



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



INSTITUTO DE CIENCIAS
CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
LICENCIATURA EN BIOMEDICINA
EJE DE MICROBIOLOGÍA

**“CLASIFICACIÓN FILOGENÉTICA, VIRULENCIA Y RESISTENCIA
ANTIMICROBIANA DE *E. coli* AISLADA DE VARONES CON
INFECCIÓN DE TRACTO URINARIO”**

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

LICENCIADO EN BIOMEDICINA

PRESENTA:
DANIEL HUEL GAS MÉNDEZ

DIRECTORA DE TESIS:
D.C. MARGARITA MARÍA DE LA PAZ ARENAS HERNÁNDEZ

PUEBLA, PUE.

Agosto, 2020



BENEMERITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE MEDICINA
LICENCIATURA EN BIOMEDICINA
EJE DE MICROBIOLOGÍA

TESIS PROFESIONAL
"CLASIFICACIÓN FILOGENÉTICA, VIRULENCIA Y RESISTENCIA
ANTIMICROBIANA DE *E. coli* AISLADA DE VARONES CON
INFECCIÓN DE TRACTO URINARIO"

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOMEDICINA

PRESENTA

Daniel Huelgas Méndez

DIRECTOR DE TESIS:

D.C. Margarita María de la Paz Arenas Hernández

REVISOR:

D.C. Rosa del Carmen Rocha Gracia

REVISOR:

D.C. Claudia Fabiola Martínez de la Peña

Puebla, Pue., 2020

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS, ICUAP



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA.
FACULTAD DE MEDICINA.
COORDINACIÓN DE TITULACIÓN Y EFICIENCIA TERMINAL DE PREGRADO
LICENCIATURA EN BIOMEDICINA
FORMATO "A" DE REGISTRO Y AUTORIZACIÓN DE PROTOCOLO DE INVESTIGACION

No. de Folio de Registro: _____

DATOS DEL SOLICITANTE.

Utilizar los renglones para señalar los datos que se indican en relación con el solicitante:

Nombre Completo: Daniel Huelgas Méndez

Matricula: 201404479

Correo Electrónico: dany_huelgs@hotmail.com

Firma: _____

NOMBRE DEL TEMA:

Clasificación filogenética, virulencia y resistencia antimicrobiana de *E. coli* aislada de varones con infección de tracto urinario

JUSTIFICACIÓN:

Dado que las ITU en varones se posicionan como la tercera causa de morbilidad en este grupo, el Estado de Puebla está dentro de los 10 estados con mayor número de casos y *E. coli* es el agente etiológico más frecuente; la caracterización de los grupos filogenéticos, la virulencia y la resistencia a antibióticos y la formación de biopelícula de cepas de *E. coli* aislada de varones con ITU del hospital del ISSSTE contribuirá al conocimiento epidemiológico regional.

OBJETIVO GENERAL:

Caracterizar la clasificación filogenética, virulencia, resistencia antimicrobiana, formación de biopelícula y la relación entre estas variables de cepas de *E. coli* aisladas de varones de la ciudad de Puebla cursando con ITU.

TIPO DE ESTUDIO:

Investigación básica

INSTITUCIÓN EN LA QUE SE REALIZARÁ EL ESTUDIO:

Centro de Investigación en Ciencias Microbiológicas (CICM)

DIRECTOR DE TESIS:

Nombre: D.C. Margarita María de la Paz Arenas Hernández

NIP.BUAP: 100141466

Especialidad: doctorado en Microbiología

Correo Electrónico: margarita.arenas@correo.buap.mx

Firma de aceptación: _____

CO-DIRECTOR:

Nombre: N/A

NIP.BUAP: N/A

Especialidad: N/A

Correo Electrónico: N/A

Firma de aceptación: N/A

Fecha Y Firma de Autorización: _____

COORDINADORA DE TITULACION Y E.T

MASS IRMA ORTEGA SANCHEZ



BUAP

Oficio No SIEP / C.I. / 431 / 2019

Asunto: Constancia de Registro

D.C. MARGARITA MARÍA DE LA PAZ ARENAS HERNÁNDEZ
DANIEL HUEL GAS MÉNDEZ

P R E S E N T E S:

El Comité de Investigación de la Facultad de Medicina de la B.U.A.P., a través de la Secretaría de Investigación y Estudios de Posgrado hace **CONSTAR** que el Proyecto de Investigación presentado en autoría Colectiva por:

- DANIEL HUEL GAS MÉNDEZ
- D.C. MARGARITA MARÍA DE LA PAZ ARENAS HERNÁNDEZ

Titulado:

"CLASIFICACIÓN FILOGENÉTICA, VIRULENCIA Y RESISTENCIA ANTIMICROBIANA DE E. COLI AISLADA DE VARONES CON INFECCIÓN DE TRACTO URINARIO"

Ha sido registrado en esta Secretaría con los siguientes datos:

Fecha de registro: 10 de septiembre de 2019.

Número de Libro: 2

Número de Hoja: 119

Número de Registro: 759

Vigencia: Inicio 10 de septiembre 2019

Termino 13 de diciembre de 2019

ATENTAMENTE

"PENSAR BIEN, PARA VIVIR MEJOR"

H. PUEBLA DE Z., A 10 DE SEPTIEMBRE DE 2019.

M.C. JOSE LUIS GANDARA RAMIREZ
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE INVESTIGACIÓN

D.C. JORGE ALEJANDRO CEBADA RUIZ
SECRETARIO DEL COMITÉ DE INVESTIGACIÓN

c.c.p. archivo
c.c.p. minutorio
DC'ETR*seaf



Facultad
de Medicina

13 Sur 2702, Col. Volcanes,
Puebla, Pue. C.P. 72410
01 (222) 229 55 00
Ext. 6047 y 6048



BUAP

Oficio No. SIEP / C.I. / 536 / 2019

Asunto: PRÓRROGA

**D.C. MARGARITA MARÍA DE LA PAZ ARENAS HERNÁNDEZ
DANIEL HUELGAS MÉNDEZ.
P R E S E N T E**

Por medio de este conducto reciban un afectuoso saludo y al mismo tiempo me permito hacer de su conocimiento que el proyecto de investigación titulado: **"CLASIFICACIÓN FILOGENÉTICA, VIRULENCIA Y RESISTENCIA ANTIMICROBIANA DE E. COLI AISLADA DE VARONES CON INFECCIÓN DE TRACTO URINARIO"** después de haber sido estudiado, se llegó a la conclusión de aceptar la prórroga que se solicita, Por lo tanto, la fecha de término de dicho protocolo se extiende con fecha límite al 29 de abril de 2020.

Sin otro particular por el momento, les reitero las seguridades de mis respetos.

ATENTAMENTE

"PENSAR BIEN, PARA VIVIR MEJOR"
H. PUEBLA DE Z., A 09 DE DICIEMBRE DE 2019.

**D.C. JORGE ALEJANDRO CEBADA RUIZ
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS DE POSGRADO
SECRETARIO DEL COMITÉ DE INVESTIGACIÓN**



**D.C. ENRIQUE TORRES RASGADO
COORDINADOR DE INVESTIGACIÓN
DE LA SIEP – FMBUAP**

c.c.p. archivo
c.c.p. minutarío
DC'ETR*mdlvv-

Facultad
de Medicina

13 Sur 2702, Col. Volcanes,
Puebla, Pue. C.P. 72410
01 (222) 229 55 00
Ext. 6047 y 6048



BUAP

Of. No. CICM-082/2020
Asunto: Aprobación de Tesis.

Dr. Jorge Alejandro Cebada Ruíz
Secretario de Investigación y Estudios de Posgrado
Facultad de Medicina
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
Presente:

At'n: **Dr. Enrique Torres Rasgado**
Coordinador de Investigación de la FMBUAP

Por medio de la presente le reciba un cordial saludo y al mismo tiempo le informo que el proyecto de tesis de Licenciatura que lleva por título "**Clasificación filogenética, virulencia y resistencia antimicrobiana de *E. coli* aislada de varones con infección de tracto urinario**", del alumno **Daniel Huelgas Méndez**, con número de matrícula **201404479** bajo la dirección de la D.C. **Margarita Ma. de la Paz Arenas Hernández** como Director, ha concluido obteniéndose el trabajo final de Tesis. Por lo que solicito de la manera más atenta se brinden las facilidades administrativas correspondientes a la continuación del proceso de Titulación.

Sin otro particular por el momento, me despido y quedo de usted.

Se anexa copia electrónica del trabajo final de tesis.

Atentamente
"Pensar Bien, Para Vivir Mejor"
H. Puebla de Z., a 12 de marzo de 2020.

Comité Revisor de Tesis:

D.C. Rosa del Carmen Rocha Gracia

D.C. Claudia Fabiola Martínez de la Peña
Comité Revisor de Tesis
Coordinadora del Eje de Microbiología
Licenciatura en Biomedicina
CICM-ICUAP-BUAP



c.c.p. D.C. Celso Enrique Cortés Romero, Coordinador de Biomedicina, FMBUAP.
c.c.p. MASS. Irma Ortega Sánchez, Coordinadora de Titulación y Eficiencia Terminal. FMBUAP.
c.c.p. Archivo.

Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas
Instituto de Ciencias (ICUAP)

Edificio IC11,
Ciudad Universitaria
Col. San Manuel, Puebla, Pue. C.P. 72570
01 (222) 229 55 00 Ext.: 2521



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA.
FACULTAD DE MEDICINA.
COORDINACIÓN DE EFICIENCIA TERMINAL EN PREGRADO
FORMATO "C" DE AUTORIZACIÓN DE TESIS.
LICENCIATURA EN BIOMEDICINA

DATOS DEL SOLICITANTE

Nombre Completo: Daniel Huelgas Méndez
Matrícula: 201404479

Correo Electrónico: dany_huelgs@hotmail.com
Teléfono: 2221837020

Fecha de Ingreso y Egreso: Otoño 2014 a Primavera 2019

Firma:

Folio otorgado por el Comité de Investigación De Posgrado: 2/119/759

TÍTULO DE LA TESIS:

"Clasificación filogenética, virulencia y resistencia antimicrobiana de *E. coli* aislada de varones con infección de tracto urinario"

ÁREA DEL ESTUDIO: Microbiología Médica

Presentarla la tesis elaborada en computadora, con letra arial, numero 12 a espacio y medio firmada por los asesores de la Tesis y coordinación de titulación

DIRECTOR DE TESIS: D.C. Margarita María de la Paz Arenas Hernández NIP BUAP: 100141466

Firma de autorización:

Revisor de la Tesis: D.C. Rosa del Carmen Rocha Gracia

NIP BUAP: 100182644

Firma de autorización:

Revisor de la Tesis: D.C. Claudia Fabiola Martínez de la Peña

NIP BUAP: 100408677

Firma de autorización:

Visto bueno y se autorizará la impresión de la Tesis.

MASS IRMA ORTEGA SANCHEZ
COORDINADORA DE TITULACION Y E/T
SELLO DE AUTORIZACIÓN

FIRMA

Por las que permanecen vivas en nuestros corazones:

Petra Aranda Esquivel[†]

y

Ana Lilia Méndez Aranda[†]

*“Bendice alma mía a Yahweh,
y no olvides ninguno de sus beneficios”*

(Salmo 103:2)

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

A la D.C. Margarita María de la Paz Arenas Hernández, por su dirección en esta tesis y apoyo, tanto técnico, como de enseñanza, infraestructura y revisión crítica del escrito.

A la D.C. Rosa del Carmen Rocha Gracia y la D.C. Patricia Lozano Zarain, titulares del Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad, por el apoyo de infraestructura y revisión crítica del escrito.

A la D.C. Claudia Fabiola Martínez de la Peña por su enseñanza, apoyo técnico y revisión crítica del escrito.

A la Dra. Guadalupe Jiménez Flores, del Hospital Regional del ISSSTE en Puebla, Pue., por el otorgamiento del cepario con el que se trabajó.

A mis compañeros de trabajo, Manuel Gerardo Ballesteros Monrreal, Elsy Mariela Martínez Gorgonio y Denisse Ramírez Mendoza, por su enseñanza técnica en el laboratorio.

A José Efraín Atenco Rosas y Christian Daniel Morán Titla, por su asistencia en la preparación de gráficas y uso de RStudio® para el análisis estadístico.

A Obeth Cuauhtémoc Tapia Baltazar, por su apoyo técnico en el trabajo de investigación.

A la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado, por el apoyo financiero otorgado en becas de investigación y dentro de los programas “*Haciendo ciencia en la BUAP*”.

A la Facultad de Medicina de la BUAP, por el financiamiento otorgado para asistir a la “*XIX Reunión Internacional de Ciencias Médicas*” en la Universidad de Guanajuato, campus León.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Aprovecho este pequeño espacio en la tesis para agradecer en primer lugar, a Dios. Él es quien por misericordia nos ha guiado a mi familia y a mí hasta el día de hoy y a quien también he conocido mucho más durante este periodo de licenciatura. Sus caminos, tiempos y voluntad son siempre perfectos. Confío en Su Sabiduría lo que está por venir para mí, mi familia y amigos. A Él la gloria por los siglos de los siglos. Amén.

A mis padres, Adrián Huelgas Fernández y María de la Paz Méndez Aranda, quienes me han criado y guiado con sabiduría y amor durante todo este tiempo. No puedo más que agradecerles y honrarlos. Se que no ha sido fácil, pero somos un gran equipo.

A mis tíos, tías y primos en Puebla, Mérida y Cuernavaca; por su apoyo moral, financiero, cariño y más. Agradezco mucho el poder conocer siempre algo nuevo de ustedes ¡Se vienen tiempos mejores!

A mis amigos de “La Fam” y “El Nudo”, a Gede, a Elba y de la Licenciatura en Biomedicina (mañana, tarde, micro y fisio) quienes me han animado, acompañado, aconsejado y con los que he compartido experiencias tan ricas durante este periodo de la licenciatura que no cabría el espacio para mencionarlas todas. ¡Simplemente quiero decirles que su amistad y acompañamiento ha sido y es un verdadero tesoro!

En fin, sé que estas ansioso por ver los que contiene esta tesis, así que ¿Qué esperas? Sigue bajando o pasando de página y si tienes alguna duda mándame inbox o WA, no prometo tener todas las respuestas pero sí hacer migas.

¡Salud!

