



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

ESCUELA DE BIOLOGÍA BUAP

FACTORES DE VIRULENCIA Y DETERMINACION PLASMIDICA DE *Escherichia coli*
UROPATÓGENA AISLADA DE PACIENTES CON DISPLASIA CERVICAL

Tesis que para obtener el título de
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

PRESENTA:

ILSE MARIANA FLORES HERNÁNDEZ.

DIRECTORA DE TESIS:

D.C MARGARITA MARÍA DE LA PAZ ARENAS HERNÁNDEZ

Centro de Investigaciones Microbiológicas

Instituto de Ciencias

BUAP

Octubre de 2015



Agradecimientos:

Al laboratorio de Biología Molecular de enteropatógenos del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas (ICUAP).

Índice

Resumen.....	4
Introducción.....	5
Antecedentes Directos.....	17
Justificación.....	20
Hipótesis.....	21
Objetivos.....	22
Material y Métodos.....	23
Esquema de Trabajo.....	24
Resultados.....	35
Discusión.....	55
Conclusión.....	61
Bibliografía.....	62
Anexos.....	71

Resumen

Las infecciones de tracto urinario (ITU), son consideradas las infecciones más comunes en los humanos, siendo *Escherichia coli* uropatógena (UPEC) el agente etiológico principal, en un 70-95%, de este tipo de infecciones. Estas bacterias poseen una multitud de factores de virulencia entre los que se encuentran: proteínas de movilidad y adherencia, mecanismos de evasión de la respuesta inmune y sistemas de captación de hierro que le confieren la capacidad para invadir y colonizar el tracto urinario del hospedero. *E.coli* se clasifica en 4 grupos filogenéticos: A, B1, B2 y D dependiendo de su naturaleza comensal (A y B1) o patógena (B2 y D). Por otro lado la comparación de perfiles plasmídicos es un método útil para evaluar la relación de cepas de bacterias para estudios epidemiológicos. Finalmente la displasia cervical se refiere a cambios anormales en la superficie del cuello uterino lo que conlleva a un sistema inmune comprometido a combatir esta patología dejando al organismo del paciente susceptible a otro tipo de infecciones. El objetivo del presente trabajo fue analizar las características filogenéticas, fenotípicas y moleculares de 17 cepas de *Escherichia coli* uropatógena aisladas de pacientes con diagnóstico de displasia cervical cursando con infección de tracto urinario. Se encontró que el grupo B2 fue el predominante, seguido por el grupo A y D y en último lugar el grupo B1. Los plásmidos más frecuentes son de 92, 4.2 y 1.4 Kb. El tamaño de los plásmidos va de 1.1 a 100Kb. Existen 5 cepas que no poseen plásmidos y el resto tiene de 1 a 5 plásmidos. De los 10 factores de virulencia de UPEC determinados, el factor de virulencia más común es *fimH* y *ecp1* presentándose en 16 cepas respectivamente, mientras que *cnf* no se presentó en ninguna cepa de UPEC. Con respecto a la susceptibilidad antibiótica, las cepas mostraron mayor resistencia a Cefalotina, Cefuroxima y Cloranfenicol (16 cepas) y una mayor sensibilidad a Ceftazidima (15 cepas), Netilmicina y Ceftriaxona con 14 cepas respectivamente. Estos resultados representan un avance importante en el estudio de UPEC aislada de pacientes mexicanos cursando con ITU, de los cuales existen pocos reportes. El aporte adicional es que no existen estudios de las características de UPEC aisladas de pacientes con displasia cervical y esto puede ayudar a dar una mejor alternativa de tratamiento.

Introducción.

Las infecciones de tracto urinario (ITU), son consideradas en general como la presencia de microorganismos patógenos en el tracto urinario con o sin presencia de síntomas (Wook Yun, *et al.*, 2013) y son las infecciones más comunes en los humanos (Bien, *et al.*, 2012).

Se estima que en todo el mundo se presentan al menos 150 millones de casos de ITU por año (Echevarría-Zarate, *et al.*, 2006). En México según cifras del INEGI (2011) las infecciones de tracto urinario ocupan el tercer lugar en morbilidad hospitalaria (Olvira, *et al.*, 2009).

Las mujeres son el sector poblacional que se ve más afectado por estos padecimientos debido a la proximidad morfológica del uréter con el ano (Li, *et al.*, 2010); en el 2007, el boletín Epidemiológico de la Secretaría de Salud se reportó un total de 3, 076,468 casos de infecciones del tracto urinario, de los cuales 2, 294,451 (74.5 %) fueron en mujeres y 749,755 (23%) se presentaron en hombres.

Las ITU pueden ser clasificadas de diferentes maneras: aguda o crónica, no complicada o complicada, sintomática o asintomática, nueva o recurrente, comunitaria o nosocomial y según su localización anatómica como altas o bajas, siendo esta última la más común (Echevarría-Zarate, *et al.*, 2006). Las infecciones de tracto urinario bajas se relacionan con la colonización bacteriana a nivel uretra, vejiga y en el caso de los hombres próstata; causando uretritis, cistitis y prostatitis respectivamente. Los síntomas que se presentan en las ITUs bajas incluyen dolor al orinar (disuria), orinar frecuentemente (polaquiuria), urgencia para orinar, dolor suprapúbico, presencia de sangre en la orina (hematuria) y mal olor en la orina.

Las infecciones de tracto urinario altas, por otro lado, indican la presencia de microorganismos a nivel de riñones causando pielonefritis presentando síntomas como fiebre elevada, escalofríos, dolor lumbar, náusea, vómito y urgencia para orinar (Arenas-Hernández, *et al.*, 2012). (Imagén1).

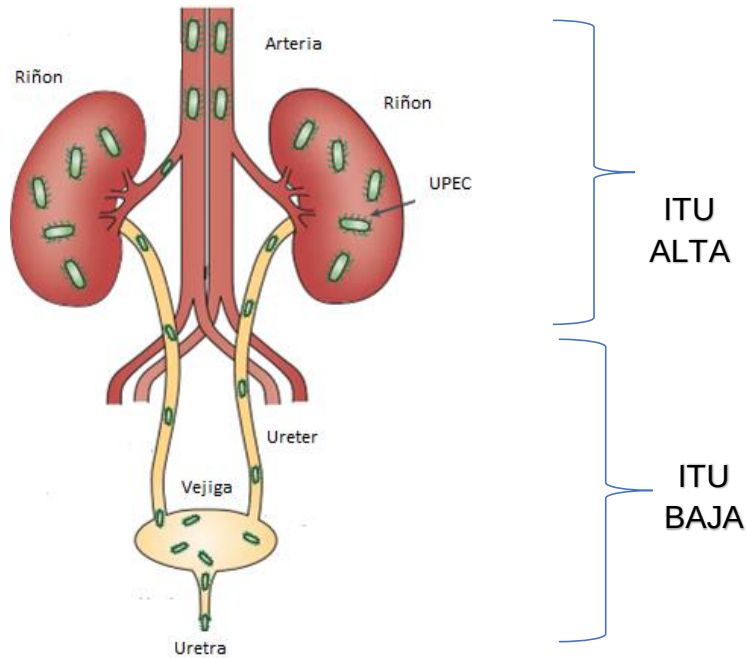


Figura 1. Colonización del sistema urinario por *Escherichia coli* uropatógena (Modificado de Kaper, *et al.*, 2004)

El tratamiento de las ITU para cada paciente va a variar de acuerdo a sus características, y es necesario considerar la creciente resistencia que *E.coli* uropatógena generan a causa de la transferencia horizontal (Platt, *et al.*, 1984). Aunque normalmente los antibióticos son efectivos contra las infecciones en vejiga, puede que no lo sean en el caso de mujeres que tienen infecciones recurrentes, de infecciones en pacientes hospitalizados, o en el caso de niños.

Debido a todo lo anterior, es recomendable realizar un antibiograma para determinar el antibiótico que dará mejor resultado para tratar la infección. Los antibióticos de primera elección para ITU baja no complicada son trimetropim-sulfametoxazol, nitrofurantoina y cefalexina; mientras que para las ITU altas complicadas Ciprofloxacina es el más recomendado seguido de antibióticos como nitrofurantoina, ac. Nalidixico y cefalexina. Por otro lado en el caso de las mujeres embarazadas se utiliza cefalexina, amoxicilina, nitrofurantoina y trimetropim-sulfametoxazol y en niños trimetropim-sulfametoxazol para infecciones bajas y ampicilina+gentamicina en el caso de infecciones de riñón.

***Escherichia coli* como principal agente causante de ITU.**

En su mayoría las infecciones de tracto urinario son ocasionadas por gérmenes procedentes de la flora normal del intestino del propio paciente, se trata de bacterias Gram negativas pertenecientes al género *Enterobacteriaceae* (Rendón, *et al.*, 2007).

Escherichia coli es el agente etiológico responsable del 80% de los casos de ITU y el 20% restante incluye organismos como *K. pneumoniae*, *S. saprophyticus*, *enterococcus spp*, *GBS*, *P.mirabilis*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Candida spp* (Flores-Mireles, *et al.*, 2015) (Ver anexo).

Escherichia coli es una especie que presenta cepas tanto patógenas como comensales. Recibe su nombre en honor a su descubridor Theodore von Escherich, quien la describió por primera vez en 1885. Forma parte de la familia *Enterobacteriaceae* (Ewing, 1985), la cual está formada por bacilos y cocobacilos gram negativos anaerobios facultativos, no formadores de esporas, fermentadores de glucosa, no presentan actividad de citocromooxidasa (son oxidasa negativa), reducen nitratos a nitritos y las especies móviles lo son mediante flagelos de distribución peritrica (Stiles *et al.*, 1981).

Dentro del grupo de las cepas de *E.coli* patógenas se encuentran las intestinales y las extraintestinales (ExPEC) en donde se encuentra *E. coli* uropatógena o UPEC, causante de las infecciones de tracto urinario; y que son normalmente identificados por tipificación serológica de sus antígenos de superficie: O (lipopolisacárido), H (flagelar) y K (capsular) (Li, *et al.*, 2010) aunque otros antígenos presentes en distintas cepas (capsulares, fimbriales y otros) han sido empleados para su clasificación o identificación (Adachi *et al.*, 2001).

E.coli es normalmente una bacteria comensal, y llega a formar una relación benéfica con su hospedero proporcionándole nutrientes y protección contra microorganismos extraños. Ciertas cepas de ésta bacteria pueden cambiar su naturaleza comensal y desarrollar una naturaleza patógena causando enfermedades para el hospedero (Wiles, *et al.*, 2008).

Factores de Virulencia de UPEC

UPEC ha desarrollado un gran repertorio de factores de virulencia que le proporcionan a la bacteria la capacidad de colonizar el tracto urinario, de persistir, de evadir la respuesta inmune del hospedero y de causar daño al mismo (Bien, *et al.*, 2012). Se pueden dividir en 4 categorías: adherencia, evasión respuesta inmune, sistemas de captación de nutrientes y toxinas (Tabla 1).

Movilidad y Adherencia	<i>fimH</i>	Adhesina de pili tipo 1
	<i>fliC</i>	Subunidades polimerizadas de flagelina.
	<i>papA</i>	Subunidad principal : fimbria P
	<i>papG1</i>	Alelos de adhesina fimbria P
	<i>papG2</i>	
	<i>papG3</i>	
	<i>Ecp1 y 2</i>	Pili común de E.coli
Sistemas captación hierro	<i>iucD</i>	Aerobactina
	<i>iha</i>	Adhesina y captación hierro
Toxinas	<i>satA</i>	Citopática y vacuolizante
	<i>satP</i>	
	<i>vatA</i>	Vacuolizante
	<i>vatP</i>	
	<i>hlyA</i>	Hemolisina α (Lisis celular)
	<i>cnf</i>	toxina citotóxica necronizante factor 1 (Internalización a célula)

Tabla 1. Principales factores de virulencia de *Escherichia coli* uropatógena

Movilidad y adherencia.

Uno de los principales factores de UPEC es el flagelo, encargado de la movilidad de la bacteria y con él puede alcanzar niveles más altos del sistema urinario como los riñones y provee una gran estrategia de colonización. El flagelo está compuesto por subunidades polimerizadas de flagelina codificadas por el gen *fliC* y es un indicador de la gravedad de la enfermedad (Karam et al., 2012)

La enfermedad comienza con la habilidad de la bacteria para unirse al tejido y así colonizar el tracto urinario. La adherencia al tejido del hospedero por UPEC es el proceso principal de colonización el cual involucra la participación de varias adhesinas que actúan al mismo tiempo o dependiendo de la etapa de la infección. Una gran cantidad de bacterias incluyendo *E.coli* posee fibras poliméricas adhesivas llamadas “pili” o “fimbrias” que facilitan el anclaje inicial de la bacteria (Rondón *et al.*, 2007). Se han identificado varios tipos de estas fimbrias tanto de cepas virulentas como en comensales, ya que estas también tienen que colonizar el tracto digestivo.

Se tiene bien identificado un pili denominado pili común de *E. coli* (**ECP**), compuesto de pilina, una proteína de 21Kda y que es codificado por el gen *ecp1*.

Una fimbria importante en la colonización de UPEC al epitelio del tracto urinario, es la fimbria tipo 1, la cual se une a uroplaquinas manosiladas del urotelio, vía la adhesina **FimH** ubicada en la punta de la fimbria (Karam, *et al*; 2012). La fimbria tipo 1 favorece la colonización y la activación de la respuesta inmune primaria del hospedero, (Figura 1). FimH es la encargada de mediar el enlace con el hospedero por receptores de reconocimiento y desatar la respuesta inmune innata y está codificada por el gen con el mismo nombre.

Otra fimbria importante en la adherencia de UPEC es la Fimbria P, que fue la primera en describirse. Esta fimbria está codificada por el gen **pap** (pili asociado a pielonefritis por sus siglas en inglés) que consiste en 11 genes, la subunidad principal es codificada por **papA** mientras la punta que funciona como adhesina es codificada por *papG* que posee tres alelos: **papG1, papG2 y papG3**.

Las siguientes fimbrias importantes son las pertenecientes a la familia Afa/Dr que consisten en adhesinas fimbriales como F1845, Dr, Dr-II, Afa-3 y afimbriales como Afa1. Se ha reportado que de un 30-40% de cepas de UPEC aisladas de pacientes embarazadas con pielonefritis tienen este tipo de adhesinas (Arenas-Hernández, *et al.*, 2009).

Otra de las primeras estrategias de *E.coli* para sobrevivir y generar una enfermedad crónica es la formación de comunidades bacterianas intracelulares (IBC). La formación de estas comunidades comienza 3 horas después de que la bacteria entra al hospedero y se adhiere a las células epiteliales; esta unión desencadena la actividad de RhoA, Cdc42 y Rac1 que posteriormente activan adhesina cinasas, fosfoinositidín 3-cinasa, α -actinina y vinculina lo que provoca un re arreglo de los filamento de actina de la membrana de la célula del hospedero cambiando su conformación y formando una extensión alrededor de la bacteria internalizándola y logrando que la infección se vuelva recurrente evadiendo con ello los mecanismos de eliminación por parte del hospedero (Anderson, *et al.*, 2004).

Además de su gran capacidad de adherencia, UPEC posee un gran repertorio de otros factores de virulencia (FV's) de los cuales en su mayoría depende la gravedad de la enfermedad. Normalmente estos factores no se codifican en el genoma de la bacteria sino por inserciones génicas que no se encuentran normalmente en cepas no patógenas. Estas regiones cromosomales conocidas como islas de patogenicidad (Hacker, *et al.*; 1997) son regiones >10kb flanqueadas por secuencias repetidas e inestables; debido a esto último, en estas zonas del genoma es donde se lleva a cabo la transferencia horizontal de genes entre bacterias patógenas y en muchos casos de bacterias comensales a patógenas (Oelschlaeger, *et al.*, 2002, Hentschel, *et al.*, 2011).

Toxinas.

Dentro de los factores de virulencia de UPEC se encuentran las toxinas, secretadas por la bacteria para dañar y matar a las células epiteliales de su hospedero y así incrementar su capacidad invasiva. α -hemolisina, una de las toxinas más comunes de UPEC, es codificada por el gen **hlyA** y es capaz de provocar lisis celular con el objetivo de liberar nutrientes que ayudaran a la bacteria a su crecimiento y supervivencia (Yun, *et al.*, 2013, Nagy, *et al.*, 2006). Algunos estudios han demostrado que **HlyA** en altas concentraciones forma poros multiméricos en la membrana de las células eucariontes llevándolas a la lisis celular (García, *et al.*, 2013); mientras que a bajas concentraciones esta proteína interfiere en la

señalización de las células del hospedero llevándolas a la apoptosis. De otra manera, HlyA también tiene como blanco algunas serin-proteasas y la capacidad de desactivar la exfoliación (Dakal, *et al.*, 2012).

La toxina conocida como factor necronizante citotóxico (**CNF1**) es una proteína de 115kDa que le confiere características invasivas a UPEC (Hofman *et al.*, 2000), induciendo la motilidad de las células epiteliales alterando las uniones celulares y permitiéndole a la bacteria internalizarse a las células epiteliales. En las células del hospedero, CNF causa rearreglos del citoesqueleto, específicamente de los filamentos de actina, multinucleación y propagación celular, formación de lamelopodios y filopodios, apoptosis de células uroteliales, disminución de la trans migración de leucocitos polimorfonucleares (PMN) y modificación de la estructura de las microvellosidades de las células epiteliales (Hofman, *et al.*, 1998), mientras en monocitos y macrófagos aumenta el contenido de actina filamentosa provocando una disminución de la fagocitosis (Capo, *et al.*, 1998, Hofman *et al.*, 2000). Algunos autores afirman que CNF1 es necesaria y posiblemente suficiente para la internalización de la bacteria confirmando a ésta una alta prevalencia de la infección (García, *et al.*, 2013).

Otra toxina, descrita no hace mucho tiempo, es la toxina auto transportadora secretada (**Sat**), que pertenece al sub-grupo de auto transportadores conocido como SPATE (auto transportadoras serin proteasa de *Enterobactereaceae*) identificadas por la presencia de un sitio activo serin proteasa en el dominio pasajero; este grupo de proteínas están asociadas generalmente con la patogenicidad de las bacterias y la evasión del sistema inmune del hospedero. Específicamente, Sat provoca efectos citopáticos en vejiga y en riñón, particularmente a glomérulos y túbulos proximales debido a su actividad citopática y vacuolizante (Guyer, *et al.*, 2000, Guyer, *et al.*, 2002).

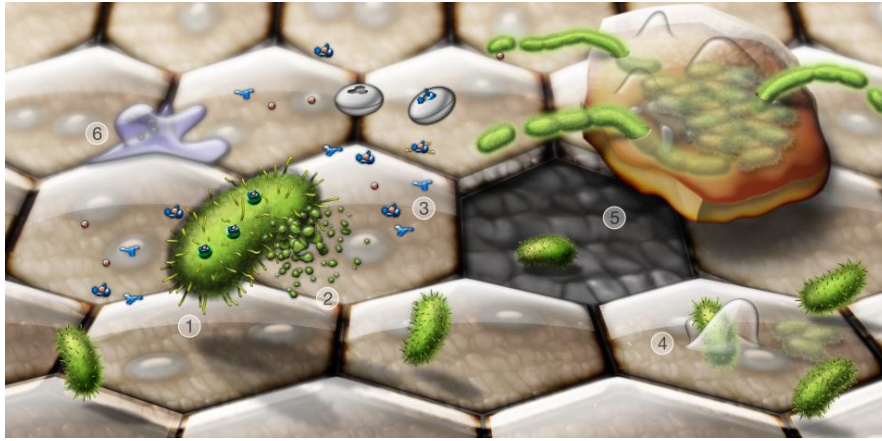


Figura 2. Proceso de colonización de UPEC. (1)UPEC se adhiere al epitelio del tracto urinario a través de la fimbria tipo 1. (2) secreción de toxinas por UPEC para dañar y matar a las células epiteliales de su hospedero, Vg. α -hemolisina; (3) Sistemas de sideroforos que pueden ser expresados con diferentes combinaciones dependiendo de la cepa y para competir por la captación de hierro con el hospedero (Ulett, *et al.*, 2013). (4) Formación de comunidades bacterianas intracelulares (IBC), rearreglo de los filamentos de actina de la membrana de la célula del hospedero e internalización (5) La bacteria sale de la célula infectada antes de que se complete la exfoliación, promoviendo la diseminación bacteriana y la persistencia de la infección. (6) Reclutamiento y activación de defensas del hospedero (modificado de Wiles., *et al*, 2009)

Vat, la toxina autotransportadora secretada, es otra toxina perteneciente al grupo SPATE capaz de inducir vacuolas intracelulares causando efectos citotóxicos. Principalmente su toxicidad recae en su actividad vacuolizante la cual es necesaria cuando la enfermedad termina en sepsis (Parreira y Giles., 2003). Todas las toxinas pertenecientes a la familia SATE tienen actividades parecidas y en ausencia de uno, otros pueden suplantar su lugar ya que son indispensables para la colonización de *UPEC* (Parham, *et al.*, 2005).

