

Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Facultad de Medicina

Licenciatura en Biomedicina

Eje de Microbiología

Identificación de adhesinas y patotipos híbridos en cepas de *Escherichia coli*
aisladas de infección de tracto urinario en mujeres.

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE
LICENCIADO EN BIOMEDICINA**

PRESENTA

Roberto Vélez García

DIRECTORA EXPERTA Y METODOLÓGICA

DC. Margarita María de la Paz Arenas Hernández

Lugar de Realización

Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas
Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

2025

Agradecimientos institucionales

- Agradezco al Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por haberme permitido desarrollar mi trabajo de investigación en sus instalaciones.
- A la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrados por haberme permitido ser partícipe del programa Haciendo Ciencia 2022.
- Al Laboratorio de Biología Molecular de Enteropatógenos, perteneciente al Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas por haberme permitido formar parte de su equipo de trabajo y así, desarrollarme como profesionista.
- A la Dra. Margarita María de la Paz Arenas Hernández por haberme aceptado como alumno de tesis, brindarme todas las herramientas necesarias para el desarrollo de esta investigación, así mismo, por la comprensión y el apoyo que me dio durante este proceso.
- A la D.C. Rosa del Carmen Rocha Gracia y la D.C. Claudia Fabiola Martínez, en primer lugar, por aceptar ser mis revisoras de protocolo de investigación y tesis, así mismo, por darme retroalimentación y apoyarme durante mi estancia en el laboratorio y clases.

Agradecimiento personales

- En primer lugar, quiero agradecer profundamente a mis padres, Roberto Vélez Castillo y Valeria García García, por haberme brindado la oportunidad de estudiar una Licenciatura y apoyarme no solo económicamente sino también emocional, sin su apoyo, comprensión y esfuerzo este proyecto no se habría logrado. Esta investigación no es mía únicamente, sino que es suya también. Tienen mi agradecimiento y amor por siempre. Al final si se logró.
- A mi hermanas, Monserrat e Isabel, por siempre apoyarme y estar en mis momentos más complicados durante este periodo y por haberme ayudado a realizar algunas de mis tareas, más en pandemia. Mil gracias, de todo corazón.
- A Gely por ser la primera persona en darme la bienvenida al laboratorio, agradezco enormemente todo lo que me enseñaste en bioinformática, experimental y personal. Gracias por haberme apoyado mucho y pese a que a veces no nos entendíamos o teníamos diferencias, siempre salíamos riendo del laboratorio, durante tu estancia hiciste el laboratorio más agradable. Eres un ejemplo de superación y perseverancia. Te admiro y quiero mucho. Gracias amiga de mi corazón, por tanto.
- A Liz por ser una gran compañera y amiga, hiciste cada día en el laboratorio un lugar más ameno, lleno de risas, buena música y muchos debates con respecto a nuestros proyectos. Agradezco enormemente que me hayas apoyado no solo cuando no salían mis experimentos sino también en el ámbito personal. Fuiste una pieza vital para el desarrollo de este proyecto. Eres una gran persona y científica. Agradezco ser tu amigo. Tienes mucho que aportar a este mundo, sigue adelante. Tienes mi admiración y aprecio. Gracias por todo.
- A Mon por ser una gran maestra y amiga. Gracias a ti aprendí muchas técnicas de laboratorio y a utilizar varios programas bioinformáticos. Eres un modelo a seguir, porque a pesar de todo lo que sabes, eres muy humilde y empática, siempre me apoyaste de la mejor manera. Sé qué harás grandes aportes a la ciencia Te admiro y quiero muchísimo.
- A Judith (comaye), iniciaste como una persona extraña en el laboratorio con un acento extravagante y terminamos siendo muy buenos amigos. Tienes mi gratitud por haberme ayudado muchísimo en el desarrollo de las PCRs para determinar patotipos híbridos. Me enseñaste muchísimas cosas a nivel personal y académico. Eres una eminencia en lo que haces. Estoy agradecido con la vida por haberme permitido conocerte. Eres un modelo a seguir. Te quiero millones, por favor regresa a Puebla.
- A Irina, mi primera aprendiz, agradezco muchísimo el hecho de que me hayas permitido enseñarte y en el proceso volvernos muy cercanos. Me enseñaste muchas cosas y, de igual

manera, estuviste ahí en momentos difíciles. Admiro tu perseverancia y positivismo, hiciste mis días más alegres en el laboratorio. Sigue trabajando y mejorando, tienes mucho potencial para volverte una gran investigadora. Espero haberte enseñado muchas cosas buenas. Sigue brillando y triunfando. Te quiero mucho, amiga mía.

- A Lety por ser una gran compañera y amiga. Hicimos muy buen equipo, a tal punto de llegar a publicar un artículo de revisión. Esperemos próximamente otro. Eres muy inteligente y disciplinada, eso te va a llevar muy lejos. Gracias por tu apoyo y amistad.
- A Akio por hacer mis días en el laboratorio más divertidos. Me enseñaste muchas cosas no solo a nivel personal, sino también académico. Admiro mucho que pese a las adversidades siempre salías adelante. Te admiro mucho como persona.
- A Paty y Ame por ser mis primeras amigas de la carrera. Desde el primer día conectamos y nos volvimos amigos inseparables. Me ayudaron mucho a desarrollarme como persona y como investigador. Pese a que nos separamos en los ejes, nunca dejamos de apoyarnos y animarnos. Son una parte muy bonita de la universidad. Las amo con todo mi corazón. Gracias por ser y estar en mi vida.
- A Erik por estar en la última etapa de la elaboración de mi tesis. Pese al poco tiempo que nos conocíamos, me apoyaste y aconsejaste. Te admiro mucho, espero algún día poder transmitir el amor hacia mi carrera como tú lo haces. Tienes mi admiración, respeto y cariño. Llegaras muy lejos, de eso estoy seguro

Índice

Índice de figuras.....	8
Índice de tablas.....	10
Abreviaturas	11
Resumen.....	12
1. Introducción	13
1.1. Tracto urinario.....	13
1.2. Infección de tracto urinario (ITU).....	14
1.2.1. Etiología	14
1.2.2. Epidemiología	15
1.2.3. Factores de riesgo en población femenina	17
1.3. <i>Escherichia coli</i>	18
1.3.1. Filogenética y tipificación de <i>Escherichia coli</i>	19
1.4. Patotipos de <i>Escherichia coli</i>	20
1.4.1. <i>Escherichia coli</i> patógenas intestinales	23
1.4.1.1. ETEC.....	23
1.4.1.2. EPEC.....	25
1.4.1.3. STEC/EHEC.....	27
1.4.1.4. EAEC	29
1.4.1.5. EIEC.....	32
1.4.1.6. DAEC.....	32
1.4.1.7. AIEC	33
1.4.2. <i>Escherichia coli</i> patógenas extraintestinales.....	33
1.4.2.1. NMEC	34
1.4.2.2. SEPEC.....	35
1.4.2.3. APEC.....	35
1.4.3. Cepas híbridas	38
1.5. <i>Escherichia coli</i> uropatógena como modelo de estudio.....	38
1.6. Factores de virulencia de UPEC.....	39
1.7. Toxinas agentes generadores de daño	39
1.8. Sistemas de captación de hierro	40
1.8.1. Adhesinas fimbriales	41
1.8.1.1. Vía clásica chaperona/ayudador.....	41

1.8.1.2.	Fimbria S	43
1.8.1.3.	Fimbria F1C	44
1.8.2.	Adhesinas no fimbriales	44
1.8.3.	Proteínas RTX	45
1.8.3.1.	TosA	46
2.	Antecedentes	47
2.1.	Antecedentes generales	47
2.2.	Fimbrias F1C y S	47
2.3.	TosA	48
2.4.	Cepas híbridas	50
2.5.	Antecedentes directos	52
3.	Justificación	55
4.	Esquema de trabajo	57
5.	Objetivos	58
5.1.	General	58
5.2.	Específicos	58
6.	Material y métodos	59
6.1.	Material biológico	59
6.2.	Cepario UPEC	59
6.3.	Extracción de ADN	59
6.4.	Obtención del paquete celular	59
6.5.	Extracción de DNA genómico	62
6.6.	Extracción de DNA plasmídico	62
6.7.	Determinación de concentración y pureza de DNA genómico	63
6.8.	Diseño de oligonucleótidos para determinar EHEC y EPEC	63
6.9.	PCR individual para identificación de adhesinas	64
6.10.	Identificación de adhesinas en cepas secuenciadas	66
6.11.	PCR múltiple cromosómica DEC	66
6.12.	PCR múltiple espF	69
6.13.	PCR múltiple plasmídica	71
6.14.	Determinación de adhesinas	73
6.15.	Determinación de cepas híbridas	74
7.	Resultados	75
7.1.	Extracción de material genético	75
7.2.	Extracción de material plasmídico	75

7.3.	PCR para amplificar genes de adhesinas UPEC: <i>sfaC</i> , <i>focH</i> y <i>tosA</i>	76
7.5.	Identificación de adhesinas en cepas UPEC secuenciadas aisladas de neonatos.	79
7.6.	Diseño de oligonucleótidos para determinar STEC/EHEC y EPEC	81
7.5.	PCR para amplificar genes DEC: <i>stx1A</i> , <i>stx2A</i> , <i>aaiG</i> , <i>espF</i> , <i>sta1</i> , <i>eltB</i> , <i>bfpA</i> y <i>aggR</i>	91
7.6.	Determinación de patotipos híbridos en el cepario	96
8.	Discusión.....	100
9.	Conclusión.....	113
10.	Perspectivas.....	114
11.	Referencias	115
12.	Anexos.....	125

Índice de figuras

Figura 1. Casos nuevos de enfermedades infecciosas de vigilancia convencional.	16
Figura 2. Infección de vías urinarias en México.	17
Figura 3. Factores de riesgo en población femenina.	18
Figura 4. Clasificación de las cepas de <i>Escherichia coli</i> y criterios propuestos para la clasificación de cepas ExPEC	22
Figura 5. Esquema de la organización de LEE en EPEC E2348/69 y en EHEC EDL933.....	29
Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa de extracciones genómicas.....	75
Figura 7. Perfil plasmídico de UPEC aisladas de ITU en mujeres.....	76
Figura 8. Resultados de la estandarización de PCR individual de los genes <i>focH</i> , <i>tosA</i> y <i>sfaC</i>	77
Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa de PCR individual de adhesinas UPEC.....	78
Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa de PCR individual para identificar adhesinas en cepas secuenciadas.....	80
Figura 11. Resultados del BLAST de <i>stx1A</i> y RI- <i>stx2A-stx2B</i> de EHEC-EDL933 con genoma de <i>E. coli</i>	81
Figura 12. Entorno genético de <i>stx1A</i> y localización de los oligonucleótidos diseñados para su amplificación.....	82
Figura 13. Entorno genético de <i>stx2A</i> y localización de los oligonucleótidos diseñados para su amplificación.....	83
Figura 14. Resultados de la alineación global de la PAI-LEE de EHEC EDL933 Y E2348/69. Resultados de EMBOSS Stretcher.	85
Figura 15. Resultados de la alineación global de la PAI-LEE de EHEC EDL933 y E2348/69 sin ARNt-selC y el profago 933L.	86
Figura 16. Esquema de la región de LEE seleccionada para el diseño de oligonucleótidos para diferenciar entre EPEC y EHEC.	86
Figura 17. Resultados de la alineación global de <i>espF</i> y la región intergénica en el extremo 3' de EDL933 y E2348/69.	87
Figura 18. Resultados del BLAST de la región intergénica (RI) y <i>espF</i> de EPEC-E2348/69 y EHEC-EDL933 con genoma de <i>E. coli</i>	88
Figura 19. Esquema de localización de los oligonucleótidos diseñados para identificar <i>espF</i> en EPEC y EHEC.	91
Figura 20. Identificación de genes de EHEC (genes de toxina Shiga 1 y 2) y EAEC (gen de SST6 y activador transcripcional AggR) para determinar patotipo DEC.	92

Figura 21. Resultados de la estandarización de PCR múltiple genómica.	93
Figura 22. Estandarización para amplificar <i>espF</i> de EHEC y EPEC.	94
Figura 23. Figura: Resultados de la estandarización de PCR múltiple <i>espF</i> en EHEC y EPEC.	95
Figura 24. Electroforesis en gel de agarosa de PCR múltiple plasmídica en gradiente de temperatura.	96
Figura 25. Electroforesis en gel de agarosa de PCR múltiple cromosómica.	97
Figura 26. Electroforesis en gel de agarosa de PCR múltiple cromosómica.	98
Figura 27. Electroforesis en gel de agarosa de PCR múltiple plasmídica.	99

Índice de tablas

Tabla 1. Etiología de las ITU	14
Tabla 2. Características de los patotipos IPEC o DEC.....	36
Tabla 3. Características de los patotipos ExPEC.	37
Tabla 4. Fimbrias chaperona-ayudador de <i>E. coli</i> uropatógena y sus características	42
Tabla 5. Características genotípicas y fenotípicas* del cepario de <i>E. coli</i> aisladas de orina de mujeres cursando con ITU.....	60
Tabla 6. Cepas control utilizadas en este estudio.....	61
Tabla 7. Oligonucleótidos para <i>tosA</i> , <i>sfaC</i> y <i>tosA</i> , tamaño del amplicón, temperaturas de alineamiento y rango de temperatura para diseño de PCR cromosómica individual.....	64
Tabla 8. Características del gen a identificar, oligonucleótidos y condiciones empleadas para estandarizar PCR individual mediante gradiente.	65
Tabla 9. Componentes empleados para cada PCR individual.....	66
Tabla 10. Oligonucleótidos para <i>stxIA</i> , <i>stx2A</i> y <i>aaiG</i> , tamaño del amplicón, temperaturas de alineamiento y rango de temperatura para diseño de PCR cromosómica individual y múltiple.....	67
Tabla 11. Características del gen a identificar, oligonucleótidos y condiciones empleadas para realizar PCR múltiple cromosómica	68
Tabla 12. Componentes empleados para cada PCR múltiple cromosómica para patotipos híbridos.	68
Tabla 13. Temperaturas de alineamiento de los certificados de <i>espF</i>	69
Tabla 14. Características del gen a identificar, oligonucleótidos y condiciones empleadas para estandarizar PCR individual mediante gradiente.	70
Tabla 15. Componentes empleados para cada PCR espF patotipos híbridos.....	70
Tabla 16. Características del gen a identificar, oligonucleótidos y condiciones empleadas para realizar PCR múltiple plasmídica.....	71
Tabla 17. Componentes empleados para cada PCR múltiple plasmídica para patotipos híbridos.	72
Tabla 18. Oligonucleótidos del LBME para determinación de patotipos DEC	73
Tabla 19. Localización de los genes <i>tosA</i> , <i>focH</i> y <i>sfaC</i> en los contig de las cepas secuenciadas.....	79
Tabla 20. Análisis de los oligonucleótidos para la identificación de <i>stxIA</i>	82
Tabla 21. Análisis de los oligonucleótidos para la identificación de <i>stx2A</i>	84
Tabla 22. Resultados del alineamiento de RI + <i>espF</i> de EPEC-E2348/69 y EHEC-EDL933 con la secuencia del cromosoma de cepas <i>E. coli</i> pertenecientes a otros patotipo/categorías.	89
Tabla 23. Análisis de los oligonucleótidos para la identificación de espF.....	90

Abreviaturas

A/E: Adhesión y eliminación	Kb: Kilo de bases
ABC: ATP-binding cassette	LT: Enterotoxina termolábil
aEPEC: EPEC atípicas	MDR: Multidrogo resistente
AIEC: <i>E. coli</i> adherente-invasiva	NMEC: <i>E. coli</i> asociada a meningitis neonatal
APEC: <i>E. coli</i> patógena aviar	PAI: Isla de patogenicidad
CAUTI: ITU asociada al catéter	PAI-LEE: Isla de patogenicidad locus de eliminación enterocitos
CH: Colitis hemorrágica	QIR: Reservorios intracelulares quiescentes
CU: Chaperona-ayudador	RTX: Repeticiones en toxina
CUF: Fimbrias chaperona-ayudador	SEPEC: <i>E. coli</i> causante de sepsis
DAEC: <i>E. coli</i> difusamente adherente	SHU: Síndrome hemolítico urémico
EAEC: <i>E. coli</i> enteroagregativa	ST: Toxina termoestable
EIEC: <i>E. coli</i> enteroinvasiva	STEC: <i>E. coli</i> productora de toxina Shiga
EPEC: <i>E. coli</i> enteropatógena	SST1: Sistema de secreción de tipo 1
ETEC: <i>E. coli</i> enterotoxigénica	SST2: Sistema de secreción de tipo 2.
ExPEC: <i>Escherichia coli</i> patógena extraintestinal.	SST3: Sistema de secreción de tipo 3.
FV: Factor de virulencia	SST5: Sistema de secreción de tipo 5
GAG: Glucosaminoglicanos	PT4: Pili de tipo IV
IBC: Comunidades bacterianas intracelulares.	tEPEC: EPEC típicas
IG: Isla genómica	TU: Tracto urinario
IPEC: <i>Escherichia coli</i> patógena intestinal	UPEC: <i>E. coli</i> uropatógena
ITU: Infección de tracto urinario	XMR: Extremadamente resistente
ITUr: ITU recurrente	

Resumen

El tracto urinario (TU) es un sistema que permite recolectar, transportar, almacenar y eliminar la orina. Se divide en dos compartimentos: superior (riñones, y uréteres) e inferior (vejiga y uretra). Una infección de tracto urinario (ITU) se define como la colonización bacteriana o fúngica del TU, en cualquiera de sus compartimientos. Se clasifica en *no complicadas*, cuando afecta a individuos clínicamente sanos sin anomalías en el TU, y *complicadas*, cuando afecta a personas con algún tipo de afección o anomalía que comprometa sus vías urinarias o su sistema inmunológico. El principal agente etiológico de las ITU es *Escherichia coli*, responsable del 65% de las *complicadas* y del 75% de las *no complicadas*. En México, las ITUs son la tercera enfermedad infecciosa con mayor morbilidad, donde las mujeres, son la población más susceptible. Esto debido a que una de cada dos mujeres a lo largo de su vida, llegan a presentarlas. Las cepas de *E. coli* se clasifican en comensales y patógenas, y las patógenas se subdividen dependiendo del sitio de colonización y afección. Si se encuentra en sistema gastrointestinal se denomina *Escherichia coli* diarreagénica (DEC), pero si es fuera de este recibe el nombre de *Escherichia coli* patógena extraintestinal (ExPEC). No obstante, hay cepas que llegan a presentar las características de ambos patotipos, estas reciben el nombre de cepas patógenas híbridas, consideradas más patógenas debido a que posee factores de virulencia de diferentes patotipos.

El objetivo de este estudio fue determinar por PCR los genes involucrados en la biogénesis de las adhesinas fimbriales F1C (*focH*) y fimbria S (*sfaC*), y de la adhesina no fimbrial TosA (*tosA*), así como genes característicos de DEC: EPEC (*bfpA* y *espF*); EHEC (*stx1A*, *stx2A* y *espF*); ETEC (*ltA* y *eltB*); y EAEC (*aggR* y *aaiG*), para identificar patotipos híbridos en 51 cepas UPEC aisladas de mujeres que cursaron con ITU, provenientes del ISSSTEP. No obstante, también se realizó una búsqueda bioinformática de los genes de las adhesinas en los ensamblajes de 9 secuencias de cepas UPEC aisladas de diferentes individuos los cuales fueron comprobados por PCR. El DNA genómico se extrajo mediante lisis alcalina y el plasmídico por Quick-Prep. Para identificación del patotipo EHEC se diseñaron oligonucleótidos para la amplificar los genes *stx1A* y *stx2A*. Así mismo se diseñaron oligonucleótidos para poder diferenciar entre las PAI-LEE de EPEC y EHEC, mediante la amplificación de *espF*. Se estandarizaron las condiciones de temperatura, tiempo, ciclos y concentraciones en las PCR individuales (*focH*, *sfaC* y *tosA*) y múltiples (cromosómica, plasmídica y *espF*). Ninguna de las cepas provenientes del ISSSTEP presentaron *focH*, *sfaC* y *tosA*. Sin embargo, estos genes se encontraron en 4 de las cepas secuenciadas, encontrando a *tosA* en el 100% (4/4 cepas), *sfaC* en el 75% (3/4 cepas) y *focH* en el 50% (2/4 cepas). Por otro lado, se encontró la presencia de 11 cepas positivas a genes DEC: 2 amplificaron *aaiG* (componente del T6SS-3) y 8 amplificaron *espF* para el patotipo EHEC.

Se concluyó que la ausencia de los genes involucrados en la biogénesis de las adhesinas F1C, S y TosA, podría deberse a que las cepas estudiadas presentan genes que codifican otras adhesinas. No obstante, en cuatro de las nueve cepas secuenciadas estudiadas, en donde, tres fueron obtenidas de pacientes pediátricos, se reportó la presencia de los genes de adhesinas, lo cual, podría señalar que tienen una mayor importancia o que las condiciones en dichos pacientes permiten su adquisición. Así mismo, se encontraron cepas patógenas híbridas, debido a que amplificaron genes específicos de EAEC y PAI-LEE de EHEC, en ambos casos, dichos genes se encuentran en PAIs, por lo que su adquisición se produjo mediante la transferencia horizontal de genes, pudiéndose llevar en el tracto gastrointestinal, ya que funciona como un importante reservorio.

1. Introducción

1.1. Tracto urinario

El tracto urinario (TU) tiene como función recolectar, transportar, almacenar y eliminar la orina, la cual está compuesta por productos metabólicos excretados y residuos generados en los riñones. El TU se compone de extremo proximal a distal, por dos riñones, dos uréteres, una vejiga y una uretra, en donde cada uno desempeña un papel fundamental para la homeostasis del sistema (Tamadonfar, *et al.*, 2019).

El TU se divide en compartimento superior conformado por los riñones, encargados de filtrar la sangre con el fin de producir la orina y por los uréteres, encargados de transportar la orina producida de los riñones a la vejiga; y por el compartimento inferior que comprende la vejiga, órgano hueco y distensible que permite almacenar la orina, y la uretra, conducto por el cual se elimina la orina. La superficie luminal del tracto urinario inferior (vejiga y uretra proximal o prostática en hombres), está revestida por el uroepitelio, el cual es un epitelio especializado de transición recubierto por una fina capa de glicosaminoglicanos (GAG) que funciona como barrera de permeabilidad que acomoda el flujo y volumen de la orina. Así mismo, impide el intercambio no regulado de productos metabólicos entre la sangre y la orina. Superficialmente está compuesto por una capa de células multinucleadas y altamente diferenciadas, denominadas “células sombrilla” que contienen a la proteína transmembranal uroplaquina, la cual es fundamental en el mantenimiento de la barrera de permeabilidad. Las capas intermedia y basal son más pequeñas y presentan células menos diferenciadas, incluyendo células madre necesarias para la generación de las células sombrilla (Neugent, *et al.*, 2020; Tamadonfar, *et al.*, 2019).

El TU es considerado relativamente estéril pues a pesar de que alrededor de la uretra viven bacterias que llegan a colonizar la vejiga, se eliminan durante la micción. No obstante, actualmente hay evidencia de una microbiota urinaria, comunidad que es difícil de estudiar. En ausencia de una infección de tracto urinario (ITU) el microbioma urinario presenta una biomasa baja entre <100 y $<10^5$ UFC /mililitro de orina (Tamadonfar, *et al.*, 2019; Rowe & Juthani-Mehta, 2013).

1.2. Infección de tracto urinario (ITU).

Una ITU se define en términos generales como la colonización bacteriana del sistema urinario, ya sea del compartimento inferior y/o del superior de una persona susceptible. La ITU se clasifica clínicamente en *no complicada*, cuando afecta a personas clínicamente sanas y sin alguna anomalía estructural o neurológica del TU, y *complicada*, cuando se presenta en personas que tienen algún factor que compromete sus vías urinarias o su sistema inmunológico. Mayoritariamente la ITU no complicada se manifiesta como infección del tracto urinario inferior: infección e inflamación de la uretra (uretritis) o de la vejiga urinaria (cistitis). Es una infección que no presenta fracaso terapéutico ni mala evolución. (Flores-Mireles, *et al.*, 2019; Tamadonfar, *et al.*, 2019). Sin embargo, una ITU complicada es aquella que se presenta en pacientes inmunodeprimidos, hombres y embarazadas, están asociadas con fiebre, sepsis, obstrucción urinaria, catéteres o que afecten a los riñones. Es una infección con alta probabilidad de fracaso durante el tratamiento, por ello, requieren tratamientos más prolongados, antibióticos alternativos y, en ocasiones, evaluaciones diagnósticas adicionales para garantizar un tratamiento eficaz (Tamadonfar, *et al.*, 2019; Sabih, *et al.*, 2024).

1.2.1. Etiología

Aproximadamente en el 75% de las ITU se aísla un único patógeno bacteriano, en el 20% dos especies coinfectantes y alrededor del 5% es causada por tres especies. Son causadas por bacterias Gram positivas y Gram negativas, así como por determinados hongos. *Escherichia coli* uropatógena (UPEC) es el agente causal principal de las ITU complicadas y no complicadas, aislándose en un 65% y 75% respectivamente. En el caso de las ITU complicadas también pueden ser causadas por orden de frecuencia a: *Enterococcus* spp., *Klebsiella pneumoniae*, *Candida* spp., *Staphylococcus aureus*, entre otros. Por su parte en las no complicadas encontramos a *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Enterococcus* spp. y otros (**Tabla 1**) (Olin & Bartges, 2015; Flores-Mireles, *et al.*, 2015).

Tabla 1. Etiología de las ITU

Clasificación	Patógeno	ITU complicadas	ITU no complicadas
Gram negativos	<i>Escherichia coli</i>	65%	75%
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	8%	6%

	<i>Proteus mirabilis</i>	2%	2%
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2%	1%
Gram positivos	<i>Enterococcus</i> spp.	11%	5%
	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	0%	6%
	<i>Staphylococcus aureus</i>	3%	1%
	<i>Streptococcus</i> grupo B	2%	3%
Hongos	<i>Candida</i> spp.	7%	1%

Flores-Mireles, *et al.*, 2015.

1.2.2. Epidemiología

En el mundo, anualmente se reportan más de 150 millones de personas que presentan una ITU, generando una carga económica de alrededor de 6,000 millones de dólares. Más del 50% de la población femenina y, por lo menos, el 12% de la población masculina sufren un episodio de ITU a lo largo de su vida. En Estados Unidos de América (EUA) las ITUs son las infecciones ambulatorias más habituales, reportando 250,000 casos de pielonefritis anuales, siendo la población femenina la más afectada, en donde las mujeres de 18-49 años, presentan una incidencia de 28 casos por cada 10,000 mujeres requiriendo hospitalización en el 7% de los casos (Foxman, 2014; Medina, *et al.*, 2019).

En México, las ITU son la tercera enfermedad infecciosa con mayor morbilidad, solo por detrás de las infecciones respiratorias agudas y las gastrointestinales y por encima de las infecciones por COVID-19. Con base en datos del Boletín Epidemiológico emitido por el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE), en México se reportan más de 2,000,000 de casos nuevos de ITU por año. Hasta la semana 12 del 2025 (16 al 22 de marzo), se han reportado 725,855 casos (**Figura 1**) (SINAVE, 2025).

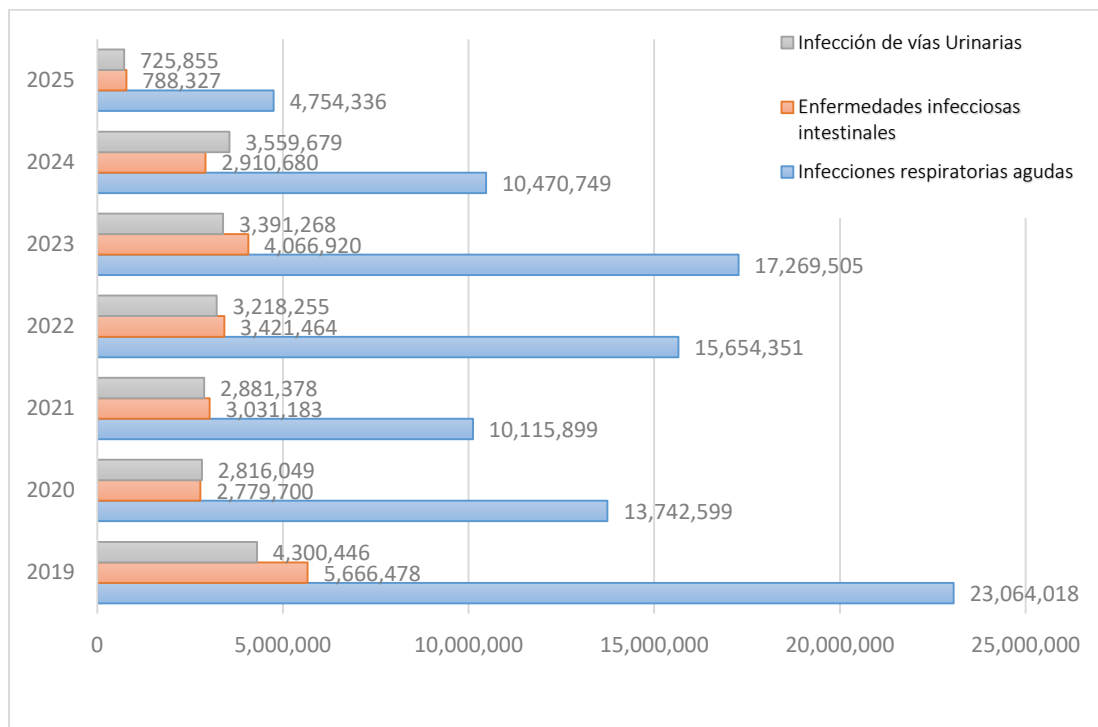


Figura 1. Casos nuevos de enfermedades infecciosas de vigilancia convencional.

Casos nuevos reportados de las tres principales enfermedades infecciosas en México por el Boletín Epidemiológico del año 2019 a la semana 12 del 2025 (datos obtenidos de SINAVE, 2025).

Una de cada dos mujeres a lo largo de su vida llegan a presentar ITU. En mujeres adultas, del 50-60%, presentaran al menos una ITU. Este riesgo en mujeres, aumenta con la edad, exceptuando las mujeres jóvenes de entre 14 y 24 años, en donde se presenta un pico de incidencia. En mujeres mayores de 65 años la prevalencia es de aproximadamente el 20%, en contraste con aproximadamente el 11% en la población general (Foxman, 2014; Medina, et al., 2019).

Los casos de ITU en población femenina mexicana representa más del 70% de todos los casos nuevos reportados en el Boletín Epidemiológico. Hasta la semana 12 del 2025 se han reportado 559,353 casos en mujeres y 166,502 en hombres, representando el 77.0% y 23.0%, respectivamente, del total de casos (**Figura 2**) (SINAVE, 2025).

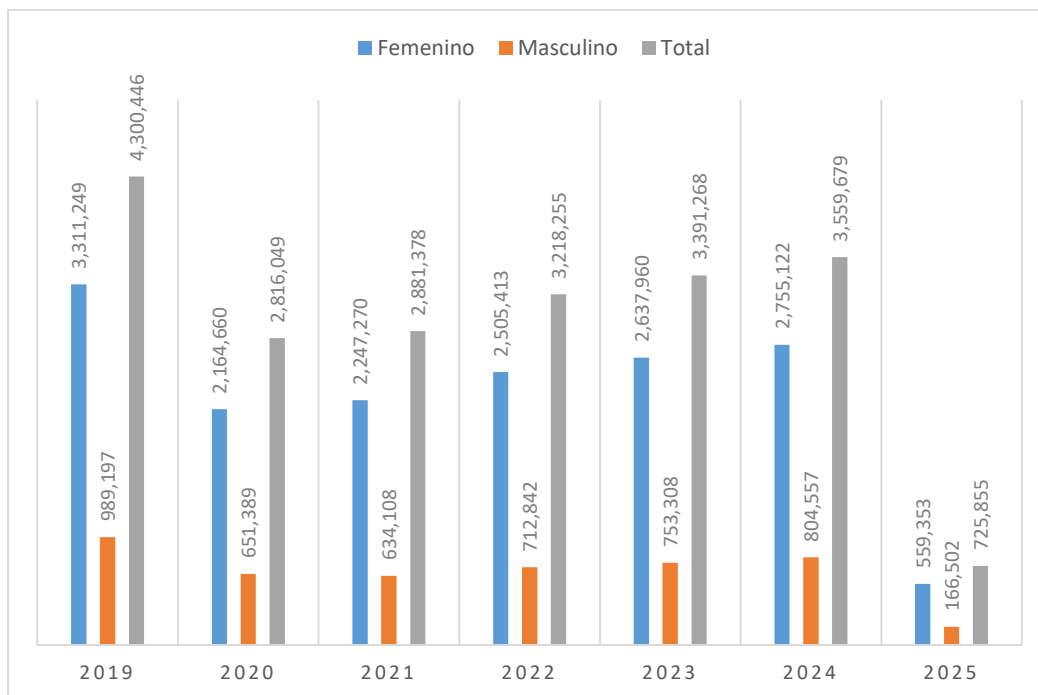


Figura 2. Infección de vías urinarias en México.

Casos nuevos de ITU en México agrupados por sexo, reportados por el Boletín Epidemiológico del año 2019 a la semana 12 del 2025 (datos obtenidos de SINAVE, 2025).

1.2.3. Factores de riesgo en población femenina

Las mujeres, en comparación con los hombres, son más vulnerables a las ITU debido a factores de anatómicos (la longitud de la uretra femenina es de 3.8 cm mientras que en los hombres es de aprox. 20cm), edad, conductuales, genéticos, y aquellos relacionados con el embarazo y el sondaje urinario (**Figura 3**). Todos estos factores contribuyen a que las mujeres sean más propensas a una ITU recurrente (ITUr), la cual se define como la aparición de más de dos episodios sintomáticos en un lapso de 6 meses o más de tres episodios sintomáticos en un plazo de 12 meses (Storme, et al., 2019; Kaur & Kaur, 2020).

Los hombres son más resistentes a las ITU, pues anatómicamente la uretra es más larga que en las mujeres, le permite la eliminación de los uropatógenos por medio de la expulsión de la orina antes de que lleguen a la vejiga. Además, en las mujeres hay menor distancia entre el orificio uretral y anal, así como con la cavidad vaginal, lo que facilita el desplazamiento de las bacterias que se encuentran en el intestino, la zona periuretral y la cavidad vaginal

hacia el tracto urinario. Así mismo presentan más zonas húmedas en la periuretra donde crecen bacterias (Foxman, 2014; Kaur & Kaur, 2020).

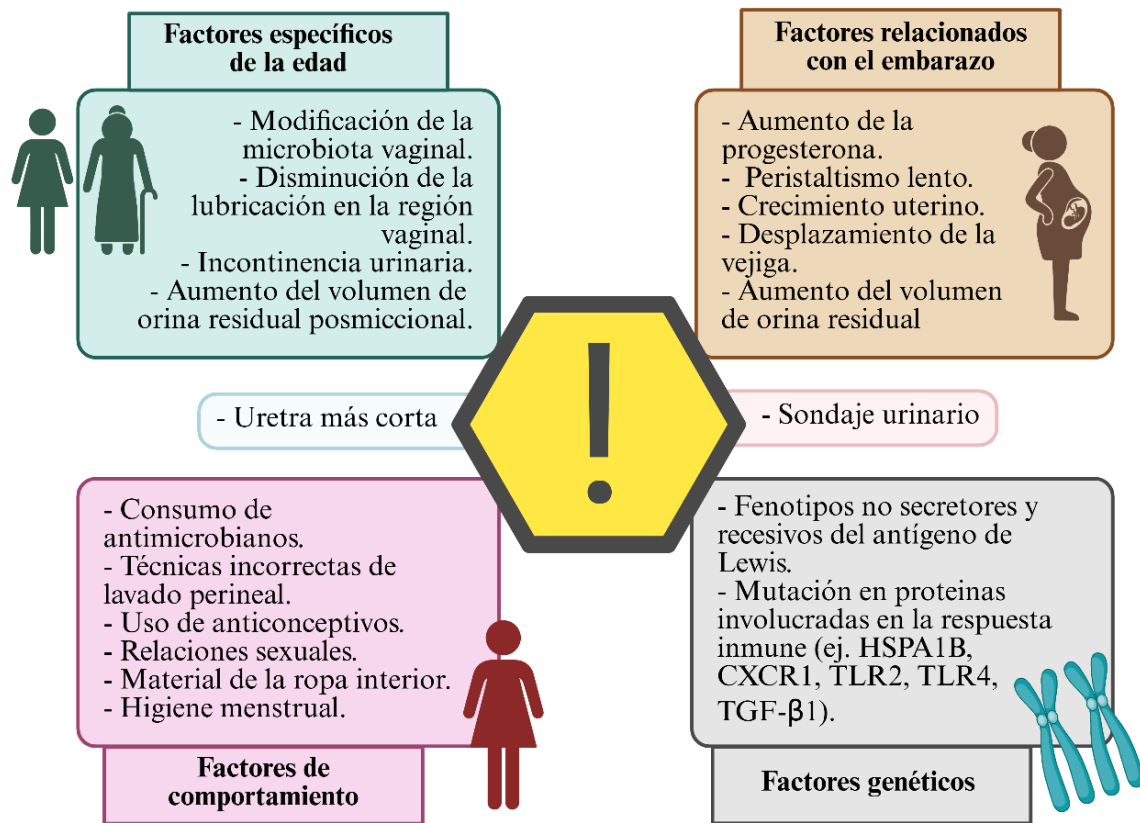


Figura 3. Factores de riesgo en población femenina.

La población femenina es más susceptible a las ITU debido a diferentes factores de riesgo asociados a la edad, el embarazo, el comportamiento, la genética, la anatomía o el sondaje urinario. Elaboración propia, creado en <https://BioRender.com>.

1.3. *Escherichia coli*

En 1885, el microbiólogo y pediatra alemán Theodor Escherich, estudia el papel de los microorganismos intestinales infantiles en la digestión y la enfermedad, durante uno de sus análisis aísla en heces de lactantes una bacteria de crecimiento rápido a la que llama *Bacterium coli commune* que años después recibe oficialmente el nombre de su descubridor: *Escherichia coli*. Se cataloga como el agente causal de la diarrea infantil (Riley, 2020; Geurtsen, *et al.*, 2022). Es un bacilo Gram-negativo anaerobio facultativo perteneciente al género *Escherichia* de la familia *Enterobacteriaceae*. Tras el nacimiento coloniza el tracto gastrointestinal de los recién nacidos, humanos y animales de sangre caliente, estableciendo

una relación simbiótica, convirtiéndolo en un miembro benigno de la microbiota intestinal, no obstante, cuando el hospedador está inmunodeprimido o sus barreras gastrointestinales están dañadas la bacteria puede desencadenar una enfermedad (Pakbin, *et al.*, 2021; Jesser & Levy, 2020).

Es el microorganismo modelo más empleado en la investigación microbiológica, genética y de biología molecular, por lo que ha permitido la comprensión del código genético, la transcripción del ADN y las enzimas de restricción. Blount en 2015 menciona que es "El organismo más intensamente estudiado y mejor comprendido del planeta" (Geurtsen, *et al.*, 2022).

1.3.1. Filogenética y tipificación de *Escherichia coli*

Serológicamente las cepas de *E. coli* se clasifican con base en las diferencias antigénicas de los antígenos H (flagelar) y O (lipopolisacárido). Existen 173 antígenos O y los 56 antígenos H (flagelares), usando el esquema de tipificación introducido en 1947 por Kauffmann. Al conjunto de cepas bacterianas que poseen el mismo antígeno O se le denomina "serogrupo", mientras que a la combinación específica de un antígeno O y uno H se le denomina "serotipo". Los antígenos K (capsular) y F (fimbrial) también se incluyen en la clasificación de Kauffmann. La agrupación de las cepas de *E. coli* en un serogrupo o serotipo determinado puede relacionarse con la presencia de determinados factores de virulencia y se usa en estudios epidemiológicos. No obstante, la determinación de los antígenos por sí sola no puede predecir las características genotípicas o de patogenicidad, ya que, por medio de la transferencia horizontal de genes, cepas fenotípicamente idénticas pueden presentar diferencias genotípicas (Flores-Mireles, 2015; Sora, *et al.*, 2021).

Las cepas de *E. coli* también se clasifican en grupos filogenéticos con base en los resultados de la PCR-cuádruplex en donde se identifica: *chuA* (receptor del grupo hemo/hemoglobina), *yjaA* (proteína inducida por estrés), *arpA* (control interno de la pureza del DNA) y TspE4.C2 (lipasa esterasa putativa) (Clermont, *et al.*, 2013). No obstante, Clermont, *et al.*, 2019, añadió la identificación de *ybgD* (proteína fimbrial putativa) y *cfaB* (subunidad principal del antígeno del factor de colonización I (CFA/I), para diferenciar el grupo F y G. Con base en la amplificación de uno o más se determina su filogrupo: A (*arpA* o *arpA-yjaA*), B1 (*arpA-*

TspE4.C2), B2 (*chuA-yjaA*, *chuA-yjaA-TspE4.C2* o *chuA-TspE4.C2*), C (*arpA-yjaA*), D (*arpA-chuA* o *arpA-chuA-yjaA*), E (*arpA-chuA*, *arpA-chuA-TspE4.C2* o *arpA-chuA-yjaA*), F (*chuA-ybgD*), G (*chuA-cfaB* o *chuA-TspE4.C2-cfaB*¹), clado I (*yjaA*, *arpA-chuA-TspE4.C2*) y clado V (negativo a todos los genes) (**Anexo 1** y **Anexo 2**). Las cepas pertenecientes a los grupos A y B1, generalmente son cepas comensales que se encuentran predominantemente en el tracto gastrointestinal. En el caso de las responsables de infecciones intestinales, generalmente se encuentran en filogrupos A, B1 o D. Por su parte, aquellas responsables de infecciones extraintestinales pertenecen a los grupos B2 y D. El grupo E está relacionado con el grupo D (incluido el O157: H7), así mismo, el grupo F está relacionado con el grupo principal B2. Para los clones de cepas de *E. coli*, que son genéticamente diversos, pero fenotípicamente indistinguibles, se han asignado al clado críptico I (Clermont, et al., 2013; Sarowska, et al., 2019; Santos, et al., 2020).

