



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



INSTITUTO DE CIENCIAS

CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS

POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA

**“Estudio de la virulencia y características de
transferencia de material genético en cepas de
E. coli aislada de infección de tracto urinario”**

TESIS

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)
CON OPCIÓN EN: MICROBIOLOGÍA MÉDICA**

PRESENTA:

Q.B.P. Isabel Montserrat Cortez de la Puente

ASESOR DE TESIS:

D.C. Margarita María de la Paz Arenas Hernández



Oficio No. PM/036/2020

Asunto: *Asignación de Comité Revisor de Tesis*

Isabel Montserrat Cortez de la Puente
Estudiante de Maestría en Ciencias (Microbiología)
CICM-ICUAP
Presente.

Por este conducto se le informa que se ha designado la Comisión revisora de Tesis para su trabajo titulado "Estudio de la virulencia y características de transferencia de material genético en cepas de *E. coli* aislada de infección de tracto urinario", la Comisión estará integrada por:

- D.C. Beatriz Eugenia Baca
- D.C. Patricia Lozano Zarain
- D.C. Rosa del Carmen Rocha Gracia
- D.C. Claudia F. Martínez de la Peña

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

Sin más que agregar, me despido afectuosamente de usted.

Atentamente:
"Pensar Bien Para Vivir Mejor"
H. Puebla de Z., a 20 de octubre 2020.

D.C. Miguel Castañeda Lucio
Coordinador
Posgrado en Microbiología
CICM-ICUAP



c.c.p. Archivo



Puebla, Pue. a 12 de noviembre 2020

A LA ACADEMIA DEL POSGRADO
EN MICROBIOLOGÍA
CICM-ICUAP
P R E S E N T E.

Por este conducto los abajo firmantes, integrantes del Comité revisor de Tesis de Maestría de la alumna **Isabel Montserrat Cortez de la Puente**, les informamos que hemos revisado el escrito titulado:

"Estudio de la virulencia y características de transferencia de material genético en cepas de *E. coli* aislada de infección de tracto urinario"

A nuestro juicio, la alumna **Isabel Montserrat Cortez de la Puente** puede proceder a la digitalización de la tesis y a la presentación del examen de grado correspondiente.

Sin más que agregar, nos despedimos afectuosamente de ustedes.

Atentamente,
"Pensar Bien Para Vivir Mejor"




D.C. Beatriz Eugenia Baca


D.C. Patricia Lozano Zarain


D.C. Rosa del Carmen Rocha Gracia


D.C. Claudia F. Martinez de la Peña

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico que me otorgó durante el desarrollo de este proyecto con el número de becaria 911787.

Al Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por las facilidades prestadas durante el desarrollo de esta Tesis.

Al laboratorio de Biología Molecular de Enteropatógenos del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas por permitirme ser parte de su equipo de trabajo y desarrollarme como profesionista.

A la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado por el apoyo otorgado para la conclusión de esta tesis.

A la D.C. Margarita María de la Paz Arenas Hernández por la oportunidad de integrarme a su equipo de trabajo, por sus consejos y siempre creer en mí.

A la D.C. Claudia Fabiola Martínez de la Peña por los consejos y recomendaciones que me hizo durante los avances del proyecto.

Al hospital regional I.S.S.S.T.E. de Puebla y a la Q.F.B. Lupita por la donación de las cepas.

Al Laboratorio de Enfermedades Nosocomiales y de la Comunidad del CICM, ICUAP por la donación de las cepas usadas como control positivo para algunas PCRs.

A mi comité tutorial, las Doctoras: Rosa del Carmen Rocha, Patricia Lozano y Beatriz E. Baca por sus valiosos consejos, paciencia y aportaciones a esta tesis.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mi mami quien ha sido el mayor apoyo en mi vida, por guiarme y ayudarme a formar a la persona que soy ahora.

A mi padre Ángel por esas conversaciones interminables sobre la vida y siempre hacerme creer en mí.

A mi hermano por sus palabras de aliento, consejos y apoyo incondicional.

A mi Moy por su apoyo incondicional, por prepararme mi lunch y siempre estar a mi lado.

A Giselle (Chis) por su paciencia, amor y apoyo incondicional aún en mis momentos de estrés.

A Elsy por su guía, sus consejos y regaños cuando empecé en este proyecto.

A Nancy por ser también una mentora y ayudarme siempre.

A Daniel y Denisse por su guía y consejos en nuestro día a día en el laboratorio.

A mis compañeros de médica, por esas charlas y apoyo mutuo.

A cada uno de los chicos de servicio que me apoyaron en lo experimental y que con ello aportaron a este trabajo.

A la Dra. Guillermina Vences Velázquez por darme las palabras de aliento y creer en mí aún en la distancia.

A mis mejores amigas Edith y Adriana por su apoyo y palabras de aliento, por estar conmigo aunque estemos lejos.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	I
ÍNDICE DE TABLAS.....	I
ABREVIATURAS.....	III
RESUMEN	III
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. <i>Escherichia coli</i> Uropatógena.....	2
1.2. Factores de virulencia y patogenicidad	2
1.2.1. Pili tipo I	3
1.2.2. Toxinas	4
1.2.3. Sideróforos	5
1.2.4. Islas de patogenicidad	5
1.2.5. Mecanismo de infección	6
1.3. Filogenia.....	8
1.4. Plásmidos bacterianos como medio de diseminación de resistencia	8
1.5. Transferencia de material genético	9
1.5.1. Conjugación bacteriana	9
1.5.2. Transformación bacteriana	10
1.5.3. Transducción bacteriana.....	11
2. ANTECEDENTES DIRECTOS.....	11
3. JUSTIFICACIÓN	16
4. OBJETIVO GENERAL	17
5. OBJETIVOS PARTICULARES.....	17
6. ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO.....	18
7. MATERIAL Y MÉTODOS.....	19

7.2.	Extracción de ADN.....	19
7.3.	Material biológico	19
7.4.	Condiciones de la mezcla de reacción para las PCRs	21
7.5.	Determinación de grupos filogenéticos	21
7.6.	Determinación de Islas de Patogenicidad	22
7.7.	Determinación del serotipo.....	23
7.8.	Amplificación del gen <i>fimH</i>	23
7.9.	Búsqueda de las variantes alélicas de <i>fimH</i>	24
7.10.	Determinación de genes <i>traT</i> y <i>mobQ</i>	24
7.11.	Conjugación bacteriana.....	25
7.11.1.	Conjugación en fase líquida	25
7.11.2.	Conjugación en fase sólida	26
7.12.	Determinación de genes de virulencia	26
7.13.	Determinación de perfiles de susceptibilidad antibiótica	28
7.14.	Amplificación de genes codificantes de Beta-lactamasas	29
7.15.	Condiciones éticas	30
8.	RESULTADOS.....	31
8.1.	Población estudiada	31
8.2.	Determinación de grupo filogenético	31
8.3.	Detección de Islas de Patogenicidad (PAI's).....	38
8.4.	Serotipo de las cepas de UPEC	40
8.5.	Determinación alélica de <i>fimH</i>	46
8.6.	Determinación de genes de transferencia genética. <i>mobQ</i> y <i>traT</i>	51
8.7.	Transferencia de material genético por conjugación	52
8.8.	Perfil de resistencia de cepas transconjugantes	56

8.9. Características de virulencia de las cepas transconjugantes	58
8.10. Genotipificación de resistencia de las cepas transconjugantes.....	59
9. DISCUSIÓN	61
10. CONCLUSIONES	69
11. PERSPECTIVAS	70
12. REFERENCIAS.....	71
13. ANEXOS.....	87
13.1. Oligonucleótidos para la amplificación de <i>fimH</i>	87
13.2. Detección de alelos de <i>fimH</i>	88

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Factores de virulencia de UPEC	3
Figura 2. Patogénesis de la infección del tracto urinario causada por UPEC.....	7
Figura 3. Gel representativo de la PCR Cuádruplex	22
Figura 4. Distribución de los antibióticos analizados en la placa de MüellerHinton29	
Figura 5. Determinación de Grupos Filogenéticos PCR Cuádruplex.....	31
Figura 6. Grupos filogenéticos, 51 cepas de <i>E. coli</i> provenientes de pacientes femeninas con ITU del Hospital regional I.S.S.S.T.E de Puebla	32
Figura 7. Determinación de las Islas de Patogenicidad de CFT073 y J96..	38
Figura 8. Islas de Patogenicidad presentes en cepas de <i>E. coli</i> de pacientes femeninas con ITU (n=51).....	39
Figura 9. Serotipificación de cepas de UPEC aisladas de mujeres con ITU	40
Figura 10. Variación alélica de <i>fimH</i> de cepas de <i>E. coli</i> aisladas de mujeres con ITU.....	46
Figura 11. Determinación de genes asociados a la transferencia genética.....	51
Figura 12. Detección de genes asociados a la transferencia genética de <i>E. coli</i> aislada de 51 cepas de pacientes femeninas con ITU	52
Figura 10. Perfil de resistencia de las cepas donadoras y sus transconjugantes..	57
Figura 14. Determinación de genes de virulencia de transconjugantes por PCR..	58
Figura 15. Cepas transconjugantes que adquirieron factores de virulencia.	59
Figura 16. Cepas transconjugantes que adquirieron genes codificantes de BLEEs	60
Figura 18. Alineamiento de los oligonucleótidos para la amplificación del gen <i>fimH</i>	87

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características generales del cepario de estudio.	19
Tabla 2. Cepas control positivas utilizadas en este estudio.	20
Tabla 3. Cepas control positivas donadas por el Laboratorio de Infecciones Hospitalarias y de la Comunidad.....	20

Tabla 4. Componentes generales de las PCR's realizadas en este estudio.	21
Tabla 5. Oligonucleotidos utilizados en la determinación de PAIs	23
Tabla 6. Oligonucleotidos utilizados en la amplificación de <i>fimH</i>	23
Tabla 7. Oligonucleotidos utilizados en la determinación de genes de movilidad genética.....	24
Tabla 8. Diluciones bacterianas seriadas para los ensayos de conjugación.	25
Tabla 9. Factores de virulencia buscados en las PCR´s múltiples.	27
Tabla 10. Oligonucleotidos utilizados en la determinación de beta-lactamasas.	30
Tabla 11. Características de virulencia y resistencia a los antibióticos por grupos filogenéticos de las cepas de <i>E. coli</i> aisladas de pacientes femeninas con ITU del Hospital regional I.S.S.S.T.E de Puebla (n=51).	30
Tabla 12. Relación entre los factores de virulencia y las PAIs encontradas.....	39
Tabla 13. Características de virulencia de las cepas tipificables y no tipificables.	40
Tabla 14. Variación alélica de <i>fimH</i> y sus características.....	47
Tabla 15. Características de las cepas de <i>E. coli</i> AMP ^R aisladas de ITU usadas como cepas donadoras en el proceso de conjugación.	52
Tabla 16. Frecuencia de conjugación en fase líquida.	55
Tabla 17. Frecuencia de conjugación en fase sólida.....	55
Tabla 18. Búsqueda de alelos de <i>fimH</i>	88

ABREVIATURAS

AMC	Amoxicilina/ácido clavulánico	GM HlyA	Gentamicina Alfa hemolisina
AMK	Amikacina	ITU	Infección del tracto urinario
AMP	Ampicilina		Levofloxacin
AN	Ácido nalidixico	LVX	Multidrogo resistente
ATM	Aztreonam	MDR	Nitrofurantoína
BLEE	Betalactamasas de espectro extendido	NF NET	Netilmicina
C	Cloranfenicol	NMDR	No multidrogo resistente
CF	Cefalotina		Norfloxacin
CFX	Cefuroxima	NOR	Ofloxacin
CFZ	Ceftazidima	OFX	Pili asociado a pielonefritis
CIP	Ciprofloxacina	pap	Pandrogo resistente
CL	Colistina		Rifampicina
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria	MDR Rf	Toxina autotransportadora secreta
CNF-1	Factor de necrosis citotóxico	Sat	Tetraciclina
COL	Colistina		Trimetoprim/sulfametoxazol
CRO	Ceftriaxona	TC	<i>E. coli</i> uropatógena
CTX	Cefotaxima	TSX	Toxina autotransportadora vacuolizante
ETP	Ertapenem		Extremadamente resistente
FEP	Cefepime	UPEC	
FimH	Adhesina del Pili tipo IV		
FliC	Adhesina flagelar del pili tipo I		
FOS	Fosfomicina	XDR	
FV	Factor de virulencia		

RESUMEN

E. coli uropatógena (UPEC) se caracteriza por ser una clase diversa de *E. coli* debido a que posee características genómicas únicas adquiridas a través de la transferencia horizontal de genes, principalmente a través de conjugación, que le ha permitido desarrollar múltiples estrategias para colonizar el tracto urinario. El objetivo del presente trabajo fue determinar las características de virulencia presentes en cepas de *E. coli* aisladas de procesos urinarios, por medio de la determinación de perfiles de resistencia, la presencia de los principales genes de virulencia, su relación filogenética y su capacidad para transferir genes de virulencia y/o resistencia. En el presente estudio se analizaron 51 cepas de UPEC aisladas de pacientes femeninos con ITU del Hospital Regional I.S.S.S.T.E. de Puebla, colectadas en el periodo de Junio-2015 a Febrero-2016. Se realizó la determinación del perfil de sensibilidad (Kirby-Baüer), del grupo filogenético (Clermont, 2013), conjugación (Poey, 2018), amplificación de genes de virulencia, resistencia a los antimicrobianos y genes de movilidad plasmídica (PCR), de PAI's (Sabate, 2006), y determinación de las variantes del gen *fimH* (PCR y secuenciación). Los resultados obtenidos fueron que el 39% pertenecen al filogrupo B2, seguido del filogrupo D (19%) y los filogramos A y C (16%). Se detectaron 3 PAI's: PAI I_{CFT073} (39%), PAI II_{CFT073} (33%) y PAI II_{J96} (4%). El serogrupo predominante fue el serogrupo O25:H4 (22%), seguido por las cepas no tipificables (16%). Se encontró que alelo del gen *fimH* con mayor presencia fue el alelo *fimH54* (25%) y el alelo *fimH30* se encontró en baja presencia (17%), seguido por *fimH29* (11%). El 53% presentó el gen *traT* y las secuencias el 2% MOB_{Q11}, el 12% MOB_{Q12} y el 8% MOB_{Qu}. Asimismo, 5 de las 10 cepas seleccionadas fueron conjugativas, obteniendo 10 transconjugantes que adquirieron resistencia a gentamicina; ampicilina, cefalotina, amoxicilina con ac. clavulámico, cefuroxima y ciprofloxacino, ceftriaxona, ceftazidima, cefotaxima, cefepime, ac. nalidixico, norfloxacina, ofloxacina, tetraciclina, cloranfenicol; y genes de virulencia como *iha* (100%), *iucD* (83%) y *satP* (71%); y los genes de resistencia *bla_{CTX-M}* (80%) y *bla_{TEM}* (40%). En conclusión los resultados del presente trabajo muestran que los los grupos filogenéticos no presentan factores de virulencia y resistencia específicos. Además, la presencia de serotipos y alelos de *fimH* asociado a cepas diarregénicas sugiere la presencia de patotipos híbridos. Asimismo, nuestros resultados de conjugación bacteriana suman evidencia su importancia en la diseminación de resistencia en cepas clínicas.

Palabras claves: UPEC, resistencia, PAI, filogramos, serogramos, conjugación.

1. INTRODUCCIÓN

Las infecciones del trato urinario (ITU) son de las infecciones bacterianas más comunes. Se calcula que afectan a 1500 millones de personas cada año en el mundo, representando entre el 10 y el 20% de las infecciones presentes en las comunidades que requieren atención médica primaria, y entre el 30 y 40% de las infecciones de atención hospitalaria, siendo un factor de riesgo para el desarrollo de carcinoma de células renales y cáncer de vejiga (Nielubowicz & Mobley, 2010; Flores-Mireles, 2015; Stefaniuk, 2016). Las mujeres presentan un riesgo 14 veces mayor que los varones de contraer una ITU. Se estima que entre el 40 y el 50% de las mujeres y el 5% de los hombres desarrollarán una infección urinaria en su vida y aproximadamente el 30% de estas mujeres tendrán ITU recurrentes (Totsika, 2012; Robinson, 2015; Albert, 2004).

Clínicamente, las ITUs se clasifican como complicadas y no complicadas, las infecciones complicadas se definen como infecciones asociadas a factores que comprometen el tracto urinario o la defensa del huésped, incluyendo en estas la obstrucción urinaria, la retención urinaria causada por enfermedades neurológicas, inmunosupresiones, fallo renal, embarazo y la presencia de cuerpos extraños como los cálculos. Las ITUs no complicadas se dividen en bajas y altas, las infecciones bajas incluyen uretritis, cistitis y prostatitis; y las ITUs altas son principalmente la pielonefritis (Flores-Mireles *et. al.*, 2015; Koves y Wullt, 2016). Dado que las ITUs son muy comunes, principalmente en mujeres, es importante el uso controlado de antibióticos para el tratamiento.

Las ITUs suelen ser causadas por microorganismos del tubo digestivo del propio paciente predominando los bacilos Gramnegativos como *E. coli*, el agente causal más frecuente en las ITUs es uno de los microorganismos más comunes en la microbiota intestinal pero, además, es capaz de causar enfermedades extraintestinales como las ITUs por lo que recibe el nombre de *E. coli* uropatógena (UPEC) siendo uno de los principales agentes etiológicos de las ITUs (Koga *et. al.*, 2014; Torres, 2006).

1.1. *Escherichia coli* Uropatógena

Escherichia coli es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, mide aproximadamente 1.1–1.5 por 2.0–6.0 μM . Fue descubierta en 1885 por Theodor Escherich nombrada inicialmente como *Bacterium coli* renombrada en 1911 como *Escherichia coli* en honor a su descubridor. Taxonómicamente pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* y, serológicamente, se pueden diferenciar en función de tres antígenos principales de la superficie celular: el O (somático), H (flagelar) y Antígenos K (capsulares). Se han descrito al menos 167 antígenos O, 53 antígenos H y 74 antígenos K han sido descritos. La caracterización de los antígenos O y H es suficiente para identificar la mayoría de las cepas de *E. coli*: la caracterización del antígeno O se realiza para determinar el serogrupo, y el antígeno H para determinar el serotipo (Meng & Schroeder, 2007). A pesar de que la mayoría de las cepas son inofensivas, algunas cepas han evolucionado a través de la adquisición de diversos factores de virulencia que le confieren una mayor adaptación a nichos nuevos y con ello pueden generar una amplia gama de enfermedades generalmente transmitidas por consumo de agua o alimentos contaminados (OMS, 2019; Kaper *et. al.*, 2004).

Las cepas de *E. coli* que pueden provocar enfermedad se dividen en dos grupos: aquellas que pueden provocar enfermedades intestinales (DEC) y aquellas que pueden causar enfermedades extraintestinales (ExPEC). Dentro de las cepas ExPEC *E. coli* uropatógena (UPEC) es una de las más frecuentes, dada la alta incidencia de ITU que hay a nivel mundial donde UPEC es responsable de >80% de los casos. Las cepas de UPEC generalmente poseen una cantidad heterogénea de factores de virulencia (figura 1) que hacen de UPEC uno de los patógenos más exitosos en el desarrollo de las ITUs (McLellan y Hunstad, 2017).

1.2. Factores de virulencia y patogenicidad

Las cepas de UPEC tienen la capacidad de colonizar el tracto urinario debido a la plasticidad de su genoma que le permite la adquisición o pérdida de material genético codifica para de factores de resistencia o virulencia. La interacción entre

bacterias y células epiteliales es un fenómeno multifactorial y complejo que involucra varias adhesinas producidas por la bacteria según la etapa de infección, ya que la adhesión a las células epiteliales es esencial para una colonización y establecimiento exitoso. La expresión de genes de virulencia como son genes de toxinas, sideróforos, lipopolisacáridos (LPS), cápsulas e invasinas; el medio ambiente y la respuesta del hospedero determinan la gravedad de la enfermedad y la virulencia la cepa. Las cepas de UPEC pueden causar infecciones agudas e infecciones recurrentes que no responden a los tratamientos antimicrobianos comunes (López-Banda, 2014; Barber *et al.*, 2016).

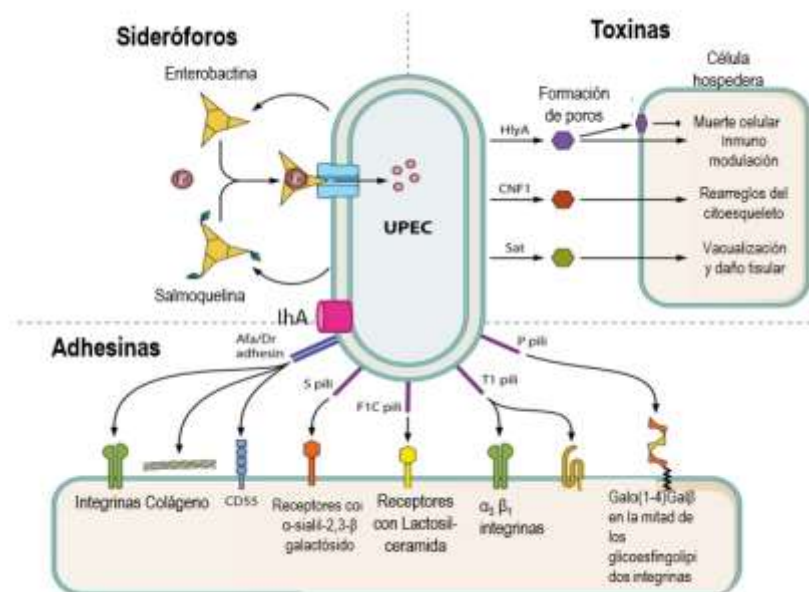


Figura 1. Factores de virulencia de UPEC. (Modificado de Barber *et al.*, 2016).

1.2.1. Pili tipo I

Las adhesinas son moléculas adhesivas que permiten que las bacterias se unan y reconozcan los receptores en la superficie del hospedero. La fimbria tipo 1 es importante para que se lleve a cabo la infección del tracto urinario dado que media la adhesión a los receptores que contienen manosa en el uroepitelio y promueve el crecimiento bacteriano intracelular (Lane y Mobley, 2007). El pili tipo 1, consiste en una varilla helicoidal de 7 nm de espesor, compuesta de subunidades repetidas de FimA, acopladas a una estructura tipo fibrilla de punta ancha de 3 nm que contiene

la adhesina FimH y dos proteínas adaptadoras, FimF y FimG (Schwan, 2013). La adhesina FimH, se une a los residuos manosilados de las células de la vejiga al igual que a las integrinas α -3- β 1 induciendo una cascada de señalización que activa a las Rho GTPasas que promueven un rearrreglo del citoesqueleto para permitir la internalización de UPEC a las células para la formación de colonias bacterianas intracelulares (IBC). Estas IBC le permiten protegerse de la eliminación mediante el tratamiento con antibióticos y de las defensas innatas del hospedero, así como el ataque de células polimorfonucleares (Mulvey, 2002; Wright *et al.*, 2007). Además, se ha observado que FimH también puede promover la absorción bacteriana por neutrófilos, mastocitos y macrófagos. Estudios recientes han demostrado que FimH no solo puede mediar la endocitosis de UPEC en los macrófagos sino que además puede promover la supervivencia bacteriana en los macrófagos (Vizacarra *et al.*, 2016; Mulvey, 2002). Asimismo, se han observado mutaciones no sinónimas en el gen de la adhesina FimH, impulsadas por la modificación funcional adaptativa que le confieren una ventaja selectiva en la colonización (Weissman *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2009).

1.2.2. Toxinas

Las toxinas desempeñan un papel importante durante la infección ya que pueden destruir las células del hospedero y con ello contribuir a la propagación de bacterias en los tejidos, aumentan la citotoxicidad y la insensibilidad a los neutrófilos (Zbiti, 2015; Sarowska *et al.*, 2019).

La α -hemolisina (HlyA), codificada por al menos el 50% de las cepas de UPEC, se inserta en la membrana celular de las células uroepiteliales y forma poros, permeabilizando la membrana celular y provocando la muerte celular lo que facilita la liberación de nutrientes y otros factores, como el hierro. Asimismo, se ha asociado con la presencia del dolor suprapúbico indicando que HlyA puede ser la responsable de la manifestación clínica en pacientes con ITU (Wiles *et al.* 2008; Dadi *et al.*, 2020; Spurbeck y Mobley, 2013).

La toxina autotransportadora secretada (Sat) es una proteasa de clase I que promueve efectos citotóxicos en varias líneas de células epiteliales indiferenciadas. Se presenta principalmente en aquellas cepas causantes de pielonefritis (Tolosa *et al.*, 2015; Zbiti, 2015)

El factor necrotizante citotóxico (CNF-1) pertenece a un grupo de citotóxicas. Es una toxina de tipo AB, compuesta por el dominio de unión celular N-terminal y el dominio catalítico C-terminal que posee una actividad desaminasa a través de la desaminación específica del sitio de un residuo Gln a Glu. Se internaliza a través de endocitosis mediada por receptores al unirse a un receptor de la superficie celular puede modular la diferenciación celular, apoptosis y proliferación celular (Feng *et al.*, 2017; Kim, 2013)

1.2.3. Sideróforos

El hierro es un elemento importante para muchos procesos celulares y bacterianos, por ello las bacterias han desarrollado múltiples estrategias para tomar el hierro del hospedero. Dentro de estas estrategias se encuentra la expresión de sistemas de adquisición de hierro que utilizan sideróforos para quelar el hierro del medio ambiente y posteriormente concentrarlo en el citosol bacteriano. Los sideróforos son moléculas que tienen alta afinidad por el hierro férrico (Fe^{3+}). Los sideróforos internalizan el hierro a través de receptores presentes en las membranas bacterianas. UPEC puede presentar hasta cuatro sideróforos: enterobactina, salmoquelina, aerobactina y yersinobactina (Garénaux *et al.*, 2011; Zbiti, 2015).