Sistemas de captación de hierro

Es bien conocido que en los mamíferos, el hierro es muy escaso dentro del tracto urinario y ya que es altamente requerido para el desarrollo de *UPEC*, la bacteria ha desarrollado 4 sistemas de sideroforos: la aerobactina hydroxamate, dos catecolatos: enterobactina y salmochelina y yersiniabactina, un sideróforo de tipo mixto; que pueden ser expresados con diferentes combinaciones dependiendo de la cepa, lo que le confiere una manera de secuestrar y competir con las células epiteliales por los bajos recursos de hierro en el ambiente (Ulett, *et al.*, 2013, Yun, *et al.*, 2013).

Cada sideróforo es reconocido por un receptor de hierro: **Iron** media la captación de salmochelina, **lucD** la de aerobactina, **Iha** media la captación de enterobactina y **FyuA** media la captación yersiniabactina. Mientras que existen receptores como **Chua** y **Hma** que median la captación directa del grupo hemo (Spurbeck, *et al.*, 2013)

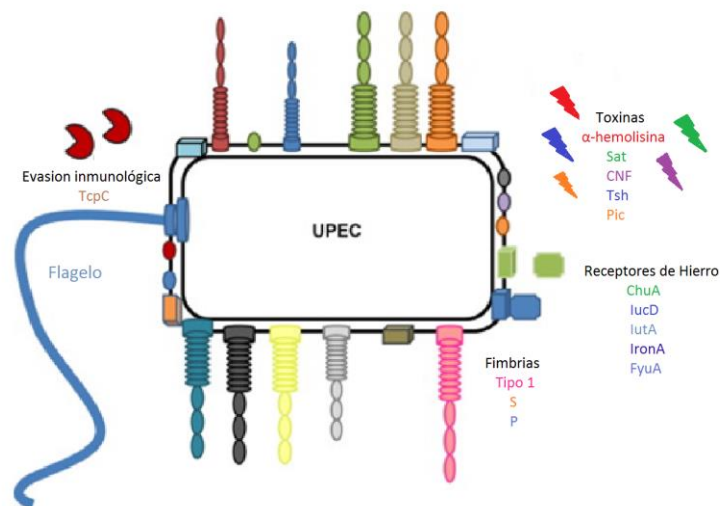


Figura 3. Factores de virulencia de UPEC. (Modificado de Spurbeck, *et al.*, 2013)

Plásmidos.

Un elemento clave para la virulencia de UPEC es el material plasmídico. Los plásmidos son elementos genéticos extracromosomales que poseen una gran cantidad de determinantes genéticos no necesarios para la sobrevivencia de la bacteria pero que le confieren a ésta ventajas ante ambientes adversos o contra otros microorganismos. Los elementos genéticos codificados en los plásmidos se pueden clasificar en 4 grupos: resistencia, energía y metabolismo, virulencia y patogenicidad y diseminación (Redondo, *et al.*, 2007). Desde los primeros reportes de transferencia de genes de resistencia por Platt y colaboradores (1984) se le comenzó a prestar especial atención a éste tipo de material genético, ya que son agentes importantes en la transferencia horizontal de genes en UPEC teniendo un rol importante en la adaptación a los cambios de ambiente.

Conocer el perfil plasmídico de cepas bacterianas nos provee de información acerca de la relación de la bacteria con la enfermedad así como la relación entre perfiles de resistencia y virulencia de diferentes cepas. Por otro lado la investigación de los mismos ha llevado a determinar varios marcadores distintivos de ciertas cepas patógenas para estudios epidemiológicos. (Celebi, *et al.*, 2007, Farshad, *et al.*, 2012).

En UPEC se sabe que los plásmidos albergan información de resistencia a varios antibióticos como cloranfenicol, tetraciclina, trimetopin-sulfametoazol (Redondo, *et al.*, 2007) y de varios factores de virulencia. Algunos estudios afirman que patotipos como APEC (patógeno aviar), y cepas diarreogénicas de *E.coli* sirven de reservorio de UPEC de plásmidos asociados a resistencia o virulencia (Johanson, *et al.*, 2007, Abe, *et al.*, 2008).

Grupos filogenéticos.

La filogenia bacteriana nos puede dar de manera general una idea de las características fenotípicas y genotípicas de una determinada cepa; se han determinado 4 grupos filogenéticos para *E.coli*: A, B1, B2 y D. Las cepas virulentas pertenecen principalmente al grupo B2 y en menos proporción al D; mientras las cepas comensales se encuentran en el grupo B1 y A. Clermont y colaboradores (2000) implementaron una técnica para la identificación del grupo filogenético de *E.coli* basado en la amplificación de los genes: *chuA*, *yjaA* y un fragmento de DNA denominado *TSPE4.C2* mediante una PCR múltiple basándose en la presencia o ausencia de estos 3 genes (Figura 4).

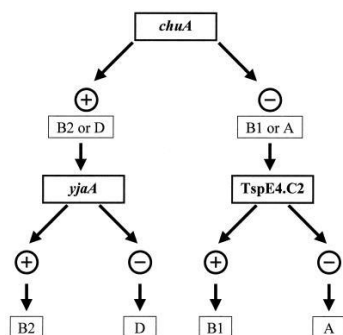


Figura 4. Árbol dicotómico propuesto por Clermont (2000) para determinación de grupo filogenético de cepas de *E.coli* basada en la amplificación de los genes *chuA*, *yjaA* y *TSPE4.C2* mediante PCR.

Resistencia a Antibióticos:

La resistencia a antibióticos se ha vuelto un grave problema a nivel mundial; ya que van emergiendo rápidamente con el paso del tiempo y diseminándose, principalmente entre bacterias nosocomiales.

Se ha vuelto altamente recomendable la realización de perfiles de sensibilidad debido a la gran cantidad de cepas resistentes a antibióticos de primera elección como Ampicilina y Trimetropin-Sulfametoxazol para dar un tratamiento adecuado a cada paciente (Celebi, *et al.* 2007).

Pacientes inmunocomprometidos: Displasia cervical

La displasia epitelial cervical es un término designado a finales de los años cincuenta para designar la atipia epitelial cervical (Reagan *et al.*, 1953). Este padecimiento se categorizó en tres categorías, leve, moderada y pronunciada, según el grado de afectación de la capa epitelial por las células atípicas llegando en algunos casos a progresar hasta el desarrollo de carcinoma cervical.

Se debe aclarar que la displasia cervical es considerada un motivo, dentro de un gran universo de afectaciones, que genera huéspedes inmunocomprometidos (HIC) siendo estos un blanco fácil para las infecciones oportunistas (IO) producidas por gérmenes habitualmente no patógenos o en su defecto por organismos patógenos pero con un grado de virulencia que supera a lo habitual en huéspedes normales (Sellors, *et al.*, 2003).

Antecedentes directos.

Estudios previos como el de Abe y colaboradores (2008) han demostrado que cepas de UPEC producen toxinas (α -hemolisina o Hly), factor necronizante citotóxico (CNF) serina proteasa (Sat) y sideróforos. Además proponen que nuevos genes como el homólogo de *irgA* de *Vibro cholerae* en UPEC o *iha* contribuyen en el establecimiento de ciertas ITU. En este estudio se analizaron 225 cepas de UPEC para determinar genes que codifican para VF. Los genes se encontraron con mayor frecuencia fueron *fim* (93.8%), *irp2* (Yersinia) (68.9%), *kps* (Cápsula) (51.5%), *pap* (Pili asociado a pielonefritis) (45.8%), *hly* (Hemolisina) (44.0%), *iha* (adhesina) (40.4%), *aer* (sideróforo aerobactina) (39.6%), *sfa* (Receptor aerotaxis) (29.8%) y *cnf* (factor necrotizante citotóxico) (23.6%).

En otros estudios se reporta que los genes *pap* y *aer* se encuentran en 25% de las cepas de UPEC mientras que *sfa* (adhesina de fimbria S) y *cnf* se encontraron en 46% y 17% respectivamente (Alabsi, et al., 2014).

En el estudio de Yun y colaboradores (2013) *fimH*, fue el factor de virulencia más común en ITU y en segundo lugar se encontró *pap* presentándose en el 60% de las cepas. Diversos estudios concuerdan con que *fimH* es de los genes más conservados en UPEC por ejemplo el trabajo de Tiba en cual en de 162 cepas estudiadas el 97.5%, presentaba este gen. Este resultado concuerda con el de Karam y colaboradores en el que el 100% de las cepas (20) presentaban *fimH* y *fliC*, otro de los genes mejor conservados de UPEC (Yun et al., 2013, Tiba et al., 2008, Karam et al., 2013).

En estudios como el de Shwan y colaboradores (2010) se encontró que de 33 cepas aisladas de pacientes con ITU, no se encontraron los genes *cnf*, *papG*, *hlyC* y *sfa* pero todos poseían el gen de *fimH* y todos menos uno presentaron *aer* (Shwan, et al., 2010).

Otros estudios demuestran que en UPEC existen componentes adicionales de membrana de UPEC que le ayudan a colonizar como son las fimbrias *P*, *F1C*, *S* (Ulett, et al., 2013).

Estudio como el de Rendón y colaboradores (2007) muestran que el gen *ecp* está presente en el 71.6% de las bacterias de *E.coli* intestinales y extraintestinales así como en cepas comensales (Rendón, et al., 2007)

Desde que existen cepas resistentes a fármacos de primera línea se ha vuelto de gran interés determinar la multiresistencia y relacionarla con la virulencia de las cepas. Se ha reportado que el 40% de las cepas de UPEC, son multiresistentes al menos a 2 grupos diferentes de antibióticos (β -lactámicos, aminoglucósidos o quinolonas) (Alabsi, *et al.*, 2014). En el mismo estudio se encontró que no existe en UPEC una relación significativa entre virulencia y resistencia; 74% de las cepas fueron resistentes a trimetropin-sulfametoxazol (tsx) concordando con resultados previos en donde el rango es de 46 a 71.5%, pero contrastando con resultados de Estados Unidos y Tunisia aislados de pacientes hospitalizados y ambulatorios, en donde 37.3 y 16.8% respectivamente de las cepas son resistentes a estos mismos antibióticos y del 63 al 66% de las cepas fueron resistentes a quinolonas y de 11 al 57% a aminoglucósidos. En contraste, Yun afirma que los genes *pap* (excepto *papGIII*) *sfa*, *kpsMTII*, *fyuA* y *hlyA* están asociados con baja resistencia a antibióticos mientras que la resistencia a Ac. Nalidíxico está asociada a una baja prevalencia de *sfa*, *pap*, *hly* y *cnf* (Yun *et al.*, 2013, Celebi, *et al.*, 2007, Mittal, *et al.*, 2014).

Varios trabajos como el de Schwan y colaboradores (2010) y Clermont y colaboradores (2000) afirman que las cepas virulentas pertenecen al grupo B2 y en menor proporción al D y que dentro de los grupos B1 y A se encuentran principalmente las cepas comensales y en el estudio de Parhan, 2005, demuestran que hay más toxinas como *sat* y *vat* en cepas del grupo B2.

Con respecto a los plásmidos de UPEC el trabajo de Ebenebe y colaboradores (2014) reporta plásmidos de 30kb, 20kb y 11kb en cepas de UPEC aisladas de niños menores de 16 años en Nigeria. En cepas de UPEC multiresistentes se encontraron plásmidos de tamaño de 2 a 51kb siendo el de 32kb el más común (Ebenebe, *et al.*, 2014). En otro estudio se obtuvo el perfil plasmídico de 118 cepas de UPEC, los plásmidos presentaron un tamaño que va de 1 a 25kb y el más común fue de 29kb (Ayten, *et al.*, 2012).

Justificación

Las infecciones de tracto urinario son a nivel mundial consideradas las más comunes en los seres humanos y al ser *Escherichia coli* uropatógeno el agente etiológico más común en este tipo de infecciones resulta de gran importancia conocer algunos de los mecanismos moleculares de virulencia que confieren a UPEC un gran éxito infeccioso particularmente en aquellas cepas de UPEC obtenidas de ITU de pacientes con displasia cervical.

Hipótesis:

Las cepas de *Escherichia coli* uropatógena aisladas de pacientes con displasia cervical presentan factores de virulencia característicos y existe una relación de estos factores con la resistencia antibiótica. Adicionalmente el grupo filogenético y la presencia de plásmidos de dichas cepas está relacionada con sus características patogénicas.

Objetivos

Objetivo general:

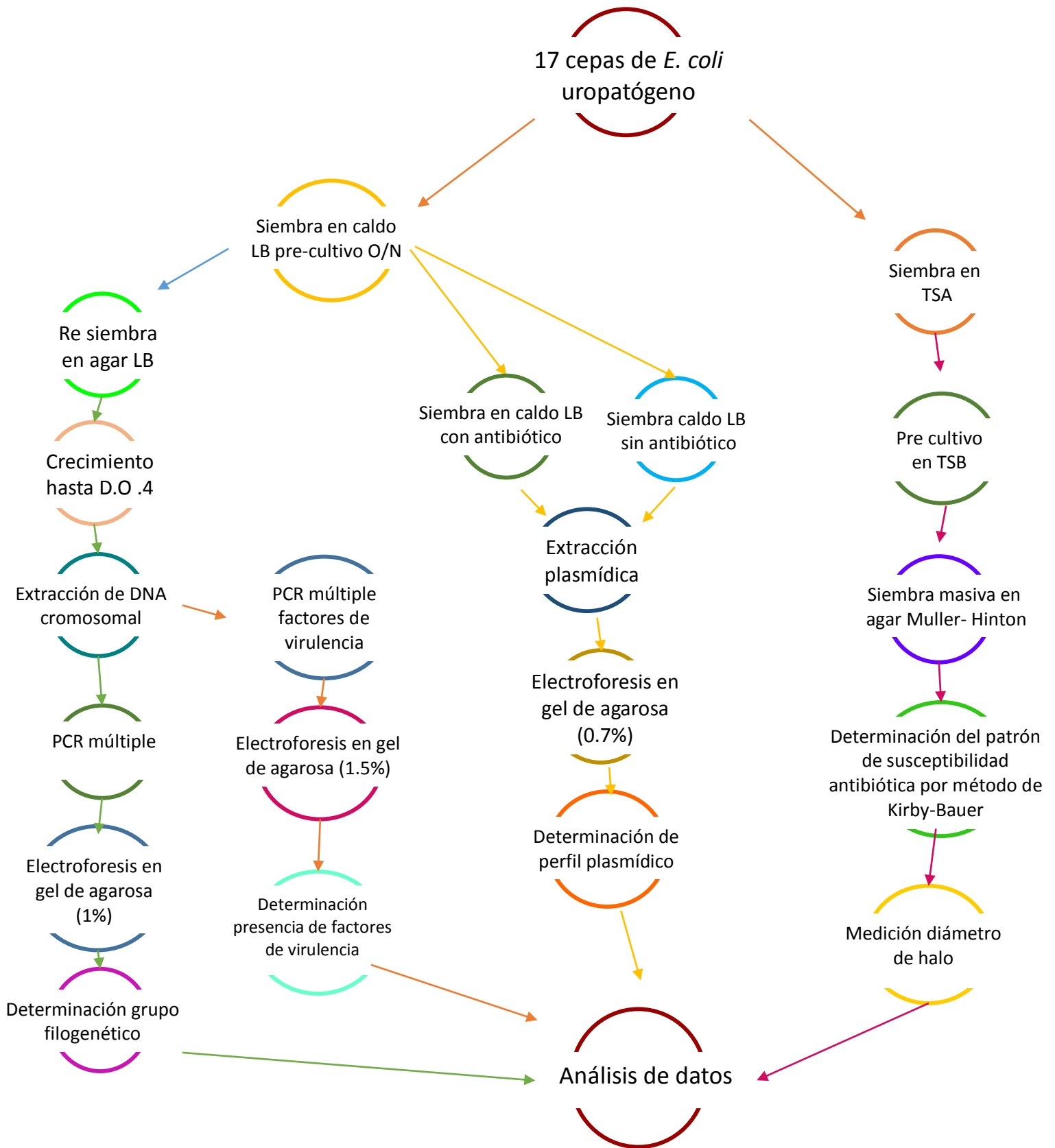
Analizar las características filogenéticas, fenotípicas, plasmídicas y moleculares de *Escherichia coli* uropatógena aislada de pacientes con diagnóstico de displasia cervical cursando con infección de tracto urinario.

Objetivos particulares:

- Determinar el grupo filogenético de cepas de *E. coli* uropatógena.
- Determinar el perfil plasmídico.
- Determinar el perfil de susceptibilidad a 17 antibióticos usados comúnmente en el tratamiento de ITU.
- Comparar el perfil plasmídico de cepas crecidas con y sin antibiótico
- Determinar la presencia de genes que codifican para factores de virulencia característicos UPEC.

Material y Métodos.

Esquema de trabajo:



En el presente estudio se trabajó con 17 cepas de *E.coli* uropatógena aisladas de pacientes con diagnóstico de displasia cervical cursando por infección de tracto urinario. Las cepas fueron obtenidas del hospital de la mujer, localizado en la ciudad de Puebla y aisladas en un trabajo previo del laboratorio de biología molecular de enteropatógenos del centro de Investigaciones Microbiológicas (ICUAP) en colaboración con el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas, ambos de la BUAP en el 2014 (Hernández Cotzomi y Lima González. Tesis de Licenciatura, 2014). La denominación de las cepas es de CD2 por displasia cervical segundo muestreo, seguidos de un guion y el número que identifica cada cepa. De esta forma se trabajó de la cepa CD2-25 a la cepa CD2-41.

Las cepas control fueron donadas por el Departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina UNAM, para usarlas como control positivo de las 5 diferentes PCRs (Tabla 6) dependiendo de su genotipo y fenotipo (Tabla 2).

Cepa	Serotipo	<i>iucD</i>	<i>vat</i>	<i>sat</i>	<i>iucD</i>	<i>hlyA</i>	<i>papA</i>	<i>papGI</i>	<i>papGII</i>	<i>papGIII</i>	<i>fliC</i>	<i>fimH</i>	<i>cnf</i>	<i>ecp</i>
CFT073	O6:K2:H1	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+
CR16	O1:H34	N/D	N/D	N/D	N/D	+	+	-	+	-	N/D	N/D	N/D	N/D
059I	O2:H-	N/D	+	+	+	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
GAG1	N/D	+	-	+	N/D	+	+	N/D	N/D	N/D	+	+	+	N/D
EDL	O157:H7 silvestre	N/D	+	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	+

Tabla 2. Genotipo y fenotipo de las cepas utilizadas como control positivo. N/D (No determinado).

Extracción genómica.

Se inocularon 75 µl de cultivo de toda la noche de la cepa problema, 4 hrs a 37° hasta obtener D.O de 0.4 nm y se empaquetaron 500µl.

Se le añadieron 570µl de solución 1 y se pusieron 30 segundos en vórtex. Se le agregaron 30 µl de SDS al 20%, posteriormente se invirtieron 5 veces y pusieron en vórtex durante 20 segundos evitando hacer burbujas.