1.4. Patotipos de *Escherichia coli*

El término "patotipo" define a todas aquellas variantes patógenas de un grupo de microorganismos taxonómicamente relacionados capaces de colonizar en un hospedador (Riley, 2020). Un patotipo tiene la capacidad de entrar, colonizar y sobrevivir el tiempo suficiente para causar un cuadro clínico en personas susceptibles, ya sea en el mismo sitio donde reside su homólogo comensal o en un sitio distinto (Riley, 2020; Sokurenko, 2016).

Las cepas de *E. coli* patógenas se distinguen de su contraparte comensal por la presencia de factores de virulencia y adaptación, obtenidos a través de la adquisición de nuevos genes por medio de la transferencia horizontal. Así mismo, presentan la inactivación de genes incompatibles con la virulencia, denominados genes anti-virulencia, los cuales son ventajosos en un entorno no patógeno, pero perjudiciales en un entorno de daño, proceso denominado pleiotropía antagonista. Además, por la alteración de los genes existentes por mutaciones patoadaptativas que dan lugar a la pérdida, sobreexpresión o variación de genes, que les permiten en última instancia desencadenar una sintomatología. Actualmente, las cepas patógenas se clasifican en patotipos, los cuales consideran sus factores de virulencia,

¹ Genotipo raro en cepas pertenecientes al filogrupo G. Se puede presentar en cepas del filogrupo B2 que han perdido el gen *yjaA*.

las enfermedades generadas en humanos, la epidemiología, los serotipos y la interacción con la célula hospedera. Con base en ello, las *E. coli* se clasifican en aquellas que pueden causar infección del sistema gastrointestinal (*Escherichia coli* patógena intestinal, IPEC o diarreagénica, DEC) o fuera de este (*Escherichia coli* patógena extraintestinal, ExPEC) (Pakbin, et al., 2021; Jesser & Levy, 2020).

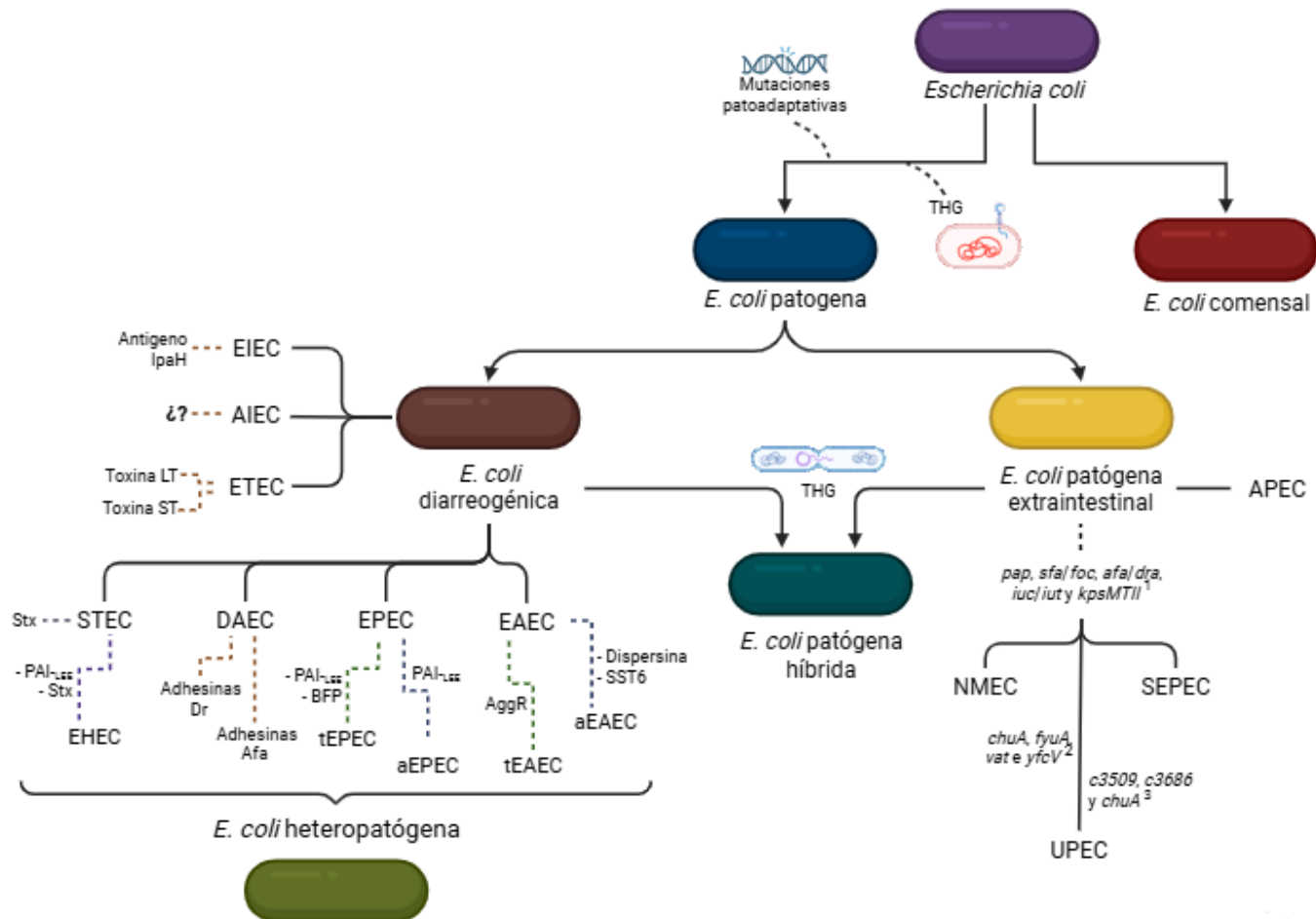


Figura 4. Clasificación de las cepas de *Escherichia coli* y criterios propuestos para la clasificación de cepas ExPEC

E. coli se clasifica en comensal y patógena, en donde, esta última se divide en *E. coli* diarreagénicas y *E. coli* patógena extraintestinal, teniendo como categorías diarreagénicas: ETEC, *E. coli* enterotoxigénica; EIEC, *E. coli* enteroinvasiva; EAEC, *E. coli* enteroagregativa; EPEC, *E. coli* enteropatógena; STEC, *E. coli* productora de toxina Shiga; EHEC, *E. coli* enterohemorrágica; DAEC, *E. coli* difusamente adherente; AIEC, *E. coli* adherente-invasivo. Categorías extraintestinales: UPEC, *E. coli* uropatógena; NMEC, asociada a meningitis neonatal; SEPEC, *E. coli* causante de sepsis; APEC, *E. coli* patógena aviar. Criterios propuestos para la clasificación de cepas ExPEC: 1, esquema de Johnson, *et al.*, 2003; 2, esquema de Spurbeck, *et al.*, 2012; 3, esquema de Brons, *et al.*, 2020. THG, transferencia horizontal de genes; SST6, sistema de secreción tipo 6; PAI-LEE, isla de patogenicidad de eliminación de enterocitos; Stx, toxina Shiga; BFP, pili formador de mechones; LT, termolábil; ST, termoestable. Elaboración propia, creado en <https://BioRender.com>. Se muestran algunos factores de virulencia involucrados en la patogenicidad de los diferentes patotipos de *E. coli*.

1.4.1. *Escherichia coli* patógenas intestinales

Separar las DEC de las *E. coli* comensales es un reto, ya que se tiene que atribuir a un subgrupo concreto de cepas la producción de una enfermedad en el mismo nicho donde habitan cepas comensales. Esto se logra tras la identificación de genes característicos de las IPEC, ausentes en las cepas comensales (Riley, 2020). Dentro de las DEC encontramos a: *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC) y su subtipo, *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* difusamente adherente (DAEC) y *E. coli* adherente-invasivo (AIEC). Se clasifican en función de los factores de virulencia que presenta, el mecanismo de infección, las interacciones de las bacterias con las células del huésped, el cuadro clínico del hospedero y el tropismo tisular (Pokharel, et al., 2023).

Su identificación, a excepción de AIEC y DAEC, puede generarse mediante la detección de genes específicos de virulencia directamente relacionados con la patogénesis de la bacteria, el desarrollo de la enfermedad y la sintomatología en el hospedero. Se ha propuesto a AIEC como la causa de la enfermedad inflamatoria intestinal, no obstante, no existe consenso al respecto, así mismo los FV putativos descritos como implicados en su patogénesis son comunes en cepas ExPEC. Por otro lado, DAEC es un patógeno entérico reconocido, ocasionalmente se identifica mediante la determinación de genes que codifican adhesinas afimbriales que también están presentes en otras cepas IPEC, incluso en comensales y ExPEC, por lo que su utilización para definir este patotipo es limitado (Tabla 1) (Jesser & Levy, 2020; Santos, et al, 2020).

1.4.1.1. ETEC

Es una de las principales causantes de "diarrea del viajero" en turistas que visitan países en vías de desarrollo. Ocasiona diarrea leve con síntomas similares a los del cólera. Se identifica por la producción de una o dos enterotoxinas, la toxina termolábil (LT) y/o la toxina termoestable (ST), responsables de alterar los mecanismos de secreción del intestino generando una diarrea acuosa. Se diagnostica mediante por la sintomatología, la detección

de *E. coli* con su identificación de los genes toxigenicos (Jesser & Levy, 2020; Pokharel, Dhakal & Dozois, 2023).

a. Toxina termolábil (LT, por sus siglas en ingles Heat-labile enterotoxin)

Es una enterotoxina tipo AB codificada por el operón *eltAB* ubicado en un plásmido de virulencia, es idéntica a la toxina del cólera, a nivel estructural y funcional. Es heterohexamérica, compuesta por una subunidad A, componente catalítico, y una subunidad B pentámera, responsable de la unión a los glucoconjugados de los epitelios. La subunidad A presenta dos dominios unidos por un enlace disulfuro: A1 presenta la actividad enzimática activa, estimula la proteína G, por otro lado, A2 sirve como puente entre A1 y la subunidad B, los ancla, así mismo, presenta una función de penetración celular, transporta la proteína a través de la membrana hasta el espacio intracelular. Con base en su capacidad antigénica y a su secuencia genética, la LT se clasifica en dos categorías: tipo I que se divide en la aislada de humanos (LT-Ih) y la aislada en porcinos (LT-Ip), por otro lado, tenemos el tipo II, subdivida en LT-IIa, LT-IIb y LT-IIc, aisladas predominantemente de animales. Presentan diferentes características de unión. El receptor primario de LT-I es el gangliósido GM1, puede unirse también a GD1b, GM2 y asialo-GM1, aunque presenta menos estabilidad. Cada uno de los subtipos de LT-II presenta receptores preferentes diferentes, su subunidad B podría unirse al receptor tipo Toll. La afinidad y especificidad de unión de LT está influida directamente por los residuos de LTB. La toxina presenta afinidad con el lipopolisacárido (LPS), presente en la pared celular de bacterias Gram negativas (Zhang & Ma, 2022).

b. Toxina termoestable (ST, por sus siglas en ingles Heat-Stable enterotoxin)

Es un péptido pequeño, no inmunogénico que se clasifica en dos categorías con base en su estructura y función. STa, posee seis residuos de cisteína que forman tres enlaces disulfuro, muy similar en estructura y secuencia a la guanilina y la uroguanilina, ambas con dos enlaces disulfuro, se subdivide en STaH (19aa), presente únicamente en cepas humanas de ETEC, y la STaP (18aa), que se encuentra en cepas aisladas de porcinos, bovinos y humanos. Por el otro lado encontramos STb, péptido de 48 aminoácidos presente en cepas aisladas de bovinos, pero no en humanos (Zhang & Ma, 2022).

1.4.1.2. EPEC

Se asocia principalmente con diarrea acuosa en niños en países en desarrollo. Puede generar una infección subclínica o fatal. Histopatológicamente se caracterizan por generar una lesión denominada "adherencia y destrucción o retracción (A/E)", producida cuando las bacterias se adhieren íntimamente a las células epiteliales intestinales alterando su citoesqueleto al acumular la actina debajo de las bacterias adheridas. Los genes involucrados en estas lesiones están codificados en la isla de patogenicidad "locus de destrucción del enterocito" (PAI-LEE), presente en su cromosoma, su detección se centra en el gen que codifica intimina, *eae* (Tanabe, *et al.*, 2020; Nascimento, *et al.*, 2022). No obstante, algunas cepas portan el plásmido del factor de adherencia de EPEC (pEAF) que codifica el pilus BFP (pili formador de mechones). Aquellas cepas BFP⁺ se nombran EPEC típicas (tEPEC), mientras que las BFP⁻ se denominan como EPEC atípicas (aEPEC). Las aEPEC presentan adherencia difusa, localizada y agregativa, pueden generar desde una enfermedad aguda hasta diarrea sanguinolenta persistente, por otro lado, las tEPEC únicamente presentan un patrón de adherencia localizada, está asociada a diarrea secretora con moco. Las cepas de aEPEC se puede encontrar en humanos y animales, mientras que el reservorio de las tEPEC es el humano. (Jesser & Levy, 2020; Pokharel, Dhakal & Dozois, 2023).

a) Pili formador de mechones BFP

Son pili tipo IV (PT4), los cuales son apéndices superficiales filamentosos y flexibles involucrados en muchos procesos, tales como la colonización, motilidad contractil, formación de biopelícula, transferencia horizontal de genes, e incluso, en la patogénesis de ciertas bacterias. La maquinaria involucrada en la biogénesis de estos pili presenta una gran similitud a nivel de secuencia con las proteínas de los sistemas de secreción de tipo II (T2SS) y los sistemas de captación de ADN (Ramboarina, S., *et al.*, 2005; Daniel, A., *et al.*, 2006).

BFP está codificada en un operón de 14 genes, de *bfpA* a *bfpL* en el plásmido EAF. Es una estructura homopolimérica, teniendo a la pilina bundlina como proteína estructural. La prebundlina es codificada por el gen *bfpA*. BfpA contiene un péptido líder N-terminal corto con carga positiva, el cual, es escindido por BfpP una pre-pilina peptidasa, que también N-metila el amino-terminal naciente, resultando en una proteína de 19 kDa. Hay tres genes,

bfpI, *bfpJ* y *bfpK*, que codifican proteínas estructuralmente similares a la bundlina, presentan el sitio de corte de la peptidasa prepilina, la secuencia hidrofóbica N-terminal y las cisteínas conservadas en sus dominios C-terminales. Por otro lado, las proteínas codificadas por *bfpD* y *bfpF* son ATPasas involucradas en la extensión y retracción del BFP, respectivamente. Siendo *bfpD* indispensable para la expresión del pili, mientras que *bfpF* no lo es, pues las mutantes por delección para este gen muestran un fenotipo híper-adherente en comparación con la cepa EPEC parental de tipo silvestre. Los otros genes están implicados en la biogénesis, entre ellos, una proteína politópica de la membrana citoplasmática, proteínas de unión a nucleótidos y una secretina de la membrana externa. Mediante análisis mutagénicos se ha revelado que dichas proteínas son indispensables para la biogénesis funcional, pero no para la expresión o procesamiento de la prepilina (Daniel, A., et al., 2006; Martínez de la Peña, C. F., et al., 2015; Ledwaba, S. E., et al., 2022).

Los BFP expresados por tEPEC representa un FV de suma importancia, ya que ayudan al proceso de A/E, permitiendo la adherencia localizada, adhesión temprana y no íntima de las bacterias a las células huésped. Se expresan durante la interacción bacteria-bacteria, permitiendo la formación de una red de fibras que resulta en la formación de microcolonias, aumentando la estabilidad de la bacteria en la mucosa, así mismo, participan en dispersión de bacterias a partir de microcolonias (Martínez de la Peña, C. F., et al., 2015; Ledwaba, S. E., et al., 2022).

b) LEE

En 1995 se descubrió, en la cepa EPEC E2348/69, la PAI-LEE, isla que no se ha encontrado en la microbiota bacteriana fisiológica normal ni en los derivados de la cepa de *E. coli* K-12. Presenta un contenido de G+C de ~38%, el cual difiere considerablemente del genoma *de E. coli*, ~50%, por lo que se intuye que EPEC la adquirió, probablemente, mediante transferencia horizontal de genes desde un ancestro desconocido, hasta ahora. Varios estudios han demostrado su transferencia horizontal espontánea de una cepa donadora a una receptora. Así mismo, LEE se localiza, generalmente, en el loci de genes de ARNt, utilizados generalmente como sitios de inserción para bacteriófagos. En la E2348/69 se encuentra integrado en *selC*, gen tRNA. Los factores involucrados en la formación de las lesiones A/E

son codificados en la PAI-LEE. Además de EPEC, se ha observado esta isla en otros patotipos intestinales de *E. coli*, como EHEC, así como en otras enterobacterias, *Citrobacter rodentium* y *Escherichia albertii*. La mayoría de estas cepas, no únicamente son patógenas para humano, sino que también afectan a otros mamíferos: ratones, conejos y ganado vacuno (Müller, D., *et al.*, 2009; Furniss, R. C. D., *et al.*, 2017; Desvaux, M., *et al.*, 2020)

La PAI-LEE de 35 kb consta de 41 genes, contiene los genes para sintetizar un T3SS, varias proteínas efectoras bacterianas, las chaperonas de estos efectores, la adhesina intimina y elementos reguladores. Está organizado en cinco operones policistrónicos: LEE1, LEE2, LEE3, LEE4 y LEE5, un operón bicistrónico (*grlAB*) y múltiples unidades de transcripción monocistrónicas. LEE1 contiene los genes que codifican Ler, regulador maestro de virulencia, las chaperonas Cesa y B, así como los componentes estructurales del T3SS: EscR, EscS, EscT, EscU, EscK y EscL. LEE2 codifica tres componentes de la maquinaria T3SS: EscC, EscJ y SepD, la chaperona CesD, el efector EspZ y un ORF con función desconocida. LEE3 codifica tres componentes de la maquinaria T3SS: EscV, EscN y SepQ, el efector EspH y dos ORF con función desconocida. LEE4 codifica las proteínas que forman la punta del T3SS, EspB y EspD, el filamento de aguja, EspA, la proteína de aguja, EscF, la chaperona CesD2, la proteína portera SepL y el efector EspF. Finalmente, LEE5 contiene Tir, receptor de intimina translocado, e intimina y la chaperona CesT. El efector Map se localiza en el extremo 5' de LEE5, y el efector EspG está encuentra único al extremo 5' de LEE1 (Müller, D., *et al.*, 2009; Furniss, R. C. D., *et al.*, 2017).

1.4.1.3. STEC/EHEC

Son cepas que infectan el tracto digestivo y causan diarrea hemorrágica. Se denomina STEC a cepas de *E. coli* que adquiere la capacidad de producir la toxina Shiga (Stx) mediante la transferencia horizontal del gen por medio de un fago. No todas las STEC pueden infectar al ser humano, solo un subconjunto de ellas es responsable de enfermedades humanas, colitis hemorrágica (CH) y síndrome hemolítico urémico (SHU), denominadas EHEC. La mayoría de las EHEC albergan la isla de patogenicidad cromosómica LEE, que codifica el sistema de secreción de tipo III (T3SS), una adhesina denominada intimina y su receptor Tir, que permiten la adhesión íntima de la bacteria al epitelio intestinal causando lesiones A/E,

compartidas con cepas EPEC. Otro factor que potencialmente contribuye a la virulencia es la EHEC-Hly (Schwidder, *et al.*, 2019; Joseph, A., *et al.*, 2020).

a) Toxina Shiga

En 1898, el microbiólogo japonés Kiyoshi Shiga descubre las Stx en la bacteria *S. dysenteriae*. Aproximadamente 80 años después se identifica su producción en aislados de *E. coli*, denominadas Stx1, con el fin de poder distinguirla de la producida por *S. dysenteriae*. Es una toxina estructural y antigénicamente idéntica. Posteriormente, se identifica en estas cepas la producción de Stx2, toxina que tiene el mismo modo de acción. Las Stx, también conocidas como toxinas Vero, son un grupo de toxinas proteicas AB₅, consisten en una subunidad A monomérica, presenta actividad N-glicosidasa, unida de forma no covalente a una subunidad B pentamérica, responsable de unirse a un receptor de la superficie celular, el glicoesfingolípido globotriaosilceramida (Gb3, también conocido como CD77). Funcionalmente pertenecen a la familia de las proteínas que inactivan el ribosoma, bloquean la síntesis de proteínas mediante la eliminación de un residuo de adenina del ARNr 28S del ribosoma 60S. Los genes de las subunidades se encuentran en un clúster, con el gen de la subunidad A 5' al de la subunidad B, dentro de la secuencia de un bacteriófago inducible, lisogénico, similar a lambda (Melton-Celsa, 2014; Joseph, A., *et al.*, 2020).

Las toxinas Shiga existen como dos tipos inmunológicamente distintos, Stx1 y Stx2, que comparten la misma estructura y función pero que no se neutralizan de forma cruzada con anticuerpos heterólogos debido a su homología de sólo el 50%, así como a sus 10 subtipos (Stx1a, Stx1c, Stx1d, y Stx2a-Stx2g). Las Stx prototipo de *E. coli* de cada grupo principal, Stx1a y Stx2a, son las más comunes encontrados en asociación con enfermedades de sus respectivos grupos, existen subtipos de cada toxina. Se asocia fuertemente la presencia de Stx2 con la colitis hemorrágica y SHU en comparación con Stx1 o con la presencia de ambos genes. Dentro del tipo Stx2, Stx2a se asocian a un mayor riesgo de enfermedad humana (Melton-Celsa, 2014; Joseph, A., *et al.*, 2020).

b) PAI-LEE

Las PAI-LEE centrales de EPEC y EHEC, presentan una homología del 93,9% a nivel de nucleótidos, sin embargo, la LEE de EHEC en su ríó debajo de LEE4 posee 13 ORF adicionales debido a la inserción de un profago críptico 933L, en EHEC (Figura caja roja).

No obstante, las secuencias de los genes individuales de las 5 unidades transcripcionales de LEE pueden presentar 100% de identidad como en el caso de los componentes estructurales del SST3, o una identidad del 33,52%, como es el caso del efector Tir (Müller, D., *et al.*, 2009; Furniss, R. C. D., *et al.*, 2017).

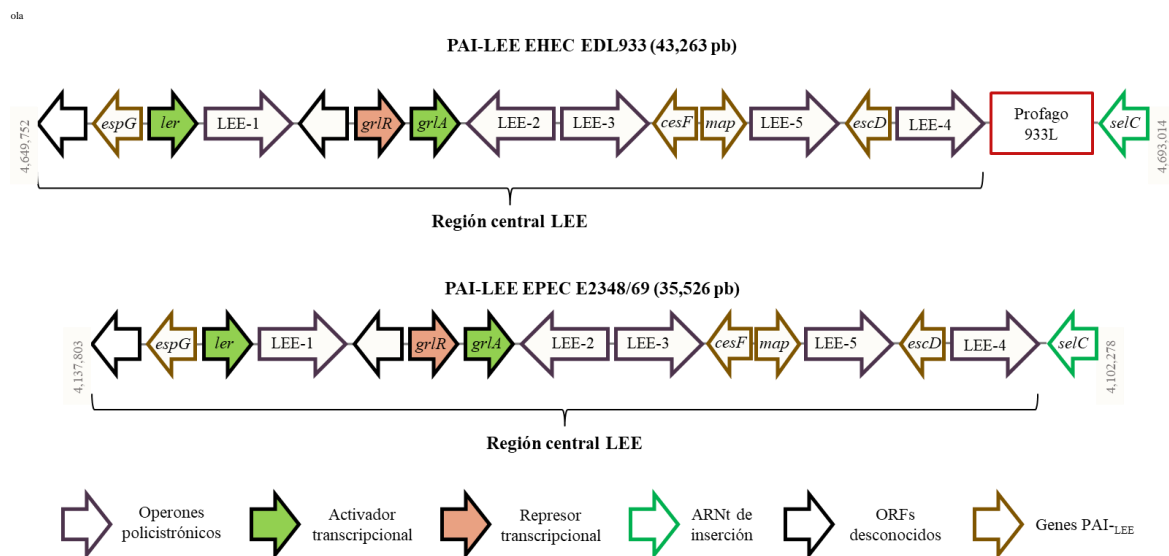


Figura 5. Esquema de la organización de LEE en EPEC E2348/69 y en EHEC EDL933.

Organización de las PAI-LEE de las cepas prototipo E2348/69 y EDL933, con número de número de acceso FM180568 y AE005174, respectivamente. Los activadores transcripcionales se representan con flechas rellenas verdes y los represores transcripcionales con flechas rellenas rojas. Los operones policistrónicos putativos están designados por flechas con contorno morado. Las flechas con contorno negro representan marcos de lectura abiertos de función desconocida y las flechas con contorno dorado representan genes presentes en la PAI-LEE que no pertenecen a los operones policistrónicos. El profago presente en EHEC se representa con un cuadrado con contorno rojo. El sitio de inserción de las LEE se muestra como una flecha con contorno verde. El tamaño de las flechas no es proporcional a la longitud original (Müller, D., *et al.*, 2009; Furniss, R. C. D., *et al.*, 2017). Elaboración propia.

1.4.1.4. EAEC

Son cepas que provocan diarrea en niños, personas mayores e inmunodeprimidos, en todo el mundo, aunque puede aislarse de sujetos asintomáticos. Fueron descritas en 1987 por su adherencia agregativa (AA) a células HeLa² y/o HEP-2³, patrón caracterizado por una disposición similar a ladrillos apilados, que permite diferenciarlas de DAEC y EPEC. Se reportan varios serotipos, y pertenecen a los filogrupos A, B1, B2 y D. Presentan altas tasas

² Células provenientes de cáncer de cuello uterino

³ Células de tumor metastásico nodular de laringe

de resistencia a ampicilina y a trimetoprim-sulfametoxazol, pero no a las quinolonas. Actualmente no existe un biomarcador para identificarlas debido a su diversidad, no obstante, los más empleados son *aatA*, gen plasmídico involucrado en biopelículas; *aggR*, activador transcripcional plasmídico; y *aaiC/G*, localizado en una isla genómica, componentes del sistema de secreción de tipo VI (SST6) (Brüssow, 2014; Días, *et al.*, 2020; Jesser & Levy, 2020).

a) Regulador transcripcional AggR

El plásmido pAA codifica el regulador transcripcional más importante de los factores de virulencia de EAEC, AggR, perteneciente a la familia AraC-XylS de factores de transcripción. Presenta una alta identidad a nivel aminocídico con los reguladores enterotoxigénicos de *E. coli*: CfaD (68%), Rns (66%) y CsvR (62%). El gen, *aggR* se autoregula positivamente⁴, por otro lado, las proteínas nucleoides como Fis y H-NS actúan como activadores y represores respectivamente (Izquierdo-Vega, J. A., *et al.*, 2023).

Para la cepa de referencia EAEC 042, AggR activa la expresión de 44 genes de virulencia: genes que codifican para la fimbria de adherencia agregativa II, *aafA*, *aafB*, *aafC* y *aafD*; dispersina, *aap*; aparato de exportación de dispersina, *aatA*, *aatB*, *aatC*, *aatD* y *aatP*; regulador de la familia ANR, *aar*; sistema de secreción tipo VI, 16 genes; y proteínas con función hipotética y desconocida, 17 genes (Morin, *et al.*, 2013; Izquierdo-Vega, J. A., *et al.*, 2023).

b) Sistema de secreción de tipo VI, T6SS

Es una nanomáquina dinámica empleada para liberar proteínas efectoras en el espacio extracelular o directamente en las células diana, ya sean procariontas o eucariotas. La caracterización de los efectores del T6SS han revelado los diversos mecanismos que emplean para inhibir las células presa, tales como: formación de poros o la disrupción directa, la inhibición de la síntesis de la pared celular, la degradación de ácidos nucleicos, o la inhibición de procesos celulares como la biosíntesis de proteínas. Los análisis genómicos han demostrado que el 25% de las bacterias Gram-negativas codifican entre 1 y 6 grupos de T6SS distintos. Su amplia distribución sugiere su utilidad, ya que confiere una ventaja evolutiva, lo que ha conducido a su selección y al desarrollo de mecanismos reguladores para minimizar

⁴ El producto del gen regulador activa la expresión de los genes.

los costes energéticos o su despliegue en circunstancias específicas (Navarro-Garcia, *et al.*, 2019).

Los genes del T6SS están ampliamente distribuidos en las *Proteobacterias* Gram-negativas, especialmente en las *Gammaproteobacterias*. Dichos genes se encuentran en la mayoría de las especies de *E. coli* y *Salmonella*, exceptuando las cepas de laboratorio *E. coli* B y K-12. Tanto los componentes del T6SS como las toxinas, suelen estar agrupados en islas genómicas (IG) cuyo porcentaje de GC difiere al del genoma central, lo que sugiere que se han adquirido por transferencia horizontal. Dentro de una IG se codifican los 13 componentes principales del T6SS, subunidades necesarias para ensamblar una maquina funcional. Los genes adicionales que se encuentra en los operones codifican toxinas y antitoxinas, proteínas adaptadoras que se unen tanto a los componentes de la maquinaria como a las toxinas, así como proteínas auxiliares necesarias para el ensamblaje de la maquina o el reclutamiento y suministro adecuado de las toxinas (Journet & Cascales, 2016; Navarro-Garcia, *et al.*, 2019). El conjunto de genes del T6SS de *E. coli* se clasifican en tres grupos filogenéticos distintos: T6SS-1 a T6SS-3, sugiriendo que ancestros comunes los presentaban. Los genes de T6SS-1 y T6SS-2 se encuentran con mayor frecuencia en los cromosomas de *E. coli*. T6SS-1 y T6SS-3 se han asociado con la competencia bacteriana, así como con la capacidad invasiva de ciertos patotipos de *E. coli*, mientras que T6SS-2 se encuentra comúnmente en cepas intestinales, incluyendo STEC como EHEC EDL933 y EAEC/STEC O104:H4. El clúster de genes T6SS-2 está sobrerrepresentado en cepas patógenas de EAEC. las cepas EAEC 042 T6SS-2⁺, causan diarrea, mientras que las cepas EAEC 34b T6SS-2⁻, no provocan diarrea en voluntarios humanos. sin embargo, no significa necesariamente que este directamente implicado en la patogénesis, sino que pueden preparar el terreno para los factores de virulencia. (Journet & Cascales, 2016; Vazquez-Lopez, *et al.*, 2020).

En la cepa prototipo EAEC 042 se encuentra la IG-pheU, denominada sistema de secreción Aai tipo VI, codifica un T6SS-3, formado por los productos del clúster *aaiA*-*aaiP*. Para mejorar el diagnóstico de EAEC, los genes *aaiA* (EC042_4562) y *aaiG* (EC042_4569) que codifican componentes del sistema de secreción, se han empleado como marcador cromosómico. Jenkins *et al.*, 2005, mediante análisis de microarrays de ADN demostraron que están particularmente conservados en las cepas clínicas de EAEC (Morin, N., *et al.*, 2013; Andrade, F. B., *et al.*, 2014; Días, *et al.*, 2020).

c) Dispersina

Es una proteína de superficie de 10,2 kDa que se une a la superficie bacteriana de forma no covalente. Inicialmente se identificó en la cepa EAEC 042. Es codificada por *aap* (proteína antiagregación) y secretada por un sistema transportador ABC enteroagregativo (Aat). Su función en la cepa 042 es neutralizar la superficie celular, repeliendo y proyectando las fimbrias de adherencia agregativas II (AAF/II) con carga positiva, lo que conduce a la antiagregación y dispersión de las bacterias en la mucosa intestinal (Velarde et al., 2007). Por otro lado, se ha reportado que aumenta la absorción de ciprofloxacina en cepas EAEC que la presentan (Mortensen et al., 2013).

El gen que la codifica es muy prevalente, pero no está presente en todas las cepas EAEC. Se ha detectado en cepas EAEC capaces de generar ITU y en productoras de toxina Shiga de los serotipos O104:H4 y O111:H21 (Moraes, et al., 2020)

1.4.1.5. EIEC

Es una *E. coli* invasiva transmitida por alimentos, genera principalmente diarrea acuosa y colitis inflamatoria invasiva. A diferencia de los otros patotipos de *E. coli* es un patógeno intracelular obligado sin factores de adherencia ni flagelos (Pakbin, et al., 2021). Con base a su presentación clínica y a sus mecanismos de virulencia es indistinguible de *Shigella spp.*, ya que están estrechamente relacionadas, pues ambos portan el plásmido pINV de tipo F que codifica los genes necesarios para la patogénesis enteroinvasiva. Para poder diferenciar *Shigella* y EIEC, se utilizan las pruebas bioquímicas y, molecularmente, la detección de IpaH, proteína codificada por pINV, proteína efectora de tipo III (Jesser & Levy, 2020; Pakbin, et al., 2021).

1.4.1.6. DAEC

Se asocia con diarrea en niños de entre 1.5 y 5 años, ITU en adultos y complicaciones en el embarazo, aunque puede formar parte de la microbiota comensal intestinal en adultos y niños. La detección de DAEC no está definida, debido a la heterogeneidad de las cepas y a que no se han establecido las características moleculares específicas. Este patotipo se definió por

primera vez con base a su patrón de adherencia difusa en células Hep-2 y HeLa. dicho patrón no es característico, ya que cepas aEPEC también presentan este fenotipo. La patogénesis de DAEC comienza con la adhesión a las células huésped específicas, uroepiteliales o entéricas, que le permite resistir la eliminación, interactuar con la célula huésped, liberar y administrar toxinas y desencadenar eventos de señalización. Su adherencia esta mediada por adhesinas Afa/Dr, es por ello por lo que la detección de los genes presentes en los operones afa, dra o daa, estructural y funcionalmente similares entre sí, han sido empleados para la identificación de DAEC. Sin embargo, los ensayos moleculares para su detección han mostrado reactividad con genes de EAEC, lo que los hace inespecíficos (Jesser & Levy, 2020; Pakbin, et al., 2021).

1.4.1.7. AIEC

Es un agente causal importante en los trastornos inflamatorios idiopáticos⁵, afecta principalmente el intestino delgado. Es un patógeno entérico capaz de adherirse e invadir células epiteliales intestinales y multiplicarse dentro de macrófagos y células epiteliales. Actualmente, no se han determinado FV particulares. Su patogénesis consta de tres etapas: adhesión, invasión y multiplicación dentro de las células epiteliales del huésped. No obstante, puede formar parte de la microbiota normal del intestino en individuos humanos sanos y no causar enfermedad (Pakbin, et al., 2021).

1.4.2. *Escherichia coli* patógenas extraintestinales

Las cepas de *Escherichia coli* patógenas extraintestinales (ExPEC) son bacterias versátiles que pueden causar infecciones en localizaciones no intestinales en sitios "estériles" fuera del hábitat natural de *E. coli* comensal. Tal como en el tracto urinario, el torrente sanguíneo y la próstata, por lo que su diagnóstico es relativamente fácil y su aislamiento es suficiente para afirmar que es la causa de la enfermedad. Son responsables de una gran cantidad de infecciones humanas, tanto en entornos asociados a la atención sanitaria como comunitarios. Generalmente se encuentran en la microbiota intestinal de los seres humanos y otros animales, a partir de ella emergen para causar infecciones extraintestinales. Para generar la enfermedad no solamente se requiere de las características de la bacteria, sino también de

⁵ Enfermedades autoinmunes donde la inflamación afecta a los tejidos del cuerpo.

determinados factores específicos del hospedador, es por ello que las ExPEC se consideran una causa necesaria pero no suficiente para causar la infección (Riley, 2020; Sora, et al., 2021)

Una característica general de las ExPEC es que la producción de exotoxinas no es un factor importante en su virulencia, en contraste con las IPEC. Sin embargo, algunas producen citotoxinas que no se ha demostrado su papel en patogenicidad. ExPEC poseen una gran cantidad de factores de virulencia, tal como: adhesinas, toxinas, factores de adquisición de hierro, lipopolisacáridos, cápsulas de polisacáridos e invasinas, que suelen codificarse en islas de patogenicidad (PAI), plásmidos y otros elementos genéticos móviles. En este grupo encontramos a en *E. coli* uropatógena (UPEC), *E. coli* asociada a meningitis neonatal (NMEC) y *E. coli* causante de sepsis (SEPEC) en humanos, mientras que en aves de corral hallamos a *E. coli* patógena aviar (APEC) (Tabla 2). Algunas ExPEC causantes de infecciones en humanos poseen una relación estrecha tanto filogenéticamente como de genes de virulencia con cepas APEC, de hecho, varios estudios han demostrado que las aves de corral, así como sus productos derivados pueden ser reservorios de cepas ExPEC y suponer un riesgo para la salud humana (Biran & Ron, 2018; Sarowska, et al., 2019).

1.4.2.1. NMEC

Son cepas de *E. coli* capaces de sobrevivir en el torrente sanguíneo e invadir las meninges de los lactantes. Es el principal patógeno Gram-negativo de generar meningitis en recién nacidos. El número de incidencia es bajo, en países en desarrollo se reporta 1 por cada 1000 nacimientos, mientras que en países desarrollados 1 por cada 10000 nacimientos. No obstante, es bastante grave, ya que tiene una alta tasa de mortalidad. Las cepas de NMEC presentan una alta heterogeneidad genotípica y fenotípica, planteando dificultades a la hora de distinguirla de otros patotipos. Entre los FV importantes para este patotipo se encuentra el antígeno capsular K1, evita la fagocitosis y permite la propagación de las bacterias, el clúster *ibeABC* cuyos productos promueven la invasión a las células y finalmente en los tejidos, el factor V estimulante de colonias y la proteína Iss, protege contra la actividad fagocitosis-bactericida del suero (Biran & Ron, 2018; Sarowska, et al., 2019).

1.4.2.2. SEPEC

Son cepas asociadas a la sepsis. Estas cepas no presentan un perfil de virulencia molecular bien definido, así mismo, sus mecanismos de patogenicidad no están claros. Se catalogan como un grupo de *E. coli* que presentan características de virulencia de los otros patotipos ExPEC, así como de las DEC (Biran, et al., 2018).

1.4.2.3. APEC

Son cepas ExPEC responsable de generar colibacilosis en aves de corral, definida como cualquier infección localizada o sistémica causada por una cepa APEC. Se caracteriza por ser un síndrome polifacético que puede comprender: septicemia, síndrome de cabeza hinchada, enfermedad respiratoria, infección del saco vitelino, onfalitis ⁶y celulitis. Es una enfermedad con un alto impacto económico que amenaza tanto la seguridad alimentaria como el bienestar de las aves del mundo. Se reporta en aves de granja una alta tasa de mortalidad debido a APEC. Es considerada una amenaza para la salud humanada debido a su potencial zoonótico. Entre los FV típicos de APEC se encuentra la hemolisina E (HlyE), la colicina CvaC, fimbrias tipo I, la hemaglutinina sensible a la temperatura, Tsh, y sideróforos como IucC y SitA. Su mecanismo de virulencia no se ha dilucidado por completo (Biran, et al., 2018; Sarowska, et al., 2019; Tonini da Rocha, et al., 2021).

⁶ Infección en el ombligo.

Tabla 2. Características de los patotipos IPEC o DEC

Patotipo		Subgrupo	Marcadores genéticos de virulencia			Patogénesis	Descripción clínica
			Presente				
Intestinales (IPEC)	<i>E. coli</i> enteropatógena (EPEC)	Típica (tEPEC)	<i>bfp</i> (pilus formador de mechones)	PAI-LEE <i>eae</i> (intimina)		Los genes de virulencia de la PAI-LEE causan lesiones de adherencia y destrucción en los enterocitos.	Heces blandas/acuosas, que pueden ir acompañadas de fiebre y vómitos.
		Atípica (aEPEC)	PAI-LEE <i>eae</i> (intimina)				
	<i>E. coli</i> enteroinvasiva (EIEC)	-	<i>ipaH</i> (antígeno del plásmido de invasión)		Atravesar la barrera epitelial intestinal, matar macrófagos, invadir enterocitos, propagación intracelular y de célula a célula.	Heces blandas/acuosas de leves a graves, raramente acompañadas con sangre, mucosidad y leucocitos, así como por fiebre y tenesmo.	
	<i>E. coli</i> productora de toxina Shiga (STEC)	-	<i>stx</i> (toxina Shiga)		La toxina Shiga inhibe la síntesis de proteínas y causa la muerte de las células del huésped en el intestino grueso. Los genes de virulencia de la PAI-LEE causan lesiones de adherencia y destrucción en los enterocitos.	Heces blandas o acuosas de leves a graves. Heces sanguinolentas y puede evolucionar a un SHU.	
		EHEC	<i>stx</i> (toxina Shiga)	PAI-LEE <i>eae</i> (intimina)			
	<i>E. coli</i> enteroagregativa (EAEC)	Típica (tEAEC)	<i>aggR</i> (activador transcripcional)			La colonización s. ve facilitada por las fimbrias, seguida de la formación de biopelículas y la liberación de toxinas.	Heces blandas/acuosas, que pueden ir acompañadas de fiebre, náuseas, tenesmo, borborigmos o mucosidad en las heces.
Atípica (aEAEC)		<i>aat</i> (sistema de secreción plasmídico)	<i>aaiG</i> (sistema de secreción cromosómico)	<i>aapA</i> (dispersina)			
<i>E. coli</i> enterotoxigénica (ETEC)	-	<i>elt</i> (toxina termolábil-LT)		<i>est</i> (toxina termoestable-ST)	Adhesinas y enterotoxinas codificadas por plásmidos.	Heces blandas/acuosas, que pueden ir acompañadas de fiebre y vómitos.	

	<i>E. coli</i> difusamente adherente (DAEC)	-	<i>dra</i> (adhesinas Dr)	<i>afa</i> (adhesinas Afa)	Las adhesinas desencadenan vías de señalización que promueven lesiones celulares, pérdida de microvellosidades intestinales e inflamación	Heces blandas y acuosas
	<i>E. coli</i> adherente-invasiva (AIEC)	-	Desconocido		-	Enfermedad de Crohn

Elaboración propia (Jesser, *et al.*, 2020; Santos, *et al.*, 2020). SS, sistema de secreción; LEE, Locus de adherencia y eliminación del Enterocitos; SUH, síndrome urémico hemolítico.

Tabla 3. Características de los patotipos ExPEC.