RECONOCIMIENTOS INSTITUCIONALES

El presente trabajo fue galardonado con el 2do lugar en la Exposición Oral, en la modalidad de Investigación básica durante el “2^{do} Congreso Nacional de Bacteriología y Virología Clínico Molecular” realizado del 13 al 15 de noviembre del 2019, en la Facultad de Medicina de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

ÍNDICE GENERAL

1. Resumen	1
2. Introducción	1
2.1 Infecciones de tracto urinario en hombres adultos y de la tercera edad	1
2.1.1 Definición, clasificación y factores de riesgo	1
2.1.2 Epidemiología	2
2.1.3. Etiología	3
2.2 <i>Escherichia coli</i>	4
2.2.1 <i>E. coli</i> patogénica extraintestinal (ExPEC)	6
2.3 Filogenia de <i>E. coli</i>	10
2.4 Patogénesis de ExPEC en tracto urinario	12
2.4.1 Patogénesis de ExPEC en vías urinarias bajas	12
2.4.2 Patogénesis de ExPEC en vías urinarias altas	14
2.4.3 Evasión del sistema inmune	16
2.4.4. Prostatitis	17
2.4.5. Islas de patogenicidad	18
2.5 Formación de biopelícula en <i>E. coli</i>	19
2.6 Resistencia antimicrobiana en <i>E. coli</i>	21
2.7 Plásmidos	23
3. Antecedentes	23
3.1 Antecedentes generales	23
3.1.1 Antecedentes internacionales	23
3.1.2 Antecedentes nacionales	25
3.2 Antecedentes directos	26
4. Planteamiento del problema	27
5. Objetivos	27
5.1 Objetivo general	27
5.2 Objetivos específicos	27
6. Material y métodos	28
6.1 Material biológico	28
6.1.1 Cepas de <i>E. coli</i> aisladas de varones con ITU	28
6.1.2 Cepas control	28
6.2 Estrategia de trabajo	29
6.3 Técnicas y procedimientos	29
6.3.1 Extracción de DNA plasmídico y genómico	29

6.3.2	Identificación de grupos filogenéticos.....	29
6.3.3	Detección de genes de virulencia e islas de patogenicidad.....	30
6.3.4	Puntaje de virulencia.....	32
6.3.4	Determinación del perfil de resistencia antimicrobiana.....	32
6.3.7.	Puntaje de resistencia.....	33
6.3.6	Clasificación de la resistencia	33
6.3.5	Determinación del fenotipo de producción de BLEE.....	34
6.3.7	Detección de genes asociados a betalactamasas	34
6.3.8	Ensayo de formación de biopelícula en microplaca de 96 pozos.....	35
6.4	Análisis estadísticos	36
7.	Resultados.....	36
7.1	Análisis poblacional	36
7.2	Clasificación filogenética	37
7.3	Características de virulencia asociadas a ExPEC.....	38
7.4	Resistencia antimicrobiana.....	45
7.5	Formación de biopelícula <i>in vitro</i>	53
7.6	Análisis de perfil plasmídico.....	54
7.7	Asociación entre variables.....	56
7.7.1	Virulencia y Filogrupos	56
7.7.2	Resistencia antimicrobiana y filogrupos	58
7.7.3	Resistencia antimicrobiana y virulencia.....	61
7.7.4	Formación de biopelícula y filogrupos	63
7.7.5	Formación de biopelícula y virulencia.....	65
7.7.6	Formación de biopelícula y resistencia antimicrobiana.....	66
7.7.7	Bandas plasmídicas y filogrupos.....	68
7.7.8	Bandas plasmídicas y Resistencia antimicrobiana	68
7.7.9	Bandas plasmídicas y formación de biopelícula	69
7	Discusión.....	70
9.	Conclusiones.....	84
10.	Perspectivas futuras	86
11.	Bibliografía	87
12.	Anexos	93

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>Sintomatología y diagnóstico de los síndromes asociados a ITU en pacientes varones adultos y ancianos.</i>	4
Tabla 2. <i>Factores de virulencia y fitness de ExPEC.</i>	8
Tabla 3. <i>Factores de virulencia/fitness codificados en las islas de patogenicidad de ExPEC.</i>	19
Tabla 4. <i>Terapia antimicrobiana de los síndromes asociados a ITU en pacientes varones adultos y ancianos.</i>	21
Tabla 5. <i>Cepas controles.</i>	28
Tabla 6. <i>Criterios genotípicos de clasificación filogenética.</i>	30
Tabla 7. <i>Factores de urovirulencia que se identificaron por PCR en el laboratorio. Pesos de cada gen, nombre y tipo de PCR en las que se determinaron.</i>	31
Tabla 8. <i>Esquema para la casificación de la resistencia antimicrobiana en Enterobacterias</i>	34
Tabla 9. <i>Condiciones de las PCR para genes de producción de β-lactamasas.</i>	35
Tabla 10. <i>Perfil de las PAIs en aislados de E. coli de varones con ITU.</i>	42
Tabla 11. <i>Relación entre factores de virulencia y PAIs en aislados de E. coli de varones con ITU (n=24).</i>	43
Tabla 12. <i>Virotipo y perfil PAI común en dos aislados de E. coli de varones con ITU (n=24).</i>	44
Tabla 13. <i>Resistotipo común en dos aislados de E. coli de varones con ITU (n=24).</i>	47
Tabla 14. <i>Perfiles de genes bla en las cepas de E. coli aisladas de varones con ITU.</i>	51
Tabla 15. <i>Perfil de sustrato y de genes bla en aislados BLEE⁺ de E. coli de varones con ITU (n=24).</i>	52
Tabla 16. <i>Perfil de genes bla en aislados BLEE⁻ de E. coli de varones con ITU (n=24).</i>	52
Tabla 17. <i>Categorías de formación de biopelícula de aislados de E. coli de varones con ITU (n=24).</i>	54
Tabla 18. <i>Distribución de los factores de virulencia por filogrupo.</i>	58
Tabla 19. <i>Distribución de la resistencia antimicrobiana y por filogrupo.</i>	60
Tabla 20. <i>Distribución de los genes de resistencia bla por filogrupo.</i>	61
Tabla 21. <i>Asociación entre factores de virulencia y resistencia antimicrobiana en aislados de E. coli de varones con ITU (n=24).</i>	62
Tabla 22. <i>Formación de biopelícula por filogrupo.</i>	64
Tabla 23. <i>Presencia de bandas plasmídicas y sus pesos por filogrupo.</i>	93
Tabla 24. <i>Distribución de rasgos de resistencia en cepas con bandas y sin bandas plasmídicas.</i>	94
Tabla 25. <i>Bandas plasmídicas, puntaje de resistencia y fenotipo global de resistencia de las cepas de E. coli aisladas de ITU.</i>	95
Tabla 26. <i>Distribución de las categorías de formación de biopelícula en cepas con bandas y sin bandas plasmídicas.</i>	96
Tabla 27. <i>Datos con todas las variables medidas en el cepario de E. coli aislada de varones con ITU del hospital regional del ISSSTE en Puebla, Pue., en el periodo 2015-2016 (n=24)</i>	98

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Modelo de pozas de DNA en los genomas procariontes.	5
Figura 2. Sitios de colonización de IPEC y ExPEC.	7
Figura 3. Comparación genómica de cepas de <i>E. coli</i> de distintos patotipos en cada grupo filogenético.	11
Figura 4. Patogénesis de ExPEC en vejiga.	14
Figura 5. Patogénesis de ExPEC en tejido renal.	16
Figura 6. Esquema de una isla de patogenicidad.	18
Figura 7. Distribución de sensidiscos.	33
Figura 8. Distribución de la población de estudio según grupos de edad ($n=24$).	37
Figura 9. Electroforesis en geles de agarosa (1%) para la Identificación filogenética de cepas de aislados de <i>E. coli</i> de varones con ITU.	38
Figura 10. Distribución de Grupos Filogenéticos en aislados de <i>E. coli</i> de varones con ITU determinadas por PCR ($n=24$).	38
Figura 11. Electroforesis en geles de agarosa (1%) para la identificación de genes de virulencia asociados a ExPEC e islas de patogenicidad.	40
Figura 12. Genes de virulencia y PAIs presentes en aislados de <i>E. coli</i> de varones con ITU ($n=24$).	41
Figura 13. Distribución de los genes <i>papGII</i> , <i>papGIII</i> , <i>papA</i> , <i>satA</i> , <i>satP</i> , <i>vatA</i> y <i>vatP</i> en aislados de <i>E. coli</i> de varones con ITU ($n=24$).	42
Figura 14. Distribución de los puntajes de virulencia en aislados de <i>E. coli</i> de varones con ITU ($n=24$).	44
Figura 15. Resistencia antimicrobiana por familia de antibiótico en aislados de <i>E. coli</i> de varones con ITU ($n=24$).	45
Figura 16. Porcentajes de resistencia antimicrobiana en aislados de <i>E. coli</i> de varones con ITU ($n=24$).	46
Figura 17. Distribución de los puntajes de resistencia en aislados de <i>E. coli</i> de varones con ITU ($n=24$).	47
Figura 18. Porcentaje en aislados de <i>E. coli</i> de varones con ITU con fenotipo MDR/XDR según los criterios del CDC y EUCAST.	48
Figura 19. Identificación del fenotipo BLEE ⁺ por el método de difusión de doble disco en aislados de <i>E. coli</i> de varones con ITU ($n=24$).	49
Figura 20. Geles representativos para la identificación de genes de producción de β -lactamasas.	50
Figura 21. Distribución de los genes <i>bla</i> en las cepas de <i>E. coli</i> aisladas de varones con ITU ($n=24$).	51
Figura 22. Distribución de la formación de biomasa de biopelícula (D.O. _{595nm}) en aislados de <i>E. coli</i> de varones con ITU ($n=24$).	53
Figura 23. Electroforesis en geles de agarosa (0.7%) para perfil plasmídico de los aislados de <i>E. coli</i> de varones con ITU ($n=24$).	55
Figura 24. Porcentajes de cepas con bandas y sin bandas plasmídicas de los aislados de <i>E. coli</i> de varones con ITU ($n=24$).	55
Figura 25. Distribución del tamaño de aproximado de plásmidos en los aislados de <i>E. coli</i> aislada de varones con ITU con bandas plasmídicas ($n=14$).	56
Figura 26. Distribución de los puntajes de virulencia por filogrupo.	57
Figura 27. Distribución de los puntajes de resistencia por filogrupo.	59

Figura 28. Correlación entre el puntaje de resistencia y el puntaje de virulencia de aislados de <i>E. coli</i> de varones con ITU ($n=24$).	61
Figura 29. Distribución de la DO _(595nm) de biomasa de biopelícula por filogrupos.	63
Figura 30. Correlación entre la DO _(595nm) de biomasa de biopelícula y el puntaje de virulencia de aislados de <i>E. coli</i> de varones con ITU ($n=24$).	65
Figura 31. <i>Formación de biopelícula acorde con factor de virulencia de aislados de E. coli de varones con ITU (n=24)</i>	66
Figura 32. Correlación entre el puntaje de resistencia y la biomasa de biopelícula DO _(595nm) de las cepas de <i>E. coli</i> aisladas de varones con ITU ($n=24$).	67
Figura 33. Formación de biopelícula de aislados de <i>E. coli</i> de varones con ITU ($n=24$) acorde con antibiótico y gen de resistencia.	67
Figura 34. Correlación entre el puntaje de resistencia y el número de bandas plasmídicas de aislados de <i>E. coli</i> de varones con ITU ($n=24$).	69
Figura 35. Número de bandas plasmídicas en cada filogrupos de <i>E. coli</i> aislada de varones con ITU ($n=24$).	93
Figura 36. Formación de biopelícula de cepas de <i>E. coli</i> aisladas de varones con ITU ($n=24$) acorde con presencia y ausencia de bandas plasmídicas.	95
Figura 37. Correlación entre el puntaje de virulencia y la biomasa de biopelícula D.O. _(595nm) del cepario y filogrupos B2 y C de las cepas de <i>E. coli</i> aisladas de varones con ITU ($n=24$).	96
Figura 38. Correlación entre el puntaje de resistencia y la biomasa de biopelícula D.O. _(595nm) de las cepas de <i>E. coli</i> aisladas de varones con ITU ($n=24$).	97
Figura 39. Oligonucleótidos propuestos para la amplificación de <i>fliC</i> por PCR en la región conservada del gen.	97

LISTA DE ABREVIATURAS

EXPEC: *Escherichia coli* patogénica extra intestinal

UPEC: *Escherichia coli* uropatógena

IPEC: *Escherichia coli* Intestinal patogénica

ETEC: *Escherichia coli* enterotoxigenica

EPEC: *Escherichia coli* enteropatógena

EHEC: *Escherichia coli* enterohemorrágica

EAEC: *Escherichia coli* enteroagregativa

DAEC: *Escherichia coli* difuso adherente

EIEC: *Escherichia coli* enteroinvasiva

NMEC: *Escherichia coli* asociada a meningitis neonatal

ITU: Infección de tracto urinario

ABU: Bacteriuria asintomática

TLR: Receptores tipo toll

LPS: Lipopolisacrido

CNF-1: Factor de necrosis citotóxico

HlyA: Alfa hemolisina

Sat: Toxina autotransportadora secretada

Vat: Toxina autotransportadora vacuolizante

FliC: Adhesina flagelar

FimH: Adhesina del pili tipo 1

Pap: Pili asociado a pielonefritis

PAI: Isla de patogenicidad

IBC: Comunidades bacterianas intracelulares

QIR: Reservorios quiescentes intracelulares

AMK: Amikacina

GM: Gentamicina

NET: Netilmicina

AN: Ácido nalidixico

CIP: Ciprofloxacina

OFX: Ofloxacina

NOR: Norfloxacina

LVX: Levofloxacina

TSX: Trimetoprim con sulfametoxazol

C: Cloranfenicol

AMP: Ampicilina

CF: Cefalotina

CFX: Cefuroxima

CFZ: Ceftazidima

CTX: Cefotaxima

CRO: Ceftriaxona

FEP: Cefepime

ATM: Aztreonam

AMC: Amoxicicilina con ácido clavulánico

FOS: Fosfomicina

CL: Colistina

TE: Tetraciclina

ETP: Ertapenem

BLEE: Betalactamasa de espectro extendido

NMDR: No multidrogo resistente

MDR: Multidrogo resistente

XDR: Extremadamente resistente

PDR: Pandrogo resistente

TEM: Temoneira (Nombre del paciente del que se aisló por primera vez una cepa con esta enzima)