Se incubaron a 80°C por 5 minutos, posteriormente se dejó enfriar 5 minutos a temperatura ambiente. Se le adicionaron 2 µl de RNAasa y se dejaron incubar a 37°C durante 45 minutos.

Se adicionaron 200µl de NaCl 5M y se invirtió durante 20 segundos seguido de 60 segundos libre, 60 segundos en vórtex, y de un minuto en reposo. Se dejaron 5 minutos en hielo.

A continuación se centrifugaron las muestras durante 10 minutos a 12.000 rpm y se pasó el sobrenadante a un tubo nuevo. Se le agregaron 800µl de isopropanol y se invirtieron durante 1 minuto.

Posteriormente se centrifugaron 20 minutos a 12.000 rpm y se quitó el sobrenadante. Se agregaron 800µl de etanol al 70% y se centrifugaron durante 5 minutos; esas dos últimas acciones se realizaron por triplicado.

Finalmente se dejó secar la pastilla y se re suspendió en 75µl de TE 10mM pH 8.

Se conserva a -20°C

Extracción plasmídica.

Se obtuvo cultivo celular de 3 ml de crecimiento de toda la noche y se centrifugó durante 5 min a 12,000 rpm para obtener paquete celular. Se decantó y re suspendió en vórtex hasta disolver pastilla.

Se agregaron 150 µl de solución 1 (2mg de lisozima por ml de solución 1, y 1ml RNAasa por tubo). Y re suspendieron en vórtex, posteriormente se incubaron durante 15 min a 37°. Terminando este tiempo, se agregaron 300 µl de solución 2 (NaOH 0.4 N y SDS 2%) y se invirtió 5 veces, posteriormente se mantuvieron 5 minutos en hielo.

Se añadieron 420µl de solución 3 (Acetato de K 5M) y se invirtió 3 veces; se mantuvieron en hielo 15 min y se centrifugaron 20 minutos a 12000 RPM.

A continuación se decantó el sobrenadante en 400ml de fenol-cloroformo- alcohol isoamílico (25:24:1) e invirtió suavemente 50 veces, posteriormente se centrifugó

durante 5 minutos y se transfirió el sobrenadante a un tubo con 400µl de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y se invirtió 100 veces.

Posteriormente se centrifugó durante 5 minutos y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo añadiendo alcohol absoluto hasta 1.5ml.

Se mantuvo a -20° durante toda la noche. Al día siguiente se centrifugó 15 minutos y se decantó el sobrenadante, agregando 800 µl de etanol al 70% y centrifugó durante 5 minutos.

Finalmente se decantó el sobrenadante y se dejó secar pastilla. Se re-suspendió en 70µl de agua tri-destilada y almacenó a -20°.

Determinación de grupo filogenético:

Se realizó la determinación del grupo filogenético siguiendo el protocolo de Clermont (2000) basados en la amplificación de 3 genes (*chuA*, *yjA* y *tspE*) mediante una reacción en cadena de la polimerasa (ver tabla 3). El grupo filogenético de cada cepa se determinó por la presencia o ausencia de los 3 productos de amplificación de acuerdo al esquema de Clermont (Ver tabla 4 y Figura 4).

A	Grupo Filogenético	
	Desnaturalización	94°
	Alineamiento	55°
	Extensión	72°
	Nº Ciclos	30
B	Mezcla por tubo	
	H2O	-
	Buffer	2
	MgCl	1.2
	C1	1
	C2	1
	Y1	1
	Y2	1
	T1	1
	T2	1
	DNTP`s	0.5
	Taq Pol	0.5

Tabla 3. (A) Detalles del programa de termociclador para la amplificación de *chuA*, *yjA* y *tspE*. (B) Mezcla de reacción por tubo.

Grupos filogenéticos	Amplifica		
	chuA	yjaA	TSPE.4C2
A	-	+/-	-
B1	-	+/-	+
B2	+	+	+/-
D	+	-	+/-

Tabla 4. Relación usada para la determinación del grupo filogenético. Basada en la presencia o ausencia de los productos de amplificación (Clermont, *et al.*, 2000).

Perfil de susceptibilidad a antibióticos por el método de Kirby-Bauer.

Se sembraron 20 µl de la cepa problema en medio TSA por estría cruzada para aislar una colonia y se dejó crecer durante toda la noche. Se tomó una colonia bien aislada y se re sembró en medio TSB y se dejó incubar a 37° hasta alcanzar una turbidez equivalente a $1,5 \times 10^6$ UFC/ml (Equivale al tubo No. 5 de la escala de Mc Farland). Posteriormente se sumergió un hisopo en el cultivo eliminando el exceso rotándolo contra la pared interna del tubo y se sembró frotando el hisopo sobre la superficie del medio de cultivo se repite esta acción 3 veces girando la placa 45° para sembrar uniforme y masivamente la placa. Se dejó secar la muestra durante 3 minutos y se colocaron los discos de antibióticos con una pinza estéril oprimiendo ligeramente con la pinza para asegurar el buen contacto con el medio; los sensi discos se colocaron dependiendo del tamaño del halo que forman, para que se pudieran apreciar mejor (Figura 5).

Finalmente se incubaron a 37°C durante 18 horas y se midieron los halos de inhibición para determinar la resistencia o sensibilidad de las cepas a los antibióticos (Tabla 5) según la “Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing”.

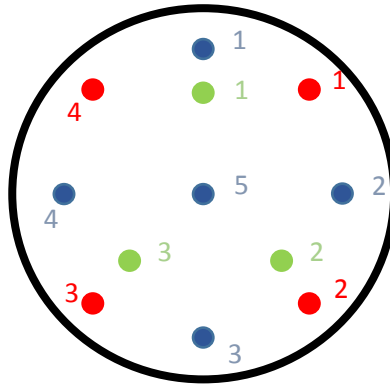


Figura 5. Distribución de discos de antibióticos. Azul: 1GM (Gentamicina), 2NET (Netilmicina), 3OFX (Ofloxacina), 4TSX (Tri-Sul), 5AMK (Amikacina) (Placa 1). 1AM (Ampicilina), 2LVX (Levofloxacina), 3MAC (Nitrofurantoina), 4NOR (Norfloxacina), 5CF (Cefalotina) (Placa). **Rojo:** 1CFZ (Ceftazidima), 2CFX (Cefuroxima), 3C (Cloranfenicol), 4AN (Ac.Nalidixico). **Verde:** 1CRO (Ceftriaxona), 2CIP (Ciprofloxacina), 3CTX (Cefatoxima).

Se utilizó como control la cepa *Escherichia coli* ATCC25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Los patrones de susceptibilidad de las cepas control, la concentración de cada sensi-disco y los criterios de interpretación se muestran en la Tabla 5.

Valores de referencia*					Valores de resistencia**		
	Antibiótico	Concentración	<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Resistentes	Intermedias	Sensibles
GM	Gentamicina	10 ug	19-26	17-23	<12	13-14	>15
NET	Netilmicina	30 ug	22-30	17-23	<12	13-14	>15
OFX	Ofloxacina	5 ug	29-33	17-21	<12	13-15	>16
TSX	Trimetropim/ Sulfametoxazol	1.25/ 23.75ug	23-29	-	<10	11-15*	>16
AMK	Amikacina	30 ug	19-26	18-26	<14	15-16	>17
AM	Ampicilina	10 ug	16-22	-	<13	14-16	>17
LVX	Levofloxacina	5 ug	29-37	19-26	<13	14-16	>17
MAC	Nitrofurantoina	300 ug	20-25	-	<14	15-16	>17
NOR	Norfloxacina	10 ug	28-35	22-29	<12	13-16	>17
CF	Cefalotina	30 ug	15-21	-	<14	15-17	>18

CFZ	Ceftazidima	30 ug	25-32	22-29	<17	18-20	>21
CFX	Cefuroxima (oral)	30 ug	20-26	-	<14	15-22	>23
C	Cloranfenicol	30 ug	21-27	-	<12	13-17	>18
AN	Ácido Nalidixico	30 ug	22-28	-	<13	14-18	>19
CRO	Ceftriaxona	30 ug	29-35	17-23	<19	20-22	>23
CIP	Ciprofloxacina	5 ug	30-40	25-33	<15	16-20	>21
CTX	Cefotaxima	30 ug	29-35	18-22	<22	23-25	>26

Tabla 5. Concentraciones de antibióticos, valores de cepas control para antibiogramas y valores de interpretación del antibiograma. Por Kirby-Bauer según los criterios de “Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing”, página 130.

Perfil plasmídico de cepas resistentes a antibióticos de primera y segunda elección.

Con base al perfil de resistencia a antibióticos, se seleccionaron las cepas resistentes a Ampicilina (9); y de las cepas no resistentes a AM (8), 6 cepas fueron resistentes a Cloranfenicol (C), seleccionando estos dos antibióticos por ser de primera elección para infecciones de tracto urinario. Y se seleccionaron las 4 cepas resistentes a Gentamicina (GE), por ser el antibiótico más recurrente de segunda elección. Dos de las cepas no fueron resistentes a ninguno de los 3 antibióticos AM, C o GE (Ver tabla 6).

En base a esta selección, las cepas se cultivaron en medio LB sin y con el antibiótico determinado (AM: 100mg/ml, GE: 25 mg/ml, C: 34mg/ml) durante toda la noche para su posterior extracción plasmídica.

Cepa	Ampicilina (AM) 100µg/µl	Cloranfenicol (C) 10µg/µl	Gentamicina (GE) 15µg/µl
25	S	S	S
26	R	S	R
27	R	S	S
28	R	S	R
29	R	S	S
30	S	R	S
31	R	S	R
32	R	S	S
33	R	S	S
34	S	R	S
35	S	R	S
36	S	S	S
37	S	R	S
38	R	S	S
39	S	R	S
40	S	S	S
41	R	S	R

Tabla 6. Antibióticos utilizados en cada cepa para comparación del perfil plasmídico en presencia y ausencia de antibiótico dependiendo de su perfil resistencia a AM, C y/o GE. (R) Resistente, (S) Sensible.

Determinación de la presencia de factores de virulencia:

Se determinó la presencia de 12 factores de virulencia mediante la amplificación de 15 genes (Ver tabla 7) por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), estas amplificaciones se realizaron mediante 4 reacciones de PCR múltiple (PCRM) usando diferentes temperaturas (Ver tabla 8).

Gen	Nombre Oligo	Tamaño amplificado	Cepa control
<i>iucD</i>	iucD-30F	612pb	CFT073
	iucD 512R		
<i>satA</i>	satA 978F	384pb	
	satA 1321R		
<i>fliC</i>	flicC 242F	304pb	
	flicC 445R		
<i>fimH</i>	fimH F	210pb	
	fimH186R		
<i>papG2</i>	papGII-113F	562pb	CFT073 CR16 059I
	papGI/G3F		
<i>papG3</i>	papG1-925R	421pb	
	papG2/G3 R		
<i>vatA</i>	vatA 1076F	330pb	
	vatA1406R		
<i>vatP</i>	vatP-86F	226 pb	
	vatP 226R		
<i>iha</i>	iha EMSA L	150pb	
	iha EMSA R		
<i>CNF</i>	CNF -70F	3176pb	GAG1
	CNF 60R		
<i>hlyA</i>	hly-133F	1280 pb	
	hly-1348R		
<i>satP</i>	satP -82F	880pb	
	satP 620R		
<i>papA</i>	papA-45F	641pb	
	papA 31R		
<i>ECP1</i>	1F	296pb	EDL
	1R		
<i>EPC2</i>	1F	500pb	
	1R		

Tabla 7. Genes de virulencia de UPEC amplificados por PRCm. Se muestra el nombre del gen, los oligonucleótidos utilizados, el tamaño del fragmento en pares de bases (pb) y la cepa control utilizada.

A

PCR 1	
Desnaturalización	94°
Alineamiento	57.7°
Extensión	72°
Nº Ciclos	30

Mezcla Maestra por tubo	
H2O	-
Buffer	2.5
MgCl	0.75
iucD F/R	0.5
satP F/R	0.5
fimH F/R	1
FlicC F/R	0.2
DNTP`s	0.5
Taq Pol	0.5

B

PCR 2	
Desnaturalización	94°
Alineamiento	64°
Extensión	72°
Nº Ciclos	30

Mezcla Maestra por tubo	
H2O	-
Buffer-MgSO4	2.5
papG2 F/R	1
papG3 F/R	1
vatA F/R	1
vatP F/R	1
Iha F/R	1
DNTP`s	0.5
Taq Pfu	.25

C

PCR 3	
Desnaturalización	94°
Alineamiento	61.4°
Extensión	72°
Nº Ciclos	29

Mezcla Maestra por tubo	
H2O	-
Buffer-MgSO4	2.5
CNF F/R	2.5
hlyA F/R	0.5
satP F/R	0.35
papA F/R	0.35
DNTP`s	0.5
Taq Pfu	0.3

D

EPC	
Desnaturalización	94°
Alineamiento	55°
Extensión	72°
Nº Ciclos	30

Mezcla Maestra por tubo	
H2O	-
Buffer	2.5
MgCl	2.5
1 F/R	0.2
2 F/R	0.2
DNTP`s	0.5
Taq Pol	0.25

Tabla 8. (A) Detalles del programa y de la mezcla para realización del PCRM1. (B) Detalles del programa y de la mezcla para realización del PCRM2. (C) Detalles del programa y de la mezcla para realización del PCRM3. (D) Detalles del programa y de la mezcla amplificación del gen EPC.

Análisis estadístico.

El análisis estadístico se realizó con ayuda del programa R. La significancia de los análisis se tomaron con un valor de $P < 0.05$, es decir con un 95% de confiabilidad.

Se realizó un análisis de covarianza para ver si se encontraban diferencias significativas entre las características de las cepas.

Resultados.

Con la finalidad de llevar a cabo la determinación del grupo filogenético de 17 cepas de UPEC aisladas de ITU de pacientes con diagnóstico de displasia cervical, se procedió a realizar primero la extracción de DNA genómico mediante el método previamente descrito en material y métodos. La pureza y determinación de la concentración del DNA se determinó por electroforesis en gel de agarosa al 0.7% y por determinación de su densidad óptica a 260nm (DO_{260nm})(Figura 5).

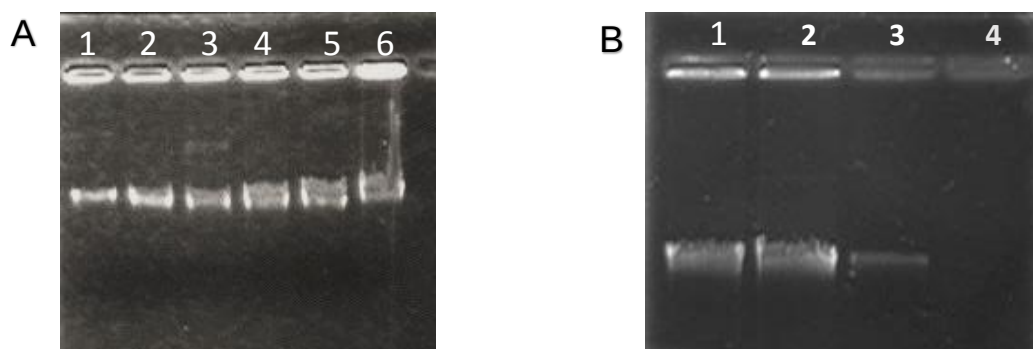


Figura 6. Fotografía representativa de electroforesis en gel de agarosa (0.7%) de extracción de DNA genómico de cepas de UPEC aislada de displasia cervical. (A)Carril 1. CD2-25, carril 2. Carril 3. CD2-30, Carril 4. CD2-32, carril 5 CD2-34, Carril 6. CD2-40, carril 7. CD2-41 (B) Carril 1. Carril 2. CD2-35, carril 3. CD2-39, carril 4.CD2-37.

Posteriormente usando el DNA genómico como templado se realizó la reacción en cadena de la polimerasa múltiple (PCRm) para determinar la presencia y/o ausencia de 3 genes chuA de 279pb, yja 211 pb y TspE de 152pb (Ver tabla 1 y Figura 6). El grupo filogenético de cada cepa se determinó por la presencia o ausencia de los productos de amplificación de acuerdo al esquema de Clermont (Ver Tabla 2 y Figura 4) (Clermont, *et al.*, 2000) Como control positivo se utilizó la cepa de UPEC GAG1 donada por la Facultad de Medicina de la UNAM (Figura 7 Panel A y B carril 8 y panel C carril 4) y como control negativo la mezcla sin DNA templado (Figura 7 Panel A y B carril 9 y C carril 5).

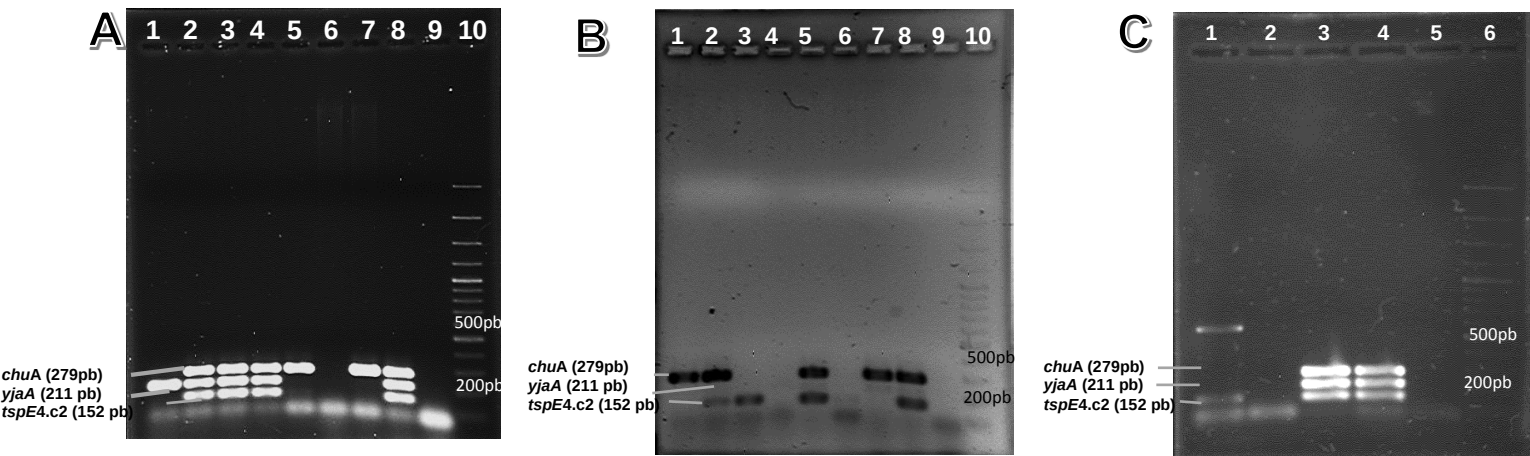
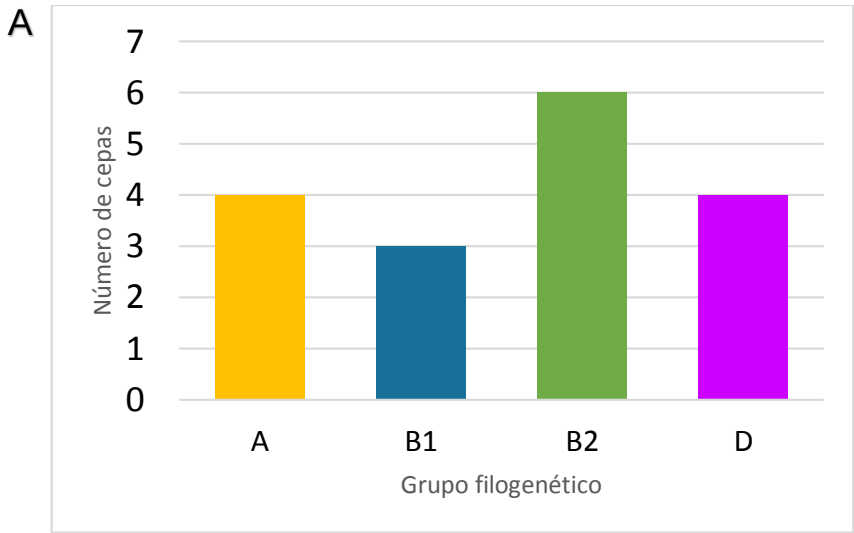


Figura 7. Grupos filogenéticos de UPEC aislada de displasia cervical. Fotografía de electroforesis en gel de agarosa (1.5%) de productos de PCR múltiple para genes *chuA* (279pb), *yjaA* (211pb), *tspE4.c2* (152pb) (A) Carril 1. CD2-25, Carril 2. CD2-26, Carril 3. CD2-27, Carril 4. CD2-28, Carril 5. CD2-29, Carril 6. CD2-30, Carril 7. CD2-31, Carril 8. GAG1 (Control +), Carril 9. Control -, Carril 10. 100pb (B) Carril 1. CD2- 32, Carril 2. CD2-33, Carril 3. CD2-34, Carril 4. CD2-35, Carril 5. CD2-36, Carril 6. CD2-37, Carril 7. CD2-38, Carril 8. GAG1 (Control +), Carril 9. Control -, Carril 10. 100pb (C) Carril 1. CD2- 39, Carril 2. CD2-40, Carril 3. CD2-41, Carril 4. GAG1 (Control +), Carril 5. Control (-) Carril 6. 100pb.