Patotipo		Definición base	Descripción clínica	Esquemas de clasificación propuestos	
Extraintestinales (ExPEC)	<i>E. coli</i> uropatógena (UPEC)	Aislado de la orina	Infecciones urinarias, incluidas las recurrentes.	Spurbeck, <i>et al.</i> , 2012: <i>chuA</i> , <i>fyuA</i> , <i>vat</i> e <i>yfcV</i> . Brons, <i>et al.</i> , 2012: <i>c3509</i> , <i>c3686</i> y <i>chuA</i> Hernández-Castillo, 2023: <i>hlyA</i> , <i>hlyC</i> , <i>cnf-1</i> , <i>papG-III</i> , <i>sfaH</i> y <i>fyuA</i>	No se han determinado factores de virulencia específicos. Sin embargo, Johnson, <i>et al.</i> , 2003, propone que si una cepa presenta dos o más de estos FV: <i>pap</i> , <i>sfa/foc</i> , <i>afa/dra</i> , <i>iuc/iut</i> y <i>kpsMTII</i> , puede designarse como ExPEC.
	<i>E. coli</i> asociada a meningitis neonatal (NMEC)	Aislado del LCR de neonatos	Meningitis potencialmente mortal.	-	
	<i>E. coli</i> asociada a sepsis (SEPEC)	Aislado de pacientes con bacteriemia	Bacteriemia/sepsis.	-	
	<i>E. coli</i> patógena aviar (APEC)	Aislado de aves	Colibacilosis: septicemia, celulitis, entre otras.	-	

Elaboración propia (Geurtsen, *et al.*, 2022; Denamur, *et al.*, 2022). LCR, Líquido cefalorraquídeo; pColV, Plásmidos de colicina V.

1.4.3. Cepas híbridas

El término *heteropatógeno* hace hincapié a todas aquellas cepas que posean genes de virulencia de dos o más patotipos IPEC o DEC, son estrictamente enteropatógenos cuya designación se basa en la presencia de FV específicos. Por su parte las cepas *patógenas híbridas* son aquellas que tienen FV de DEC, así como de ExPEC, o alternativamente, se aíslan de una infección extraintestinal y presenta factores de virulencia definitorios de IPEC, ya que existe ambigüedad en los genes requeridos para definir cepas ExPEC (Santos, et al, 2020).

Hay pocos reportes sobre cepas de *E. coli* causantes de infecciones intestinales y extraintestinales en el mismo huésped. No obstante, estudios recientes han identificado cepas ExPEC que promueven infecciones intestinales seguidas de infecciones del torrente sanguíneo, consideradas cepas potencialmente más virulentas. Por medio de la transferencia horizontal de genes se pueden generar movilización de diversos FV de ExPEC a IPEC y de IPEC a ExPEC (Valiatti, et al, 2020).

1.5. *Escherichia coli* uropatógena como modelo de estudio

La amplia definición de UPEC, cualquier cepa de *E. coli* que sea aislada de la orina de un paciente con una ITU sintomática, hace que carezca de una "firma genética" que la caracterice de aquellas cepas que no son uropatógenas⁷. Los antecedentes filogenéticos de las cepas aisladas del tracto urinario, así como la presencia de factores de virulencia y adaptación no son predictivos de su urovirulencia. Las UPEC para generar una ITU tienen que poseer determinadas propiedades tales como: adhesinas, un grupo variable de factores de virulencia y la capacidad de crecer en la orina y el TU, principalmente en la vejiga. El crecimiento rápido en la orina y por consiguiente el aumento del número de bacterias incrementa la posibilidad de adhesión, internalización, formación de comunidades bacterianas intracelulares (IBC) y Reservorios intracelulares quiescentes (QIR) y propagación más allá del tracto urinario (Tamadonfar, et al, 2019; Reitzer & Zimmern, 2019).

Varias investigaciones han demostrado que las cepas de UPEC son capaces de crecer rápidamente en la orina. El primer estudio cuantitativo del crecimiento de uropatógenos en orina, llevado a cabo por Kass, 1956, indicó que "incluso sin glucosa añadida, la orina generalmente favorece la multiplicación de los patógenos habituales del tracto urinario tan bien como lo hace el caldo nutritivo". Stamey & Mihara, 1980, demostraron que la orina normal no inhibe a las enterobacterias y enterococos, pero no

⁷ Bacteria capaz de generar daño el TU en un hospedero susceptible.

favorece el crecimiento de algunas de miembros de la microbiota, tal es el caso de la flora perineal normal.

1.6. Factores de virulencia de UPEC

Las UPEC emplean una gran variedad de factores de virulencia y adaptación para entrar, adherirse, adquirir nutrientes esenciales, multiplicarse en un entorno hostil, causar daños tisulares y diseminarse por el tracto urinario. Están conformados por flagelos, adhesinas (fimbriales y afimbriales), polisacáridos extracelulares, así como por otros componentes estructurales y secretados que determinan el tipo y la gravedad de las ITU, dichos componentes se pueden localizar tanto en el cromosoma como en los plásmidos y en islas de patogenicidad (PAI) permitiéndole así a UPEC aumentar su flexibilidad en patogenicidad y virulencia (Subashchandrabose & Mobley, 2015; Behzadi, 2020).

1.7. Toxinas agentes generadores de daño

UPEC secreta, tres tipos de toxinas: alfa-hemolisina (HlyA), factor necrotizante citotóxico 1 (CNF1) y toxinas autotransportadoras secretadas. La HlyA pertenece a las proteínas RTX asociada a daño renal y cicatrización, codificada por el operón *hlyCABD*. Sus efectos dependen de su concentración, a altos niveles permite a la bacteria atravesar las barreras mucosas, dañar el sistema inmunitario y agotar las reservas de hierro del huésped, mientras que a bajas concentraciones induce muerte celular en las células epiteliales de la vejiga, mediante la activación de la caspasa-1/caspasa-4, provocando exfoliación celular. Además, induce variaciones en la concentración de Ca^{2+} en las células epiteliales tubulares renales, lo que genera una alteración en el flujo de orina, potenciando el ascenso y la colonización de UPEC en los uréteres y el parénquima renal. La toxina CNF1 es producida por muchas cepas de UPEC. Es capaz de activar de forma constitutiva la vía Rho-GTPasas, *in vitro* se ha visto un aumento en la producción de fibras de actina y el enrollamiento de la membrana, permitiendo la invasión de la bacteria en las células renales. Las cepas que expresan CNF1 aumentan la inflamación y la apoptosis de las células de la vejiga, mediante la activación de Rac1, RhoA y CDC42, proteínas de unión a Rho, sugiriendo que *in vivo* estimula la exfoliación en la vejiga, resultando en la exposición de los tejidos subyacentes (Etefia, 2021; Zhou, et al., 2023).

Dentro de las toxinas autotransportadoras de serina proteasa de *Enterobacteriaceae* (SPATEs), se encuentran toxinas que contribuyen a la patología renal, entre ellas, la toxina autotransportadora secretada, Sat, que genera *in vitro* efectos citopáticos en células de vejiga y riñón, puede degradar el factor V de coagulación en humano e inducir el desprendimiento celular autofágico; la toxina

autotransportadora vacuolizante, Vat, es expresada durante la infección, genera efectos citotóxicos mediante la formación de vacuolas intracelulares (Etefia, 2021; Zhou, et al., 2023).

1.8. Sistemas de captación de hierro

El hierro es un nutriente esencial, es ingerido por los hospedadores, pero puede ser adquirido por los patógenos, ya que, la adquisición de hierro es requisito para la virulencia bacteriana. En el TU hay una cantidad limitada de hierro, es por ello que UPEC emplea diferentes estrategias para poder obtenerlo (Etefia, 2021; Zhou, et al., 2023).

El grupo hemo es una fuente de hierro *in vivo*, presente de forma libre o en proteínas, como en la hemoglobina. UPEC es capaz de capturar directamente este grupo mediante el sistema de captación de hemina, conformado por Hma, receptor asociado a metales pesados, y ChuA, receptor dependiente de Ton-B, capaces de unirse al grupo hemo y transportarlo al periplasma. Una vez ahí, es transportado por ChuT, un transportador con cassette de unión a ATP, al citoplasma de la bacteria. Por otro lado, la bacteria también es capaz de producir moléculas quelantes del hierro, denominadas sideróforos, para eliminar el hierro férrico (Fe^{3+}) del huésped. Entre ellos encontramos: yersiniabactina, salmochelina, aerobactina y enterobactina, siendo este último ampliamente conservada entre las cepas de *E. coli*. (Etefia, 2021; Zhou, et al., 2023).

La salmochelina, codificada por el operón *iroBCDEN*, presenta mayor afinidad por el hierro que la enterobactina, su expresión aumenta a pH bajo. Por otro lado, yersiniabactina y su receptor, FyuA, son codificados en una PAI. La yersiniabactina es capaz de secuestrar el cobre derivado del huésped, teniendo así un papel protector contra la muerte intracelular por estrés de cobre. Se ha reportado que FyuA es necesario en la formación de biopelícula en UPEC. La aerobactina, por su parte, es un sideróforo hidroxamato, formado a partir de la condensación de dos moléculas de lisina y una de citrato, a pH bajo es estable, además, presenta mayor afinidad al hierro, en comparación con la enterobactina. La salmochelina es secretada por UPEC durante la invasión. Se ha demostrado *in vitro* que su receptor de membrana externa, IronN, facilita la invasión bacteriana de las células epiteliales de la vejiga. Por último, la enterobactina presenta una menor solubilidad y estabilidad que la aerobactina, no obstante, posee una mayor afinidad por el hierro que la aerobactina en medio acuoso. UPEC puede emplearla para liberar Fe^{3+} en el tracto urinario. El sideróforo puede ser inactivado por proteínas del huésped, tal como la albúmina sérica y la siderocalina, impidiendo así su captación, para superar este mecanismo por medio de una glucosilación, llevada a cabo por una glucosiltransferasa, transforma la enterobactina en salmochelina (Flores-Mireles, et al., 2015; Etefia, 2021; Zhou, et al., 2023).

1.8.1. Adhesinas fimbriales

Las bacterias patógenas poseen una gran cantidad de sistemas de secreción, con diferentes propiedades, capacidades y funciones. Por medio de determinados sistemas de secreción se transportan diferentes tipos de factores de virulencia, entre ellos las adhesinas fimbriales, apéndices extracelulares adhesivos, utilizados por las bacterias para adherirse a diversas superficies (Zav'yalov, et al., 2010; Behzadi, 2020)

Las adhesinas expresadas por las bacterias, así como sus receptores, presentes en las células del huésped, median procesos importantes, tales como: colonización bacteriana, formación de biopelículas, replicación, secreción/transporte de productos bacterianos, internalización e invasión, desencadenamiento directo de vías de señalización, tanto en células huésped como en células bacterianas. Son consideradas las moléculas asociadas a la virulencia más importantes durante el proceso patogénico de UPEC. En general, las cepas UPEC codifican un número significativamente mayor de operones fimbriales en comparación con las cepas fecales/comensales. Las adhesinas fimbriales se forman generalmente por homo/hetero-polimerización no covalente de proteínas subunitarias. De acuerdo al sistema de secreción, las proteínas adhesivas presentes en la superficie de las bacterias pueden dividirse en familias, con base a la forma en la que se construyen: vía clásica chaperona/ayudador, vía alterna chaperona/ayudador, polimerización de subunidades en la membrana citoplasmática y ensamble mediante nucleación extracelular (Zav'yalov, et al., 2010; Etefia, 2021; Zhou, Y., et al., 2023)

1.8.1.1. Vía clásica chaperona/ayudador

Para que UPEC lleve a cabo una colonización exitosa emplea diversas estructuras como lo son las fimbrias chaperona-ayudador (CUFs) (Tabla 1). Varias investigaciones han revelado la presencia de genes CUFs en PAIs junto a numerosos genes de virulencia (Behzadi, 2020).

Las fimbrias ensambladas por vía chaperona/ayudador (CU) genómicamente se encuentran en operones, es decir, todos los genes implicados están en una unidad genética funcional regulada por los mismos elementos de control y genes reguladores. Están compuestos por lo menos por tres proteínas diferentes: una subunidad fimbrial estructural principal, una chaperona y una proteína ayudador, suelen contener genes adicionales que codifican proteínas estructurales, es decir, subunidades fimbriales menores, así como proteínas de ensamblaje o proteínas reguladoras (Nuccio & Bäumler, 2007).

Tabla 4. Fimbrias chaperona-ayudador de *E. coli* uropatógena y sus características

CUF	Genes del operón	Función/Proteína		Receptor	Tropismo tisular	Manifestación clínica
Fimbria tipo I	<i>fimA, fimB, fimC, fimD, fimE, fimF, fimG, fimH, fimI</i>	Chaperona	FimC	Glucoesfingolípidos, Gal(α 1-4)Gal β	Uroplaquina UP1a, integrinas β 1 α 3, laminina, CD48, colágeno (tipo I y IV), epitelio de vejiga y riñón	Cistitis.
		Ayudador	FimD			
		Adhesina	FimH			
Fimbria P	<i>papA, papB, papC, papD, papE, papF, papG, papH, papI, papJ, papK</i>	Chaperona	PapD	Glicoesfingolípidos con globotriosilceramida Gal(α 1-4)Gal	Epitelio renal, eritrocitos	Cistitis y pielonefritis.
		Ayudador	PapC			
		Adhesina	PapG			
Fimbria S	<i>sfaA, sfaB, sfaC, sfaD, sfaE, sfaF, sfaG, sfaH, sfaS, sfaX, sfaY</i>	Chaperona	SfaE	Sialil-galactósido, α -sialil-(2,3)- β -Gal	Plasminógeno, células epiteliales de vejiga y riñón, eritrocitos, células endoteliales.	Infecciones urinarias, meningitis neonatal
		Ayudador	SfaF			
		Adhesina	SfaH			
Fimbria F1C	<i>focA, focC, focD, focF, focG, focH, focI</i>	Chaperona	FocC	Galactosil-ceramida, Gal-Nac- β -1,4-Gal- β	Células uroteliales humanas, membranas mucosas urinarias, endotelios de vejiga y riñón.	Cistitis y pielonefritis.
		Ayudador	FocD			
		Adhesina	FocH			

Elaboración propia (Nuccio, *et al.*, 2017; Werneburg, *et al.*, 2018). Gal, galactosa; Nac, N-acetil.

Las proteínas de ensamblaje, así como las estructurales poseen una señal N-terminal característica que les permite ser transportadas a través de la membrana citoplasmática por la vía secretoria general, SecYEG. Después de ser transportadas las subunidades fimbriales se les escinde el péptido señal por una peptidasa. En el periplasma, las chaperonas, son reclutadas para transportar las subunidades fimbriales desde el espacio periplásmico a las plataformas conformadas por la proteína ayudadora, para posteriormente atravesar la membrana externa bacteriana y polimerizarse para finalmente formar fimbrias chaperona-ayudador (CUF) en la superficie de las UPEC. Las chaperonas son estructuras altamente conservadas que manipulan las subunidades fimbriales CU, plegándolas y/o replegándolas,

así mismo, regulan su disposición, evitan la formación temprana e inestable de fimbrias y las exponen para un ensamblaje exitoso y adecuado mediante el mecanismo de complementación de hebra donante (DSC). Las proteínas ayudadoras tienen una forma anillada, transfieren las subunidades fimbriales a través de su poro cuyo diámetro va de los 2-3 nm por medio del intercambio de hebra donante (DSE) para ensamblar y polimerizar las subunidades fimbriales en orden: menores, mayores, adaptadora y adhesina, en la superficie extracelular de UPEC. Estudios anteriores han demostrado que la polimerización de CUF se produce por la subunidad adhesina, es crucial para el inicio de la formación. El proceso de polimerización abarca desde la punta hasta el final de la fimbria, por lo que este proceso se lleva a cabo en una disposición y orden determinados y específicos. La subunidad de la adhesina posee dos dominios: un dominio de lectina, dominio N-terminal, y un dominio C-terminal similar a inmunoglobulina (Nuccio & Bäumlner, 2007; Zav'yalov, *et al.*, 2010, Behzadi, 2020).

La liberación del complejo CU y el ensamblaje fimbrial no requiere una fuente externa de energía, es un proceso termodinámico-dependiente y libre de energía celular debido a la falta de ATP en el espacio periplásmico o al sistema de fuerza motriz de protones (Behzadi, 2020). A continuación, se abordan las fimbrias estudiadas en este trabajo.

1.8.1.2. Fimbria S

Se encuentra tanto en los patotipos UPEC y NEMEC. Su nombre proviene de las glicoproteínas sialiladas, estructuras que reconocen las adhesinas. Es una varilla helicoidal de aproximadamente 7 nm de diámetro, posee una punta distal con una estructura lineal de fibrilla de 2 nm de diámetro. Los genes codificadores de sus subunidades se encuentran en un clúster génico cromosómico de 8 kb, se encuentra en una PAI que se adquirió por medio de la transmisión horizontal de genes, comprende nueve genes, *sfaCBADEFGSH*, en donde, SfaB y SfaC son proteínas reguladoras que median la aparición y desaparición de las fimbrias por medio de la variación de fase que está directamente asociada a factores periféricos como la temperatura y la presencia de algunas moléculas como la glucosa, de SfaD no se conoce su función, SfaA es la subunidad mayor que constituye la varilla helicoidal, SfaE es la chaperona, SfaF el ayudador, SfaG es la subunidad mayor de la parte fibrilar, SfaS y SfaH son adhesinas que conforman el extremo distal flexible de la fimbria, son altamente afines a

receptores de α -sialil-2,3- α -galactosa, presentes en glicolípidos y glicoproteínas superficiales en células endoteliales microvasculares del cerebro, células uroteliales de los conductos colectores, glomérulos y tejidos endoteliales vasculares de la vejiga y los riñones. Además del ácido siálico, también puede reconocer fibronectina y laminina. Puede unirse a las moléculas de ácido siálico en los eritrocitos, permitiendo que UPEC produzca urosepsis en los pacientes (Behzadi, 2020; Ribić, *et al*, 2018).

1.8.1.3. Fimbria F1C

Las fimbrias F1C son CUF, se encuentran en alrededor del 30% de las cepas UPEC. Estas fimbrias están involucradas en la formación de biopelículas en la orina humana. Se ha detectado una alta presencia de estas fimbrias en ausencia de fimbrias P y de tipo 1. Los genes biosintéticos forman un operón de siete genes, *focAICDFGH*, comprenden 8.3 kilopares de bases (kb). Es un apéndice no hemaglutinante, de 1- μ m de largo y 7-nm de ancho, está formado por las subunidades: FocA, subunidad mayor, FocF y FocG, subunidades menores, y FocH, adhesina. Existe una homología muy estrecha con las fimbrias de tipo 1, es por ello que son capaces de sustituirse entre sí y formar fimbrias híbridas. Los genes restantes contribuyen en la formación de la fimbria: FocI, molécula reguladora, FocC, chaperona, y FocD, ayudador. Los receptores de esta fimbria son las moléculas Gal-Nac- β -1,4-Gal- β presentes en células uroteliales humanas, uréteres, glomérulos, mucosas urinarias, endotelios de la vejiga y el riñón, túbulos distales de las nefronas y conductos colectores de orina, por lo que son receptores específicos de unión (Behzadi, 2020; Ribić, *et al*, 2018).

1.8.2. Adhesinas no fimbriales

En contraparte con las adhesinas poliméricas, las adhesinas no fimbriales son estructuras monoméricas o triméricas. Están ampliamente distribuidas en las bacterias, participan en la adhesión celular tanto en superficies abióticas como en células del huésped. Tienen la capacidad de anclarse mediante enlaces covalentes o no covalentes a la membrana externa, debido a su tamaño corto, están implicadas en las interacciones célula-célula y en la agregación. Se ha visto además que son capaces de interactuar con varios componentes de la matriz extracelular de la biopelícula, uniéndolas a la matriz y manteniendo la arquitectura de esta. Pese a que presentan diferentes características a nivel de estructura y/o propiedades

adhesivas, en Gram-negativos se agrupan con base al sistema de secreción que emplean: sistema de secreción de tipo 1 (T1SS) y secreción de tipo 5 (T5SS) (Berne, et al, 2015).

1.8.3. Proteínas RTX

Las proteínas RTX, repeticiones en toxina, son ampliamente producidas por bacterias Gram negativas. Se caracterizan por presentar repeticiones de secuencias, típicamente nonapéptidos, GGXGXDXUX, donde X puede ser cualquier aminoácido y U es un aminoácido hidrofóbico, ubicados el extremo N-terminal de la señal de secreción de la proteína, sitios indispensables para la unión a iones de calcio, Ca^{2+} . Presentan un único modo de secreción, sistema de secreción de tipo I (T1SS). Su translocación se produce mediante un canal de secreción oligomérico que atraviesa la membrana citoplasmática, el espacio periplasmático y la membrana externa. Emplean un transportador ABC (ATP-binding cassette) capaz de reconocer las señales de secreción no escindibles en el extremo C-terminal de la proteína y mediar la translocación en un solo paso, de los polipéptidos RTX desde el citosol hacia el espacio extracelular, sin un intermediario de secreción periplásmica. Los genes involucrados en la producción de la proteína y de su posterior transporte, generalmente, se encuentran en un operón de gran tamaño (Linhartová, *et al.*, 2010; Benz, 2016; Spitz, *et al.*, 2019).

La palabra "toxina", por razones históricas, está en el nombre de esta familia, sin embargo, comprende estructuras proteicas con diferentes actividades biológicas y bioquímicas, entre ellas: citolisinas RTX, tal como la alfa-hemolisina (HlyA) de *Escherichia coli* uropatógena, adhesinas RTX, toxinas enzimáticas, bacteriocinas y enzimas hidrolíticas, como proteasas y lipasas. Actualmente se conocen más de 1,000 proteínas RTX, cuyo tamaño difiere dependiendo de la función, llegando a comprender más de 6,000 aminoácidos o de 1,000-2,000 aminoácidos en el caso de las toxinas con masas moleculares de 40 a >600 kD. Las toxinas RTX representan el grupo más predominante y ampliamente estudiado (Linhartová, *et al.*, 2010; Benz, 2020).

1.8.3.1. TosA

En *E. coli* CFT073, aislado de pielonefritis/urosepsis, contiene 13 islas genómicas (IG), representan cerca de la quinta parte del genoma, siete de ellas han sido confirmadas como PAIs. La PAI CFT073-aspV vinculada con el T1SS contiene el operón, *tosRCBDAEF*, que codifica TosA, originalmente anotado como UpxA, miembro de las toxinas RTX (Vigil, et al., 2012; Luterbach, et al., 2018)

TosA es una adhesina no fimbrial RTX, tienen la capacidad de adherirse a células epiteliales de riñón humano. Se expresa durante las ITU murinas y humanas, de hecho, en modelo murino de ITU con una mutante carente de *tosA*, mostró una colonización de vejiga y riñones atenuada. Las proteínas TosCBD median la activación y exportación de TosA, por su parte TosE y TosF tienen una función reguladora no descrita asociada a la supresión de la motilidad. El operón está regulado por TosR, a niveles altos inhibe la producción, mientras que a niveles bajos hay mayor producción de TosA (Luterbach, et al., 2018).

2. Antecedentes

2.1. Antecedentes generales

2.2. Fimbrias F1C y S

Internacionales

Santo, *et al.*, en São Paulo, Brasil 2006, aislaron y estudiaron 100 cepas de *E. coli* aisladas de 100 pacientes (un aislado por paciente). Con base en sus síntomas clínicos determinaron si eran de cistitis (frecuencia urinaria, la disuria interna y el dolor suprapúbico o pélvico) o pielonefritis (fiebre, dolor en el costado, náuseas y vómitos), así mismo, por medio de pruebas de laboratorio determinaron si presentaba una ITU (10⁵ UFC de *E. coli* por ml de orina). Por PCR detectan la presencia de *pap* en el 32% (42 cepas), *sfa* en el 19% (19 cepas) y *afa* en el 11% (11 cepas) del cepario. Por otro lado, determinaron la producción de hemolisina en el 96% (96 cepas), mediante la presencia de halo hemolítico. Así mismo, mediante el método de recubrimiento determinaron que 24 cepas (24%) producían colicina.

Rahdar, *et al.*, en Irán 2015, a partir de 100 aislados no duplicados de *E. coli* aisladas de pacientes adultos con pielonefritis o cistitis adquiridas en la comunidad, determinaron la presencia de genes que pertenecen a sistemas adhesivos fimbriales: *fimH*, *pap*, *sfa* y *foc*, encontrándolos en el 95%, 57%, 81% y el 16% de los aislados, respectivamente. Reportando que del 95% de las cepas positivas a *fim*, solo el 2% albergaba el gen *foc*. Así mismo, identificaron en el 12% de los aisladas *afa*, perteneciente a las adhesinas afimbriales.

Khaleque, *et al.*, en Dhaka, Bangladesh 2017, aísla 56 cepas UPEC de orina de pacientes ambulatorios y hospitalizados, mediante PCR determinaron genes importantes para establecer la adhesión inicial para ITU: fimbria tipo 1, *fim1*; fimbria P, *papC*, adhesinas afimbriales, *afa*; y fimbria S, encontrándolos en 16, 24, 6 y 0 muestras, respectivamente. Además, se detectaron marcadores de virulencia asociados a DEC: EPEC, *eaeA* y *bfpA*; EHEC/STEC, *stx1* y/o *stx2*; ETEC, *eltB* y/o *estA*; EIEC, *ial*; y EAEC, *aatA*. Identificaron 7

cepas híbridas: 1 UPEC/STEC, *stx2* positiva; 1 UPEC/EIEC, *ial* positiva; 3 UPEC/ETEC, 2 *estA* y 1 *eltB* positiva; 1 UPEC/EPEC, *bfpA* positiva; y 1 UPEC/EAEC, *aatA* positiva.

Ali, *et al.*, en Pakistán 2019, trabaja con 155 cepas UPEC proveniente de ITU adquiridas en la comunidad. Mediante PCR determinaron el filogrupa, siendo B2 el predominante con 92 cepas, 59%, seguido del D con 43 cepas, 28%, B1 con 12 cepas, 8%, y A con 8 cepas, 5%. Así mismo, identificaron diferentes FV, entre ellos: *fimH* en 155 cepas, 100%; *papC* en 75 cepas, 48%; *usp* en 22 cepas, 14%; *sfa/foc* en 20 cepas, 13%; *hlyA* en 18 cepas, 12%; y *afa* en 15 cepas, 10%.

Alfuraiji, *et al.*, Bagdad, Irak en 2022, estudia 75 muestras de UPEC aisladas de orina provenientes de pacientes pediátricos, mediante PCR se les identificó los siguientes genes: factor necrotizante citotóxico 1, *cnfI*; pili asociados a la pielonefritis, *pap*: fimbria S; y adhesina fimbrial A, *afa*, encontrándolas en el 16.0%, 13.3%, 53.3% y 42.6% de los aislados, respectivamente. Los aislados de UPEC de pacientes pediátricos de sexo femenino presentaban una mayor distribución de factores de virulencia.

Nacionales

López-Banda, *et al.*, en México 2014, a partir de 108 aislados de orina de mujeres diagnosticadas con infección aguda de vías urinarias y confirmadas por laboratorio, mediante PCR detectaron *sfa/focDE*, *sfaS* y *focG* en 74.1%, 1.9% y 2.8%, respectivamente, encontrándose estos últimos dos exclusivamente en aislados del filogrupa B2, 60 cepas (55,6%). Reportaron, además, la presencia de otros genes característicos de UPEC: *fimH* (98.1%) y *papC* (62%), *iutA* (48.1%), *fyuA* (44.4%), *hlyA* (7.4%), entre otros.

2.3. TosA

Internacionales

Lloyd, *et al.*, en Michigan, Estados Unidos en 2009, por medio de la eliminación de secciones pequeñas de la PAICFT073-aspV, construyeron mutantes con el fin de localizar el fenotipo de atenuación de la adherencia, por medio de ello se identificó a *tosA* como un componente

importante, ya que, aumenta la adaptabilidad de la cepa CFT073 en un modelo murino de ITU ascendente, para la colonización de riñones en ratones CBA/J.

Vigil, *et al.*, en Michigan, Estados Unidos en 2011, realiza una asociación entre *tosA* y otros genes de virulencia, contrastando 314 aislados clínicos de *E. coli*, en donde, 91 se obtuvieron de materia fecal, 41 de huéspedes comprometidos, 68 de personas con bacteriuria asintomática, 37 de personas con cistitis y 78 de personas con pielonefritis, reportando 64 aislados positivos y 250 aislados negativos a *tosA*. Las cepas positivas, en general, portaban un mayor número de otros genes de virulencia, promediando 11,2 de los 15 genes de virulencia o adaptación estudiados, tendencia que se observó independientemente del lugar de procedencia de las cepas, en tanto que los aislados *tosA*-negativos tenían una media de 5,4 genes. Además, determinaron que la presencia de *tosA* predice el éxito de la colonización independientemente de la fuente clínica, ya que, tras inocular por vía transuretral la vejiga de ratones C57BL/6 hembra, por un lado, EFC5, aislado fecal de un voluntario humano sano, y por otro lado CFT073, aislado de pielonefritis humana, no se observaron diferencias respecto a los altos niveles de colonización tanto a nivel de vejiga como de riñón.

Wojciuk, *et al.*, en Szczecin, Polonia 2022, trabaja con 38 cepas de UPEC aisladas de orina, 23 de huéspedes inmunocompetentes y 15 de receptores renales, ambos con ITU confirmada por cultivo de orina con crecimiento bacteriano. Mediante PCR identificaron los siguientes genes: *fimH*, *csgA*, *flu* (denominado posteriormente Ag43), *papC* y *tosA*, encontrándolos en el 97.4%, 94.8%, 43.5%, 28.2% y 20.5% de las cepas, respectivamente. No encontraron diferencias estadísticamente significativas en la prevalencia de adhesinas entre los receptores de riñón y los huéspedes inmunocompetentes.

Nacionales

Xicohtencatl-Cortes, J., *et al.*, en México 2019, trabaja con 300 cepas clínicas UPEC de pacientes pediátricos con ITU complicadas, determinaron la presencia de *tosA* mediante PCR, reportando 55 cepas positivas, *tosA*⁺, encontrándose principalmente en los filogrupos B2 con un 63,63%, y D con un 25.45%, así mismo, presentaban resistencia a 10 clases de antibióticos, encontrando MDR3 en el 25.45%, MDR4 en el 20.0%, MDR5 en el 16.36%, MDR6 en el 20%, MDR7 en el 9.09%, MDR8 en el 5.45% y XDR9 en el 3.63%. Además, determinaron el perfil de adherencia de las cepas *tosA*⁺ en células de vejiga humana HTB-9,

encontrando adherencia alta en el 47.3%, moderada en el 41.8% y baja solo en el 10.9% de las cepas. Produjeron la proteína TosA recombinante que, reacciono con anticuerpos procedentes del suero de pacientes con infección urinaria, y los anticuerpos policlonales anti-TosA recombinante también detectaron la expresión de TosA en estas cepas.

Luna-Pineda, *et al.*, 2018, Ciudad de México, México, estudia 178 cepas de *E. coli* aisladas de orina de pacientes pediátricos con infecciones urinarias de vía baja e infecciones urinarias complicadas. Por medio de PCR se amplificaron: *fimH*, *csgA* (subunidad mayor del curli), *iutD* (aerobactina), *sat* (toxina autotransportadora secretada), *fyuA* (yersiniabactina), *fliC* (flagelina), *hlyA* (alfa-hemolisina) y *tosA* (adhesina no fimbrial), reportándolos en el 99.4% (177/178), 92.1% (164/178), 73.6% (131/178), 60.7% (108/178), 57.9% (103/178), 54.5% (97/178), 25.8% (46/178) y 10.7% (19/178). Determinaron tres tipos de *papG* (I, II y III), reportándolas en el 0%, 34.3% y 1.7% de las cepas, y *papF* (adaptador fimbrial de la adhesina) en el 10.7% del cepario. Reportando que las cepas de ITU no complicadas están asociadas a una mayor frecuencia de genes de virulencia y aptitud, entre ellos *iutD*, *csgA*, *sat*, *tosA*, *fliC* y *papGII*. Así mismo, denotaron que los genes *hlyA*, *tosA*, *iutD* y *fliC* se asocian con los filogrupos B1 y B2, debido a las frecuencias elevadas de estos genes en dichos grupos.

2.4. Cepas híbridas

Internacionales:

Lara, *et al.*, en Brasil 2017, aísla 258 cepas de *E. coli*, 3 cepas por cada muestra, de 86 casos de infecciones extraintestinales: 79 de infección urinaria; 1 de bacteriemia; 1 de neumonía; 2 de infección del sitio quirúrgico; 1 de infección de la cavidad peritoneal y 2 de infecciones de las mucosas. Por medio de PCR se detectaron marcadores de virulencia de UPEC, entre ellos: *focA*, *pap* y *sfa*. Por otro lado, para detectar cepas EAEC se identificaron *aatA*, *aggR* y *aapA*. Encontrándose estos dos primeros en conjunto en el 3,4% (9/258) de las cepas ExPEC, pertenecientes a 3 de los 86 casos estudiados (3,4%), además, estas cepas presentaban los genes de UPEC: *fyuA* y *pap*, por lo que se catalogaron como cepas EAEC/UPEC híbridas que se recuperaron de dos casos de ITU y de un caso de bacteriemia.

Tanabe, *et al.*, en Brasil 2020, analiza 112 aislamientos de UPEC obtenidos de muestras de orina de pacientes ambulatorios con recuentos de $\geq 10^5$ unidades formadoras de colonias (UFC) por mL de orina, se les determino por medio de PCR la presencia de genes con distintas funciones en la patogénesis de los aislados de ExPEC tales como: *fimH*, *sfa/focDE* y *hlyA*, encontrándolos en 110 (98.2%), 19 (17%) y 10 (8.9%) aislados, respectivamente. Así mismo, se detectaron genes para el diagnóstico de algunos patotipos de DEC: EPEC, *eae* y *bfpB*; EAEC, *aggR* y *aatA*; y STEC, *stx1* y *stx2*, encontrándose cinco aislados UPEC (4,5%) positivos para patotipos DEC: una UPEC/aEPEC, positiva a *eae*, y cuatro UPEC/EAEC, positivas a *aggR* y *aatA*. Los aislados híbridos UPEC/DEC se obtuvieron de cuatro pacientes diagnosticados con cistitis y uno de pielonefritis.

Nascimento, *et al.*, en Brasil 2022, evalúa 172 aislamientos de *E. coli*, de los cuales 143 (83,1%) procedían de pacientes de sexo femenino y 7 (4%) de pacientes de sexo masculino, no se disponía del historial clínico de 22 pacientes (22,7%). Determinaron el tipo de infección en 131 pacientes (76,1%): 37 (28%) eran bacteriuria asintomática (BA) y 94 (71,7%) eran ITU sintomática, incluidas 17 (12,9%) infecciones recurrentes. Por PCR determinaron genes asociados a la virulencia, entre ellos: *aggR* (EAEC); *elt* y *est* (ETEC); *bfpB*, *eae* y *escV* (EPEC) y; *stx1*, *stx2*, *eae* y *escV* (STEC y EHEC). En este estudio se encontraron tres cepas patógenas híbridas (1,7%), dos de las cuales presentaban el gen *eae* y carecían del gen *bfpB*. Por este motivo, se clasificaron como UPEC/aEPEC. La tercera cepa híbrida albergaba el gen *aggR*, clasificándose como UPEC/EAEC.

Moazeni, *et al.*, en Irán 2024, trabaja con 165 muestras de urocultivo positivas a *E. coli* obtenidas de hospitales y 37 cepas archivadas de UPEC. Extrajeron el material genético de las 202 cepas UPEC, mediante el método de ebullición, y determinaron si eran cepas EAEC/UPEC híbridas, utilizando como marcadores moleculares *aggR* y pCVD432. Nueve cepas fueron positivas (4,5%) a *aggR*, ocho cepas con ambos marcadores y una sola poseía el marcador pCVD432. Todas las cepas híbridas albergaban *app*, mientras que eran negativas para los genes *aggA* (subunidad estructural de las fimbrias de adherencia agregativa I, AAF/I), *aafA* (subunidad estructural de las fimbrias de adherencia agregativa II, AAF/II), *astA* (enterotoxina termoestable enteroagregante de *E. coli*, EAST1) y *pet* (enterotoxina autotransportadora).

Nacionales:

Rodríguez-García, *et al.*, en México 2024, trabaja con 52 cepas aisladas de pacientes con diagnóstico de infección crónica de vías urinarias identificadas como *Escherichia coli*; 23 provenientes de infecciones persistentes y 29 de infecciones recurrentes, mediante PCR determinaron que 30 (57.39%) de las cepas evaluadas presentaban al menos uno de los genes asociados a DEC, sin identificar genes UPEC. En los cuadros de persistencia 12 (52.17%) cepas fueron híbridas (UPEC/DEC); 3 positivas a *bfpA*, 5 a *eaeA*, 4 a *ltA*, 5 a *stA* y 3 a *ipaH*, por otro lado, los casos de recurrentes fueron 18 (62.07%) cepas UPEC/DEC; 6 amplificaron *stx2*, 1 *bfpA*, 6 *eaeA*, 8 *ltA*, 2 *ipaH* y 5 *aggR*.

Ballesteros-Monrreal, *et al.*, en Sonora, México 2024, trabaja con 40 cepas de *E. coli* aisladas de muestras de orina provenientes de pacientes que presentaban síntomas de ITU o de mujeres embarazadas. Determinaron los marcadores moleculares asociados a los patotipos DEC: EPEC, *eaeA* y *bfpA*; DAEC, *daaE*; y EAEC, pCVD432, con base a su perfil genético. Las veinte cepas positivas a genes DEC se les determinaron sus patrones de adherencia encontrando: ladrillo (85%), localizado (55%), agregativo (20%) y difuso (15%), reportando que sólo ocho (40%) de los aislados presentaban un único patrón de adherencia, mientras que doce (60%) presentaban patrones de adherencia mixtos asociados a diferentes patotipos de *E. coli*. Detectaron *bfpA* en el 80% de estos aislados, pCVD432 en el 30%, *daaE* en el 20% y *eaeA* en el 5%. Este estudio indicó la presencia de 16 cepas híbridas en la población mexicana con ITU: 1 UPEC/EAEC/DAEC/EPEC, 3 UPEC/DAEC/EPEC, 5 UPEC/EAEC/EPEC y 7 UPEC/EPEC.

2.5. Antecedentes directos

Ixtepan-Tejero, 2018, estudia 51 cepas de *E. coli* aisladas de mujeres con ITU. Mediante PCR identificó 13 genes o fragmentos genéticos que codifican para adhesinas (*fimH* en el 98%, *papGII* en el 27.5%, *papA* en el 21.6% y *papGIII* en el 1.96%), flagelo (*fliC* en el 7.84%), toxinas (*satA* en el 33.3%, *satP* en el 25.5%, *hlyA* en el 19.6%, *cnf-1* en el 13.7% y *vatP* en el 5.88% y *vatA* en el 3.92%) y sistema de captación de hierro (*iucD* en el 76.5% y *iha* en el 45.1%) en el cepario. Así mismo, identificó genes BLEE más prevalentes, encontrando: *bla_{TEM}* en el 66%, *bla_{CTX-M}* en el 25% y *bla_{OXA-1}* en el 9% de los aislados, así

como bla_{SHV} que no se encontró en el cepario. Además, determino el perfil plasmídico de las cepas, encontrando 3 cepas con cinco bandas, 3 con cuatro bandas, 7 con tres bandas, 6 con dos bandas, 9 con una banda y 23 cepas que no presentaban bandas. La banda plasmídica de mayor tamaño fue de 10.5 kb, mientras que la de menor tamaño era de 25 kb. Las cepas que presentaban bandas plasmídicas, por medio de PCR, les identifique *traT* y *MOB_{F12}*, encontrándolas 11 y 8 cepas positivas, respectivamente. Por otro lado, determino el perfil de susceptibilidad antibiótica para 24 antibióticos de 10 familias distintas, encontrando resistencia a β-lactámicos en el 95.2%, quinolonas en el 94.9% aminoglucósidos en el 52.2%, categorizándolas en extremadamente resistente, XMR, y multidrogo resistente, MDR, 10% y 90%, respectivamente.

Cortez-de la Puente, 2020, trabaja con 51 cepas de *Escherichia coli* uropatógena aislada de pacientes femeninos, determino el filogruppo encontrando el B2 en el 37%, seguido del D en el 20%, A y C en el 16%, F en el 6%, B y E en el 2% y Clado I en el 2% de las cepas. Así mismo, mediante PCR múltiple determina dos PAIs de UPEC cepa CFT073, PAI-ICFT073 en un 39% y PAI-II_{CFT073} en el 33%, y dos de UPEC cepa J96, PAI-I_{J96} en un 4% y PAI-II_{J96} en ningún aislado, el 22% de las cepas poseían dos PAIs y solo el 2% presentaba 3. Determino el serotipo de las cepas, encontrando 16 serotipos distribuidos en 43 cepas, O25:H4 en el 22%, O102:H6 en el 14%, O20:H9 en el 10%, O-:H4 en el 10%, O-:H10 en el 8%, el 2% restante se distribuyó en 11 serotipos, y 8 cepas fueron no tipificables. Mediante PCR's individuales determino los genes asociados a la transferencia genética *traT*, positivo en el 53% de las cepas, y *mob_Q*, *mob_{Q12}* en el 12%, *mob_{Qu}* en el 8% y *mob_{Q11}* en el 2% de los aislados.

Hernández-Castillo, en Puebla 2023, analiza 24 cepas UPEC obtenidas de pacientes varones cursando ITU, mediante PCR determino genes clásicos de este patotipo: sistema de transporte capsular tipo ABC (*kpsMT-K1*), flagelina (*fliC*), proteína específica uropatógena (*usp*) y la adhesina de la fimbria F1C (*focH*), encontrándolos en un 92%, 67%, 63% y 21% de los aislados, respectivamente. Además, identificó la presencia de genes asociados a patotipos DEC: ETEC, *lt-I*; STEC, *stx1*; EPEC, *bfpA* y *eae*, reportando 3 cepas híbridas UPEC/STEC.

Ortega-Enríquez, 2024, trabaja con 40 cepas aisladas de orina de mujeres que cursaban con una ITU, mediante PCR realizó la identificación de genes específicos para cada patotipo DEC: EAEC (*aggR* y *aaiG*), ETEC (toxinas LT y ST), EPEC (*bfpA*) y EHEC (toxinas Shiga: *stx1A* y *stx2A*). Reportando 14 cepas (35%) como patotipos híbridos: UPEC/EAEC (42%, n=6/14) y UPEC/EAEC/ETEC (35%, n=5/14), seguido de 1 cepa positiva a UPEC/aEAEC/EPEC (7%), UPEC/ETEC (7%, n=1/14) y 1 cepa a UPEC / aEAEC (7%). Además, trabajo con 40 cepas de *E. coli* aisladas de heces provenientes de personas sanas (portadores), a las cuales les determino por PCR la presencia de los genes más frecuentes asociados a virulencia de UPEC: adhesinas (*fimH*, *papGII*, *papA* y *papGIII*), toxinas (*satA*, *satP*, *hlyA*, *cnf-1*, *vatP* y *vatA*), evasión de la respuesta inmune (*traT* y *fliC*) y sistema de captación de hierro (*fyuA*, *iucD* y *iha*). Encontrando más prevalentemente *fimH*, *fyuA* y *iucD* en el 100%, *traT* en el 84% y *satP* en el 95%. Consideraron a las cepas que presentaban al menos a 1 gen de virulencia de cada categoría como UPEC, es decir con potencial uropatógeno, reportando 9 cepas híbridas: 6 cepas aEPEC/UPEC, 1 cepa aEPEC/ETEC/UPEC, 1 cepa aEPEC/DAEC/UPEC y 1 cepa ETEC/UPEC.