SHV: reactivo sulfhidrilo variable

CTX-M: Activo sobre cefotaxima- Aislado en Munich

OXA: *Oxacillin-hydrolyzing*

ECOR: *Escherichia coli* reference collection

UFC/mL: Unidades formadoras de colonias por mililitro

1. Resumen

En México, las infecciones de tracto urinario (ITU) son la tercera causa de enfermedad en varones a nivel nacional y estatal. El agente causal más frecuente es *E. coli*. Esta bacteria posee una estructura filogenética diversa, así como diferentes estrategias para causar infecciones extraintestinales. *E. coli* es uno de los microorganismos que presenta en nuestro país un alto índice de multiresistencia. El objetivo de este estudio fue caracterizar la filogenia, virulencia y resistencia antimicrobiana de aislados de *E. coli* de varones mexicanos con ITU en la ciudad de Puebla, así como la relación estadística entre estas variables. La clasificación filogenética se realizó por PCR, así como la amplificación de genes de virulencia, islas de patogenicidad (PAIs) y genes de producción de β -lactamasas. La caracterización de la resistencia antimicrobiana se llevó a cabo por el método de Kirby-Bauer y la determinación del fenotipo de producción de BLEEs se realizó por el método de doble disco. La formación de biopelícula se evaluó mediante el ensayo en microplaca de 96 pozos. El filogrupo más frecuente fue el B2 (60%), así como el más virulento ($p < 0.05$). Los genes *pap*, *iha* y la PAI I y II de CFT073 estuvieron asociados al filogrupo B2 ($p < 0.05$). De las categorías de virulencia investigadas (adherencia, sideróforos, toxinas, evasión inmunológica y PAIs) más del 30% del cepario presentó al menos dos genes de cada categoría. Los rangos de prevalencia de genes fueron desde 0% (*papGIII* y *fliC*) hasta 92% (*fimH*). El puntaje de virulencia medio fue de 6 (rango 1-10). En total, hubo 22 perfiles de virulencia diferentes y uno fue compartido. La resistencia antimicrobiana se concentró en la familia de las quinolonas y la sensibilidad antimicrobiana en fosfomicina. La media de los puntajes de resistencia antimicrobiana fue de 10 (rango: 6-13). El 70% de las cepas fueron MDR y el 30%, XDR. El 33% presentó el fenotipo BLEE+. El gen *bla*_{CTX-M}, fue el más prevalente (80%). En total hubo 22 perfiles de resistencia diferentes y 1 fue compartido. La media de biomasa de biopelícula formada fue de 0.8 ± 0.45 (rango D.O._{595nm}: 0.3-2.4). El 96% de las cepas fueron productoras de biopelícula con excepción de una de ellas. La producción débil de biopelícula estuvo asociada al filogrupo B2 con respecto al C ($p < 0.05$). Los puntajes de resistencia o virulencia fueron inversamente proporcionales a la biomasa de biopelícula (DO_{595nm}) (Spearman, $p < 0.05$). El 60% de las cepas presentó bandas plasmídicas y en promedio 2 bandas (rango: 1 a 5 bandas), frecuentemente con pesos de 1 Kb y > 10 Kb. Se encontró una tendencia a una asociación lineal positiva entre el puntaje de resistencia y el número de bandas plasmídicas del cepario (Spearman, $p < 0.05$). En conclusión, el cepario posee diversidad filogenética, tiene el potencial virulento para causar ITUs bajas y altas y presenta fenotipos MDR y XDR. La mayoría posee el gen *bla*_{CTX-M}, tiene bandas plasmídicas y forma biopelícula *in vitro*. Este estudio, contribuye al incipiente conocimiento sobre las características genotípicas y fenotípicas de interés epidemiológico de cepas de *E. coli* aisladas de varones con ITU atendidos en el Estado de Puebla.

2. Introducción

2.1 Infecciones de tracto urinario en hombres adultos y de la tercera edad

2.1.1 Definición, clasificación y factores de riesgo

La infección de tracto urinario (ITU) es la colonización de bacterias, hongos o virus patógenos en algún sitio del tracto urinario u órganos sexuales asociados, -como en el caso de los varones- (p. ej. próstata y gónadas masculinas), que causa un espectro de signos y síntomas en el paciente, los cuales son diagnosticados como cistitis, prostatitis, pielonefritis y urosepsis (Smelov, Naber, & Bjerklund Johansen, 2016; Bruschi, 2018).

Las ITU también pueden ser clasificadas en complicadas y no complicadas. Las ITU no complicadas se refieren a ITU, agudas, esporádicas o comúnmente bajas (cistitis) y/o altas (pielonefritis) que están limitadas a las mujeres no embarazadas con una anatomía y fisiología urinaria normal y sin comorbilidades. Por otro lado, las ITU complicadas son todas aquellas que ocurren en un paciente con una alta probabilidad de desarrollar un resultado complicado: p.ej. en todos los hombres, mujeres embarazadas, pacientes con anomalías funcionales y/o anatómicas en el tracto urinario, pacientes cateterizados, con enfermedades renales, y/o con otras enfermedades inmunocomprometedoras como la diabetes (Urology, 2018). Generalmente, las ITU en hombres son consideradas complicadas dada la sospecha de alguna enfermedad subyacente como fístula enterovesical o por algún procedimiento con instrumentación médica como el cateterismo, (Seminerio, Aggarwal, & Sweetser, 2011). La presencia de ITU complicada en varón puede llevar a un círculo vicioso en donde al presentarse esta, se hospitaliza al paciente, el cual puede ser cateterizado y/o inmunosuprimido y complicar aún más la ITU.

Ante esto, se deduce que los factores de riesgo de ITU en hombres son: anomalía anatómica subyacente (hiperplasia prostática, fístulas colovesicales asociadas con cáncer de colon o enfermedad inflamatoria del intestino y malformaciones congénitas del tracto urogenital) y la instrumentación médica (citoscopía o cateterización) así como condiciones inmunosupresoras (p. ej.

diabetes mellitus, corticoesteroides) que pueden predisponer a ITUs recurrentes. Además, los hombres no circuncidados con pobre higiene y el sexo anal sin protección también son factores de riesgo de ITUs recurrentes (Seminario *et al.*, 2011; Coull, Mastoroudes, Popert, & O'Brien, 2008).

Otras condiciones que se pueden presentar, tanto en hombres como en mujeres, y que forman parte de las ITU complicadas son las ITU recurrentes (ITUr) y las ITU asociadas a cateterismo (CAUTI).

Las ITUr se definen como la frecuencia de una ITU complicada o no complicada de al menos tres ITUs/año o dos ITUs en los últimos 6 meses.

Las CAUTI se refieren como la ITU en una persona cuyo tracto urinario ha sido cateterizado en el plazo de las últimas 48 horas.

Los datos las ITU en varones y su diagnóstico se resumen en la tabla 1.

2.1.2 Epidemiología

Desafortunadamente, la epidemiología de las ITU en varones ha sido poco descrita comparada con los numerosos estudios que existen en población femenina, a pesar de que existan diferencias substanciales en la anatomía, respuesta inmune y estado hormonal (Lipsky, 1989).

La incidencia de estas infecciones es casi exclusiva de las mujeres entre los 2 y 60 años a diferencia de los varones los cuales se encuentran protegidos anatómicamente por el mayor tamaño de la uretra, propiedades antibacterianas del fluido prostático y menor frecuencia en la colonización periuretral (Seminario *et al.*, 2011; Foxman, 2003). Sin embargo, en algunas poblaciones la incidencia de las ITU en hombres, iguala o excede las de las mujeres; incluso, algunos datos epidemiológicos sugieren una diferencia debida al sexo en la morbilidad de ITU en vías urinarias altas (Olson & Hunstad, 2017).

Las ITU en varones menores de 50 años es rara con aproximadamente 5 a 8 casos por cada 10,000 habitantes por año en Estados Unidos, pero la incidencia en esta población va incrementando con la edad (Seminario *et al.*, 2011). Esto último puede deberse a que a partir de los 60 años hay patrones de vaciamiento anormales por patologías urodinámicas adquiridas (p. ej. hiperplasia prostática) (Olson & Hunstad, 2017).

En nuestro país, aunque la incidencia de ITU en mujeres es mayor que en hombres, las ITU se posicionan como la tercera causa de enfermedad en

varones de todas las edades a nivel nacional y estatal (SUIVE/DGE/Secretaría de Salud/Estados Unidos Mexicanos, 2018c). De hecho, en 2018 el Estado de Puebla se posicionó en el 6^{to} lugar con mayor número de casos de ITU en varones de 45-49 años a nivel nacional y el 8^{vo} en varones de 60 y más años (SUIVE/DGE/Secretaría de Salud/Estados Unidos Mexicanos, 2018b).

2.1.3. Etiología

La etiología de las ITU en adultos y ancianos masculinos varía según el síndrome asociado a ITU. Por ejemplo, la prostatitis bacteriana crónica es causada en un 80% por *Escherichia coli* y la pielonefritis es causada en un 25% por *E. coli* y en menor medida por *Proteus* y *Providencia* (Brusch, 2018).

Al igual que en las mujeres, se piensa que la ruta usual de inoculación de *E. coli* en hombres proviene del intestino, sin embargo, no se sabe en realidad si las bacterias acceden transmucosalmente desde el recto o por una migración retrógrada desde la uretra (Schaeffer, 2016; Brusch, 2018).

Existe evidencia de la transmisión sexual de *E. coli* hacia el hombre a través de la pareja femenina u homosexual infectada (Wilson, Tovey, Adler, & Gruneberg, 1986).

En el ambiente intrahospitalario, la transmisión de *E. coli* puede darse por la mala higiene del personal de salud, y puede ir asociado a la mala manipulación del área perineal al colocar o remover catéteres lo que puede aumentar las probabilidades de transmitir el patógeno (Foxman, 2010).

Tabla 1. Sintomatología y diagnóstico de los síndromes asociados a ITU en pacientes varones adultos y ancianos.

ITU	Sx en varones adultos y ancianos	Investigación diagnóstica
Bacteriuria asintomática	No referente al tracto urinario.	Urocultivo: 10 ³ UFC/ml de un solo microorganismo o más de 2 microorganismos con 10 ⁵ UFC/ml Complementar con contexto sintomatológico.
Cistitis no complicada	STUB: Frecuencia, disuria, febrícula, nocturia, y dolor suprapúbico. (fiebre-> prostatitis).	
Prostatitis aguda		
Prostatitis crónica		
Pielonefritis e ITU complicadas	Disuria, urgencia al orinar, frecuencia, dolor flaquear, sensibilidad del ángulo costovertebral y fiebre. Desórdenes urológicos (p.ej. hipersplasia prostática).	
Urosepsis	Disfunción orgánica causada por una respuesta desregulada del hospedero a la infección.	
ITU asociada a cateterismo	Fiebre, resfriados, estado mental alterado, dolor de costado, sensibilidad costovertebral, hematuria aguda, malestar pélvico.	>100 UFC/ml de un microorganismo. (aislamiento del mismo microorganismo en sangre, es interpretado como urosepsis).

STUB: Síntomas del tracto urinario bajo (Harper & Fowles, 2007; A. J. Schaeffer & Nicolle, 2016; Sotomayor de Zavaleta *et al.*, 2015)

2.2 *Escherichia coli*

La especie bacteriana *Escherichia coli* (*E. coli*) es un miembro de la familia *Enterobacteriaceae*, localizado taxonómicamente dentro de la subdivisión *gamma* del filo *Proteobacteria*. *E. coli* también es conocida como un miembro de la microbiota intestinal del *Homo sapiens* y como bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo (Kaper, Nataro, & Mobley, 2004; Lukjancenko, Wassenaar, & Ussery, 2010).

Algunas cepas de *E. coli* se han adaptado y evolucionado a un estilo de vida patógeno y pueden causar diversas patologías, tanto intestinales como extraintestinales (Kaper *et al.*, 2004).

Las cepas patógenas de *E. coli* pueden ser divididas en *E. coli* patógena intestinal (IPEC) y *E. coli* patógena extraintestinal (ExPEC). Esta clasificación en patotipos está basada en las manifestaciones clínicas de la enfermedad y los factores de virulencia involucrados (Leimbach, Hacker, & Dobrindt, 2013).

La característica de las cepas de *E. coli* de presentarse como comensal o patógeno en algún hospedero reside en la plasticidad genómica de la bacteria (Leimbach *et al.*, 2013). El genoma *core* de las cepas de *E. coli* (los genes que están presentes en todas las cepas de esta especie) representa solo el 20% del tamaño genómico promedio, mientras que el resto del genoma (genoma flexible/prescindible) es responsable de la diversidad en esta especie la cual le permite adaptarse a diversos nichos (Donnenberg, 2013) (figura 1). Ejemplos de esta poza génica flexible son elementos móviles como plásmidos, fagos e islas genómicas (GIs, por sus siglas en inglés). Esto último pone a la transferencia horizontal de genes como un actor primordial en la evolución de *E. coli* (Leimbach *et al.*, 2013).

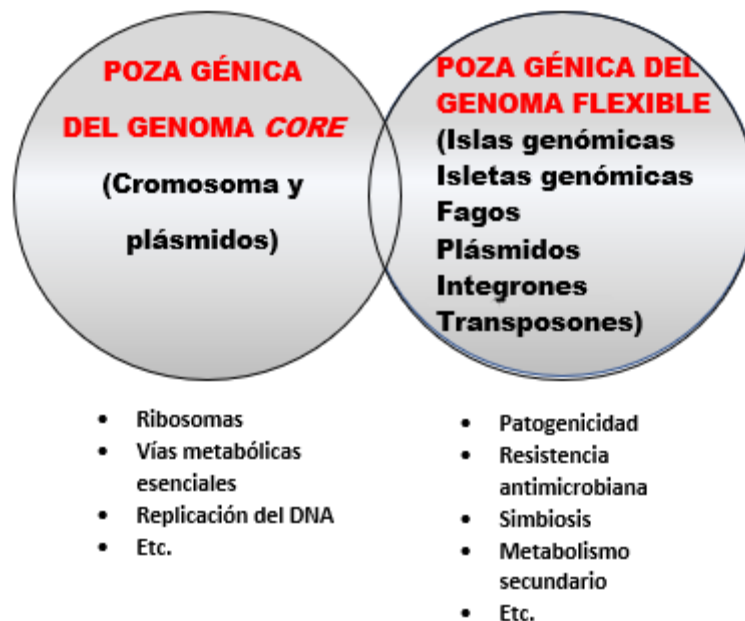


Figura 1. Modelo de pozas de DNA en los genomas procariontes.
Modificado de Hacker & Carniel, 2013.

2.2.1 *E. coli* patogénica extraintestinal (ExPEC)

Las cepas de *E. coli* comensales son aquellas que colonizan inocuamente el colon de hospederos sanos y llegan a causar infección solo cuando hay grandes inóculos, p. ej. en un trauma abdominal penetrante, y/o un compromiso significativo del hospedero. La mayoría de estas cepas carecen de los factores de virulencia presentes en cepas diarreagénicas y extraintestinales (Vila *et al.*, 2016).

IPEC comprende un grupo de cepas que, a diferencia de las comensales, rara vez se encuentra en la microbiota fecal de individuos sanos. Estas cepas causan síndromes diarreicos como gastroenteritis o colitis cuando son ingeridos en cantidades suficientes por un hospedero susceptible. Su patogénesis varía según los factores de virulencia distintivos de cada cepa. De hecho, las diferencias entre estos factores son el criterio para la clasificación de los patotipos intestinales en *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC) y *E. coli* enteroagregativa (EAEC) (Russo y Johnson, 2002).

ExPEC, por otro lado, es un grupo que al igual que las cepas de *E. coli* comensales pueden colonizar el tracto gastrointestinal humano sin causar alguna patología en este. Sin embargo, estas tienen la característica de entrar y sobrevivir en sitios fuera del tracto gastrointestinal y causar enfermedad cuando colonizan estos. Comúnmente las infecciones extraintestinales (IEs) incluyen infecciones de tracto urinario (ITU), meningitis (mayormente neonatos y después de neurocirugía), infección intrabdominal, neumonía (particularmente en pacientes hospitalizados e internados), infección de dispositivo intravascular, osteomielitis e infección de tejido blando. Cabe señalar que, la bacteriemia puede ocurrir en cualquiera de los casos citados (Russo & Johnson, 2002) (figura 2).