B

CD2-25	NIC 1	A
CD2-27	NIC 1	B2
CD2-28	NIC 1	B2
CD2-30	NIC1	A
CD2-31	NIC1	D
CD2-32	NIC1	D
CD2-33	NIC 1	D
CD2-35	NIC 1	A
CD2-37	NIC 1	B1
CD2-38	NIC 1	B2
CD2-39	NIC 1	B2
CD2-40	NIC 1	D
CD2-41	NIC 1	B1
CD2-34	NIC 2	B1
CD2-26	NIC 3	B2
CD2-29	NIC 3	D
CD2-36	NIC 3	B2

Grafica 1. (A) Frecuencia de los 4 grupos filogenéticos de *E.coli* en cepas de UPEC (B) Grupo filogenético por grado de displasia (NIC).

Los resultados de este estudio indican que el grupo B2 (amplificando *chuA* *yjaA* y *tspE*) fue el más frecuente con 6 cepas seguido por el A (únicamente amplificando *yjaA* o ninguno de los 3) y D (amplificando *chuA* y *tspE*) con 4 cepas cada uno y finalmente B1 (Amplificando *yjaA* y *tspE*) con 3 cepas (Gráfica 1).

Para determinar el perfil plasmídico se extrajo el DNA plasmídico de las 17 cepas, (Figura 8). Se encontró que 5 cepas, CD2-30, CD2-34, CD2-35, CD2-38 y CD2-40, no presentaron ningún plásmido (Grafica 2), Este resultado se verificó por duplicado. A las 12 cepas que presentaron plásmidos se les determinó su perfil plasmídico (número, tamaño y patrón). Para determinar el tamaño, se usaron como controles 1kb plus DNA ladder (Fermentans) y para los plásmidos grandes se usó la extracción de DNA plasmídica de *E.coli* enterohemorrágica (EHEC) cepa EDL933: Los plásmidos se encontraron en un número de 0 a 5 dependiendo de la cepa, 4 de las 17 cepas presentaron 5 plásmidos y fueron CD2-25, CD2-32, CD2-33 y CD2-36. El tamaño de las plásmidos va de 1.1 a 100kb. Los plásmidos más frecuentes fueron aquellos de 84 a 100kb y de 1.1 a 1.9 kb con 10 plásmidos presentes en cada rango. Finalmente se determinó la presencia de plásmidos comunes: 92kb (5 cepas), 1.4 (5 cepas) y 4.2 (3 cepas); algunas cepas presentaron 2 de estos plásmidos (CD2-25, CD2-27, CD2-29, CD2-33). Cabe destacar que cada cepa de este grupo tiene un perfil plasmídico único. (Figura 6)

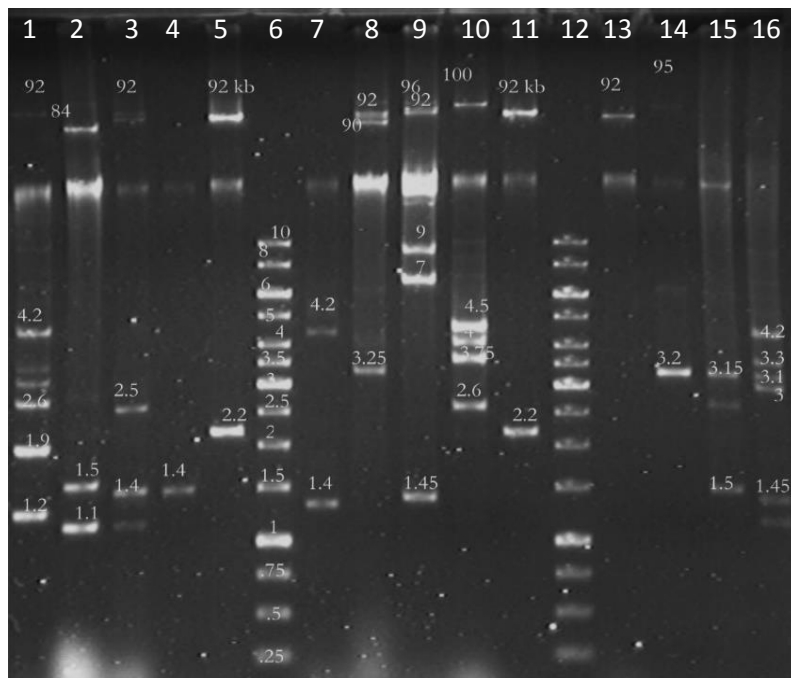
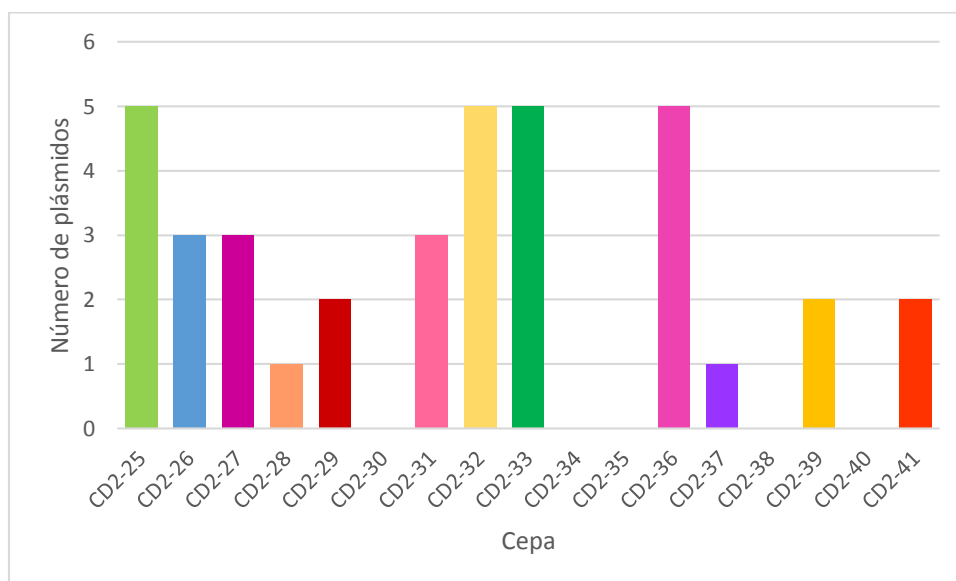


Figura 8. Perfil plasmídico de 17 cepas de *E. coli* aisladas de displasia cervical. Fotografía de electroforesis en gel de agarosa (0.7%) de la extracción de DNA plasmídico. Carril 1. CD2- 25, Carril 2. CD2-26, Carril 3. CD2-27, Carril 4. CD2-28, Carril 5(C) EDL, Carril 6 (M). 1Kb, Carril 7. CD2-29, Carril 8. CD2-31, Carril 9. CD2-33 Carril 10. CD2-36, Carril 11(C). EDL, Carril 12(M). 1Kb, Carril 13. CD2-37, Carril 14. CD2-39, Carril 15. CD2-41, Carril 16. CD2-32. Las bandas tenues pueden ser isoformas de DNA de las bandas de DNA plasmídico anexas.



Gráfica 2. Presencia de plásmidos en cepas de UPEC aisladas de displasia cervical.

Para cumplir con el objetivo de conocer el perfil de susceptibilidad antibiótica de cepas de UPEC aisladas de displasia cervical se llevó a cabo el método de Kirby-Bauer para 17 antibióticos (Figura 9).



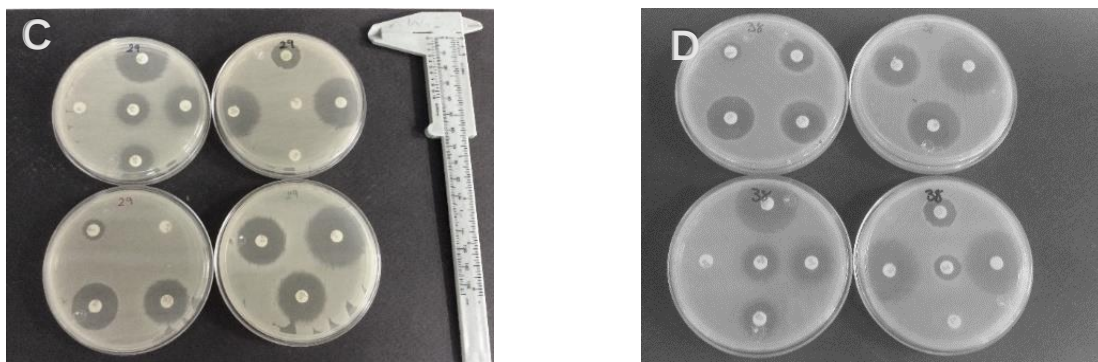


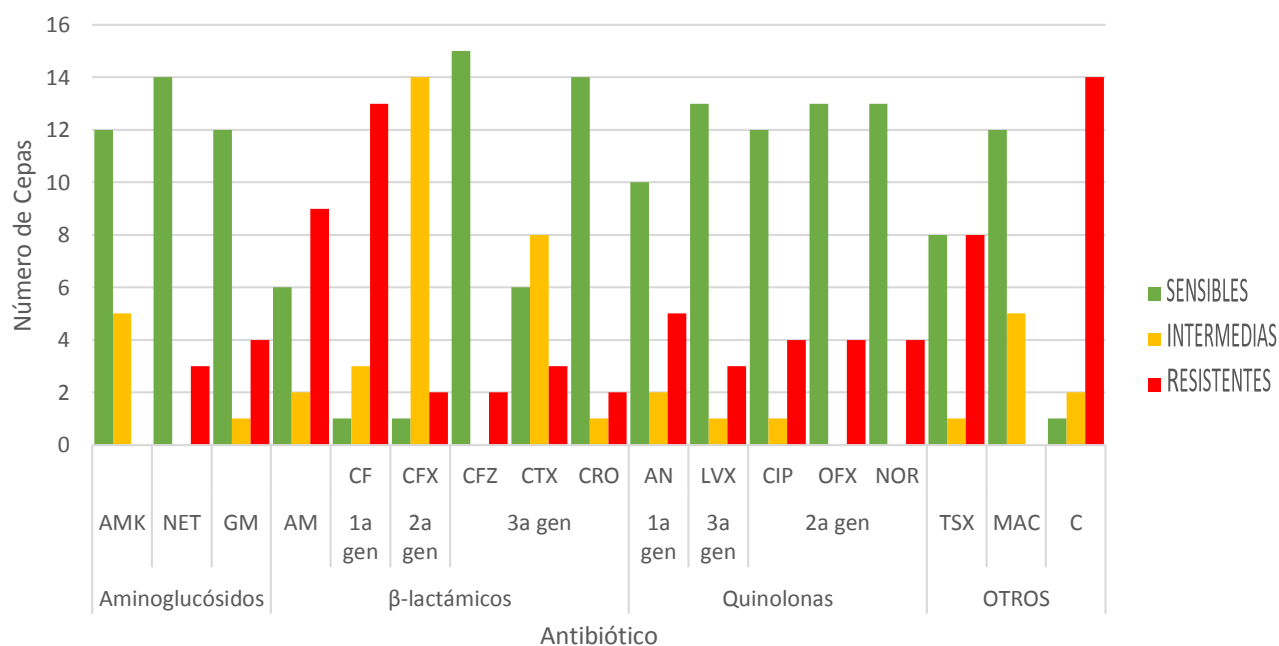
Figura 9. Fotografías representativas de los antibiogramas realizados por el método de Kirby-Bauer. (A) *E. coli* ATCC (Cepa control) (B) CD2-25 (C) CD2-29 (D) CD2-38.

Con respecto a la determinación y reporte de los perfiles de susceptibilidad antibiótica para las cepas de UPEC analizadas, en este estudio, se consideró que los valores de susceptibilidad intermedios se reportan para el análisis como resistentes ya que es probable que una subpoblación bacteriana esté desarrollando resistencia al antibiótico en cuestión (Tabla 9) en base a esta modificación, se encontró que el 100% de las cepas muestra multirresistencia, considerando el término como aquella cepa resistente a 2 o más antibióticos de diferente familia.

Los resultados mostraron también que las cepas presentaron el más alto porcentaje de resistencia a CF, CFX y C (16 cepas) seguido por AM y CTX (11 cepas) y por TSX con 9 cepas resistentes a este antibiótico. Con respecto a la sensibilidad las cepas presentaron el más alto porcentaje a NET y CRO con 14 cepas, seguidos por LVX y OFX (13 cepas) y AMK, GM, CIP, MAC (12 cepas) (Gráfica 3). Los valores de los diámetros del halo se muestran en el anexo.

Agente antimicrobiano CEPA	Aminogucosidos			β -lactámicos						Quinolonas					Otros		
	GM	NET	AMK	AM	CF	CFX	CFZ	CTX	CRO	AN	LVX	CIP	OFX	NOR	TSX	MAC	C
25	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I
26	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R
27	S	S	S	R	I	S	S	S	S	R	I	R	R	R	I	S	R
28	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R
29	S	S	S	R	R	I	S	S	S	I	S	S	S	S	R	S	S
30	S	S	S	S	I	I	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	I
31	R	S	I	R	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	R	I	R
32	S	S	I	R	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R
33	I	S	S	R	R	R	S	I	S	S	S	S	S	S	R	I	R
34	S	S	S	S	R	I	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	R
35	S	S	S	I	R	I	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	R
36	S	S	S	S	I	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I
37	S	S	S	S	R	I	S	I	S	I	S	S	S	S	S	I	R
38	S	S	I	R	R	I	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	R
39	S	S	S	S	R	I	S	I	S	R	S	I	S	S	S	I	R
40	S	S	S	I	R	I	S	I	I	S	S	S	S	S	S	I	R
41	R	R	I	R	R	I	S	I	S	R	R	R	R	R	R	S	R

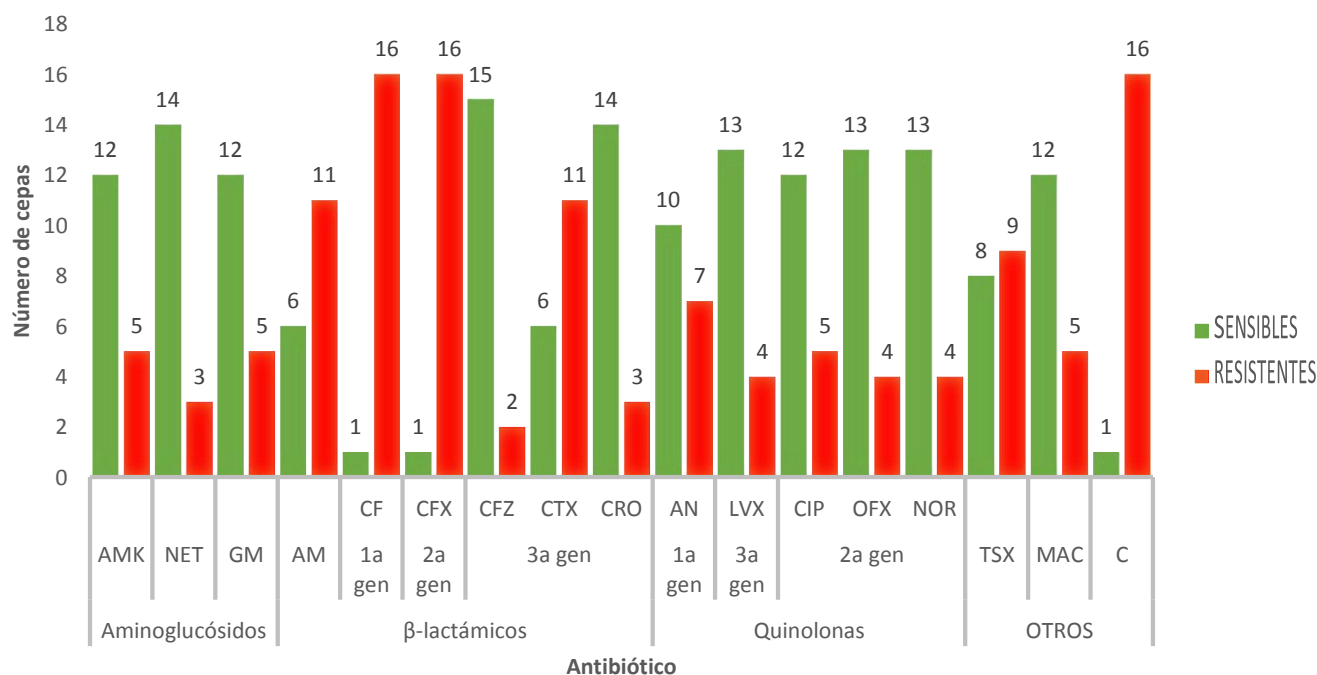
Tabla 9. Susceptibilidad a 17 antibióticos de 17 cepas de *E. coli* aisladas de displasia cervical. En rojo se muestran los valores para cepas resistentes, en amarillo los valores intermedios y en verde los que corresponden a cepas sensibles para los diferentes antibióticos de las 4 familias.



Grafica 3. Frecuencia de cepas sensibles, intermedias y resistentes a cada antibiótico por familia.

Agente antimicrobiano CEPA	Aminogucosidos			β -lactámicos						Quinolonas					Otros		
	GM	NET	AMK	AM	CF	CFX	CFZ	CTX	CRO	AN	LVX	CIP	OFX	NOR	TSX	MAC	C
25	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
26	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R
27	S	S	S	R	R	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	S	R
28	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R
29	S	S	S	R	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S
30	S	S	S	S	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R
31	R	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R
32	S	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R
33	R	S	S	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	R	R	R
34	S	S	S	S	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R
35	S	S	S	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R
36	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
37	S	S	S	S	R	R	S	R	S	R	S	S	S	S	S	R	R
38	S	S	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	R
39	S	S	S	S	R	R	S	R	S	R	S	R	S	S	S	R	R
40	S	S	S	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	R	R
41	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R

Tabla 10. Susceptibilidad a antibióticos sustituyendo los intermedios por resistentes. En rojo se muestran los valores para cepas resistentes, en verde los que corresponden a cepas sensibles para los diferentes antibióticos de las 4 familias.



Gráfica 3. Frecuencia de cepas sensibles y resistentes a cada antibiótico por familia. Todos los datos reportados como intermedios se tomaron como resistentes.

Para valorar el efecto del crecimiento de las cepas de UPEC con antibiótico sobre el perfil plasmídico, se sembraron nueve cepas, CD2-26, a CD2-34 con antibiótico

dependiendo de su resistencia a AM, GE y C (Tabla 6) y se obtuvieron sus perfiles plasmídicos. No se encontró ninguna diferencia en el perfil plasmídico de las cepas cultivadas sin y con antibiótico (Figura 10) lo que puede indicar que los plásmidos no son inducibles por la presencia de antibióticos.