Barrientos-Mejorada, 2023, trabaja con 24 aislados de *E. coli* de varones con ITU a través de PCR determino los genes *ybbW* (permeasa de alantoína), *hek* (proteína aglutinina resistentes a la temperatura), *kpsE* (subunidad del transportador ABC) y *agn43* (antígeno 43), reportándolos en el 100% (n=13/24), 88% (n=21/24), 71% (n=17/24) y 54% (n=13/24) de las cepas, respectivamente. Por otro lado, realizó ensayos de adherencia en células HeLa en presencia y ausencia de manosa con siete cepas que presentaban diferente genotipo de adherencia. En los ensayos sin manosa reporta que cinco de las siete cepas (71.4%) se adhieren en un 43% a 0.5%. Mientras que en los ensayos con manosa cuatro de las siete cepas (57.1%) mostraron adherencia en un 30% a 5%.

3. Justificación

Las ITUs se encuentran entre las infecciones bacterianas más frecuentes, anualmente generan gastos millonarios en costes sanitarios a nivel mundial. En México ocupan el tercer lugar de las infecciones con mayor número de casos nuevos, reportando por año más de 2 millones de casos, siendo la población femenina la más afectada, representando más del 70% de total de casos, debido a diversos factores no solo anatómicos sino también conductuales.

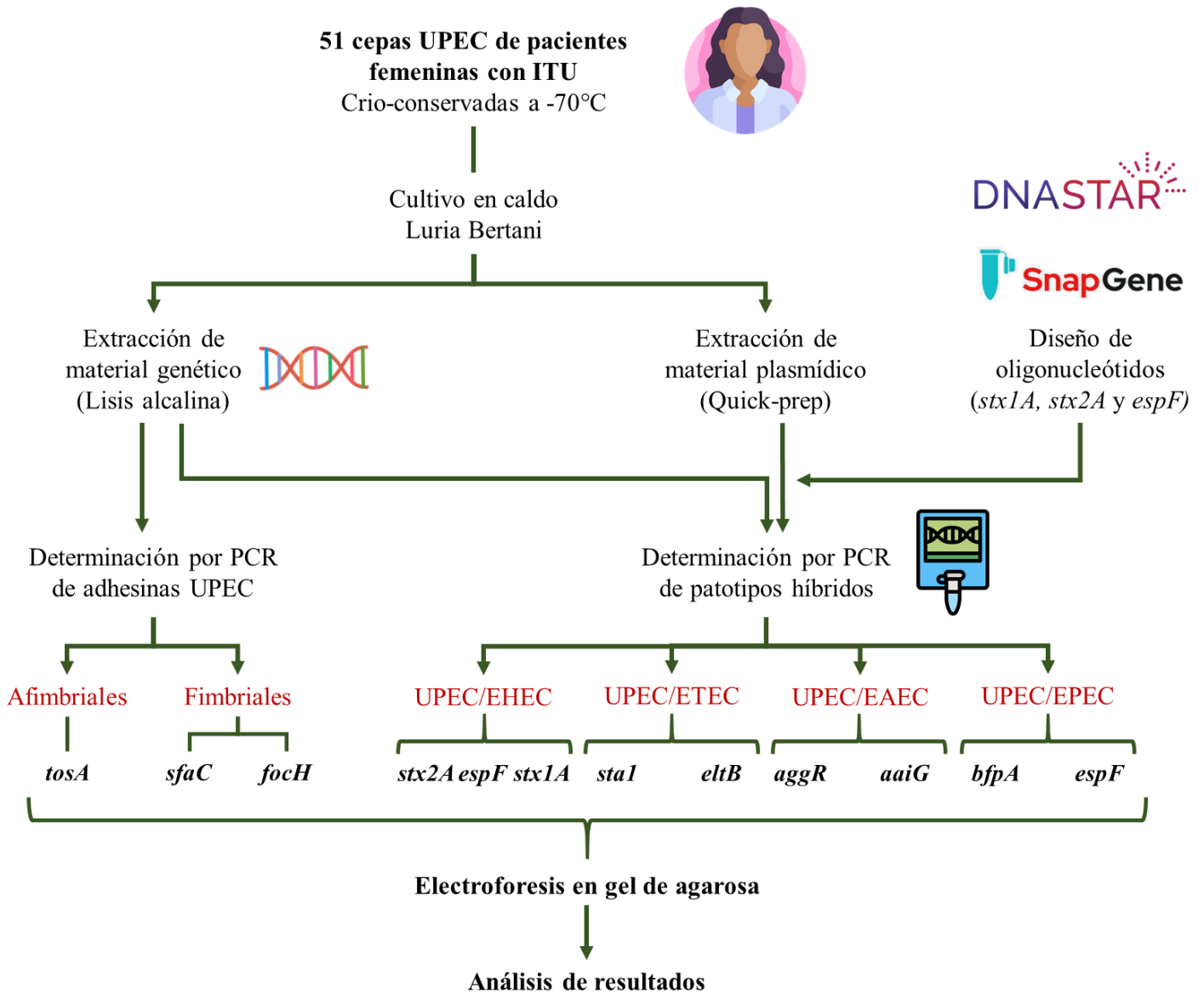
UPEC cuentan con una extensa gama de factores de virulencia y adaptación que le permiten interactuar con el huésped. La virulencia del patógeno es un proceso complejo que requiere de diferentes estructuras tanto extracelulares como intracelulares. Es por ello que el estudio e identificación de los determinantes de virulencia, ausentes en la microbiota, pero esenciales para los patógenos permite el desarrollo de terapias dirigidas que los neutralicen y, finalmente, prevengan el desarrollo del cuadro clínico.

El proceso de adhesión determina el éxito del uropatógeno, pues si hay una buena adhesión hay mayor probabilidad de sobrevivir, multiplicarse, generar daño y, en determinados casos, generar un cuadro clínico en el hospedero. Teniendo en cuenta la importancia este proceso, mediado por adhesinas, el presente trabajo busca identificar en cepas de UPEC aisladas de mujeres mexicanas con ITU, la presencia de la adhesina de la fimbria F1C, *focH*, de la proteína reguladora de la fimbria S, *sfaC*, y la adhesina no fimbrial, *tosA*, con el propósito de determinar su prevalencia en el genoma de cepas aisladas en territorio nacional, ya que, hay pocos informes tanto en México como a nivel internacional.

Además, en los últimos años ha habido reporte de cepas ExPEC aisladas de orina capaces de generar una infección intestinal seguida de una infección del torrente sanguíneo que presentan, aparte de genes ExPEC típicos de virulencia, genes que codifican para factores de virulencia característicos de patotipos DEC, que le brindan más herramientas a la hora de sobrevivir o generar daño. Las cepas híbridas son consideradas cepas potencialmente más virulentas. Es por ello, que en este trabajo también se busca identificar la prevalencia de cepas híbridas: UPEC/ETEC, UPEC/EHEC, UPEC/EPEC y UPEC/EAEC en el cepario antes mencionado, con el fin de ver su prevalencia, ya que, en territorio nacional hay pocos

reportes, al igual que a nivel internacional, a excepción de Brasil, país con una gran cantidad de reportes y estudios enfocados a su identificación.

4. Esquema de trabajo



5. Objetivos

5.1. General

Identificar genes que codifican subunidades de adhesinas y patotipos híbridos UPEC/DEC en un cepario de *Escherichia coli* uropatógena proveniente de mujeres cursando con infección de tracto urinario.

5.2. Específicos

1. Estandarizar condiciones de PCR para la identificación de las subunidades de adhesinas fimbriales, *sfaC* y *focH*, y la adhesina no fimbrial, *tosA*, en el cepario de mujeres provenientes del ISSSTE.
2. Identificación de *focH*, *sfaC* y *tosA* en cepas UPEC previamente secuenciadas.
3. Diseñar oligonucleótidos para identificar patotipos DEC: STEC/EHEC y EPEC.
4. Estandarizar las condiciones de PCR múltiple para identificar patotipos DEC (EHEC, ETEC, EAEC y EPEC)
5. Identificar patotipos híbridos UPEC/DEC (UPEC/EHEC, UPEC/EAEC y UPEC/EPEC).

6. Material y métodos

6.1. Material biológico

A continuación, en la ~~¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.~~ se exponen las características fenotípicas y genotípicas del cepario de *E. coli* aisladas en 2016 de mujeres cursando con ITU del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSSTE), que fueron determinadas por Ixtepan-Tejero, 2018 y Cortez de la Puente, 2020. Así mismo, en la **Tabla 6** se enlistan las cepas usadas como control positivo en el presente trabajo.

6.2. Cepario UPEC

Se analizaron 51 cepas de *Escherichia coli* aisladas de pacientes femeninas que cursaban con ITU, provenientes del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSSTE) de Puebla, México, cuyo rango de edad era de 21 a 86 años, obtenidas de junio del 2015 a febrero del 2016. Estas cepas fueron trabajadas y caracterizadas parcialmente en los proyectos de tesis Claudia Ixtepan Tejero e Isabel Montserrat Cortez de la Puente. Actualmente, se encuentran en criopreservación (-70 °C) en el Laboratorio de Biología Molecular de Enteropatógenos (LBME), ubicado en el Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Instituto de Ciencias BUAP.

6.3. Extracción de ADN.

Se realizó la extracción de material genético de las cepas clínicas y controles mediante lisis alcalina, para obtener el material genómico, y quick-PREP para extraer el material plasmídico (Sambrook, *et al.*, 2001).

6.4. Obtención del paquete celular

Se inocularon 10 µL del criovial atemperado en hielo, en 3 mL de caldo Luria Bertani (LB), se incubó a 37°C, a 220 rpm de 18 a 24 hrs (pre-cultivo). Posteriormente se inocularon 80 µl del pre-cultivo a un tubo con 5 mL de caldo LB, nuevo y estéril, para después incubarlo de 2 a 4 hrs a 37°C hasta alcanzar una DO_{260nm} de 0.4 a 0.5 (cultivo). A partir del cultivo se

transfirieron 500 µL a tubos Eppendorf para posteriormente centrifugar 1 min a 12,000 rpm, se retiró el sobrenadante para dejar solo la pastilla/paquete celular (extracción genómica). Para realizar la extracción plasmídica, se obtuvo el paquete celular de 3 ml del pre-cultivo crecido a 37°C, a 220 rpm de 18 a 24 hrs.

Tabla 5. Características genotípicas y fenotípicas* del cepario de *E. coli* aisladas de orina de mujeres cursando con ITU.

Característica	Especificación	Numero de cepas	Porcentaje	
Grupos filogenéticos ²	A	8	16%	
	B1	1	2%	
	B2	19	37%	
	C	8	16%	
	D	10	20%	
	E	1	2%	
	F	3	6%	
	Clado I	1	2%	
Genes de virulencia ¹	Adhesina	<i>fimH</i>	50	98%
		<i>papGII</i>	14	27%
		<i>papGIII</i>	1	2%
		<i>papA</i>	11	22%
	Sistema de captación de hierro	<i>Iha</i>	23	45%
		<i>iucD</i>	39	76%
	Flagelo	<i>fliC</i>	4	8%
	Toxinas	<i>satA</i>	17	33%
		<i>satP</i>	13	25%
		<i>vatA</i>	2	4%
		<i>vatP</i>	3	6%
		<i>hlyA</i>	10	20%
		<i>Cnf</i>	7	14%
Islas de patogenicidad ²	CFT073	PAI I	20	39%
		PAI II	17	33%
	J96	PAI I	0	0%
		PAI II	2	4%
Serotipificación ²	O25:H4	11	22%	
	No tipificable	8	16%	
	O102:H6	7	14%	
	O20:H9	5	10%	
	O-:H4	5	10%	
	O-:H10	4	8%	
	Otros	1	2%	

Genes de transferencia genética	<i>Mob</i>	<i>mobF12</i> ¹	8	16%
		<i>mobQ11</i> ²	1	2%
		<i>mobQ12</i> ²	6	12%
		<i>mobQu</i> ²	4	8%
		<i>traT</i> ²	27	53%
Categoría de resistencia ^{1*}		MDR	5	10%
		XDR	46	90%
Presencia de Betalactamasas ¹		CTX-M	13	25%
		OXA	13	25%
Bandas plasmídicas ¹		5	3	6%
		4	3	6%
		3	7	14%
		2	6	12%
		1	9	18%
		0	23	45%
Formación de biopelícula ^{1*}		Si	8	16%
		No	43	84%

1) Datos reportados por Ixtepan-Tejero, 2018. 2) Datos reportados por Cortez de la Puente, 2020

Tabla 6. Cepas control utilizadas en este estudio

Patotipo	Cepa Control	Tipo de molécula de ADN (kb) Numero de acceso NCBI	Gen de estudio
Comensal	MC4100*	Cromosoma (4,527.247) NZ_HG738867.1	<i>focH</i> (-), <i>sfaC</i> (-), <i>tosA</i> (-), <i>aaiG</i> (-), <i>aggR</i> (-), <i>sta1</i> (-), <i>eltB</i> (-), <i>espF</i> (-), <i>stx1A</i> (-), <i>stx2A</i> (-), <i>bfpA</i> (-)
ExPEC	CFT073 (UPEC)	Cromosoma (5,231.428) NC_004431	<i>focH</i> (+), <i>sfaC</i> (+), <i>tosA</i> (+)
DEC	042 (EAEC)	Cromosoma (5,241.977) FN554766	<i>aaiG</i> (+)
		Plásmido HH35 (104.880) CP136994	<i>aggR</i> (+)
	LD102b (ETEC)	Plásmido H10407 (66.681) FN649417	<i>sta1</i> (+), <i>eltB</i> (+)
	E2348/69 (EPEC)	Cromosoma (4,965.553) FM180568	<i>espF</i> (+)
		Plásmido MAR2 (97.978) FM180569	<i>bfpA</i> (+)
	EDL933 (EHEC)	Cromosoma (5,528.445) AE005174	<i>stx1A</i> (+), <i>stx2A</i> (+), <i>espF</i> (+)
Plásmido pO157 (92.077) AF074613		EHEC- <i>hlyA</i> (+)	

* Control negativo, cepa comensal K-12. 1, tamaño en kilo pares de bases calculado con SnapGene

6.5. Extracción de DNA genómico

Se le agregó a cada pastilla celular 570 μL de solución I (sacarosa, EDTA-TRIS), se agitó 30 segundos en vortex a velocidad media, se añadieron 60 μL del SDS al 20%, se homogeneizó en vortex por 20 segundos evitando la formación de burbujas, después se incubó a 80°C por 5 minutos en termoblock, se dejó enfriar a temperatura ambiente, se agregaron 2 μL de RNAsa y se incubó por 45 minutos a 37°C en incubadora estática, posteriormente se adicionaron 200 μL de NaCl 5M, se invirtió 20 segundos, se dejó reposar 60 segundos, después se homogeneizó con vortex 60 segundos, se volvió a reposar por 60 segundos, se introdujeron en hielo por 5 minutos, se centrifugaron 10 minutos a 12,000 rpm, a continuación, se trasladó el sobrenadante a un tubo nuevo. Se añadieron 800 μL de isopropanol, se invirtió por 1 minuto, se centrifugó 20 min a 12,000 rpm, se retiró el sobrenadante, para luego agregar de 800 a 700 μL de etanol al 70%, se centrifugó 5 min a 12,000 rpm, se decantó para retirar el sobrenadante, para posteriormente secar la pastilla en la incubadora estática a 37 °C. Una vez seca se re-suspendió en 75 μL de Tris 10 mM, pH 8, finalmente se le dio spin.

6.6. Extracción de DNA plasmídico

A la pastilla celular de 3 ml, se le añadieron 150 μL de solución Ia (sacarosa, EDTA-TRIS, lisozima y RNAsa), se re-suspendió con vortex y se incubó 15 min a temperatura ambiente, posteriormente se añadieron 300 μL de solución II (NaOH 0.4 M y SDS al 2%), se invirtió 10 veces y se mantuvo en hielo por 5 min. Después, se le añadieron 225 μL de solución III (acetato de potasio 3 M), se homogenizó por inversión 10 veces, se metió en hielo por 15 minutos, transcurrido el tiempo se centrifugó a 12,000 rpm por 15 min a 4°C, el sobrenadante se transfirió por decantación a un tubo que contenían 300 μL de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico, ya rotulado, para posteriormente invertirlo 30 veces suavemente, se centrifugó a 12,000 rpm por 5 min a 4°C. Luego se transfirió el sobrenadante a tubos con 300 μL de cloroformo-alcohol (24:1), se invirtieron 50 veces, tras esto se centrifugaron a 12,000 rpm por 5 min a 4°C. Se transfirió el sobrenadante del tubo con punta a un tubo nuevo, se le añadió 2 veces su volumen de etanol absoluto o hasta alcanzar el volumen de 1.5 mL, se dejaron a -4°C toda la noche. Transcurrido el tiempo, se centrifugó a 12,000 rpm por 5 min

a 4°C, se le retiró el sobrenadante por decantación, se añadió etanol al 70% hasta alcanzar un volumen de 1.5 mL, se mezcló por inversión 5 veces y se volvió a centrifugar a las mismas revoluciones, pero solo por 5 minutos. Se decantó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla sobre papel, cerca del mechero. Una vez seca, se re-suspendió en 60 µL de Tris al 10 mM, pH 8, finalmente se le dio spin.

6.7. Determinación de concentración y pureza de DNA genómico

Por medio del equipo NanoDrop 2000c se analizó el ADN genómico obtenido de cada muestra, se realizó una lectura a 260 nm con el fin de determinar la concentración, así mismo se evaluó la relación 260/280 nm para determinar la pureza del material obtenido, considerando de 1.7 a 2.0 como rango óptimo. Para determinar la integridad del ADN se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.7% de 10 µl del extracto, teñido con bromuro de etidio y fotografiado en el fotodocumentador MiniBIS Pro.

6.8. Diseño de oligonucleótidos para determinar EHEC y EPEC

Para la identificación de patotipos híbridos, se diseñaron oligonucleótidos usando los genomas de EPEC E2348/69 y EHEC EDL933 (No. de acceso FM180568 y AE005174 en National Center for Biotechnology Information (NCBI), respectivamente) para amplificar *stx1A*, *stx2A* de STEC/EHEC y *espF*, gen presente en la PAI-LEE de EHEC y EPEC, cuyo amplicón varía en ambos patotipos permitiendo ser usados como diferenciador⁸. Se usó DNASTar para analizar temperatura de alineamiento, tamaño, porcentaje de guanina-citosina, formación de horquillas y dímeros. Se cuidó que la longitud fuera de 18-24 bases, %GC del 40-60%, poseer como máximo una diferencia de T_m de 5 °C entre el oligonucleótido delantero y reverso.

Para el análisis de las secuencias se emplearon los siguientes programas: Sequence Utilities, para obtener secuencias en dirección 5'-3' y complementarias; SnapGene Viewer, para la visualización del genoma y localización de los oligonucleótidos; BLAST (NCBI), para identificar regiones conservadas del gen y su prevalencia en genomas secuenciados.

⁸ Las secuencias de los oligonucleótidos diseñados en el presente trabajo no se presentan debido a se van a publicar en un artículo.

6.9. PCR individual para identificación de adhesinas

Con base en las temperaturas de alineamiento (T_m) de los certificados de Elaboración de Oligonucleótidos emitido por el Instituto de Biotecnología (IBT) de la UNAM. Se determinó el rango de temperatura de alineamiento de cada par de oligonucleótidos, basándose en las dos temperaturas del certificado (T_{m1} y T_{m2}) menos cinco grados centígrados ($T_m - 5^\circ\text{C}$)⁹. Se tomó la $T_m - 5^\circ\text{C}$ máxima y mínima para generar el rango de temperatura (**Tabla 7**). Con el fin de generar un gradiente de temperatura que permita determinar la temperatura a la que los oligonucleótidos se alinean correctamente al DNA templado y se evite la formación de bandas/amplicones inespecíficos.

Tabla 7. Oligonucleótidos para *tosA*, *sfaC* y *fosA*, tamaño del amplicón, temperaturas de alineamiento y rango de temperatura para diseño de PCR cromosómica individual.

Gen	Nombre del Oligonucleótido	Amplicón	Temperatura de Alineación (T_m)			Rango
			T_{m1}	T_{m2}	$T_m - 5^\circ\text{C}$	
<i>tosA</i>	<i>tosA-F</i>	589 pb	T_{m1}	63.0 °C	58.0 °C	53.0° C - 59.8° C
			T_{m2}	58.0 °C	53.0 °C	
	<i>tosA-R</i>		T_{m1}	64.8 °C	59.8 °C	
			T_{m2}	60.0 °C	55.0 °C	
<i>fosH</i>	<i>fosH-F</i>	1,065 pb	T_{m1}	62.6 °C	57.6 °C	49.0° C - 58.3° C
			T_{m2}	54.0 °C	49.0 °C	
	<i>fosH-R</i>		T_{m1}	63.3 °C	58.3 °C	
			T_{m2}	60.0 °C	55.0 °C	
<i>sfaC</i>	<i>sfaC-F</i>	375 pb	T_{m1}	64.8 °C	59.8 °C	55.0° C - 59.8° C
			T_{m2}	60.0 °C	55.0 °C	
	<i>sfaC-R</i>		T_{m1}	63.3 °C	58.3 °C	
			T_{m2}	60.0 °C	55.0 °C	

* Temperatura de alineamiento del certificado de Elaboración de Oligonucleótidos, proporciona dos temperaturas (T_{m1} y T_{m2}) por cada oligonucleótido.

Se generó un programa gradiente en el termociclador con el rango de temperatura y el tiempo de extensión de acuerdo a la longitud del amplicón, considerando que la velocidad de reacción de la DreamTaq es de 1 kb/min (**Tabla 8**).

⁹ Metodología empleada en el LBME para determinar la temperatura de alineamiento de oligonucleótidos.

Tabla 8. Características del gen a identificar, oligonucleótidos y condiciones empleadas para estandarizar PCR individual mediante gradiente.

Cepa Control (Patotipo)	Especificaciones del gen		Oligonucleótidos	Tamaño del amplicón	Condiciones de amplificación			Referencia		
					Fase	Tiempo	Temperatura			
CFT073 (UPEC)	Nombre:	<i>tosA</i>	<i>tosA</i> – F	589 pb	DI:	3 min	95.0°C	Xicoténcatl <i>et al.</i> , 2016		
	Tamaño:	4,833 pb			30 ciclos	D:	30 s		95.0°C	
						A:	30 s		52.8 °C 55.1 °C* 57.7 °C 59.8 °C	
						E:	36 s		72.0°C	
	Codifica:	Adhesina no fimbrial	<i>tosA</i> – F	EF:	10 min	72.0°C				
	Nombre:	<i>focH</i>	<i>focH</i> – F	1,065 pb	DI:	3 min	95.0°C		Nava-Rodríguez, 2015.	
	Tamaño:	969 pb			30 ciclos	D:	30 s			95.0°C
						A:	30 s			49.2 °C 54.9 °C 57.5 °C* 58.5 °C
						E:	65 s			72.0°C
Codifica:	Adhesina de la fimbria FIC	<i>focH</i> – R	EF:	10 min	72.0°C					
Nombre:	<i>sfaC</i>	<i>sfaC</i> – F	375 pb	DI:	3 min	95.0°C	Nava-Rodríguez, 2015.			
Tamaño:	285 pb			30 ciclos	D:	30 s		95.0°C		
					A:	30 s		55.0 °C* 58.3 °C 59.9 °C		
					E:	24 s		72.0°C		
Codifica:	Proteína reguladora de la fimbria S	<i>sfaC</i> – R	EF:	10 min	72.0°C					

DI, desnaturalización inicial; D, desnaturalización; A, alineamiento; E, extensión; EF, extensión final.

* Temperatura establecida para la amplificación por PCR de genes con base a los resultados de la electroforesis del gradiente.

Para estandarizar las PCR para *focH*, *sfaC* y *tosA* se prepararon reacciones individuales, cada una se sometió a una temperatura diferente, utilizando el DNA genómico de la cepa control CFT073 (aislado de pielonefritis/urosepsis), el par de oligonucleótidos correspondiente y los demás componentes de la reacción (agua, dNTPs, DreamTaq) , considerando un volumen final de reacción de 10 µL enlistados en la **Tabla 9**. Los productos se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio y fotografiado en el fotodocumentador MiniBIS Pro.

Tabla 9. Componentes empleados para cada PCR individual.

Componente	Concentración stock	Volumen de stock por reacción			Concentración final (10 µL)
		<i>sfaC</i>	<i>focH</i>	<i>tosA</i>	
DreamTaq DNA-pol (Thermo Scientific)	5 U/MI	0.06 µL	0.06 µL	0.06 µL	0.03 U
10X DreamTaq Buffer (Thermo Scientific)	10X	1.0 µL	1.0 µL	1.0 µL	1X
dNTPs Mix ¹ (Thermo Scientific)	10.0 Mm	0.2 µL	0.2 µL	0.2 µL	0.2 Mm
Oligo Delantero	10.0 µM	0.1 µL	0.1 µL	0.1 µL	0.2 µM
Oligo Reverso	10.0 µM	0.1 µL	0.1 µL	0.1 µL	0.2 µM
DNA Templado ²	-	-	-	-	1.00 µg
Agua	-	Para 10 µL	Para 10 µL	Para 10 µL	-

1, 0.04 mM de cada dNTP; 2, ADN templado obtenido mediante el método de lisis alcalina, su concentración varía.

6.10. Identificación de adhesinas en cepas secuenciadas

Para la identificación bioinformática de *tosA*, *focH* y *sfaC* se usaron contigs específicos de 9 cepas secuenciadas de UPEC dentro de nuestro equipo de trabajo (Cortez-de la Puente, tesis doctoral en proceso). Se usó el programa SnapGene para visualizar los contigs y determinar la posición de los oligonucleótidos y en su caso el hallazgo de cada uno de los genes completos. Para corroborar el hallazgo bioinformático se realizó PCR y electroforesis en gel de agarosa usando como templado DNA de las cepas UPEC secuenciadas, siguiendo las condiciones de la **Tabla 9**.

6.11. PCR múltiple cromosómica DEC

Las PCR múltiple se diseñaron, con base a la localización de los genes a estudiar. Esta PCR amplifica 3 genes/fragmentos de genes cromosómicos característicos de patotipo EHEC: *stx1A*, subunidad A de la toxina Shiga 1 (286/948 pb) y *stx2A*, subunidad A de la toxina Shiga 2 (1,130/960 pb); y EAEC, *aaiG*, componente del T6SS-3 (808/1,983 pb).

Primero, se realizaron PCR individuales para *stx1A*, *stx2A* y *aaiG* a 59.1°, temperatura de alineación similar o muy próxima entre los tres pares de oligonucleótidos (**Tabla 10**). Cada

reacción contenía los oligonucleótidos correspondientes a cada gen y el DNA genómico de la cepa control, para amplificar los genes *stx1A* y *stx2A* se utilizó DNA genómico de la cepa EHEC EDL933, mientras que para el componente del T6SS-3 se empleó el de la cepa EAEC 042.

Tabla 10. Oligonucleótidos para *stx1A*, *stx2A* y *aaiG*, tamaño del amplicón, temperaturas de alineamiento y rango de temperatura para diseño de PCR cromosómica individual y múltiple.

Gen	Nombre del Oligonucleótido	Amplicón	Temperatura de Alineación			
			T _m		T _m - 5°C	Rango
<i>stx2A</i>	<i>stx2A</i> -27F	1130 pb	T _{m1}	65.0 °C	60.0 °C	59.0°C - 63.0°C
			T _{m2}	64.1 °C	59.1 °C	
	<i>stx2A</i> +143R		T _{m1}	66.6 °C	61.6 °C	
			T _{m2}	68.0 °C	63.0 °C	
<i>stx1A</i>	<i>stx1A</i> 546F	286 pb	T _{m1}	68.1 °C	63.1 °C	59.0°C - 63.1°C
			T _{m2}	66.0 °C	61.0 °C	
	<i>stx1A</i> 811R		T _{m1}	66.5 °C	61.5 °C	
			T _{m2}	64.1 °C	59.1 °C	
<i>aaiG</i>	aaiG-F	808 pb	T _{m1}	66.5 °C	61.5 °C	57.0°C - 61.5°C
			T _{m2}	62.0 °C	57.0 °C	
	aaiG-R		T _{m1}	63.9 °C	58.9 °C	
			T _{m2}	66.0 °C	61.0 °C	

* Temperatura de alineamiento del certificado de Elaboración de Oligonucleótidos, proporciona dos temperaturas por cada oligonucleótido.

Con base en los resultados obtenidos en las PCRs individuales, se prosiguió a realizar una PCR múltiple a una temperatura de alineamiento de 59.1° C para amplificar los tres genes DEC cromosómicos (**Tabla 11**). El control positivo, contenía los tres pares de oligonucleótidos y los dos DNA genómicos de las cepas control (EHEC-EDL933 y EAEC-042), y el control negativo, comprendía los oligonucleótidos y agua o la extracción genómica de la cepa control negativo MC4100.

Tabla 11. Características del gen a identificar, oligonucleótidos y condiciones empleadas para realizar PCR múltiple cromosómica

Cepa Control (Patotipo)	Especificaciones del gen		Oligonucleótidos	Tamaño del amplicón	Condiciones de amplificación			Referencia	
					Fase	Tiempo	Temperatura		
EDL933 (EHEC)	Nombre:	<i>stx1A</i>	<i>stx1A525-F</i> <i>stx1A811-R</i>	1130 pb	DI:	5 min	95.0° C	Este estudio	
	Tamaño:	948 pb							
	Codifica:	Subunidad A de la toxina Shiga 1							
	Nombre:	<i>stx2A</i>	<i>RI27-F</i> <i>stx2B132-R</i>	286 pb	30 ciclos	D:	30 s	95.0° C	Este estudio
	Tamaño:	960 pb							
	Codifica:	Subunidad A de la toxina Shiga 2							
042 (EAEC)	Nombre:	<i>AaiG</i>	<i>aaiG-F</i> <i>aaiG-R</i>	808 pb	EF:	10 min	72.0° C	Dias, et al., 2020	
	Tamaño:	1,983 pb							
	Codifica:	Componente del T6SS-3							

DI, desnaturalización inicial; D, desnaturalización; A, alineamiento; E, extensión; EF, extensión final

Para realizar las PCR múltiples se consideraron las concentraciones finales para un volumen final de reacción de 20 µL enlistados en la **Tabla 12**.

Tabla 12. Componentes empleados para cada PCR múltiple cromosómica para patotipos híbridos.

Componente	Concentración stock	Volumen de stock por reacción	Concentración final (20 µL)
DreamTaq DNA-polimerasa (Thermo Scientific)	5 U/µL	0.40 µL	0.10 U
10X DreamTaq Buffer (Thermo Scientific)	10X	2.0 µL	1X
dNTP Mix (Thermo Scientific) ¹	10.0 Mm	0.4 µL	0.2 Mm
<i>stx1A546F</i>	10.0 µM	0.4 µL	0.2 µM
<i>stx1A811R</i>	10.0 µM	0.4 µL	0.2 µM

<i>stx2A -27F</i>	10.0 µM	0.3 µL	0.2 µM
<i>stx2A +143R</i>	10.0 µM	0.3 µL	0.2 µM
<i>aaiG-F</i>	10.0 µM	0.4 µL	0.2 µM
<i>aaiG-R</i>	10.0 µM	0.4 µL	0.2 µM
DNA Templado ²	-	-	1.00 µg
Agua	-	Para 20 µL	-

1, 0.04 mM de cada dNTP. 2, ADN templado obtenido mediante el método de lisis alcalina, su concentración varía.

Los productos de las PCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1%, se tiñeron con bromuro de etidio y fotografiado en el fotodocumentador MiniBIS Pro.

6.12. PCR múltiple *espF*

La PCR múltiple para diferenciar entre EHEC y EPEC, amplifica un gen que codifica una proteína efectora de la PAI-LEE, *espF*. En EPEC genera un amplicón de 770 pb, mientras que en EHEC uno de 687 pb.

Considerando las T_m de los certificados se determinó el rango de temperatura óptimo (**Tabla 13**). Primero se realizaron reacciones de PCR individuales, es decir, una reacción con el DNA genómico de EHEC (EDL933), otra con el de EPEC (E2348/69) y un control negativo (DNA de MC4100, cepa K-12) con el par de oligonucleótidos a diferentes temperaturas (64.3°C, 63.1°C, 57.5°C y 56.0°C). Para corroborar que generaban el amplicón correspondiente al patotipo y no se generaran bandas inespecíficas.

Tabla 13. Temperaturas de alineamiento de los certificados de *espF*.

Gen	Nombre del Oligonucleótido	Amplicón		Temperatura de Alineación			
				T_m	$T_m - 5^\circ\text{C}$	Rango	
<i>espF</i>	<i>espF219F</i>	EPEC	687 pb	T_{m1}	68.1 °C	63.1 °C	59.0°C - 65°C
				T_{m2}	70.0 °C	65.0 °C	
	<i>espF+219H262PR</i>	EHEC	770 pb	T_{m1}	68.2 °C	63.2 °C	
				T_{m2}	64.0 °C	59.0 °C	

* Temperatura de alineamiento del certificado de Elaboración de Oligonucleótidos, proporciona dos temperaturas por cada oligonucleótido.

Basándonos en los resultados de las PCR individuales, se realizó la PCR múltiple en gradiente (56.0°C, 57.5°C, 63.1°C y 64.3°C) (**Tabla 14**). El control positivo, contenía el par

de oligonucleótidos y los dos DNA genómicos de las cepas control (E2348/69 y EDL933), y el control negativo, comprendía los oligonucleótidos y agua o la extracción genómica de la cepa control negativo MC4100.

Tabla 14. Características del gen a identificar, oligonucleótidos y condiciones empleadas para estandarizar PCR individual mediante gradiente.

Cepa Control (Patotipo)	Especificaciones del gen		Oligonucleótidos	Tamaño del amplicón	Condiciones de amplificación			Referencia		
					Fase	Tiempo	Temperatura			
EDL933 (EHEC)	Nombre:	<i>espF</i>	<i>RI219/62-F</i>	770 pb	DI:		3 min	95.0°C		
	Tamaño:	747 pb			30 ciclos	D:	30 s	95.0°C		
	Codifica:	Proteína efectora de la PAI-LEE				A:	30 s	56.0° C*		
							63.1° C	64.3° C		
E2348/69 (EPEC)	Nombre:	<i>EspF</i>			<i>espF551/425-R</i>	687 pb	E:		48 s	72.0°C
	Tamaño:	621 pb					EF:		10 min	72.0°C
	Codifica:	Proteína efectora de la PAI-LEE								

DI, desnaturalización inicial; D, desnaturalización; A, alineamiento; E, extensión; EF, extensión final.

* Temperatura establecida para determinación de genes con base a los resultados de la electroforesis del gradiente.

Para realizar las PCR múltiples se consideraron las concentraciones finales para un volumen final de reacción de 10 µL enlistados en la **Tabla 15**.

Tabla 15. Componentes empleados para cada PCR *espF* patotipos híbridos.

Componente	Concentración stock	Volumen de stock por reacción	Concentración final (10 µL)
DreamTaq DNA-polimerasa (Thermo Scientific)	5 U/MI	0.05 µL	0.03 U

10X DreamTaq Buffer (Thermo Scientific)	10X	1.0 µL	1X
dNTP Mix (Thermo Scientific) ¹	10.0 mM	0.2 µL	0.2 Mm
<i>espF219F</i>	10.0 µM	0.1 µL	0.1 µM
<i>espF+219H262PR</i>	10.0 µM	0.1 µL	0.1 µM
DNA Templado ²	-	-	2.00 µg ³
Agua	-	Para 10 µL	-

1, 0.04 mM de cada dNTP; 2, ADN templado obtenido mediante el método de lisis alcalina, su concentración varia; 3, se agregó 1.00 µg de cada uno de los DNA correspondientes a las cepas controles (E2348/69, LD102b y 042) empleadas.

6.13. PCR múltiple plasmídica

La PCR plasmídica permite la amplificación de 4 genes o fragmentos genéticos localizados en plásmidos de diferentes categorías del patotipo DEC: ETEC, *sta1* de 147 pb y *eltB* de 322 pb; EAEC, *aggR* de 457 pb; y EPEC, *bfpA* de 879 pb.

Se sometieron dos PCR múltiple plasmídica a diferentes T_m , una a 49.9° C y otra a 52.4° C. Cada una de ellas contenía como DNA templado la extracción plasmídica de las cepas control para cada categoría DEC: *E. coli* E2348/69 (EPEC), *E. coli* 042 (EAEC) y *E. coli* LD102b (ETEC), y el par de oligonucleótidos correspondientes a cada gen a identificar (**Tabla 16**).

Tabla 16. Características del gen a identificar, oligonucleótidos y condiciones empleadas para realizar PCR múltiple plasmídica

Cepa Control (Patotipo)	Especificaciones del gen		Oligonucleótidos	Tamaño del amplicón	Condiciones de amplificación			Referencia
					Fase	Tiempo	Temperatura	
LD102b (ETEC)	Nombre:	<i>sta1</i>	<i>ST-1</i> <i>ST-2</i>	147 pb	DI:	5 min	95.0° C	Maldonado-López, 2004
	Tamaño:	219 pb						
	Codifica:	Toxina termoestable						
	Nombre:		<i>LTIb-1</i> <i>LTI-2</i>	322 pb	31 ciclos	D:	30 s	
Tamaño:	375 pb							

	Codifica:	Cadena B de enterotoxina termolábil				A:	30 s	49.9 °C* 52.4 °C	
042 (EAEC)	Nombre:	<i>aggR</i>	<i>aggR-F</i> <i>aggR-R</i>	457 pb		E:	54 s	72.0° C	Moyo, et al., 2007
	Tamaño:	798 pb							
	Codifica:	Regulador transcripcional							
E2348/69 (EPEC)	Nombre:	<i>bfpA</i>	<i>bfp2325R</i> <i>bfpA579R</i>	879 pb		EF:	10 min	72.0° C	Arenas-Hernández, 2000.
	Tamaño:	582 pb							
	Codifica:	Pilina estructural mayor, bundling							

DI, desnaturalización inicial; D, desnaturalización; A, alineamiento; E, extensión; EF, extensión final; LBME, laboratorio de biología molecular de enteropatógenos.

* Temperatura establecida para determinación de genes con base a los resultados de la electroforesis del gradiente.

Las reacciones de PCR se prepararon con base en las concentraciones finales para un volumen final de reacción de 15 µL enlistados en la **Tabla 17**.

Tabla 17. Componentes empleados para cada PCR múltiple plasmídica para patotipos híbridos.

Componente	Concentración stock	Volumen de stock por reacción	Concentración final (15 µL)
DreamTaq DNA-polimerasa (Thermo Scientific)	5 U/µL	0.40 µL	0.13 U
10X DreamTaq Buffer (Thermo Scientific)	10X	1.5 µL	1X
dNTP Mix (Thermo Scientific) ¹	10.0 mM	0.5 µL	0.3 Mm

ST-1	10.0 µM	1.50 µL	1.0 µM
ST-2	10.0 µM	1.50 µL	1.0 µM
<i>bfpA2325</i>	10.0 µM	1.20 µL	0.8 µM
<i>bfpA579</i>	10.0 µM	1.20 µL	0.8 µM
LT1b-1	10.0 µM	0.30 µL	0.2 µM
LT1I-2	10.0 µM	0.30 µL	0.2 µM
<i>aggR-F</i>	10.0 µM	0.40 µL	0.3 µM
<i>aggR-R</i>	10.0 µM	0.40 µL	0.3 µM
DNA Templado ²	-	-	3.00 µg ³
Agua	-	Para 15 µL	-

1, 0.04 mM de cada dNTP; 2, ADN templado obtenido mediante el método de lisis alcalina, su concentración varia; 3, se agregó 1.00 µg de cada uno de los DNA correspondientes a las cepas controles (E2348/69, LD102b y 042) empleadas.

En la **Tabla 18** se encuentran los oligonucleótidos del LBME que se emplearon en la determinación de patotipos DEC a nivel plasmídico.

Tabla 18. Oligonucleótidos del LBME para determinación de patotipos DEC

Cepa control (patotipo)	Primers			Tamaño amplicón	Referencia
	Nombre	Secuencia (5'-3')	Tamaño		
E2348/69 (EPEC)	<i>bfp2325R</i>	GCGGGAAAAACCAAATGCGT	20 nt	879 pb	Arenas-Hernández, 2020
	<i>bfpA579R</i>	CTTCATAAAATATGGATCCTTATTGGT	26 nt		
LD102b (ETEC)	ST-1 – R	TTAATAACATCCAGCACAGGCAG	23 nt	147 pb	Maldonado-López, 2004
	ST-2 – F	CTTGACTCTTCAAAGAGAAAATTAC	26 nt		
	LT1b-1 – R	TCTCTATGTGCATACGGAGC	20 nt	322 pb	
	LTI-2 – F	CCATACTGATTGCCGCAAT	19 nt		

6.14. Determinación de adhesinas

Cada una de las extracciones genómicas de las cepas provenientes del ISSSTE, se sometieron a PCR individual siguiendo las condiciones de reacción y oligonucleótidos enlistados en la **Tabla 8**, así mismo considerando las concentraciones finales para un volumen final de reacción de 10 µL enlistados en la **Tabla 9**. En cada grupo/lote de reacciones se empleó un control negativo para verificar que durante la preparación no hubiese algún tipo de contaminación (en lugar de DNA genómico contiene agua), así como, un control positivo (con el DNA genómico de la cepa control CFT073). Los productos de PCR se sometieron a

electroforesis en gel de agarosa al 1%, se tiñeron con bromuro de etidio y se fotografió en el fotodocumentador MiniBIS Pro.