1.2.4. Islas de patogenicidad

Los factores de virulencia de las bacterias patógenas a menudo son codificados por distintos grupos de genes de virulencia. Estos grupos de genes de virulencia se han denominado Islas de Patogenicidad (PAI, por sus siglas en inglés) y generalmente están ausentes de las cepas no patógenas de la especie (Karaolis, 2001). En algunos casos, estas secuencias también ayudan en la adaptación de diversas afecciones; pueden contener elementos transponibles que tienden a replicarse y

hacer copias en el genoma lo que proporciona un mecanismo para la transferencia horizontal coordinada de genes de virulencia (Chatterjee y Raval, 2019; Sabaté *et al.*, 2006). Todas las PAI's poseen características específicas como la capacidad de recombinarse, típicamente representada por la presencia de una integrasa; un contenido de G + C que varía de la secuencia de ADN circundante; una asociación con genes de tRNA; y la presencia de repeticiones en ambos extremos (flanqueando) (Hallstrom y McCormick, 2015). En UPEC, las PAI's se describieron por primera vez en la cepa 536, a finales de la década de 1980 por Hacker *et al.* (1990). Posteriormente, se dieron a conocer las PAI's de las cepas CFT073 y J96 (Samei *et al.*, 2016).

Las cepas prototipo de UPEC donde se ha descrito la presencia de PAIs son las cepas UPEC 536, J96, CFT073 y UTI89. La cepa CFT073 posee en su genoma un total de 13 PAIs de las cuales la PAI I_{CFT073} codifica para un operón de alfa hemolisina, un operón del Pili tipo P y genes relacionados a sistemas de transporte de hierro. La PAI II_{CFT073} presenta también genes de regulación de hierro como la PAI I_{CFT073}, el operón *pap*, elementos genéticos móviles y genes aún sin clasificar. Por otro lado la cepa J96 presenta dos PAIs: la PAI I_{J96} posee el operón *pap* y el operón *hly*, y la PAI II_{J96} también posee el operón *hly* y los genes que codifican para el factor de necrosis citotóxico (CNF) (Desvaux *et al.*, 2020).

1.2.5. Mecanismo de infección

UPEC normalmente comienza la infección del tracto urinario al contaminar el área periuretral y colonizar la uretra. Esto comienza con la adherencia de UPEC mediante la expresión de adhesinas fimbriales (FimH, PapG, SfaS, FocH, CsgA y DrA) que al interactuar con sus respectivos ligandos mejoran la colonización. La adherencia es un evento clave, en la vejiga las consecuencias de las complejas interacciones hospedero-patógeno determinan en última instancia si los uropatógenos tienen éxito en la colonización o si se eliminan (Ulett *et al.*, 2013; López-Banda *et al.*, 2014). El hospedero desencadena una respuesta inmune que derivará en la infiltración de polimorfonucleares y, como defensa, UPEC experimenta multiplicación y formación de biopelícula. Además, UPEC producirá toxinas y proteasas que inducen daño

celular y con ello la liberación de nutrientes esenciales que promueven la supervivencia bacteriana. UPEC asciende hacia el riñón mediante un sistema de encendido/apago del flagelo y del pili tipo 1. Así como en la vejiga, en el riñón también se lleva a cabo la colonización mediante otras adhesinas y daño celular por toxinas. Asimismo, si la infección no es tratada UPEC puede cruzar la barrera epitelial y progresar a bacteriemia (figura 2) (Flores-Mireles *et al.*, 2015; Leite *et al.*, 2016).

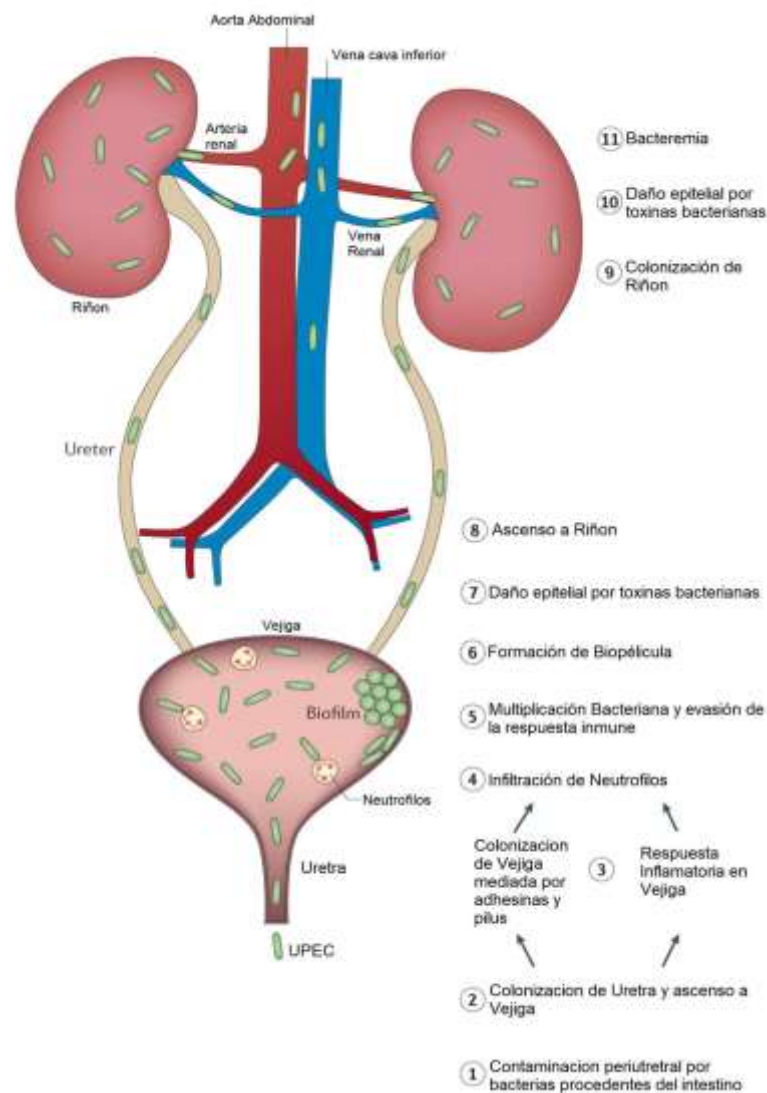


Figura 2. Patogénesis de la infección del tracto urinario causada por UPEC. (Modificado de Flores-Mireles *et al.*, 2015).

1.3. Filogenia

Inicialmente se creía que *E. coli* era un organismo únicamente comensal sin embargo, en la década de 1940 se encontraron cepas de *E. coli* responsables de brotes severos de diarrea, encontrando así que no todas las cepas de *E. coli* eran comensales. Por ello, años más tarde (1980) para estudiar la diversidad de estas cepas se encontró la existencia de subestructuras genéticas asociadas con el sitio de aislamiento de las cepas de *E. coli* patógenas. Se definieron seis grupos filogenéticos principales, designados como A, B1, B2, C, D y E (Selander *et al.*, 1987). Posteriormente, Clermont *et al.*, 2000 desarrollaron una PCR triple para llevarla a cabo de manera más rápida y eficaz la clasificación de las cepas dentro de cuatro grupos filogenéticos principales (A, B1, B2, y D). En esta PCR se evaluaba la presencia o ausencia de los genes *chuA* (involucrado en el transporte del grupo hemo), *yjaA* (presente en *E. coli* K-12, función desconocida) y *TspE4.C2* (fragmento de ADN) (Clermont *et al.*, 2000; Chaudhuri y Henderson 2012). En 2013, se añade el filogrupo F como un filogrupo derivado del filogrupo B2. De igual manera se añade la detección del filogrupo C y del Clado I con los genes *trpA* (para identificar el filogrupo C) y *arpA* (usado para identificar al Clado I) (Clermont *et al.*, 2013; Gordon *et al.*, 2008).

1.4. Plásmidos bacterianos como medio de diseminación de resistencia

Los plásmidos son elementos genéticos extracromosómicos circulares de ADN, aunque en ocasiones existen plásmidos lineales o hechos de ARN con capacidad para autoreplicarse de forma controlada y pueden transferirse horizontalmente entre bacterias por conjugación. Los plásmidos suelen conferir una gran variedad de fenotipos a las bacterias que los posean así como una ventaja evolutiva sobre las demás bacterias (Clark *et al.*, 2019). Los plásmidos suelen desempeñar un papel importante en la diseminación de resistencia a los antibióticos siendo los plásmidos conjugativos los impulsores más importantes de la propagación de resistencia en las enterobacterias. Esto debido a que pueden portar genes asociados a la

resistencia como lo son la Beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE), las cuales pueden hidrolizar β -lactámicos y propagarse a través de bacterias de una manera mediada por plásmidos (Millán, 2018; Li *et al*, 2019). Además, los plásmidos conjugativos pueden llevar varios elementos transponibles que, a su vez, pueden albergar integrones de clase 1, el más frecuentemente encontrado en cepas clínicas, con una combinación diversa de casetes de resistencia como lo pueden ser los genes *sul* que confieren resistencia a sulfamidas (Márquez *et al*, 2008; Sabaté y Prats, 2002).

1.5. Transferencia de material genético

Desde que Avery, MacLeod y McCarty descubrieron el principio de transformación de Griffith, dieron la pauta para el descubrimiento de muchos aspectos desconocidos de la genética bacteriana, donde la amplia difusión de la ganancia y pérdida de genes bacterianos llevaron al concepto de “genómica lateral” (Clark y Pazdernik, 2013). La transferencia horizontal de genes (HGT, por sus siglas en inglés) es el movimiento de información genética entre bacterias, es decir, se refiere a la transmisión no sexual de material genético entre genomas no relacionados y tiene un impacto en la adaptación y evolución de las bacterias ya que pueden incluir la propagación de genes de virulencia y resistencia entre bacterias patógenas (Villa *et al.*, 2019; Burmeister *et al.*, 2015). La HGT es mediada a través de 3 mecanismo diferentes: transformación (absorción de ADN libre), conjugación (transferencia mediada por plásmidos) y transducción (transferencia mediada por fagos) (Choudhuri, 2014).

1.5.1. Conjugación bacteriana

La conjugación bacteriana es una forma de recombinación que implica la transferencia de plásmidos o transposones y, en algunos casos como de las cepas de enterobacterias puede eventualmente movilizar el hemicromosoma, por lo tanto, generalmente origina merodiploides y raramente diploides completos (Villa *et al.*, 2019; Griffiths *et al.*, 1999). Aunque la conjugación requiere el contacto de célula a

célula, puede ocurrir entre bacterias distantes o incluso entre bacterias y eucariotas (Makarenkov *et al.*, 2006). La conjugación en bacterias Gram negativas es común a diferencia de las Gram positivas. Para que el proceso se lleve a cabo es necesario una síntesis permanente de ADN (Villa *et al.*, 2019). En la conjugación, el plásmido de una bacteria (donadora) es transferido por un emparejamiento a otra (el receptor) a través de un pili. Sin embargo, el gen *traT* codifica para una proteína de membrana externa que participa en la exclusión de superficie e impide la formación del par conjugativo ocurre entre dos células que contienen el mismo plásmido. En este proceso a medida que las bacterias se acercan, se produce la unión del pili y después este pili se retracta y se estabiliza el contacto de la envoltura celular de ambas bacterias. Posteriormente, se lleva a cabo la transferencia de ADN, donde las relaxasas MOB son las proteínas iniciadoras dado que cortan específicamente en una de las cadenas del *oriT*, de manera que el plásmido súper enrollado pasa a estar relajado lo que resulta en la transferencia de uno o varios marcadores genéticos, y después las bacterias se separan. Dentro de los plásmidos conjugativos de mayor importancia, se encuentran los plásmidos F, los cuales son capaces de autotransmitirse. Estos plásmidos se asocian frecuentemente con virulencia y resistencia a los antibióticos (Griffiths *et al.*, 2000; Hobot, 2015; Villa *et al.*, 2019).

1.5.2. Transformación bacteriana

La transformación bacteriana es el proceso donde las bacterias absorben e incorporan en su genoma no solo ADN homólogo sino también ADN heterólogo, aunque el segundo requiere un cierto grado de homología de ADN, para permitir la formación de heteroduplex con el ADN receptor. Por lo general, solo se intercambian fragmentos cortos de ADN de esta manera (Villa *et al.*, 2019; Makarenkov *et al.*, 2006).

1.5.3. Transducción bacteriana

Algunos bacteriófagos son capaces de "movilizar" genes bacterianos y transportarlos de una célula bacteriana a otra a través del proceso de transducción. Por lo tanto, la transducción es el proceso por el cual un virus transfiere material genético de una bacteria a otra (Griffiths *et al.*, 2000). Requiere que el donante y el receptor compartan los receptores de la superficie celular para la unión del fago. Por lo general, se limita a bacterias estrechamente relacionadas. La longitud del ADN transferido por transducción está limitada por el tamaño de la cabeza del fago (Makarenkov *et al.*, 2006).

2. ANTECEDENTES DIRECTOS

Johnson *et al.* (2004), en Estados Unidos, trabajan con 152 cepas de *E. coli* de las cuales el 71% son de muestras urinarias, encuentran una relación entre la presencia de resistencia a los antibióticos con un bajo número de factores de virulencia. Encontraron que las cepas diferentes al filogrupo B2 (A, B1 y D) presentan menor virulencia pero mayor resistencia. Esto podría deberse a la presión que el uso indiscriminado de los antibióticos ha hecho sobre estos filogrupos considerados comensales (A y B1).

Moreno *et al.* (2006), en España, trabajan con 200 cepas UPEC, encuentran una mayor resistencia a los antibióticos en cepas pertenecientes a los filogrupos A y B1 en contraste con las cepas del filogrupo B2 que presentaban mayor sensibilidad a los antibióticos.

Ali *et al.* (2019) Pakistán, trabajan con 155 cepas de UPEC, encuentran una alta prevalencia de cepas en el filogrupo B2 (59%), seguido del D (28%) y los filogrupos B1 (8%) y A (5%). Además, detectan la presencia de cepas ST131 y observan que la mayoría de las cepas pertenecientes a la Secuencia Tipo 131, responsable de la diseminación de cepas resistentes a los antibióticos, son de filogrupo B2 (59%) y al serotipo O25b (61%). Conjuntamente, las cepas son MDR que portan una variedad de factores de virulencia, incluidos genes para adhesinas, siendo el alelo *fimH30* el más predominante (50%) en la ST131.

Rijavec *et al.* (2006), en Eslovenia, analizan 110 cepas de UPEC, las cuales pertenecen a los cuatro grupos filogenéticos más grandes (A, B1, B2 y D) y presentan una alta resistencia a los antibióticos, principalmente a tetraciclina y cloranfenicol. Además, realiza ensayos de conjugación donde observa que las transconjugantes adquirirían plásmidos pertenecientes al grupo de incompatibilidad IncF, sugiriendo que las transconjugantes podían adquirir y mantener plásmidos conjugativos que codificaban resistencia a los antibióticos.

Najafi *et al.* (2017), en Irán, trabajan con 140 cepas de UPEC aisladas de ITU, a las cuales se les determina la presencia de factores de virulencia, grupo filogenético y de PAIs (PAI I_{CFT073}, PAI II_{CFT073}, PAI I₅₃₆, PAI II₅₃₆, PAI III₅₃₆, PAI IV₅₃₆, PAI I_{J96} y PAI II_{J96}). En este trabajo se reporta que la presencia de factores de virulencia está relacionada con los marcadores PAIs y que la mayoría de los factores de virulencia se presentaban en las cepas del filogrupo B2.

Lebba *et al.* (2012), en Italia, analizan patrones de mutación en el gen *fimH* de 52 cepas de *E. coli* aisladas de pacientes pediátricos. Encontrar que las cepas que presentan las mutaciones G66S, N70S y S78N en la proteína FimH pertenecen a los filogrupos B2 y D, y las mutaciones N70S y S78N presentan una exclusión mutua con la mutación A119V.

Dahbi *et al.* (2014), en España, evalúan 490 cepas de *E. coli* pertenecientes a la ST131 de las cuales 456 pertenecen al serogrupo O25:H4, 27 al O106:H5 y 7 son no tipificables. Todas las cepas del serotipo O106:H5 presentan el alelo *fimH41*; las O25:H4 presentan dos alelos (*fimH30* 78% y *fimH22* 16%). Observa que la mayoría de las cepas que presentan el alelo *fimH30* son resistentes a fluoroquinolonas (98%) mientras que las cepas de los alelos *fimH41* y *fimH22* son sensibles.

Ghosh y Mukherjee (2019), en República Checa, trabajan con 200 cepas de *E. coli* de pacientes sintomáticos y asintomáticos de ITU, encuentra la presencia de 20 SNP en el gen *fimH* en pacientes asintomáticos y 31 SNP en pacientes sintomáticos. Siendo la mutación V27A en el dominio de lectina de la adhesina FimH la que se presenta en pacientes con un grado alto de inflamación de la mucosa.

Cusumano *et al.* (2010), en Estados Unidos, reporta que UPEC, a través de la transferencia horizontal ha adquirido genes que le permiten desarrollar más estrategias de colonización del tracto urinario. Ellos trabajan con un aislado de UPEC, UTI89, que contiene un plásmido F (pUTI89) que le provee a la cepa una mayor capacidad para invadir y colonizar la vejiga, además de poseer el operón *tra* lo que permite que pUTI89 se mantenga y se disemine a otras cepas de UPEC.

Conjuntamente, Osborn *et al.* (2000), en el Reino Unido, estudia la relación de los replicones alfa pGSH500 y pLV1402 pertenecientes a la familia IncFII, y encuentra que el concepto de incompatibilidad para el grupo IncF puede ser un poco erróneo ya que puede haber múltiples replicones en un mismo plásmido (pGSH500 y pLV1402), donde un replicón puede estar silenciado mientras que otro replicón actúa como origen de replicación.

Poey y Laviña (2018), en Uruguay, estudian en cepas de UPEC resistentes a antibióticos, la transferencia por conjugación de un plásmido que porta un integrón de clase 1, el cual posee un conjunto variable de genes de resistencia a los antibióticos como lo son los genes *sul1*, *sul2* y *sul3*, los cuales confieren resistencia a sulfonamidas. Observan que un 40% de cepas transconjugantes las cuales poseían, al menos, un plásmido perteneciente al grupo IncF, portador del integrón clase 1 con la presencia de los genes de resistencia a sulfonamidas.

Respecto a la resistencia plasmídica, Guzmán *et al.* (2013), en Venezuela, estudian 27 cepas de UPEC, de las cuales 9 fueron conjugativas. Las cepas transconjugantes adquieren los genes *bla_{TEM}* y *bla_{SHV}* demostrando el papel que tiene la conjugación en la diseminación de las BLEEs.

Koga *et al.* (2014), en Brasil, trabajan con 21 cepas obtenidas de muestras de sangre de pacientes con ITU que habían progresado a bacteremia y en las cuales se aisló a *E. coli*. Encuentra la presencia de cuatro PAIs, la PAI IV₅₃₆, I_{J96}, ICFT₀₇₃ y II_{CFT073} de las siete PAIs previamente descritas para UPEC (PAI I₅₃₆, II₅₃₆, IV₅₃₆, ICFT₀₇₃, II_{CFT073}, I_{J96} y II_{J96}). De las cuales la PAI IV₅₃₆ ha sido descrita como una isla estable y altamente frecuente en las enterobacterias.

Por otro lado, en el grupo de trabajo del laboratorio de Biología Molecular de Enteropatógenos del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, se ha estudiado la presencia de las principales características de virulencia de UPEC donde Molina Villa (2011), trabaja con 114 cepas de UPEC de las cuales el 93.8% provenían de mujeres con ITU. Encuentra que los serotipos más frecuentes son O25, O1 y O102, siendo O25:H4 y O6:H1 las de mayor presencia y con un 23% sin la presencia de plásmidos. Conjuntamente Aroche Camarillo (2011) trabaja con 133 cepas aisladas de hombres y mujeres con ITU (relación 9:1); y él también encuentra mayor presencia del serotipo O25:H4 (15%). Asimismo, encuentra que el grupo filogenético B2, fue el filogrupo predominante con un 57%.

Posteriormente, Martínez Alvarado (2012) trabaja con 125 cepas aisladas de pacientes con diagnóstico de ITU de ambos sexos, tanto adultos como de la tercera edad, encuentra también al serotipo O25:H4 como el más frecuente seguido de O17:H18 y O6:H1. García (2017), Trabaja con este mismos cepario y encuentra una resistencia del 100% a 24 antibióticos pertenecientes a 10 familias, representando un 78% de cepas MDR. También encuentra que el grupo B2 era el más frecuente (32%).

Flores Hernández (2015) trabaja con 17 cepas de UPEC aisladas de pacientes con diagnóstico de displasia cervical cursando con infección de tracto urinario y encuentra al grupo filogenético B2 como el predominante con un 35%, seguido por el grupo A (24%) y D (24%) y en último lugar el grupo B1 (18%).

Zarzoza Mendoza (2016) trabaja un total de 65 cepas UPEC del serogrupo O25, de los ceparios antes mencionados, de las cuales 57 pertenecen al serotipo O25:H4 y 8 cepas pertenecen al serogrupo O25:H⁻. Las cepas pertenecen al grupo B2 en un 92% y en bajo porcentaje al filogrupo A (3%). Del mismo modo, el 100% de las cepas son multi-drogo resistente, y presentan de 1 a 7 bandas plasmídicas, con tamaños relativos de 1-3 kb, 50-70 kb y 100-127 kb. También busca la presencia de 4 PAIs (PAI I_{CFT073}, II_{CFT073}, I_{J96} y II_{J96}) y encuentra solo la presencia de tres PAIs: I_{CFT073} (95%), PAI II_{CFT073} (63%) y PAI II_{J96} (3%).

Martínez-Gorgonio (2019), trabaja con 55 cepas pertenecientes al serotipo O25:H4 recopiladas de 4 ceparios diferentes. Determina la presencia de la ST131, y encuentra que 44 cepas de las 55 pertenecen al ST131 y poseen el alelo *fimH30* siendo el subclon H30-Rx el más prevalente con un 91%. Asimismo realiza ensayos de conjugación con 5 cepas y observa que de las 15 clonas transconjugantes que obtiene, el 66% adquirió el gen *bla_{TEM}* y solo el 20% el gen *bla_{CTX-M}*.

3. JUSTIFICACIÓN

El Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) estima que, tan solo en los Estados Unidos, cada año al menos 2 millones de personas se infectan de algún patógeno resistente a los antibióticos y que por lo menos 23,000 personas mueren como resultado de dichas infecciones (CDC, 2018).

Las infecciones del tracto urinario (ITU) en México representan un problema de salud pública y se ubican en el tercer lugar de las enfermedades con mayor morbilidad en el país. Por cuestiones anatómicas se presenta una incidencia mayor en mujeres (77%) que en varones (23%). *Escherichia coli* uropatógena (UPEC) es el agente etiológico principal causando el 80-90% de las ITU adquiridas en la comunidad y el 40-50% de las ITU adquiridas del ambiente intrahospitalario. UPEC posee características genómicas únicas adquiridas a través de la transferencia horizontal de genes, principalmente a través del proceso de conjugación. Esto le ha permitido desarrollar múltiples estrategias para colonizar el tracto urinario y causar daño al hospedero. Las ITUs poseen un tratamiento específico y exitoso, sin embargo, el incremento en el uso descontrolado y excesivo de antibióticos ha generado un aumento en las tasas de resistencia bacteriana a los antibióticos y con ello complicaciones de la enfermedad, fracaso en el tratamiento y aumento significativo en las tasas de morbi-mortalidad, convirtiendo a las ITUs por UPEC-MDR en una emergencia de salud pública asociada principalmente a la diseminación de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE).

Por todo esto el conocer las características de virulencia como las variantes alélicas del gen *fimH* presentes en cepas clínicas y relacionarlas con el serotipo y, conjuntamente, el conocer los tipos de genes de resistencia que se transfieren a través de conjugación pueden ayudar a tener un mejor entendimiento de UPEC como el patógeno principal de las ITU y posibilitará en un futuro el diseño de nuevas estrategias para el tratamiento contra este patógeno.