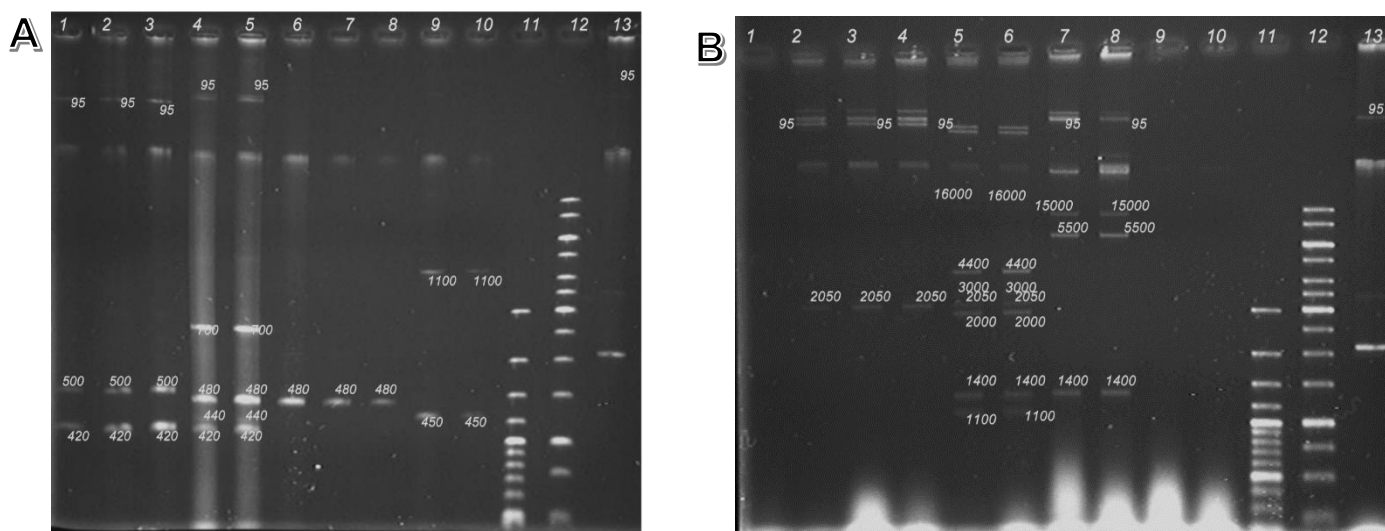


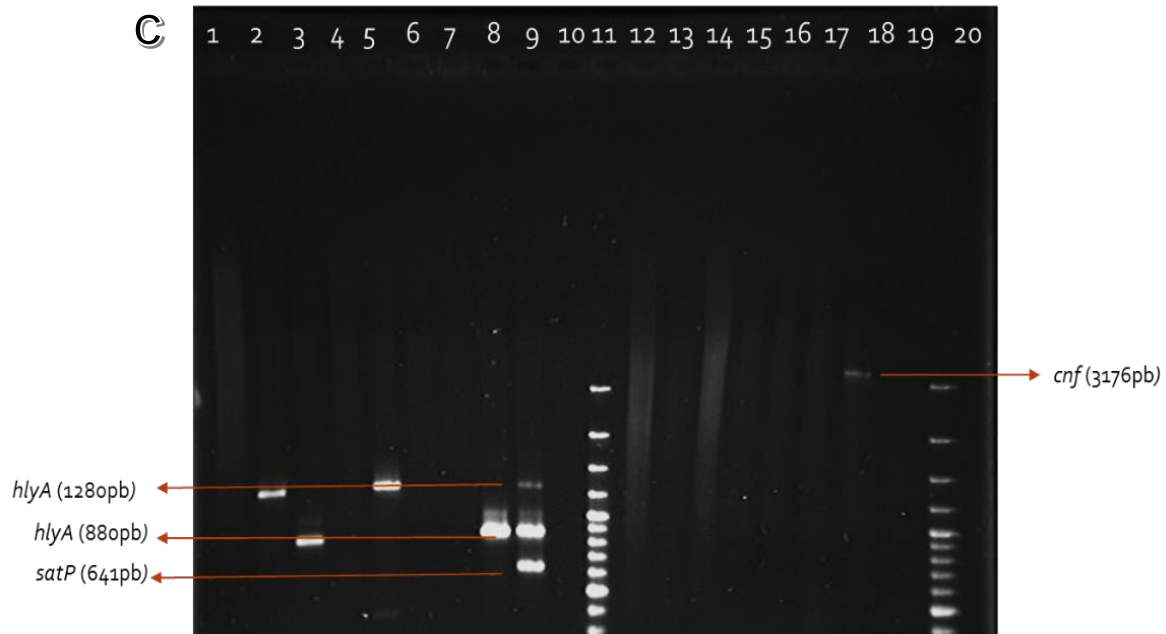
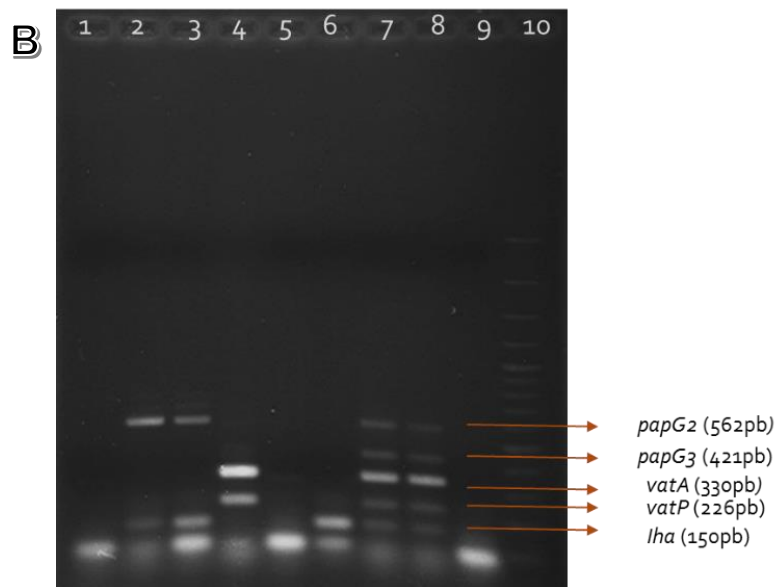
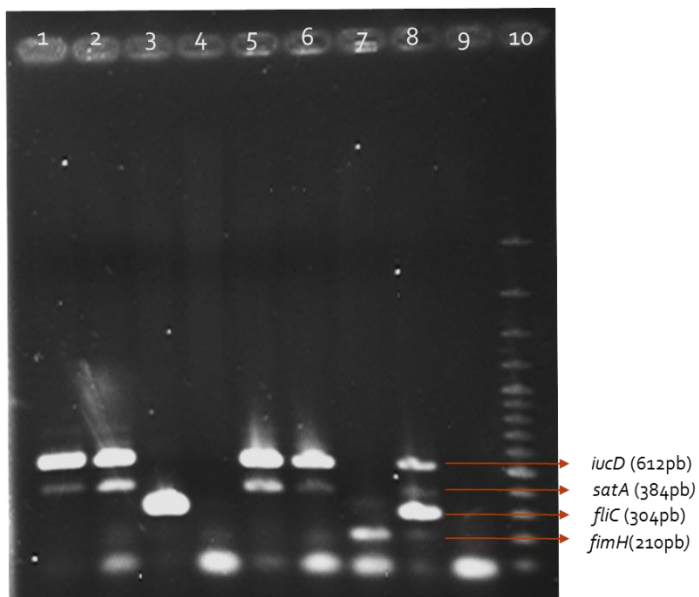
Figura 10. Determinación del perfil plasmídico de cepas UPEC aisladas de pacientes con displasia cervical cultivadas sin y con antibiótico. Electroforesis en gel de agarosa al 0.7% de DNA plasmídico de cepas de UPEC. **(A)** Carril 1. CD2-26, carril 2. CD2-26 con AM Carril 3. CD2-26 con GE, Carril 4. CD2-27, Carril 5. CD2-27 con AM, Carril 6. CD2-28, Carril 7. CD2- 28 AM, Carril 8. CD2- 28 GE, Carril 9. CD2-29, Carril 10. CD2-29 AM, Carril 11.00pb Carril 12. 1Kb, Carril 13. EDL. **(B)** Carril 1. CD2-30, Carril 2. CD2-31, carril 3. CD2-31 con AM Carril 4. CD2-31 con GE, Carril 5. CD2-32, Carril 6. CD2-32 con AM, Carril 7. CD2-33, Carril 8. CD2-33 AM, Carril 9. CD2- 34, Carril 10. CD2-34 con C, Carril 11.100pb Carril 12. 1Kb, Carril 13. EDL.

Con la finalidad de conocer cuáles son los factores de virulencia que poseen las cepas de UPEC aisladas de pacientes con displasia cervical se llevó a cabo la determinación de 12 factores de virulencia reportados en otros estudios como característicos de UPEC (Abe, *et al.*, 2008, García, *et al.*, 2015, Wiles *et al.*, 2008, Guyer, *et al.*, 2000, Marrs, *et al.*, 2005). Esta determinación se llevó a cabo a través de 3 diferentes reacciones de PCRm y 2 de PCR individuales estandarizadas en el laboratorio de Biología Molecular de Enteropatógenos. La primer PRCm se amplificaron los genes *iucD* (612pb), *satA* (384pb), *fliC* (304pb) y *fimH*(210pb) usando como control positivo la cepa CFT073; en la PCRm 2 se amplificaron los genes *papG2* (562pb), *papG3* (421pb), *vatA* (339pb), *vatP* (226pb), *iha* (150pb)

usando como control positivo la mezcla de las cepas CFT073, CR16, 059I ya que una sola no posee todos los factores de virulencia; la PCRM 3 amplificó los genes *cnf* (3176pb), *hlyA* (1280pb), *satP* (880pb), *papA* (641pb) y como control positivo se usó la cepa GAG1. Finalmente los PCR individuales amplificaron los genes *ecp1* (296pb) y *ecp2* (500pb) usando como control positivo GAG1.

Los resultados de las 3 diferentes reacciones de PCRM y las 2 de PCR individual de factores de virulencia mostradas en la figura 11 nos permitieron determinar la presencia de 11 genes a través de 16 diferentes amplicones (Tabla 9). Los resultados muestran que *fimH* es el gen que se amplificó en un mayor número de cepas con 16, seguido por *ecp2* con 13 cepas y *satA* con 10 cepas y los genes de virulencia que se presentaron en menor número en este trabajo fueron *papG3* con 2 cepas y *cnf* que no se presentó en ninguna de las cepas (Gráfica 3)

Debido a que en algunos casos, dos amplificados se consideraron para determinar la presencia del gen que codifican para 1 solo factor de virulencia como lo es *vat* y *sat* que son los genes codifican para la región peptídica y auto transportadora de las toxinas autotransportadoras vacuolizante (*vatP* y *vatA*) y toxina autotransportadora secretada (*satP* y *satA*) y también en el caso del gen que codifica para el pili asociado a pielonefritis, *pap*, en cuyo caso se consideró la amplificación de *papA* que codifica para la subunidad principal del pili y los tres alelos de la adhesina *papG* (*papGII* y *papGIII*), se consideraron las cepas como positivas a *sat*, *vat* o *pap* aquellas que amplificaban las dos regiones en caso de *sat* y *vat* y en el caso de *pap*: *papA* y alguno de los alelos para tomar como positivos el factor completo (Gráfica 4).



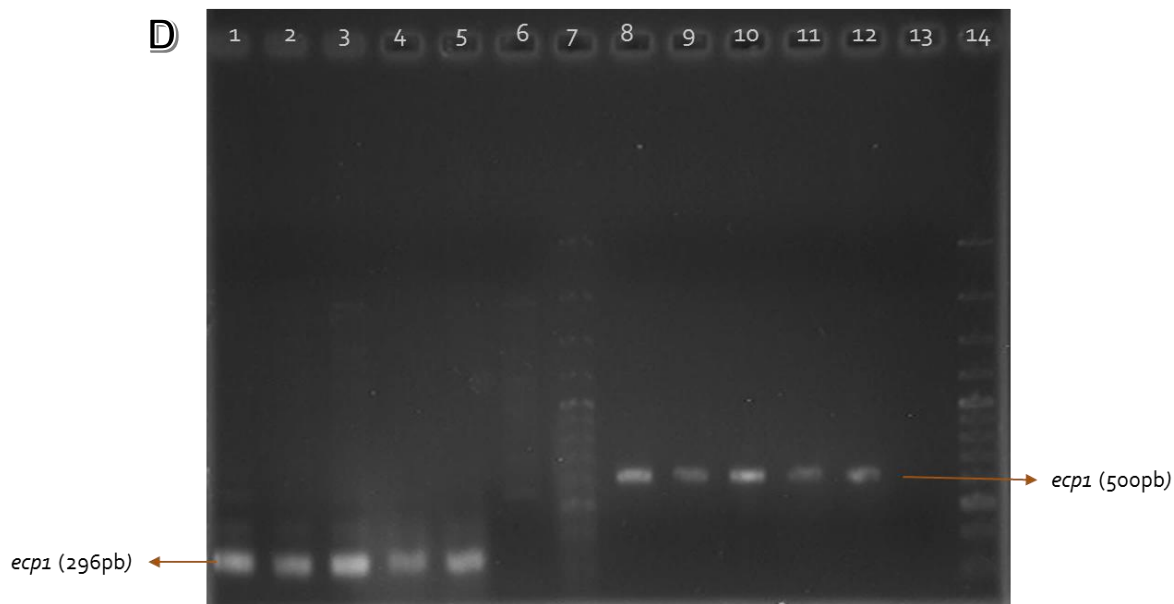


Figura 11 Determinación de genes que codifican para Factores de Virulencia de UPEC.

Fotografías representativas de geles de agarosa (1%) de los productos de 4 PCRm diferentes. (A) PCR1. Carril 1. CD2-28, Carril 2. CD2-29, Carril 3. CD2-30, Carril 4. CD2-31, Carril 5. CD2-32, Carril 6. CD2-33, Carril 7. CD2-34, Carril 8. CFT Control (+), Carril 9. Control -, Carril 10. 100pb (B) PCR 2. Carril 1. CD2-31, Carril 2. CD2-32, Carril 3. CD2-33, Carril 4. CD2-34, Carril 5. CD2-35, Carril 6. CD2-36, Carril 7. Control 1 (+), Carril 8: Control 2 (+), Carril 9. Control -, Carril 10. 100pb. (C) Carril 1. CD2-34, Carril 2. CD2-35, Carril 3. CD2-36, Carril 4. CD2-37, Carril 5. CD2-38, Carril 6. CD2-39, Carril 7. CD2-40, Carril 8. CD2-42 ControlGAG1, Carril 9. Control -, Carril 10. 100pb, Carril 11. CD2-34, Carril 12. CD2-35, Carril 13. CD2-36, Carril 14. CD2-37, Carril 15. CD2-38, Carril 16. CD2-39, Carril 17. CD2-40, Carril 18. CD2-42 Control GAG1, Carril 19. Control -, Carril 20. 100pb. (D) Carril 1. CD2-38, Carril 2. CD2-39, Carril 3. CD2-40, Carril 4. CD2-41, Carril 5. EDL, Carril 6. Control -, Carril 7. 100pb, Carril 8. CD2.38, Carril 9. CD2-39, Carril 10. CD2-40, Carril 11. CD2-41, Carril 12. EDL, Carril 13. Control -, Carril 14. 100pb.

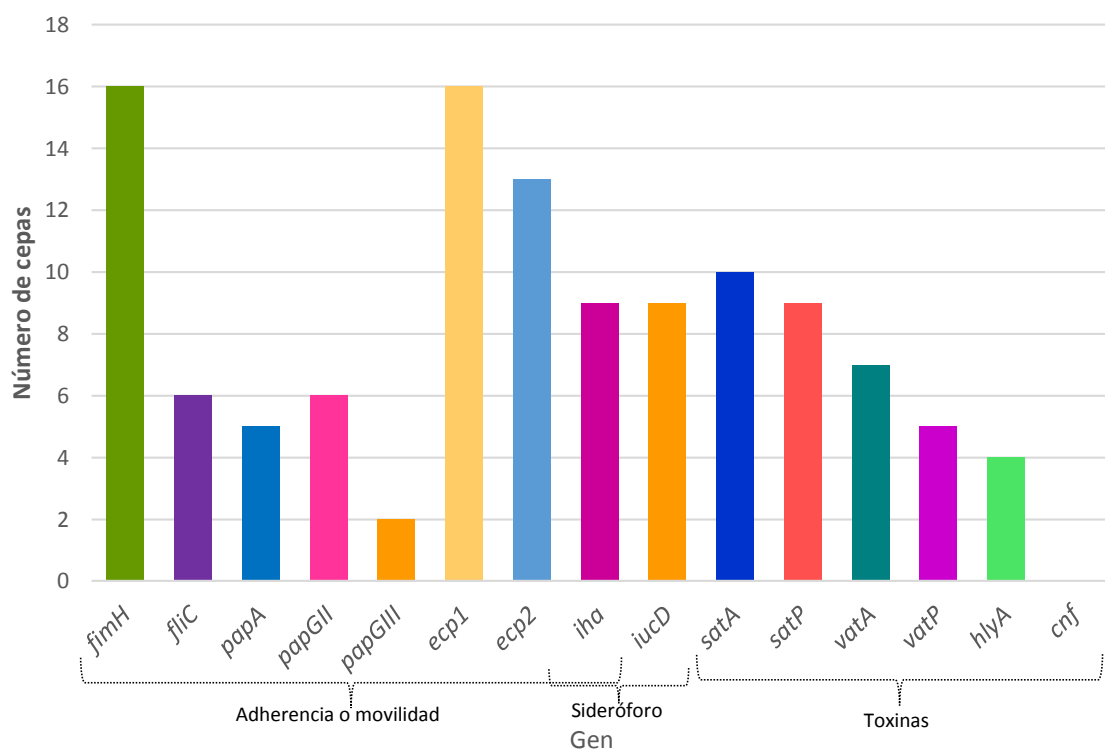
A

	Adherencia/ Movilidad							Captación de Hierro		Toxinas						
	fimH	flicC	ECP1	ECP2	papA	papG2	papG3	ihA	lucD	satA	satP	vatA	vatP	hlyA	CNF	
CD2-25	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CD2-26	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-
CD2-27	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
CD2-28	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
CD2-29	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
CD2-30	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
CD2-31	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CD2-32	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
CD2-33	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
CD2-34	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-
CD2-35	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-
CD2-36	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
CD2-37	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CD2-38	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-
CD2-39	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CD2-40	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CD2-41	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-

B)

	fliC	fimH	ECP1	ECP2	papA	papG2	papG3	ihA	lucD	satA	satP	vatA	vatP	hlyA	CNF
CD2-25	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CD2-26	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-
CD2-27	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
CD2-28	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-
CD2-29	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
CD2-30	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
CD2-31	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CD2-32	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-
CD2-33	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-
CD2-34	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-
CD2-35	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-
CD2-36	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
CD2-37	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
CD2-38	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-
CD2-39	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CD2-40	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CD2-41	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-

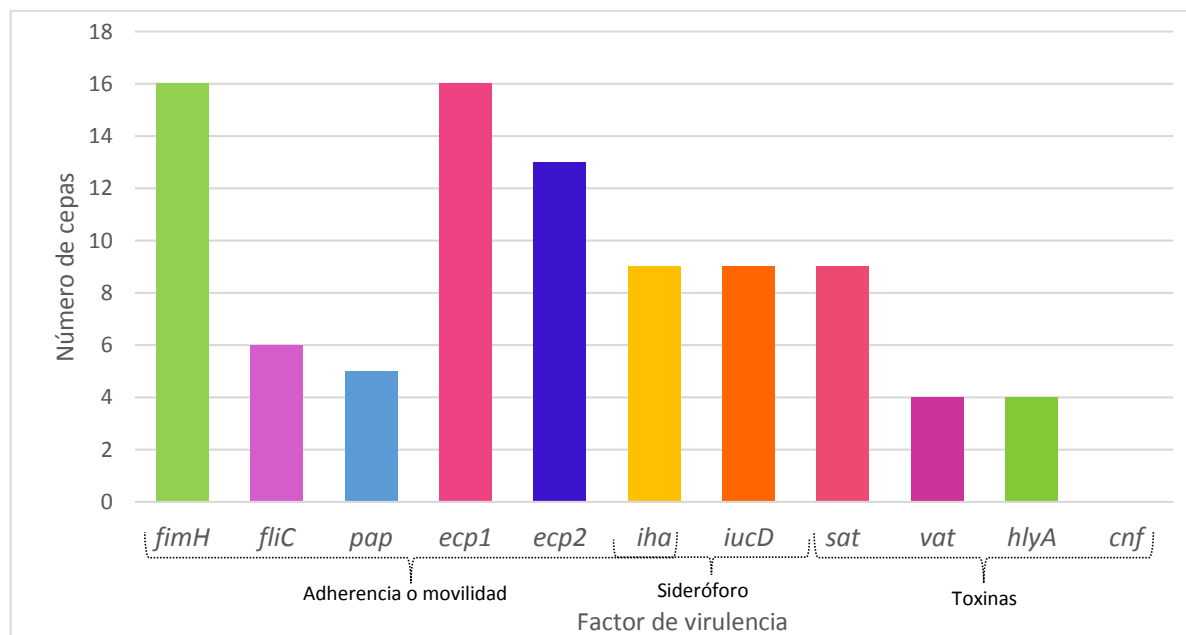
Tabla 11. (A) Resultados de la determinación de Factores de Virulencia de UPEC en cepas aisladas de pacientes con displasia cervical. + Amplificación, - No amplificación. (B) Resultados de la determinación de factores de virulencia, marcadas en casillas azules se señalan los genes que se tomaron como genes completos.