6.15. Determinación de cepas híbridas

Cada una de las extracciones genómicas y plasmídicas de las cepas provenientes del ISSSTE, se sometieron a: PCR dúplex *espF*, PCR triplex cromosómica y PCR cuádruplex plasmídica, siguiendo las condiciones de reacción y oligonucleótidos enlistados en la **Tabla 11**, **Tabla 14** y **Tabla 16**. Con cada grupo de reacciones de DNA problema se preparó un control negativo (contenía agua en lugar de material genético o material genético de la cepa comensal MC4100) y un control positivo (con el DNA genómico o plasmídico de las cepas control). Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1%, se tiñeron con bromuro de etidio y se fotografiaron en el fotodocumentador MiniBIS Pro.

7. Resultados

7.1. Extracción de material genético

La extracción genómica de las 51 cepas provenientes de mujeres que cursaron con una ITU provenientes del ISSSTEP y de las 5 cepas controles empleadas en este estudio: CFT073 (UPEC), EDL933 (EHEC), 042 (EAEC), E2348/69 (EPEC) y MC4100 (K-12), se realizó mediante lisis alcalina. Se determinó la integridad del ADN obtenido, mediante electroforesis en gel de agarosa. En la **Figura 6** se muestra un gel representativo.

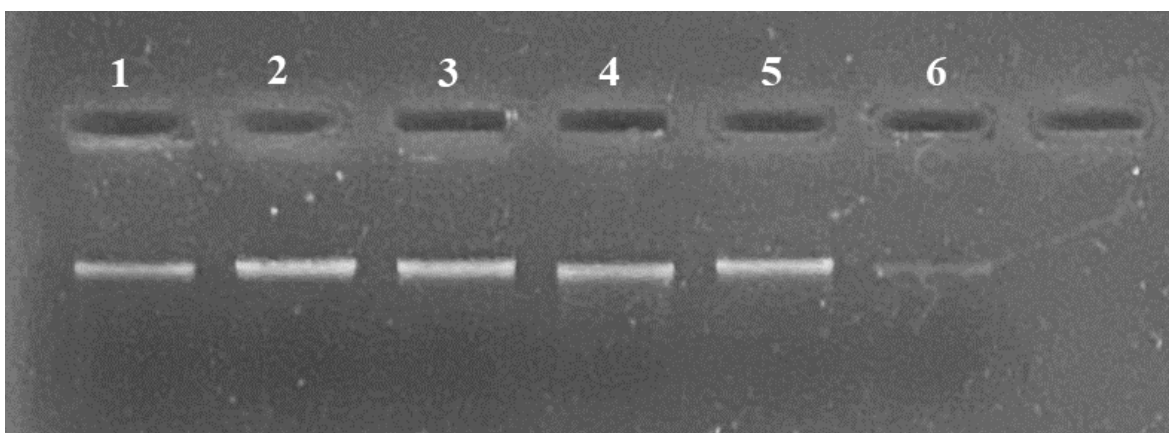


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa de extracciones genómicas.

Electroforesis en gel de agarosa al 0.7% de extracciones genómicas obtenidas por lisis alcalina. Carril 1, cepa CFT073; carril 2, cepa 101; carril 3, cepa 107; carril 4, cepa 140; carril 5, cepa 163; y carril 6, cepa 175.

Datos corroborados mediante el análisis de cada extracción obtenida por medio del equipo NanoDrop 2000c, en donde se obtuvo una concentración que oscilaba entre los 200 ng/μl y cuyo rango de pureza (relación 260/280 nm) se encontraba entre 1.8-1.9, rango óptimo.

7.2. Extracción de material plasmídico

La extracción de plásmidos de las cepas 51 cepas UPEC del ISSSTEP y de las cepas controles: EDL933 (EHEC), 042 (EAEC), LD102b (ETEC) y MC4100 (K-12), se realizó mediante quick-Prep. Los plásmidos obtenidos se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa. Se empleó la extracción de los plásmidos de la cepa EDL933 como referencia, ya que posee dos plásmidos: plásmido pO157 de 92 kb y un plásmido críptico de 2.1 kb. En la **Figura 7** se muestra un gel representativo de la electroforesis de los plásmidos.

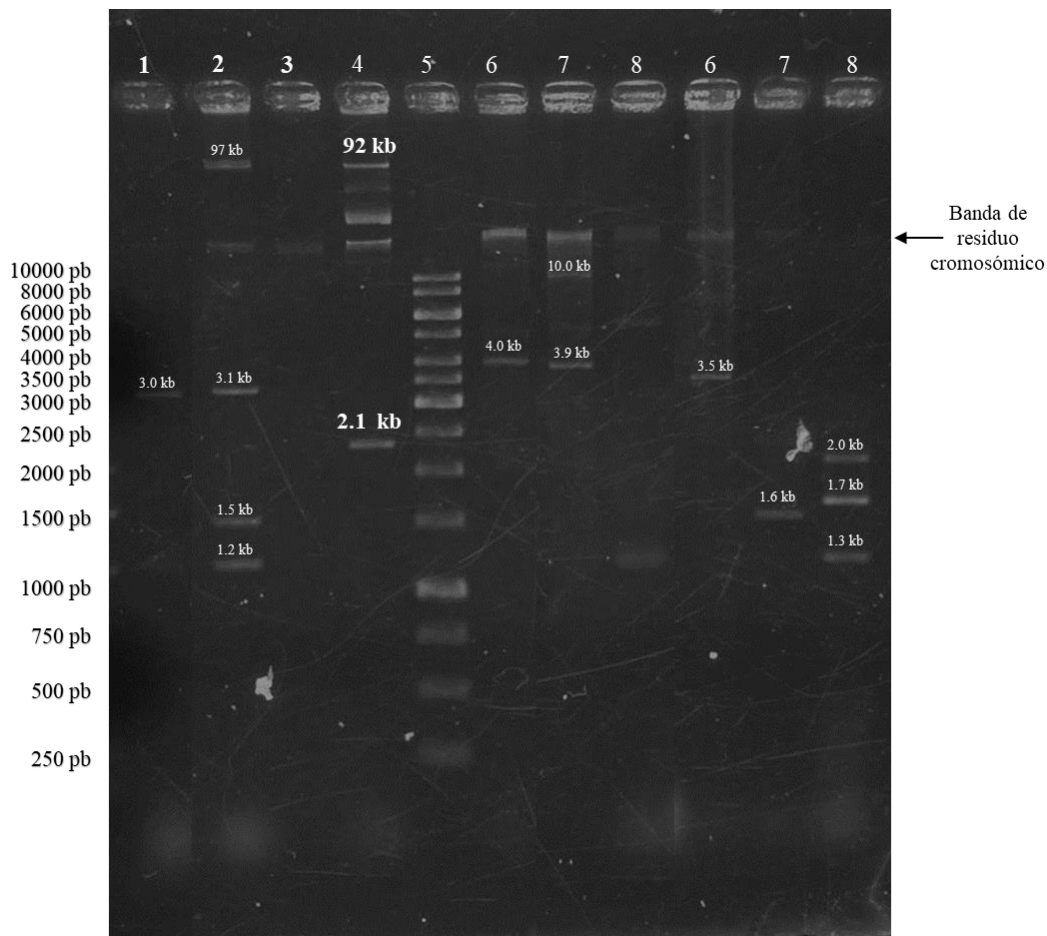


Figura 7. Perfil plasmídico de UPEC aisladas de ITU en mujeres.

Electroforesis en gel de agarosa al 1% de las extracciones plasmídicas. Se muestran el bandeo plasmídico obtenido tras someter a electroforesis en gel de agarosa al 1.0% las extracciones plasmídicas obtenidas por quick-Prep. Carril 1, cepa 136; carril 2, cepa 139; carril 3, cepa 147; carril 4, cepa EDL933 presenta dos plásmidos caracterizados uno de 92 kb y otro de 2.1 kb; carril 5, marcador de peso molecular de 1kb; carril 6, cepa 149; carril 7, cepa 150; carril 8, cepa 157; carril 9, cepa 175; carril 10, cepa 114; y carril 11, cepa 113.

7.3. PCR para amplificar genes de adhesinas UPEC: *sfaC*, *focH* y *tosA*

Se determinó la T_m para cada par de oligonucleótidos mediante un gradiente de temperatura basado en el rango obtenido a partir de los certificados **Tabla 7**. En la **Figura 8-A**, se muestran los resultados obtenidos para amplificar *focH*, siendo la T_m óptima de 57.5° C, ya que no se presentan bandas inespecíficas y la banda del gen corresponde al peso deseado de 1,065 pb, en comparación con las demás temperaturas 49.2°, 54.9° y 58.5° C. Para identificar *tosA*, se seleccionó la temperatura de 55.1° C, pues la banda generada corresponde al tamaño

del fragmento del gen amplificado, 589 pb, así mismo, la banda inespecífica que se presenta a dicha temperatura es más tenue, en comparación con las otras temperaturas, 52.8°, 57.7° y 59.8° C (**Figura 8-B**). Por último, en la sección C de la **Figura 8**, se muestran los resultados del gradiente empleado para identificar *sfaC*, con base a los resultados se seleccionó la temperatura de 55.0° C, porque la banda generada coincide con el peso del amplicón, 375 pb.

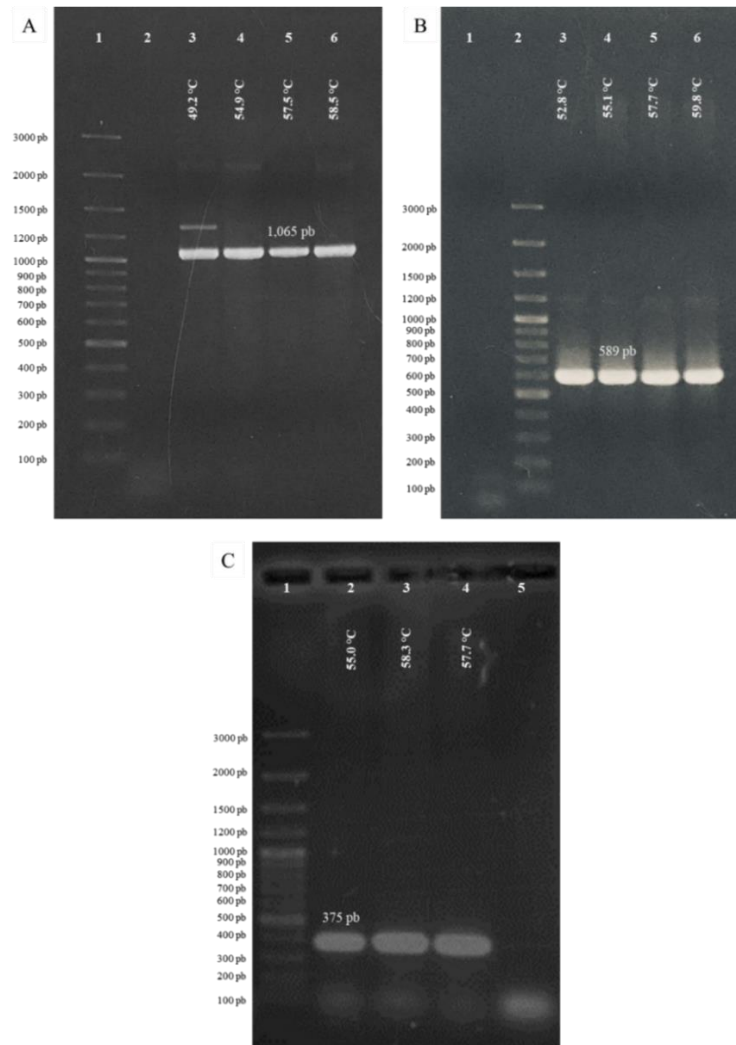


Figura 8. Resultados de la estandarización de PCR individual de los genes *focH*, *tosA* y *sfaC*.

Se muestran los fragmentos amplificados en una electroforesis en geles de agarosa al 1%. **A)** PCR para determinar *focH*: carril 1, marcador de peso molecular (MP) de 100 pb; carril 2, control negativo (C-); carril 3, 4, 5 y 6 producto de PCR para *focH* a 49.2°, 54.9°, 57.5° y 58.5° C, respectivamente. **B)** PCR para determinar *tosA*: carril 1, C-; carril 2, MP de 100 pb; carril 3, 4, 5 y 6 producto de PCR para *tosA* a 52.8°, 55.1°, 57.7° y 59.8° C, respectivamente. **C)** PCR para determinar *sfaC*: carril 1, MP de 100 pb; carril 2, 3 y 4 producto de PCR para *sfaC* a 55.0°, 58.3° y 57.7° C, respectivamente, Carril 5, control negativo.

Se hizo la determinación de los genes que codifican SfaC, FocH y TosA, mediante PCRs individuales, empleando como material genético templado cada una de las extracciones genómicas realizadas mediante lisis alcalina. Ninguna de las cepas amplificó *sfaC*, *focH* y *tosA*. La **Figura 9** muestra geles representativos de los genes antes mencionados.

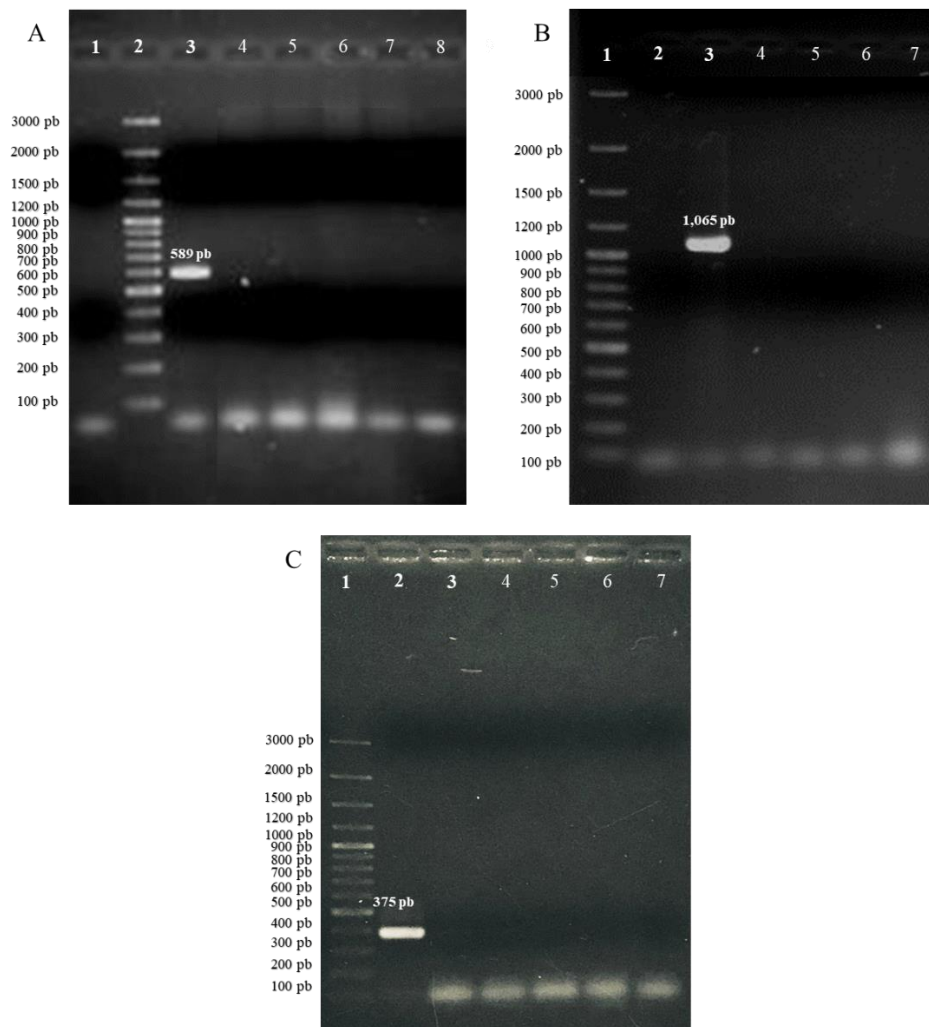


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa de PCR individual de adhesinas UPEC.

Se muestran los fragmentos amplificados en una electroforesis en geles de agarosa al 1%. **A)** PCR para determinar *tosA*: carril 1, control negativo (C-); carril 2, marcador de peso molecular (MP) de 100 pb; carril 3, control positivo CFT073 con un amplicón de 589 pb; carril 4, 5, 6, 7 y 8 producto de PCR para *focH* de la cepa 101, 104, 105, 106 y 107, respectivamente. **B)** PCR para determinar *focH*: carril 1, marcador de peso molecular (MP); carril 2, control negativo (C-); carril 3, control positivo CFT073 con un amplicón de 589 pb; carril 4, 5, 6 y 7 producto de PCR para *focH* de la cepa 120, 121, 122 y 123, respectivamente. **C)** PCR para determinar *sfaC*: carril 1, marcador de peso molecular (MP); carril 2, control positivo CFT073 con un amplicón de 375 pb; carril 3, control negativo (C-); carril 4, 5, 6 y 7 producto de PCR para *focH* de la cepa 166, 169, 170 y 172, respectivamente.

7.5. Identificación de adhesinas en cepas UPEC secuenciadas aisladas de neonatos.

Mediante SnapGene se buscó bioinformáticamente *sfaC*, *focH* y *tosA*, utilizando los oligonucleótidos de la **Tabla 8**, en los contigs que obtuvo Cortez-de la Puenta tras secuenciar 9 cepas UPEC: 5 cepas aisladas de adultos, 1 cepa de mujer embarazada y 3 de pediátricos, para posteriormente realizarles una simulación de PCR. En este análisis se encontró que tres cepas UPEC provenientes de pacientes pediátricos presentaban en su genoma genes involucrados en la biogénesis de adhesinas: 124N (positiva a *tosA*, *sfaC* y *focH*), 129N (positiva a *tosA* y *sfaC*) y CR135 (positiva a *focH* y *tosA*), así mismo, en una cepa aislada de un adulto con ITU: CR149 (positiva a *sfaC* y *tosA*) (**Tabla 19**).

Tabla 19. Localización de los genes *tosA*, *focH* y *sfaC* en los contig de las cepas secuenciadas

Descripción	Cepa	Genes determinados por PCR	Nombre del contig (tamaño)	Gen(es) identificado(s) ¹
Cepas UPEC aislada de pacientes pediátricos	124N	<i>fimH</i> , <i>iha</i> , <i>papGII</i> , <i>papGIII</i> , <i>vatA</i> , <i>vatP</i> y <i>satA</i> , <i>iucD</i> y <i>fliC</i> ²	meta124_12 (140,541 pb)	<i>tosA</i>
			meta124_20 (60,003 pb)	<i>sfaC</i> y <i>focH</i>
	129N	<i>fimH</i> , <i>iha</i> , <i>papGII</i> , <i>vatA</i> , <i>vatP</i> , <i>satA</i> , <i>iucD</i> y <i>fliC</i> ²	qu2.u.ut.ut2.st2.ut3.ut3.s.st_21 (47,151 pb)	<i>tosA</i>
			qu2.u.ut.ut2.st2.ut3.ut3.s.st_32 (21,291 pb)	<i>sfaC</i>
	CR135	<i>fimH</i> , <i>iucD</i> , <i>iha</i> , <i>sat</i> , <i>vat</i> y <i>hlyA</i> ³	qu3.ut3.s3.ut2.u.st2.ut.u2.s2.st.s_4 (211,604 pb)	<i>tosA</i>
			qu3.ut3.s3.ut2.u.st2.ut.u2.s2.st.s_6 (186,820 pb)	<i>focH</i>
Cepa UPEC aislada de adulto con ITU	CR149	<i>fimH</i> , <i>iucD</i> , <i>iha</i> , <i>sat</i> , <i>vat</i> y <i>cnf</i> ³	qst.s.st2.u.ut2.u2.u3.ut3.s2.ut_19 (81,061 pb)	<i>sfaC</i>
			qst.s.st2.u.ut2.u2.u3.ut3.s2.ut_20 (66,781 pb)	<i>tosA</i>

1, Identificados bioinformáticamente por SnapGene empleando los oligonucleótidos empleados en este trabajo para identificar *sfaC*, *focH* y *tosA*; 2, Determinados previamente por PCR múltiple (Ibarra-Valencia, 2015); 3, Determinados previamente por PCR múltiple (Pérez-Ama, 2018).

La extracción genómica de las cepas UPEC: 124N, 129N, CR135 y CR149 se sometieron a PCR para amplificar *tosA*, *sfaC* y *focH* (**Tabla 8 y Tabla 9**), para corroborar lo obtenido bioinformáticamente. Como control positivo se empleó CFT073 y como control negativo MC4100.

En la **Figura 10** se muestra un gel representativo de los resultados obtenidos de la PCR para cada gen. Todas las cepas amplificaron: 124N, *tosA*; 129N, *sfaC* y *focH*; CR135, *focH* y *tosA*; y CR149, *sfaC* y *tosA*.

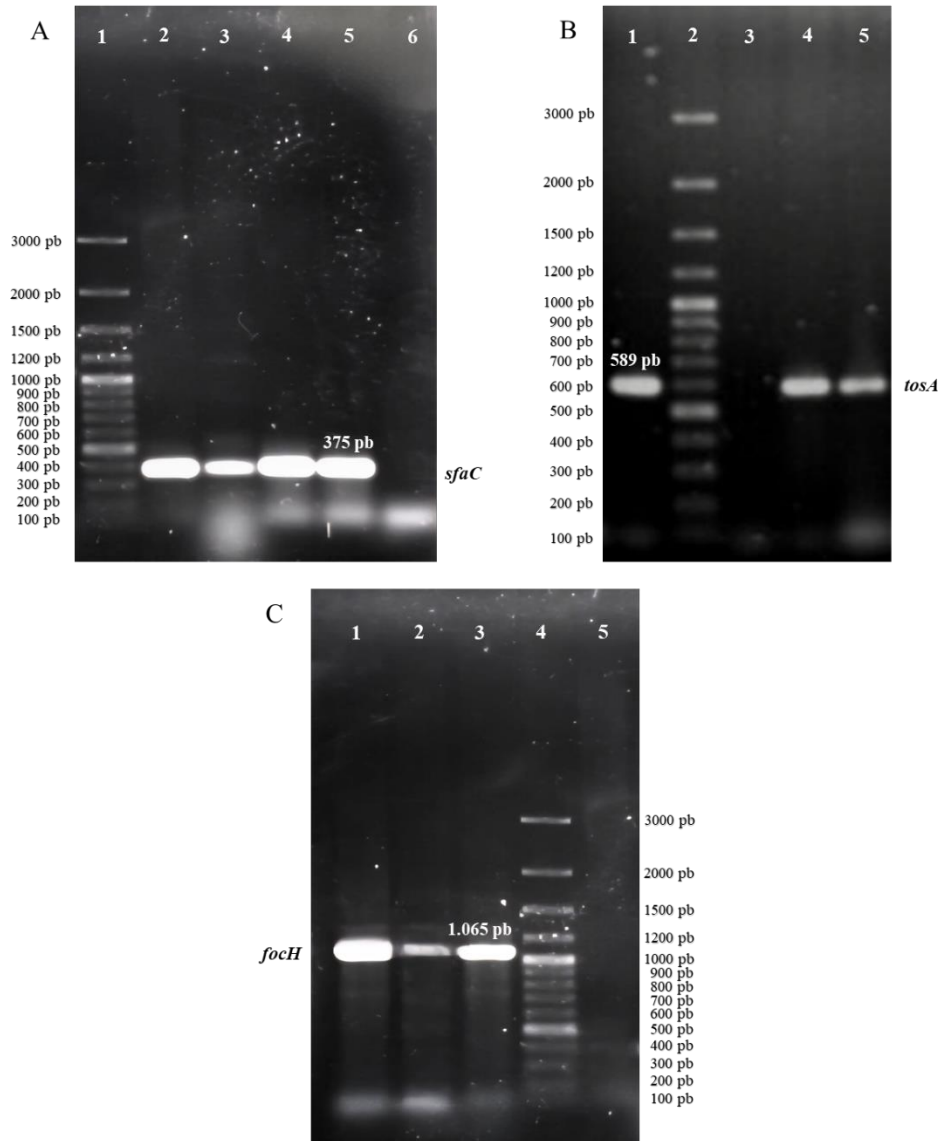


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa de PCR individual para identificar adhesinas en cepas secuenciadas.

Se muestran los fragmentos amplificados en una electroforesis en geles de agarosa al 1%. **A)** PCR para determinar *sfaC*: carril 1, marcador de peso molecular (MP) de 100 pb; carril 2, control positivo (CFT073, 375 pb); carril 3, cepa 124N; carril 4, cepa 129N; carril 5, cepa CR149; carril 6, control negativo (MC4100). **B)** PCR para determinar *tosA*: carril 1, control positivo (CFT073, 589 pb); Carril 2, marcador de peso molecular de 100 pb; Carril 3, control negativo (MC4100); Carril 4, cepa 124N; Carril 5, cepa 129N. **C)** PCR para determinar *focH*: Carril 1, cepa 124N; carril 2, cepa CR135R; carril 3, control positivo (CFT073, 1065 pb); carril 4, marcador de peso molecular (MP); carril 5, control negativo (MC4100).

7.6. Diseño de oligonucleótidos para determinar STEC/EHEC y EPEC

Se usó el genoma de EHEC EDL933 (NCBI número de acceso AE005174) para localizar *stxIA* (subunidad A de la toxina Shiga 1), se determinó su posición, tamaño (948 pb) y además el entorno genético mediante el programa SnapGene (**Figura 12**). Además la secuencia completa del gen se alineó mediante BLAST con genomas de *E. coli*, para localizar regiones conservadas dentro del mismo. En la **Figura 11-A** se observa que la secuencia presenta el 100% de identidad en genomas de STEC/EHEC y 0% en genomas de otras categorías/patotipos. En el diseño de los oligonucleótidos se buscó generar un amplicón de *stxIA* menor a 300 pb, para poder, posteriormente, realizar PCR-múltiple.

A

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli strain 122 chromosome complete genome	Escherichia coli	1751	1751	100%	0.0	100.00%	5454175	CP028654.1
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli O157:H7 strain F7349 chromosome complete genome	Escherichia coli	1751	1751	100%	0.0	100.00%	5519312	CP038363.1
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli O157:H7 strain OK1 chromosome complete genome	Escherichia coli	1751	1751	100%	0.0	100.00%	5459741	CP038313.1
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli O111:NM strain 14614 chromosome complete genome	Escherichia coli	1751	1751	100%	0.0	100.00%	5406681	CP077460.1
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli O111:H2 strain 08-3342 chromosome complete genome	Escherichia coli	1751	1751	100%	0.0	100.00%	5287691	CP077551.1
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli strain 2013C-3250 chromosome complete genome	Escherichia coli	1751	1751	100%	0.0	100.00%	5401672	CP027380.1
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli O157:H7 strain 611 chromosome complete genome	Escherichia coli	1751	1751	100%	0.0	100.00%	5477691	CP038428.1
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli strain 112 chromosome complete genome	Escherichia coli	1751	1751	100%	0.0	100.00%	5508281	CP028683.1
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli O157:H7 strain 6535NalR chromosome complete genome	Escherichia coli	1751	1751	100%	0.0	100.00%	5644599	CP069034.1
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli O157:H7 str. EDL933 chromosome complete genome	Escherichia coli	1751	1751	100%	0.0	100.00%	5138920	CP124740.1
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli O157:H7 strain FIT_2000A chromosome complete genome	Escherichia coli	1751	1751	100%	0.0	100.00%	5498632	CP051824.1
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli strain UTAk-13 chromosome complete genome	Escherichia coli	1751	1751	100%	0.0	100.00%	5426638	CP169008.1
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli O157:H7 strain FIT_1998F chromosome complete genome	Escherichia coli	1751	1751	100%	0.0	100.00%	5491538	CP051830.1
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli strain UTAk-8 chromosome complete genome	Escherichia coli	1751	1751	100%	0.0	100.00%	5455482	CP168991.1
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli O111:H8 strain 05-3004 chromosome complete genome	Escherichia coli	1751	1751	100%	0.0	100.00%	5395930	CP077600.1

B

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli O157:H7 strain Z1723 chromosome complete genome	Escherichia coli O157	2459	4770	100%	0.0	100.00%	5722250	CP062739.1
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli strain 2013C_3678 chromosome complete genome	Escherichia coli	2459	2459	100%	0.0	100.00%	5494776	CP074863.1
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli CEC13091 DNA complete genome	Escherichia coli	2459	2459	100%	0.0	100.00%	5531748	AP026108.1
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli strain 437023 chromosome complete genome	Escherichia coli	2459	4886	100%	0.0	100.00%	554791	CP088034.1
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli O157:H7 strain F7349 chromosome complete genome	Escherichia coli O157	2459	2459	100%	0.0	100.00%	5519312	CP038363.1
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli CEC08123 DNA complete genome	Escherichia coli	2459	2459	100%	0.0	100.00%	5395638	AP026110.1
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli O157:H7 strain OK1 chromosome complete genome	Escherichia coli O157	2459	2459	100%	0.0	100.00%	5459741	CP038313.1
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli strain ERL06-2502 chromosome complete genome	Escherichia coli	2459	2459	100%	0.0	100.00%	5547257	CP032795.1
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli strain 2009C_3689 chromosome complete genome	Escherichia coli	2459	2459	100%	0.0	100.00%	5438720	CP074895.1
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli strain 7_15_5C chromosome complete genome	Escherichia coli	2459	2459	100%	0.0	100.00%	5516501	CP074830.1
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli O111:NM strain 14614 chromosome complete genome	Escherichia coli O111	2459	2459	100%	0.0	100.00%	5406681	CP077460.1
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli O111:H8 E401 DNA including Stx2-prophage region contig Stx2-prophage_of_E401	Escherichia coli O111:H8	2459	2459	100%	0.0	100.00%	69852	LC522050.1
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli strain UTIME-2 chromosome complete genome	Escherichia coli	2459	2459	100%	0.0	100.00%	5418968	CP169026.1
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli O157:H7 str. EDL933 plasmid unnamad2 complete sequence	Escherichia coli O157	2459	2459	100%	0.0	100.00%	286775	CP124741.1

Figura 11. Resultados del BLAST de *stxIA* y RI-*stx2A-stx2B* de EHEC-EDL933 con genoma de *E. coli*.

A) Resultados del alineamiento de *stxIA* con genomas de *E. coli*. B) Resultados del alineamiento RI-*stx2A-stx2B* con genomas de *E. coli*. Se observa una identidad del 100% de ambas secuencias en varios genomas de *E. coli*. O157:H7 (catalogadas como STEC/EHEC asociados con el consumo de carne bovina), O111 (cepas STEC/EHEC aisladas con frecuencia, causante de brotes de gastroenteritis con SHU) y otras cepas STEC/EHEC.

Por medio del programa DNASTar se realizó un análisis de los oligonucleótidos *stxIA* diseñados para verificar sus propiedades (**Tabla 20**). La secuencia de los oligonucleótidos diseñados en este trabajo no se presentan debido a que serán publicados.

Tabla 20. Análisis de los oligonucleótidos para la identificación de *stxIA*.

Características de los oligonucleótidos		
Nombre	<i>stxIA546-F</i>	<i>stxIA811-R</i>
Cadena de alineamiento	Complementaria (-)	Líder (+)
% Guanina-Citosina	57.1%	52.4%
Temperatura de alineamiento (T _m)	57.0 °C	58.3 °C
Formación de auto-dímeros	No (7 dímeros de baja espontaneidad)	No (7 dímeros de baja espontaneidad)
Formación de horquillas	No (4 horquillas de baja espontaneidad)	No (7 horquillas de baja espontaneidad)
Formación de dímeros entre el par	No (8 dímeros de baja espontaneidad)	

Además, utilizando el programa SnapGene se verificó que los oligonucleótidos diseñados se alinearan correctamente dentro del genoma de EHEC, EL933 (número de acceso AE005174), así mismo, se verificó el tamaño del amplicón en *stxIA*, 286 pb (

Figura 12).

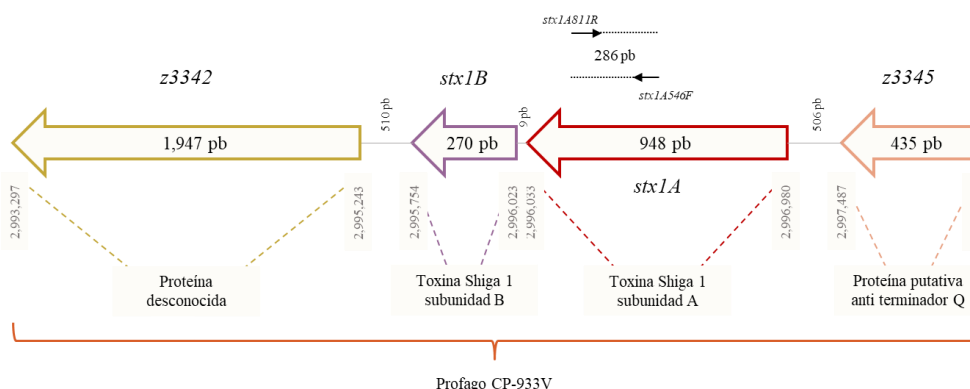


Figura 12. Entorno genético de *stxIA* y localización de los oligonucleótidos diseñados para su amplificación.

Dentro de la secuencia del profago CP-933W (llave roja), presente en el genoma de EHEC EDL933 (número de acceso AE005174), se encuentran los genes que codifican para las subunidades A y B de la toxina Shiga 1, *stxIA* y *stx1B*, representados con flechas con contorno rojo y morado, respectivamente. Hacia el extremo 3' de *stx1B* se encuentra un ORF desconocido, z3342, flecha dorada, y río arriba de *stx1A* se encuentra una proteína putativa anti-terminador Q, z3345, flecha rosa. El tamaño en pares de bases (pb) de cada gen se encuentra indicado dentro de cada flecha. Las posiciones de cada gen dentro del genoma de la cepa EDL933 son indicadas con números que flanquean cada flecha y, la proteína que codifica cada flecha se encuentra debajo de cada una. Las flechas negras representan el lugar de alineamiento de los oligonucleótidos:

stx1A546-F y *stx1A811-R*, mientras que las líneas punteadas indican la región de *stx1A* que se amplifica, así como el tamaño del amplicón, 286 pb.

Por otro lado, para identificar *stx2A* (subunidad A de la toxina Shiga 2), se siguió la misma metodología que para *stx1A*. No obstante, como se deseaba amplificar todo el gen, no solamente se obtuvo la secuencia de *stx2A* sino también el de la región intergénica -localizada en el extremo 5' de *stx2A*, y el de *stx2B* (subunidad B de la toxina Shiga 2), gen que se encuentra en el extremo 3' de *stx2A*. Las secuencias se alinearon mediante BLAST con genomas de STEC/EHEC para localizar regiones conservadas en la región intergénica y *stx2B*, sitios que flanquean *stx2A*. Se encontró una identidad del 100% en genomas de *E. coli* catalogadas como STEC/EHEC (**Figura 11-B**) y 0% en genomas de otras categorías. Una vez identificadas se diseñaron los oligonucleótidos en dichas regiones.

Por medio del programa SnapGene se verificó que los oligonucleótidos se alinean al genoma de la cepa EDL933, así mismo, el tamaño del amplicón para *stx2A* de 1,130 pb (**Figura 13**). Te falta poner las secuencias de los genes y donde pegan los oligos, pues ese es el resultado.

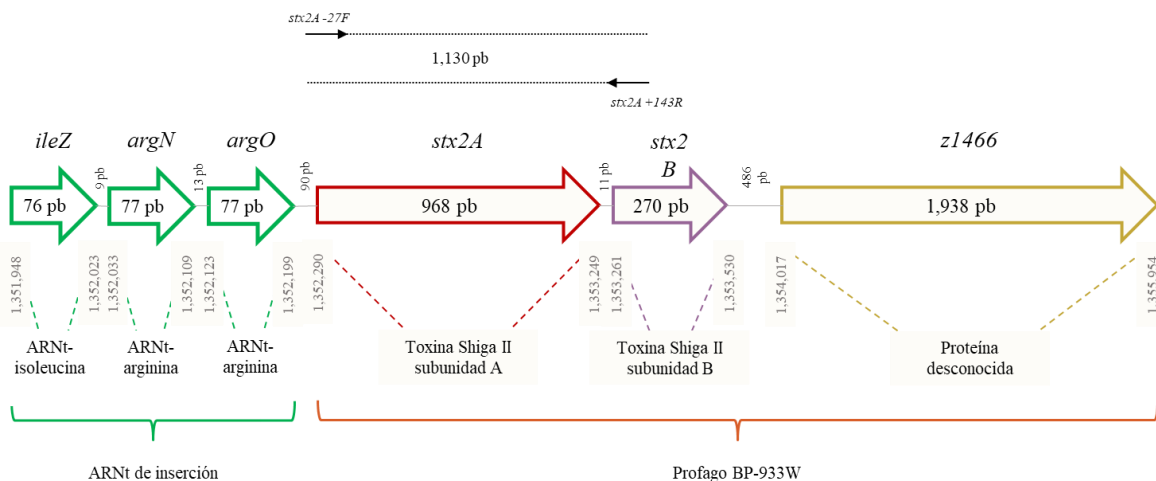


Figura 13. Entorno genético de *stx2A* y localización de los oligonucleótidos diseñados para su amplificación.

En flechas con contorno verdes se designan los ARNt (*ileZ*, ARNt isoleucina; *argN*, ARNt arginina; y *argO*, ARNt arginina). Dentro de la secuencia del profago BP-933W (llave naranja), localizado dentro del genoma de EHEC, cepa EDL933 con número de acceso AE005174, se encuentran los genes que codifican las subunidades A y B de la toxina Shiga 2, *stx2A* y *stx2B*, representados con flechas con contorno rojo y morado, respectivamente, así como un ORF desconocido, *z1466*, flecha dorada. Las posiciones de cada gen dentro del genoma de la cepa EDL933 son indicadas con números que flanquean cada flecha y, el nombre del ARNt o de la proteína que codifica cada gen se encuentra

debajo de cada flecha. Las flechas negras representan el lugar de alineamiento de los primers *RI27-F* y *stx2B132-R* en el genoma de EDL933, mientras que las líneas punteadas la región que amplifica de la región intergénica, de *stx2A* y *stx2B*, así como el tamaño del amplicón, 1,130 pb.

Por medio del programa DNASTar se realizó un análisis de los oligonucleótidos *stx2A* diseñados para verificar que cumpliera con las propiedades ideales de un buen oligonucleótido (**Tabla 21**).

Tabla 21. Análisis de los oligonucleótidos para la identificación de *stx2A*.

Características de los oligonucleótidos		
Nombre	<i>RI27-F</i>	<i>stx2B132-R</i>
Cadena de alineamiento	Líder (+)	Complementaria (-)
% Guanina-Citosina	45.5%	47.8%
Temperatura de alineamiento	52.7 °C	55.2 °C
Formación de auto-dímeros	No (3 dímeros de baja espontaneidad)	No (9 dímeros de baja espontaneidad)
Formación de horquillas	No (6 horquillas de baja espontaneidad)	No (7 horquillas de baja espontaneidad)
Formación de dímeros entre el par	No (14 dímeros de baja espontaneidad)	

Para la amplificación de *espF* en EPEC y EHEC. Primero se localizó la PAI-LEE en ambos patotipos mediante SnapGene. En el caso de la EPEC cepa E2348/69, se observó que el programa delimitaba la isla, sin embargo, en la EHEC cepa EDL933 no se delimitaba. Por lo que para identificar el inicio y fin de LEE en EHEC se buscaron: el sitio de inserción *selC* (ARNt específico de selenocisteína) y un segmento de 31 pb del extremo terminal 3' de la LEE, ambos extraídos del genoma de EPEC para posteriormente localizarlos en el genoma de EHEC. Así, se observó que en EPEC la PAI-LEE comprende 35,526 pb, mientras que en EHEC, su tamaño es de 43,263 pb. Una vez delimitadas, mediante EMBOSS Stretcher se les realizó un alineamiento global, reportando una identidad y similitud del 75.6% y 18.5% de gaps (hueco o ausencia de bases nucleotídica en una de las hebras del DNA). Además, en el genoma de EHEC hay 11 genes del profago 933L, río abajo del sitio de inserción de la isla,

que no están presentes en LEE de EPEC. Comprende *intL* y 10 ORFs de función desconocida, uno de ellos se encuentra río arriba de *espF* que no se encuentra en EPEC (**Figura 14**).



Figura 14. Resultados de la alineación global de la PAI-LEE de EHEC EDL933 Y E2348/69. Resultados de EMBOSS Stretcher.

A) Bloque de información sobre el alineamiento. B) Identificación del inicio del profago de 933L en el formato de secuencia por pares. C) Identificación del final del profago de 933L.

Mediante EMBOSS Stretcher se alinearon las secuencias correspondientes a la PAI-LEE de cada patotipo, omitiendo la secuencia del ARNt *selC* y del profago 933L. En EPEC se obtuvo una secuencia de 35,435 pb, mientras que en EHEC de 35,369 pb, el análisis indicó una identidad/similitud del 91.4% y gaps en un 1.4% (**Figura 15**).



Figura 15. Resultados de la alineación global de la PAI-LEE de EHEC EDL933 y E2348/69 sin ARNt-*selC* y el profago 933L.

Resultados de EMBOSS Stretcher. A) Bloque de información sobre el alineamiento. B) Identificación de la zona variable en la PAI-LEE de EPEC y EHEC en el formato de secuencia por pares.

Se encontró que las regiones que presentaban una diferencia de tamaño eran: *espF* (presente en la cadena complementaria cuyo tamaño en EPEC es de 621 pb y en EHEC es de 747 pb) y la región intergénica (RI) que se encuentra en su extremo 3' (en EPEC es de 902 pb y en EHEC de 864 pb), resultan en una diferencia de 88 pb que se aprovechó para el diseño de oligonucleótidos que permitan diferenciar entre el patotipo EPEC y EHEC (**Figura 16**).