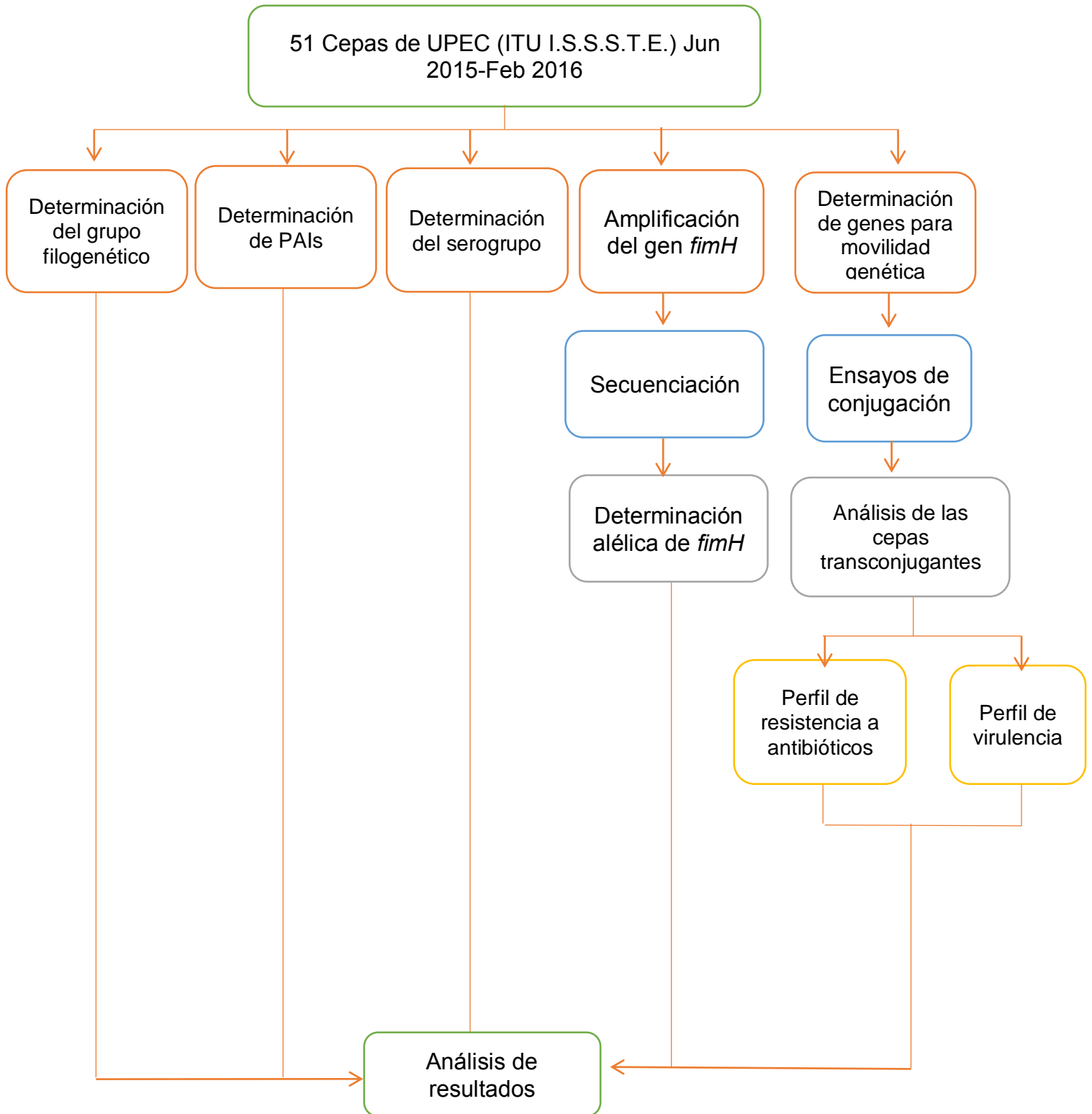
4. OBJETIVO GENERAL

Estudiar una colección de cepas de *E. coli* aisladas de procesos urinarios a través de la determinación de la presencia de los principales genes de virulencia, perfiles de resistencia, su relación filogenética y su capacidad para transferir genes de virulencia y/o resistencia.

5. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar el grupo filogenético de una colección de cepas de *E. coli* aisladas de ITU.
2. Determinar la presencia de Islas de patogenicidad en las cepas de *E. coli*.
3. Determinar el serogrupo de las cepas.
4. Determinar los alelos de la adhesina fimbrial tipo 1 de las cepas de *E. coli*.
5. Determinar la presencia de genes relacionados con la movilidad genética de plásmidos.
6. Determinar la transferencia de material genético en cepas de UPEC-MDR-*mob*⁺-*tra*⁺.

6. ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO



7. MATERIAL Y MÉTODOS

Se estudiaron 51 cepas de *Escherichia coli* uropatógena aislada de pacientes femeninos del Hospital Regional I.S.S.S.T.E de Puebla, Mex. en el periodo de Junio del 2015 a Febrero del 2016. Las muestras fueron colectadas y parcialmente caracterizadas en los proyectos de tesis de Jesús David García García y Claudia Ixtepan Tejero. Estas cepas se encuentran almacenadas en crioconservación a -70°C.

7.2. Extracción de ADN.

Se sembraron en 3 ml de medio líquido LB incubándolas a 37°C, a 220 rpm de 18 a 24 hrs (pre-cultivo). Posteriormente se inocularon 80 µl del precultivo en 5 ml de medio líquido LB, hasta obtener una DO_{260nm} de 0.4 a 0.5. Del tubo de precultivo se obtuvieron paquetes celulares de 3 ml para ser usados en la extracción plasmídica y del tubo con DO de 0.4 a 0.5 se obtuvieron paquetes de 500 µl usados para la extracción de ADN genómico llevadas a cabo acorde a los protocolos establecidos en el manual Molecular Cloning (Sambrook, 2012).

7.3. Material biológico

En la tabla 1 se enlistan las características generales del cepario de estudio. Asimismo, en las tablas 2 y 3 se enlistan las cepas utilizadas como controles en los ensayos realizados en el presente trabajo.

Tabla 1. Características generales del cepario de estudio.

Cepario	MDR	Presencia de Beta-lactamasas		Factores de virulencia	
		51 cepas aisladas de mujeres con ITU	90%	CTX-M	25%
OXA	25%			<i>iha</i>	35%
					<i>traT</i>

Tabla 2. Cepas control positivos utilizadas en este estudio.

Cepa	Características
UPEC CFT073	Genes <i>iucD</i> , <i>vat</i> , <i>sat</i> , <i>hlyA</i> , <i>papGII</i> , <i>fliC</i> , <i>fimH</i> y las Islas I y II de dicha cepa
059I	Genes <i>sat</i> , <i>vat</i> , <i>papGIII</i>
GAG1	Genes <i>iucD</i> , <i>sat</i> , <i>hlyA</i> , <i>papA</i> , <i>fliC</i> , <i>fimH</i> , <i>cnf</i> ,
EHEC EDL	Cepa Tipo EHEC Control positivo para el filogrupo E
UPEC J96	Islas de patogenicidad I y II de dicha cepa
<i>E. coli</i> K12 MC4100	Control Positivo para Grupo A
ETEC CD79a	Cepa Tipo ETEC Control positivo para Toxina Termoestable
ETEC LD102b	Cepa Tipo ETEC Control positivo para Toxina Termolábil
058I	Control positivo para <i>traT</i> . Cepa de nuestra colección aislada de ITU procedente del Hospital Regional I.S.S.S.T.E. PUEBLA.
7206	Control positivo para el filogrupo C

Tabla 3. Cepas control positivos donadas por el Laboratorio de Infecciones Hospitalarias y de la Comunidad

Cepa	Características
7223	Genes <i>bla_{oxa}</i> y <i>bla_{CTX-M}</i>
SA42	Gen <i>bla_{shv}</i>

7.4. Condiciones de la mezcla de reacción para las PCRs

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo, de manera general, bajo las siguientes condiciones de la mezcla de reacción:

Tabla 4. Componentes generales de las PCR's realizadas en este estudio.

Componente	Concentración final
Agua inyectable PiSA	---
Buffer de reacción	1X
Cloruro de magnesio	1.5 mM
dNTP's	0.05 mM
Oligonucleótido forward	0.5 mM
Oligonucleótido reverso	0.5 mM
Taq polimerasa	1.5 U/ μ l
ADN templado	--

7.5. Determinación de grupos filogenéticos

Se utilizó el método descrito por Clermont *et al.*, 2013 para la identificación del grupo filogenético mediante la realización de una PCR Quadruplex. Se realizó a partir del DNA genómico bacteriano extraído, PCR y posterior electroforesis en agarosa 1.5%. En la Figura 3 se muestran los genes buscados mediante este método y su interpretación correspondiente.

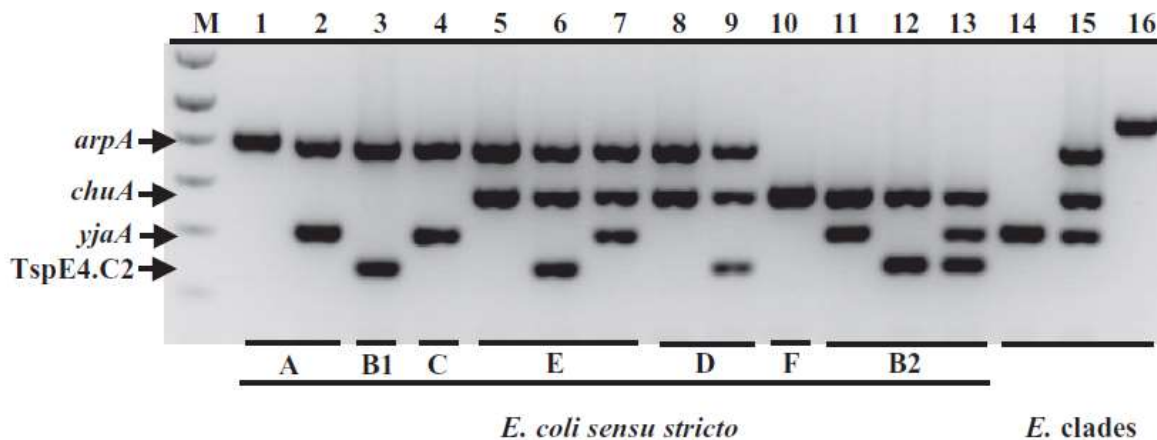


Figura 3. Gel representativo de la PCR Quadruplex. *arpA*: control interno de la pureza del DNA; *chuA*: captador tipo heme; *yjaA*: proteína inducida por estrés (resistencia a peróxido ácido); TspE4.C2: lipasa esterasa putativa. Clermont, 2013.

7.6. Determinación de Islas de Patogenicidad

En la tabla 5 se muestran los cebadores, y sus características, de acuerdo al protocolo propuesto por Sabate *et al.*, 2006 donde se buscaron 4 islas que codifican factores de virulencia clásicos de UPEC. En la PCR para PAI I_{CFT073} y PAI I_{CFT073} se usó 1.25 Ude DreamTaq DNA polymerase en PCR buffer (10X DreamTaq Buffer), 0.5 mM dNTPs, 2.5 mM MgCl₂, y las siguientes concentraciones de los cebadores: 0.7 mM cft073.2Ent1 y cft073.2Ent2; y 0.06 mM RPAi y RPAf.

En la PCR para PAI I_{J96} y PAI II_{J96}, se utilizó 1.25 Ude DreamTaq DNA polymerase en PCR buffer (10X DreamTaq Buffer), 0.5 mM dNTPs, 2.5 mM MgCl₂, y las siguientes concentraciones de cebadores: 0.04 mM papGI_f y papGI_r1.2 mM; 0.06 mM hly_d y cnf.

El protocolo para las PCRs consistió de 94°C por 5 min, seguido por 30 ciclos de 94°C por 1 min, 55°C por 1 min and 72°C por 1 min, con una extensión final a 72°C por 10 min. Ambas PCRs se estandarizaron usando como controles de PAI las cepas de UPEC CFT073 y J96 (Sabate *et.al.*, 2006).

Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados en la determinación de PAIs

Isla	Oligonucleótidos (5' - 3')	Tamaño (pb)
PAI I_{CFT073}	F: GGA CAT CCT GTT ACA GCG CGC A R: TCG CCA CCA AT CACA GCG AAC	925
PAI II_{CFT073}	F: ATG GAT GTT GTA TCG CGC R: ACG AGC ATG TGG ATC TGC	420
PAI I_{J96}	F: TCG TGC TCA GGT CCG GAA TTT R: TGG CAT CCC ACA TTA TCG	400
PAI II_{J96}	F: GGA TCC ATG AAA ACA TGG TTA ATG GG R: GAT ATT TTT GTT GCC ATT GGT TAC C	2300

7.7. Determinación del serotipo

La determinación del serotipo de las cepas se llevó a cabo con la colaboración del D.C. Armando Navarro Ocaña del Departamento de Salud Pública de la UNAM. Las cepas fueron enviadas al Departamento de Salud Pública de la UNAM en tubos eppendorf con medio TSA en pico de flauta a temperatura de refrigeración. La tipificación del serotipo se realizó mediante el método de aglutinación en placa (Qrskov y Orskov, 1984) utilizando suero de conejo obtenido de 187 antígenos somáticos y 53 flagelares específicos de *E. coli*.

7.8. Amplificación del gen *fimH*

En la tabla 5 y anexo 1 se muestran los oligonucleótidos utilizados para la amplificación del gen *fimH* para su posterior secuenciación. La purificación de los productos de PCR se realizó de acuerdo al procedimiento del fabricante mediante la utilización del kit de purificación Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit. Los productos purificados se cuantificaron en el equipo NanoDrop 2000c y se verificó la integridad del producto en un gel de agarosa al 1%, antes de ser enviados a secuenciación.

Tabla 6. Oligonucleótidos utilizados en la amplificación de *fimH*

Gen	Oligonucleótidos (5' - 3')	Tamaño (pb)	Tm
<i>fimH</i>	fimH-F: CACTCAGGGAACCATTCAGGCA fimH-R: TTTATTGATAAACAAAAGTCAC	975	54°C

7.9. Búsqueda de las variantes alélicas de *fimH*

La búsqueda de las variantes alélicas de *fimH* se realizó mediante la base de datos del FimTyper 1.0. del Centro de Epidemiología Genómica de la Universidad Técnica de Dinamarca (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/FimTyper/>).

7.10. Determinación de genes *traT* y *mobQ*

Para la determinación de los genes de movilidad genética *traT* y *MOB_Q* Se realizaron PCR's individuales utilizando cebadores reportados previamente por otros autores (tabla 6). Los productos obtenidos fueron separados en geles de agarosa al 1%.

Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados en la determinación de genes de movilidad genética.

Gen	Oligonucleótidos (5' - 3')	Tamaño (pb)	Referencia
<i>traT</i>	No mostrados	739	Laboratorio de Biología Molecular de Enteropatógenos
<i>MOB_{Q11}</i>	F:CAATCGTCCAAGGCGAARGCNGAYTA R:CGCTCGGAGATCATCAYYTGYCAYTG	331	Alvarado <i>et al.</i> , 2012
<i>MOB_{Q12}</i>	F:CTGGAATATACTGAACACGGNAAYATGCC R:ATCCTTGGTGTTAGCACGTTTRAARWAYTG	341	
<i>MOB_{Qu}</i>	F: AGCGCCGTGCTGTCCGCBGCNTAYCG R: CTCCGCAGCCTCGRCSGCRTTCCA	179	

7.11. Conjugación bacteriana

7.11.1. Conjugación en fase líquida

Se preparó un pre-cultivos independientes para la cepa receptora (rifampicina resistente) y para la donadora (ampicilina resistente), en 3 ml de medio LB sin presencia de antibióticos. Se dejaron en incubación 24 hrs a 37°C. Posteriormente, se tomaron 40 µl de los pre-cultivos para sembrarlos en medio LB con 100 µg/ml de ampicilina para la cepa donadora y 100 µg/ml de rifampicina para la cepa receptora. Se incubaron a 37°C hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0.4 a 0.6.

Posteriormente, se colocaron en tubos eppendorf separados: 1 ml de la cepa donadora y 1 ml de la cepa receptora. Se centrifugaron por 5 min a 12000 rpm. Se decantaron y lavaron con 1 ml de medio LB, este paso se repitió 2 veces. Después de decantar, se añadió 1 ml de medio LB y se resuspendieron. Se mezclaron en relación 1:1 (v/v) cepa donadora y receptora en un matraz con 20 ml de medio LB sin antibiótico. Cada matraz se incubó a 37°C por 24 hrs. Se realizaron diluciones de 10^0 a 10^{-5} . Cada dilución se sembró en placas de LB con antibiótico (ampicilina/rifampicina) (tabla 3). Se incubaron a 37°C por 24 hrs. (Protocolo modificado de Rijavec *et al.*, 2006; Poey *et al.*, 2018).

La frecuencia de conjugación se obtuvo de la siguiente manera: UFC recuperadas por la inversa de la dilución.

Tabla 8. Diluciones bacterianas seriadas para los ensayos de conjugación.

10^0	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
200 µL Del inculo directo	100 µL del inculo + 900 µL de medio LB	100 µL de 10^{-1} + 900 µL de medio LB	100 µL de 10^{-2} + 900 µL de medio LB	100 µL de 10^{-3} + 900 µL de medio LB	100 µL de 10^{-4} + 900 µL de medio LB

7.11.2. Conjugación en fase sólida

Se preparó un pre-cultivo independiente de la cepa receptora (rifampicina resistente) y de la donadora (ampicilina resistente) en 3 ml de medio LB sin presencia de antibióticos. Se dejaron en incubación 24 hrs a 37°C. Posteriormente, se tomaron 40 µl de los pre-cultivos para sembrarlos en medio LB con 100 µg/ml de ampicilina para la cepa donadora y 100 µg/ml de rifampicina para la cepa receptora. Se incubaron a 37°C hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0.4 a 0.6.

Posteriormente, se colocaron en tubos eppendorf separados: 1 ml de la cepa donadora y 1 ml de la cepa receptora. Se centrifugaron por 5 min a 12000 rpm. Se decantaron y lavaron con 1 ml de medio LB, este paso se repitió 2 veces. Después de decantar, se añadió 20 µl de medio LB y se resuspendieron. Se mezclaron la receptora con la donadora en un mismo tubo y con una micropipeta se transfirió todo el volumen en forma de un punto de contacto a una placa de medio LB sin antibiótico. La placa se incubó a 37°C durante 24 hrs.

Después de la incubación, con un asa bacteriológica se tomó todo el crecimiento del punto de contacto y se pasó a un tubo eppendorf con 1 ml de medio LB, se agitó suavemente para disociar la asociación bacteriana. Posteriormente, se realizaron diluciones de 10⁰ a 10⁻⁵. Cada dilución se sembró en placas de LB con antibiótico (ampicilina/rifampicina) (tabla 4). Se incubaron a 37°C por 24 hrs.

La frecuencia de conjugación se obtuvo de la misma manera que en la fase líquida.

7.12. Determinación de genes de virulencia

En la tabla 9 se muestran los genes de virulencia y transferencia de material genético buscados en 3 PCRs múltiples y 4 individuales previamente estandarizadas en el Laboratorio de Biología Molecular de Enteropatógenos y el Laboratorio de Infecciones Hospitalarias y de la Comunidad.

Tabla 9. Factores de virulencia buscados en las PCR's múltiples.

	Gen (producto)	Oligonucleótidos (5' - 3')	Tamaño (pb)
PCRM 1	<i>iucD</i>	iucD30F:GCTGTGGCTGGTAACTCAGG iucD512R:GCTTCACACAGGGTGGTAAAT	512
	<i>satA</i>	satA978F: CCAAACAATGCAGATACCAC satA1321R: ATTACCTTACCATTTCCGCTT	384
	<i>fliC</i>	FliC242F: GCTGTCCGAAATCAACAACAA FliC445R: GGCTATCGTACCGGAACCATT	304
	<i>fimH</i>	FimHF: CCTACAGCTGAACCCAAAG FimH188R: GAAAGATCTACGACCAG	210
PCRM 2	<i>papGII</i>	papG2113F:GGAATGTGGTGATTACTCAAAGG papG2/G3R:TCCAGAGACTGTGCAGAAGGAC	562
	<i>papGIII</i>	papG1/G3F:CATGGCTGGTTGTTCCCTAACAT papG2/G3R:TCCAGAGACTGTGCAGAAGGAC	421
	<i>vatA</i>	vatA1076F:CCTGGGACATAATGGTCAGAT vatA1406R:CTGGCAATATTCACGCTACTG	330
	<i>vatP</i>	vatP86F:TAGCGCGCAATTCAACAATA vat226R:GCAGATAGTGCCAGAGAGGTAAG	226
	<i>iha</i>	IhaEMSAR:CGGAATTCCGATCTCCGATCATGTTAACCG IhaEMSAL:CGGAATTCCGGCATGCCGAGGCAGTCGTTA	150
PCRM 3	<i>hlyA</i>	hlyA-133F:ACTCATGTTGGTAAAGTATCAGAAT hlyA1348R:AGCCAGTACAGTGCTTATCGTTG	1280
	<i>satP</i>	satP82F:AGCAAGCTGTTAGTAACCAACC satP773R:GAGCCGCTGTCTCCGAATA	880
	<i>papA</i>	papA-45F:CAGATATCTCTGGTGTGTTTCAGTAA papA+31R:GGTCTTGCCTCACCCCTGTAA	641
CNF	<i>cnf</i>	CNF1-71F:CTCGCCCAGTGATTAGGTATTC CNF1+60R:GCGCTAACAAAACAGCACAAGG	3100

**iucD*: aerobactina; *satA*: región autotransportadora de la toxina secretada; *fliC*: flagelina; *fimH*: adhesina fimbrial del pili tipo 1, *papGII*: adhesina fimbrial pili P; *papGIII*: adhesina fimbrial pili P; *vatA*: región autotransportadora toxina vacuolizante; *vatP*: región peptidasa toxina vacuolizante; *iha*: adhesina homóloga IrgA/sideroforo, *hlyA*: hemolisina; *satP*: región peptidasa toxina autotransportadora; *papA*: base pili P, *cnf*: factor necrotizante citotóxico

7.13. Determinación de perfiles de susceptibilidad antibiótica

Se llevó a cabo por el método de difusión en disco de Kirby-Bauer, se evaluaron 24 antibióticos (amikacina, gentamicina, netilmicina, ampicilina, cefalotina, cefuroxima, ceftriaxona, cefotaxima; ceftazidima; cefepime; aztreonam; ertapenem, ácido clavulánico-amoxicilina, ácidonalidíxico, ciprofloxacina, ofloxacina, norfloxacina, levofloxacina, nitrofurantoína, fosfomicina, trimetoprim/sulfametoxazol, cloranfenicol, colistina y tetraciclina) pertenecientes a 13 categorías distintas con base a los criterios establecidos por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI).

El preinoculo se preparó tomando con micropipeta 5 µl de la cepa problema y colocándolos en agar soya tripticaseina (TSA), después se sembró por estría cruzada y se incubo a 37°C durante 24 horas. Se tomó con asa una sola colonia bien diferenciada y se re sembró en caldo soya tripticaseina (TSB), se dejó incubar a 37° hasta alcanzar una turbidez equivalente al 0.5 de la escala de Mcfarland (1,5 x 10⁸ UFC/ml). Posteriormente se sumergió un hisopo estéril en el medio de cultivo eliminándose el exceso en la pared interna del tubo y se sembró masivamente con el hisopo sobre la superficie de una placa de gelosa Müller-Hinton rotándola 45° tres veces para cubrir la totalidad de la misma. Se dejó secar la muestra durante 3 minutos y se colocaron los sensidiscos con una pinza estéril oprimiendo ligeramente para asegurar el buen contacto con el medio. La concentración de cada antibiótico se reporta en el CLSI en la versión 2017; los unidiscos se colocaron como se muestra en la figura 4.

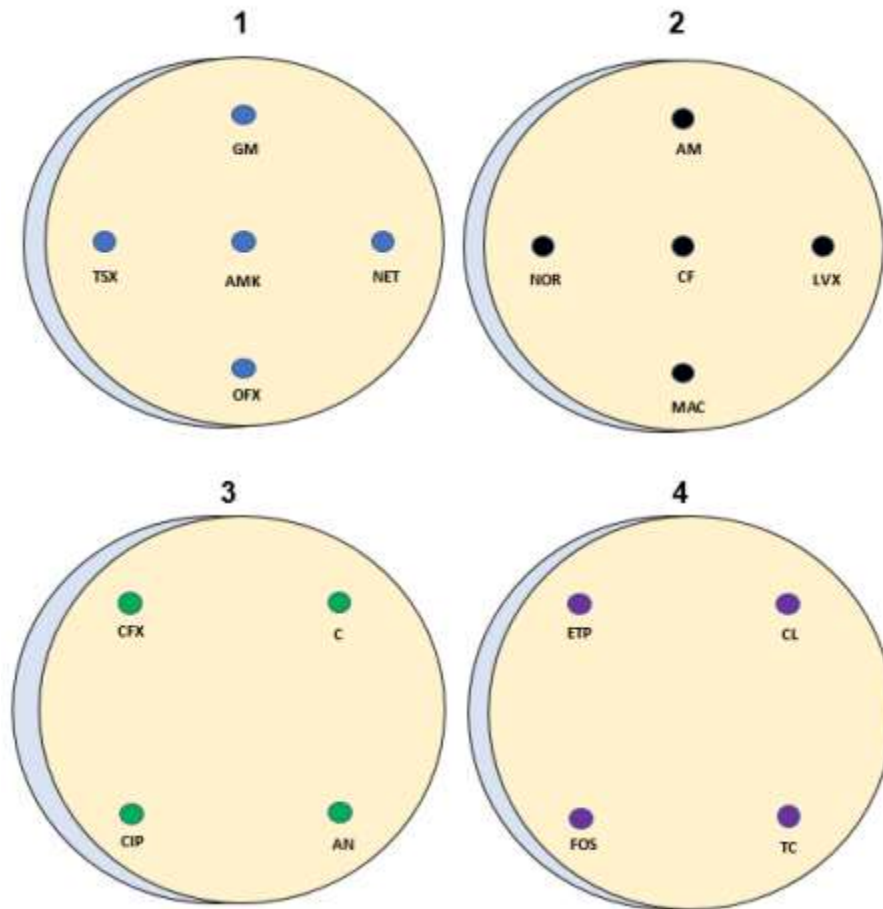


Figura 4. Distribución de los antibióticos analizados en la placa de Müller-Hinton. (1) GM: Gentamicina; NET: Netilmicina; OFX: Ofloxacina; TSX: Trimetoprim con Sulfametoxazol; AMK: Amikacina (2) AMP: Ampicilina; LVX: Levofloxacin; MAC: Nitrofurantoina; NOR: Norfloxacin; CF: Cefalotina (3) CFX: Cefuroxima; C: Cloranfenicol; CIP: Ciprofloxacina; AN: Ácido nalidixico. (4) ETP: Ertapenem; TE: Tetraciclina; FOS: Fosfomicina; CL: Colistina.