Grafica 4. Frecuencia de genes que codifican para factores de virulencia de UPEC en cepas aisladas de displasia cervical.

Los factores de virulencia con mayor frecuencia en este estudio son *fimH* y *ecp1* con 16 cepas cada uno, seguido de *ecp2* con 13 cepas y *satA* con 10 cepas; por

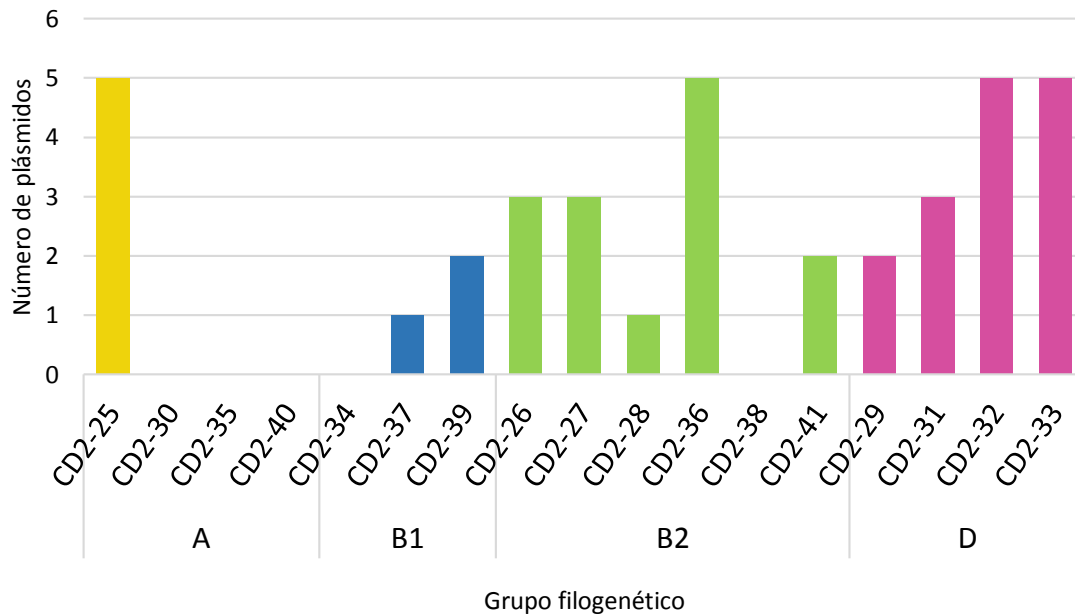
otro lado, *papGII* solo se encontró en 2 cepas y *cnf* no se encontró en ninguna cepa (Ver tabla 11 y gráfica 4).



Grafica 5. Frecuencia de genes que codifican para factores de virulencia de UPEC en cepas aisladas de displasia cervical.

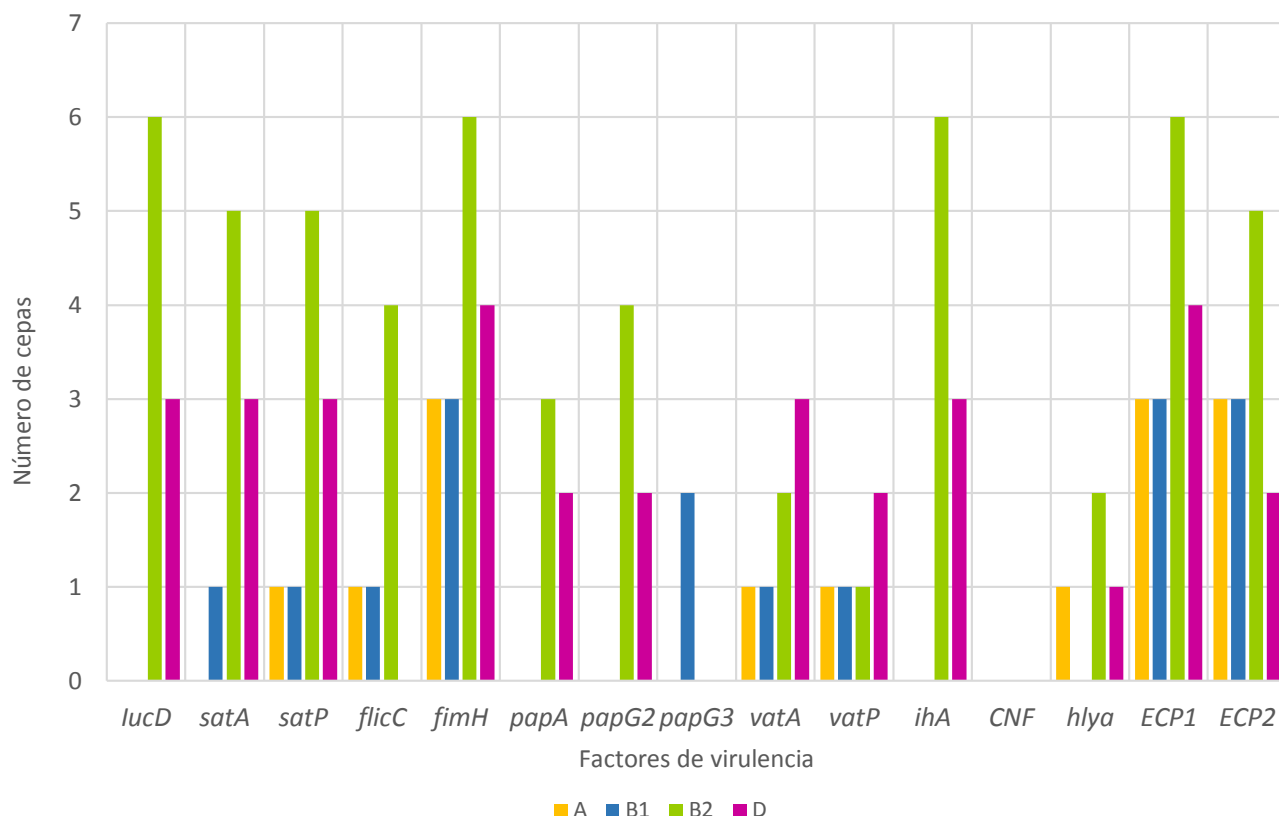
Considerando las amplificaciones como genes completos, *sat* se presentó en 9 cepas ya que 1 cepa (CD2-35) no presentó *satP*, mientras en el caso de *vat* solo se presentó en 4 cepas de manera completa, encontrando en menor proporción (4 cepas) el gen de *satA* (Ver tabla 11 y gráfica 5).

Adicionalmente para conocer si existe relación entre las diferentes características de virulencia de UPEC determinadas en este trabajo, se llevaron a cabo comparaciones de las variables estudiadas para cada una de las 17 cepas de UPEC aisladas de displasia cervical.



Grafica 6. Relación entre número de plásmidos y grupo filogenético de 17 cepas de UPEC aisladas de UPEC aisladas de displasia cervical. No se encontró diferencia significativa. $P > 0.05$

Dentro de la comparación de número de plásmidos y grupos filogenéticos, existen menos cepas del grupo A, solo una de las 4 cepas del grupo A presenta plásmidos. El resto de los grupos presenta cepas cuyo número de plasmidos va de 1 a 5, aunque el grupo B1 y B2 presentan 1 cepa, respectivamente (CD2-34, CD2-38), que no presenta plásmidos y en el grupo D todas las cepas presentan plásmidos (Ver Grafica 6). En general, las cepas B2 y D son las que tienen más cepas con presencia de plásmidos.

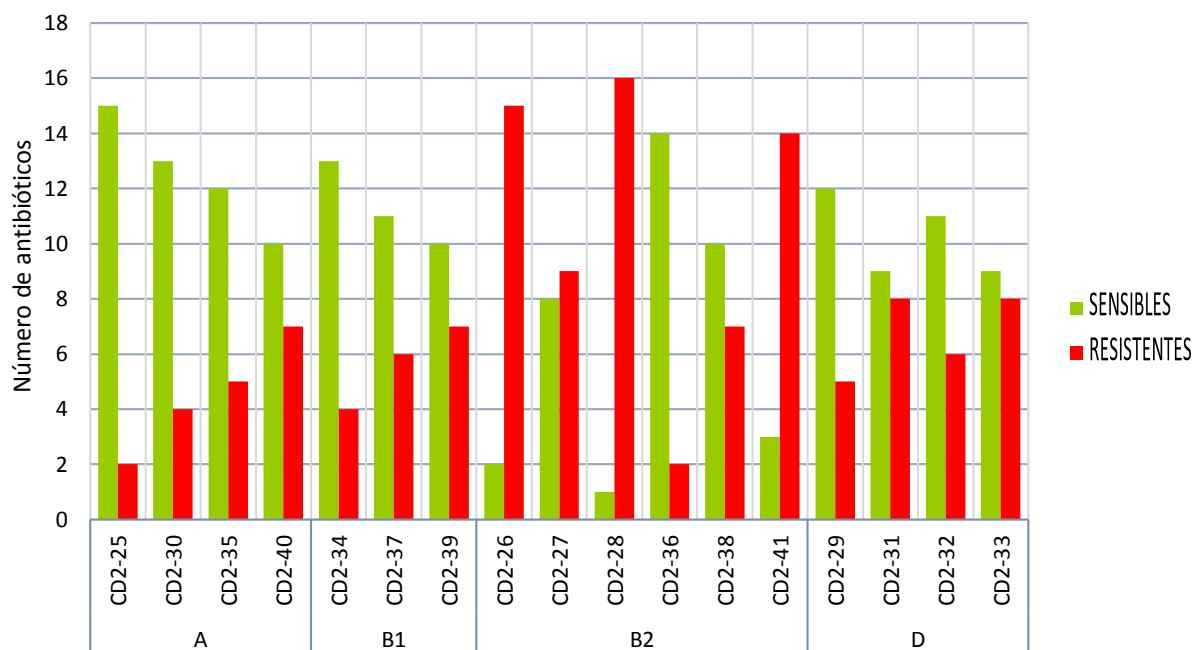


	lucD	satA	satP	fliC	fimH	papA	papG2	papG3	vatA	vatP	iha	CNF	hlyA	ECP1	ECP2	Total	Grupo filogenético
CD2-25				1										1	1	3	A
CD2-30				1						1						2	
CD2-35			1		1				1				1	1	1	6	
CD2-40					1									1	1	3	
CD2-34		1	1	1	1			1	1	1				1	1	9	B1
CD2-37					1			1						1	1	4	
CD2-39					1									1	1	3	
CD2-26	1	1	1	1	1	1	1				1		1	1	1	11	B2
CD2-27	1	1	1	1	1				1	1	1			1	1	10	
CD2-28	1	1	1		1	1	1				1			1	1	9	
CD2-36	1	1	1		1				1		1			1		7	
CD2-38	1			1	1		1				1		1	1	1	8	
CD2-41	1	1	1	1	1	1	1				1			1	1	10	
CD2-29	1	1	1		1				1	1	1		1	1	1	10	D
CD2-31					1									1		2	
CD2-32	1	1	1		1	1	1		1	1	1			1		10	
CD2-33	1	1	1		1	1	1		1		1			1	1	10	

Grafica 7. (A) Relación entre grupo filogenético y factores de virulencia de 17 cepas de UPEC aisladas de displasia cervical. (B) relación por cepa entre grupo filogenético y factores de virulencia No se encontró diferencia significativa. $P>0.05$.

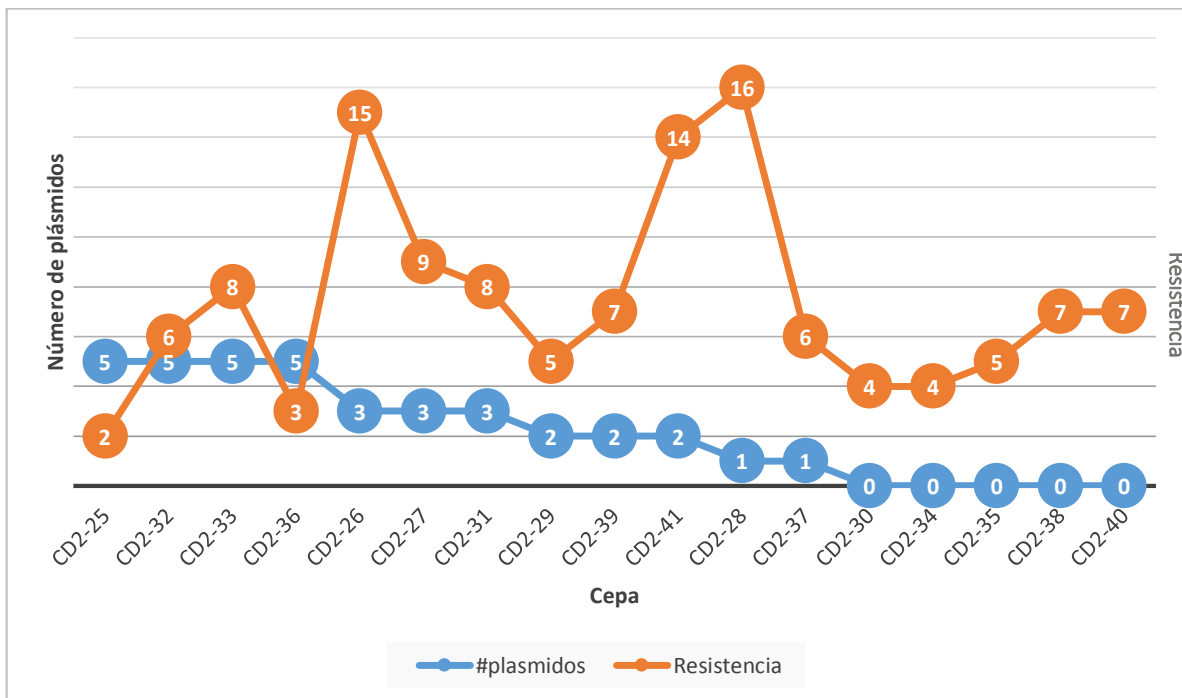
En la comparación de grupo filogenético y factores de virulencia se puede apreciar que las cepas que pertenecen al grupo B2 y D tienen un mayor número de factores de virulencia. La presencia de *cnf* se no se encontró en ninguna de las 17 cepas. Los genes *iucD*, *papA*, *papGII* e *iha*, no se presentaron en los grupos A y B1, conocidos como comensales. En el caso de *papGIII*, solo se presentó en 3 cepas

que pertenecen al grupo B1, pero este mismo grupo no presentó el gen que codifica para hemolisina (*hlyA*) mientras que todos los demás grupos si la presentaron. El gen *fliC* no se encontró en el grupo filogenético D mientras que *satA* no se encontró en el A (Ver gráfica 7).



Grafica 8. Cepas de UPEC aisladas de displasia cervical, sensibles y resistentes por grupo filogenético. No se encontró diferencia significativa. $P > 0.05$.

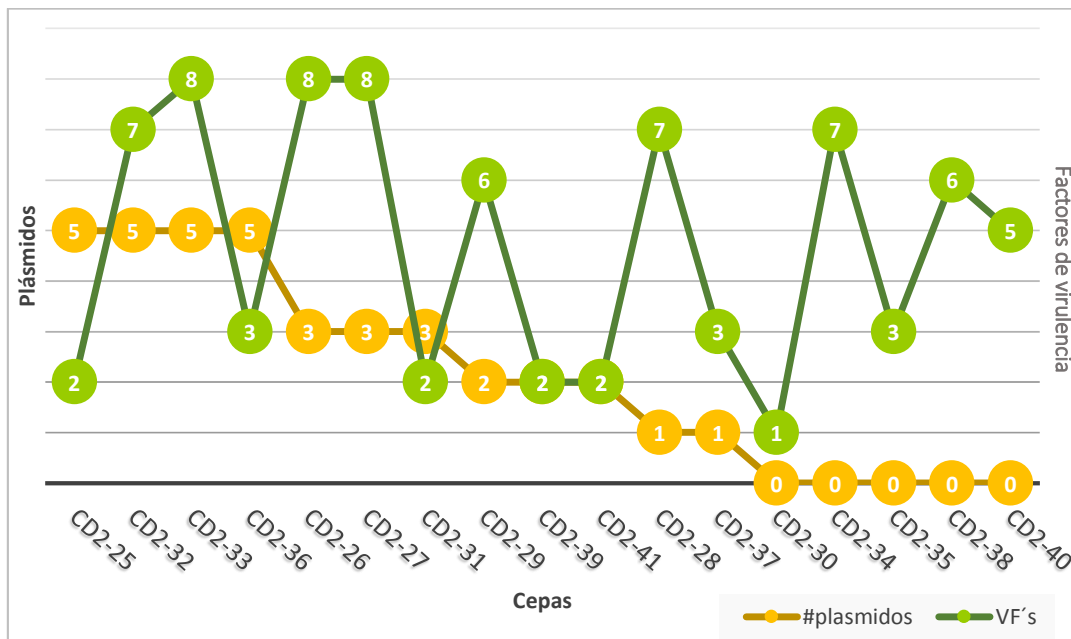
En el caso de la comparación del grupo filogenético con la susceptibilidad a antibióticos las cepas más resistentes (CD2-26, CD2-28, CD2-41) pertenecen al grupo B2, aunque la cepa CD2-36 que fue sensible a 14 pertenece también al mismo grupo; mientras que se puede observar mayor sensibilidad en el grupo A como es el caso de la cepa CD2-25 que fue sensible a 15 antibióticos que pertenece a este grupo; (Ver gráfica 8).



Gráfica 7. Comparación de número de plásmidos y resistencia antibiótica de 17 cepas de UPEC aisladas de displasia cervical. No se encontró diferencia significativa. $P > 0.05$.