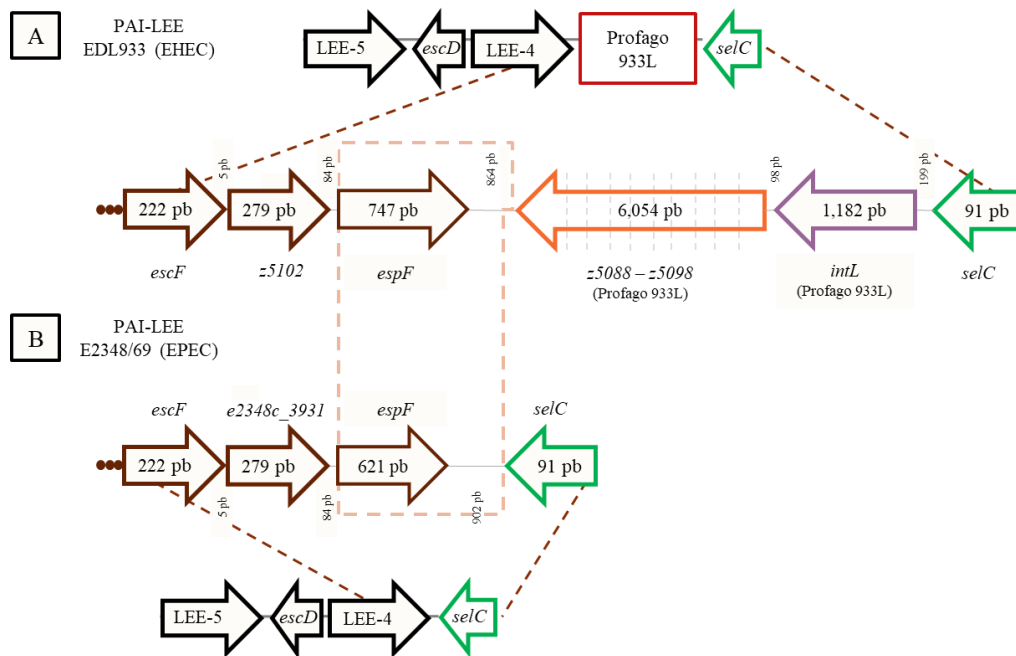


Figura 16. Esquema de la región de LEE seleccionada para el diseño de oligonucleótidos para diferenciar entre EPEC y EHEC.

A) Región de PAI-LEE en EHEC EDL933. B) Región de PAI-LEE en EPEC E2346/69. La línea punteada en color rosa encierra las regiones seleccionadas, en ambos patotipos, para el diseño de oligonucleótidos (*espF* y la región intergénica río abajo del gen). El profago 933L, representado por un cuadrado con contorno negro, contiene *intL*, que codifica una integrasa, representada por una flecha con contorno morado, así mismo, presenta 10 ORFs desconocidos, *z5088* a *z5098*, designados como una flecha en color naranja. Las flechas marrones representan genes del locus policistrónico LEE4, en EHEC: *espF*, *z5102* y *escF*, mientras que en EPEC: *espF*, *e2348c_3931* y *escF*. Las flechas con contorno verde representan el ARNt (sitio de inserción): *selC*, ARNt de selenocisteína.

Las secuencias comprendidas entre la RI y *espF* de EHEC (1,611 pb) y EPEC, (1,523 pb), presentan una similitud nucleotídica del 87.8% y 5.5% de gaps (**Figura 17**). En esta zona se

A

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli O127:H6 E2348/69 complete genome_strain E2348/69	Escherichia coli ...	2813	3793	100%	0.0	100.00%	4965553	FM180568.1
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli O127:H6 isolate EPEC E2348/69 variety 2 genome assembly_chromosome_1	Escherichia coli ...	2813	3793	100%	0.0	100.00%	4848621	LT827011.1
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli strain E2348/69 chromosome_complete genome	Escherichia coli	2813	3793	100%	0.0	100.00%	4944462	CP059840.2
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli isolate DCE7 chromosome_complete genome	Escherichia coli	2802	3782	100%	0.0	99.87%	4417652	CP090611.1
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli strain B19374 chromosome_complete genome	Escherichia coli	2802	3782	100%	0.0	99.87%	5061136	CP142915.1
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli strain A25 chromosome_complete genome	Escherichia coli	2796	3776	100%	0.0	99.80%	4602860	CP028750.1
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli strain SC434 genome assembly_chromosome_omosome1	Escherichia coli	2791	3642	100%	0.0	99.74%	4658197	LR778142.1
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli isolate SC477 genome assembly_chromosome_omosome1	Escherichia coli	2791	3642	100%	0.0	99.74%	4658510	LR778152.1
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli isolate SC455 genome assembly_chromosome_omosome1	Escherichia coli	2791	3642	100%	0.0	99.74%	4655420	LR778146.1
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli strain Z1323PEC0009 chromosome_complete genome	Escherichia coli	2772	3730	100%	0.0	99.54%	4868214	CP148286.1
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli strain E2348/69 pathogenicity island_rOrf1 (rorf1)_rOrf2 (rorf2)_EscR (escR)_EscS (escS)_E...	Escherichia coli	2761	3741	99%	0.0	99.80%	35624	AF022236.1
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli strain RHB34-C04 chromosome_complete genome	Escherichia coli	2758	3603	100%	0.0	99.34%	4848005	CP057178.1
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli genes foe locus of enterocyte effacement_complete sequence_strain NIAH_Bird_32	Escherichia coli	2475	3121	100%	0.0	96.00%	57709	LC053401.1
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli strain STEC UZB005 chromosome_complete genome	Escherichia coli	2470	3296	100%	0.0	95.99%	4954036	CP171880.1
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli strain Z1322MEC0002 chromosome_complete genome	Escherichia coli	1816	2675	100%	0.0	94.95%	4880729	CP148566.1
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli strain Z1322HEC0009 chromosome_complete genome	Escherichia coli	1773	2717	100%	0.0	93.98%	4890023	CP148570.1

B

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli strain 122 chromosome_complete genome	Escherichia coli	2976	5383	100%	0.0	100.00%	5454175	CP028654.1
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli O157:H7 strain E7349 chromosome_complete genome	Escherichia coli...	2976	5313	100%	0.0	100.00%	5519312	CP038363.1
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli O157:H7 strain OK1 chromosome_complete genome	Escherichia coli...	2976	5313	100%	0.0	100.00%	5459741	CP038313.1
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli O157:H7 strain 611 chromosome_complete genome	Escherichia coli...	2976	5313	100%	0.0	100.00%	5477691	CP038428.1
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli strain 112 chromosome_complete genome	Escherichia coli	2976	5313	100%	0.0	100.00%	5508281	CP028683.1
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli O157:H7 strain 6535NaIR chromosome_complete genome	Escherichia coli...	2976	5313	100%	0.0	100.00%	5644599	CP089034.1
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli O157:H7_str. EDL933 chromosome_complete genome	Escherichia coli...	2976	5244	100%	0.0	100.00%	5138920	CP124740.1
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli O157:H7 strain FLT_2000A chromosome_complete genome	Escherichia coli...	2976	5313	100%	0.0	100.00%	5498832	CP051824.1
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli O157:H7 strain FLT_1998F chromosome_complete genome	Escherichia coli...	2976	5244	100%	0.0	100.00%	5491638	CP051830.1
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli strain 110 chromosome_complete genome	Escherichia coli	2976	5244	100%	0.0	100.00%	5442850	CP028687.1
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli O157 strain AR-0428 chromosome_complete genome	Escherichia coli...	2976	5313	100%	0.0	100.00%	5557507	CP044145.1
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli O157:H7 strain Z570 chromosome_complete genome	Escherichia coli...	2970	5447	100%	0.0	99.94%	5553302	CP062771.1
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli PA8 chromosome_complete genome	Escherichia coli...	2970	5308	100%	0.0	99.94%	5473983	CP145946.1
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli H52_982342 DNA_complete genome	Escherichia coli	2970	5310	100%	0.0	99.94%	5430116	AP026085.1
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli PA2 chromosome_complete genome	Escherichia coli...	2970	5238	100%	0.0	99.94%	5412736	CP145944.1
<input checked="" type="checkbox"/> Escherichia coli O157:H7 strain Rafaela_II chromosome_complete genome	Escherichia coli...	2970	5238	100%	0.0	99.94%	5544602	CP076230.1

Figura 18. Resultados del BLAST de la región intergénica (RI) y *espF* de EPEC-E2348/69 y EHEC-EDL933 con genoma de *E. coli*.

A) Alineamiento de RI + *espF* de E2348/69 con genomas de *E. coli*. **B)** Alineamiento de RI + *espF* de EDL933 con genomas de *E. coli*.

Así mismo, se realizó alineamientos de RI + *espF* de EPEC-E2348/69 (1,523 pb) y EHEC-EDL933 (1,611 pb) con *E. coli* pertenecientes a otras categorías: EAEC cepa 042 (No. de acceso: FN554766.1), ETEC cepa H10407 (No. de acceso: NC_017633.1), DAEC cepa SK1144 (No. de acceso: NZ_AP018784.2), AIEC cepa LF82 (No. de acceso: NC_011993.1), NMEC O18 (No. de acceso: NZ_CP007275.1), UPEC cepa CFT073 (No. de acceso: NC_004431), APEC cepa 102026 (No. de acceso: NZ_CP087293.1), y de la cepa comensal MC4100 (No. de acceso NZ_HG738867.1) (**Anexo 5** y **Anexo 6**).

En la **Tabla 22** se muestran los resultados obtenidos del BLAST para EPEC-E2348/69, se observa que las cepas: ETEC-H10407, APEC-102026 y la comensal MC4100, no presentan zonas con homología. La cepa EAEC-042 arrojó dos zonas de alineamiento (313/368 nt y 313/368 nt), mientras que DAEC-SK1144 presento tres zonas de alineamiento (313/368 nt, 313/368 nt y 44/47 nt). Por otro lado, las cepas: AIEC-LF82, NMEC-O18 y UPEC-CFT073 presentan solo un alineamiento de 44/47 nt, en las dos primeras, y de 309/365 nt para la UPEC. Para EHEC-EDL933 se obtuvieron resultados similares, sin embargo, en EAEC-042 y UPEC se reportó dos (38/38 nt y 37/37) y zona más (41/42 nt) de alineamiento, respectivamente. En las cepas AIEC-LF82 y NMEC-O18, no se encontraron alineamientos. En ambos casos no se muestra un alineamiento mayor al 25%, en EPEC 24.2% (368/1,523 nt) y 22.8 % (368/1,611 nt) en EHEC.

Tabla 22. Resultados del alineamiento de RI + *espF* de EPEC-E2348/69 y EHEC-EDL933 con la secuencia del cromosoma de cepas *E. coli* pertenecientes a otros patotipo/categorías.

Patotipo	Categoría	EPEC-E2348/69 (1,523 nt)		EHEC-EDL933 (1,611 nt)	
		Identidad	Gaps	Identidad	Gaps
DEC	EAEC-042	313/368 (85%)	11/368 (2%)	314/368 (85%)	11/368 (2%)
				312/365 (85%)	11/365 (3%)
		311/365 (85%)	11/365 (3%)	38/38 (100%)	0/38 (0%)
				37/37 (100%)	0/37 (0%)
	DAEC-SK1144	311/365 (85%)	11/365(3%)	312/365 (85%)	11/365(3%)
		313/368 (85%)	11/368 (2%)	314/368 (85%)	11/368 (2%)
		44/47 (94%)	0/47 (0%)	37/37 (100%)	0/47 (0%)
ETEC-H10407	-	-	-	-	
AIEC-LF82	44/47 (94%)	0/47 (0%)	-	-	
ExPEC	APEC-102026	-	-	-	-
	NMEC-O18	44/47 (94%)	0/47 (0%)	-	-
	UPEC-CFT073	309/365 (85%)	11/365 (3%)	310/365 (85%)	11/365 (3%)
41/42 (98%)				1/42 (2%)	
Comensal	MC4100	-	-	-	-

Con base en los resultados se diseñaron los oligonucleótidos y, por medio de DNASTar, se realizó un análisis para determinar si cumplía con los criterios necesarios (**Tabla 23**). La secuencia de los oligonucleótidos no se muestra, porque se van a publicar posteriormente en un artículo. Por medio del programa SnapGene se verificó que los oligonucleótidos se alinearan únicamente en los genes objetivos dentro del genoma de las cepas EPEC E2348/69 y EHEC EDL933, se determinó el tamaño del amplicon 687 pb y 770 pb, respectivamente (**Figura 19**). Se verificó que no se alinearan en otros genomas.

Tabla 23. Análisis de los oligonucleótidos para la identificación de *espF*.

Características de los oligonucleótidos		
Nombre	<i>espF219F</i>	<i>espF+219H262PR</i>
Cadena de alineamiento	Complementaria (-)	Líder (+)
% Guanina-Citosina	52.2%	60.0%
Temperatura de alineamiento	55.6° C	58.0 ° C
Formación de auto-dímeros	No (6 dímeros de baja espontaneidad)	No (5 dímeros de baja espontaneidad)
Formación de horquillas	No (7 horquillas de baja espontaneidad)	No (5 horquillas de baja espontaneidad)
Formación de dímeros entre el par	No (11 dímeros de baja espontaneidad)	

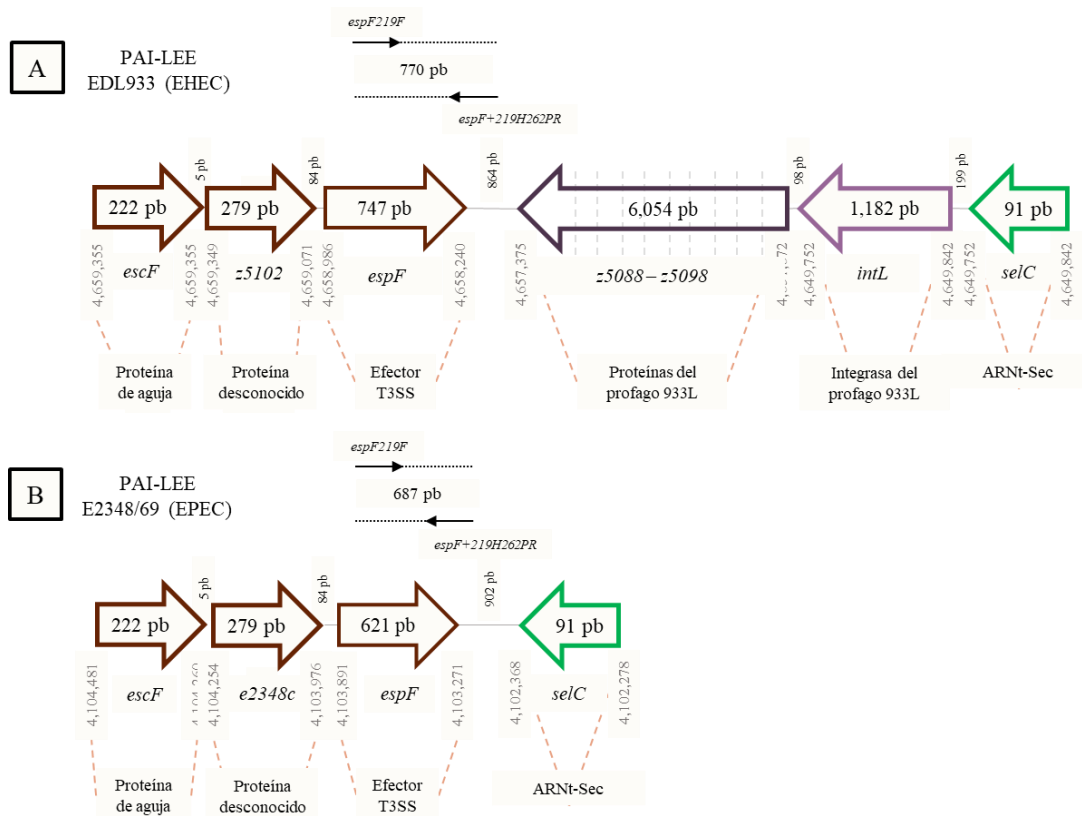


Figura 19. Esquema de localización de los oligonucleótidos diseñados para identificar *espF* en EPEC y EHEC.

A) Región de LEE en EHEC EDL933. Dentro de la PAI-LEE de EHEC se encuentra insertado el profago 933L, el cual codifica una integrasa, representado con una flecha morado pastel, y proteínas desconocidas, flecha morado oscuro. B) Región de LEE en EPEC E2346/69. Las flechas negras representan el lugar de alineamiento de los primers *espF*219F y *espF*+219H262PR, el primero se alinea en *espF*, mientras que el segundo se alinea en la región intergénica 5' del gen, en ambos genomas. Las líneas punteadas denotan la región que amplifica, así como el tamaño del amplicón, 770 pb para EHEC y 687 pb para EPEC. Las flechas con contorno verde representan el ARNt de inserción: *selC*, ARNt de selenocisteína. Las posiciones de cada gen dentro del genoma de la cepa EDL933 y E2348/69 son indicadas con números que flanquean cada flecha y, la proteína que codifica cada flecha se encuentra debajo de cada una.

7.5. PCR para amplificar genes DEC: *stx1A*, *stx2A*, *aaiG*, *espF*, *sta1*, *eltB*, *bfpA* y *aggR*.

Para determinar la T_m de los genes cromosómicos En la **Figura 20** se muestra la electroforesis de las PCR individuales de: *stx1A*, *aggR*, *aaiG* y *stx2A* a 59.1°C. En donde se observa que en ningún carril hay bandas inespecíficas, únicamente el amplicón esperado, para *stx1A* una banda de 286 pb (carril 1), para *aggR* una banda de 457 pb (carril 3), para *aaiG* una banda de 808 pb (carril 4) y para *stx2A* una banda de 1,130 pb (carril 5). En el carril 2 se encuentra el marcador de peso molecular (MP) de 100 pb. Es por ello que 59.1°C se

definió como la temperatura óptima de alineamiento para realizar PCR múltiple cromosómica.

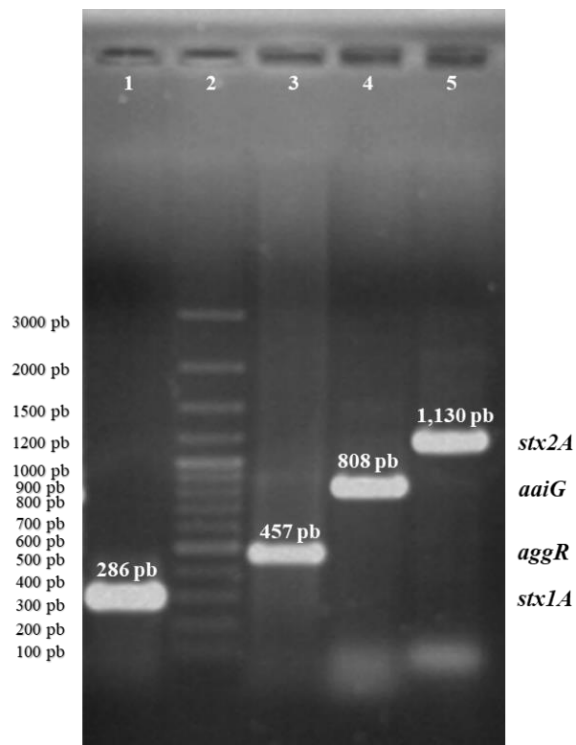


Figura 20. Identificación de genes de EHEC (genes de toxina Shiga 1 y 2) y EAEC (gen de SST6 y activador transcripcional AggR) para determinar patotipo DEC.

Electroforesis en gel agarosa al 1% de la estandarización de la amplificación por PCR individual de los genes cromosómicos *stx1A*, *stx2A* y *aaiG* a 59.1°C. Carril 1, *stx1A* (286pb); carril 2, marcador de peso molecular (MP) de 100 pb; carril 3, *aaiG* (808 pb); carril 4, *stx2A* (1,130 pb).

La PCR múltiple cromosómica para *stx1A*, *stx2A* y *aaiG* se muestra en la **Figura 21**. En el carril 1 se encuentra el control positivo (C+), se observan tres bandas correspondientes a los genes cromosómicos: *stx1A* de 286 pb, *aaiG* de 808 pb y *stx2A* de 1,130 pb. No hay bandas inespecíficas, por lo que la T_m de 59.7° C se designó como óptima para la PCR múltiple cromosómica. En el carril 2 se localiza el control negativo (C-), al no observarse bandas se comprueba que los reactivos no presentan contaminación, validando la reacción. En el carril 3 se encuentra el marcador de peso molecular de 100 pb.

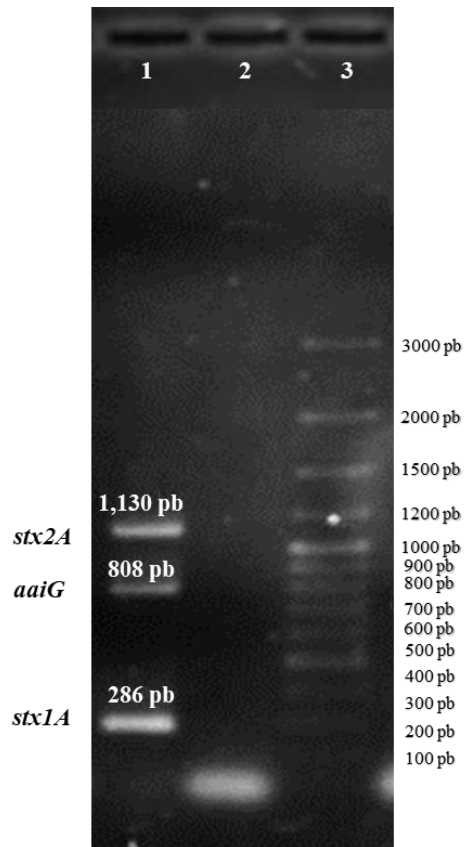


Figura 21. Resultados de la estandarización de PCR múltiple genómica.

Carril 1, producto de PCR múltiple plasmídica a 49.9° C (*stx1A* 286 pb, *aaiG* 808 pb y *stx2A* 1,130 pb); Carril 2, control negativo; Carril 3, marcador de peso molecular de 100 pb

Para determinar la T_m óptima para amplificar *espF* y verificar que en EHEC EDL933 y EPEC E2348/69 se produjeran amplicones de diferentes tamaños, se metieron PCR individuales (solo con un genoma) a diferentes temperaturas: 56.0°C, 57.5°C, 63.1°C y 64.3°C.

En la **Figura 22** se observa que se generaron amplicones en EHEC de 770 pb y en EPEC de 687 pb a diferentes temperaturas, no obstante, en todas hay presencia de bandas inespecíficas. Es por ello que se metieron PCR múltiple a las mismas temperaturas. Cada reacción positiva contenía los oligonucleótidos correspondientes para amplificar *espF* y el genoma de las cepas controles: EDL933 y E2348/69, así mismo, se incluyó un control negativo con el genoma de MC4100 (Tabla).

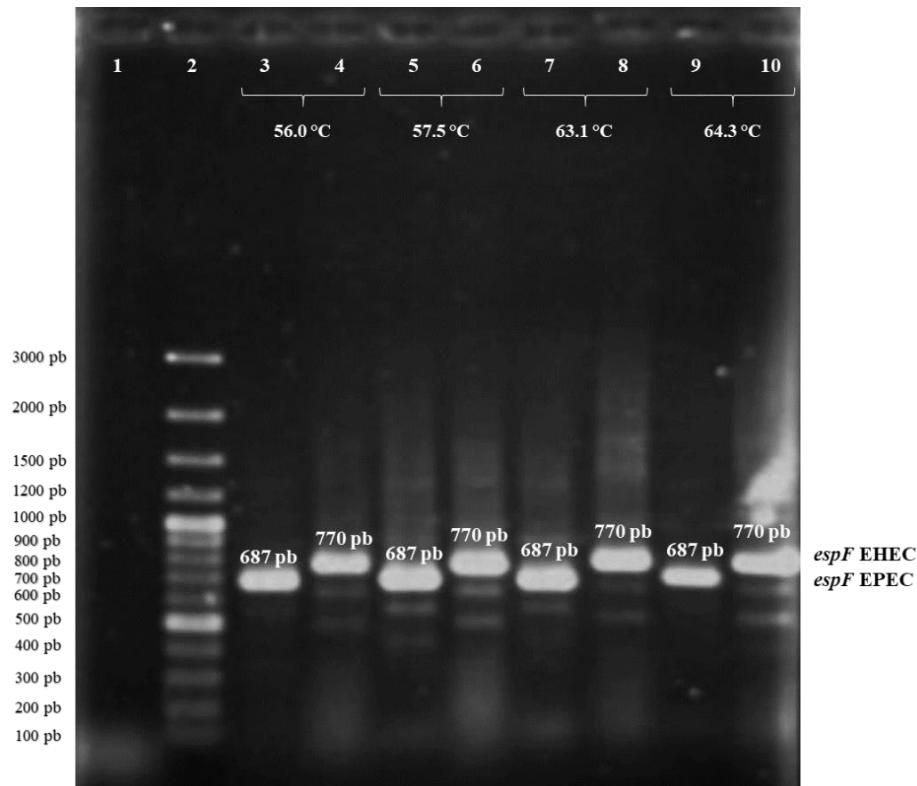


Figura 22. Estandarización para amplificar *espF* de EHEC y EPEC.

Se muestran los fragmentos amplificados por PCR individual en una electroforesis en geles de agarosa al 1%. Los productos de PCR con genoma de EPEC E2348/69 se muestran en los carriles 3, 5, 7 y 9 teniendo como temperatura de alineamiento 56.0°C, 57.5°C, 63.1°C y 64.3°C, respectivamente. Por otro lado, los productos de PCR con genoma de EHEC EDL933 se muestran en los carriles 4, 6, 8 y 10 teniendo como temperatura de alineamiento 56.0°C, 57.5°C, 63.1°C y 64.3°C, respectivamente. Carril 1. control negativo; Carril 2. Marcador de peso molecular de 100 pb ().

Los resultados de la **Figura 23** arrojan que la T_m adecuada para amplificar *espF* en ambos patotipos es 56.0°C, ya que se generan las dos bandas deseadas, 687 pb para EPEC y de 770 pb para EHEC, congruente con los análisis bioinformáticos de diseño. En las demás temperaturas (57.5°C, 63.1°C y 64.3°C), se visualizan bandas inespecíficas.

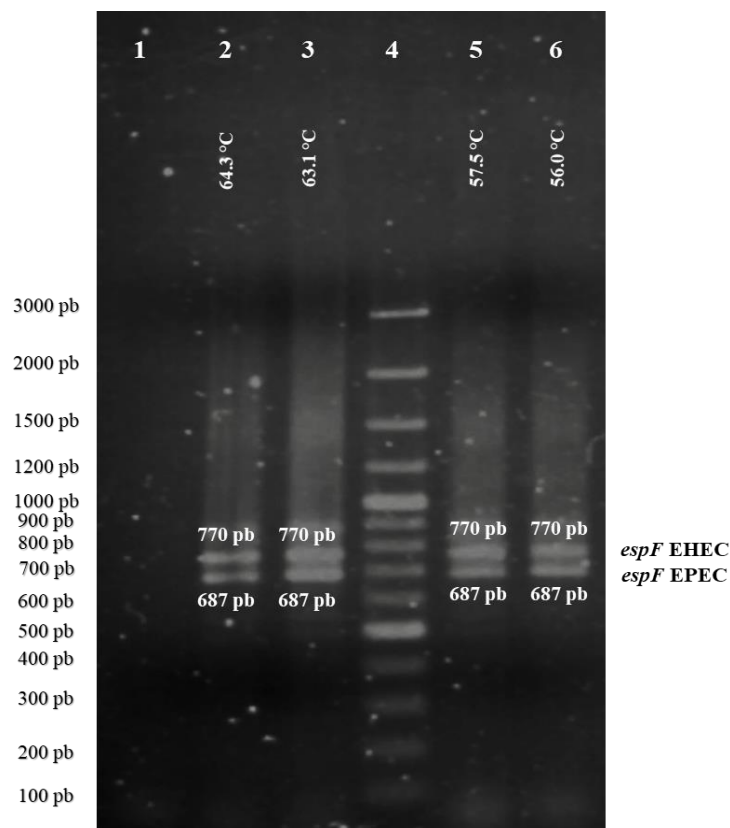


Figura 23. Figura: Resultados de la estandarización de PCR múltiple *espF* en EHEC y EPEC.

Se muestran los fragmentos amplificados en una electroforesis en geles de agarosa al 1%. Carril 1, control negativo; carril 2, producto de PCR múltiple *espF* a 64.3°C (*espF* en EHEC 770 pb y en EPEC 687 pb); carril 3, producto de PCR múltiple *espF* a 63.1°C; carril 4, marcador de peso molecular de 100 pb; carril 5, producto de PCR múltiple *espF* a 57.5°C; carril 6, producto de PCR múltiple *espF* a 56.0°C.

La PCR múltiple plasmídica permite la amplificación de 4 genes plasmídicos: *stal*, *eltB*, *aggR* y *bfpA*. Se determinó su T_m tras someter una reacción a 49.9° C y otra 52.4° C. Ambas contenían los cuatro pares de oligonucleótidos y el genoma de las cepas control: EAEC 042, EPEC E2348/69 y ETEC LD102b.

En la **Figura 24** se muestra el resultado de la electroforesis. En el carril 2 se observan cuatro bandas definidas, correspondientes con el tamaño del amplicón de cada gen: *stal* de 147 pb, *eltB* de 322 pb, *aggR* de 457 pb y *bfpA* de 879 pb. En el carril 3 se observan igualmente cuatro bandas, aunque menos definidas, por lo que, se seleccionó 49.9°C como T_m para esta PCR.

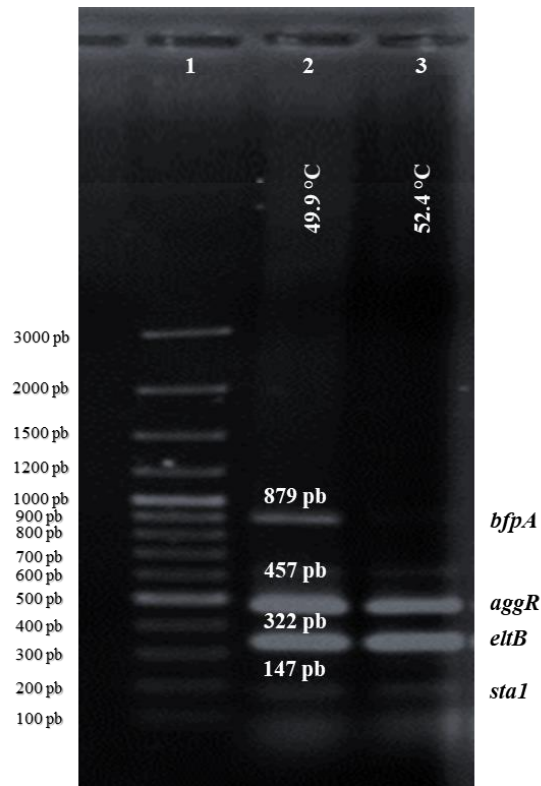


Figura 24. Electroforesis en gel de agarosa de PCR múltiple plasmídica en gradiente de temperatura. Carril 1, marcador de peso molecular de 100 pb; Carril 2, producto de PCR múltiple plasmídica a 49.9° C; Carril 3, PCR múltiple plasmídica a 52.4° C

7.6. Determinación de patotipos híbridos en el cepario

Se determinó la presencia de genes DEC en el cepario mediante PCR múltiple cromosómica (*stx1A*, *stx2A* y *aggR*), PCR múltiple *espF* y PCR múltiple plasmídica (*eltB*, *sta1*, *bfpA* y *aggR*) empleando como material genético templado cada una de las extracciones genómicas realizadas mediante lisis alcalina y las extracciones plasmídicas obtenidas por quick-Prep.

Cromosómicamente, se obtuvo la amplificación solamente del gen *aaiG* en dos cepas analizadas la 109 y 169 correspondiente al 3.9% del cepario. Este gen codifica parte del T6SS-3, característico del patotipo EAEC. Resultando en dos muestras híbridas UPEC/aEAEC. Ninguna de las cepas estudiadas amplificó alguna de las toxinas Shiga, *stx1A* y *stx2A*.

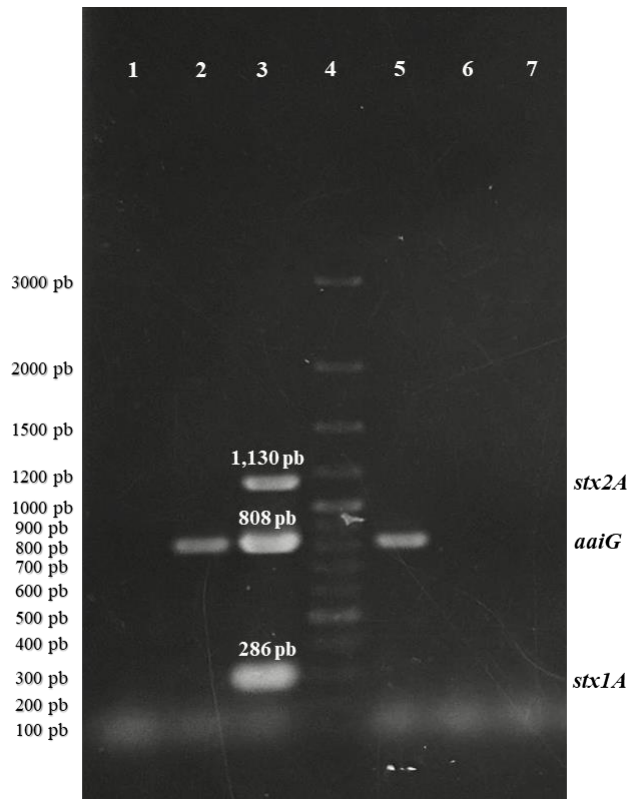


Figura 25. Electroforesis en gel de agarosa de PCR múltiple cromosómica.

Carril 1, cepa 101; Carril 2, cepa 109; Carril 3, control positivo (*stx1A* 286 pb, *aaiG* 808 pb y *stx2A* 1,130 pb); Carril 4, marcador de peso molecular de 100 pb; Carril 5, cepa 169; Carril 6, cepa 175; Carril 7, control negativo, MC4100.

Por otro lado, se obtuvo la amplificación de *espF* para el patotipo EHEC en el 16% del cepario (8 cepas), ya que en todas se observaron bandas de 770 pb, congruente con el control positivo EHEC EDL933. En la **Figura 26** se muestra el resultado de la electroforesis en gel de agarosa de los resultados obtenidos. Con base en los resultados tenemos 8 cepas híbridas UPEC con una PAI-_{LEE} similar a EHEC.

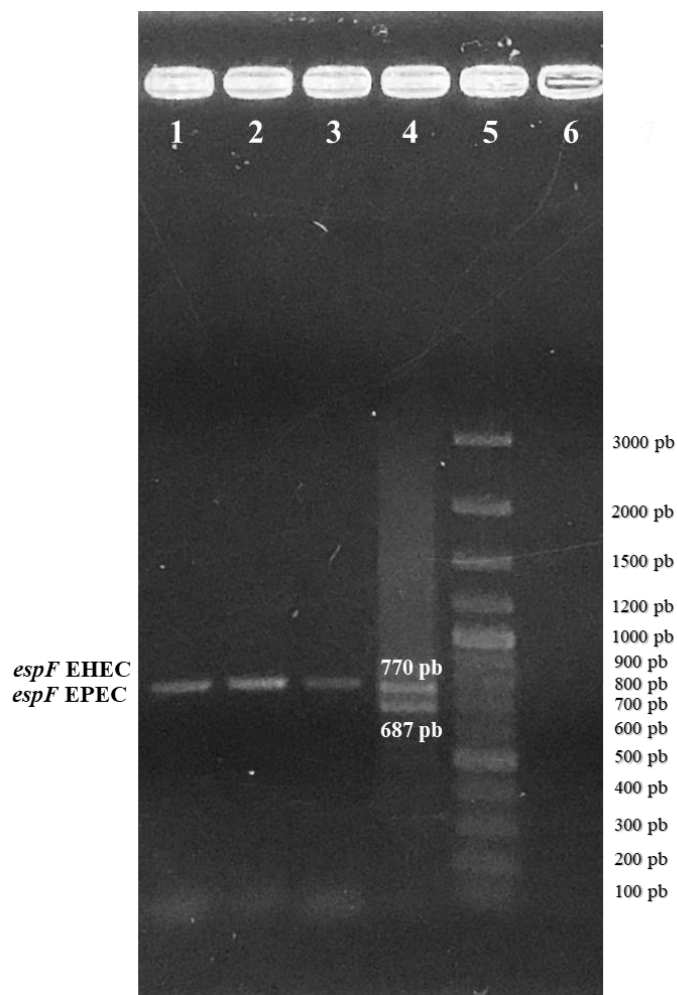


Figura 26. Electroforesis en gel de agarosa de PCR múltiple cromosómica.

Carril 1, cepa 113; Carril 2, cepa 114; Carril 3, cepa 136; Carril 4, control positivo *espF* en EHEC (EDL933,770 pb) y EPEC (E2348/69 687pb); Carril 5, marcador de peso molecular de 100 pb; Carril 6, control negativo.

Finalmente, se determinó por medio de la PCR múltiple plasmídica que ninguna de las cepas que poseían plásmido (**Anexo 7**) presentaba: *sta1*, *eltB*, *aggR* y *bfpA*. En la **Figura 27** se muestra un gel representativo de los resultados obtenidos.

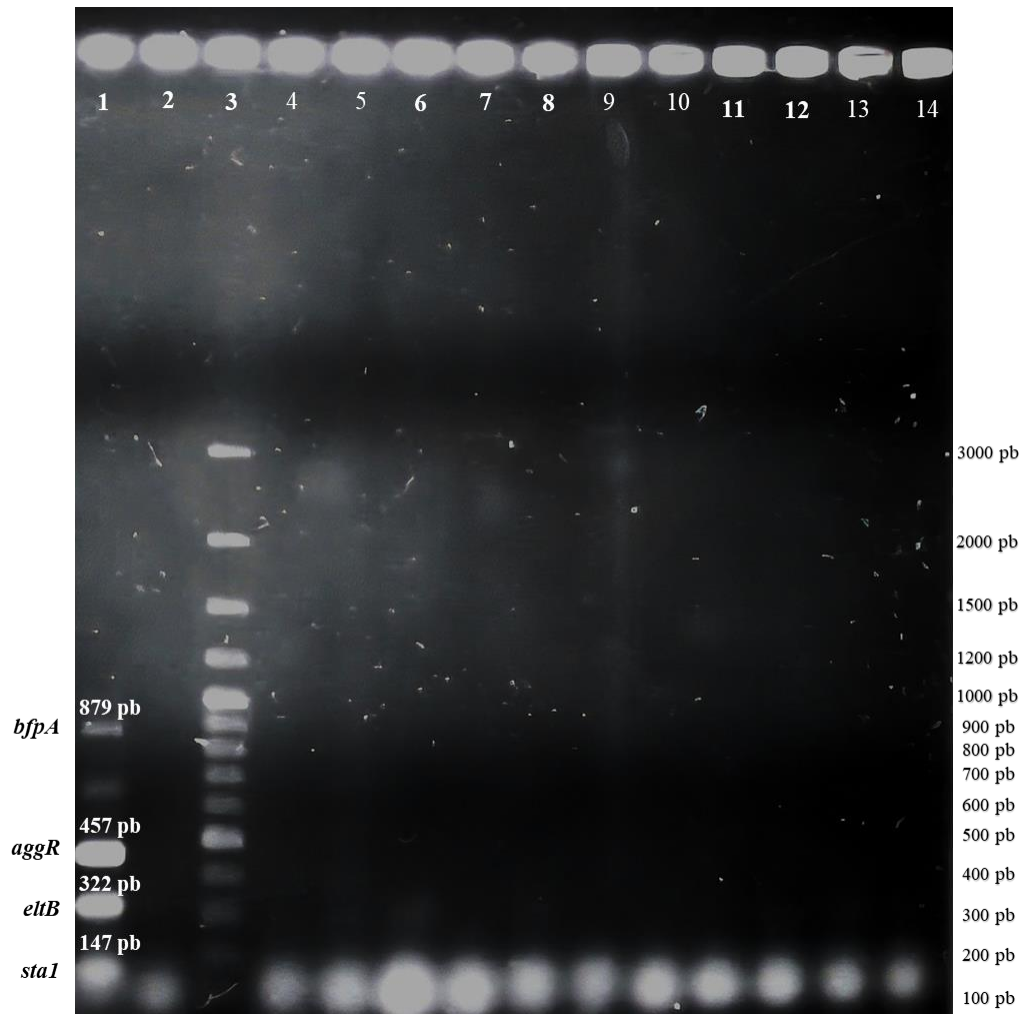


Figura 27. Electroforesis en gel de agarosa de PCR múltiple plasmídica.

Carril 1, control positivo (ETEC, *stx1* de 147 pb y *eltB* de 322 pb; EAEC, *aggR* de 457 pb; y EPEC, *bfpA* de 879 pb); Carril 2, control negativo; Carril 3, marcador de peso molecular de 100 pb; Carril 4, cepa 101; carril 5, cepa 105; carril 6, cepa 109; carril 7, cepa 121; carril 8, cepa 123; carril 9, cepa 131; carril 10, cepa 135; carril 11, cepa 139; y carril 12, cepa 148; carril 13, cepa 163; carril 14, cepa 172.

8. Discusión

Genéticamente, *E. coli* es un microorganismo altamente versátil, es capaz de colonizar y persistir en varios nichos, ya sea en el medio ambiente o en un hospedero. La genómica comparativa ha demostrado que los genomas de *E. coli* están conformados por un núcleo conservado y un segmento flexible adquirido por medio de la transferencia horizontal de genes, involucrado en la resistencia a antimicrobianos, patogenicidad y adaptabilidad de la bacteria. Las regiones de plasticidad del genoma se caracterizan por presentar un contenido de G+C atípico en relación con el resto del genoma (Braz, et al., 2020; Yang, T., et al., 2022). Las regiones de ADN genómico que oscilan entre 5 a 100 kb de longitud y que pueden intercambiarse entre aislamientos bacterianos se denominan islas genómicas (IG), las cuales, se clasifican con base a las funciones codificadas, encontrando islas de simbiosis, islas de adaptación, islas metabólicas, islas de patogenicidad (PAI) e islas de resistencia. Las IG son un rasgo característico de *E. coli*, ya que, desempeñan un papel vital en la evolución y surgimiento de diferentes patotipos (Lloyd, et al., 2007; Yang, T., et al., 2022).

Diferenciar cepas de *E. coli* patógenas y *E. coli* comensales a través de la identificación de FV específicos es difícil y en ocasiones no pueden distinguirse, como es el caso de cepas ExPEC, ya que, la patogénesis de *E. coli* ha ido evolucionando mediante la transferencia horizontal dentro de la misma especie o especies relacionadas. En su mayoría, los genes de virulencia se encuentran en elementos genéticos móviles, tales como: PAIs, bacteriófagos, secuencias de inserción (IS), integrones, plásmidos y transposones; facilitando su intercambio entre diferentes bacterias. Estos elementos permiten la duplicación, supresión y adquisición de genes. Dicho tránsito genético genera una mayor adaptabilidad, resultando en la transición de bacterias patógenas entre humanos y animales, la resistencia a los antimicrobianos, la aparición de patógenos emergentes y/o el aumento de la patogenicidad (Braz, et al., 2020).