7.14. Amplificación de genes codificantes de Beta-lactamasas

La Tabla 10 muestra el nombre y tamaño de los cebadores utilizados para amplificar los genes que codifican para beta-lactamasas. Se amplificaron mediante PCRs individuales, con oligonucleótidos diseñados para amplificar una región conservada. Los productos obtenidos fueron separados en geles de agarosa al 1%.

Tabla 10. Oligonucleótidos utilizados en la determinación de beta-lactamasas.

Gen	Oligonucleótidos (5' - 3')	Tamaño (pb)	Tm
<i>bla_{CTX-M}</i>	CTXM-UNI-F: CGATGTGCAGTACCAGTAA CTXM-UNI-R: TTAGTGACCAGAATCAGCGG	566	52°C
<i>bla_{TEM}</i>	TEM-F: ATTCTTGAAGACGAAAGGGC TEM-R: ACGCTCAGTGGAACGAAAAC	1029	60°C
<i>bla_{SHV}</i>	SHV-F: CACTCAAGGATGTATTGTG SHV-R: TTAGCGTTGCCAGTGCTCG	883	52°C
<i>bla_{oxa-1}</i>	OXA-1: CCAAAGACGTGGATG OXA-2: GCTGCTCAAGGAGCACAGGAT	442	61°C

7.15. Condiciones éticas

Las cepas fueron donadas por el Hospital Regional I.S.S.S.T.E. de Puebla y son utilizadas en este Proyecto Núm. 188.2018 manteniendo los datos de los pacientes de forma anónima. Las cepas fueron transportadas bajo cadena de custodia, y desechadas en apego a las normas: WHO/HSE/GCR/2012.12, NOM-051-SCT2/201, NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002 y NOM-052-SEMARNAT-2005.

8. RESULTADOS

8.1. Población estudiada

Se estudiaron un total de 51 cepas provenientes del Hospital Regional I.S.S.S.T.E de Puebla, en el periodo de junio del 2015 a febrero del 2016 de paciente femeninos que cursaban con ITU en un rango de edad de 21 a 84 años.

8.2. Determinación de grupo filogenético

Para la determinación del grupo filogenético realizó una PCR cuádruplex propuesta por Clermont *et al.*, 2013, los productos de PCR se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 1% para observar el perfil de bandeo. En la figura 5 se muestra una imagen representativa del gel obtenido que describen el patrón de bandeo de los amplificados de algunas cepas.

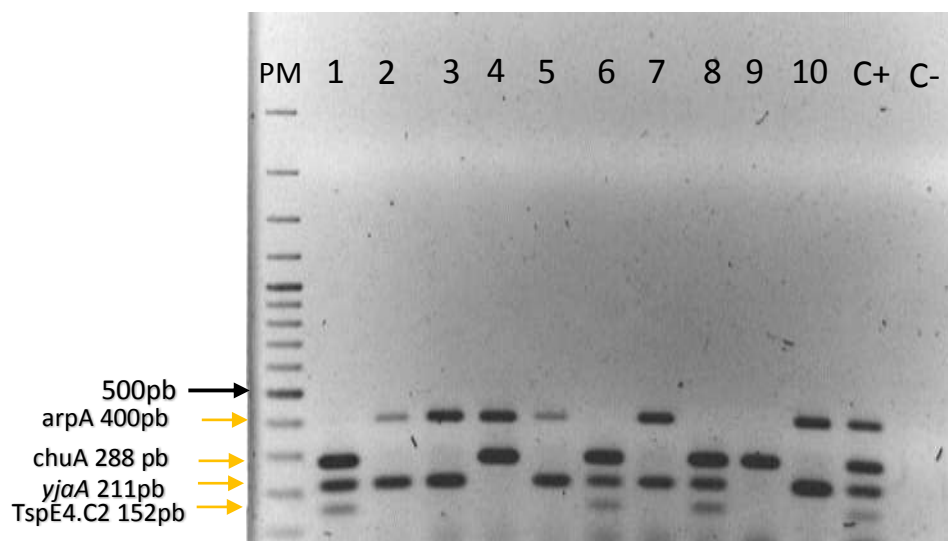


Figura 5. Determinación de Grupos Filogenéticos PCR Cuádruplex. Resultado representativo. Genes: *arpA*: control interno de la pureza del DNA; *chuA*: captador tipo heme; *yjaA*: proteína inducida por estrés (resistencia a peróxido y ácido); TspE4.C2: lipasa esterasa putativa. Carriles: PM: Marcador de Peso Molecular GeneRuler™ 100 pb Plus DNA Ladder; 1 cepa 141-I; 2 cepa 142-I; 3 cepa 143-I; 4 cepa 145-I; 5 cepa 146-I; 6 cepa 147-I; 7 cepa 148-I; 8 cepa 149-I; 9 cepa 150-I; 10 cepa 151-I; C+ control positivo cepa Tipo CFT073 y MC4100.

El filogrupo B2 fue el más predominante con una frecuencia del 37% (n=19), seguido del filogrupo D 20% (n=10) y los filogrupos A y C 16% (n=8), en la figura 6 se observan los porcentajes obtenidos de cada filogrupo.

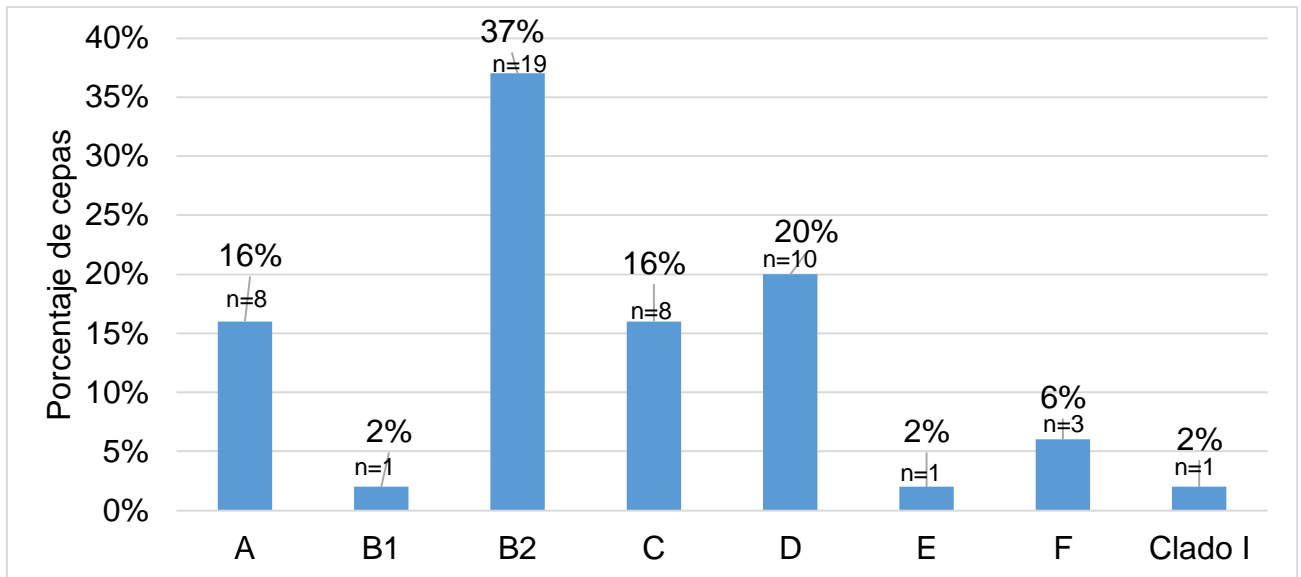


Figura 6. Grupos filogenéticos, 51 cepas de *E. coli* provenientes de pacientes femeninas con ITU del Hospital regional I.S.S.T.E de Puebla. Clasificación de Clermont *et al* 2013.

Las cepas pertenecientes a cada uno de los filogrupos se agruparon con sus factores de virulencia. Encontrando que las cepas pertenecientes al filogrupo B2 presentaban un mayor número de factores de virulencia (de 2 a 9 factores de virulencia), en contraste con las cepas pertenecientes a los filogrupos A, B1 y C consideradas comensales que presentaron de 1 a 5 factores de virulencia (tabla 11).

Tabla 11. Características de virulencia y resistencia a los antibióticos por grupos filogenéticos de las cepas de *E. coli* aisladas de pacientes femeninas con ITU del Hospital regional I.S.S.S.T.E de Puebla (n=51).

Grupos filogenético	Cepa	Perfil de Virulencia														PV*	Perfil de Resistencia
		<i>fimH</i>	<i>papGII</i>	<i>papGIII</i>	<i>papA</i>	<i>lha</i>	<i>iucD</i>	<i>fliC</i>	<i>satA</i>	<i>satP</i>	<i>vata</i>	<i>vatP</i>	<i>hlyA</i>	<i>cnf</i>			
A	104-I	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	2	GM, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, FO, TC, NF, C	
	137-I	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	AMK, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, TC, TSX, NF, C	
	142-I	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	3	AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, TC	
	151-I	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	2	GM, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, TC, NF, C	
	165-I	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	3	GM, AMK, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, CL, TC, TSX, NF, C	
	166-I	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	1	GM, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, TSX, NF, C	

	171-I	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	2	AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, CL, TC, TSX, NF, C
	175-I	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	2	GM, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, NOR, OFX, LVX, TC
B1	146-I	+	-	-	+		+	-		+	-	-	+		3	AMK, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, TC, TSX, NF, C
B2	107-I	+	+	-	+	+	+	-	+	+			+	+	7	GM, AMK, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, FOS, TC, NF, C
	112-I	+	+	-		+	+	-	-		-	+		-	3	NET, AMK, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, TC
	113-I	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	6	GM, NET, AMK, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, TC
	114-I	+		-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	2	GM, NET, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, TC
	119-I	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	4	AMK, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, TC
	136-I	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	3	GM, AMK, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, TC, TSX

138-I	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	6	GM, AMK, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, TC
140-I	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	4	GM, AMP, CF, CFX, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, TC
141-I	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	4	GM, AMK, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, TC
147-I	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	2	GM, AMP, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, TC, TSX, NF, C
149-I	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	2	GM, AMK, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, NOR, CIP, OFX, LVX, TC, NF, C
153-I	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	2	GM, AMK, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX
156-I	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	3	GM, AMK, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, TC, NF, C
157-I	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	4	GM, NET, AMK, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, ETP, TC, TSX
158-I	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	3	GM, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, NOR, CIP, OFX, LVX, TC, TSX, NF, C
160-I	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	3	GM, AMP, CF, CFX, CRO, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, CL, TC

	163-I	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	4	GM, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM., AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, TC
	164-I	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	4	GM, AMP, CFX, CRO, AMC, NOR, CIP, OFX, TC, TSX
	170-I	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	3	GM, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, CL, TC
C	120-I	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	2	GM, AMK, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, TC, TSX, NF, C
	122-I	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	3	GM, NET, AMK, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, TSX, NF, C
	124-I	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	GM, AMK, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, TC, TSX, C
	133-I	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	3	AMK, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, TC, TSX, NF, C
	134-I	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	GM, AMK, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, FOS, TC, TSX, NF, C

	143-I	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	3	AMK, AMP, CF, CFX, CRO. CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, TC
	148-I	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	3	GM, AMK, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, NF, C
	169-I	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	2	GM, AMP, CF, CFX, NOR, CIP, OFX, LVX, CL
D	106-I	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	2	GM, AMK, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, TC, TSX, NF, C
	109-I	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	2	GM, AMK, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, TC, NF, C
	111-I	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	4	AMK, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, TC, NF, C
	121-I	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	GM, AMK, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, TC, TSX, NF, C
	123-I	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	5	GM, NET, AMK, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, TC, TSX, NF, C

	131-I	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	NET, AMK, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, TC, TSX, NF, C
	135-I	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	2	GM, AMK, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, ETP, TC, TSX, NF, C
	139-I	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	4	GM, NET, AMK, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, FOS, TC, TSX, NF, C
	152-I	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	2	GM, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, NF, C
	172-I	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	3	GM, AMK, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, TC, TSX, NF, C
E	145-I	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	2	GM, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, TC, TSX, NF, C
F	101-I	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	3	GM, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, FOS, TC, TSX, NF, C
	105-I	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	3	GM, AMK, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, TC, NF, C

	150-I	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	3	GM, AMK, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, NOR, CIP, OFX, LVX, FOS, TC, TSX, NF, C
Clado 1	116-I	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, TSX
	Total	50	14	1	11	23	39	4	17	13	2	3	10	7		
	%	98	27	2	22	45	76	8	33	25	4	6	20	14		

*Análisis y determinaciones realizadas por Ixtepan-Tejero, 2018. PV= Puntaje de Virulencia. *iucD*: aerobactina; *satA*: región autotransportadora de la toxina secretada; *fliC*: flagelina; *fimH*: adhesina fimbrial del pili tipo 1, *papGII*: adhesina fimbrial pili P; *papGIII*: adhesina fimbrial pili P; *vatA*: región autotransportadora toxina vacuolizante; *vatP*: región peptidasa toxina vacuolizante; *iha*: adhesina homologa IrgA/sideroforo, *hlyA*: hemolisina; *satP*: región peptidasa toxina autotransportadora; *papA*: base pili P, *cnf*: factor necrotizante citotoxico. AMK:Amikacina, GM:Gentamicina, NET:Netilmicina, AMP:Ampicilina, CF:Cefalotina, CFX:Cefuroxima; CRO:Ceftriaxona, CTX:Cefotaxima; CFZ:Ceftazidima; FEP:Cefepime; ATM:Aztreonam; ETP:Ertapenem; AMC:Ácido clavulánico-Amoxicilina; AN:Ácidonalidíxico; CIP:Ciprofloxacina, OFX:Ofloxacina, NOR:Norfloxacina, LVX:Levofloxacina; NF: Nitrofurantoína FOS:Fosfomicina, TSX:Trimetoprim/sulfametoxazol, C:Cloranfenicol, CL:Colistina y TE:Tetraciclina.

8.3. Detección de Islas de Patogenicidad (PAI's)

Se detectó la presencia de cuatro PAI's en las 51 cepas. Las dos PAI's de UPEC cepa CFT073 y las dos de UPEC cepa J96. La detección se llevó a cabo mediante PCR's múltiples (figura 7). Se observó una mayor detección de la PAI I_{CFT073} con un 39% (n=20) seguido de la PAI II_{CFT073} con un 33% (n=17). Sin embargo, solo el 4% (n=2) fue positiva para la presencia de la PAI II_{J96} y ninguna cepa presentó la PAI I_{J96} (figura 8). Asimismo, el 22% de las cepas (n=11) poseían dos PAIs y el 2% (n=1) presento las tres PAIs encontradas en este estudio.

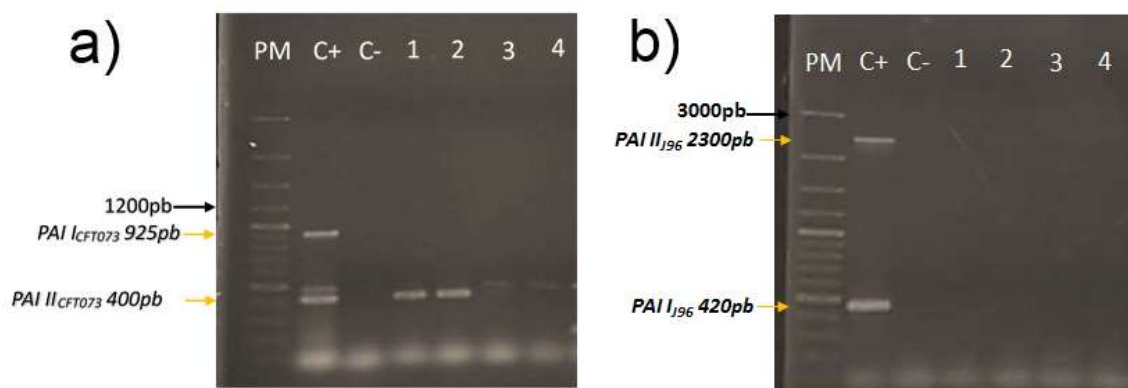


Figura 7. Determinación de las Islas de Patogenicidad de CFT073 y J96. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. PM: Marcador de Peso Molecular GeneRuler™ 100 pb Plus DNA Ladder; C+: control positivo; C-: control negativo, carriles: 1 cepa 140-I, 2 cepa 141-I, 3 cepa 142-I y 4 cepa 143-I.

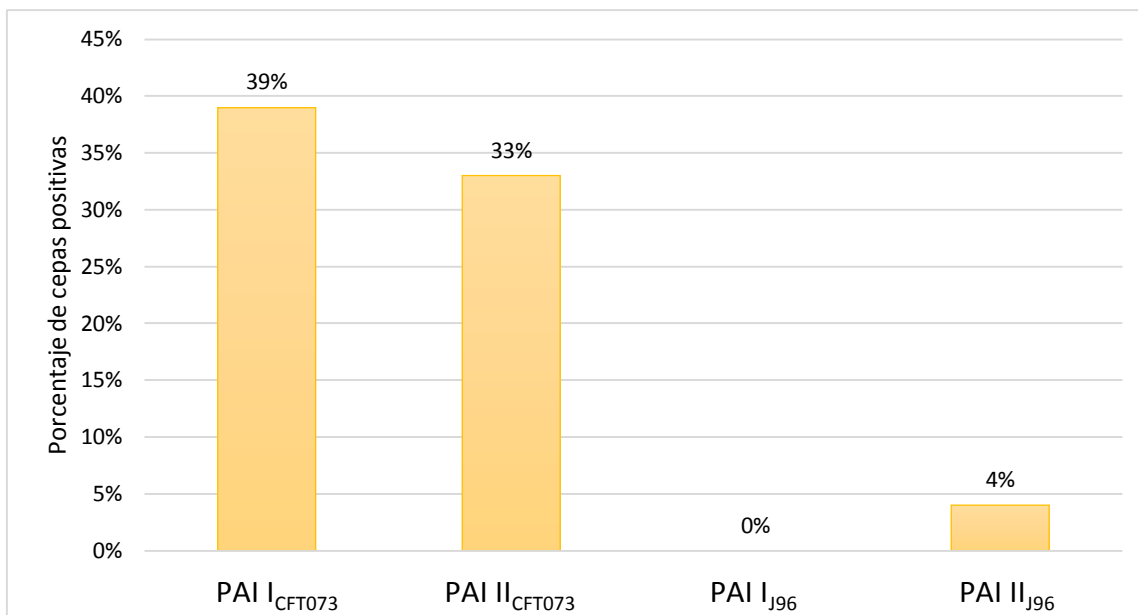


Figura 8. Islas de Patogenicidad presentes en cepas de *E. coli* de pacientes femeninas con ITU (n=51).

Dado que las PAIs portan genes que codifican factores de virulencia se hizo la relación entre la presencia de los factores de virulencia determinados de forma independiente con las PAIs encontradas para observar si existía una relación entre ellas.

Tabla 12. Relación entre los factores de virulencia y las PAIs encontradas.

Genes de virulencia*	PAI ICFT073 (n=20)	PAI II CFT073 (n=17)	PAI II J96 (n=2)
<i>fimH</i>	20	17	2
<i>pap</i>	4	3	2
<i>iha</i>	11	14	1
<i>iucD</i>	14	13	2
<i>fliC</i>	2	1	0
<i>sat</i>	4	2	0
<i>vat</i>	0	0	1
<i>hlyA</i>	6	5	1
<i>cnf-1</i>	5	4	1

*Determinación realizada por Ixtepan-Tejero

8.4. Serotipo de las cepas de UPEC

Se determinó el serotipo de las 51 cepas de UPEC aisladas de mujeres con ITU en colaboración del D.C. Armando Navarro Ocaña de la UNAM. Se encontraron 16 serotipos distribuidos en 43 cepas y 8 cepas fueron no tipificables (NT). Además se encontró que el serotipo más frecuente fue el serotipo O25:H4 con un 22% (n=11) (figura 9).

En la tabla 12 se muestra el serotipo de cada cepa así como sus características de virulencia y resistencia a los antimicrobianos.

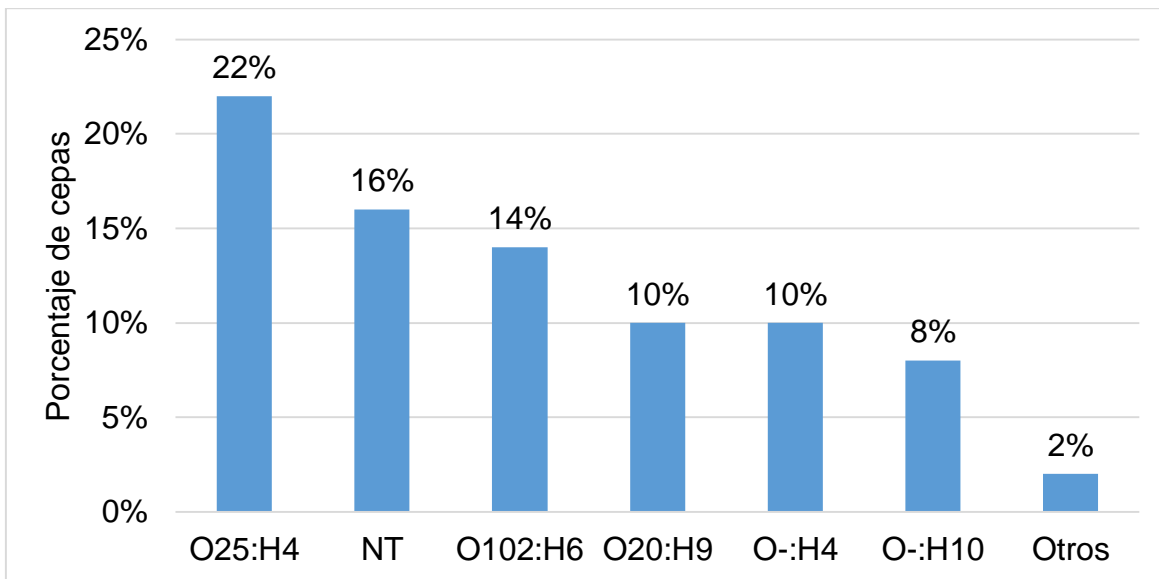


Figura 9. Serotipificación de cepas de UPEC aisladas de mujeres con ITU. NT: no tipificable; Otros incluye 11 serotipos encontrados en una sola cepa y son: O20:H4; O106:H6; O12:H4; O23:H3; O23:H4; O75:H6; O25:H-; O57:H9; O102:H-; O176:H-; y O75:H-.

Tabla 13. Características de virulencia de las cepas tipificables y no tipificables.