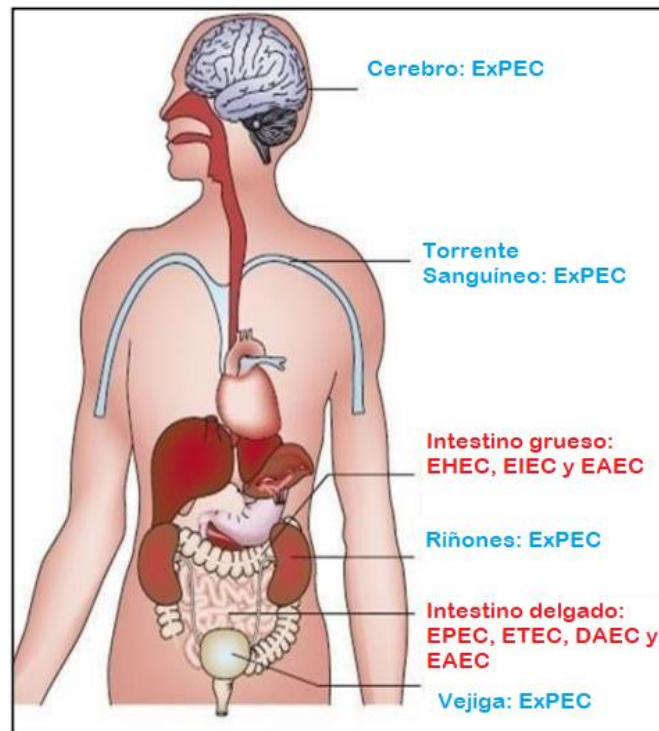


Figura 2. Sitios de colonización de IPEC y ExPEC.
Modificado de: Croxen & Finlay, 2010.

Este grupo posee diversos factores de virulencia y *fitness*. Los factores de virulencia son cualquier atributo genético que incrementa la probabilidad de ExPEC para causar daño directo en el hospedero. Algunos ejemplos son las adhesinas (p.ej. fimbria P y S), mecanismos de evasión de la respuesta inmune (p.ej. cápsula) y toxinas (p.ej. α -hemolisina). Los factores *fitness* son aquellos atributos genéticos que contribuyen a la supervivencia, más que al daño, de ExPEC en sitios extraintestinales como el tracto urinario del huésped. Ejemplo de estos son los sistemas de adquisición de hierro (p.ej. aerobactina) (Flores-Mireles, Walker, Caparon, & Hultgren, 2015a; Subashchandrabose & Mobley, 2015a) (tabla 2).

Tabla 2. Factores de virulencia y fitness de ExPEC.

Adherencia	Adquisición de metales	Toxinas	Evasión de la respuesta inmune	Otros
Fimbria tipo 1 (operón <i>fim</i>)	Aerobactina (<i>iucABCD/iutA</i>)	α -hemolisina (<i>hlyA</i>)	Polisacárido capsular (Antígeno K)	Antígeno 43 (<i>flu</i>)
F1C pili	Enterobactina	Factor citotóxico necrozante 1 (<i>cnf-1</i>)	α -hemolisina (<i>hlyA</i>)	Flagelos (<i>fli</i>)
Fimbria P (operón <i>pap</i>)	Salmoquelina	Lipolisacárido (LPS)	Polisacárido O	Usp (uropathogenic specific protein)
Fimbria S	Yersiniabactina	Toxina autotransportadora secretada (<i>sat</i>)	Lipoproteína TraT (<i>traT</i>)	
Adhesinas Dr	Receptores Haem regulados por ChuA y Hma	Toxina autotransportadora vacuolizante (<i>vat</i>)	Factor citotóxico necrozante 1 (<i>cnf-1</i>)	
Fimbrias curli	Mecanismos de adquisición de Zinc	Pic (proteasa involucrada en la colonización)	Yersiniabactina	
Fimbrias con receptor sideróforo (<i>Iha</i>)				

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

Escherichia coli uropatógena (UPEC), se define como una bacteria de la especie *E. coli* que es aislada de un hospedero con ITU o que causa algún síndrome asociado a ITU en un hospedero.

No obstante, el término UPEC, debe ser utilizado con cierto cuidado, entendiéndose que tradicionalmente las cepas de UPEC se asociaban estrictamente, con infecciones de tracto urinario, sin embargo, ahora son reconocidas por tener un rango más amplio de patogenicidad en diferentes sitios anatómicos (Russo & Johnson, 2002).

Algunos han optado por sustituir el término UPEC por el de ExPEC ante la antigua noción de que existían ciertas “clonas virulentas” dentro de ciertos linajes evolutivos de *E. coli* que se caracterizaban por pertenecer a cierto serotipo (p.ej. O18:K1:H7) asociados estrictamente con cuadros clínicos como pielonefritis, bacteriemia y/o meningitis neonatal. Esto originó los conceptos de *E. coli* asociada a sepsis, uropatógena, y asociada a meningitis (Russo & Johnson, 2002).

Desafortunadamente, estas designaciones específicas de cada síndrome, aunque son válidas en un sentido, en realidad son limitadas. Implican que ciertas cepas de *E. coli* extraintestinal poseen ciertos factores de virulencia específicos para cada sitio anatómico extraintestinal como el tracto urinario, el sistema nervioso, etc. No obstante, ninguna sola clona o factor de virulencia está limitado (o absolutamente requerido) para causar cualquier síndrome extraintestinal. Esto no es del todo sorprendente, ya que ciertos mecanismos del sistema inmunológico del hospedero (p.ej. el complemento o los fagocitos profesionales), requerimientos nutricionales bacterianos, (p.ej. adquisición de hierro), y ciertos receptores para la adhesión bacteriana (p.ej. glicolípidos de membrana y proteínas de matriz extracelular), son comunes de muchos sitios extraintestinales que *E. coli* infecta. Además, aunque las cepas de ExPEC tienden a poseer un conjunto de factores de virulencia provenientes de diferentes categorías (p.ej. adhesinas, protectinas, etc.), no existe un perfil genético de virulencia específico de ningún aislado de infección extraintestinal, lo que sugiere que existen múltiples alternativas bacterianas de un patógeno para sobrevivir en varios sitios anatómicos del hospedero (Russo & Johnson, 2002).

Durante este trabajo se optará por utilizar, preferentemente, el término ExPEC, ya que no limita el potencial patogénico de las cepas a únicamente el tracto urinario, sino que hace evidente que también pueden infectar otros sitios extraintestinales como, el torrente sanguíneo o el encéfalo.

Una cepa puede ser clasificada como ExPEC optando por alguno de los siguientes criterios.

El más simple y comúnmente usado, aunque poco confiable, es el contexto clínico y la fuente de aislamiento para indicar el potencial virulento de la cepa. Según este criterio, todos los aislados clínicos de *E. coli* de sitios extraintestinales son considerados como ExPEC y todos los aislados

provenientes de heces son considerados como no-ExPEC (Sannes *et al.*, 2004). Sin embargo, esta lógica es débil, ya que los hospederos comprometidos pueden desarrollar infecciones serias debido a microorganismos poco virulentos (Johnson, 1998), y el intestino es un reservorio de cepas de *E. coli* que causan infecciones extraintestinales serias en individuos sanos (Yamamoto *et al.*, 1997). Un enfoque más confiable es caracterizar el aislado a partir de su bagaje filogenético y su virotipo o perfil de virulencia, el cual permite hacer inferencias considerando el probable potencial virulento. Este enfoque también tiene limitantes, dado que la correspondencia entre las características bacterianas y la virulencia real está incompletamente definida, no todos los factores de virulencia han sido identificados o están listos para examinarse fenotípicamente y por otro lado, no existe una correlación estricta entre filogenia y patotipo extraintestinal (Vila *et al.*, 2016). Sin embargo, es el más utilizado, dado que se puede argumentar que el potencial virulento fue ya expresado en el hospedero de cual se aisló la cepa, fue diagnosticado con algún tipo de ITU.

Un enfoque más directo, que no requiere conocimiento *a priori* de la fuente de aislado o de sus características moleculares, es retar animales con el aislado en un modelo de infección experimental (p.ej. ratones) y observar los resultados de dicha infección (Hagberg *et al.*, 1983; Johnson *et al.*, 2006). Las limitaciones de este enfoque son que no es muy viable utilizarlo como una prueba de rutina o a gran escala, y cierta imposibilidad que presentan algunos modelos animales para mimetizar el desarrollo de la infección humana. Sin embargo, es el enfoque que prueba de manera más directa el potencial virulento de algún aislado (Falkow, 1988).

2.3 Filogenia de *E. coli*

La diversidad genética existente en la especie *E. coli* está representada en la colección de cepas ECOR (*E. coli* de referencia) establecida por Ochman y Selander basada en resultados de electroforesis de multi-locus enzimáticos (MLEE, por sus siglas en inglés)(Ochman & Selander, 1984). Dicha colección está clasificada filogenéticamente en 5 principales grupos (A, B1, B2, D y E). Recientemente, el filogrupo C ha sido propuesto como un clado relacionado con el B1 (Clermont, Gordon, Brisse, Walk, & Denamur, 2011). El grupo de Walk *et al.*, 2009, reporta nuevos linajes de *Escherichia* que son genéticamente

distintos, pero fenotípicamente indistinguibles de *E. coli*. A estos linajes se les ha denominado como clado I, es cual ahora es considerado como un filogrupo más de *E. coli* basado en la extensa recombinación detectada entre las cepas de este clado y las de *E. coli*. Por lo tanto, a la fecha existen 8 grupos filogenéticos de *E. coli*, 7 pertenecientes a *E. coli sensu stricto* y uno a *Escherichia* clado I (Clermont, Christenson, Denamur, & Gordon, 2013).

Como se comentó en la sección anterior, la importancia de clasificar filogenéticamente a los aislados clínicos de *E. coli* extraintestinal tiene tanto una relevancia epidemiológica como una clínica, aunque definitivamente no es un criterio tajante para clasificar a una cepa como ExPEC (Leimbach *et al.*, 2013). Sobre el último punto, es menester explicar aquí más a fondo la relación que existe entre filogrupo y patotipo en *E. coli*. Al obtener la secuencia genómica completa de las cepas de la colección ECOR, pertenecientes a diferentes filogrupos y patotipos, se hicieron alineamientos para conocer los porcentajes de identidad entre ellas y la cepa comensal ATCC 8739. Los resultados arrojaron similitudes mayores al 90% entre la cepa ATCC 8739 y las diferentes cepas ECOR (Leimbach *et al.*, 2013) (figura 3). Lo que se deduce de este experimento es que 1) las cepas ECOR clasificadas en los patotipos Comensal e IPEC pertenecen a múltiples filogrupos (*E. coli* Comensal: A, B1 y B2, IPEC: B1, B2 y E), 2) Las cepas ECOR clasificadas como ExPEC pertenecen solo a los filogrupos D y B2 3) El filogrupo A solo alberga cepas comensales, el E solo cepas IPEC y el B1, D y B2 albergan a dos o más patotipos diferentes.

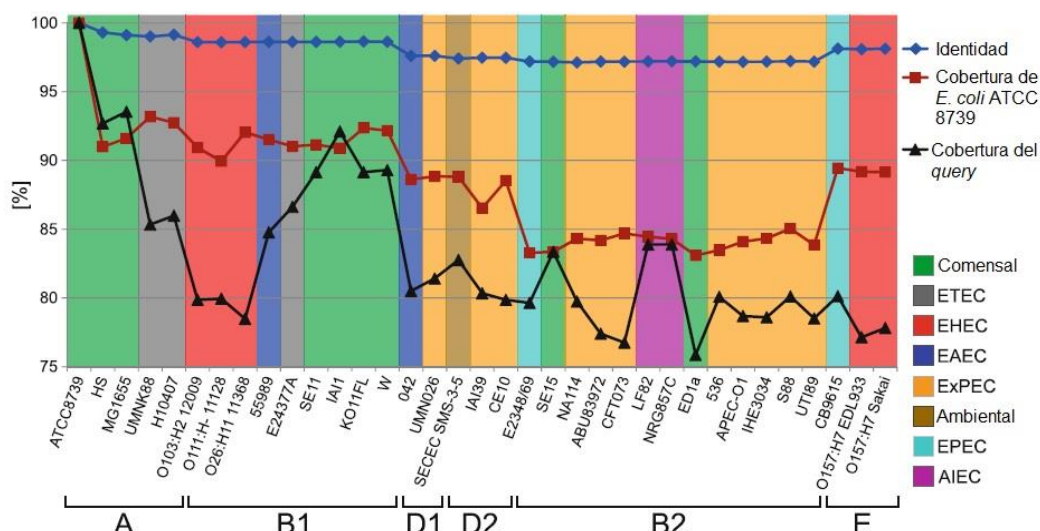


Figura 3. Comparación genómica de cepas de *E. coli* de distintos patotipos en cada grupo filogenético.

Modificado de Leimbach, Hacker y Dobrindt, 2013.

Por lo tanto, no podemos fiarnos de la clasificación filogenética como criterio para clasificar a las cepas de *E. coli* como ExPEC, ya que las cepas de este patotipo solo se ubican en los filogrupos D y B2, y, sin embargo, los filogrupos D y B2 albergan cepas también de los patotipos comensal e IPEC, los cuales, en algún hospedero susceptible podrían causar también alguna infección extraintestinal. Hay que recordar, entonces, que existen factores intrínsecos al agente causal, al huésped y al medio ambiente. En el intestino del hospedero se encuentran cepas de *E. coli* clasificadas en los diferentes filogrupos y que, a su vez, pueden presentar los factores de virulencia necesarios para colonizar el tracto urinario (p.ej. fimbria tipo I, sideróforos, etc.) que pueden ser transferidos de una cepa a otra, incluso de diferentes filogrupos, vía conjugación, y eventualmente causar ITU según las características anatómicas y funcionales del hospedero y las del propio medio ambiente en donde se encuentren estos dos (p.ej. ambiente intrahospitalario).

2.4 Patogénesis de ExPEC en tracto urinario

La patogénesis de ExPEC en el tracto urinario del varón es un fenómeno multifactorial. Depende tanto de factores inherentes al huésped (p.ej. la edad, estado inmunológico, anatómico, hormonal y dietético) como de las cepas de ExPEC (p.ej. factores de virulencia y *fitness*) y del medio ambiente (p. ej. ambiente doméstico o intrahospitalario). La dinámica entre estos factores influye en el pronóstico de la enfermedad (OECD, 2016).