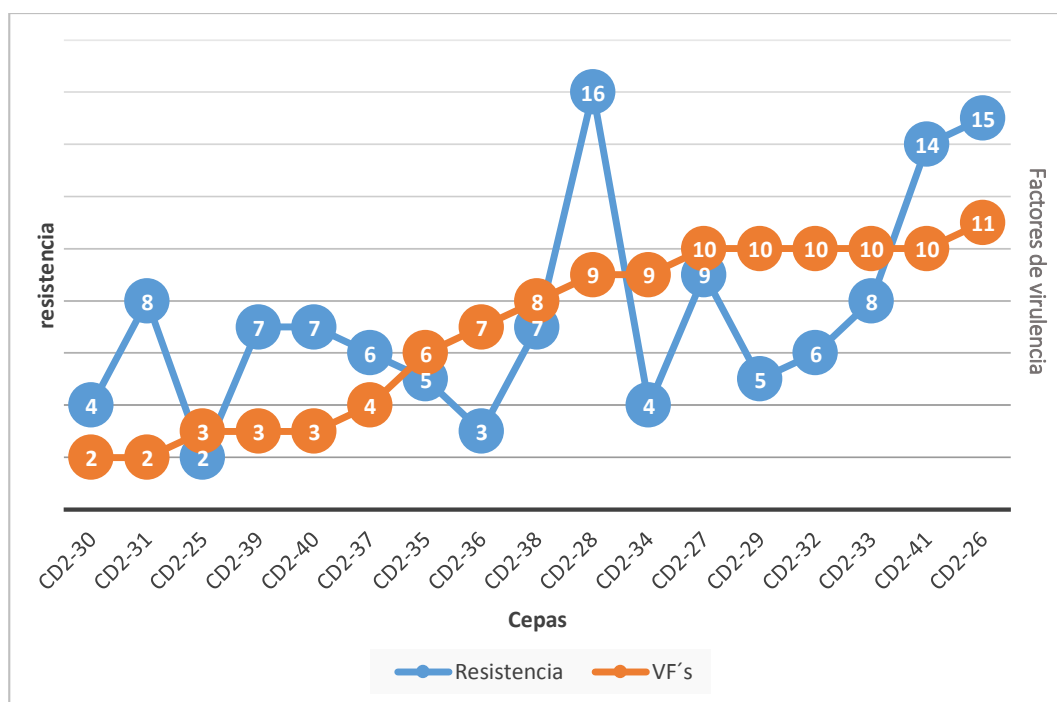
Por otro lado en la relación de número de plásmidos y resistencia a antibióticos existen cepas que llaman la atención como es el caso de CD2- 28 que posee solo un plásmido y es resistente a 16 de los 17 antibióticos, o el de la cepa CD2-25, la cual presenta 5 plásmidos y solo es resistente a 2 antibióticos (Ver gráfica 7).

El caso de los factores de virulencia y los plásmidos es similar, ya que se encontraron cepas (CD2-41, CD2-26) que presentan 10 factores de virulencia, de los 11 buscados en este estudio, y solo 2 o 3 plásmidos respectivamente. Esto nos indica que, en cepas aisladas de pacientes con diagnóstico de displasia cervical, los genes de resistencia y factores de virulencia pueden estar codificados en el genoma de las bacterias o en su defecto en plásmidos de tamaño más grande de los buscados en este trabajo (Ver Gráfica 8).



Gráfica 8. Comparación de número de plásmidos y factores de virulencia de 17 cepas de UPEC aisladas de displasia cervical. No se encontró diferencia significativa. $P > 0.05$

Finalmente dentro de la relación que existe entre la virulencia y la resistencia, no se encontraron valores significativos $p > 0.05$ ya que se encontraron en la mayoría de las cepas un alto número de factores de virulencia y una amplia resistencia a los antibióticos probados (Ver gráfica 9).



Grafica 9. Comparación de número de factores de virulencia y resistencia de 17 cepas de UPEC aisladas de displasia cervical. No se encontró diferencia significativa. $P>0.05$.

Cepa	Grupo filogenético	Factores de virulencia	Multiresistentes	Resistencia Antibiótica	Número De plásmidos	Grado de displasia
CD2-25	A	3	Si	2	5	NIC 1
CD2-26	B2	11	Si	15	3	NIC 3
CD2-27	B2	10	Si	9	3	NIC 1
CD2-28	B2	9	Si	16	1	NIC 1
CD2-29	D	10	Si	5	2	NIC 3
CD2-30	A	2	Si	4	0	NIC1
CD2-31	D	2	Si	8	3	NIC1
CD2-32	D	10	Si	6	5	NIC1
CD2-33	D	10	Si	8	5	NIC 1
CD2-34	B1	9	Si	4	0	NIC 2
CD2-35	A	6	Si	5	0	NIC 1
CD2-36	B2	7	Si	3	5	NIC 3
CD2-37	B1	4	Si	6	1	NIC 1
CD2-38	B2	4	Si	7	0	NIC 1
CD2-39	B1	3	Si	7	2	NIC 1
CD2-40	A	3	Si	7	0	NIC 1
CD2-41	B2	10	Si	14	2	NIC 1

Tabla 12. Resumen de las características genotípicas encontradas en 17 cepas de E.coli uropatógena aisladas de pacientes con displasia cervical.

Discusión.

Los resultados de este estudio mostraron que la mayoría de las cepas pertenecen al grupo filogenético B2 (6) seguidas por los grupos A y D (4) y finalmente 3 cepas pertenecen al grupo D, esto concuerda con autores como Shwan (2010) en donde el 51% de sus cepas fueron B2, 20% D, 15% fueron A y 13% pertenecieron al grupo B1; trabajos como el de Bashir y colaboradores (2012) o el de Agarwal y colaboradores (2014) también concuerdan con lo reportado ya que el 50% y el 54.4% de sus cepas respectivamente fueron del grupo B2; ya que las cepas tratadas en este estudio fueron de pacientes inmunocomprometidos, no concuerda con algunos autores (Moreno, et al., 2005, Rijavec, et al., 2008) en el que en sus trabajos únicamente encontraron grupos B1 y A en este tipo de pacientes, al contrario del trabajo de Bingen-Bidois (2002) donde no se encontró relación entre el grupo filogenético y la salud del paciente (pacientes inmunocomprometidos y no inmunocomprometidos).

Los factores de virulencia más frecuentemente reportados en la bibliografía son los que codifican para factores de captación de hierro, en este estudio el gen de captación de hierro *iha* se presentó en más de la mitad de las cepas, 9 de las 17, lo que concuerda con el estudio de Le Bouguenec y colaboradores (2000) en el cual el 44% de sus cepas amplificaron dicho gen, mientras que el gen *iucD* fue el menos común presentándose solo en 3 cepas; esto no concuerda con los trabajos como el de Rijavec, et al., 2008 en donde el 91% de sus cepas presentaba este último gen o con el de Narciso y colaboradores (2012), en donde 28 de 29 cepas amplificaron el gen *iucD*. Se ha reportado que UPEC posee más de 1 sistema de captación de hierro ya que compite con el hospedero por la obtención de este importante nutriente (Flores-Mireles., et al, 2015).

Para los genes que codifican para la adhesina flagelar, *fliC* y la pilina, *ecp*, los estudios anteriores como el de Karam y colaboradores (2012) encontraron que el 70% de las cepas presentaba el gen *fliC* lo que concuerda con este trabajo ya que menos de la mitad de las cepas (6) presentaron este gen; mientras que *ecp* fue el segundo gen más frecuente en este trabajo con 13 cepas amplificando los 2 genes, lo que concuerda con trabajos como el de Saldaña y colaboradores (2014) en donde de 172 cepas, 170 presentaron el gen *ecpA* y con el estudio de Rendón y colaboradores (2007) en donde el 71.6 % de sus cepas presenta el gen *ecp*.

Por otro lado en el presente estudio también se encontró que para las toxinas producidas por UPEC, el gen más comúnmente amplificado fue el correspondiente a la toxina autotransportadora *sat* con 9 cepas (53%) esto es mayor al reportado en otros artículos como el de Taddei y colaboradores (2003) reportaron una frecuencia de aparición del gen de 27%.

El gen *pap*, normalmente asociado a cepas de UPEC aisladas de pielonefritis estuvo presente en 5 de las 17 cepas analizadas lo que difiere de varios trabajos (Yun, *et al.*, 2013, Le Bouguenec, *et al.*, 2000) en los cuales encontraron *pap* en 60% y 45.8% de sus cepas respectivamente. En este último trabajo se reportó una alta presencia de los genes *hly* y *cnf* (44 y 40 % respectivamente) lo que no concuerda con los resultados de este trabajo ya que *hlyA* solo se encontró en 4 cepas y *cnf* en ninguna. Esto se podría explicar con lo descrito previamente por Moreno y colaboradores en el 2005 en donde afirman que se necesita la presencia de más factores de virulencia para atacar a pacientes sanos que para infectar a pacientes inmunocomprometidos.

En cuanto a los factores de virulencia el gen *fimH* fue el que se presentó en la mayoría de las cepas (17) esto concuerda con varios autores (Yun, *et al.*, 2013, Tiba, *et al.*, 2002, Karam, *et al.*, 2012, Abe, *et al.*, 2008, Shwan, *et al.*; 2010, Yun, *et al.*, 2013, Rajavec, *et al.*, 2003, Schwan, *et al.*, 2010, Karam *et al.*, 2012 Johonson, *et al.*, 2000) que afirman que este gen se presenta del 90 al 97% de las cepas de sus estudios.

Para los resultados de susceptibilidad a antibióticos, las cepas se encontraron resistentes a 5 antibióticos principalmente que son CF, CFX y C (16 cepas), AM y CTX (11 cepas), mientras que mostraron mayor sensibilidad a 9 principalmente: CFZ (15 cepas) NET CRO(14 cepas), LVX, OFX (13 cepas) y AMK, GM, CIP Y MAC con 12 cepas cada uno, lo cual no concuerda con el estudio de Yun y colaboradores (2013) en donde el 94% de sus cepas fueron resistentes a nitrofurantoina y 65.5% a ceftazidima mientras que en este estudio son de los antibióticos a los que las cepas de UPEC aisladas de displasia cervical mostraron más sensibilidad, los cuales podrían ser una alternativa de tratamiento para este tipo de pacientes. Por otro lado, en un estudio hecho en México (Arredondo- García, *et al.*, 2008)

netilmicina solo presento 5.1% de resistencia y recomienda tratamientos orales con nitrofurantoina ya que solo presenta 7.3% de resistencia, concordando con un estudio en el que 98% de las cepas fueron sensibles a este antibiótico (Mittal, *et al.*, 2008), los cuales si presentan porcentajes parecidos a los presentados en este trabajo, de igual manera se encuentran porcentajes similares en el trabajo realizado en México con los de este trabajo con respecto a la Ampicilina (74%), caso parecido al de Japón en donde Yamamoto y colaboradores (2007) encontraron que el 60% de las cepas eran resistentes a ampicilina.

Por otro lado, algunos estudios afirman alguna relación entre el grupo filogenético y la resistencia a antibióticos como es el caso de Alabsi y colaboradores (2014) en donde encuentra una relación de resistencia al cloranfenicol asociado a grupo A y susceptibilidad al mismo antibiótico del grupo B2, dicha relación no se encontró en este trabajo ya que solo una cepa fue sensible a este antibiótico perteneciente al grupo D.

Otra relación encontrada por Rodríguez- Martínez y colaboradores (2011) es la que existe entre los factores de virulencia y en específico la familia de las quinolonas en el cual mientras más resistencia a quinolonas, menor presencia de factores de virulencia y viceversa. La cual tampoco se encontró en el presente trabajo.

Con respecto al análisis de perfil plasmídico, en este estudio se encontraron plásmidos comunes: 92, 4.2 y 1.4 kb aunque en algunos estudios los plásmidos frecuentemente encontrados son de 19, 30, 32, 6.5, 4 y 5kb. Por otro lado, se sabe que existen antibióticos cuya resistencia y multiresistencia a ciertos antibióticos está relacionada con la presencia de algunos plásmidos. Como es el caso del plásmido de 87 y 88 kb asociado a resistencia a Ampicilina, Cefalotina, Cloranfenicol, Gentamicina, Kanamicina o el de 106 y 102 kb relacionados con la resistencia a Ampicilina y Cefalotina; también se encuentran los plásmidos de 93kb asociados a resistencia ampicilina; por otro lado la multiresistencia ha sido comúnmente relacionada con la presencia de plásmidos de 2 y 6.5 kb. Dentro de este estudio no se encontraron esos tamaños, aunque el de 100, 96, 95, 90 y 84 kb pueden ser comparables; el de 100 kb con 102 y 106kb estos resultados concuerdan con la resistencia a Cefalotina y Cloranfenicol, el de 92kb con el de 93 kb relacionado con

la resistencia a Ampicilina contrastando con este estudio ya que 3 de las 5 cepas con este plásmido solamente fue resistente a este antibiótico finalmente se encontró relación en el caso del plásmidos de 84kb con el reportado en la bibliografía de 88kb siendo la cepa portadora de este plásmido resistente a Ampicilina, Cefalotina, Trimetropim y cloranfenicol.

La poca relación de la resistencia a antibióticos con los plásmidos de este estudio, puede estar dada por la escasez de plásmidos grandes ya que son plásmidos de más de 87kb en otros reportes, los comúnmente relacionados con esta ventaja bacteriana; o en su defecto estar codificada esta información en el cromosoma de UPEC. (Ebenebe, *et al.*, 2014, Ayten, *et al.*, 2010, Ekinabe, *et al.*, 2011, Farshad, *et al.*, 2012, Koga, *et al.*, 2013).

Hay que enfatizar el hecho de que las 17 cepas de este trabajo presentaron multiresistencia, es decir resistencia a 2 o más familias de antibióticos, esto puede estar dado por el hecho de que al ser pacientes inmunocomprometidos se les administra un mayor número de antibióticos para su tratamiento respecto a las personas que no están pasando por una etapa de inmunosupresión, aunque en el estudio de Rijavec y colaboradores (2008) en donde se compararon cepas de pacientes saludables contra pacientes inmunocomprometidos se encontró mayor resistencia en los pacientes inmunocomprometidos aunque solo se encontró diferencia significativa para el caso específico de ampicilina (parecido al de este estudio en donde más de la mitad fue resistente a este antibiótico).

Finalmente, se presentaron 3 cepas que es necesario resaltar por su alto número de factores de virulencia y resistencia a antibióticos: CD2-26, CD2-28 y CD2-40, por trabajos previos en el laboratorio, se conoce que la primera cepa es serotipo O25:H4, la segunda a 102:H6 relacionadas con alta resistencia y la tercera a O6:H31 asociada a infección en vías (Naseer., *et al.*, 2013, Koga, *et al.*, 2014) aunque las 3 cepas son sensibles a Nitrofurantoina, el cual puede ser una buena alternativa de tratamiento para los pacientes. Concordando con el estudio de Farshad y colaboradores (2012) en el cual con cepas aisladas de niños de Irán sugiere el tratamiento con este antibiótico (Farshad, *et al.*, 2012).

Por otro lado se encontraron 4 cepas (CD2-26, CD2-28, CD2-33, CD2-41) que presentan los factores completos *pap* y *sat* y la cepa CD2-32 que presenta los factores *pap*, *sat*, *vat* lo que nos indica la gran capacidad invasiva de la bacteria al ser capaz de infectar los riñones por la presencia de *pap* y la capacidad de romper epitelio por los efectos citotóxicos vacuolizantes de *sat* y *vat*.

Se puede conocer la patogenicidad de UPEC por características como la presencia de factores de virulencia, siendo en este estudio *fimH* y *ecp* los más comunes; la presencia de plásmidos (0 a 5 plásmidos), sus pesos moleculares (1.1 a 100 kb), los antibióticos a los que se presenta mayor resistencia (CF, CFX y C) y finalmente su grupo filogenético (B2) para su estudio epidemiológico.

Ya que existen pocos estudios en México de UPEC y aún menos de pacientes inmunocomprometidos cursando por infección en vías urinarias, es necesario que se realicen los estudios adecuados para un óptimo diagnóstico y tratamiento.

Conclusiones.

1. El grupo B2 se encontró mayormente en cepas de *Escherichia coli* uropatógena aisladas de pacientes diagnosticadas con displasia cervical encontrándose en 6 cepas, seguidas por el grupo A y D con 4 cepas cada grupo.
2. Existen plásmidos comunes como los de 92,4.2 y 1.4 kb.
3. El peso en el que se encontraron más plásmidos es el que va de 1.1 a 100 kb
4. El número de plásmidos va de 0 a 5 plásmidos
5. Los genes más comunes son *fimH* y *ecp1* presentándose en 16 cepas respectivamente.
6. El gen *cnf* no se presentó en ninguna cepa de UPEC.
7. Los grupos B2 y D son los que tienen un mayor número de cepas con plásmidos.
8. Las cepas que pertenecen a los grupos B2 y D tienen mayor número de factores de virulencia.
9. No se encontraron diferencias significativas entre las variables analizadas.

Bibliografía.

Abe, C., Salvador, F., Falsetti, I., Vieira, M., Blanco, J., JE, B., Gomes, T. (2008). Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) strains may carry virulence properties of diarrhoeagenic *E. coli*. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 52(3), 397-406.

Adachi, J., Jiang, Z., Mathewson, J., Verenkar, M., Thompson, S., Martínez-Sandoval, F., DuPont, H. (2001). Enteroaggregative *Escherichia coli* as a major etiologic agent in traveler's diarrhea in 3 regions of the world. *Clin. Infect. Dis.*, 32, 1706-1709.

Agarwal, J., Mishra, B., Srivastava, S., Srivastava, R., & Pandey, A. (2014). Virulence determinants in *Escherichia coli* associated with recurrent cystitis in sexually active women. *Microbial Pathogenesis*, 74, 38-41.

Alabsi, M. S., Ghazal, A., Sabry, S. A., & Alasaly, M. M. (2014). Association of some virulence genes with antibiotic resistance among uropathogenic *Escherichia coli* isolated from urinary tract infection patients in Alexandria, Egypt: A hospital- based study. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 2, 83-86.

Anderson, G. G., Dodson, K. W., Hooton, T. M., & Hultgren, S. J. (2004). Intracellular bacterial communities of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract pathogenesis. *Trends in Microbiology*, 12(9), 424-430.

Arenas- Hernández, M. M. d. I. P., Rojas López, M., Medrano López, A., Martínez de la Peña, C. F., & Martínez Laguna, Y. (2009). *Mecanismos Bioquímicos de Resistencia Antibiótica* (Vol. 1): Publicación especial de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Arredondo-García, J. L., & Amábile-Cuevas, C. F. (2008). High resistance prevalence towards ampicillin, co-trimoxazole and ciprofloxacin, among uropathogenic *Escherichia coli* isolates in Mexico City. *J Infect Developing Countries*, 2(5), 350-353.

Asadi, K., Oloomi, M., Habibi, M., & Bouzari, S. (2012). Cloning of *fimH* and *fliC* and expression of the fusion protein FimH/FliC from Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) isolated in Iran. *Iran J Microbiol.*, 4(2), 55-62.

Bien, J., Sokolova, O., & Przemyslaw, B. (2011). Role of Uropathogenic *Escherichia coli* Virulence Factors in Development of Urinary Tract Infection and Kidney Damage. *International Journal of Nephrology*, 2012, 15.

Bingen-Bidois, M., Clermont, O., Bonacorsi, S., Terki, M., Brahimi, N., Louki, C., Bingen, E. (2002). Phylogenetic Analysis and Prevalence of Urosepsis Strains of *Escherichia coli* Bearing Pathogenicity Island-Like Domains. *Infect Immun.*, 70(6), 3216–3226.

Capo, C., Meconi, S., Sanguedolce, M.-V., Bardin, Gilles Flatau, N., & Boquet, P. (1998). Effect of Cytotoxic Necrotizing Factor-1 on Actin Cytoskeleton in Human Monocytes: Role in the Regulation of Integrin-Dependent Phagocytosis. *J Immunol*, 161, 4301-4308.

Celebi, A., Nizam, D., Ozturk, F., Acik, L., Aslan, G., & Aslantas, O. (2007). Identification of clinic uropathogenic *Escherichia coli* isolates by antibiotic susceptibility, plasmid and whole cell protein profiles. *Advances in Molecular Biology*, 1, 31-40.

Clermont, O., Bonacorsi, S., & Binger, E. (2000). Rapid and Simple determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group. *Appl. environ, Microbiol.*, 66(10), 4555-4558.

Dhakal, B. K., & Mulvey1, M. A. (2012). The UPEC Pore-Forming Toxin a-Hemolysin Triggers Proteolysis of Host Proteins to Disrupt Cell Adhesion, Inflammatory, and Survival Pathways. *Cell Host & Microbe*, 11, p. 58-69.

Ebenebe, J. C., Emeka-Okafor, K. M., Akujobi, C. N., Ezeanya, C. C., Agbakoba, N. R., & Egwuatu, C. C. (2014). Plasmid profile of Uropathogens among Children. *British Journal of Medicine & Medical Research*, 4(5), 1195-1203.