Serotipo O25:H4		
Cepa	Perfil de virulencia	Perfil de resistencia

107-I	<i>fimH, papGII, papa, lha, iucD, satA, satP, hlyA, cnf</i>	GM, AMK, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, FOS, TC, NF, C
113-I	<i>fimH, papGII, papa, lha, iucD, fliC, satP, vatP, hlyA</i>	GM, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, TC
114-I	<i>fimH, iucD, satA</i>	GM, AMP, CF, CFX, CRO, CTX, FEP, TC
136-I	<i>fimH, lha, satA, satP</i>	GM, AMK, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, TC
140-I	<i>fimH, papa, lha, iucD, satP, hlyA</i>	GM, AMP, CF, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, TC
149-I	<i>fimH, lha</i>	GM, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, NOR, CIP, OFX, TC, NF, C
153-I	<i>fimH, lha, satA</i>	GM, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX
156-I	<i>fimH, papGII, lha, iucD, satA</i>	GM, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, TC, NF, C
157-I	<i>fimH, papGII, lha, iucD, satA, hlyA</i>	GM, NET, AMK, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, ETP, TC, TSX
163-I	<i>fimH, papGII, lha, iucD, cnf</i>	GM, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, TC
164-I	<i>fimH papGII, lha, iucD, satA, cnf</i>	GM, AMP, CFX, CRO, AMC, NOR, CIP, TC
Cepas No Tificables		
Cepa	Perfil de virulencia	Perfil de resistencia
124-I	<i>fimH</i>	GM, AMK, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, TC
142-I	<i>fimH, papa, fliC, satA, satP</i>	AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, ATM, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, TC

146-I	<i>fimH, papa, iucD, satP, hlyA</i>	AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, TC
151-I	<i>fimH, iucD</i>	GM, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, TC, NF, C
166-I	<i>satA</i>	GM, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, NF, C
169-I	<i>fimH, iucD, vatA, fimH, iucD</i>	GM, AMP, CFX, NOR, CIP, OFX, LVX, CL
171-I	<i>fimH, iucD</i>	AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, CL, TC, TSX, NF, C
175-I	<i>fimH, iucD</i>	GM, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, NOR, OFX, LVX, TC
Serotipo O102:H6		
Cepa	Perfil de virulencia	Perfil de resistencia
105-I	<i>fimH,iucD, fliC</i>	GM, AMK, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, TC, NF, C
106-I	<i>iucD,fimH</i>	GM, AMK, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, TC, TSX, NF, C
123-I	<i>fimH,iucD,satA, papA,satP, hlyA,cfn-1</i>	GM, NET, AMK, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, TC, TSX, NF, C
135-I	<i>fimH,iucD</i>	GM, AMK, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, ETP, TC, TSX, NF, C
139-I	<i>iucD,satA,fimH,iha,papG2,satP,</i>	GM, NET, AMK, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, FOS, TC, TSX, NF, C

165-I	<i>iucD,fimH, satA,hlya</i>	GM, AMK, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, CL, TC, TSX, NF, C
172-I	<i>fimH,iucD, iha</i>	GM, AMK, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, TC, TSX, NF, C
Serotipo O20:H9		
Cepa	Perfil de virulencia	Perfil de resistencia
109-I	<i>iucD,fimH</i>	GM, AMK, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP,ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, TC, NF, C
111-I	<i>iucD,fimH,papA,satP,hlya,cnf-1</i>	AMK, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, TC, NF, C
121-I	<i>fimH</i>	GM, AMK, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, TC, TSX, NF, C
148-I	<i>iucD,fimH,cnf-1</i>	GM, AMK, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, NF, C
152-I	<i>iucD,fimH</i>	GM, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, NF, C
Serotipo O:H4		
Cepa	Perfil de virulencia	Perfil de resistencia
101-I	<i>fimH,iucD,satA, iha</i>	GM, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, FOS, TC, TSX, NF, C
133-I	<i>fimH,iucD,satA, iha</i>	AMK, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, TC, TSX, NF, C

137-I	<i>fimH</i>	AMK, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, TC, TSX, NF, C	
158-I	<i>iucD,satA,fimH,iha,vatA,papG2</i>	GM, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, NOR, CIP, OFX, LVX, TC, TSX, NF, C	
170-I	<i>iucD,fimH,iha,papG2</i>	GM, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, CL, TC	
Serotipo O:-H10			
Cepa	Perfil de virulencia	Perfil de resistencia	
104-I	<i>fimH,iucD</i>	GM, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, FO, TC, NF, C	
116-I	<i>fimH</i>	AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, TSX	
143-I	<i>iucD,fimH,fliC,satP</i>	AMK, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, TC	
147-I	<i>fimH,iha,papG2</i>	GM, AMP, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, TC, TSX, NF, C	
Otros serotipos			
Cepa	Serotipo	Perfil de virulencia	Perfil de resistencia
112-I	O20:H4	<i>iucD,satA,fimH,iha,papG2,papA,satP,hlyA,cnf-1</i>	NET, AMK, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, TC
120-I	O106:H6	<i>fimH,iucD,satA</i>	GM, AMK, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, TC, TSX, NF, C
122-I	O12:H4	<i>fimH,iucD,iha</i>	GM, NET, AMK, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, TSX, NF, C

131-I	O23:H3	<i>fimH</i>	NET, AMK, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, TC, TSX, NF, C
141-I	O23:H4	<i>iucD,fimH,iha,papG2,papA,satP</i>	GM, AMK, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, TC
160-I	O75:H6	<i>iucD,fimH,iha,vatA,papG3</i>	GM, AMP, CF, CFX, CRO, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, CL, TC
119-I	O25:H-	<i>iucD,fimH,iha,vatP,papG2,papA,satP</i>	AMK, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, TC
134-I	O57:H9	<i>fimH</i>	GM, AMK, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, FOS, TC, TSX, NF, C
138-I	O102:H-	<i>iucD,fimH,iha,papG2,papA,satP,hlyA,cnf-1</i>	GM, AMK, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, TC
145-I	O176:H-	<i>iucD,fimH</i>	GM, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, TC, TSX, NF, C
150-I	O75:H-	<i>iucD,fimH,papA,hlyA</i>	GM, AMK, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, NOR, CIP, OFX, LVX, FOS, TC, TSX, NF, C

*Cepas de *E. coli* aisladas de mujeres con ITU. *iucD*: aerobactina; *satA*: región autotransportadora de la toxina secretada; *fliC*: flagelina; *fimH*: adhesina fimbrial del pili tipo 1, *papGII*: adhesina fimbrial pili P; *papGIII*: adhesina fimbrial piliP; *vatA*: región autotransportadora toxina vacuolizante; *vatP*: región peptidasa toxina vacuolizante; *iha*: adhesina homologa IrgA/sideroforo, *hlyA*: hemolisina; *satP*: región peptidasa toxina autotransportadora; *papA*: base pili P, *cnf*: factor necrotizante citotóxico. AMK:Amikacina, GM:Gentamicina, NET:Netilmicina, AMP:Ampicilina, CF:Cefalotina, CFX:Cefuroxima; CRO:Ceftriaxona, CTX:Cefotaxima;

CFZ:Ceftazidima; FEP:Cefepime; ATM:Aztreonam; ETP:Ertapenem; AMC:Ácido clavulánico-Amoxicilina; AN:Ácidonalidíxico; CIP:Ciprofloxacina, OFX:Ofloxacina, NOR:Norfloxacina, LVX:Levofloxacina; NF: Nitrofurantoína FOS:Fosfomicina, TSX:Trimetoprim/sulfametoxazol, C:Cloranfenicol, CL:Colistina y TE:Tetraciclina.

8.5. Determinación alélica de *fimH*

La adhesina fimbrial del pili tipo 1, FimH, de UPEC participa en la interacción inicial con el receptor de la célula hospedera y se ha observado que las variantes de esta adhesina se encuentran asociadas con cepas clínicas con características de virulencia y resistencia diferentes. En la tabla 14 y anexo 2 se muestra la variación alélica de *fimH*, obtenida por secuenciación y análisis como se describe en material y métodos. Aunque el gen *fimH* completo se amplificó y purificó para las 51 cepas, el análisis alélico se realizó solo para 36 de las 51 cepas. Por lo tanto debido a cuestiones de contingencia sanitaria en nuestro país quedó pendiente la secuenciación y análisis del gen *fimH* de 15 cepas. Se encontraron 17 alelos y se observó que el alelo más predominante fue *fimH54* con un 25%, seguido de la presencia de *fimH30* con un 17% y *fimH29* 11% (figura 10).

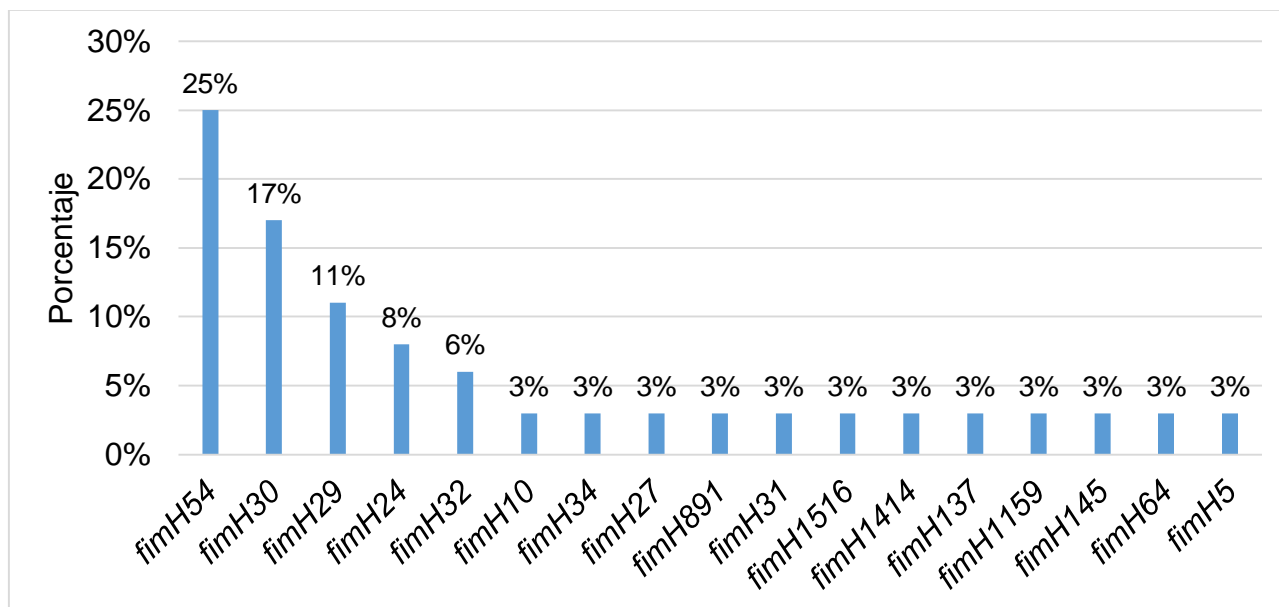


Figura 10. Variación alélica de *fimH* de cepas de *E. coli* aisladas de mujeres con ITU.

Tabla 14. Variación alélica de *fimH* y sus características.

Alelo	Cepa	serotipo	Perfil de virulencia	Perfil de resistencia
<i>fimH54</i>	120-I	O106:H6	<i>fimH,iucD,satA</i>	AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX,TC, NF, C
	124-I	NT	<i>fimH</i>	GM, AMK, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, TC, TSX, C
	142-I	NT	<i>satA,fliC,fimH,papA,satP</i>	AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, TC
	146-I	NT	<i>iucD,fimH,papA,satP,hlyA</i>	AMK, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, TC, TSX, NF, C
	165-I	O102:H6	<i>iucD,fimH,satA,hlyA</i>	GM, AMK, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, CL, TC, TSX, NF, C
	169-I	NT	<i>iucD,fimH,vatA</i>	GM, AMP, CF, CFX, NOR, CIP, OFX, LVX, CL
	170-I	O-:H4	<i>iucD,fimH,iha,papG2</i>	GM, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, CL, TC
	171-I	NT	<i>iucD,fimH</i>	AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, CL, TC, TSX, NF, C
	175-I	NT	<i>iucD,fimH</i>	GM, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, NOR, OFX, LVX, TC

<i>fimH30</i>	140-I	O25:H4	<i>iucD,fimH,iha,papA,satP,hlya</i>	GM, AMP, CF, CFX, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, TC
	141-I	O23:H4	<i>iucD,fimH,iha,papG2,papA,satP</i>	GM, AMK, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, TC
	147-I	O-:H10	<i>fimH,iha,papG2</i>	GM, AMP, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, TC, TSX, NF, C
	157-I	O25:H4	<i>fimH,iucD,satA,ihapapG2,hlya</i>	GM, NET, AMK, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, ETP, TC, TSX
	158-I	O-:H4	<i>iucD,satA,fimH,ihavata,papG2</i>	GM, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, NOR, CIP, OFX, LVX, TC, TSX, NF, C
	163-I	O25:H4	<i>iucD,fimH,iha,papG2,cnf-1</i>	GM, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM., AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, TC
<i>fimH29</i>	105-I	O102:H6	<i>fimH,iucD, fliC</i>	GM, AMK, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, TC, NF, C
	106-I	O102:H6	<i>iucD,fimH</i>	GM, AMK, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, TC, TSX, NF, C
	139-I	O102:H6	<i>iucD,satA,fimH,ihapapG2,satP,</i>	GM, NET, AMK, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, FOS, TC, TSX, NF, C
	172-I	O102:H6	<i>fimH,iucD, iha</i>	GM, AMK, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN,

				NOR, CIP, OFX, LVX, TC, TSX, NF, C
<i>fimH24</i>	111-I	O20:H9	<i>iucD,fimH,papA,satP,hlya,cnf-1</i>	AMK, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, TC, NF, C
	114-I	O25:H4	<i>iucD,satA,fimH</i>	GM, NET, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, TC
	143-I	O-:H10	<i>iucD,fimH,fliC,satP</i>	AMK, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, TC
<i>fimH32</i>	104-I	O-:H10	<i>fimH,iucD</i>	GM, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, FO, TC, NF, C
	107-I	O25:H4	<i>iucD,satA,fimH,ihapapG2,papA,satP,hlya,cnf-1</i>	GM, AMK, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, FOS, TC, NF, C
<i>fimH10</i>	101-I	O-:H4	<i>fimH,iucD,satA,ihapapG2,papA,satP,hlya,cnf-1</i>	GM,AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, FOS, TC, NF, C
<i>fimH34</i>	112-I	O20:H4	<i>iucD,satA,fimH,ihapapG2,papA,satP,hlya,cnf-1</i>	NET, AMK, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, TC
<i>fimH27</i>	121-I	O20:H9	<i>fimH</i>	GM, AMK, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, TC, TSX, NF, C
<i>fimH891</i>	122-I	O12:H4	<i>fimH,iucD,ihapapG2,papA,satP,hlya,cnf-1</i>	GM,AMK,AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX,NF

<i>fimH31</i>	131-I	O23:H3	<i>fimH</i>	NET, AMK, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, TC, TSX, NF, C
<i>fimH1516</i>	136-I	O25:H4	<i>satA, iha, satP</i>	GM, AMK, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, TC, TSX
<i>fimH1414</i>	137-I	O-:H4	<i>fimH</i>	AMK, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, TC, TSX, NF, C
<i>fimH137</i>	145-I	O176:H-	<i>iucD, fimH</i>	GM, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, TC, TSX, NF, C
<i>fimH1159</i>	148-I	O20:H9	<i>iucD, fimH, cnf-1</i>	GM, AMK, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, NF, C
<i>fimH145</i>	150-I	O75:H-	<i>iucD, fimH, papA, hly</i>	GM, AMK, AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, NOR, CIP, OFX, LVX, FOS, TC, TSX, NF, C
<i>fimH64</i>	160-I	O75:H6	<i>iucD, fimH, iha, vatA, papG3</i>	GM, AMP, CF, CFX, CRO, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, CL, TC
<i>fimH5</i>	164-I	O25:H4	<i>fimH, iucD, satA, iha, papG2, cnf-1</i>	GM, AMP, CFX, CRO, AMC, NOR, CIP, OFX, TC, TSX

*Cepas de *E. coli* aisladas de mujeres con ITU. *iucD*: aerobactina; *satA*: región autotransportadora de la toxina secretada; *fliC*: flagelina; *fimH*: adhesina fimbrial del pili tipo 1, *papGII*: adhesina fimbrial pili P; *papGIII*: adhesina fimbrial pili P; *vatA*: región autotransportadora toxina vacuolizante; *vatP*: región peptidasa toxina vacuolizante; *iha*: adhesina homologa IrgA/sideroforo, *hlyA*: hemolisina; *satP*: región peptidasa toxina autotransportadora; *papA*: base pili P, *cnf*: factor necrotizante citotóxico AMK:Amikacina, GM:Gentamicina, NET:Netilmicina, AMP:Ampicilina,

CF:Cefalotina, CFX:Cefuroxima; CRO:Ceftriaxona, CTX:Cefotaxima; CFZ:Ceftazidima; FEP:Cefepime; ATM:Aztreonam; ETP:Ertapenem; AMC:Ácido clavulánico-Amoxicilina; AN:Ácidonalidíxico; CIP:Ciprofloxacina, OFX:Ofloxacina, NOR:Norfloxacina, LVX:Levofloxacina; NF: Nitrofurantoína FOS:Fosfomicina, TSX:Trimetoprim/sulfametoxazol, C:Cloranfenicol, CL:Colistina y TE:Tetraciclina.

8.6. Determinación de genes de transferencia genética. *mobQ* y *traT*

La determinación de los genes asociados a la transferencia genética mediante plásmidos conjugativos, *mobQ* y *traT*, se llevó a cabo mediante PCR's individuales. La figura 11 muestra los geles representativos de los genes involucrados en la transferencia de material genético.

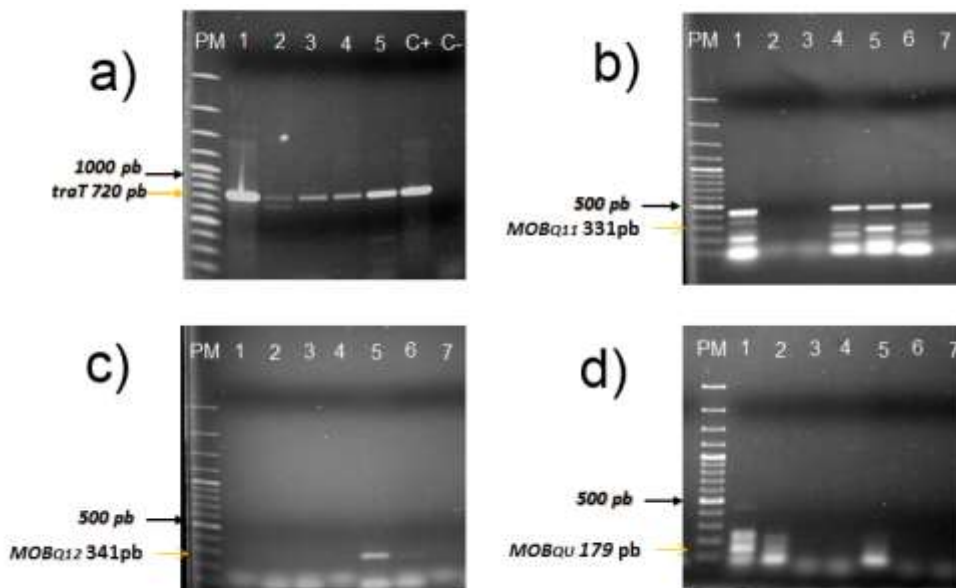


Figura 11. Determinación de genes asociados a la transferencia genética. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. *traT*: proteína de membrana externa; *MOB_{Q11}*, *MOB_{Q12}* y *MOB_{Qu}*: relaxasas. PM: Marcador de Peso Molecular GeneRuler™ 100 pb Plus DNA Ladder. a) gen *traT*: carriles: 1 cepa 101-I, 2 cepa 105-I, 3 cepa 120-I, 4 cepa 122-I, 5 cepa 123-I; C+: control positivo; C-: control negativo. b) gen *MOB_{Q11}*, carriles: 1 cepa 147-I, 2 cepa 148-I, 3 cepa 149-I, 4 cepa 150-I, 5 cepa 151-I, 6 cepa 152-I, 7 cepa 153-I. c) gen *MOB_{Q12}*, carriles: 1 cepa 163-I, 2 cepa 164-I, 3 cepa 165-I, 4 cepa 166-I, 5 cepa 169-I, 6 cepa 170-I, 7 cepa 171-I.

I. d) gen MOB_{Qu} , carriles: 1 cepa 164-I, 2 cepa 165-I, 3 cepa 175-I, 4 cepa 172-I, 5 cepa 171-I, 6 cepa 170-I, 7 cepa 169-I.

Se encontró al gen *traT* con un porcentaje del 53% (n=27). Los genes MOB_Q se encontraron con menor presencia: MOB_{Q11} 2%, MOB_{Q12} 12%, MOB_{Qu} 8% (figura 12).

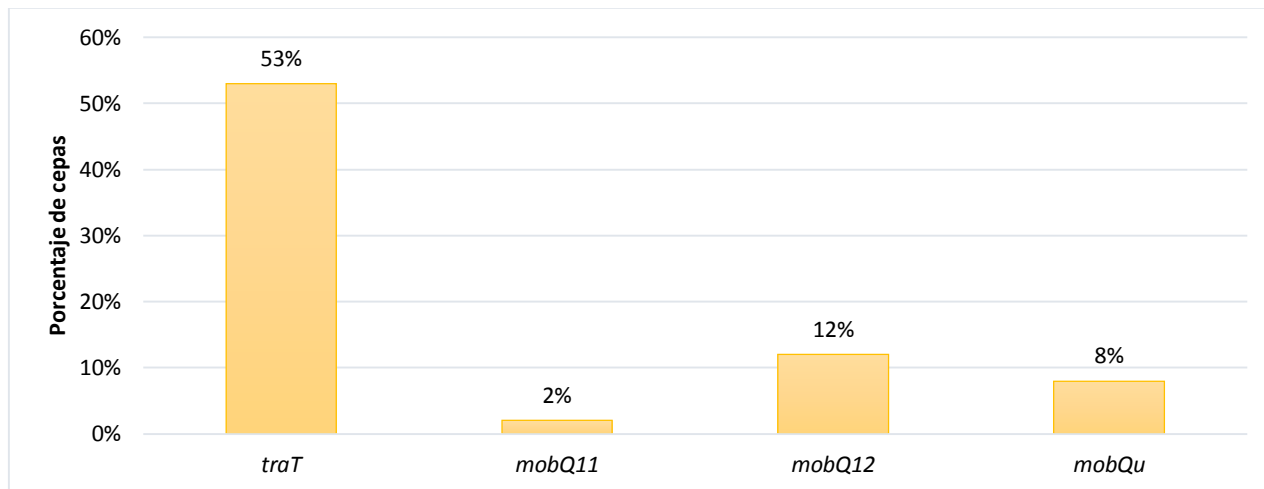


Figura 12. Detección de genes asociados a la transferencia genética de *E. coli* aislada de 51 cepas de pacientes femeninas con ITU. Porcentajes de los genes asociados a la movilidad genética *traT*: proteína de membrana externa (n=27); MOB: relaxasa: MOB_{Q11} (n=1), MOB_{Q12} (n=6) y MOB_{Qu} (n=4).

8.7. Transferencia de material genético por conjugación

La selección de las cepas donadoras para los ensayos de conjugación se basaron en la amplificación de los genes asociados con la movilidad genética: el gen *traT*, la presencia de la relaxasa MOB_{F12} (previamente descrito por Ixtepan-Tejeros). Asimismo, se seleccionaron 10 cepas que presentaron multiresistencia antibiótica, factores de virulencia y sensibilidad al antibiótico rifampicina (tabla 14). La cepa receptora fue la cepa *E. coli* K12 C600 resistencia a rifampicina.

Tabla 15. Características de las cepas de *E. coli* AMP^R aisladas de ITU usadas como cepas donadoras en el proceso de conjugación.

Cepa	Genes de transferencia genética	Perfil de resistencia*	Perfil de virulencia*	Genes de resistencia

101-I	<i>*mobF12/traT</i>	GM,AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, FOS, TC, NF, C	<i>fimH10,iucD,satA,i ha</i>	<i>bla_{TEM}</i>
105-I		GM,AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX,TC, NF, C	<i>fimH29,iucD, fliC</i>	<i>bla_{TEM}, bla_{CTX-M}</i>
120-I		AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX,TC, NF, C	<i>fimH54,iucD,satA</i>	<i>bla_{TEM}</i>
122-I		GM,AMK,AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX,NF	<i>fimH891, iucD, iha</i>	<i>bla_{TEM}, bla_{OXA}, bla_{CTX-M}</i>
123-I		GM,NET,AMK,AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX,TC	<i>fimH,iucD,satA, papA,satP, hlya,cfn</i>	<i>bla_{TEM}, bla_{OXA}, bla_{CTX-M}</i>
133-I		AMK,AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX,TC, NF, C	<i>fimH,iucD,satA, iha,</i>	<i>bla_{TEM}, bla_{CTX-M}</i>

156-I	GM,AMP, CF, CFX CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX,TC, NF, C	<i>fimH,iucD,satA,iha</i> , <i>papG2</i>	<i>bla_{CTX-M}</i>
157-I	GM, NET,AMK,AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, ETP, TC, TSX	<i>fimH30,iucD,satA,iha</i> , <i>papG2, hlyA</i>	<i>bla_{TEM}</i> , <i>bla_{OXA}</i> , <i>bla_{CTX-M}</i>
164-I	GM,AMP,CFX, CRO,AMC,NOR, CIP,TC	<i>fimH5,iucD,satA,ih</i> <i>a, papG2,cnf</i>	<i>bla_{TEM}</i> , <i>bla_{OXA}</i> , <i>bla_{CTX-M}</i>
172-I	AMP, CF, CFX, CRO, CFZ, CTX, FEP, ATM, AMC, AN, NOR, CIP, OFX, LVX, TC, NF, C	<i>fimH29,iucD, iha</i>	<i>bla_{TEM}</i> , <i>bla_{OXA}</i> , <i>bla_{CTX-M}</i>

*Determinación realizada por Ixtepan-Tejero, 2018. *iucD*: aerobactina; *satA*: región autotransportadora de la toxina secretada; *fliC*: flagelina; *fimH*: adhesina fimbrial del pili tipo 1, *papGII*: adhesina fimbrial pili P; *papGIII*: adhesina fimbrial pili P; *vatA*: región autotransportadora toxina vacuolizante; *vatP*: región peptidasa toxina vacuolizante; *iha*: adhesina homologa IrgA/sideroforo, *hlyA*: hemolisina; *satP*: región peptidasa toxina autotransportadora; *papA*: base pili P, *cnf*: factor necrotizante citotóxico. AMK:Amikacina, GM:Gentamicina, NET:Netilmicina, AMP:Ampicilina, CF:Cefalotina, CFX:Cefuroxima; CRO:Ceftriaxona, CTX:Cefotaxima; CFZ:Ceftazidima; FEP:Cefepime; ATM:Aztreonam; ETP:Ertapenem; AMC:Ácido clavulánico-Amoxicilina; AN:Ácidonalidíxico; CIP:Ciprofloxacina, OFX:Ofloxacina, NOR:Norfloxacina, LVX:Levofloxacina; NF: Nitrofurantoína FOS:Fosfomicina, TSX:Trimetoprim/sulfametoxazol, C:Cloranfenicol, CL:Colistina y TE:Tetraciclina.

bla_{TEM}: Beta-lactamasa TEM, *bla_{OXA}*: Beta-lactamasa OXA, *bla_{CTX-M}*: Beta-lactamasa CTX-M.

La conjugación se realizó de dos maneras: fase sólida y fase líquida. La fase líquida fue la primera en realizarse donde se observó que de las 10 cepas seleccionadas el 40% (n=4) de las cepas fueron capaces de conjugarse por este método (cepas 101-I, 120-I, 157-I y 164-I) obteniendo una frecuencia de conjugación de 1.4×10^2 a 2.8×10^3 (tabla 16).

Tabla 16. Frecuencia de conjugación en fase líquida.

Cepa	UFC recuperadas	Frecuencia de conjugación
101-I	285	2.8×10^3
120-I	117	1.1×10^3
157-I	72	7.7×10^2
164-I	14	1.4×10^2

Se seleccionaron de 1 a 4 clones de cada cepa conjugativa. Las cepas transconjugantes fueron seleccionadas por su resistencia a los antibióticos Ampicilina y Rifampicina.

Asimismo, las cepas que no conjugaron en fase líquida se les realizó la conjugación en fase sólida para evaluar su capacidad conjugativa obteniendo que solo 1 cepa el 33% (n=1) fue capaz de conjugarse por este método obteniendo una frecuencia de conjugación de 4×10^1 (tabla 17).