2.4.1 Patogénesis de ExPEC en vías urinarias bajas

La patogénesis de ExPEC en la vejiga se ha comprobado como similar tanto en modelo murino hembra como macho (figura 4) (Olson, Hruska, & Hunstad, 2016). En vejiga los factores de virulencia que medían la colonización son las adhesinas que reconocen receptores en el uroepitelio y la mayoría pertenecen a la familia de los pili de la vía chaperona-usher (CUP, por sus siglas en inglés). Un ejemplo de estas adhesinas es la fimbria tipo 1. Estas fimbrias tienen como receptor la uroplaquina del uroepitelio, la cual es una proteína altamente manosiada. Específicamente la adhesina FimH de la fimbria tipo 1 es la que media la unión a la D-manosa en las glicoproteínas. Al unirse la fimbria tipo 1 con las células del uroepitelio desencadena una transducción de señales que activa Rho GTPasas,

lo que provoca un rearrreglo del citoesqueleto de actina y la subsecuente internalización de ExPEC en las células huésped. Este mecanismo de invasión permite a ExPEC sobrevivir al sistema inmunológico y evadir algún tratamiento antimicrobiano (Flores-Mireles *et al.*, 2015a).

ExPEC, también secreta el factor citotóxico necrotizante 1 (CNF-1) que remodela la actina en la célula huésped a través de tres pequeñas Rho GTPasas: RAC1, RHOA y el control de división celular 42 (CDC42). Al ser excretada CNF-1, entra a la célula vía vesículas endocíticas y activa las Rho GTPasas causando reareglos en el citoesqueleto de actina y la alteración de la membrana, lo que lleva a mayores niveles de internalización bacteriana (Lüthje & Brauner, 2014). Dentro de las células del urotelio, ExPEC puede formar colonias intracelulares parecidas a biopelícula (IBCs, por sus siglas en inglés), un fenotipo que también se ha observado en el modelo murino macho (Olson *et al.*, 2016). Este fenotipo le permite a ExPEC sobrevivir a los mecanismos de defensa innatos de expulsión del citoplasma, de los neutrófilos y otros factores estresantes como antibióticos y luego dispersarse a otras células para reiniciar el ciclo de formación de IBCs (Flores-Mireles *et al.*, 2015a).

Algunos metales como el hierro y zinc son nutrientes esenciales para distintas formas de vida, incluyendo las bacterias. El sistema inmune de mamíferos aprovecha esta esencialidad para retardar el crecimiento bacteriano durante una infección. Para asegurar los niveles de hierro intracelular adecuados, ExPEC aumenta la expresión de genes involucrados en la adquisición de hierro como son los sideróforos. Los sideróforos son moléculas de bajo peso molecular que son liberadas al medio extracelular para quelar el hierro. Los sideróforos al unirse al hierro forman complejos para ser internalizados. Uno de estos sideróforos que expresan las cepas de ExPEC es la aerobactina perteneciente a la familia de los hidroxamatos (Subashchandrabose & Mobley, 2015).

También existen otros sistemas redundantes de captación de hierro como son la adhesina homóloga a IrgA denominada Iha, que funciona como un receptor de sideróforos de la familia de los quetacولات (Subashchandrabose & Mobley, 2015). De hecho, experimentos con mutantes que carecen del gen *iha* y de receptores a aerobactina, mostraron que los receptores a aerobactina son críticos para la uropatogénesis *in vivo* de ExPEC y que *iha* pertenece a un

sistema redundante de captación de hierro (Garcia, Brumbaugh, & Mobley, 2011).

Algunas bacterias liberan toxinas para provocar la apoptosis en las células blanco y captar metales mediante sideróforos. Las cepas de ExPEC pueden secretar altas concentraciones de α -hemolisina (HlyA) la cual se oligomeriza y se integra en los microdominios ricos en colesterol de la membrana de la célula huésped. Esto resulta en la formación de poros y lisis en las células del urotelio y neutrófilos, lo que facilita la adquisición de hierro y nutrientes para las bacterias. Además, la α -hemolisina es uno de los genes mayormente expresados en las IBCs y participa en la exfoliación del urotelio, lo cual permite a las bacterias invadir capas más profundas del tejido en donde se encuentran células de transición. Dentro de estas células, ExPEC forma reservorios quiescentes intracelulares (QIRs, por sus siglas en inglés) provocando ITUs crónicas (Flores-Mireles *et al.*, 2015a).

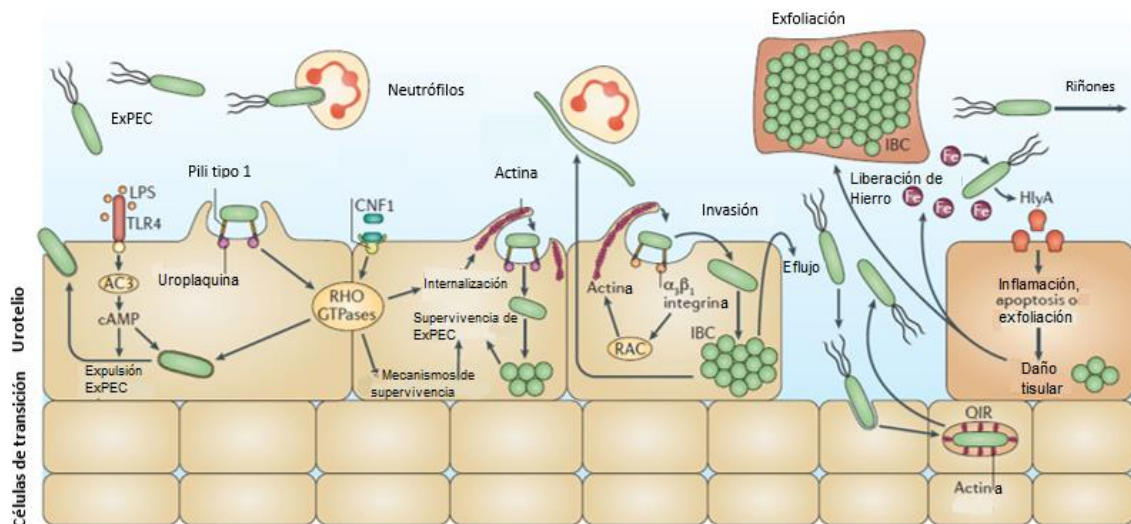


Figura 4. Patogénesis de ExPEC en vejiga.

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

2.4.2 Patogénesis de ExPEC en vías urinarias altas

En ocasiones, la patogénesis de ExPEC en vejiga evoluciona a una ITU ascendente. En los experimentos en ratones hembras y machos se ha demostrado que los machos, a diferencia de las hembras, desarrollan pielonefritis más severa y en el 100% un absceso renal penetrante. Este fenotipo

esta marcadamente influenciado por la producción de testosterona (Olson *et al.*, 2016).

Un factor de virulencia y *fitness* de ExPEC en la patogénesis de vías urinarias altas es la expresión del flagelo. En un experimento de imagenología *in vivo* se determinó el patrón de expresión de genes relacionados al flagelo dentro del tracto urinario de ratones (Lane, Alteri, Smith, & Mobley, 2007). La expresión del gen *fliC* se cuantificó utilizando a la proteína Luciferasa como un sistema reportero. La expresión máxima de *fliC* fue consistente con el ascenso de ExPEC en los uréteres y riñones, sugiriendo un rol del flagelo en el desarrollo de la pielonefritis (Subashchandrabose & Mobley, 2015).

Las cepas de ExPEC están dotadas con una fimbria codificada por los genes *pap* que se conoce como fimbria P. La adhesina de la fimbria P, PapG, se une a los glicosfingolípidos que contienen restos de digalactosa presentes en el epitelio renal humano. También, PapG interacciona con los receptores TLR 4 del epitelio renal, reduciendo la expresión del receptor polimérico a inmunoglobulina (PIGR) lo que impide la traslocación de inmunoglobulina A (IgA) y la opsonización de ExPEC (Flores-Mireles *et al.*, 2015a). Existen diferentes afinidades según las diferentes variantes de PapG. La variante PapGIII, está más asociada con la cistitis en humano y la infección renal en perros. La variante PapGII se une a la globotetraosilceramida, la cual predomina en el riñón humano y por lo tanto PapGII está más asociada a la pielonefritis y la bacteremia en humano (Lüthje & Brauner, 2014).

Las toxinas *sat* y *vat*, pertenecientes a la familia de los autotransportadores de serinproteasas de las *Enterobacteriaceae* (SPATEs, por sus siglas en inglés), se expresan durante la patogénesis de ITUs en vías urinarias altas. La toxina *sat* induce la vacuolización de células del túbulo proximal renal y su actividad serinproteasa lleva a efectos citopáticos (Lüthje & Brauner, 2014). Por otra parte, la toxina *vat* (toxina transportada vacuolizante) tiene función en la patogénesis de cuadros de urosepsis, mas no a nivel renal (Nichols *et al.*, 2016).

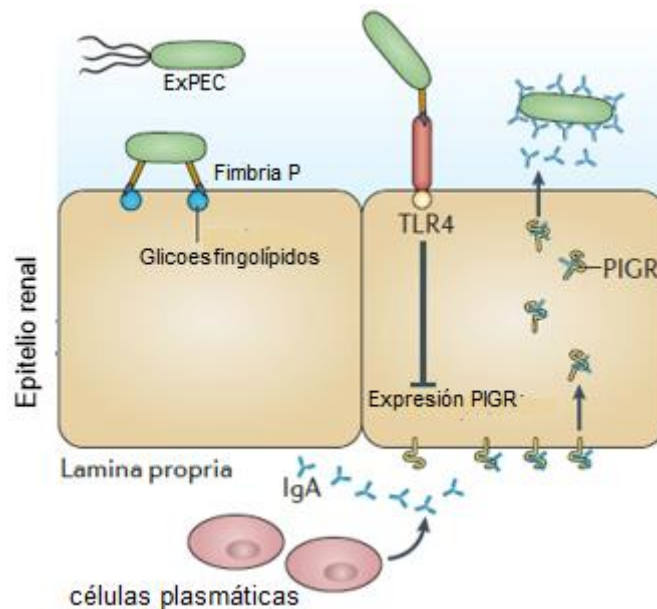


Figura 5. Patogénesis de ExPEC en tejido renal.

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

2.4.3 Evasión del sistema inmune

Una de las principales diferencias, además de la anatomía, entre el tracto urinario femenino y masculino es la respuesta inmunológica. En experimentos con ratones machos y hembras, se ha demostrado que las hembras tienen una reacción proinflamatoria mucho más exacerbada que en los machos, así como un control de ExPEC mucho más eficiente (Olson *et al.*, 2016). Particularmente, las hembras tienen una expresión aumentada de IL-17 la cual tiene un papel crucial en la inmunidad en el tracto urinario pues al ser neutralizada se impide la resolución de la infección (Scharff *et al.*, 2019).

Ya se habló sobre algunas estrategias de ExPEC para evadir la respuesta inmunológica a nivel de vejiga y riñones, como la internalización en células huésped o la represión de mecanismos de traslocación de anticuerpos. Sin embargo, existen factores *fitness* que permiten que las cepas resistan al sistema de complemento presente en el suero. Algunos de estos factores es la cápsula de polisacáridos y la proteína de membrana externa traT (Lüthje & Brauner, 2014).

La mayoría de las cepas de ExPEC producen cápsulas del grupo II entre las cuales se encuentran las cápsulas K1, K2, K4, K5, entre otras. Por ejemplo, la cápsula K2 de la cepa tipo de UPEC, CFT073, le provee de ventaja para la

colonización en el tracto urinario debido a la resistencia al complemento (Lüthje & Brauner, 2014).

La lipoproteína TraT está codificada en plásmidos conjugativos y puede funcionar individualmente o en combinación con los efectos capsulares. Se conoce que también tiene un efecto contra la actividad antibactericida del sistema de complemento posiblemente al inhibir el ensamblaje correcto de este en la membrana celular (Jahandeh, Ranjbar, Behzadi, & Behzadi, 2015; Sukupolvi & O'Connor, 1990).

2.4.4. Prostatitis

Existen dos cuadros clínicos de prostatitis, la prostatitis aguda (PA) y la crónica (PC). En ninguno de los dos se conoce a fondo la patofisiología. Sin embargo, se han propuesto algunas teorías al respecto (Davis & Silberman, 2019).

Los mecanismos propuestos en la PA involucran infiltración de uropatógenos que son capaces de evadir la respuesta inmune innata de la glándula prostática. Comúnmente los microorganismos pueden inocularse por: 1) reflujo de la orina infectada en los ductos prostáticos, 2) Infección uretral ascendente como consecuencia de la contaminación uretral durante el coito, 3) Invasión por bacterias del recto, por extensión directa o linfática, 4) infección hematógena o 5) por biopsia de próstata (agujas transrectales) (Theodorou & Becopoulos, 2000).

En el estudio de Longhi *et al.*, 2016 se demuestra con experimentos *in vitro* que la línea de células prostáticas normales RWPE-1 son invadidas por cepas de *E. coli* y expresan un fenotipo de formadoras fuertes de biopelícula.

Además, Krieger, Dobrindt, Riley, & Oswald, 2011, reportan que las cepas de *E. coli* de 18 hombres jóvenes con PA pertenecen principalmente al filogrupo B2 y poseen genes de virulencia característicos de ExPEC (p. ej., *hly*, *pap*, *kpsMT-II* y *traT*).

Esto último, sugiere que factores involucrados en la adherencia, invasión, evasión de la respuesta inmune y formación de biopelícula están implicados durante la patogénesis de *E. coli* en PA

2.4.5. Islas de patogenicidad

La mayoría de los factores de virulencia antes mencionados no están codificados en el genoma *core* de las cepas de ExPEC sino en diferentes inserciones del cromosoma. Estas regiones del cromosoma pertenecen al genoma flexible/prescindible, tienen un tamaño de >10kb y también codifican para elementos móviles (p. ej. integrasas y secuencias de inserción); están asociadas con genes de tRNA, flanqueadas con secuencias repetidas, frecuentemente son inestables y difieren en su contenido de guanina y citocina con el resto del genoma *core*. Estas regiones se denominan islas de patogenicidad (PAIs) y sus versiones pequeñas son llamadas “isletas” (figura 6) (Hacker & Carniel, 2013). Las PAIs son una clase de islas genómicas adquiridas por los microorganismos a través de transferencia horizontal por plásmidos, bacteriófagos o transposones conjugativos (Najafi, Hasanpour, Askary, Aziemzadeh, & Hashemi, 2018). Tanto las secuencias repetidas que flanquean a estas islas como la presencia de genes de integrasas son remanentes de ese evento (Oelschlaeger, Dobrindt, & Hacker, 2002).