Un paso indispensable para la patogénesis de diversas infecciones bacterianas es la adhesión, ya que permite la colonización de nichos específicos en el huésped. Una vez que UPEC entra a la vejiga lo primero que hace es adherirse al urotelio, mediante el reconocimiento e interacción por medio de las adhesinas fimbriales y afimbriales de los receptores presentes

en la superficie celular. En UPEC muchas de estas adhesinas son CUF. Un genoma de *E. coli* puede presentar hasta 16 operones CUF distintos. En el caso de las UPEC, su genoma suele contener de 5 a 10 operones CUFs completos diferentes (Greene, et al., 2014; Spaulding, et al., 2016).

Con el aumento de la secuenciación de genomas se han identificado grupos de genes fimbriales sin caracterizar. Las propiedades de adherencia de las fimbrias se asocian con determinados patotipos de *E. coli*. Las ExPEC se asocian comúnmente con las fimbrias F17-like, Pix, P, S y F1C, siendo estas tres últimas fuertemente asociadas epidemiológicamente a la colonización del tracto urinario. Las fimbrias F1C son codificadas por el operón *focAICDFGH*, adhesina no hemaglutinante que reconocen la galactosil-ceramida presentes en las células epiteliales de los uréteres, los riñones y la vejiga, así como a globotriaosilceramida presente únicamente en los riñones. Mientras que las fimbrias S, codificadas por el operón *sfaCBADEFGSH* en UPEC, es una adhesina resistente a manosa que reconoce los receptores de α -sialil-2,3-galactosa presentes en los glicolípidos y las glicoproteínas del huésped: conductos colectores, glomérulos y tejidos endoteliales de vejiga y riñón (Wurpel, et al., 2013; Behzadi, 2020).

En el presente estudio, ninguna de las 51 cepas estudiadas amplificó por PCR, el gen *sfaC* (proteína reguladora de la fimbria S). Datos que concordaron con lo reportado por Khaleque, et al., 2017 en Dhaka, Bangladesh, quienes trabajaron con 56 cepas UPEC de orina de pacientes ambulatorios y hospitalizados, reportando ninguna de sus cepas fue positiva para fimbria S. Por otro lado, un estudio en São Paulo, Brasil en 2006, reporto que a partir de 100 cepas de *E. coli* aisladas de pacientes diagnosticados con ITU, el 11% de los aislados presentaba *sfa* que es un resultado bajo (Santo, et al., 2006). Alfuraiji, et al., 2022 en Bagdad, Irak, quienes trabajaron con 75 muestras de UPEC aisladas de orina provenientes de pacientes pediátricos, reportaron la fimbria S en un 53.3% de los aislados. A nivel nacional en estudio usando 108 aislados de *E.coli* de orina de mujeres diagnosticadas con ITU en la ciudad de México de determinaron genes de fimbrias S y F1C, reportando la presencia de *sfa/focDE*, *sfaS* y *focG* en el 74.1%, 1.9% y 2.8% de las cepas, respectivamente (López-Banda, et al., 2014).

La mayoría de los trabajos no reporta que genes amplifican en específico, sin embargo, mediante un análisis bioinformático de la secuencia de los oligonucleótidos reportados y de las cepas empleadas como control, se determinó que Alfuraiji, *et al.*, 2022 mediante PCR amplificó *sfaD* (proteína de función desconocida de la fimbria S), Khaleque, *et al.*, 2017 amplificó *sfaD*, y Santo, *et al.*, 2006 identificó *sfaD/focC* correspondiente a una proteína de función desconocida de la fimbria S y a la chaperona de la fimbria F1C, respectivamente. En los anteriores estudios se muestra la baja prevalencia de los genes pertenecientes al operón *sfa* cuando únicamente se detecta uno, no obstante, cuando se determina en conjunto con un gen del operón *foc* la prevalencia aumenta. Johnson *et al.*, 2000 trabajo con 75 cepas de urosepsis, en donde, reporto una mayor prevalencia de cepas *sfa/foc*-positivas (25%), en comparación con cepas *sfaS*-positivas (4%) y *focG*-positivas (19%). El gen del operón de la fimbria S mayormente buscado por PCR es *sfaD*, no obstante, hay estudios en donde se determina otro gen del operón, mayoritariamente no se reporta a que gen del operón en los estudios presentados, por lo que se sugiere hacer un consenso más detallado sobre que genes en específico se amplifican para determinar cuáles son las subunidades más prevalentes.

Por otro lado, en ninguna de nuestras cepas estudiadas amplificaron *focH* (adhesina de la fimbria F1C). Los datos obtenidos no coinciden con los reportados por Rahdar, *et al.*, 2015 en Irán, quienes a partir de 100 aislados de *E. coli* aisladas de pacientes adultos con pielonefritis o cistitis adquiridas en la comunidad, reportaron la presencia de *foc* en el 16% de los aislados. Así mismo, Ali, *et al.*, 2019 trabajaron con 155 cepas UPEC proveniente de ITU adquiridas en la comunidad, reportando 20 cepas positivas a *sfa/foc* (13%). En estos estudios no se especifica que gen (es) amplifican del operón *foc*, es por ello que en el presente estudio determinamos bioinformáticamente que Rahdar, *et al.*, 2015 amplificó *focHG* que corresponde a la adhesina y a una subunidad menor de la fimbria F1C. Mientras que Ali, *et al.*, 2019 utilizando los oligonucleótidos de Yun, *et al.*, 2014 amplificó los genes *sfaD/focC*.

Snyder, *et al.*, 2005 demostraron que cepas mutantes incapaces de expresar tanto fimbrias tipo 1 como fimbrias tipo P, producían otras fimbrias, en comparación con la cepa tipo salvaje CFT073 o UPEC76, como la fimbria F1C. Sus datos sugieren que la fimbria F1C representa un mecanismo compensatorio en respuesta a la incapacidad de expresar fimbrias de tipo 1 y P, ya que contribuyen a la colonización y persistencia de UPEC en el tracto urinario. No

obstante, las cepas del presente estudio, con base en los datos reportados por Ixtepan-Tejero, 2018, amplificaron por PCR los siguientes genes para CUF: *fimH* en el 98%, *papGIII* en el 1.96%, *papGII* en el 27.5% y *papA* en el 21.6% de los aislados, así como la adhesina no fimbrial: *iha* en el 45.1%. Estos genes están involucrados en la biogénesis de la fimbria tipo 1 y la fimbria P, estructuras que podrían estar mediando la interacción de la bacteria con el hospedero, por lo que la presencia de los genes codificadores de la fimbria F1C no son necesarios, ya que hay otros genes CUF que podrían desempeñar una función más importante al momento de la adhesión.

Una isla de patogenicidad (PAI) es una gran región genómica de alrededor de 10 y 200 kb que alberga genes relacionados con la patogenicidad. Se encuentran presentes en cepas patógenas, pero ausentes en los genomas de cepas no patógenas de la misma especie o de una especie estrechamente relacionada. Dentro de los FV que codifican se encuentran una gran variedad de adhesinas, exceptuando fimbrias conservadas como las fimbrias de tipo 1. En cepas ExPEC, se encuentran las fimbrias F1C y S (Desvaux, *et al.*, 2020; Yang, T., *et al.*, 2022). La nula identificación de las fimbrias S y F1C en este cepario, puede deberse al hecho de que sus operones codificadores se encuentran en la PAI-CFT073-*serX*, denominada así por su ácido ribonucleico de transferencia (ARNt) de inserción, ARNt serina-*serX*. Comprende un tamaño de 113 kb (Lloyd, *et al.*, 2007; Desvaux, *et al.*, 2020).

En contraparte con las adhesinas poliméricas, las adhesinas no fimbriales son estructuras monoméricas o triméricas cortas (Berne, *et al.*, 2015). En la PAI_{CFT073-III}, también denominada PAI_{CFT073-aspV} por su sitio de inserción que codifica para el ácido ribonucleico de transferencia de aspartato (ARNt-aspartato-*aspV*). En su secuencia se encuentra el operón *tos* que codifica TosA, adhesina no fimbrial perteneciente a la familia RTX (Lloyd, *et al.*, 2007; Desvaux, *et al.*, 2020).

Lloyd, *et al.*, en 2009 generó mutantes isogénicos tras la eliminación total o parcial de IG involucradas en la patogenicidad de la bacteria, con el fin de determinar su papel en la adherencia en el ratón CBA/J, modelo de ITU ascendente. La construcción de cuatro mutantes en diferentes regiones de la PAI_{CFT073-aspV} les permitió determinar un fenotipo de atenuación en comparación con la cepa tipo salvaje CFT073, encontrando que la eliminación del gen *c0363*, denominado *tosA*, presenta una colonización estadísticamente menor a nivel

de riñones y vejiga en comparación con la cepa de tipo salvaje, por otro lado, la eliminación de *cdiA* (toxina CdiA, perteneciente al sistema de inhibición del crecimiento dependiente del contacto celular) y *picU* (proteasa auto transportadora) disminuye la colonización solo a nivel de vejiga. Resultando genes que brindan una ventaja adaptativa a la cepa para adherirse a dichos tejidos. Por otro lado, Vigil, *et al.*, en 2011 determinaron que la presencia de *tosA* predice el éxito de la colonización del TU independientemente de la fuente clínica, ya que, tras inocular por vía transuretral la vejiga de ratones C57BL/6 hembra, por un lado, EFC5, aislado fecal de un voluntario humano sano, y por otro lado CFT073, aislado de pielonefritis humana, no se observaron diferencias respecto a los altos niveles de colonización tanto a nivel de vejiga como de riñón. Así mismo observaron que *tosA* puede servir como un marcador de cepas UPEC y de otros orígenes capaces colonizar el TU, independientemente de los FV que posea, reportando la cepa ECOR 58, positiva a *tosA* y obtenida a partir de un león, capaz de colonizar tanto la vejiga como los riñones en el modelo murino pese a que solo presentaba 3/15 genes estudiados, relacionados con la patogénesis en el TU: *fimA*, *picU* e *iroN*. Lo que se podría interpretar como la existencia de otros FV o mecanismos por los cuales pueda generarse una adherencia al TU.

En este estudio de las 51 cepas estudiadas, ninguna de las cepas amplificó *tosA*, gen que codifica una adhesina no fimbrial perteneciente a la familia RTX. Resultados que no concuerdan con lo reportado por Vigil, *et al.*, 2011, quienes trabajaron con 314 aislados de *E. coli* provenientes de muestras fecales, ABU, cistitis y pielonefritis no complicadas e ITU complicadas. Reportando 64 aislados positivos (20.4%) y 250 (79.6%) aislados negativos a *tosA*, en donde, las cepas positivas portaban un mayor número de otros genes de virulencia, promediando 11,2 de los 15 genes de adhesión, toxinas y receptores de hierro de membrana externa estudiados, tendencia que se observó independientemente del lugar de procedencia de las cepas, en tanto que los aislados *tosA*-negativos tenían una media de 5,4 genes. Caracterizándolo como un predictor de cepas altamente virulentas, así como un marcador del grupo filogenético B2. Por otro lado, Wojciuk, *et al.*, 2022 estudiaron con 38 cepas de UPEC aisladas de orina: 23 de huéspedes inmunocompetentes y 15 de receptores renales. Reportando *fimH*, *csgA*, *flu* (denominado posteriormente Ag43), *papC* y *tosA* en el 97.4%, 94.8%, 43.5%, 28.2% y 20.5% de las cepas, respectivamente.

En México, Luna-Pineda, *et al.*, 2018 reportó que de 178 cepas UPEC de pacientes pediátricos solo 19 (10.7%) presentaban el gen que codifica la adhesina no fimbrial TosA, dichas cepas pertenecientes al filogrupo B1 (8 cepas, 42.1%) y B2 (6 cepas, 31.5 %). Ellos reportan que la presencia de *tosA* está asociada a cepas que portan un número inusualmente alto de genes de virulencia y adaptación, y suponen que la adquisición de dicho gen por cepas del filogrupo B1 (consideradas *E. coli* comensales junto con el filogrupo A) se llevó a cabo mediante la transferencia horizontal de genes (Luna-Pineda, *et al.*, 2018). Adicionalmente, se ha reportado que *tosA* se encuentra en la PAI-_{aspV} presente en CFT073 (Desvaux, *et al.*, 2020). Xicohtencatl-Cortes, *et al.*, 2019 estudiaron 300 cepas clínicas UPEC de pacientes pediátricos con ITU complicadas, reportando 55 cepas positivas a *tosA* (18.3%), encontrándose principalmente en los filogrupos B2 con un 63,63% (35 cepas), y D con un 25.45% (14 cepas). Además, determinaron el perfil de adherencia de las cepas *tosA*⁺ en células de vejiga humana HTB-9, encontrando adherencia alta en el 47.3%, moderada en el 41.8% y baja solo en el 10.9% de las cepas. Por otro lado, produjeron la proteína TosA recombinante, la cual, reacciona con anticuerpos procedentes del suero de pacientes con infección urinaria, mientras que los anticuerpos policlonales anti-TosA recombinante detectaron la expresión de TosA en estas cepas.

TosA pertenece a las proteínas RTX (repeticiones en toxina), quienes se caracterizan por presentar secuencias repetidas (generalmente nanopéptido), indispensables para la unión a iones de calcio (Ca²⁺). Estos dominios RTX, están involucrados en la secreción y el plegado de las proteínas de quienes los poseen, en un medio con baja concentración de calcio los dominios se desdoblán y se vuelven a plegar cuando la concentración aumenta (Benz, 2020). La nula identificación de *tosA* en cepas UPEC aisladas de mujeres adultas podría deberse a que, en comparación con los pacientes pediátricos, la secreción de calcio en orina es menor, dicho ion es de suma importancia para que adquiera su conformación funcional. Hay diversos factores, como la dieta, la actividad física, la raza y la edad que influyen en la excreción urinaria de calcio. Matos, *et al.*, 1997, analizo muestras de orina de 410 personas (bebés, niños y adolescentes) de entre 1 mes a 17 años de edad, en este estudio determinaron que el percentil 95 la relación calcio/creatinina (Ca/Cr) disminuyó progresivamente de 2.2 hasta alcanzar un valor a 0,7 mol/mol a los 8 años de edad.

Hay pocos reportes sobre la identificación de *tosA* en cepas UPEC tanto a nivel internacional como nacional, pese a que se ha demostrado su importancia en la colonización del TU en modelo murino, así como la capacidad de generar anticuerpos contra la proteína TosA recombinante. En México solo se ha reportado su identificación en UPEC provenientes de pacientes pediátricos, por lo que resultaría interesante identificar dicha proteína en el cepario de UPEC proveniente de pacientes pediátricos, perteneciente al LBME.

Cortez-de la Puente se encuentra actualmente trabajando con la secuencia del genoma completo de 9 cepas diferentes del LBME: 5 cepas aisladas de adultos, 1 cepa de mujer embarazada y 3 de pediátricos. Mediante SnapGene se realizó la búsqueda de la subunidad de la fimbria F1C (*focH*) y de la fimbria S (*sfaC*), así como la adhesina no fimbrias TosA (*tosA*). Encontrando 4 cepas positivas: 3 provenientes de pediátricos (124N, 129N y CR135) y 1 proveniente de adulto (CR149). Se encontró que las cuatro cepas presentaban *tosA*. Así mismo, la cepa 124N positiva a *sfaC* y *focH*; 129N positiva a *focH*; CR135 positiva a *focH*; y CR149 positiva a *sfaC*. Dichos resultados se corroboraron mediante PCR, obteniendo las bandas deseadas. Las cepas 124N y 129N fueron parcialmente caracterizadas por Ibarra-Valencia, 2015, quien determinó que son positivas a los genes de adhesión: *fimH*, *iha* y *papGII*; daño celular: *vatA*, *vatP* y *satA*; captación de hierro: *iucD*; movilidad: *fliC*. No obstante, la cepa 124N también fue positiva a *papGIII*. Cabe destacar que ambas cepas pertenecen al filogruppo B2. Por otro lado, las cepas CR135 y CR149 fueron estudiadas por Pérez-Ama, 2018, quien determinó que ambas eran positivas a los genes de adhesión: *fimH* y *iha*; daño celular: *vat* y *sat*; y captación de hierro: *iucD*. La cepa CR135 también fue positiva a *hlyA*, mientras que la cepa CR149 fue positiva a *cnf*. Con base en este análisis, se logra observar que en cepas provenientes de pacientes pediátricos es más probable que presente *tosA*, ya que de las 9 cepas analizadas solo cuatro presentaron el gen, siendo 3 provenientes de pacientes pediátricos. Además, resulta interesante ver la presencia de *sfaC* y *focH* en las cepas, pese a la presencia de genes involucrados en la biogénesis de la fimbria 1 en todas, y de la fimbria P en las cepas 124N y 129N.

El estudio de Johnson, *et al.*, 2003 describen con base a su virulencia intrínseca que si una cepa de *E. coli* presenta ≥ 2 de estos FV: *pap*, *sfa/foc*, *afa/dra*, *iuc/iut* y *kpsMTII*, puede clasificarse como una ExPEC. Por otro lado, Spurbeck, *et al.*, 2012 con base en datos

epidemiológicos, describieron 4 genes codificadores de FV altamente relacionados con el potencial uropatógeno, cepas UPEC: *chuA*, *fyuA*, *vat* e *yfcV* (Johnson, *et al.*, 2003; Spurbeck, *et al.*, 2012; Valiatti, *et al.*, 2020). Los resultados de este estudio arrojan la ausencia de genes del operón *foc* y *sfa* en el cepario *E. coli* de mujeres usados en este estudio, no obstante, resultaría interesante determinar por PCR la presencia de los genes faltantes del esquema de Johnson, *et al.*, 2003: *afa/dra*, *iuc/iut* y *kpsMTII*, esto con el fin de probar su eficiencia para determinar cepas ExPEC, grupo al que pertenecen las UPEC, así mismo, determinar los genes propuestos por Spurbeck, *et al.*, 2012 para ver su prevalencia en cepas UPEC aisladas de mujeres mexicanas y determinar la eficacia de este método de diagnóstico.

Hernández-Castillo, 2023 realizó genómica comparativa *in silico*, primero analizó 5 genomas de *E. coli* (1 *E. coli* comensal, 1 DEC y 3 ExPEC), en donde, identifiqué 83 posibles genes que permitirían la identificación de UPEC. Por otro lado, analizo 6 genomas ExPEC (2 UPEC, 1 APEC, 1 NMEC y 2 SEPEC), identificando 14 posibles marcadores genéticos para la identificación de UPEC. En ambos análisis se encuentra: *focH* (subunidad de la proteína fimbrial F1C), *tosA* (adhesina no fimbrial), *focG* (subunidad menor de la fimbria F1C), entre otros. En este trabajo realizamos la búsqueda de los genes *focH*, *sfaC* y *tosA* en 51 cepas UPEC, sin embargo, no se obtuvo amplificación. Sugiriendo que estos genes no son marcadores genéticos de UPEC, o no al menos, en cepas de mujeres mexicanas. La nula amplificación de estas subunidades fimbriales y la adhesina no fimbrial puede asociarse a la ausencia total o parcial de sus PAIs (PAI-CFT073-serX y PAI_{CFT073-aspV}) en el genoma de las cepas estudiadas. En el laboratorio, Cortez-de la Puente, 2020, identifiqué en las cepas de estudio la PAI-I_{CFT073} (PAI-CFT073-*pheV*), PAI-II_{CFT073} (PAI-CFT073-*pheU*), PAI-I_{J96} y PAI-II_{J96} en el 39%, 33%, 4% y 0% de las cepas, en donde, el 22% de las cepas poseían dos PAIs y solo el 2% presentaba 3 PAIs. Estas PAIs son características del patotipo UPEC, por lo que la presencia de una o más nos permite estimar su potencial de urovirulencia. La escisión y la integración de PAIs en el genoma de una ExPEC o DEC esta mediada por las integrasas codificadas por la misma. Dicho proceso está sujeto a las condiciones en las que se encuentre el microorganismo, ya que generalmente se adquieren mediante la transferencia horizontal, debido a que la mayoría no contienen un origen de replicación y no son capaces de movilizarse por sí mismas. La estabilización de estos elementos genéticos móviles se da cuando le brinda una ventaja a la bacteria receptora, lográndose mediante la pérdida selectiva

de las funciones de transferencia o movilización codificadas por estos elementos (Desvaux, *et al.*, 2020). Se propone en un futuro estudio hacer la identificación de PAI-CFT073^{-serX} y PAI_{CFT073-aspV} en el cepario, ya que, pese a que no se encuentran los genes *focH*, *sfaC* y *tosA*, hay estudios que reportan la delección de estas PAIs con frecuencias que oscilan entre 5×10^{-3} y 1×10^{-6} (Desvaux, *et al.*, 2020). Es por ello que podría presentar la PAI, aunque sea incompleta.

El estudio de adherencia en presencia de manosa en células HeLa realizado por Barrientos-Mejorada Angélica, demostró que pese a la saturación de la fimbria tipo 1, cuyo receptor son residuos de manosa, se presentaba adherencia en un menor número de cepas pasando del 71.4% sin manosa (5/7 cepas) al 57.1% con manosa (4/7 cepas). Del primer grupo la adherencia se presentó del 43% a 0.5% y del segundo grupo del 30% a 5% respectivamente. En este estudio se buscaron tres genes pertenecientes a operones que codifican a otras adhesinas (*focH*, *sfaC* y *tosA*), cuyo receptor es diferente a manosa (sialil-galactósido para la fimbria S y galactosil-ceramida para la fimbria F1C). La ausencia de dichos genes sugiere que el operón de biogénesis para la fimbria S y F1C, así como de la adhesina no fimbrial TosA, no existe o se encuentra incompleto, por lo que no podrían desempeñar un papel en la adhesión de estas cepas. Sugiriendo la presencia de otras fimbrias que estén desempeñando un papel en este proceso.

La mayoría de los genes involucrados en la virulencia de *E. coli* se localizan en elementos genéticos móviles que pueden transferirse, permitiendo la mezcla de patotipos y el surgimiento de patotipos híbridos. Santos, *et al*, 2020 define un patotipo *heteropatógeno* de *E. coli* como aquella que presenta genes específicos de virulencia de dos o más patotipos DEC. Por otro lado, define una cepa *híbrida patógena* como aquella que posee FV de ambos patotipos (DEC y ExPEC) o como aquella que se aísla de una infección extraintestinal y presenta FV definitorios de algún patotipo DEC.

En los últimos años se han reportado cepas de *E. coli* tanto *heteropatógenas* como *patógenas híbridas* (Mariani-Kurkdjian, *et al*, 2020; Valiatti, *et al*, 2020). Esto ha recobrado mucha importancia debido a que son consideradas cepas hipervirulentas que pueden causar procesos infecciosos más severos. Estudios recientes han identificado cepas ExPEC que promueven

infecciones intestinales seguidas de infecciones del torrente sanguíneo (Kessler, *et al*, 2020; Mariani-Kurkdjian, *et al*, 2020; Valiatti, *et al*, 2020).

Los patotipos EHEC y EPEC generan lesiones A/E por medio de los factores codificados dentro de la PAI-LEE (Bhatt, *et al.*, 2016; Hua, *et al.*, 2018). La región central de las PAI-LEE de EHEC y EPEC presentan una homología a nivel de secuencia del 93.9%. En EPEC comprende un tamaño de 35,526 pb, mientras que en EHEC es de 43,263 pb, debiéndose esta diferencia a la inserción en EHEC del profago críptico 933L río abajo de LEE4, representando 13 ORF adicionales (Müller, D., *et al.*, 2009; Furniss, R. C. D., *et al.*, 2017). En el operón policistrónico LEE4 se localiza *espF*, gen que codifica una proteína efectora dependiente del SST3 exclusiva de los patógenos A/E (EPEC, EHEC y *Citrobacter rodentium*). Se dirige a las mitocondrias y al nucléolo del huésped. Altera las uniones estrechas, inhibe la fagocitosis, induce la desaparición de las microvellosidades en las células epiteliales intestinales, reordena el citoesqueleto, genera disfunción mitocondrial y apoptosis (Hua, *et al.*, 2018).

Los alineamientos de las secuencias de *espF* de EPEC y EHEC arrojan un 87% de homología, mientras que en el caso de *C. rodentium* hay una similitud del 67% con respecto a EPEC y un 65% con la de EHEC. En EPEC *espF* comprende 621 pb, mientras que en EHEC es de 747 pb (Hua, *et al.*, 2018).

En muchos estudios, la identificación de PAI-LEE por PCR en EHEC y EPEC se realiza amplificando un gen perteneciente a esta región, generalmente *eae* (codifica para intimina), no obstante, no permite diferenciar a un patotipo del otro, ya que los amplicones para ambos patotipos es similar. Por lo que, para diferenciar a EHEC de EPEC se necesita amplificar la toxina Shiga. Es por ello que en este estudio tomando en cuenta las diferencias de tamaño a nivel de nucleótidos y a la inserción del profago 933L, río debajo de LEE4 en EHEC, se diseñaron oligonucleótidos que permitieran diferenciar entre la PAI-LEE de EHEC y EPEC con base al tamaño del amplicón que se obtuviera, 687 pb para EPEC y 770 pb para EHEC. Se obtuvo la amplificación de *espF* para EHEC en 8 cepas, no obstante, no se obtuvo la amplificación de los genes que codifican la subunidad A de la toxina Shiga 1 y 2, *stx1A* y *stx2A* respectivamente, reportados frecuentemente en cepas EHEC de origen humano. Es por ello que se consideraron cepas híbridas UPEC con PAI-LEE similar a EHEC, debido a que los

oligonucleótidos diseñados no se alinean en otros segmentos del genoma de los patotipos EHEC y EPEC, así mismo, no se alinean con genomas de otros patotipo (UPEC, EAEC, ETEC, NMEC). Es por ello, que se propone determinar la presencia de otros genes que codifiquen la toxina Shiga.

Se han reportado cepas híbridas UPEC/EPEC, entre ellos Tanabe, *et al.*, 2020 quienes trabajaron con 112 cepas UPEC de pacientes ambulatorios, mediante PCR determinaron la presencia de cinco cepas híbridas: una UPEC/aEPEC, positiva a *eae*, y cuatro UPEC/EAEC, positivas a *aggR* y *aatA*, cepas obtenidas de cuatro pacientes diagnosticados con cistitis y uno de pielonefritis. En Brasil, Nascimento, *et al.*, 2022, evaluaron 172 aislamientos de *E. coli* provenientes de pacientes ambulatorios con diferentes tipos de ITU, reportando tres cepas patógenas híbridas: dos cepas UPEC/aEPEC, positivas a *eae* y negativas a *bfpB*, y una UPEC/EAEC, positiva a *aggR*.

En territorio mexicano Rodríguez-García, *et al.*, 2024 evaluaron 52 cepas aisladas de pacientes con diagnóstico de infección crónica de vías urinarias, determinaron que 30 (57.39%) de las cepas evaluadas presentaban al menos uno de los genes asociados a DEC. En las ITU persistente 12 (52.17%) cepas fueron híbridas (UPEC/DEC); 3 positivas a *bfpA*, 5 a *eaeA*, 4 a *ltA*, 5 a *stA* y 3 a *ipaH*, por otro lado, los casos de recurrentes fueron 18 (62.07%) cepas UPEC/DEC; 6 amplificaron *stx2*, 1 *bfpA*, 6 *eaeA*, 8 *ltA*, 2 *ipaH* y 5 *aggR*. Ballesteros-Monrreal, *et al.*, 2024 estudiaron 40 cepas UPEC provenientes de pacientes que presentaban síntomas de ITU, reportando *bfpA* en el 80% de estos aislados, pCVD432 en el 30%, *daaE* en el 20% y *eaeA* en el 5%. Este estudio indico la presencia de cepas 16 híbridas en la población mexicana con ITU: 1 UPEC/EAEC/DAEC/EPEC, 3 UPEC/DAEC/EPEC, 5 UPEC/EAEC/EPEC y 7 UPEC/EPEC. Además, identificaron sus patrones de adherencia: ladrillo (85%), localizado (55%), agregativo (20%) y difuso (15%), reportando que sólo ocho (40%) de los aislados presentaban un único patrón de adherencia, mientras que doce (60%) presentaban patrones de adherencia mixtos asociados a diferentes patotipos de *E. coli*. Ortega-Enríquez, 2024, trabajo con 40 cepas de *E. coli* aisladas de heces provenientes de portadores sanos, les determino por PCR la presencia de los genes más frecuentes asociados a virulencia de UPEC: adhesinas (*fimH*, *papGII*, *papA* y *papGIII*), toxinas (*satA*, *satP*, *hlyA*, *cnf-1*, *vatP* y *vatA*), evasión de la respuesta inmune (*traT* y *fliC*) y sistema de captación de

hierro (*fyuA*, *iucD* y *iha*). Encontrando 9 cepas híbridas: 6 cepas aEPEC/UPEC (positivas a *eae*), 1 cepa aEPEC/ETEC/UPEC (positivas a *eae* y toxina LT), 1 cepa aEPEC/DAEC/UPEC (positivas a *eae* y *daaE*) y 1 cepa ETEC/UPEC (toxina LT).

La identificación de la PAI-LEE en cepas UPEC es relativamente alta, siendo el patotipo híbrido UPEC/EPEC uno de los más comunes (Nascimento, *et al.* 2022; Rodríguez-García, *et al.*, 2024; Ballesteros-Monrreal, *et al.*, 2024). Valiatti, *et al.*, 2020 trabajaron con la cepa UPEC-252, una *E. coli* aislada de ITU y portadora del gen *eae* característico de EPEC y EHEC. Bioinformáticamente determinaron que presentaba la PAI-LEE completa, presentando identidades que oscilaban entre el 93 % y el 99 % con cepas de EPEC y EHEC. Por inmunotransferencia se confirmó la expresión de intimina y EspB, demostrando que es funcional, se traduce. Se determinó que es capaz de adherirse a células epiteliales urinarias (T24 y HEK 293T) e intestinales (Caco-2 y LS174T). Así mismo, determinaron que en células HeLa genera lesiones A/E. Estos autores nos demuestran que una cepa UPEC puede presentar en su genoma una PAI-LEE funcional, la cual, podría contribuir al establecimiento o agravamiento de una ITU. Además, se puede observar su capacidad no solo para adherirse a células intestinales sino también a uroteliales (Valiatti, *et al.*, 2020).

En este estudio también se identificó la presencia de dos cepas híbridas UPEC/aEAEC, debido a la amplificación de *aaiG* en la cepa 109 y la cepa 169. Coincidiendo con lo reportado por Domingos, *et al.*, 2022 en São Paulo, Brasil, quienes analizaron 40 cepas UPEC aisladas de la orina de pacientes femeninas pediátricas, reportando tres cepas positivas (una cepa de un paciente con trato urinario normal, una de un paciente con tracto urinario anormal y una de un paciente con pielonefritis) para *aaiG* y *aaiA*, y tres cepas derivadas de pacientes con tracto urinario anormal positivas a *aggR*. Lara, *et al.*, 2017 en Brasil aislaron 258 cepas de *E. coli*, 3 cepas por cada muestra, de 86 casos de infecciones extraintestinales. Por PCR detectaron marcadores de virulencia de EAEC: *aatA*, *aggR* y *aapA*. Reportando 3 de los 86 casos estudiados (3,4%) positivos a *aatA* y *aggR*, representando el 3,4% (9/258), además, presentaban los genes de UPEC: *fyuA* y *pap*, por lo que se catalogaron como cepas híbridas EAEC/UPEC, se recuperaron de dos casos de ITU y de un caso de bacteriemia. Ortega-Enríquez, 2024, trabajo con 40 cepas aisladas de orina de mujeres que cursaban con una ITU, reporto que 14 de ellas (35%) presentaban genes característicos de cepas DEC: 6 cepas

UPEC/EAEC (positivas a *aggR*, 42%), 5 cepas UPEC/EAEC/ETEC (positivas a *aggR*, LT y/o ST, 35%), 1 cepa UPEC/aEAEC/EPEC (positivas a *aaiG* y *bfpA*, 7%), 1 cepa UPEC/ETEC (positiva a LT y/o ST, 7%) y 1 cepa a UPEC/aEAEC (positiva a *aaiG*, 7%).

La mayoría de los estudios presentados en este trabajo, donde se identifica el patotipo híbrido UPEC/EAEC se realiza mediante la identificación de *aggR*. Un regulador transcripcional que desempeña un papel central en la modulación de la adherencia de la cepa EAEC 042, además, es un regulador global de los genes de virulencia de EAEC tanto a nivel cromosómico como plasmídico. No obstante, solo está presente únicamente en aquellas cepas que presentan el plásmido pAA, denominadas EAEC típicas (tEAEC), dejando de lado las cepas EAEC atípicas (aEAEC).

La tEAEC es considerada más virulenta y con mayores probabilidades de causar diarrea en comparación con la aEAEC. Las cepas tEAEC son más frecuentes, no obstante, ha habido reportes de brotes importantes causadas por aEAEC (Guerrieri, *et al.*, 2019). Es por ello que en este estudio se identificó *aggR* y *aaiG*, tomando en cuenta lo reportado por Andrade, *et al.*, 2014 quienes determinaron que la PCR cuádruplex de los genes plasmídicos considerados marcadores fiables de EAEC típicas, *aggR* (regulador transcripcional) y *aatA* (proteína transportadora de dispersina), y los genes cromosómicos *aaiA* y *aaiG* (codifican componentes del SST6), permite la identificación de EAEC tanto típica como atípica, ya que presenta una sensibilidad del 94,8 % y una especificidad del 94,3 %. Este estudio demuestra que la detección solo de los genes transmitidos por plásmido pasa por alto cepas EAEC atípicas. Así mismo, Dias, *et al.*, 2020 trabajaron con 220 aislados de EAEC analizaron 25 genes de virulencia que codifican adhesinas, toxinas, proteasas secretadas y SST6. Encontrando que los genes que codifican para la dispersina (*aap*), el T6SS (*aaiA*, *aaiC* y *aaiG*) y otros cinco factores de virulencia putativos (*orf3*, *aar*, *air*, *capU* y *shf*) se presentaban en cepas EAEC típicas y atípicas. Encontrando en el 69.5% de los aislados EAEC los genes que codifican el SST6.

9. Conclusión

Se estudiaron 51 cepas UPEC provenientes de mujeres que cursaron con ITU, provenientes del ISSSTEP, cuyo rango de edad era de 21 a 86 años. Se les realizó extracción de su material genómico por lisis alcalina y de sus plásmidos por Quick-Prep. Mediante PCR se hizo la identificación de genes involucrados en la biogénesis de fimbrias fimbriales: *focH* (adhesina de la fimbria F1C) y *sfaC* (), y la adhesina no fimbrial *tosA*. Además, estos genes se buscaron en contigs de 9 cepas secuencias. Por otro lado, se realizó la identificación por PCR de genes característicos de cepas DEC: EPEC (*bfpA* y *espF*); EHEC (*stx1A*, *stx2A* y *espF*); ETEC (*ltA* y *eltB*); y EAEC (*aggR* y *aaiG*). Se encontró una nula amplificación de los genes de adhesinas en el cepario del ISSSTEP, no obstante, en cuatro de las cepas secuenciadas se encontró la presencia de estos genes: *tosA* en el 100% (4/4 cepas), *sfaC* en el 75% (3/4 cepas) y *focH* en el 50% (2/4 cepas). En donde, dos de las cepas positivas a *tosA* provenían de pacientes pediátricos. Así mismo, se encontró la presencia de 11 cepas positivas a genes DEC: 2 amplificaron *aaiG* (componente del T6SS-3) y 8 amplificaron *espF* para el patotipo EHEC.

La ausencia de los genes involucrados en la biogénesis de las adhesinas F1C, S y TosA analizados en este estudio, podría deberse a que no tienen una participación de suma importancia en la adherencia de estas cepas, debido a la presencia de genes que codifican otras adhesinas. Además, estos tres genes se encuentran en PAIs por lo que su baja prevalencia podría también asociarse a su baja transferencia en la zona. No obstante, mediante la búsqueda bioinformática en las cepas secuenciadas se encontraron dos cepas provenientes de neonatos positivas a *tosA*, *sfaC* y solo una positiva a *focH*. Lo cual podría asociarse a que en neonatos hay mayor excreción de iones de calcio en orina, indisponible para que TosA adquiera su conformación funcional. Además, la fimbria S se ha reportado en cepas NEMEC, debido a su papel de suma importancia en la adherencia a las meninges. Por lo que, en pacientes pediátricos estas adhesinas podrían desempeñar un papel más importante en la adherencia, en comparación con las cepas aisladas de mujeres adultas.

En este estudio se reportaron 2 cepas híbridas UPEC/aEAEC y 8 cepas UPEC positivas a PAI-_{LEE} del patotipo EHEC. Los genes DEC encontrados en las cepas UPEC, se encuentran en PAIs por lo que su adquisición se debió a la transferencia horizontal de genes. Tomando en cuenta que el tracto gastrointestinal es un reservorio de cepas UPEC y cepas DEC, pudo haberse dado una interacción que le permitió a dichas cepas adquirir los genes estudiados. En nuestro país ha habido reportes de patotipos híbridos, por lo que debería de implementarse protocolos para su identificación, ya que, estas cepas se han asociado con infecciones más graves.