Tabla 17. Frecuencia de conjugación en fase sólida.

Cepa	UFC recuperadas	Frecuencia de conjugación
156-I	4	4×10^1

De la conjugación en fase sólida se seleccionaron de 1 a 4 clones de cada cepa conjugativa. Las cepas transconjugantes fueron seleccionadas por su resistencia a los antibióticos Cefotaxima y Rifampicina.

Las cepas transconjugantes obtenidas fueron evaluadas para determinar su perfil plasmídico, de resistencia virulencia y genes de resistencia.

8.8. Perfil de resistencia de cepas transconjugantes

La determinación de la resistencia antibiótica se realizó por el método de Kirby-Bauer con las interpretaciones que marca el CLSI, 2018.

Las interpretaciones dependieron del tamaño del halo de inhibición generado por la presencia de cada antibiótico y de acuerdo a los criterios del CLSI por cada cepa, se procedió a graficar los porcentajes de resistencia antimicrobiana para los 24 antibióticos que pertenecen a 10 familias, (figura 10).

Todas las cepas transconjugantes (n=10) adquirieron resistencia a ampicilina (100%), cefalotina (100%), cefuroxima (50%), ceftriaxona (40%), cefotaxima (75%), ceftazidima (88%), cefepime (25%), amoxicilina con ácido clavulánico (100%), gentamicina (56%), ácidonalidíxico (20%), ciprofloxacina (50%), ofloxacina (38%), norfloxacina (10%), cloranfenicol (57%) y tetraciclina (60%)

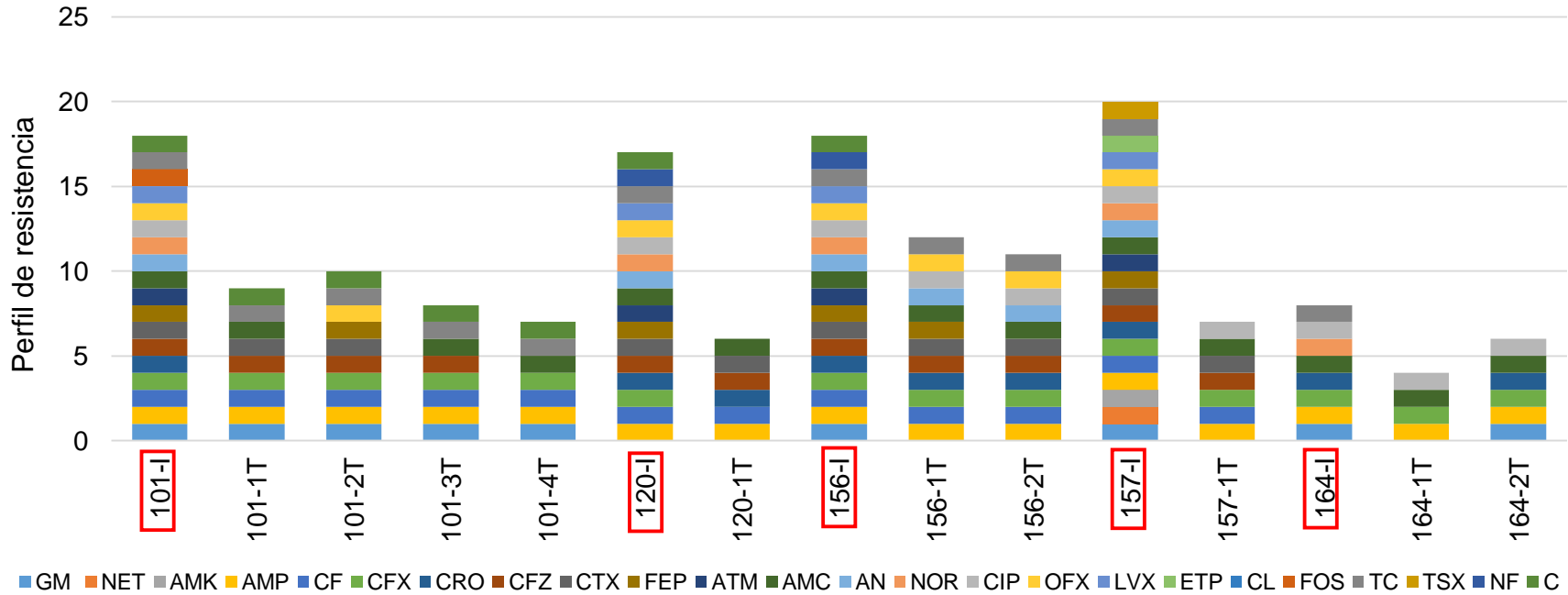


Figura 13. Perfil de resistencia de las cepas donadoras y sus transconjugantes. La prueba de susceptibilidad fue hecha mediante el método de Kirby-Bauer e interpretando acorde con los criterios CLSI, 2018. Las cepas donadoras se encuentran en los recuadros rojos. Amigolucósidos: AMK:Amikacina, GM:Gentamicina, NET:Netilmicina; Beta-lactámicos: AMP:Ampicilina, CF:Cefalotina, CFX:Cefuroxima; CRO:Ceftriaxona, CTX:Cefotaxima; CFZ:Ceftazidima; FEP:Cefepime; ATM:Aztreonam; AMC:Ácido clavulánico-Amoxicilina; Quinolonas: AN:Ácidonalidíxico; CIP:Ciprofloxacina, OFX:Ofloxacina, NOR:Norfloxacin, LVX:Levofloxacina; Carbapenémicos: ETP:Ertapenem; NF: Nitrofurantoína FOS:Fosfomicina, TSX:Trimetoprim/sulfametoxazol, C:Cloranfenicol, CL:Colistina y TE:Tetraciclina.

8.9. Características de virulencia de las cepas transconjugantes

La determinación del perfil de virulencia de las cepas transconjugantes se llevó a cabo por 3 PCR's múltiples y una individual. En la figura 14 se observan geles representativos con sus respectivos patrones de bandeado de acuerdo a los pb de cada uno de los genes de virulencia amplificados.

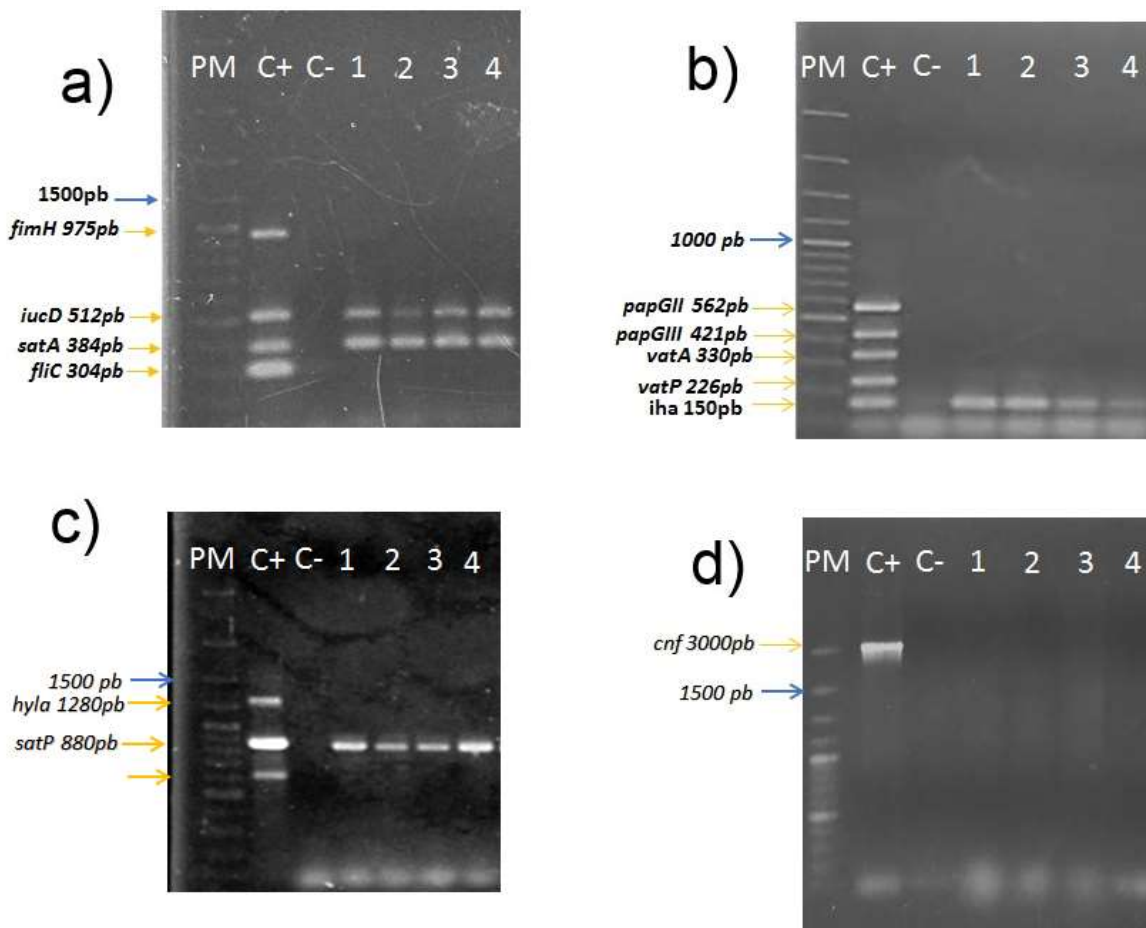


Figura 14. Determinación de genes de virulencia de transconjugantes por PCR. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. PM: Marcador de Peso Molecular GeneRuler™ 100 pb Plus DNA Ladder; C+: control positivo; C-: control negativo. a), b), c) y d) carriles: 1 cepa 101-1T, 2 cepa 101-2T, 3 cepa 101-3T, 4 cepa 101.4T. *iucD*: aerobactina; *satA*: región autotransportadora de la toxina secretada; *fliC*: flagelina; *fimH*: adhesina fimbrial del pili tipo 1, *papGII*: adhesina fimbrial *pili* P; *papGIII*: adhesina fimbrial *pili* P; *vatA*: región autotransportadora toxina vacuolizante; *vatP*: región peptidasa toxina vacuolizante; *iha*: adhesina homologa IrgA/sideroforo, *hyla*: hemolisina; *satP*: región peptidasa toxina autotransportadora; *papA*: base *pili* P, *cnf*: factor necrotizante citotóxico.

En la figura 15 se muestra el número de cepas transconjugantes que adquirieron los factores de virulencia de su cepa donadora, tomando en consideración los diversos factores de virulencia que presenta cada una de las cepas donadoras. El 100% de las cepas transconjugantes adquirieron el gen *iha* seguido los genes *iucD* (80%) y *satA* (70%). Estos genes no estaban presentes en la cepa donadora (cepa C600).

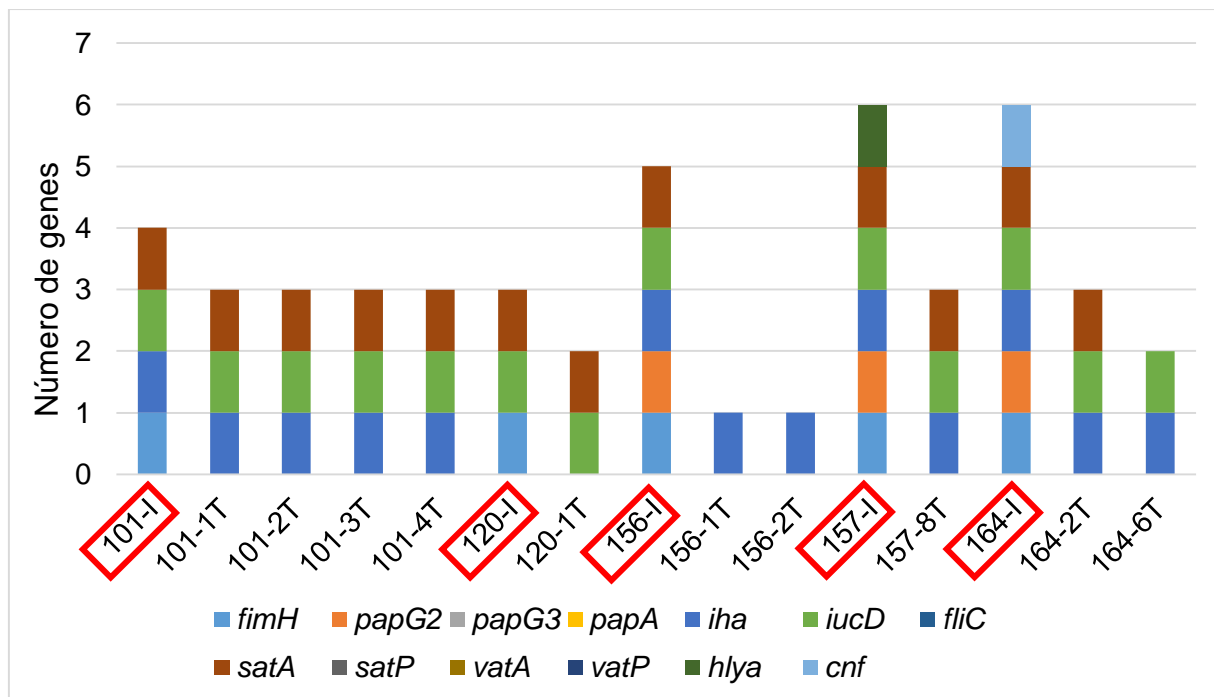


Figura 15. Cepas transconjugantes que adquirieron factores de virulencia. Se muestran los factores de virulencia presentes en las cepas donadoras y sus transconjugantes. Las cepas donadoras se encuentran en los recuadros rojos.

8.10. Genotipificación de resistencia de las cepas transconjugantes

La determinación de los genes *bla* se realizó mediante PCR's individuales. El 40% de las cepas transconjugantes fueron positivas al gen *bla_{TEM}* y el 80% adquirió el gen *bla_{CTX-M}*. En la figura 16 se muestran los genes *bla* de las cepas donadoras y aquellas que fueron adquiridas por las cepas transconjugantes.

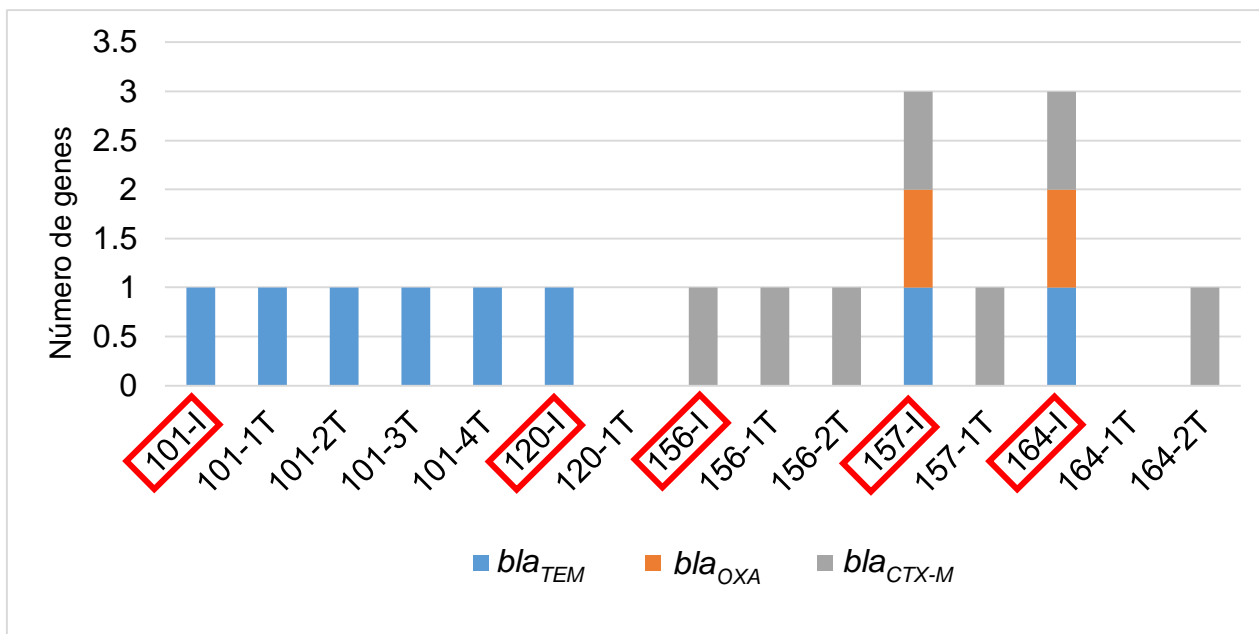


Figura 16. Cepas transconjugantes que adquirieron genes codificantes de BLEEs. Se muestran los genes *bla* presentes en las cepas donadoras y sus transconjugantes. Las cepas donadoras se encuentran en los recuadros rojos.

9. DISCUSIÓN

Las infecciones del tracto urinario representan un problema de salud pública, siendo una de las infecciones más comunes con aproximadamente el 20% de las infecciones notificadas por los centros de atención médica primaria afectando aproximadamente a 150 millones de personas al año. Las ITU afectan a la población en general sin embargo, se presenta mayormente en mujeres que en varones debido a que las bacterias del tracto digestivo pueden contaminar la uretra y comenzar a multiplicarse para causar la infección (CDC, 2020; Demilie *et al*, 2012).

En el presente estudio se trabajó con 51 cepas de *E. coli* aisladas de ITU en pacientes femeninos del Hospital Regional I.S.S.S.T.E de Puebla, con un intervalo de edad de 21 a 86 años, en el periodo de Junio del 2015 a Febrero del 2016. Las pacientes. Como antecedente se sabe que el 90% de las cepas era MDR y el 10% restante XDR. Asimismo, los factores de virulencia más presentes eran la adhesina fimbrial del pili tipo 1 y la adhesina homóloga IrgA (Ixtepan-Tejero, 2018).

Escherichia coli uropatógena es el agente etiológico principal de las ITU, presente en aproximadamente el 80% de las infecciones. Dado que *E. coli* no solo es una bacteria comensal sino que también es responsable de varias infecciones intestinales y extraintestinales, se encontró la existencia de subestructuras genéticas asociadas al sitio de aislamiento de las cepas de *E. coli* patógenas clasificándolas en 7 grupos filogenéticos: A, B1, B2, C, D, E, y F; y dos clados: Clado I y II (Selander *et al.*, 1987; Clermont *et al.*, 2013). Los filogrupos B2, D y F se han asociado en mayor medida a cepas patógenas extraintestinales y los filogrupos A, B1 y C a cepas comensales.

Nuestros resultados indican que el filogrupo predominante en las cepas del estudio es el filogrupo B2 (39%), seguido de los filogrupos A, C y D (16%). Al comparar estos resultados con reportes internacionales de cepas de UPEC aisladas de pacientes de ambos sexos encontramos que estos estudios también reportan al filogrupo B2 como el más predominante (21–52%), seguido en su mayoría por los filogrupos D, A y B1, coincidiendo con nuestros resultados, a excepción del filogrupo B1 (Ali *et al*, 2019; Dadi *et al*, 2020; Cristea *et al*, 2020; Khairy *et al*, 2020). Asimismo,

nuestros resultados también concuerdan con los resultados observados por Ballesteros-Monrreal (2020) en mujeres no gestantes de las ciudades de Puebla y Sonora donde el filogrupo B2 sigue siendo el más predominante con un 52% y 32% respectivamente.

A pesar de que la clasificación filogenética puede predecir el posible potencial patógeno de las cepas causantes de ITU, esto por sí mismo ya no es un indicador de su capacidad de causar daño como se pensaba anteriormente, es decir, los filogrupos considerados comensales presentaban un menor número de factores de virulencia con respecto a los considerados patógenos. Sin embargo, en nuestro trabajo encontramos que la mayoría de los factores de virulencia asociados a UPEC, no se asociaron a un filogrupo en particular, a excepción del Pili tipo P (el cual media la unión de UPEC con las células de riñón) que solo se encontró casi exclusivamente en los filogrupos B2 y D, lo que sugiere que estos siguen siendo los filogrupos con mayor capacidad para producir una ITU alta. En el presente estudio, las cepas comensales (A y B1) poseen un puntaje de virulencia semejante (de 2 a 5) respecto a las cepas de los filogrupos patógenos (de 3 a 5) aun cuando se encontró un número mayor de factores de virulencia en el filogrupo B2 (de 2 a 7). Al comparar nuestros resultados con los de Yazdanpour en Irán (2020), al igual que ellos, la mayoría de los factores de virulencia ya no son exclusivos de un filogrupo en particular aun cuando el filogrupo B2 pueda presentar un mayor número de factores de virulencia como ya se ha reportado también en otros artículos (Moreno *et al*, 2006; Ali *et al*, 2019). No obstante, Johnson *et al* (2004) encontró una relación inversamente proporcional entre la presencia de resistencia con respecto al puntaje de virulencia de acuerdo al grupo filogenético donde observó que los grupos filogenéticos no B2 presentaban una mayor propensión intrínseca para adquirir y/o retener resistencia. Sin embargo, en los resultados observados en este estudio la relación tanto de resistencia como de virulencia no es propio de un filogrupo en particular, dado que la mayoría de las cepas resultaron ser MDR (90%) y el 10% XDR, lo cual concuerda con lo encontrado por Varela *et al* (2017). Esto sugiere que los filogrupos comensales ya no solo se pueden considerar como un reservorio de

resistencia sino como también reservorio de virulencia y que además están adquiriendo mayor capacidad para producir una ITU.

Las Islas de Patogenicidad (PAIs) son los elementos genéticos móviles responsables de la diseminación de factores de virulencia caracterizadas por acarrear una gran cantidad de genes de virulencia, y su presencia puede indicar un alto potencial patógeno. Por ello, en el presente estudio se realizó la búsqueda de cuatro PAIs características de UPEC previamente reportadas en las cepas prototipo CFT073 (PAI I_{CFT073} y II_{CFT073}) y J96 (PAI I_{J96} y II_{J96}). Se encontró la presencia de las PAIs I_{CFT073} y II_{CFT073} en un 39% y 33% respectivamente y de la PAI II_{J96} en un 4%. Los resultados concuerdan con lo reportado por autores internacionales donde las PAIs de CFT073 son las más predominantes en cepas de UPEC (Najafi *et al*, 2017; Ghosh *et al*, 2019; Calhau *et al*, 2015; Tangi *et al*, 2015). Asimismo, en estudios reportados en nuestro país las PAIs de CFT073 siguen siendo predominantes tal como muestran lo reportado por Pérez-Ama (2018) quien también encontró que las PAIs CFT073 era la más predominante con un 61%(n=92).

La presencia de una o varias PAIs en una cepa puede ser característica de una especie, cepa o patotipo en específico. Tal es el caso de las PAIs que se encontraron en el presente trabajo (PAIs I_{CFT073}, II_{CFT073} y II_{J96}) que son PAIs características de UPEC. La presencia de PAIs en cepas clínicas puede ayudar a estimar el potencial patógeno de la cepa que lo porta, es decir, las cepas en las que encontramos la presencia de estas PAIs tienen el potencial de virulencia necesario para desarrollar una ITU alta y daño citotóxico dado que se ha reportado la presencia del operon *pap*, que codifica para el pili asociado a pielonefritis en las PAIs I_{CFT073} y II_{CFT073}, la alfa hemolisina en la PAI I_{CFT073} y el factor de necrosis citotóxico en la PAI II_{J96}. Además, se ha reportado que las PAIs presentan secuencias de inserción que pueden permitir su diseminación demostrando la importancia de la transferencia horizontal de genes para UPEC. Al revisar el porcentaje de coincidencia entre las PAIs y los genes *hlyA*, *papG+papA* y *cnf-1*, reportados en cada una de las PAIs, encontramos una mayor presencia estos genes determinados de forma individual lo que sugiere que estos genes se encuentran

fuera de la PAI pero dentro del genoma de forma individual. Estos resultados contrastan con los reportados por Ballesteros-Monrreal (2020), quien encontró mayor presencia de las PAIs que de los genes reportados en ellas determinados de forma individual.

Por otro lado, al hacer la determinación del serotipo se encontró una gran variedad de serotipos, incluyendo a serotipos asociados a patotipos intestinales como los serotipos O20:H9, O20:H4, O75:H-. El serotipo O20:H9 no solo representa un patotipo intestinal (STEC) sino que además ha sido asociado a cepas asociadas a sepsis neonatal en nuestro país (Carrillo-Casas *et al.*, 2013). Esto indica que las cepas pertenecientes a este serotipo pueden ser cepas híbridas STEC/UPEC. La mayoría de las cepas de este estudio pertenecieron al serotipo O25:H4 (22%), el cual es uno de los serotipos representativos de UPEC y de mayor distribución a nivel mundial. Además, en el presente trabajo las cepas NT se encontraron en un 16% esto contrasta con los resultados reportados por Pérez Ama donde las cepas NT corresponden a un 64% de su cepario de estudio. El encontrar la presencia de cepas NT indica que UPEC no se encuentra restringida a un número limitado de serotipos como se describe en anteriormente (Wiles *et al.*, 2008). Comparando los porcentajes de serotipos encontrados con los trabajos de Sainz *et al.* (2008) y Sharma *et al.* (2016), se observó que también reportaron diferentes serotipos en cepas de UPEC y que también encontraron al serogrupo O75, el cual se sabe que pertenece a un patotipo intestinal (STEC), lo que podría sugerir que este serogrupo puede pertenecer a una cepa híbrida STEC/UPEC. Al hacer un análisis entre el serotipo y las características de virulencia y resistencia de las cepas del presente trabajo, no se encontró una relación en particular.