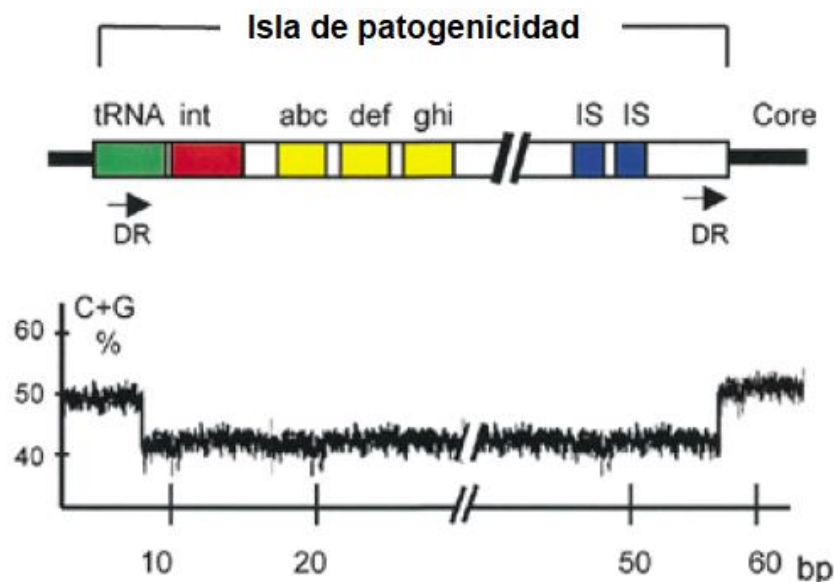


Figura 6. Esquema de una isla de patogenicidad.

Estos bloques de DNA están adyacentes a genes de tRNA y flanqueados por repeticiones directas (DR). El contenido de guanina y citosina (G+C) de la isla es diferente al del resto del genoma *core*. Abreviaturas: int, gen de integrasa; abc, def y ghi, genes que codifican factores de virulencia/*fitness*; IS, secuencias de inserción; bp, pares de bases. Modificado de Hacker & Carniel, 2013.

Las cepas prototipo de ExPEC CFT073 y J96 contienen PAIs las cuales se han secuenciado y anotado su contenido génico (Oelschlaeger *et al.*, 2002). En la tabla 3 se encuentran los factores de virulencia codificados en PAIs, genoma *core* o en plásmido.

Tanto las cepas comensales o extraintestinales de *E. coli* pueden contener el mismo tipo de PAI insertadas en su genoma. Esto es interesante, pues en una misma cepa algunas adhesinas codificadas por las PAIs de CFT073, como la fimbria tipo P, confieren mayor persistencia en el colon mientras que en los riñones tiene efecto inmunomodulador. Por lo que, según el contexto en donde se encuentra la cepa, las islas genómicas generan un fenotipo virulento o de *fitness* comensal (Hacker & Carniel, 2013).

Tabla 3. Factores de virulencia/fitness codificados en las islas de patogenicidad de ExPEC.

PAI	Factores de virulencia
PAI _{CFT073} I	<i>hlyA</i> , operón <i>pap</i> , aerobactina (<i>iucABCD/iutA</i>), <i>sat</i> , <i>iha</i> , precursor Ag43, <i>kpsMT-II</i> (cápsulas del grupo II)
PAI _{CFT073} II	Operón <i>pap</i>
PAI _{J96} I	<i>hlyA</i> , <i>pap</i>
PAI _{J96} II	<i>hlyA</i> , <i>cnf-1</i>

Modificado de: Lloyd, Rasko, & Mobley, 2007; Oelschlaeger *et al.*, 2002

2.5 Formación de biopelícula en *E. coli*

Las biopelículas son comunidades bacterianas, sésiles, complejas, diferenciadas y multicelulares que pueden estar conformadas por una o más especies. Una característica que distingue a la biopelícula de las bacterias en estado planctónico es la matriz extracelular que en el caso de *E. coli* puede estar conformada por proteínas (p. ej. curli, fimbrias), polisacáridos (p.ej. celulosa, ácido colónico) y DNA. (Devaraj, Justice, Bakaletz, & Goodman, 2015.; Subashchandrabose & Mobley, 2015).

La formación de biopelícula en cepas de *E. coli* es considerada tanto un mecanismo de evasión de la respuesta inmune del hospedero como de resistencia antimicrobiana. Esta facultad, confiere a las cepas mayor sobrevivencia en superficies abióticas (p ej. en catéteres urinarios) así como persistencia y recurrencia en las ITU. (Vila *et al.*, 2016; Webb & Kahler, 2008).

Además, los microorganismos que forman biopelículas son capaces de aumentar su virulencia debido a las altas tasas de conjugación que existen dentro de estas comunidades (Cortés, Consuegra Bonilla, Ruben, & Sinisterra, 2011).

Como se mencionó, ExPEC es capaz de formar IBCs en las células del urotelio, lo cual contribuye a la persistencia del patógeno en vejiga. Estas comunidades intracelulares comprenden 10^4 - 10^5 bacterias estrechamente empaquetadas, que están protegidas por una matriz extracelular. Los polisacáridos como la cápsula de ácido siálico, están presentes en las IBCs, y funcionan, en parte, para la protección de la comunidad contra los ataques de neutrófilos. Diferentes estudios con mRNA han identificado algunos genes que están sobreexpresados durante la formación de IBCs, la mayoría de estos está involucrado en la resistencia al estrés oxidativo, la expresión del pili tipo 1, el metabolismo de galactosa y la adquisición de hierro (Hadjifrangiskou *et al.*, 2012; Kaylen O'Rourke and Peter A. Cadieux, 2019).

También, se ha demostrado que las cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con prostatitis crónica son formadoras fuertes de biopelícula. Incluso, Nickel *et al.*, 1990 observaron estructuras de formación de biopelícula en tejido prostático en ratas con prostatitis crónica, pero el mecanismo molecular aún no se conoce (Mazzoli, 2015; Nickel *et al.*, 1990).

La biopelícula de *E. coli* también se relaciona con las ITU asociadas a cateterismo (CAUTI) y la adherencia mediada por el pili tipo I ayuda a la formación de biopelícula en la superficie del catéter (Miryala *et al.*, 2020).

Comúnmente, al reproducir este fenómeno *in vitro* se utilizan placas de poliestireno o algún otro plástico en donde, según el medio en el que sean crecidas las cepas, se expresa primordialmente un factor u otro. Por ejemplo, en placas de PVC con medio LB se expresa esencialmente el pili tipo 1, en placas de PVC con medio YESCA, las fibras curli. El flagelo es esencial en tanto en medio LB como en YESCA.

Sin embargo, se debe mencionar que las condiciones *in vitro* de formación de biopelícula no necesariamente reflejan la realidad *in vivo* (Hadjifrangiskou *et al.*, 2012; Lüthje & Brauner, 2014).

2.6 Resistencia antimicrobiana en *E. coli*

E. coli ha sido incluida en la lista de los nueve principales microorganismos de interés internacional causando las infecciones más comunes en diferentes sectores: la comunidad, hospitales o transmitidos por comida (OMS, 2014).

Los aislados de *E. coli* resistentes y multidrogoresistentes (MDR) se han incrementado grandemente durante las últimas décadas (Vila *et al.*, 2016). Por lo que una vigilancia de la resistencia antibiótica es de gran importancia para detectar la emergencia de mecanismos de resistencia en distintos países (Hawser, 2012) (WHO, 2014).

Los antibióticos son la primera opción de tratamiento de las ITU (Kodner y Thomas Gupton, 2010) y la resistencia a estos está siendo adquirida rápidamente por las bacterias (Sotomayor de Zavaleta *et al.*, 2015). Los antibióticos de primera elección y los que se utilizan como tratamiento empírico están resumidos en la tabla 4.

Tabla 4. Terapia antimicrobiana de los síndromes asociados a ITU en pacientes varones adultos y ancianos.

ITU	Terapia
Bacteriuria asintomática	Esperar a resultados de urocultivo. No se recomienda Tx empírico con antibióticos.
Cistitis no complicada	• fosfomicina-trometamol Se pueden usar antibióticos de amplio espectro mientras se esperan resultados de urocultivo
Prostatitis aguda	Tx empírico: Administración parenteral de: • penicilinas de espectro amplio. • cefalosporinas de tercera generación • fluoroquinolonas. • Cualquiera de los anteriores + aminoglucósidos.
Prostatitis crónica	Tratamiento de primera elección: fluoroquinolonas.

Pielonefritis e ITU complicadas	En pacientes hospitalizados: • amoxicilina + aminoglucósido • cefalosporina de segunda generación + aminoglucósido • cefalosporina de tercera generación Con respuesta inflamatoria sistémica: • ertapenem Basarse en resultados de urocultivo y antibiograma. Evitar antibióticos con resistencias locales de >20%. Evitar fluoroquinolonas en pacientes del departamento de urología.
Urosepsis	Aplicar antibióticos de amplio espectro • carbapenémicos con actividad antipseudomonas. • piperacilina-tazobactam cefalosporina 4ta generación + aminoglucósido + vancomicina.
ITU asociada a cateterismo	Basarse en urocultivos previos del paciente, antimicrobianos utilizados antes, resistencia microbiana observada en la comunidad donde está tratándose al paciente, alergias antimicrobianas o tolerancia para su metabolismo renal o hepático. Ajustar tratamiento luego de urocultivo con antibiograma.

(Sotomayor de Zavaleta *et al.*, 2015; Urology, 2018)

Se han reportado porcentajes de resistencia altos tanto a β -lactámicos como a quinolonas en varios estudios realizados en México. Por lo que el abanico de posibles tratamientos para las ITU en nuestro país se está reduciendo (Sotomayor de Zavaleta *et al.*, 2015).

La producción de β -lactamasas codificadas y transmitidas por plásmidos, como las *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA-1} y *bla*_{CTX-M}, representan otro problema clínico, debido a que su transferencia horizontal difunde la resistencia a cefalosporinas de tercera generación, así como otros antibióticos β -lactámicos.

En general las β -lactamasas tipo TEM y SHV, poseen un perfil de sustrato que incluye a las cefalosporinas de 3^{ra} generación y a monobactámicos. En total, las B-lactamasas tipo TEM tienen un total de 249 variantes y las tipo SHV 244 (Naas, T.; Oueslati, S.; Bonnin, R. A.; Dabos, M. L.; Zavala, A.; Dortet, L.; Retailleau, P.; Llorca, 2020).

En México, las β -lactamasas de la familia CTX-M, son las más frecuentes, en particular la variante CTX-M15 la cual se ha identificado ampliamente en *E. coli*.

Su identificación por PCR o por expresión fenotípica permite saber con prontitud si el aislado será sensible o no a cefalosporinas. Su perfil sustrato puede incluir cefalosporinas de amplio espectro y carbapenémicos. Actualmente, se conocen 239 variantes (Sotomayor de Zavaleta *et al.*, 2015).

El gen *bla_{OXA-1}* ha sido frecuentemente encontrado en asociación con genes que codifican para BLEEs. Su perfil de sustrato hidroliza cefalosporinas de amplio espectro como cefepime. En estudios recientes se ha reportado su frecuente asociación a la β -lactamasa CTX-M15 en aislados de *E. coli* de diferentes zonas geográficas (Sugumar *et al.*, 2014).

2.7 Plásmidos

Otra forma de diseminación de resistencia y/o virulencia entre bacterias es a través de plásmidos; elementos genéticos movilizables autorreplicables formados por DNA de doble cadena que no son esenciales para la bacteria. Se ha observado que ExPEC posee plásmidos de distintos tamaños y en ellos, se encuentran los elementos génicos para su transferencia así como genes de virulencia o resistencia (p. ej. β -lactamasas) (Pérez Ama, 2018).

3. Antecedentes

3.1 Antecedentes generales

3.1.1 Antecedentes internacionales

Un grupo brasileño (de Souza da-Silva *et al.*, 2017) caracteriza perfiles de virulencia y resistencia en cepas de *E. coli* causante de ITU aislada de hombres (n=12) y mujeres (n=127). Determinaron que, en hombres, las ITU son más frecuentemente causadas por el filogrupo B2, con respecto a mujeres (83% comparado con 42%, $p<0.05$). Además, este filogrupo presentó el puntaje más alto de virulencia con respecto al A, B1 y D (media y mediana=7, $p<0.05$). Los aislados de *E. coli* de hombres también presentaron un porcentaje significativamente mayor de genes de virulencia como *sfa/foxDE* (67% vs 27%) *hlyA* (58% vs 24%) *cnf1* (58% vs 16%) *fyuA* (100% vs 82%) y *MalX* (92% vs 44%) comparado con los aislados de mujeres. En la distribución de la resistencia a diferentes antibióticos (aminoglucósidos, beta-lactámicos, quinolonas,

fosfomicina, nitrofurantoína, etc.) no hubo diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los aislados de hombres y mujeres.

Por otra parte, el grupo de Kudinha *et al.*, 2013 trabajó con 389 aislados de pacientes varones australianos con cistitis ($n=153$) y pielonefritis ($n=101$), de 30 a 70 años y con muestras fecales de pacientes sanos como grupo control ($n=135$). El 60% de los aislados perteneció al filogrupo B2, seguido del A (21%), D (16%) y B1(6%). El filogrupo significativamente más prevalente entre las cepas clínicas fue el B2 en comparación con los controles (70% vs 34%, $p < 0.001$). El filogrupo A, por otra parte, fue el más prevalente en las muestras control (42% vs 9%). La diferencia en la prevalencia de 22 genes de virulencia entre los aislados de cistitis y pielonefritis fue de solo 8 genes: 30% vs 53%, *papGII*; 28% vs 41%, *papGIII*; 61% vs 79%, *papAH*; 61% vs 82%, *papC*; 63% vs 87%, *papEF*; 52% vs 83%, *cnf-1*; 74% vs 89%, *ompT* y 70% vs 84%, *usp*, respectivamente, $p < 0.05$.

En Argelia, Zenati *et al.*, 2019 estudiaron 27 cepas de *E. coli* productoras de beta-lactamasas de espectro extendido (ESBLs) recolectadas de 10 hombres (27%) y 17 mujeres (63%) con ITU durante el 2011-2013. De las 10 cepas aisladas de hombres, el 100% amplificó el gen *bla*_{CTX-M-15} y *bla*_{TEM-1}. El 50% de estas cepas pertenecieron al filogrupo A. y el 30% al B2.

Un estudio en España de Soto *et al.*, 2007, se estudiaron 151 cepas de *E. coli* provenientes de pacientes con cistitis ($n=44$), pielonefritis ($n=75$) y prostatitis ($n=35$) se determinaron las posibles relaciones entre cistitis, pielonefritis y prostatitis con la formación de biofilm y perfil de virulencia. Lo destacable de sus resultados es que el 63% de sus cepas aisladas de pielonefritis ($n=20$) son positivas para la formación de biopelícula. El 58% ($n=88$) pertenecen al filogrupo B2, el 23%($n=35$) pertenecen al filogrupo A, el 14% ($n=21$) pertenecen al grupo D y solo 5%($n=7$) al B1. La producción de biofilm del filogrupo A es menor con respecto a los demás filogrupos (10/35 o 29% vs 59/116 o 51%, $p=0.02$). El porcentaje más alto de cepas productoras de biopelícula se observa en el filogrupo B2 con respecto a los demás filogrupos (48/88 o 55% contra 21/63 o 33%, $p=0.009$). No hay una asociación de la formación de biopelícula con los filogrupos B1 y D ($p=0.87$ y 0.45 , respectivamente). El gen *fimA* es el factor de virulencia más frecuentemente identificado (91% de las cepas), la yersiniabactina (*fyuA*), aerobactina (*aer*), fimbria P (*papA*) y hemolisina (*hay*)

están presentes en el 72%, 60%, 42% y 36% de los aislados, respectivamente. Solo la hemolisina y la fimbria tipo 1 se asociaron significativamente con cepas de *E. coli* productoras de biopelícula.