10. Perspectivas

- Determinar si las cepas positivas a *espF* presentan por completo la PAI_{LEE}.
- Identificar en las cepas *espF*⁺ si hay otros subtipos de toxina Shiga.
- Determinar patotipos híbridos en el cepario de varones del ISSSTEP.
- Identificar por PCR si las cepas UPEC aisladas de pacientes pediátricos que cursaron una ITU del LBME presentan *tosA*, *sfaC* y *focH*.
- Identificación de PAI-CFT073_{-serX} y PAI_{CFT073-aspV} en el cepario.
- Purificar y secuenciar los amplicones de cepas positivas a *espF* para determinar mutaciones y homología con las secuencias de referencia/control.
- Determinar los genes faltantes del esquema de Spurbeck, *et al.*, 2012: *chuA*, *fyuA* e *yfcV*.
- Determinar los genes faltantes del esquema de Johnson, *et al.*, 2003: *afa/dra*, *iuc/iut* y *kpsMTII*

11. Referencias

- Abe, C. M., Salvador, F. A., Falsetti, I. N., Vieira, M. A., Blanco, J., Blanco, J. E., Blanco, M., Machado, A. M., Elias, W. P., Hernandez, R. T., & Gomes, T. A. (2008). Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) strains may carry virulence properties of diarrhoeagenic *E. coli*. *FEMS immunology and medical microbiology*, 52(3), 397–406. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2008.00388.x>
- Alfurajji, N., Al-Hamami, A., Ibrahim, M., Rajab, H. K., & Hussain, B. W. (2022). Uropathogenic *Escherichia coli* virulence characteristics and antimicrobial resistance amongst pediatric urinary tract infections. *Journal of medicine and life*, 15(5), 650–654. <https://doi.org/10.25122/jml-2021-0148>
- Andrade, F. B., Gomes, T. A. T., & Elias, W. P. (2014). A sensitive and specific molecular tool for detection of both typical and atypical enteroaggregative *Escherichia coli*. *Journal of microbiological methods*, 106, 16–18. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.07.030>
- Andrade, F. B., Gomes, T. A. T., & Elias, W. P. (2014). A sensitive and specific molecular tool for detection of both typical and atypical enteroaggregative *Escherichia coli*. *Journal of microbiological methods*, 106, 16–18. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.07.030>
- Ballesteros-Monrreal, M. G., Mendez-Pfeiffer, P., Ortíz, B., Bolado-Martínez, E., Álvarez-Ainza, M. L., Enciso-Martínez, Y., Arenas-Hernández, M. M. P., Diaz-Murrieta, B., Barrios-Villa, E., & Valencia, D. (2024). Uropathogenic *E. coli* and Hybrid Pathotypes in Mexican Women with Urinary Tract Infections: A Comprehensive Molecular and Phenotypic Overview. *Current issues in molecular biology*, 46(6), 5909–5928. <https://doi.org/10.3390/cimb46060353>
- Behzadi P. (2020). Classical chaperone-usher (CU) adhesive fimbriome: uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) and urinary tract infections (UTIs). *Folia microbiologica*, 65(1), 45–65. <https://doi.org/10.1007/s12223-019-00719-x>
- Benz R. (2016). Channel formation by RTX-toxins of pathogenic bacteria: Basis of their biological activity. *Biochimica et biophysica acta*, 1858(3), 526–537. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.10.025>
- Benz R. (2020). RTX-Toxins. *Toxins*, 12(6), 359. <https://doi.org/10.3390/toxins12060359>

- Berne, C., Ducret, A., Hardy, G. G., & Brun, Y. V. (2015). Adhesins Involved in Attachment to Abiotic Surfaces by Gram-Negative Bacteria. *Microbiology spectrum*, 3(4), 10.1128/microbiolspec.MB-0018-2015. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MB-0018-2015>
- Biran, D., & Ron, E. Z. (2018). Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*. *Current topics in microbiology and immunology*, 416, 149–161. https://doi.org/10.1007/82_2018_108
- Clermont, O., Christenson, J. K., Denamur, E., & Gordon, D. M. (2013). The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylogroups. *Environmental microbiology reports*, 5(1), 58–65. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12019>
- Cortez de la Puente, I. M. Estudio de la virulencia y características de transferencia de material genético en cepas de *E. coli* aislada de infección de tracto urinario. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
- Croxen, MA, Law, RJ, Scholz, R., Keeney, KM, Wlodarska, M. y Finlay, BB (2013). Avances recientes en la comprensión de la *Escherichia coli* patógena entérica. *Revisión de microbiología clínica*, 26 (4), 822–880. <https://doi.org/10.1128/CMR.00022-13>
- Daniel, A., Singh, A., Crowther, L. J., Fernandes, P. J., Schreiber, W., & Donnenberg, M. S. (2006). Interaction and localization studies of enteropathogenic *Escherichia coli* type IV bundle-forming pilus outer membrane components. *Microbiology (Reading, England)*, 152(Pt 8), 2405–2420. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28860-0>
- Denamur, E., Clermont, O., Bonacorsi, S. y Gordon, D. (2021). La genética de poblaciones de *Escherichia coli* patógena. *Reseñas de la naturaleza. Microbiología*, 19 (1), 37–54. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0416-x>
- Desvaux, M., Dalmasso, G., Beyrouthy, R., Barnich, N., Delmas, J., & Bonnet, R. (2020). Pathogenicity Factors of Genomic Islands in Intestinal and Extraintestinal *Escherichia coli*. *Frontiers in microbiology*, 11, 2065. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.02065>
- Dias, R. C. B., Tanabe, R. H. S., Vieira, M. A., Cergole-Novella, M. C., Dos Santos, L. F., Gomes, T. A. T., Elias, W. P., & Hernandez, R. T. (2020). Analysis of the Virulence Profile and Phenotypic Features of Typical and Atypical Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) Isolated From Diarrheal Patients in Brazil. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 10, 144. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00144>

- Dielubanza, E. J., & Schaeffer, A. J. (2011). Urinary Tract Infections in Women. *Medical Clinics of North America*, 95(1), 27–41. doi:10.1016/j.mcna.2010.08.023
- Flores-Mireles, A. L., Walker, J. N., Caparon, M., & Hultgren, S. J. (2015). Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nature reviews. Microbiology*, 13(5), 269–284. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3432>
- Flores-Mireles, A., Hreha, T. N., & Hunstad, D. A. (2019). Pathophysiology, Treatment, and Prevention of Catheter-Associated Urinary Tract Infection. *Topics in spinal cord injury rehabilitation*, 25(3), 228–240. <https://doi.org/10.1310/sci2503-228>
- Foxman B. (2014). Urinary tract infection syndromes: occurrence, recurrence, bacteriology, risk factors, and disease burden. *Infectious disease clinics of North America*, 28(1), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2013.09.003>
- Sabih, A., & Leslie, S. W. (2024). Complicated Urinary Tract Infections. In StatPearls. StatPearls Publishing.
- Furniss, R. C. D., & Clements, A. (2017). Regulation of the Locus of Enterocyte Effacement in Attaching and Effacing Pathogens. *Journal of bacteriology*, 200(2), e00336-17. <https://doi.org/10.1128/JB.00336-17>
- Geerlings S. E. (2016). Clinical Presentations and Epidemiology of Urinary Tract Infections. *Microbiology spectrum*, 4(5), 10.1128/microbiolspec.UTI-0002-2012. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.UTI-0002-2012>
- Geurtsen, J., de Been, M., Weerdenburg, E., Zomer, A., McNally, A., & Poolman, J. (2022). Genomics and pathotypes of the many faces of *Escherichia coli*. *FEMS microbiology reviews*, 46(6), fuac031. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuac031>
- Ixtepan-Tejero, C. (2018). Características de virulencia, resistencia y transferencia del material genético en cepas de *E. coli* uropatógena. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
- Izquierdo-Vega, J. A., Castillo-Juarez, R. J., Sánchez-Gutiérrez, M., Ares, M. A., & De La Cruz, M. A. (2023). A Mini-Review of Enteroaggregative *Escherichia coli* with a Specific Target on the Virulence Factors Controlled by the AggR Master Regulator. *Polish journal of microbiology*, 72(4), 347–354. <https://doi.org/10.33073/pjm-2023-037>
- Izquierdo-Vega, J. A., Castillo-Juarez, R. J., Sánchez-Gutiérrez, M., Ares, M. A., & De La Cruz, M. A. (2023). A Mini-Review of Enteroaggregative *Escherichia coli* with a Specific Target on

- the Virulence Factors Controlled by the AggR Master Regulator. Polish journal of microbiology, 72(4), 347–354. <https://doi.org/10.33073/pjm-2023-037>
- Jesser, K. J., & Levy, K. (2020). Updates on defining and detecting diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes. Current opinion in infectious diseases, 33(5), 372–380. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000665>
- Joseph, A., Cointe, A., Mariani Kurkdjian, P., Rafat, C., & Hertig, A. (2020). Shiga Toxin-Associated Hemolytic Uremic Syndrome: A Narrative Review. Toxins, 12(2), 67. <https://doi.org/10.3390/toxins12020067>
- Joseph, A., Cointe, A., Mariani Kurkdjian, P., Rafat, C., & Hertig, A. (2020). Shiga Toxin-Associated Hemolytic Uremic Syndrome: A Narrative Review. Toxins, 12(2), 67. <https://doi.org/10.3390/toxins12020067>
- Kass EH. 1956. Infecciones asintomáticas del tracto urinario. Trans Assoc Am Physicians 69:56–64.
- Kaur, R., & Kaur, R. (2020). Symptoms, risk factors, diagnosis and treatment of urinary tract infections. Postgraduate Medical Journal, postgradmedj–2020–139090. doi:10.1136/postgradmedj-2020-139090
- Kessler, R., Nisa, S., Hazen, T. H., Horneman, A., Amoroso, A., Rasko, D. A., & Donnenberg, M. S. (2015). Diarrhea, bacteremia and multiorgan dysfunction due to an extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strain with enteropathogenic *E. coli* genes. Pathogens and disease, 73(8), ftv076. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftv076>
- Khaleque, M., Akter, S., Akhter, H., Khan, S. I., & Begum, A. (2017). Analysis of diarrheagenic potential of uropathogenic *Escherichia coli* isolates in Dhaka, Bangladesh. Journal of infection in developing countries, 11(6), 459–469. <https://doi.org/10.3855/jidc.8257>
- Lara, F. B., Nery, D. R., de Oliveira, P. M., Araujo, M. L., Carvalho, F. R., Messias-Silva, L. C., Ferreira, L. B., Faria-Junior, C., & Pereira, A. L. (2017). Virulence Markers and Phylogenetic Analysis of *Escherichia coli* Strains with Hybrid EAEC/UPEC Genotypes Recovered from Sporadic Cases of Extraintestinal Infections. Frontiers in microbiology, 8, 146. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00146>
- Ledwaba, S. E., Bolick, D. T., de Medeiros, P. H. Q. S., Kolling, G. L., Traore, A. N., Potgieter, N., Nataro, J. P., & Guerrant, R. L. (2022). Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) expressing a non-functional bundle-forming pili (BFP) also leads to increased growth failure

- and intestinal inflammation in C57BL/6 mice. *Brazilian journal of microbiology* : [publication of the Brazilian Society for Microbiology], 53(4), 1781–1787. <https://doi.org/10.1007/s42770-022-00802-5>
- Lloyd, A. L., Henderson, T. A., Vigil, P. D., & Mobley, H. L. (2009). Genomic islands of uropathogenic *Escherichia coli* contribute to virulence. *Journal of bacteriology*, 191(11), 3469–3481. <https://doi.org/10.1128/JB.01717-08>
- Lloyd, A. L., Rasko, D. A., & Mobley, H. L. (2007). Defining genomic islands and uropathogen-specific genes in uropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 189(9), 3532–3546. <https://doi.org/10.1128/JB.01744-06>
- López-Banda, D. A., Carrillo-Casas, E. M., Leyva-Leyva, M., Orozco-Hoyuela, G., Manjarrez-Hernández, Á. H., Arroyo-Escalante, S., ... & Hernández-Castro, R. (2014). Identification of virulence factors genes in *Escherichia coli* isolates from women with urinary tract infection in Mexico. *BioMed research international*, 2014.
- Mariani-Kurkdjian, P., Lemaître, C., Bidet, P., Perez, D., Boggini, L., Kwon, T., & Bonacorsi, S. (2014). Haemolytic-uraemic syndrome with bacteraemia caused by a new hybrid *Escherichia coli* pathotype. *New microbes and new infections*, 2(4), 127–131. <https://doi.org/10.1002/nmi2.49>
- Martinez de la Peña, C. F., De Masi, L., Nisa, S., Mulvey, G., Tong, J., Donnenberg, M. S., & Armstrong, G. D. (2015). BfpI, BfpJ, and BfpK Minor Pilins Are Important for the Function and Biogenesis of Bundle-Forming Pili Expressed by Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 198(5), 846–856. <https://doi.org/10.1128/JB.00818-15>
- Medina, M., & Castillo-Pino, E. (2019). An introduction to the epidemiology and burden of urinary tract infections. *Therapeutic advances in urology*, 11, 1756287219832172. <https://doi.org/10.1177/1756287219832172>
- Melton-Celsa A. R. (2014). Shiga Toxin (Stx) Classification, Structure, and Function. *Microbiology spectrum*, 2(4), 10.1128/microbiolspec.EHEC-0024-2013. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.EHEC-0024-2013>
- Méndez-Moreno, E., Caporal-Hernandez, L., Mendez-Pfeiffer, P. A., Enciso-Martinez, Y., De la Rosa López, R., Valencia, D., Arenas-Hernández, M. M. P., Ballesteros-Monrreal, M. G., & Barrios-Villa, E. (2022). Characterization of Diarrheagenic *Escherichia coli* Strains Isolated

- from Healthy Donors, including a Triple Hybrid Strain. *Antibiotics* (Basel, Switzerland), 11(7), 833. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11070833>
- Moazeni, S., Askari Badouei, M., Hashemitabar, G., Rezatofighi, S. E., & Mahmoodi, F. (2024). Detection and characterization of potentially hybrid enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) strains isolated from urinary tract infection. *Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 55(1), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s42770-023-01195-9>
- Morin, N., Santiago, A. E., Ernst, R. K., Guillot, S. J., & Nataro, J. P. (2013). Characterization of the AggR regulon in enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infection and immunity*, 81(1), 122–132. <https://doi.org/10.1128/IAI.00676-12>
- Moyo, SJ, Maselle, SY, Matee, MI, Langeland, N. y Mylvaganam, H. (2007). Identificación de *Escherichia coli* diarreógena aislada de bebés y niños en Dar es Salaam, Tanzania. *Enfermedades infecciosas de BMC* , 7 , 92. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-7-92>
- Müller, D., Benz, I., Liebchen, A., Gallitz, I., Karch, H., & Schmidt, M. A. (2009). Comparative analysis of the locus of enterocyte effacement and its flanking regions. *Infection and immunity*, 77(8), 3501–3513. <https://doi.org/10.1128/IAI.00090-09>
- Nascimento, J. A. S., Santos, F. F., Santos-Neto, J. F., Trovão, L. O., Valiatti, T. B., Pinaffi, I. C., Vieira, M. A. M., Silva, R. M., Falsetti, I. N., Santos, A. C. M., & Gomes, T. A. T. (2022). Molecular Epidemiology and Presence of Hybrid Pathogenic *Escherichia coli* among Isolates from Community-Acquired Urinary Tract Infection. *Microorganisms*, 10(2), 302. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020302>
- Navarro-Garcia, F., Ruiz-Perez, F., Cataldi, Á., & Larzábal, M. (2019). Type VI Secretion System in Pathogenic *Escherichia coli*: Structure, Role in Virulence, and Acquisition. *Frontiers in microbiology*, 10, 1965. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01965>
- Neugent, M. L., Hulyalkar, N. V., Nguyen, V. H., Zimmern, P. E., & De Nisco, N. J. (2020). Advances in Understanding the Human Urinary Microbiome and Its Potential Role in Urinary Tract Infection. *mBio*, 11(2), e00218-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.00218-20>
- Nuccio, S. P., & Bäumler, A. J. (2007). Evolution of the chaperone/usher assembly pathway: fimbrial classification goes Greek. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 71(4), 551–575. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00014-07>

- Nuccio, S. P., & Bäumlér, A. J. (2007). Evolution of the chaperone/usher assembly pathway: fimbrial classification goes Greek. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 71(4), 551–575. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00014-07>
- Olin, S. J., & Bartges, J. W. (2015). Urinary tract infections: treatment/comparative therapeutics. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*, 45(4), 721–746. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2015.02.005>
- Pakbin, B., Brück, W. M., & Rossen, J. W. A. (2021). Virulence Factors of Enteric Pathogenic *Escherichia coli*: A Review. *International journal of molecular sciences*, 22(18), 9922. <https://doi.org/10.3390/ijms22189922>
- Ramboarina, S., Fernandes, P. J., Daniell, S., Islam, S., Simpson, P., Frankel, G., Booy, F., Donnenberg, M. S., & Matthews, S. (2005). Structure of the bundle-forming pilus from enteropathogenic *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry*, 280(48), 40252–40260. <https://doi.org/10.1074/jbc.M508099200>
- Reitzer, L., & Zimmern, P. (2019). Rapid Growth and Metabolism of Uropathogenic *Escherichia coli* in Relation to Urine Composition. *Clinical microbiology reviews*, 33(1), e00101-19. <https://doi.org/10.1128/CMR.00101-19>
- Riley L. W. (2020). Distinguishing Pathovars from Nonpathovars: *Escherichia coli*. *Microbiology spectrum*, 8(4), 10.1128/microbiolspec.AME-0014-2020. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.AME-0014-2020>
- Rodríguez-García, J. A. (2024). Caracterización Fenotípica y Genotípica de *Escherichia coli*, para Evaluar el Impacto en Infección Crónica de Vías Urinarias. <https://repositorio.xoc.uam.mx/jspui/handle/123456789/46778>
- Rowe, T. A., & Juthani-Mehta, M. (2013). Urinary tract infection in older adults. *Aging health*, 9(5), 10.2217/ahe.13.38. <https://doi.org/10.2217/ahe.13.38>
- Santo, E., Macedo, C., & Marin, J. M. (2006). Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* from a university hospital in Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 48, 185-188.
- Santos, A. C. M., Santos, F. F., Silva, R. M., & Gomes, T. A. T. (2020). Diversity of Hybrid- and Hetero-Pathogenic *Escherichia coli* and Their Potential Implication in More Severe Diseases.

Frontiers in cellular and infection microbiology, 10, 339.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00339>

Sarowska, J., Futoma-Koloch, B., Jama-Kmiecik, A., Frej-Madrzak, M., Ksiazczyk, M., Bugla-Ploskonska, G., & Choroszy-Krol, I. (2019). Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from different sources: recent reports. *Gut pathogens*, 11, 10. <https://doi.org/10.1186/s13099-019-0290-0>

SINAVE/DGE/SALUD. Información epidemiológica de morbilidad. Anuario 2025, Versión ejecutiva; 2025. México, D.F.: Secretaría de Salud. Disponible en <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/986922/sem12.pdf>

Sokurenko E. (2016). Pathoadaptive Mutations in Uropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology spectrum*, 4(2), 10.1128/microbiolspec.UTI-0020-2015. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.UTI-0020-2015>

Sora, V. M., Meroni, G., Martino, P. A., Soggiu, A., Bonizzi, L., & Zecconi, A. (2021). Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*: Virulence Factors and Antibiotic Resistance. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 10(11), 1355. <https://doi.org/10.3390/pathogens10111355>

Stamey TA, Mihara G. 1980. Observations on the growth of urethral and vaginal bacteria in sterile urine. *J Urol* 124:461–463.

Storme O, Tirán Saucedo J, Garcia-Mora A, Dehesa-Dávila M, Naber KG. Risk factors and predisposing conditions for urinary tract infection. *Ther Adv Urol*. 2019 May 2;11:1756287218814382. doi: 10.1177/1756287218814382. PMID: 31105772; PMCID: PMC6502981.

Subashchandrabose, S., & Mobley, H. L. T. (2015). Virulence and Fitness Determinants of Uropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology spectrum*, 3(4), 10.1128/microbiolspec.UTI-0015-2012 <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.UTI-0015-2012>

Tamadonfar, K. O., Omattage, N. S., Spaulding, C. N., & Hultgren, S. J. (2019). Reaching the End of the Line: Urinary Tract Infections. *Microbiology spectrum*, 7(3), 10.1128/microbiolspec.BAI-0014-2019. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.BAI-0014-2019>

Tanabe, R. H. S., Dias, R. C. B., Orsi, H., de Lira, D. R. P., Vieira, M. A., Dos Santos, L. F., Ferreira, A. M., Rall, V. L. M., Mondelli, A. L., Gomes, T. A. T., Camargo, C. H., & Hernandez, R.

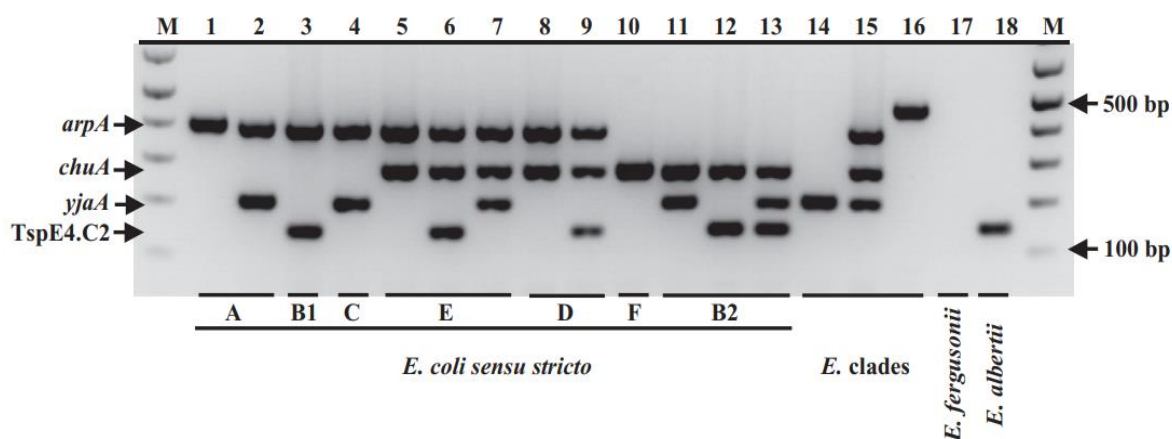
- T. (2022). Characterization of Uropathogenic *Escherichia coli* Reveals Hybrid Isolates of Uropathogenic and Diarrheagenic (UPEC/DEC) *E. coli*. *Microorganisms*, 10(3), 645. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10030645>
- Tonini da Rocha, D., De Oliveira Salle, F., Apellanis Borges, K., Quedi Furian, T., Pinheiro do Nascimento, V., Luiz de Souza Moraes, H., & Tadeu Pippi Salle, C. (2021). Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) and uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC): characterization and comparison. *Journal of infection in developing countries*, 15(7), 962–971. <https://doi.org/10.3855/jidc.14217>
- Valiatti, T. B., Santos, F. F., Santos, A. C. M., Nascimento, J. A. S., Silva, R. M., Carvalho, E., Sinigaglia, R., & Gomes, T. A. T. (2020). Genetic and Virulence Characteristics of a Hybrid Atypical Enteropathogenic and Uropathogenic *Escherichia coli* (aEPEC/UPEC) Strain. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 10, 492. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00492>
- Vazquez-Lopez, J., & Navarro-Garcia, F. (2020). In silico Analyses of Core Proteins and Putative Effector and Immunity Proteins for T6SS in Enterohemorrhagic *E. coli*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 10, 195. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00195>
- Werneburg, G. T., & Thanassi, D. G. (2018). Pili Assembled by the Chaperone/Usher Pathway in *Escherichia coli* and Salmonella. *EcoSal Plus*, 8(1), 10.1128/ecosalplus.ESP-0007-2017. <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0007-2017>
- Wojciuk, B., Majewska, K., Grygorcewicz, B., Krukowska, Ż., Kwiatkowska, E., Ciechanowski, K., & Dołęgowska, B. (2022). The role of uropathogenic *Escherichia coli* adhesive molecules in inflammatory response- comparative study on immunocompetent hosts and kidney recipients. *PloS one*, 17(5), e0268243. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0268243>
- Xicohtencatl-Cortes, J., Cruz-Córdova, A., Cázares-Domínguez, V., Escalona-Venegas, G., Zavala-Vega, S., Arellano-Galindo, J., Romo-Castillo, M., Hernández-Castro, R., Ochoa, S. A., & Luna-Pineda, V. M. (2019). Uropathogenic *Escherichia coli* strains harboring *tosA* gene were associated to high virulence genes and a multidrug-resistant profile. *Microbial pathogenesis*, 134, 103593. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103593>
- Zaffanello, M., Malerba, G., Cataldi, L., Antoniazzi, F., Franchini, M., Monti, E., & Fanos, V. (2010). Genetic risk for recurrent urinary tract infections in humans: a systematic review. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2010, 321082. <https://doi.org/10.1155/2010/321082>

Zav'yalov, V., Zavialov, A., Zav'yalova, G., & Korpela, T. (2010). Adhesive organelles of Gram-negative pathogens assembled with the classical chaperone/usher machinery: structure and function from a clinical standpoint. *FEMS microbiology reviews*, 34(3), 317–378. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00201.x>

12. Anexos

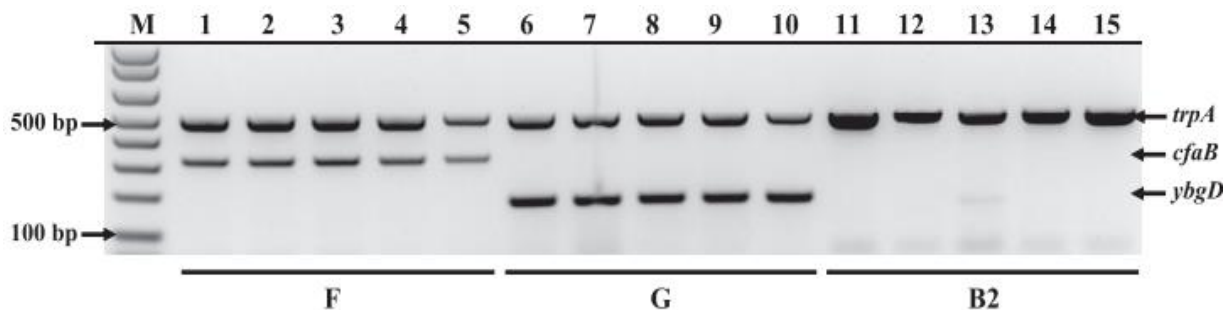
Determinación de filogrupos en cepas de *E. coli*

En el **Anexo 1** se muestra la PCR cuádruple empleada para identificar los filogrupos: A, B1, C, E, D, F, B2, caldo I y clado V, mientras que en el **Anexo 2** se muestran los genes empleados para identificar el filogrupos G y diferenciarlo del grupo F y B2.



Anexo 1. Perfiles de PCR cuádruple para la determinación de filogenética.

Se amplifica: *chuA* (receptor del grupo hemo/hemoglobina), *yjaA* (proteína inducida por estrés), *arpA* (control interno de la pureza del DNA) y TspE4.C2 (lipasa esterasa putativa). La presencia o ausencia determina el filogrupos al que pertenece la cepa (Clermont, et al., 2013).

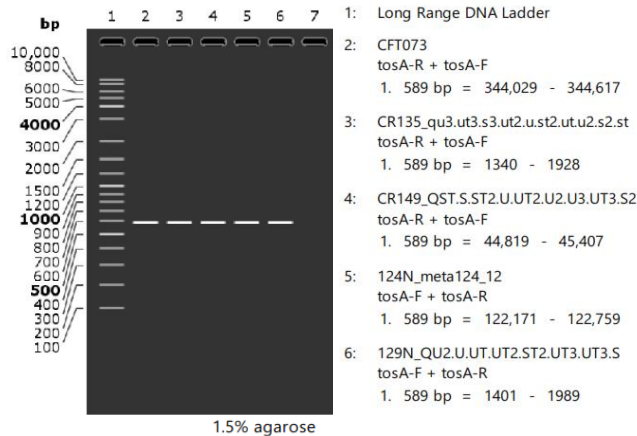


Anexo 2. Perfiles de PCR para la determinación/diferenciación del filogrupos F, G y B2.

Se amplifica: *ybgD* (proteína fimbrial putativa), *trpA* (subunidad alfa de la triptófano-sintasa) y *cfaB* (subunidad principal del antígeno del factor de colonización I (CFA/I)). Las cepas pertenecientes al filogrupos G amplifican *cfaB*, mientras que las del grupo G amplifican *ybgD*. La amplificación de *trpA* se empleó como control interno (Clermont, et al., 2019)

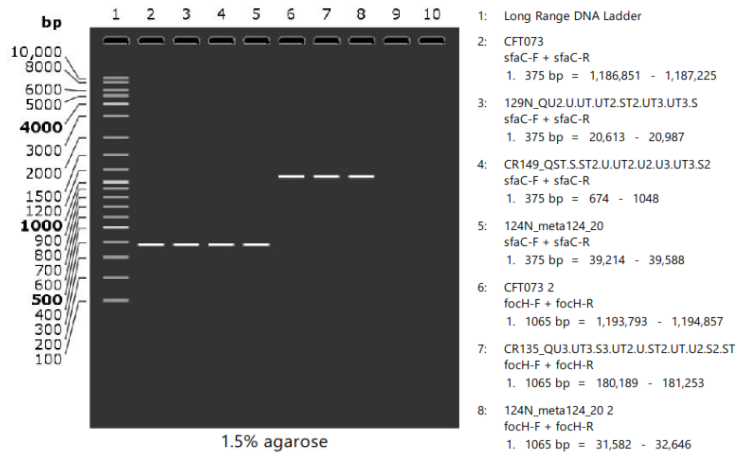
Simulación de PCR de las adhesinas mediante SnapGene en cepas secuenciadas

En el **Anexo 3** y **Anexo 4** se muestran la simulación del gel de agarosa empleando los contigs descritos en la **Tabla 19** y la cepa UPEC-CFT073 (control positivo a las adhesinas), para identificar *tosA*, *sfaC* y *focH*. Las bandas obtenidas coinciden con el tamaño deseado.



Anexo 3. Simulación de gel de agarosa para la identificación de *tosA* en SnapGene.

Carril 1, marcador de peso molecular Long Range DNA Ladder (Jena Bioscience); carril 2, control positivo a *tosA* (598 pb, CFT073); carril 3, cepa CR135; carril 4, cepa CR149; carril 5, 124N; carril 6, cepa 129N.



Anexo 4. Simulación de gel de agarosa para la identificación de *sfaC* y *focH* en SnapGene.

Carril 1, marcador de peso molecular Long Range DNA Ladder (Jena Bioscience); carril 2, control positivo a *sfaC* (375 pb, CFT073); carril 3, cepa 129N; carril 4, cepa CR149; carril 5, 124N; carril 6, control positivo a *focH* (1,065 pb, CFT073).

Alineamientos de RI +espF de EPEC-E2348/69 y EHEC-EDL933 con el cromosoma de *E. coli* de otros patotipo/categoría.

En el **Anexo 5** se muestran los resultados obtenidos del BLAST de RI + *espF* de EPEC-E2348/69 con genomas de *E. coli* de otras categorías y patotipos. Cinco de siete secuencias de cromosomas, presentaron alineamientos: EAEC-042 (dos alineamientos), DAEC-SK1155 (tres alineamientos), UPEC-CFT073 (un alineamiento), AIEC-LFB2 (un alineamiento) y NMEC-018 (un alineamiento). Las cepas AIEC-LF82 y NMEC-018 no presentaron alineamiento.

A Escherichia coli 042 complete genome

Sequence ID: [FN554766.1](#) Length: 5241977 Number of Matches: 2

Range 1: 3429016 to 3429383 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
364 bits(197)	1e-100	313/368(85%)	11/368(2%)	Plus/Minus
Query 313	CAACGCCACAGTCGGGCTAATCCACCACTCAATCGTGGTTCGAGTACTACACAC	372		
Sbjct 3429016	CAGCGCCACCTGCCGGCTAATCCACCACTCTGATCGAGGTTACAGTACTGCCATAC	3429075		
Query 373	GATTACCGGCTATACAGGAGCGGTTGGTCTGAAAACATCATGCCGCTAAAGGTAAC	432		
Sbjct 3429076	GATTACCGGCTATACAGGAGCAGTTGGTCTGAAAACATCAATGCTCGCTAAAGGTAAC	3429135		
Query 433	CGTTACGACACACCTCAATGAAAACTTAGTAAACCGTGAA---GA-A---TGA--	482		
Sbjct 3429136	TGTTACGACACACCTCGATGGAAAGCTTCTGGGAAACGCTGAAAATGAGAGCTGAGC	3429195		
Query 483	AACTATCGTTTTAATACCGGGATGAAGCCATCTAAGTAATACGGAATACATTGAGATT	542		
Sbjct 3429196	CACTATCGTTTTAATACCGGGATGAAGCCATCTCAGTAATACGGAATACATTGAGATT	3429255		
Query 543	TTCTCAACACATCAGCGCCGCACTCCGCTGGGGAATATCTCCCTAGTAGCCCTCA-G	601		
Sbjct 3429256	TTCTCAAAATGTCAGCGCTGTCCTCTGGGGAATATCTCCCGGAGCCCTCAGG	3429315		
Query 602	GAAAAATAAACAGATAACTGCGTAAAAAAAAAAGCAAAATGGTGGTCTCCGATTGCCA	661		
Sbjct 3429316	GAAAAATAATCATCAGATGGCTGCTTAAAAAAGCAAAATGGTAGTCTCCGATTGCCA	3429375		
Query 662	GATACCT 669			
Sbjct 3429376	GTACACCT 3429383			

B Escherichia coli strain SK1144 chromosome, complete genome

Sequence ID: [NZ_AP018784.2](#) Length: 5029297 Number of Matches: 3

Range 1: 862190 to 862554 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
364 bits(197)	1e-100	311/365(85%)	11/365(3%)	Plus/Minus
Query 316	CGCCACAGTCGGGCTAATCCACCACTCAATCGTGGTTCGAGTACTACACACGAT	375		
Sbjct 862554	CGCCACCTGCCGGCTAATCCACCACTCTGATCGAGGTTACAGTACTGCCATACGAT	862495		
Query 376	TACCGGCTATACAGGAGCGGTTGGTCTGAAAACATCATGCCGCTAAAGGTAACCGT	435		
Sbjct 862494	TACCGGCTATACAGGAGCAGTTGGTCTGAAAACATCAATGCTCGCTAAAGGTAACGT	862435		
Query 436	TACGACACACCTCAATGAAAACTTAGTAAACCGTGAA---GA-A---TGA--AAC	485		
Sbjct 862434	TACGACACCTCGATGGAAAGCTTCTGGGAAACGCTGAAAATGAGAGCTGAGCCAC	862375		
Query 486	TATCGTTTTAATACCGGGATGAAGCCATCTAAGTAATACGGAATACATTGAGATTTC	545		
Sbjct 862374	TATCGTTTTAATACCGGGATGAAGCCATCTCAGTAATACGGAATACATTGAGATTTC	862315		
Query 546	TACAACCATCAGCGCCGCACTCCGCTGGGGAATATCTCCCTAGTAGCCCTCAGG-AA	604		
Sbjct 862314	TACAATCGTCAGCGCTCACTCTGCTGGGGAATATCTCCCGGAGCCCTCAGGGAA	862255		
Query 605	AAATATAACAGATAACTGCGTAAAAAAAAAAGCAAAATGGTGGTCTCCGATTGCCAGTA	664		
Sbjct 862254	AAATATCATCAGATGGCTGCTTAAAAAAGCAAAATGGTAGTCTCCGATTGCCAGTA	862195		
Query 665	TACCT 669			
Sbjct 862194	CACCT 862190			

C Escherichia coli CFT073, complete sequence

Sequence ID: [NC_004431.1](#) Length: 5231428 Number of Matches: 1

Range 1: 3425890 to 3426254 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
353 bits(191)	2e-97	309/365(85%)	11/365(3%)	Plus/Minus
Query 316	CGCCACAGTCGGGCTAATCCACCACTCAATCGTGGTTCGAGTACTACACACGAT	375		
Sbjct 3426254	CGCCACCTGCCGGCTAATCCACCACTCTGATCGAGGTTACAGTACTGCCATACGAT	3426195		
Query 376	TACCGGCTATACAGGAGCGGTTGGTCTGAAAACATCATGCCGCTAAAGGTAACCGT	435		
Sbjct 3426194	TACCGGCTATACAGGAGCAGTTGGTCTGAAAACATCAATGCTCGCTAAAGGTAACGT	3426135		
Query 436	TACGACACACCTCAATGAAAACTTAGTAAACCGTGAA---GA-A---TGA--AAC	485		
Sbjct 3426134	TACGACACCTCGATGGAAAGCTTCTGGGAAACGCTGAAAATGAGAGCTGAGCCAC	3426075		
Query 486	TATCGTTTTAATACCGGGATGAAGCCATCTAAGTAATACGGAATACATTGAGATTTC	545		
Sbjct 3426074	TATCGTTTTAATACCGGGATGAAGCCATCTCAGTAATACGGAATACATTGAGATTTC	3426015		
Query 546	TACAACCATCAGCGCCGCACTCCGCTGGGGAATATCTCCCTAGTAGCCCTCAGG-AA	604		
Sbjct 3426014	TACAATCGTCAGCGCTCACTCTGCTGGGGAATATCTCCCGGAGCCCTCAGGGAA	3425955		
Query 605	AAATATAACAGATAACTGCGTAAAAAAAAAAGCAAAATGGTGGTCTCCGATTGCCAGTA	664		
Sbjct 3425954	AAATATCATCAGATGGCTGCTTAAAAAAGCAAAATGGTAGTCTCCGATTGCCAGTA	3425895		
Query 665	TACCT 669			
Sbjct 3425894	CACCT 3425890			

D Escherichia coli LF82, complete sequence

Sequence ID: [NC_011993.1](#) Length: 4773108 Number of Matches: 1

Range 1: 3885714 to 3885760 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
71.3 bits(38)	2e-12	44/47(94%)	0/47(0%)	Plus/Plus
Query 1	GCCAAAATGCCTCTCTGAACTCTCCGACGTAAACAAAACCCCTTC	47		
Sbjct 3885714	GCCAAAATGCCTCTCTGAACTCTCCGACGTCAACAACTCTTC	3885760		

E Escherichia coli strain O18 chromosome, complete genome

Sequence ID: [NZ_CP007275.1](#) Length: 5002781 Number of Matches: 1

Range 1: 3180627 to 3180673 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
71.3 bits(38)	3e-12	44/47(94%)	0/47(0%)	Strand Plus/Plus
Query 1	GCCAAAATGCCTCTCTGAACTCTCCGACGTAAACAAAACCCCTTC	47		
Sbjct 3180627	GCCAAAATGCCTCTCTGAACTCTCCGACGTCAACAACTCTTC	3180673		

Anexo 5. Resultados del BLAST de RI + *espF* de EPEC-E2348/69 con genomas de *E. coli* de otras categorías y patotipos.

A) Resultado del alineamiento con EAEC-042, dos alineamientos. B) Resultado del alineamiento con DAEC-SK1155, tres alineamientos. C) Resultado del alineamiento con UPEC-CFT073, un alineamiento. D) Resultado del alineamiento con AIEC-LFB2, un alineamiento. E) Resultado del alineamiento con NMEC-018, un alineamiento.

En el **Anexo 5** se muestran los resultados obtenidos del BLAST de RI + *espF* de EHEC-EDL933 con genomas de *E. coli* de otras categorías y patotipos. Tres de siete secuencias de

cromosomas, presentaron alineamientos: EAEC-042 (cuatro alineamientos), DAEC-SK1155 (tres alineamientos) y UPEC-CFT073 (dos alineamientos). Las cepas AIEC-LF82, AIEC-LFB2, NMEC-018 y NMEC-O18 no presentaron alineamiento.



Anexo 6. Resultados del BLAST de RI + *espF* de EHEC-EDL933 con genomas de *E. coli* de otras categorías y patotipos.

A) Resultado del alineamiento con EAEC-042, cuatro alineamientos. B) Resultado del alineamiento con DAEC-SK1155, tres alineamientos. C) Resultado del alineamiento con UPEC-CFT073, dos alineamientos.

Anexo 7. Características genóticas y perfil plasmídico del cepario de mujeres que cursaron con ITU provenientes del ISSSTEP

Filogrupos ²	Nombre de la cepa	Fimbrias chaperona-ayudador						Adhesinas no fimbriales		Sist. de captación de	Flagelo	Toxinas ¹						Patotipos DEC								No. de bandas plasmídicas ¹			
		<i>fimH</i> ¹	<i>papGII</i> ¹	<i>papGIII</i> ¹	<i>papA</i> ¹	<i>sfaC</i>	<i>focH</i>	<i>tosA</i>	<i>Iha</i> ¹			<i>iucD</i> ¹	<i>fliC</i> ¹	<i>satA</i>	<i>satP</i>	<i>VatA</i>	<i>vatP</i>	<i>hlyA</i>	<i>cnf</i>	EHEC			EAEC		EPEC		ETEC		
																				<i>espF</i>	<i>stx1A</i>	<i>stx2A</i>	<i>aggR</i>	<i>aaiG</i>	<i>espF</i>		<i>bfpA</i>	<i>eltB</i>	<i>stx1</i>
A	104	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	
	137	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	
	142	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	
	151	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
	165	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	
	166	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	
	171	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
	175	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
B1	146	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	
B2	107	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
	112	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	
	113	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	
	114	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
	119	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	

Constancias de cursos y sesiones



La Universidad Autónoma de Guerrero y el Instituto Nacional de Medicina Genómica otorgan la presente

CONSTANCIA

A:

Roberto Vélez García

por haber aprobado el curso en línea
Introducción a la Medicina Genómica
realizado del 3 de abril al 19 de mayo con una duración de 20 horas.

Ciudad de México a 19 de mayo de 2023.



Lic. David G. Vallejo Escameilla
Director de Enseñanza e Investigación
INMEGEN

Dr. I. Javier Castiello Roachi
Director General de Educación
Medio Superior e Superior, UAGro

Dra. Berenice Huello Aguiar
Coordinadora General de Planeación e
Investigación, UAGro

Dr. Oscar del Moral Hernández
Director de la Facultad
de Ciencias Químico-Biológicas,
UAGro



La Universidad Autónoma de Guerrero y el Instituto Nacional de Medicina Genómica otorgan la presente

CONSTANCIA

A:

Roberto Vélez García

por haber aprobado el curso en línea
Habilidades Básicas en Linux Vol. 1
realizado del 17 de abril al 22 de mayo con una duración de 22 horas.

Ciudad de México a 22 de mayo de 2023.



Lic. David G. Vallejo Escameilla
Director de Enseñanza e Investigación
INMEGEN

Dr. I. Javier Castiello Roachi
Director General de Educación
Medio Superior e Superior, UAGro

Dra. Berenice Huello Aguiar
Coordinadora General de Planeación e
Investigación, UAGro

Dr. Alfredo Morales Carballa
Director de la Facultad
de Matemáticas, UAGro



La Universidad Autónoma de Guerrero y el Instituto Nacional de Medicina Genómica otorgan la presente

CONSTANCIA

A

Roberto Vélez García

por haber aprobado el curso en línea
Escribe, edita y revisa un artículo científico
realizado del 24 de mayo al 20 de junio con una duración de 20 horas.

Ciudad de México a 28 de junio de 2023.



Leda Ana L. Escobedo Razo
Subdirectora de Gestión Académica
INMEGEN

Dr. I. Javier Castiello Roachi
Director General de Educación
Medio Superior e Superior, UAGro

Dra. Berenice Huello Aguiar
Coordinadora General de Planeación e
Investigación, UAGro

Dr. Oscar del Moral Hernández
Director de la Facultad
de Ciencias Químico-Biológicas,
UAGro





BUAP

WE23-0223

La Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

A través de la Dirección General de Bibliotecas

otorga la presente:

CONSTANCIA

A:

Roberto Vélez García

Por asistir a nuestra sesión "*Estrategias para recuperar información relevante para tus investigaciones y trabajos académicos con el Descubridor BUAP*" el día 29 de junio de 2023, impartido por *Cristina García Peña, Senior Training Specialist EBSCO* y que forma parte de los *Webinars especializados en Sistemas de Información en Línea*, con una duración de **90 minutos**.

"Pensar bien, para vivir mejor"

Heroica Puebla de Zaragoza, a 29 de junio de 2023

Mtro. Alfredo Avendaño Arenaza
Director General de Bibliotecas de la
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla



EL GRUPO DE ACADÉMICOS DE PUEBLA S.C.

Otorga la presente

Constancia

A:

ROBERTO VÉLEZ GARCÍA

POR SU ASISTENCIA AL CURSO-TALLER TITULADO:

"BIOINFORMÁTICA: DE LOS NUCLEÓTIDOS A LAS PROTEÍNAS"

Sesión virtual (Valor curricular: 2 horas)

Heroica Puebla de Zaragoza, a 31 de julio de 2020

D.C. Marcos Flores Encarnación
Por el Comité Académico
GAP

Participación en Haciendo Ciencia



"HUP, 50 años de enseñanza y salud"

Id: BUAP-VIEP-HCBUAP22/31-38/22

Folio: 949

A QUIEN CORRESPONDA:

El que suscribe **Dr. Arturo Fernández Téllez**, Director General de Divulgación Científica de la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado, de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, hace constar que

Roberto Vélez García

Participó con el proyecto de investigación: "Determinación de un nuevo factor de virulencia de *Escherichia coli* uropatógena involucrado en pielonefritis.", bajo la asesoría de la **D.C Margarita María de la Paz Arenas Hernández**, en el Programa **Haciendo Ciencia en la BUAP 2022**, mismo que se llevó a cabo del 01 de agosto al 23 de septiembre de 2022.

Se extiende la presente en la Heroica Puebla de Zaragoza a los veintiséis días del mes de septiembre del año dos mil veintidós.

Atentamente

"Pensar Bien, para Vivir Mejor"

Dr. Arturo Fernández Téllez



Vicerrectoría de Investigación y
Estudios de Posgrado

Torre de Gestión Académica y
Servicios Administrativos, Piso 6
Avenida Central, Ciudad Universitaria
Puebla, Pue. C.P. 72570
Teléfono: 229 65 00 Ext. 5726, 5431



Participación en el 6to Congreso Nacional de Ciencias Bioquímicas



“El saber de mis hijos
hará mi grande”

Universidad de Sonora
Facultad Interdisciplinaria de Ciencias Biológicas y de Salud
Departamento de Ciencias Químico Biológicas y Agropecuarias
otorga la presente

CONSTANCIA

a

Vélez-García Roberto, Margarita Ma. de la Paz Arenas Hernández

por haber participado en la presentación del trabajo en la modalidad de cartel “Determinación de Patotipos Híbridos y Subunidades Fimbriales en UPEC Aislada de Mujeres con ITU ” durante el **6to Congreso Nacional de Ciencias Bioquímicas 2024 y XXVII Semana del Químico, realizado en la Universidad de Sonora campus Caborca, del 27 al 29 de noviembre de 2024.**



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS
QUÍMICO BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
UNIVERSIDAD DE SONORA
CAMPUS CABORCA

D.E.V.
Dra. Dora Edith Valencia Rivera
Jefa del Departamento de Ciencias
Químico Biológicas y Agropecuarias

M.L.R.G.
Mariann Lizeth Rojo García
Presidenta del Comité de Alumnos

H.T.M.
Dr. Heriberto Torres Moreno
Presidente del Comité Organizador

H. Caborca, Sonora. Noviembre de 2024



Universidad de Sonora