Uno de los factores de virulencia más representativos de UPEC es la adhesina fimbrial del pili tipo 1, la cual desempeña un papel fundamental no solo en la adherencia, sino que además se asocia con la formación de colonias bacterianas intracelulares y la supervivencia en macrófagos (Vizcarra *et al.*, 2016). FimH en las cepas de UPEC tiende a unirse con mayor especificidad a la manosa que las cepas de patotipos intestinales, es decir, existe en UPEC una variante alélica de *fimH* que

codifica para una adhesina capaz de unirse con más avidez a la manosa y por lo tanto tiene una mayor capacidad adaptativa en el tracto urinario en comparación con un alelo que produce una variante con una actividad de unión a manosa más débil y que además puede facilitar la colonización del tracto urinario (Aprikian *et al*, 2007). Chen *et al* (2009), identificó la presencia de aminoácidos específicos en FimH que evolucionan bajo selección positiva fuera del sitio de unión a manosa y estudió si estas mutaciones afectan la unión de FimH con la manosa; se encontró que algunas mutantes (A62S) disminuyen la capacidad de la adhesina para unirse a su ligando y con ello también disminuyó la colonización, esto como consecuencia de posibles efectos alostéricos provocados por las mutaciones. En el presente trabajo se encontró 17 alelos en 36 cepas analizadas, siendo *fimH54* (27%) el alelo predominante seguido por los alelos *fimH30* (14%), *fimH29* (11%) y *fimH24* (8%). Estas variantes alélicas no se han reportado asociadas a algún serotipo en particular, sin embargo, la mayoría de las cepas que presentaron el alelo *fimH54* fueron no tipificables. Por otro lado, el alelo de *fimH* más diseminado a nivel mundial es el alelo *fimH30* el cual está asociado a la ST131 y al serotipo O25:H4. La mayoría de las cepas con el alelo *fimH30* (n=3, 50%) son del serotipo O25:H4, aunque también pertenecen a los serotipos O:H4, O:H10 y O23:H4, estos últimos se han reportado asociados a cepas diarregénicas (Dahbi *et al*, 2014).

Actualmente son pocos los reportes que consideran el análisis alélico de FimH en cepas UPEC, a excepción del alelo *fimH30* que, como ya se mencionó es uno de los alelos más diseminados a nivel mundial y se encuentra relacionado a la ST131. Sin embargo, el alelo *fimH54* se ha descrito recientemente por Díaz-Jiménez *et al.*, (2020) en un patotipo híbrido EPEC/ExPEC emergente que presenta factores de virulencia tanto intestinales (genes *stx2d*, *eae-xi* y *ehxA*) como extraintestinales (variación alélica MT78 del pili tipo 1 y el gen *traT* asociado a la supervivencia al suero) así como la β -lactamasa CTX-M-32 y pertenece al serogrupo O153:H10 y ST10. Sin embargo a las cepas con el alelo *fimH54* encontradas en el presente estudio, solo se les determino factores de virulencia típicos de UPEC. Asimismo, otros autores han asociado a *fimH54* con cepas de *Escherichia coli* patógena aviar (APEC) (Jørgensen *et al*, 2019; Hayashi *et al*, 2019). Además, Furlan y Stehling

(2019) encontraron este alelo asociado a una cepa de *E. coli* aislada de suelo y perteneciente al serotipo O80:H26. Basándose en estos reportes internacionales se puede sugerir que las cepas con *fimH54* pueden ser cepas híbridas pertenecientes a la ST10, dado que en la mayoría de los artículos ya mencionados este alelo se asocia a esta ST. En el presente estudio, de las 9 cepas *fimH54*, 6 son NT y las otras 3 pertenecen a los serotipos O106:H6, O102:H6 y O:-H4 para los cuales no hay estudios reportados de alelos *fimH*.

De otros alelos encontramos frecuencias de 1 a 3 cepas como por ejemplo alelos *fimH24*, *fimH27* y para los cuales encontramos algunos reportes internacionales. Por ejemplo, el alelo *fimH24* ha sido asociado por Roer *et al* (2018) y Gama *et al* (2020) con la ST410, un clon internacional emergente de alto riesgo que presenta resistencia a fluoroquinolonas, cefalosporinas de tercera generación y carbapenémicos en Noruega. Nuestras cepas pertenecientes a este alelo también poseían resistencia a fluoroquinolonas y cefalosporinas de tercera generación (67%, n=2 en ambos casos) pero eran sensibles a carbapenémicos (100%).

De igual manera, el alelo *fimH27* ha sido reportado como un clon emergente de la ST131 con características particulares, es decir, mientras que las cepas ST131-H30 se presenta como un linaje asociado con ITU con características de virulencia asociados a UPEC (fimbrias tipo P, hemolisinas y factores que confieren una mayor supervivencia a suero y absorción de hierro) en los aislados de ST131-H27 se han encontrado características de virulencia asociadas con patotipos de *E. coli* diarreagénicos (DEC) (Boll *et al*, 2020). Boll *et al*, (2020) y Mandomando *et al* (2020) encontraron que las cepas que presentaban el alelo *fimH27* albergaban genes tanto de ExPEC como de *E. coli* enteroagregativa (EAEC). Estos trabajos pueden sugerir que la cepas que presentan *fimH27* también pueden ser cepas híbridas EAEC/UPEC.

Debido a la falta de información referida sobre los otros alelos encontrados los resultados del presente trabajo abren un panorama más amplio de las características particulares de las cepas que presentan los diferentes alelos

encontrados, respecto a lo reportado en estudios internacionales, lo que podría ofrecer un mayor entendimiento y control de las ITU causadas por UPEC.

UPEC es considerado un agente etiológico versátil en su genoma esto debido a su capacidad para adquirir mediante transferencia horizontal (principalmente a través de conjugación), diversos genes que le han permitido no solo adaptarse a nuevos nichos como el tracto urinario sino que además ha ido adquiriendo resistencia. La resistencia en UPEC es una de las características fundamentales para la sobrevivencia bacteriana, por lo que la adquisición de plásmidos que acarrean no solo genes de virulencia sino también de resistencia es importante para su éxito como patógeno. Los plásmidos desempeñan un papel importante en la diseminación de factores de virulencia y/o resistencia (.).

De los genes importantes para la transferencia a través de conjugación son los genes *mob* y *traT*, los cuales pueden ser un indicador de plásmidos conjugativos. Asimismo, se conoce que los relaxosomas de los plásmidos conjugativos pueden competir entre ellos por la formación del puente conjugativo con la célula receptora lo que podría afectar la transferencia del otro provocando la dominancia de uno de ellos. Uno de los grupos MOB más predominantes en cepas de *E. coli* es MOB_{F12}, que se asocia principalmente la presencia de plásmidos conjugativos grandes y las relaxasas MOB_Q a plásmidos pequeños (Garcillán-Barcia et al, 2009). Previamente, Ixtepan-Tejeros (2018) reportó la presencia de la relaxasa MOB_{F12} (47%) en este cepario de estudio. En este trabajo se encontró la presencia de las relaxasas MOB_{Q12} (12%), MOB_{Qu} (8%) y MOB_{Q11} (2%) y más de la mitad de las cepas (53%) poseía el gen *traT*. La presencia de la relaxasa MOB_Q ha sido también previamente reportada por Barrios-Villa et al (2019) y Carreón-León et al (2019) en cepas de *E. coli* aisladas de alimentos y animales domésticos. Nuestros resultados sugieren la presencia de plásmidos movilizables de diferentes tamaños, aproximadamente de 8kb (plásmidos con relaxasas MOB_Q) a 100kb (plásmidos con relaxasas MOB_F) (Firth et al 2006, Scholz et al, 1989).

Con base en los resultados obtenidos de los genes involucrados en la movilidad genética, se seleccionaron de 10 cepas que resultaron ser MOB y *traT*

positivas, para ser las donadoras en los ensayos de conjugación que se realizaron en fase líquida y fase sólida. De las 10 cepas seleccionadas cuatro (40%) conjugaron en fase líquida con una frecuencia de conjugación que oscilaba entre 1.4×10^2 y 2.8×10^3 , y una cepa conjugó en fase sólida donde la frecuencia de conjugación fue de 4×10^1 . La selección de cepas transconjugantes se realizó con ampicilina (fase líquida) y cefotaxima (fase sólida) por lo que se seleccionaron las transconjugantes que aceptaron el plásmido con dichos determinantes de resistencia. Las cepas transconjugantes lograron adquirir factores de virulencia como adhesinas, la adhesina homóloga IrgA; sistemas de captación de hierro, aerobactina; y toxicidad, proteína autotransportadora vacuolizante. Al comparar nuestros resultados con los de Koga *et al* (2014) observamos que en dicho estudio, las cepas transconjugantes también adquirieron genes para la captación de hierro (aerobactina) y toxicidad (hemolisina). Está documentado que la adquisición de sistemas de captación de hierro y la presencia de toxinas es un paso importante para que UPEC pueda adaptarse al tracto urinario (Mann *et al*, 2017).

Cuando se revisan estudios sobre conjugación en cepas clínicas de UPEC uno de los puntos más relevantes a tomar es la adquisición de resistencia a los antibióticos por parte de las cepas transconjugantes, lo que se ha convertido en un problema de salud pública. Las cepas transconjugantes obtenidas adquirieron resistencia a beta-lactámicos y a aminoglucosidos, estos resultados se parecen a lo obtenido por Poey y Laviña (2018), donde se observó que las cepas transconjugantes habían adquirido resistencia a los antibióticos ampicilina, estreptomina, sulfametoxazol, trimetoprim, cloranfenicol y tetraciclina. Además, Wu *et al* (2010), también reportó la transferencia de resistencia a los antibióticos estreptomina, ampicilina y trimetoprim. Sin embargo, Poey y Laviña, (2018) y Wu *et al* (2018) se reportan que la resistencia a ampicilina no se encuentra codificada dentro del casete de genes de resistencia del integrón de clase 1. Por lo tanto, la resistencia a ampicilina se encontraba fuera del integrón pero, muy probablemente, en el mismo plásmido que la porta. En este sentido se ha observado que un solo agente antimicrobiano podría co-seleccionar cepas resistentes a diferentes clases de antibióticos, implicando la transferencia de varios genes a la misma bacteria y/o

la adquisición de mutaciones en diferentes loci genéticos que afectan a diferentes antimicrobianos (Cantón y Ruiz-Garbajosa, 2011).

La presencia de genes de resistencia, como lo que codifican a las Beta-lactamasas en plásmidos conjugativos es una de las características fundamentales para la sobrevivencia bacteriana dado que permite la diseminación de resistencia a otras bacterias (Guzmán, 2013). En el presente estudio, la mayoría de las cepas transconjugantes (el 80%) adquirió la β -lactamasa CTX-M y el 40% la β -lactamasa TEM. Estos resultados concuerdan con lo reportado en artículos internacionales donde la diseminación de la β -lactamasa CTX-M es la más reportada al igual que la β -lactamasa TEM (Guzmán *et al*, 2013; Kim *et al*, 2011; Lahlaoui *et al*, 2014). Sin embargo, estos resultados contrastan con lo reportado por Martínez-Gorgonio (2019), donde la β -lactamasa TEM fue la más frecuentemente transferida y solo una de sus transconjugantes logró adquirir la β -lactamasa CTX-M.

10. CONCLUSIONES

En este estudio mostramos que la distribución de los factores de virulencia es independiente del grupo filogenético al que pertenezcan las cepas, a excepción a excepción del Pili tipo P que solo se encontró en los filogrupos B2 y D. Asimismo, las cepas MDR y XDR se presentaron en todos los grupos filogenéticos.

La presencia de las PAIs de CFT073 es un marcador característico de las cepas de UPEC en población mexicana dado que son las PAIs más frecuente. La presencia de algunas serotipos como los serotipos O20:H9, O20:H4, O75:H- y alelos de *fimH* como los alelos *fimH54* y *fimH24* sugieren que las cepas que los poseen pueden ser híbridas, esto es muy importante porque pueden ser clonas emergentes.

La conjugación juega un papel importante en la diseminación de genes de resistencia y virulencia en las cepas clínicas analizadas.

11. PERSPECTIVAS

1. Determinar la presencia de cepas híbridas de los patotipos de *E. coli* (EAEC, AIEC, STEC).
2. Determinar la presencia de otras Beta-lactamasas.
3. Encontrar los genes que están confiriendo resistencia antimicrobiana a aminoglicosidos.
4. Determinar las variantes de CTX-M que puedan estar presentes tanto en los aislados clínicos como en las cepas transconjugantes.
5. Realizar ensayos de campos pulsados para la determinación del perfil plasmídico de las cepas transconjugantes y sus donadoras.
6. Encontrar las diferencias a nivel de proteína de los alelos de *fimH*,
7. Realizar ensayos de adherencia e invasión para observar el papel que puede estar desempeñando las variantes alélicas del gen *fimH*.
8. Determinar la secuencia tipo a la que pertenecen las cepas.
9. Buscar la presencia de integrones en las cepas clínicas y transconjugantes.
10. Hacer la determinación de biofilm.
11. Buscar la presencia de otras relaxasas.
12. Hacer la determinación de otras PAIs.
13. Confirmar la presencia de *fimH30* por PCR.

12. REFERENCIAS

Abou Heidar, N. F., Degheili, J. A., Yacoubian, A. A., & Khauli, R. B. (2019). Management of urinary tract infection in women: A practical approach for everyday practice. *Urology annals*, 11(4), 339–346. https://doi.org/10.4103/UA.UA_104_19

Albert X, Huertas I, Pereiró II, Sanfélix J, Gosalbes V, Perrota C. Antibiotics for preventing recurrent urinary tract infection in non-pregnant women. *Cochrane Database Syst Rev*. 2004;2004(3):CD001209. doi: 10.1002/14651858.CD001209.pub2. PMID: 15266443; PMCID: PMC7032641.

Ali I, Rafaque Z, Ahmed I, Tariq F, Graham SE, Salzman E, Foxman B, Dasti JI. (2019). Phylogeny, sequence-typing and virulence profile of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) strains from Pakistan. *BMC Infect Dis*. 19(1):620. doi: 10.1186/s12879-019-4258-y. PMID: 31299909; PMCID: PMC6626394.

Alvarado, A., Garcillán-Barcia, M., & de la Cruz, F. (2012). A degenerate primer MOB typing (DPMT) method to classify gamma-proteobacterial plasmids in clinical and environmental settings. *PloS one*, 7(7), e40438. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040438>

Aprikian, P., Tchesnokova, V., Kidd, B., Yakovenko, O., Yarov-Yarovoy, V., Trinchina, E., Vogel, V., Thomas, W., & Sokurenko, E. (2007). Interdomain interaction in the FimH adhesin of *Escherichia coli* regulates the affinity to mannose. *The Journal of biological chemistry*, 282(32), 23437–23446. <https://doi.org/10.1074/jbc.M702037200>

Aroche F. (2011). Determinación de serotipo, perfil de resistencia y presencia del gen *fliC* y *fimH* en cepas de *Escherichia coli* uropatógena (UPEC). Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Ballesteros-Monrreal, M. G., Arenas-Hernández, M. M., Enciso-Martínez, Y., Martínez-de la Peña, C. F., Rocha-Gracia, R., Lozano-Zaraín, P., Navarro-Ocaña, A., Martínez-Laguna, Y., & de la Rosa-López, R. (2020). Virulence and Resistance Determinants of Uropathogenic *Escherichia coli* Strains Isolated from Pregnant and

Non-Pregnant Women from Two States in Mexico. *Infection and drug resistance*, 13, 295–310. <https://doi.org/10.2147/IDR.S2262>

Barber, A. E., Norton, J. P., Wiles, T. J., & Mulvey, M. A. (2016). Strengths and Limitations of Model Systems for the Study of Urinary Tract Infections and Related Pathologies. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 80(2), 351–367. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00067-15>

Boll, E. J., Overballe-Petersen, S., Hasman, H., Roer, L., Ng, K., Scheutz, F., Hammerum, A. M., Dungu, A., Hansen, F., Johannesen, T. B., Johnson, A., Nair, D. T., Lilje, B., Hansen, D. S., Krogfelt, K. A., Johnson, T. J., Price, L. B., Johnson, J. R., Struve, C., Olesen, B., ... Stegger, M. (2020). Emergence of Enteroaggregative *Escherichia coli* within the ST131 Lineage as a Cause of Extraintestinal Infections. *mBio*, 11(3), e00353-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.00353-20>

Barrios-Villa, E. (2019). Estudio De La Transferencia Genética De La Resistencia A Antimicrobianos En *Escherichia coli* Aisladas De Diferentes Origenes Y Genómica Comparativa De Cepas St131. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Burmeister A. R. (2015). Horizontal Gene Transfer. *Evolution, medicine, and public health*, 2015(1), 193–194. <https://doi.org/10.1093/emph/eov018>

Cantón, R., & Ruiz-Garbajosa, P. (2011). Co-resistance: an opportunity for the bacteria and resistance genes. *Current opinion in pharmacology*, 11(5), 477–485. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2011.07.007>

Carattoli A. (2009). Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* 53:2227–2238.

Carreón-León, E. (2019). Estudio Molecular De La Resistencia Y Virulencia De Cepas De *Escherichia coli* Productoras De B-Lactamasas De Espectro Extendido Aisladas De Vegetales Crudos. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Chatterjee, S., & Raval, I. H. (2019). Pathogenic Microbial Genetic Diversity with Reference to Health. *Microbial Diversity in the Genomic Era*, 559–577. [doi:10.1016/b978-0-12-814849-5.00032-0](https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814849-5.00032-0)

Chaudhuri, R. R., & Henderson, I. R. (2012). The evolution of the *Escherichia coli* phylogeny. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 12(2), 214–226. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.01.005>

Chen, S. L., Hung, C. S., Pinkner, J. S., Walker, J. N., Cusumano, C. K., Li, Z., Bouckaert, J., Gordon, J. I., & Hultgren, S. J. (2009). Positive selection identifies an in vivo role for FimH during urinary tract infection in addition to mannose binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(52), 22439–22444. <https://doi.org/10.1073/pnas.0902179106>

Choudhuri, Supratim. (2014). *Fundamentals of Molecular Evolution*. 10.1016/B978-0-12-410471-6.00002-5.

Clark, D. P., & Pazdernik, N. J. (2013). *Molecular Evolution*. *Molecular Biology*, e673–e679. doi:10.1016/b978-0-12-378594-7.00061-5

Clark, D., Pazdernik, N., McGehee, M. (2019). *Plasmids*. En *Molecular Biology (Third Edition)*. 712-748. United Kingdom: Academic Press.

Clermont O, Christenson JK, Denamur E, Gordon DM. (2013). The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environ Microbiol Rep*. 5(1):58-65. doi: 10.1111/1758-2229.12019. Epub 2012 Dec 24. PMID: 23757131.

Clermont, O., Bonacorsi, S., & Bingen, E. (2000). Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Applied and environmental microbiology*, 66(10), 4555–4558. <https://doi.org/10.1128/aem.66.10.4555-4558.2000>

Cusumano, CK. Hung, CS. Chen, SL. & Hultgren, SJ. (2010). Virulence Plasmid Harbored by Uropathogenic *Escherichia coli* Functions in Acute Stages of Pathogenesis. *Infection and Immunity*. 78(4): 1457–1467

Dadi, B. R., Abebe, T., Zhang, L., Mihret, A., Abebe, W., & Amogne, W. (2020). Distribution of virulence genes and phylogenetics of uropathogenic *Escherichia coli*

among urinary tract infection patients in Addis Ababa, Ethiopia. *BMC infectious diseases*, 20(1), 108.

Dahbi G, Mora A, Mamani R, López C, Alonso MP, Marzoa J, Blanco M, Herrera A, Viso S, García-Garrote F, Tchesnokova V, Billig M, de la Cruz F, de Toro M, González-López JJ, Prats G, Chaves F, Martínez-Martínez L, López-Cerezo L, Denamur E, Blanco J. (2014). Molecular epidemiology and virulence of *Escherichia coli* O16:H5-ST131: comparison with H30 and H30-Rx subclones of O25b:H4-ST131. *Int J Med Microbiol.* 304(8):1247-57. doi: 10.1016/j.ijmm.2014.10.002. Epub 2014 Oct 14. PMID: 25455219.

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>

Díaz-Jiménez, D., García-Meniño, I., Herrera, A., García, V., López-Beceiro, A. M., Alonso, M. P., Blanco, J., & Mora, A. (2020). Genomic Characterization of *Escherichia coli* Isolates Belonging to a New Hybrid aEPEC/ExPEC Pathotype O153:H10-A-ST10 eae-beta1 Occurred in Meat, Poultry, Wildlife and Human Diarrheagenic Samples. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 9(4), 192. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9040192>

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

Feng, Y., Mannion, A., Madden, C. M., Swennes, A. G., Townes, C., Byrd, C., Marini, R. P., & Fox, J. G. (2017). Cytotoxic *Escherichia coli* strains encoding colibactin and cytotoxic necrotizing factor (CNF) colonize laboratory macaques. *Gut pathogens*, 9, 71. <https://doi.org/10.1186/s13099-017-0220-y>

Firth, N. and Skurray, R.A. (2014). Genetics: Accessory Elements and Genetic Exchange. In *Gram-Positive Pathogens* (eds V.A. Fischetti, R.P. Novick, J.J. Ferretti, D.A. Portnoy and J.I. Rood). doi:10.1128/9781555816513.ch33

Flores I. (2015). Factores de Virulencia y Determinación plasmídica de *Escherichia coli* Uropatógena aislada de pacientes con displasia cervical. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

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>

Foxman B, Barlow R, D'Arcy H, Gillespie B, Sobel JD. (2000). Urinary tract infection: self-reported incidence and associated costs. *Ann Epidemiol.* 10(8):509-15. doi: 10.1016/s1047-2797(00)00072-7. PMID: 11118930.

Gama, J. A., Kloos, J., Johnsen, P. J., & Samuelsen, Ø. (2020). Host dependent maintenance of a blaNDM-1-encoding plasmid in clinical *Escherichia coli* isolates. *Scientific reports*, 10(1), 9332. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66239-8>

García-García, David. (2018). Estudio de determinación de virulencia en cepas de *Escherichia coli* uropatógena de un hospital del sector público. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Garcillán-Barcia, M. P., Francia, M. V., & de la Cruz, F. (2009). The diversity of conjugative relaxases and its application in plasmid classification. *FEMS microbiology reviews*, 33(3), 657–687. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00168.x>

Garénaux, A., Caza, M., & Dozois, C. M. (2011). The Ins and Outs of siderophore mediated iron uptake by extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Veterinary microbiology*, 153(1-2), 89–98. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.05.023>

Ghosh, A., Mukherjee, M. (2019). Incidence of multidrug resistance, pathogenicity island markers, and pathoadaptive FimH mutations in uropathogenic *Escherichia coli* isolated from asymptomatic hospitalized patients. *Folia Microbiol* 64, 587–600. <https://doi.org/10.1007/s12223-019-00685-4>

Gordon D. M., Clermont O., Tolley H., Denamur E. (2008) Assigning *Escherichia coli* strains to phylogenetic groups: multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method. *Environ Microbiol*10:2484–2496

Griffiths AJF, Gelbart WM, Miller JH, *et al.* Modern Genetic Analysis. New York: W. H. Freeman; 1999. Bacterial Conjugation. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21351/>

Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT, *et al.* An Introduction to Genetic Analysis. 7th edition. New York: W. H. Freeman; 2000. Bacterial conjugation. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21942/>

Guzmán L, Militza, Rodríguez, Eliosmar, Antón C, Karen, Silva, Suyin, Navarro, Jhonilys, Lastra, Lorianys, Salazar de V, Elsa, & Alonso, Guillermina. (2013). Genes blaTEM, blaSHV y blaCTX-M en enterobacterias productoras de b-lactamasas de espectro extendido aisladas de pacientes con infección intrahospitalaria. *Investigación Clínica*, 54(3), 235-245. Recuperado en 23 de septiembre de 2020, de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0535-51332013000300002&lng=es&tlng=es.

Hacker, J & Kaper, JB. (2000). Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu. Rev. Microbiol.* 54:641–79.

Hallstrom, K. N., & McCormick, B. A. (2015). Pathogenicity Islands. *Molecular Medical Microbiology*, 303–314. doi:10.1016/b978-0-12-397169-2.00016-0

Hayashi, W., Tanaka, H., Taniguchi, Y., Iimura, M., Soga, E., Kubo, R., Matsuo, N., Kawamura, K., Arakawa, Y., Nagano, Y., & Nagano, N. (2019). Acquisition of mcr-1 and Cocarriage of Virulence Genes in Avian Pathogenic *Escherichia coli* Isolates from Municipal Wastewater Influent in Japan. *Applied and environmental microbiology*, 85(22), e01661-19. <https://doi.org/10.1128/AEM.01661-19>

Hobot, J. A. (2015). Bacterial Ultrastructure. *Molecular Medical Microbiology*, 25–27. doi:10.1016/b978-0-12-397169-2.00002-0

Ibarra M. (2015). Análisis de determinantes de patogenicidad de cepas de *Escherichia coli* aisladas de infecciones de tracto urinario. multirresistente. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Iebba, V., Conte, M. P., Lepanto, M. S., Di Nardo, G., Santangelo, F., Aloï, M., Totino, V., Checchi, M. P., Longhi, C., Cucchiara, S., & Schippa, S. (2012). Microevolution in *fimH* gene of mucosa-associated *Escherichia coli* strains isolated from pediatric patients with inflammatory bowel disease. *Infection and immunity*, 80(4), 1408–1417. <https://doi.org/10.1128/IAI.06181-11>

Iebba, V., Conte, M. P., Lepanto, M. S., Di Nardo, G., Santangelo, F., Aloï, M., Totino, V., Checchi, M. P., Longhi, C., Cucchiara, S., & Schippa, S. (2012). Microevolution in *fimH* gene of mucosa-associated *Escherichia coli* strains isolated from pediatric patients with inflammatory bowel disease. *Infection and immunity*, 80(4), 1408–1417. <https://doi.org/10.1128/IAI.06181-11>

Ixtepan-Tejero, C. (2018). Características de virulencia, resistencia y transferencia del material genético en cepas de *E. coli* uropatógena. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Jain R, Rivera MC, Moore JE, Lake JA. (2003) Horizontal gene transfer accelerates genome innovation and evolution. *Mol Biol Evol.* 20(10):1598-602. doi: 10.1093/molbev/msg154. Epub 2003 May 30. PMID: 12777514.