3.1.2 Antecedentes nacionales

Ramírez-Castillo *et al.*, 2018, trabajaron con 86 muestras de *E. coli* aislada de pacientes femeninas (M) y 24 de hombres (H) con ITU (rango de edad: neonatos a 91 años), durante junio y noviembre del 2012. Los filogrupos D (23.6%) y A (19.1%) fueron los más comunes, seguido por el B1 (15.5%), C (13.6%), B2 (11.8%), F (10%), Clados crípticos (5.5%) y E (0.9%). El fenotipo multidrogoresistente (MDR), estuvo distribuido en todas los filogrupos, aunque estuvo significativamente ($p<0.05$) al filogrupo D.

Los porcentajes de resistencia más altos se observaron en trimetoprim-sufametoxazol (72.7%), ampicilina (70.9%), ampicilina-sulbactam (55.5%), peperacilina-tazobactam (55.5%), ciprofloxacina (47.3%) y levofloxacina (43.6%). Los aislados fueron susceptibles a carbapenémicos (ertapenem e imipenem). Las cepas de aisladas de ambos sexos mostraron diferencias significativas entre sí ($p<0.05$) en su resistencia a gentamicina (H:45.8% vs M:23.3%), cefazolina (H:62.5% vs M:36%), ceftazidima (H:54.2% vs 16.3%), ceftriaxona (H:58.3% vs M:18.6%), cefepime (H:58.3% vs M:17.4%), ciprofloxacina (H:70.8% vs M:40.7%) y levofloxacina (H:66.7% vs M:37.2%).

En general, los genes de virulencia *fimH* (71.8%), *fyuA* (68.2%) y *agn43* (54.5%) fueron los de mayor distribución, mientras que *afa/dra* (8.2%) y *cnf-1* (2.7%) tuvieron la más baja. Otros factores de virulencia tuvieron la siguiente distribución: *chuA*, 49.1%; *papC*, 42.7%; *kpsMTII*, 37.3%; *vat*, 20%; *yfcV*, 20%; *sfaS* 10%, and *hlyA*, 9.1%. Solo existió una diferencia significativa en la distribución de *yfcV* entre los aislados de hombres y mujeres (H:41.7% vs M:14%).

El gen *bla_{CTX-M}* fue encontrado en el 20.8% de las cepas de hombres y en el 10.5% de las cepas de mujeres.

3.2 Antecedentes directos

En el laboratorio de Biología Molecular de Enteropatógenos se cuentan con pocos estudios hechos sobre *E. coli* aislada de varones adultos y de la tercera edad cursando con ITU.

García en 2017, estudió 66 aislados del hospital regional del ISSSTE de la ciudad de Puebla del año 2010. De este cepario, el 35% (n=23) fueron aisladas de varones y el 62% de mujeres. El rango de edad de los varones va desde 1 año a 89 años. Los filogrupos más prevalentes en el cepario son el A (33%) y el B2 (32%). Mientras que el filogrupo D, C, F, y B1 presentan una distribución de 12%, 9%, 6%, y 3%, respectivamente. El 5% no son tipificables por medio del método de Clermont *et al.*, 2013.

Los genes de factores de virulencia hallados con mayor frecuencia en este cepario fueron *iucD* (100%), *fimH* (91%) y *vat* (*vatA*+*vatP*) (92%). Y estuvieron ausentes *papA*+*papGII* y *papA*+*papGIII*.

En el perfil de resistencia se evaluaron 24 antibióticos de 10 familias diferentes por medio del método de Kirby-Bauer y se interpretaron los resultados según la *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2017). La mayoría de los antibióticos presentaron resistencias $\geq 20\%$ con excepción de la fosfomicina (9%), colistina (9%), netilmicina (3%) y ertapenem (0%).

El 97% de las cepas se catalogaron como multidrogo resistentes (MDR) y el 3% como extremadamente resistentes (XDR), según los criterios del Comité Europeo sobre Pruebas de susceptibilidad Antimicrobiana (EUCAST, por sus siglas en inglés) y el Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés). El 24% de las cepas presentan el fenotipo de producción de betalactamasa de espectro extendido (BLEE).

Ixtepan en 2013, estudió un cepario proveniente del mismo hospital (ISSSTE) y del mismo periodo de tiempo (2015-2016) pero aislado de pacientes femeninas (n=51, rango de edad:21-86 años). La resistencia 12 familias de antibióticos se concentró en los β -lactámicos (92.2%) y las quinolonas (94.9%). El 90% de las cepas fue MDR y el 10% XDR. El 23.5% del cepario presentó el fenotipo BLEE. La formación de biopelícula se realizó según el método de Cristal Violeta (O'Toole, 2011) y se clasificaron en formadoras y no formadoras de biopelícula (85% vs 15%) según los criterios de Crémet *et al.*, 2013 y Tabasi *et al.*, 2015

Los genes más frecuentes fueron *fimH* (96%) y *iucD* (65%) y el rango de factores de virulencia fue de 1 a 9 genes en el 96% de las cepas. El gen *vat* estuvo ausente.

Los genes de BLEEs más dominantes fueron *bla*_{TEM} (66%) y *bla*_{CTX-M} (25%). El gen *bla*_{SHV} estuvo ausente.

4. Planteamiento del problema

Las ITU son la tercera causa de morbilidad nacional en varones en la edad adulta y senil y el Estado de Puebla se posiciona en los primeros 10 estados con mayor número de caso en estos grupos de edad (SUIVE/DGE/Secretaría de Salud/Estados Unidos Mexicanos, 2018). El agente causal más común en las ITU es *E. coli*. Los aislados de *E. coli* resistente a fluoroquinolonas, MDR y con genes de resistencia a BLEEs han sido reportados con una alta frecuencia en México en los últimos años (Sotomayor de Zavaleta *et al.*, 2015). Además, la formación de biopelícula tiene una importancia en la ITU causadas por cateterismo (CAUTI) (Miryala *et al.*, 2020). Esto, en conjunto, representa un problema de salud pública estatal y nacional.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Caracterizar la clasificación filogenética, virulencia, resistencia antimicrobiana, formación de biopelícula, perfil plasmídico y la relación estadística entre estas variables de aislados de *E. coli* de varones adultos y de la tercera edad con ITU en la ciudad de Puebla.

5.2 Objetivos específicos

1. Clasificar a las cepas filogenéticamente.
2. Determinar la prevalencia de factores de virulencia e islas de patogenicidad asociadas a ExPEC y el puntaje de virulencia.
3. Caracterizar el perfil de resistencia antimicrobiana y el puntaje de resistencia antimicrobiana.
4. Buscar fenotípicamente la presencia de β -lactamasas de espectro extendido.

5. Detectar la presencia de genes que codifican para β -lactamasas de espectro extendido.
6. Evaluar la formación de biopelícula *in vitro*.
7. Caracterizar parcialmente el perfil plasmídico.
8. Analizar estadísticamente la relación entre las variables

6. Material y métodos

6.1 Material biológico

6.1.1 Cepas de *E. coli* aisladas de varones con ITU

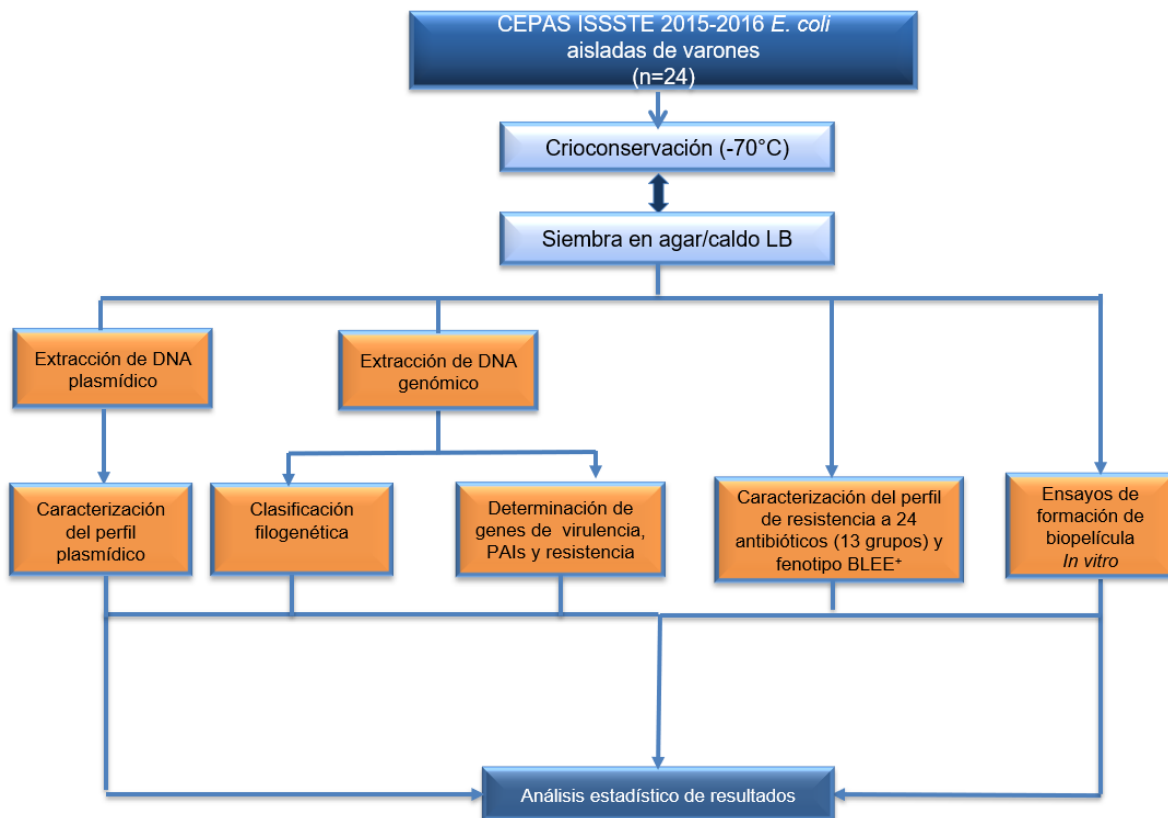
Se usaron un total de 24 aislados de *E. coli* de varones con ITU derechohabientes del Hospital Regional “Puebla” del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSSTE) en el periodo del 2015-2016. Las cepas se encuentran almacenadas en crioconservación a -70°C .

6.1.2 Cepas control

Tabla 5. Cepas controles.

Cepa	Características
CFT073	<i>lucD</i> ⁺ , <i>vat</i> ⁺ , <i>sat</i> ⁺ , <i>hlyA</i> ⁺ , <i>papGIII</i> ⁺ , <i>fliC</i> ⁺ y <i>fimH</i> ⁺ , <i>kpsMT-II</i> ⁺ , PAI I _{CFT073} ⁺ y PAI II _{CFT073} ⁺
J96	PAI I _{J96} ⁺ y PAI II _{J96} ⁺
059-I	<i>vat</i> ⁺ , <i>sat</i> ⁺ , <i>papGIII</i> ⁺
GAG1	<i>lucD</i> ⁺ , <i>sat</i> ⁺ , <i>hlyA</i> ⁺ , <i>fliC</i> ⁺ y <i>fimH</i> ⁺ y <i>cnf</i> ⁺ , <i>chuA</i> ⁺ , <i>yjaA</i> ⁺ y <i>TspE4.C2</i> ⁺
<i>E. coli</i> K-12 MC4100	<i>arpA</i> ⁺
EHEC/EDL	Confirmación del filogrupo E
C7206	Confirmación del filogrupo C
<i>E. coli</i> ATCC 25922	Control positivo de ensayos de biopelícula y de antibiogramas
058-I	<i>traT</i> ⁺ y perfil plasmídico
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Control positivo para antibiogramas
C7225	<i>bla</i> _{OXA-1} ⁺ y <i>bla</i> _{CTX-M} ⁺
SA42	<i>bla</i> _{SHV} ⁺
1550	<i>bla</i> _{TEM} ⁺

6.2 Estrategia de trabajo



6.3 Técnicas y procedimientos

6.3.1 Extracción de DNA plasmídico y genómico

La metodología de extracción de DNA genómico y plasmídico se realizó por lisis alcalina descrita en Green y Sambrook, 2012.

6.3.2 Identificación de grupos filogenéticos

Todos los grupos filogenéticos de *E. coli sensu stricto* (A, B2, C, D y E) y un clado críptico (clado I) fueron identificados usando una PCR cuádruplex para amplificar los genes *arpA*, *chuA*, *yjaA* y el fragmento *TSPE4.C2*; la segunda y la tercer PCR fueron para los filogrupos C (*arpAgpE*+) y E (*trpAgpc*), respectivamente según la metodología de Clermont *et al.*, . El criterio para poder clasificar a las cepas según los genes amplificados mediante PCR se muestra en la tabla 6:

Tabla 6. Criterios genotípicos de clasificación filogenética.

Genotipo cuádruplex				Filogrupo	Siguiete paso
<i>arpA</i>	<i>chuA</i>	<i>yjaA</i>	<i>TspE4.C2</i>		
+	-	-	-	A	
+	-	-	+	B1	
-	+	-	-	F	
-	+	+	-	B2	
-	+	+	+	B2	
-	+	-	+	B2	Podría ser confirmado
+	-	+	-	A o C	Usar primer C-específicos. Si C+, entonces C, sino A.
+	+	-	-	D o E	Usar primer E-específicos. Si E+, entonces E, sino D.
+	+	-	+	D o E	Usar primer E-específicos. Si E+, entonces E, sino D.
+	+	+	-	E o clado I	Usar primer E-específicos. Si E-, entonces clado I. Confirmar usando primer de clado críptico.
-	-	+	-	Clado I o Clado II	Confirmar usando primers de clado críptico
-	+	-	-	Clado III, IV o V	Confirmar usando primers de clado críptico
-	-	-	+	Desconocido	MLST
-	-	+	+	Desconocido	MLST
+	-	+	+	Desconocido	MLST
+	+	+	+	Desconocido	MLST
-	-	-	-	Desconocido	MLST

chuA =receptor hemo de membrana externa; *arpA* =regulador de acetil-CoA sintetasa; *tspE4C.2* = gen putativo de lipasa esterasa, *yjaA* = proteína de respuesta a estrés.

6.3.3 Detección de genes de virulencia e islas de patogenicidad

La detección de los 15 genes de virulencia y 4 islas de patogenicidad asociados a ExPEC se llevó a cabo a través la reacción en cadena de polimerasa (PCR) según las condiciones previamente establecidas en el grupo de trabajo (Laboratorio de Biología Molecular de Enteropatógenos).

Los factores de virulencia e islas de patogenicidad que se buscaron están detallados en la tabla 7.