Echevarría-Zarate, J., Sarmiento Aguilar, E., & Osorio-Plenge, F. (2006). Urinary tract infection and antibiotic treatment. *Acta méd. peruana*, 23(1), 26-31.

Ewing, W. H., Davis, B. R., Fife, M. A., & Lessel, E. F. (1973). Biochemical characterization of *Serratia liquefaciens* (Grimes and Hennerty) Bascomb et al. (Formerly *Enterobacter liquefaciens*) and *Serratia rubidaea* comb. nov. and designation of type and neotype strains. *J. Syst. Bacteriol.*, 23, 217-225.

Farshad, S., Ranjbar, R., Japoni, A., Hosseini, M., Anvarinejad, M., & Mohamadzagdegan, R. (2012). Microbial Susceptibility, Virulence Factors, and Plasmid Profiles of Uropathogenic *Escherichia coli* Strains isolated from Children in Jahrom, Iran. *Arch Iran Med*, 15(5), 312-316.

Flores-Mireles, A. L., Walker, J. N., Caparon, M., & Hultgren, S. J. (2015). Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Microbiology*, 13, 269-283.

Garcia, T. A., Ventura, C. L., Smith, M. A., Merrell, D. S., & O'Brien, A. D. (2013). Cytotoxic Necrotizing Factor 1 and Hemolysin from Uropathogenic *Escherichia coli* Elicit Different Host Responses in the Murine Bladder *Infection and Immunity*, 81(1), p. 99–109.

Guajardo Lara, C. E., González-Martínez, P. M., & Ayala-Gaytán, J. J. (2009). Resistencia antimicrobiana en la infección urinaria por *Escherichia coli* adquirida en la comunidad. ¿Cuál antibiótico voy a usar? *Pública Mex*, 51, 155-158.

Guyer, D. M., Henderson, I. R., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. T. (2000). Identification of Sat, an autotransporter toxin produced by uropathogenic *Escherichia coli* *Molecular Microbiology*, 38(1), 53-66.

Guyer, D. M., Radulovic, S., Jones, F.-E., & Mobley, H. L. T. (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), 4539–4546.

Hacker, J., & Kaper, J. (1997). Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Pathogenicity islands and the evolution of microbes*, 54, 641–679.

Harwalkar, Anandkumar, Gupta, S., Rao, A., & Srinivasa, H. (2014). Lower prevalence of hlyD, papC and cnf-1 genes in ciprofloxacin-resistant uropathogenic *Escherichia coli* than their susceptible counterparts isolated from southern India. *Journal of Infection and public Health*, 7(5), 413-419.

Hentschel, U., & Hacker, J. (2001). Pathogenicity islands: the tip of the iceberg. *Microbes and Infection*, 3, 545-548.

Hofman, P., Flatau, G., Selva, E., Gauthier, M., Le Negrate, G., Fiorentini, C., Boquet, P. (1998). *Escherichia coli* Cytotoxic Necrotizing Factor 1 Effaces Microvilli and Decreases Transmigration of Polymorphonuclear Leukocytes in Intestinal T84 Epithelial Cell Monolayers. *Infection and Immunity*, 66(6), p. 2494–2500.

Hofman, P., Le Negrate, G., Mograbi, B., Hofman, V. r., Brest, P., Alliana-Schmid, A., Rossi, B. (2000). *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor-1 (CNF-1) increases the adherence to epithelia and the oxidative burst of human polymorphonuclear leukocytes but decreases bacteria phagocytosis. *Journal of Leukocyte Biology*, 68(364), 522-528.

Hunstad, D. A., & Justice, S. S. (2010). Intracellular Lifestyles and Immune Evasion Strategies of Uropathogenic *Escherichia coli*. *The Annual Review of Microbiology*, 64, 203–221.

Jacques, M. (2013). *Escherichia coli* virulence factors. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 152, 2-12.

Johnson, J., O'Bryan, T., Delavari, P., Kuskowski, M., Stapleton, A., Carlino, U., & Russo, T. (2001). Clonal relationships and extended virulence genotypes among *Escherichia coli* isolates from women with a first or recurrent episode of cystitis. *J Infect Dis.*, 183(10), 1508-1517.

Johnson, J. R., & Russo, T. A. (2002). Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: "The other bad E coli" *J Lab Clin Med*, 139, 155-162.

Justice S, S., & Hunstad A, D. (2012). UPEC Hemolysin: More than Just for Making Holes. *Cell Host & Microbe*, 11, 4-5.

Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*, 2(2), 123-140. doi: 10.1038/nrmicro818

Karam Asadi, M., Oloomi, M., Habibi, M., & Bouzari, S. (2012). Cloning of *fimH* and *fliC* and expression of the fusion protein FimH/FliC from Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) isolated in Iran. *Iran J Microbiol.*, 4(2), 55-62.

Koga, V. L., Tomazetto, G., Cyويا, P., Neves, S. M., Vidotto, M. C., Nakazato, G., & T., K. R. K. (2013). Molecular Screening of Virulence Genes in Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* Isolated from Human Blood Culture in Brazil. *BioMed Research International*, 2014, 1-9.

Köhler, C.-D., & Dobrindt, U. (2011). What defines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*? *International Journal of Medical Microbiology*, 301, 642– 647.

Landraud, L., Pulcini, C., Gounon, P., Flatau, G., Boquet, P., & Lemichez, E. (2004). *E.coli* CNF1 toxin: a two-in-one system for host-cell invasion. *Int. J. Med. Microbiol*, 293, 513-518.

Le Bouguenec, C., Archambaud, M., & Labigne, A. (1992). Rapid and specific detection of the *pap*, *afa*, and *sfa* Adhesin Encoding Operons in uropathogenic *Escherichia coli* Strains by Polymerase Chain Reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(5), 1189-1193.

Li, D., Liu, B., Chen, M., Guo, D., Guo, X., Liu, F., Wang, L. (2010). A multiplex PCR method to detect 14 *Escherichia coli* serogroups associated

- with urinary tract infections. *Journal of Microbiological Methods*, 82, 71-77.
- Marrs, C. F., & Zhang, L. F., Betsy. (2005). Escherichia coli mediated urinary tract infections: Are there distinct uropathogenic E. coli (UPEC) pathotypes? *FEMS Microbiology Letters*, 252, 183-190.
- Mittal, S., Sharma, M., & Chaudhary, U. (2014). Study of virulence factors of uropathogenic Escherichia coli and its antibiotic susceptibility pattern. *Indian Journal of Pathology and Micobiology*, 57(1), 61-64.
- Moreno, E., Planells, I., Prats, G., Planes, A., Moreno, G., & Andreu, A. (2005). Comparative study of Escherichia coli virulence determinants in strains causing urinary tract bacteremia versus strains causing pyelonephritis and other sources of bacteremia. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 53(2), 93-99.
- Mulvey, M. A., Lopez-Boado, Y. S., Wilson, C. L., Roth, R., Parks, W. C., Heuser, J., & Hultgren, S. J. (1998). Induction and Evasion of Host Defenses by Type 1-Piliated Uropathogenic Escherichia coli. *Science*, 282, 1944-1947.
- Nagy, G., Altenhoefer, A., Knapp, O., Maier, E., Dobrindt, U., Blum-Oehler, G., Hacker, J. (2006). Both α -haemolysin determinants contribute to full virulence of uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. *Microbes and Infection*, 8, 2006-2012.
- Narciso, A., Nunes, F., Amores, T., Lito, L., Melo-Cristino, J., & Duarte, A. (2012). Persistence of uropathogenic Escherichia coli strains in the host for long periods of time: relationship between phylogenetic groups and virulence factors. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 31, 1211-1217.
- Naseer, U., Haldorsen, B., Le Teland, S., Hegstad, K., Scheutz, F., Simonsen, G. S., The norwegian esbl study group (2009). Molecular characterization of CTX-M-15-producing clinical isolates of Escherichia coli reveals the spread of multidrug-resistant ST131 (O25:H4) and ST964 (O102:H6) strains in Norway. *Journal Compilation*, 117, 526-536.
- Oelschlaeger, T. A., Dobrindt, U., & Hacker, J. (2002). Pathogenicity islands of uropathogenic *E.coli* and the evolution of virulence. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 19, 517-521.
- Olvira Abrego, E., Espinoza lagunes, L. A., Martinez Nudding, H., Peralta Pedrero, M. L., Cisneros Quiroz, J., & Sánchez Ambriz, S. (2009). Diagnóstico y tratamiento de la infección aguda, o complicada del tracto urinario en la mujer: Centro Nacional de Excelencia tecnológica en Salud.

Parham, N. J., Pollard, S. J., Desvaux, M. I., Scott-Tucker, A., Liu, C., Fivian, A., & Henderson, I. R. (2005). Distribution of the Serine Protease Autotransporters of the Enterobacteriaceae among Extraintestinal Clinical Isolates of *Escherichia coli*. *Journal of clinical microbiology*, 43(8), 4076–4082.

Parreira, V. R., & Gyles, C. L. (2003). A Novel Pathogenicity Island Integrated Adjacent to the *thrW* tRNA Gene of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Encodes a Vacuolating Autotransporter Toxin. *INFECTION AND IMMUNITY*, 71(9), 5087–5096.

Platt, J. S., Sommerville, C. A., & Timbury, M. C. (1984). Antimicrobial resistance and the ecology of *Escherichia coli* plasmids. *Hyg. Camb.*, 93, 181-188.

Reagan, J., Seidemann, I. L., & Saracusa, Y. (1953). The cellular morphology of carcinoma in situ and dysplasia or atypical hyperplasia of the uterine cervix. *American Cancer Society*, 6(2), 224-235.

Redondo, C., & Alonso, G. (2007). Plásmidos conjugativos aislados de cepas multirresistentes de pacientes de cuatro centros de salud del área metropolitana de Caracas. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 27, 100-107.

Rendón, M. A., Saldaña, Z., Erdem, A. L., Monteiro-Neto, V., Vázquez, A., Kaper, J. B., Girón, J. A. (2007). Commensal and pathogenic *Escherichia coli* use a common pilus adherence factor for epithelial cell colonization. *The National Academy of Sciences of the USA*, 104(25), 10637–10642.

Rijavec, M., Starcic, E., Ambrozic Avgustin, J., Reissbrodt, R., Fruth, A., Krizan-Hergouth, V., & Zgur-Bertok, D. (2006). High prevalence of multidrug resistance and random distribution of mobile genetic elements among uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) of the four major phylogenetic groups. *Current Microbiology*, 53, 158-162.

Rodríguez-Martínez, J. M., Cano, M. E., Velasco, C., Martínez-Martínez, L., & Pascual, Á. (2011). Plasmid-mediated quinolone resistance: an update. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 17(2), 149-182.

Rondón Nucete, M., Orence Leonett, O., & Rondón Guerra, A. v. (2011). *Infección de tracto urinario* Vol. 1. P. V. Académico (Ed.) (pp. 121).

Saldaña, Z., De la Cruz, M. A., Carrillo-Casas, E. M., Laura, D., Zhang, Y., Hernández-Castro, R., Girón, J. A. (2014). Production of the

Escherichia coli Common Pilus by Uropathogenic *E. coli* Is Associated with Adherence to HeLa and HTB-4 Cells and Invasion of Mouse Bladder Urothelium. *PLOS ONE*, 9(7), 1-13.

Schwan, W. R., Briska, A., Buffy, S., Trevor K. Wagner, Zentz, E., Henkhaus, J., Dykes, C. W. (2010). Use of optical mapping to sort uropathogenic *Escherichia coli* strains into distinct subgroups *Microbiology*, 156, 2124-2135.

Sellers, J. W., & Sankaranarayanan, R. (2003). Introducción a la displasia cervical (NIC). Cáncer (Ed.), *La colposcopia y el tratamiento de la neoplasia intraepitelial cervical* (Vol. 1, pp. 13-21). Lyon, Francia.

Spurbeck, R. R., Dinh, P. C. J., Walk, S. T., Stapleton, A. E., Hooton, T. M., Nolan, L. K., . . . Mobley, H. L. T. (2012). *Escherichia coli* Isolates That Carry *vat*, *fyuA*, *chuA*, and *yfcV* Efficiently Colonize the Urinary Tract. *American Society for Microbiology*, 80(12), p. 4115- 4122.

Stiles, M. E., & King, L. N. (1981). Biochemical Characteristics and Identification of *Enterobacteriaceae* Isolated from Meats. *Applied and Environmental Microbiology*, 41(3), 639-645.

Taddei, C. R., Moreno, R. A. C., Filho, A. F., Montemor, L. P. G., & Martinez, M. B. (2003). Prevalence of secreted autotransporter toxin gene among diffusely adhering *Escherichia coli* isolated from stools of children. *FEMS Microbiology Letters*, 227, 249-253.

Tiba, M., Yano, T., Leite, D. (2008). Genotypic characterization of virulence factors in *Escherichia coli* strains from patients with cystitis. *Rev Inst Med*, 50(5), 225-260.

Ulett, G. C., Totsika, M., Schaale, K., Carey, A. J., Sweet, M. J., & Schembri, M. A. (2013). Uropathogenic *Escherichia coli* virulence and innate immune responses during urinary tract infection. *Current Opinion in Microbiology*, 16, 100-107.

Villa, L., Aurora, G.-F., Fortini, D., & Alessandra, C. (2010). Replicon sequence of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants. *J Antimicrob Chemother*, 65, 2518-2529.

Vouret-Craviari, V., Grall, D., Flatau, G., Pouysseur, J., Boquet, I., & Obberghen-Schilling, E. V. (1999). Effects of Cytotoxic Necrotizing Factor 1 and Lethal Toxin on Actin Cytoskeleton and VE-Cadherin Localization in

Human Endothelial Cell Monolayers. *INFECTION AND IMMUNITY*, 67(6), p. 3002–3008.

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

Yamamoto, S. (2007). Molecular epidemiology of uropathogenic *Escherichia coli* *J Infect Chemother*, 13, 68-73.

Yun Wook, K., Young Kim, H., Kuk Park, H., Kim, W., & Seok Lim, I. (2013). Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* of urinary tract infections and asymptomatic bacteriuria in children. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 20, 1-7.

Anexo:

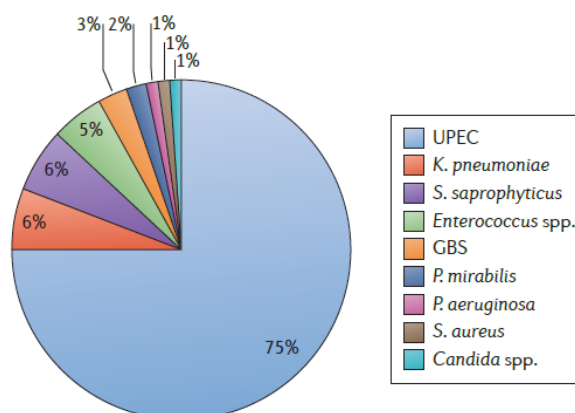
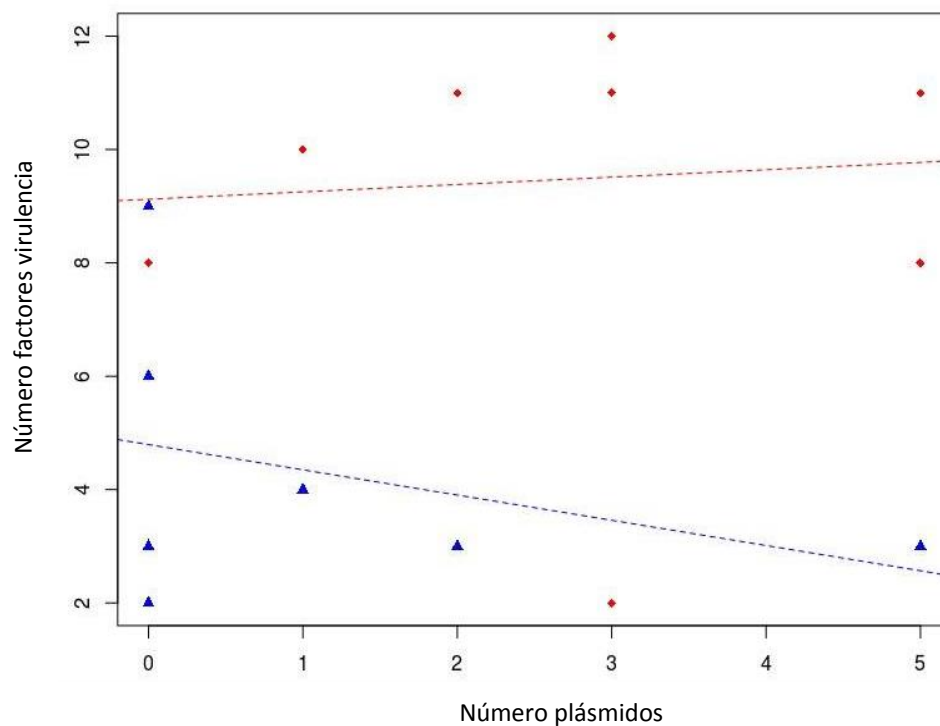


Figura 1. Epidemiología de ITU

	Aminogucosidos			β-lactámicos						Quinolonas					Otros			
Agente antimicrobiano	GM	NET	AMK	AM	CF	CFX	CFZ	CTX	CRO	AN	LUX	CIP	OFX	NOR	TSX	MAC	C	Multiresistentes
25	21	21	23	21	19	20	25	26	23	23	32	34	30	32	26	19	14	si
26	6	12	19	6	6	6	12	6	6	6	6	6	6	8	6	18	6	Si
27	16	18	19	6	15	24	25	27	24	6	15	10	12	10	14	20	10	si
28	6	8	15	6	6	6	14	6	6	6	9	6	6	6	6	18	6	si
29	18	20	18	6	10	18	22	26	23	18	29	30	28	28	6	19	18	si
30	18	18	20	20	16	19	23	25	28	22	25	28	23	25	24	19	12	si
31	11	17	15	6	13	19	22	28	26	23	24	26	20	21	6	15	6	si
32	15	16	16	6	13	20	23	27	29	25	27	32	27	26	6	19	11	si
33	14	18	17	6	9	17	21	23	23	23	26	22	28	27	6	16	6	si
34	16	18	18	17	15	20	24	25	24	23	25	24	23	25	22	19	10	si
35	17	19	20	15	13	19	25	25	26	19	28	27	26	27	23	18	11	si
36	17	21	18	19	16	21	24	27	28	27	33	33	32	29	28	20	14	si
37	18	18	17	18	14	18	23	24	25	17	25	22	26	26	23	16	10	si
38	15	18	16	6	13	16	21	21	23	19	25	27	25	23	6	27	10	si
39	15	17	17	17	12	17	21	25	24	13	20	20	20	22	23	15	10	si
40	15	17	17	16	12	19	22	24	22	20	20	21	21	21	20	15	9	si
41	6	9	16	6	12	17	21	25	25	6	9	6	8	6	6	17	9	si

Figura 2. Diámetro de los halos obtenidos en los antibiogramas. En rojo se muestran los valores determinados como resistentes y en verde los sensibles.



Grafica 1. Grafica de correlación entre factores de virulencia y número de plásmidos.

```

Calls: lm ... eval -> <Anonymous> -> model.frame.default -> eval -> eval
> ancoval<-lm(virulencia-plasmidos*clado)
> summary(ancoval)

Call:
lm(formula = virulencia ~ plasmidos * clado)

Residuals:
    Min       1Q   Median       3Q      Max
-7.5130 -1.1227  0.7472  1.4870  4.2055

Coefficients:
            Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
(Intercept)   4.7945     1.3146   3.647  0.00295 **
plasmidos     -0.4452     0.6350  -0.701  0.49561
cladovir       4.3282     2.2801   1.898  0.08009 .
plasmidos:cladovir  0.5753     0.8461   0.680  0.50847
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 2.9 on 13 degrees of freedom
Multiple R-squared:  0.5159,    Adjusted R-squared:  0.4042
F-statistic: 4.619 on 3 and 13 DF,  p-value: 0.0207
> |

```

Figura 3. Análisis de correlación entre factores de virulencia y número de plásmidos p=0.508