Johnson J., & A. Stell. (2000). Extended Virulence Genotypes of *Escherichia coli* Strains from Patients with Urosepsis in Relation to Phylogeny and Host Compromise. *J Infect Dis.*;181(1):261-72. Johnson J., B. Johnston, C. Clabots, M. Kuskowski, M. Castanheira. 2010. *Escherichia coli* sequence type ST131 as the major cause of serious multidrug-resistant *E. coli* infections in the United States. *Clin Infect Dis*;51(3):286-94.

Johnson JR, Kuskowski M, Denamur E, Elion J, Picard B. (2000). Clonal origin, virulence factors, and virulence, *Infect Immun.* 68:424-5.

Johnson JR, Kuskowski MA, Gajewski A, Sahm DF, Karlowsky JA. (2004). Virulence characteristics and phylogenetic background of multidrug-resistant and

antimicrobial-susceptible clinical isolates of *Escherichia coli* from across the United States, 2000-2001. J Infect Dis. 15;190(10):1739-44. doi: 10.1086/425018. Epub 2004 Oct 7. PMID: 15499527.

Johnson JR, Kuskowski MA, Smith K, O'Bryan TT, Tatini S. Antimicrobial-resistant and extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in retail foods, J Infect Dis (in press)

Johnson JR, O'Bryan TT, Kuskowski MA, Maslow JN. (2001). Ongoing horizontal and vertical transmission of virulence genes and papA alleles among *Escherichia coli* blood isolates from patients with diverse-source bacteremia, Infect Immun. 69:5363-74

Johnson, J., & Stell A. (2000). Extended Virulence Genotypes of *Escherichia coli* Strains from Patients with Urosepsis in Relation to Phylogeny and Host Compromise. J Infect Dis.;181(1):261-72. <https://doi.org/10.1086/315217>

Jørgensen, S. L., Stegger, M., Kudirkiene, E., Lilje, B., Poulsen, L. L., Ronco, T., Pires Dos Santos, T., Kiil, K., Bisgaard, M., Pedersen, K., Nolan, L. K., Price, L. B., Olsen, R. H., Andersen, P. S., & Christensen, H. (2019). Diversity and Population Overlap between Avian and Human *Escherichia coli* Belonging to Sequence Type 95. mSphere, 4(1), e00333-18. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00333-18>

Kaper, J., Nataro, J. & Mobley, H. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol. 2:123–140 <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>

Karaolis, D. K. R. (2001). Pathogenicity Islands. Encyclopedia of Genetics, 1422–1424. doi:10.1006/rwgn.2001.1646

Kim, J., Bae, I. K., Jeong, S. H., Chang, C. L., Lee, C. H., & Lee, K. (2011). Characterization of IncF plasmids carrying the blaCTX-M-14 gene in clinical isolates of *Escherichia coli* from Korea. The Journal of antimicrobial chemotherapy, 66(6), 1263–1268. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr106>

Kim., K. (2013). Meningitis-associated *Escherichia coli*. En *Escherichia coli* (Second Edition) Pathotypes and Principles of Pathogenesis. 305-330. United Kingdom: Academic Press.

Koga, V. L., Tomazetto, G., Cyoia, P. S., Neves, M. S., Vidotto, M. C., Nakazato, G., & Kobayashi, R. K. (2014). Molecular screening of virulence genes in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from human blood culture in Brazil. *BioMed research international*, 2014, 465054. <https://doi.org/10.1155/2014/465054>

Koves, B., & Wullt, B. (2016). The roles of the host and the pathogens in urinary tract infections. *Eur. Urol. Suppl.* 15, 88–94. doi: 10.1016/j.eursup.2016.04.005

Lahlaoui, H., De Luca, F., Maradel, S., Ben-Haj-Khalifa, A., Ben Hamouda, H., Kheder, M., Ben Moussa, M., Rossillini, G. M., & Docquier, J. D. (2015). Occurrence of conjugative IncF-type plasmids harboring the blaCTX-M-15 gene in Enterobacteriaceae isolates from newborns in Tunisia. *Pediatric research*, 77(1-1), 107–110. <https://doi.org/10.1038/pr.2014.153>

Lane MC, Mobley HL. (2007). Role of P-fimbrial-mediated adherence in pyelonephritis and persistence of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) in the mammalian kidney. *Kidney Int.* 72(1):19-25. doi: 10.1038/sj.ki.5002230. Epub 2007 Mar 28. PMID: 17396114.

Lebba, V. Conte, P. Lepanto, M. Di Nardo, M. Santangelo, F. Aloj, M. *et al.* 2012. Microevolution in *fimH* Gene of Mucosa-Associated *Escherichia coli* Strains Isolated from Pediatric Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Infec and Inmunity.* 80 (4): 1408–1417.

Li, Q., Chang, W., Zhang, H., Hu, D., & Wang, X. (2019). The Role of Plasmids in the Multiple Antibiotic Resistance Transfer in ESBLs-Producing *Escherichia coli* Isolated From Wastewater Treatment Plants. *Frontiers in microbiology*, 10, 633. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00633>

López-Banda, D. A., Carrillo-Casas, E. M., Leyva-Leyva, M., Orozco-Hoyuela, G., Manjarrez-Hernández, Á. H., Arroyo-Escalante, S., Moncada-Barrón, D., Villanueva-Recillas, S., Xicohtencatl-Cortes, J., & 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, 959206. <https://doi.org/10.1155/2014/959206>

Makarenkov, V., Kevorkov, D., & Legendre, P. (2006). Phylogenetic Network Construction Approaches. *Applied Mycology and Biotechnology*, 61–97. doi:10.1016/s1874-5334(06)80006-7

Mann, R., Mediati, D. G., Duggin, I. G., Harry, E. J., & Bottomley, A. L. (2017). Metabolic Adaptations of Uropathogenic *E. coli* in the Urinary Tract. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 7, 241. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00241>

Márquez, C., Labbate, M., Raymondo, C., Fernández, J., Gestal, A. M., Holley, M., Borthagaray, G., & Stokes, H. W. (2008). Urinary tract infections in a South American population: dynamic spread of class 1 integrons and multidrug resistance by homologous and site-specific recombination. *Journal of clinical microbiology*, 46(10), 3417–3425. <https://doi.org/10.1128/JCM.00835-08>

Martínez J. (2012). Determinación del serotipo y presencia de genes de virulencia en cepas de *E. coli* uropatógena (UPEC) multirresistente. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Martínez-Gorgonio, E. (2019). “Búsqueda de la Secuencia Tipo 131 de UPEC O25:H4 aisladas de población mexicana: características de virulencia y resistencia. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Mathers A., G. Peirano, J. Pitout. 2015. *Escherichia coli* ST131: el ejemplo por excelencia de un clon multirresistente internacional de alto riesgo. *Adv Appl Microbiol.*; 90: 109-54.

McLellan, L. K., & Hunstad, D. A. (2016). Urinary Tract Infection: Pathogenesis and Outlook. *Trends in molecular medicine*, 22(11), 946–957. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2016.09.003>

Miranda-Estrada, L. I., Ruíz-Rosas, M., Molina-López, J., Parra-Rojas, I., González-Villalobos, E., & Castro-Alarcón, N. (2017). Relationship between virulence factors, resistance to antibiotics and phylogenetic groups of uropathogenic *Escherichia coli* in two locations in Mexico. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (English Ed.)*, 35(7), 426–433.

Mobley H. 2016. Measuring *Escherichia coli* Gene Expression during Human Urinary Tract Infections. *Pathog*; 5(1): 7.

Molina T. (2011). Serotipificación, perfil de resistencia antimicrobiana y presencia de los genes *pap* y *hlyA* en *E. coli* uropatógena (UPEC). Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Moreno E., G. Prats, I. Planells, A. Planes, T. Pérez, A. Andreu. (2006). Caracterización de *Escherichia coli* de los grupos filogenéticos A y B1 causantes de infección extraintestinal. *Enferm Infecc Microbiol Clin*; 24(8):483-9.

Mulvey MA. (2002). Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol*. 4(5):257-71. doi: 10.1046/j.1462-5822.2002.00193.x. PMID: 12027955

Najafi A, Hasanpour M, Askary A, Aziemzadeh M, Hashemi N. (2018). Distribution of pathogenicity island markers and virulence factors in new phylogenetic groups of uropathogenic *Escherichia coli* isolates. *Folia Microbiol (Praha)*. 63(3):335-343. doi: 10.1007/s12223-017-0570-3. Epub 2017 Dec 3. PMID: 29199378.

Nielubowicz, G. R. & Mobley, H. L. Host–pathogen interactions in urinary tract infection. *Nature Rev. Urol*. 2010; 7:430–441.

O'Brien, VP. Hannan, TJ. Nielsen, HV. Hultgren, SJ. (2016). Drug and Vaccine Development for the Treatment and Prevention of Urinary Tract Infections. *Microbiol Spectr*. 4(1): doi:10.1128/microbiolspec.UTI-0013-2012.

Osborn AM, da Silva Tatley FM, Steyn LM, Pickup RW, Saunders JR. (2000). Mosaic plasmids and mosaic replicons: evolutionary lessons from the analysis of genetic diversity in IncFII-related replicons. *Microbiology (Reading)*. 146(9):2267-2275. doi: 10.1099/00221287-146-9-2267. PMID: 10974114.

Pérez-Ama, A. (2018). Estudio De Las Propiedades De Virulencia En Cepas De *Escherichia coli* Uropatógena. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Poey, ME & Laviña, M. (2018). Horizontal transfer of class 1 integrons from uropathogenic *Escherichia coli* to *E. coli* K12. *Micro Patho*.117: 16–22

Raghavendra, P., & Pullaiah, T. (2018). Future of Cellular and Molecular Diagnostics. *Advances in Cell and Molecular Diagnostics*, 203–270. doi:10.1016/b978-0-12-813679-9.00008-7

Raz R. (2011). Urinary tract infection in postmenopausal women. *Korean J Urol*. 52:801–8

Rijavec, M. Erjavec, MS. Avgustin, JA. Reissbrodt, R. Fruth, A. Kriz'an-Hergouth, V. (2006). High Prevalence of Multidrug Resistance and Random Distribution of Mobile Genetic Elements Among Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) of the Four Major Phylogenetic Groups. *Current Microbiology*. 53: 158–162.

Robinson D, Giarenis I, Cardozo L. The management of urinary tract infections in octogenarian women. *Maturitas*. 2015;81:343–347. doi: 10.1016/j.maturitas.2015.04.014.

Roer, L., Overballe-Petersen, S., Hansen, F., Schønning, K., Wang, M., Røder, B. L., Hansen, D. S., Justesen, U. S., Andersen, L. P., Fulgsang-Damgaard, D., Hopkins, K. L., Woodford, N., Falgenhauer, L., Chakraborty, T., Samuelsen, Ø., Sjöström, K., Johannesen, T. B., Ng, K., Nielsen, J., Ethelberg, S., ... Hasman, H. (2018). *Escherichia coli* Sequence Type 410 Is Causing New International High-Risk Clones. *mSphere*, 3(4), e00337-18. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00337-18>

Rogers BA, Sidjabat HE, Paterson DL. (2011). *Escherichia coli* O25b-ST131: a pandemic, multiresistant, community-associated strain. *J Antimicrob Chemother*. 66:1-14.

Sabaté, M., & Prats, G. (2002). Estructura y función de los integrones [Structure and function of integrons]. *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica*, 20(7), 341–345. [https://doi.org/10.1016/s0213-005x\(02\)72813-9](https://doi.org/10.1016/s0213-005x(02)72813-9)

Sabate, M., Moreno, E., Pérez, T., Andreu, A., & Prats, G. (2006). Pathogenicity island markers in commensal and uropathogenic *Escherichia coli* isolates. *Clin Microbiol Infect*, 12(1), 880-886. doi:10.1111/j.1469-0691.2006.01461.x

Sainz E., Teresita del Rosario, & Reyes M., Violeta, & Vicente P., Jazmin, & Serapio-Alva, Reyna, & Zárata, Martha Patricia, & Navarro, Armando, & Eslava C., Carlos (2008). Resistencia a antimicrobianos de cepas de *E. coli* de diversos serotipos aisladas de pacientes de un Hospital Psiquiátrico. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 39(4),18-25.[fecha de Consulta 25 de Octubre de 2020]. ISSN: 1870-0195. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=579/57911113004>

Samei, A., Haghi, F. & Zeighami, H. (2016). Distribution of pathogenicity island markers in commensal and uropathogenic *Escherichia coli* isolates. *Folia Microbiol* 61, 261–268.

Samei, A., Haghi, F., & Zeighami, H. (2016). Distribution of pathogenicity island markers in commensal and uropathogenic *Escherichia coli* isolates. *Folia microbiologica*, 61(3), 261–268. <https://doi.org/10.1007/s12223-015-0433-8>

San-Millan A. (2018). Evolution of Plasmid-Mediated Antibiotic Resistance in the Clinical Context. *Trends in microbiology*, 26(12), 978–985. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.06.007>

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>

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>

Sharma, S., Kaur, N., Malhotra, S., Madan, P., Ahmad, W., & Hans, C. (2016). Serotyping and Antimicrobial Susceptibility Pattern of *Escherichia coli* Isolates from

Urinary Tract Infections in Pediatric Population in a Tertiary Care Hospital. Journal of pathogens, 2016, 2548517. <https://doi.org/10.1155/2016/2548517>

SINAVE/DGE/SALUD. Información epidemiológica de morbilidad. Anuario 2019, Versión ejecutiva; 2019. México, D.F.: Secretaría de Salud. Disponible en https://epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/2019/principales/nacional/grupo_edad.pdf

Tangi, S. C., Tajbakhsh, E., Soleimani, N. A., & Shahraki, M. M. (2015). Prevalence of pathogenicity island markers genes in uropathogenic *Escherichia coli* isolated from patients with urinary tract infectious. Asian Pacific Journal of Tropical Disease, 5(8), 662–666. doi:10.1016/s2222-1808(15)60909-4

Tolozza, L., Giménez, R., Fábrega, M. J., Alvarez, C. S., Aguilera, L., Cañas, M. A., Martín-Venegas, R., Badía, J., & Baldomà, L. (2015). The secreted autotransporter toxin (Sat) does not act as a virulence factor in the probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917. BMC microbiology, 15, 250. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0591-5>

Torres M, Mattera A. (2006). Infección urinaria. Temas de Bacteriología y Virología Médica. Universidad de la República; Facultad de Medicina; Departamento de Bacteriología y Virología; Instituto de Higiene. 2 ed. Montevideo: FEFMUR;189–196.

Torres M, Mattera A. Infección urinaria. (2010). Revista del Departamento de Microbiología de la Universidad de Barcelona España. 191-196.

Totsika M, Moriel DG, Idris A, Rogers BA, Wurpel DJ, Phan MD, Paterson DL, Schembri MA. Uropathogenic *Escherichia coli* mediated urinary tract infection. Curr Drug Targets. 2012 Oct;13(11):1386-99. doi: 10.2174/138945012803530206. PMID: 22664092.

Ulett, G. C., Totsika, M., Schaale, K., Carey, A. J., Sweet, M. J., & Schembri, M. A. (2013). Uropathogenic *Escherichia coli* virulence and innate immune responses during urinary tract infection. Current opinion in microbiology, 16(1), 100–107. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.01.005>

Vanessa L. Koga, Geizecler Tomazetto, Paula S. Cyoia, Meiriele S. Neves, Marilda C. Vidotto, Gerson Nakazato, Renata K. T. Kobayashi. (2014). "Molecular Screening of Virulence Genes in Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* Isolated from Human Blood Culture in Brazil", BioMed Research International, vol. 2014, Article ID 465054, 9 pages, <https://doi.org/10.1155/2014/465054>

Weissman, S. J., Johnson, J. R., Tchesnokova, V., Billig, M., Dykhuizen, D., Riddell, K., Rogers, P., Qin, X., Butler-Wu, S., Cookson, B. T., Fang, F. C., Scholes, D., Chattopadhyay, S., & Sokurenko, E. (2012). High-resolution two-locus clonal typing of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. Applied and environmental microbiology, 78(5), 1353–1360. <https://doi.org/10.1128/AEM.06663-11>

Wiles, T. J., Kulesus, R. R., & Mulvey, M. A. (2008). Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. Experimental and molecular pathology, 85(1), 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2008.03.007>

Wiles, T. Kulesus, R. Mulvey, M. (2008). Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. Exp. Mol. Pathol. 85:11–19.

Wright KJ, Seed PC, Hultgren SJ. (2007). Development of intracellular bacterial communities of uropathogenic *Escherichia coli* depends on type 1 pili. Cell Microbiol. 9(9):2230-41. doi: 10.1111/j.1462-5822.2007.00952.x. Epub 2007 May 8. PMID: 17490405.

Wright, K. J., Seed, P. C., & Hultgren, S. J. (2007). Development of intracellular bacterial communities of uropathogenic *Escherichia coli* depends on type 1 pili. Cellular microbiology, 9(9), 2230–2241. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.00952.x>

Wu, S., Dalsgaard, A., Hammerum, A. M., Porsbo, L. J., & Jensen, L. B. (2010). Prevalence and characterization of plasmids carrying sulfonamide resistance genes among *Escherichia coli* from pigs, pig carcasses and human. Acta veterinaria Scandinavica, 52(1), 47. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-52-47>

Zarzoza I. 2016. Análisis de determinantes de virulencia de cepas de *Escherichia coli* uropatógena serogrupo O25. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

13. ANEXOS

13.1. Oligonucleótidos para la amplificación de *fimH*

Para el diseño de los oligonucleótidos la secuencia en la que se basó fue en la cepa prototipo de UPEC CFT073 (NC_004431.1).

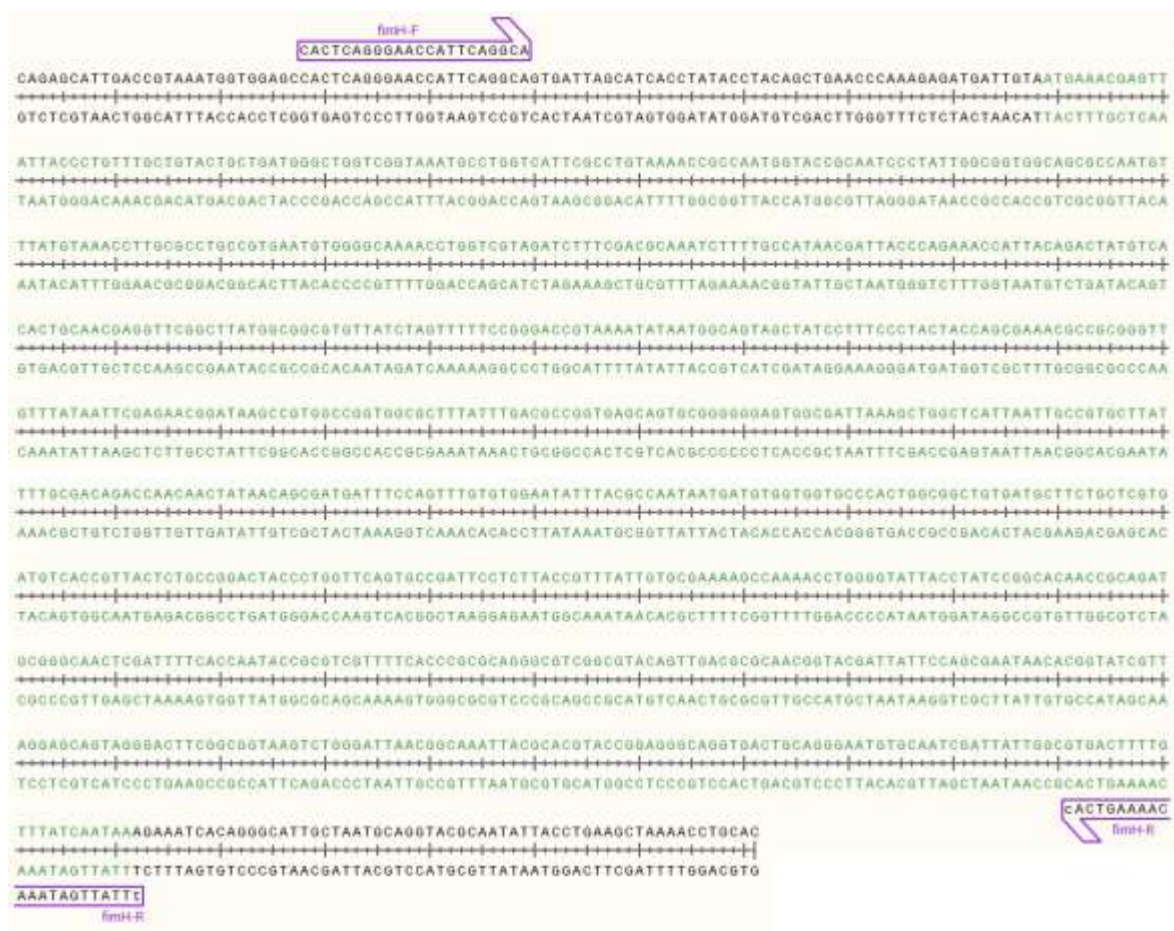


Figura 17. Alineamiento de los oligonucleótidos para la amplificación del gen *fimH*. En los recuadros morados se encuentran las secuencias de los oligonucleótidos usados para la amplificación de un fragmento de 975 pb (incluyen 903pb de *fimH*, 72 pb río arriba y 1 pb río abajo del gen). De color verde se encuentra la secuencia del gen *fimH* ya que los oligos se alinean río arriba y en la terminación del gen (de color negro).

13.2. Detección de alelos de *fimH*

Para la detección de los alelos de *fimH* se utilizó la herramienta bioinformática FimTyper 1.0. del Centro de Epidemiología Genómica de la Universidad Técnica de Dinamarca.

Tabla 18. Búsqueda de alelos de *fimH*.

Cepa	Tamaño secuenciado	Tipo de <i>fimH</i>	%Identidad	Query/HSP length	Position in contig
101-I	F=962 R=950	<i>fimH10</i>	100.00	489 / 489	74..562
104-I	F=932 R=960	<i>fimH32</i>	99.80	489 / 489	73..561
105-I	F=955 R=905	<i>fimH29</i>	100.00	489 / 489	73..561
106-I	F=903 R=942	<i>fimH29</i>	100.00	489 / 489	73..561
107-I	F=895 R=960	<i>fimH32</i>	99.80	489 / 489	73..561
111-I	F=960 R=963	<i>fimH24</i>	100.00	489 / 489	73..561
112-I	F=902 R=950	<i>fimH34</i>	100.00	489 / 489	74..562
114-I	F=907 R=960	<i>fimH24</i>	100.00	489 / 489	73..561
120-I	F=900 R=915	<i>fimH54</i>	100.00	489 / 489	73..561
121-I	F=960 R=907	<i>fimH27</i>	100.00	489 / 489	73..561
122-I	F=900 R=950	<i>fimH891</i>	94.13	511/489	81..591
124-I	F=928 R=959	<i>fimH54</i>	99.39	489 / 489	76..564
131-I	F=907 R=960	<i>fimH31</i>	100.00	489 / 489	113..601
136-I	F=962 R=938	<i>fimH1516</i>	96.99	421 / 421	163..582
137-I	F=950 R=960	<i>fimH1414</i>	90.75	489 / 489	73..561
139-I	F=949 R=962	<i>fimH29</i>	100.00	489 / 489	73..561
140-I	F=965 R=950	<i>fimH30</i>	100.00	489 / 489	64..552
141-I	F=967 R=907	<i>fimH30</i>	100.00	489 / 489	64..552
142-I	F=917 R=960	<i>fimH54</i>	100.00	489 / 489	74..562
143-I	F=962 R=958	<i>fimH24</i>	99.80	489 / 489	73..561

145-I	F=950 R=960	<i>fimH137</i>	99.80	490 / 489	66..555
146-I	F=948 R=950	<i>fimH54</i>	100.00	489 / 489	73..561
147-I	F=970 R=967	<i>fimH30</i>	100.00	489 / 489	64..552
148-I	F=907 R=936	<i>fimH1159</i>	97.87	422/489	73..561
150-I	F=900 R=943	<i>fimH145</i>	100.00	489 / 489	73..561
157-I	F=908 R=907	<i>fimH30</i>	100.00	489 / 489	64..552
158-I	F=950 R=960	<i>fimH30</i>	99.80	489 / 489	64..552
160-I	F=962 R=945	<i>fimH64</i>	100.00	489 / 489	73..561
163-I	F=967 R=930	<i>fimH54</i>	100.00	489 / 489	74..562
164-I	F=907 R=900	<i>fimH5</i>	99.80	489 / 489	73..561
165-I	F=906 R=962	<i>fimH54</i>	100.00	489 / 489	73..561
169-I	F=954 R=900	<i>fimH54</i>	99.59	491 / 489	73..561
170-I	F=962 R=955	<i>fimH54</i>	100.00	489 / 489	73..561
171-I	F=962 R=970	<i>fimH54</i>	100.00	489 / 489	74..562
172-I	F=967 R=900	<i>fimH29</i>	99.80	491 / 489	74..562
175-I	F= 907 R=962	<i>fimH54</i>	100.00	489 / 489	73..561