Tabla 7. Factores de urovirulencia que se identificaron por PCR en el laboratorio. Pesos de cada gen, nombre y tipo de PCR en las que se determinaron.

Factor de virulencia	Peso	Codifica	PCR	Control +	Tm (C°)
<i>iucD</i>	512 pb	Síntesis de aerobactina	PCRM1	CFT703	57.7
<i>satA</i>	384 pb	Toxina secretada autotransportadora			
<i>fliC</i>	304 pb	Flagelina			
<i>fimH</i>	210 pb	Adhesina del extremo distal de la fimbria tipo 1.			
<i>papGIII</i>	562 pb	Adhesina del pili asociado a pielonefritis	PCRM2	CFT073+059-I	61.4
<i>papGII</i>	421 pb				
<i>vatA</i>	330 pb	Proteína transportadora vacuolizante.			
<i>vatP</i>	226 pb				
<i>iha</i>	150 pb	Adhesina homóloga IrgA receptora de siderófo			
<i>hlyA</i>	1280pb	α-hemolisina	PCRM3	GAG1	61.4
<i>satP</i>	880 pb	Toxina secretada autotransportadora			
<i>papA</i>	641 pb	subunidad mayor fimbrial del pili asociado a pielonefritis			
<i>kpsMT-II</i>	578 pb	Cápsulas del grupo 2	PCR individual	CFT073	61..4
<i>traT</i>	739 pb	Lipoproteína de membrana externa de resistencia al complemento.	PCR individual	058-I	
<i>cnf-1</i>	1286 pb	Factor necrosante citotóxico tipo 1	PCR individual	GAG1	61.4
PAI ICFT073	930 pb	<i>hlyA</i> , operón <i>pap</i> , aerobactina, <i>sat</i> , <i>iha</i> , precursor Ag43, <i>kpsMT-II</i> (cápsulas del grupo II)	PCR dúplex	CFT073	60.1
PAI IICFT073	400 pb	Operón <i>pap</i>			
PAI IIJ96	2.5 kb	<i>hlyA</i> , <i>pap</i>	PCR dúplex	J96	
PAI IJ96	400 pb	<i>hlyA</i> , <i>cnf-1</i>			

6.3.4 Puntaje de virulencia

El puntaje de virulencia (PV) fue calculado por la suma de todos los genes de virulencia detectados en cada cepa (excepto PAIs). Los genes *pap* (*papA*, +*papGII*), *sat* (*satA*+ *satP*) y *vat* (*vatA* y *vatP*) fueron considerados como un solo PV. Esta característica molecular predice la virulencia experimental *in vivo* (Johnson *et al.*, 2006).

6.3.4 Determinación del perfil de resistencia antimicrobiana

Se llevó a cabo por el método de Kirby–Bauer, evaluándose la resistencia a 24 antibióticos pertenecientes a 9 familias (aminoglucósidos, β -lactámicos, quinolonas, nitrofuranos, fosfonatos, inhibidores de la vía folato, fenicoles, polimixinas y tetraciclinas) y 14 grupos (aminoglucósidos, penicilinas, penicilinas+inhibidor, cefalosporinas de 1ra y 2da generación (corto espectro), cefalosporinas de 3ra y 4ta generación (amplio espectro), monobactámicos, carbapenémicos, quinolonas, nitrofuranos, fosfonatos, inhibidores de la vía folato, fenicoles, polimixinas y tetraciclinas).

Se sembraron 10 μ L del crioconservado en agar soya tripticaseína (TSA) a 37°C toda la noche. Luego se tomó 1 colonia y se cultivó de 2 a 3 horas a 37 °C en medio líquido tripticaseína hasta que se obtuvo una turbidez de McFarland de 0.5. Con un hisopo se realizó una siembra masiva en agar Mueller-Hinton, se dejó secar y se colocarán los sensidiscos, se incubó por 18 hrs. a 37°C y se llevó a cabo la lectura para ser clasificada según los criterios del CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute, 2018).

Para la determinación de perfiles de resistencia se usaron como control, las cepas de referencia *Escherichia coli* ATCC25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 según los criterios del CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute, 2018).

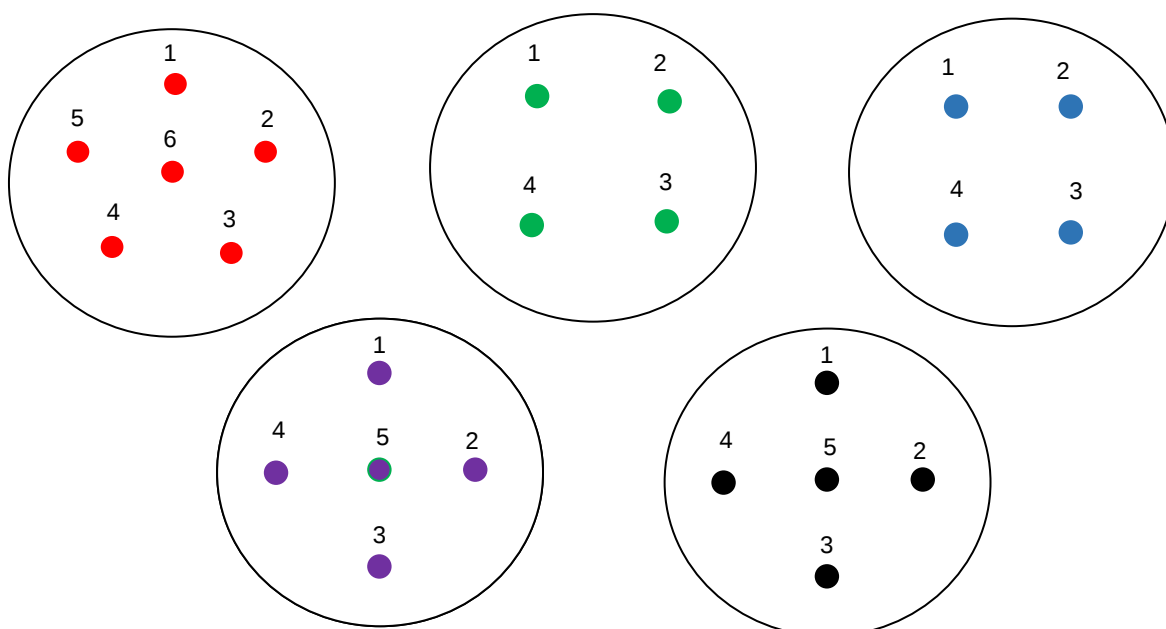


Figura 7. Distribución de sensidiscos.

Rojo: 1 CRO (ceftriaxona), 2 CTX (cefotaxima), 3 CFZ (ceftazidima), 4 ATM (aztreonam), 5 FEP (cefepime), 6 AMC (amoxicilina/ácido clavulánico). Verde: 1 C (cloranfenicol), 2 CFX (cefuroxima), 3 AN (ácido nalidixico), 4 CIP (ciprofloxacina). Azul: 1 FOS (fosfomicina), 2 TC (tetraciclina), 3 COL (colistina), 4 ERT (ertapenem). Morado: 1 GM (gentamicina), 2 NET (netilmicina), 3 OFX (ofloxacina), 4 TSX (trimetoprim/sulfametoxazol) y Negro: 1 AM (ampicilina), 2 LVX (levofloxacina), 3 NF (nitrofurantoína), 4 NOR (norfloxacina), 5 CF (cefalotina).

6.3.7. Puntaje de resistencia

El puntaje de resistencia (PR) fue el número de grupos antimicrobianos (de los 14 estudiados) a los cuales un aislado presentó resistencia a ≥ 1 antibiótico representativo de cada clase (Kudinha *et al.*, 2013).

6.3.6 Clasificación de la resistencia

Los 24 antibióticos evaluados correspondieron a 13 categorías antimicrobianas del esquema publicado por Magiorakos *et al.*, 2012 para la clasificación de la resistencia antimicrobiana en Enterobacterias según lineamientos del CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) y EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) (Tabla 8). Las cepas se clasificaron en NMDR: No multidrogo resistente (Resistencia en ≤ 2 grupos); MDR: Multidrogoresistente (Resistencia a ≥ 1 antibiótico en ≥ 3 grupos); XDR: Extremadamente resistente (Resistencia a ≥ 1 antibiótico en todas las categorías excepto ≤ 2); PDR: Pandrogo resistente (Resistencia a todos los antibióticos enlistados).

Tabla 8. Esquema para la caslificación de la resistencia antimicrobiana en *Enterobacterias*

Categoría antimicrobiana	Antibiótico(s)
aminoglucósidos	gentamicina, amikacina, netilmicina
carbapenémicos	ertapenem
cefalosporinas de 1ra y 2da generación	cefuroxima
cefalosporinas de 3ra y 4ta generación	cefotaxima, ceftriaxona, ceftaxiddima, cefepime
fluoroquinolonas	ciprofoxacina
inhibidores de la vía folato	trimetroprim-sulfametoxazol
monobactámicos	aztreonam
Penicilinas	ampicilina
penicilinas + inhibidores de β -lactámicos	amoxicilina-ácido clavulánico
Fenicoles	cloranfenicol
Fosfonatos	fosfomicina
Polimixinas	colistina
Tetraciclinas	tetraciclina

Modificado de: Magiorakos *et al.*, 2012

6.3.5 Determinación del fenotipo de producción de BLEE

La detección del fenotipo BLEE se realizó a través del método del doble disco como lo describen (Lezameta, Gonzáles-Escalante, & Tamariz, 2010).

Las placas de agar Mueller Hinton fueron inoculadas con las cepas de estudio, con una turbidez equivalente al tubo N.º0.5 de la escala de Mc Farland. Se colocó un disco de AMC en el centro de la placa Petri con agar Mueller Hinton y alrededor discos de CTX, FEP y CFZ, de manera opcional se analizaron los discos de CRO y ATM (figura 7). La presencia de BLEE se manifestó por el efecto sinérgico del inhibidor y los discos -efecto de huevo, cola de pez o balón de futbol americano-.

6.3.7 Detección de genes asociados a betalactamasas

La detección de los genes *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, *bla_{OXA-1}* y *bla_{CTX-M}* se hizo a través de reacciones en cadena de polimerasa (PCR) individuales estandarizadas previamente (Tabla 9).

Tabla 9. Condiciones de las PCR para genes de producción de β -lactamasas.

Gen	Primers	Tm	Cepa control	Tamaño del producto	Referencia
<i>bla_{CTX-M}</i>	F: 5' CGATGTGCAGTACCAGTAA 3' R: 5' TTAGTGACCAGAATCAGCGG 3'	52°C	C7225	586 pb	Batchelor <i>et al.</i> , 2005
<i>bla_{OXA-1}</i>	F: 5' ACA CCA TAC ATA TCA ACT TCG C 3' R: 5' AGT GTG TTT AGA ATG GTG ATC 3'	61°C	C7225	766 pb	Briñas <i>et al.</i> , 2003
<i>bla_{SHV}</i>	F: 5' CAC TCA AGG ATG TAT TGT G 3' R: 5' TTA GCG TTG CCA GTG CTC G 3'	52°C	SA12	883 pb	Pitout <i>et al.</i> , 2003
<i>bla_{TEM}</i>	F: 5' ATT CTT GAA GAC GAA AGG GC 3' R: 5' ACG CTC AGT GGA ACG AAA AC 3'	60°C	1550	1209 pb	Belaouaj <i>et al.</i> , 1994

6.3.8 Ensayo de formación de biopelícula en microplaca de 96 pozos

Se sembraron 5 ul de crivial en placas de LB de 10 ml. Posteriormente, se incubó la placa por 24 hrs $\pm$ 30 min. en 35-37°C. Luego se tomaron de 2 a 3 colonias bien aisladas y se resembraron en 3ml de caldo LB e incubaron durante 18 hrs $\pm$ 30 min. en 35-37°C. Se procedió a ajustar las cepas a una D.O. 600nm de 1.0 (8×10^8). Se Diluyó con caldo LB cuando fue necesario. Luego, se vertieron 10ul del cultivo en 990 ul de TSB en tubos Eppendorf (dilución 1:100) y se homogeneizó 3 veces para colocar 200 ul de la suspensión en cada pozo de la microplaca estéril (3 réplicas por cepa). Se incubó en estático 24 hrs. a 35°C-37°C. Posteriormente se midió en el lector de microplacas a 620nm. Se quitó el medio con punta por cepa (esquina del pozo, así para todos). Se vertieron lentamente 200 ul de agua tridestilada y se retiraron con pipeta muy lentamente pegado a una esquina del pozo. (cambiar punta por cepa). Se repitió el proceso 2 veces. Se secó sacudiendo la microplaca dentro de la campana después de cada paso de lavado. Se fijó la biopelícula con 150 ul en cada de metanol en cada pocillo y se dejó reposar 20 min. Se sacó sacudiendo y se dejó la microplaca secarse de 15 a 20 minutos. Se vertieron 150 ul de cristal violeta por cepa. (una punta para todas) y se dejó reposar por 20 min. Se tiró el cristal violeta con punta lentamente y se lavó con agua tridestilada 2 veces (poner agua en cada réplica y quitar lentamente pegado a una esquina del pozo). Se dejó reposar 15 min. y se vertieron 200 ul de ácido acético al 33% por cepa y se dejó

reposar 30 min. (Observar triplicado en el mismo tono). Se midió la D.O. a 595nm y se registraron los datos. Posteriormente se analizaron los datos considerando un punto de corte (D.O.c) representado por $3 \times SD$ sobre la media de la D.O. de los pozos con el control negativo (sin bacterias cultivadas). Las cepas fueron clasificadas en las siguientes categorías: no productoras de biopelícula ($D.O. \leq D.O.c$), productora débil de biopelícula, ($D.O.c < D.O. \leq 2 \times D.O.c$), productora moderada de biopelícula ($2 \times D.O.c < D.O. \leq 4 \times D.O.c$) y productora fuerte de biopelícula ($4 \times D.O.c < DO$).

6.4 Análisis estadísticos

Todas las pruebas estadísticas fueron hechas utilizando el software R versión 3.6.1. La comparación entre proporciones de las diferentes variables categóricas fue evaluada usando la prueba de Fisher. La comparación entre grupos fue evaluada con pruebas paramétricas (t de Student) y no paramétricas (U de Mann-Whitney), según el caso. La prueba Shapiro-Wilks fue utilizada para saber si los datos presentaban una distribución Gaussiana. La correlación entre los grupos fue evaluada calculando el coeficiente de correlación de Spearman. Para todas las pruebas estadísticas, el valor de significancia fue de $p < 0.05$.

7. Resultados

7.1 Análisis poblacional

Durante el periodo 2015-2016, se aislaron 24 cepas de *E. coli* de pacientes varones con ITU derechohabientes del hospital regional del ISSSTE de la ciudad de Puebla en el periodo 2015-2016. La edad media de los pacientes fue de 71 años (rango 46-91 años). El 71% de los aislados fueron de varones de 60 y más años y 21% de varones de entre 45 y 59 años (figura 8).

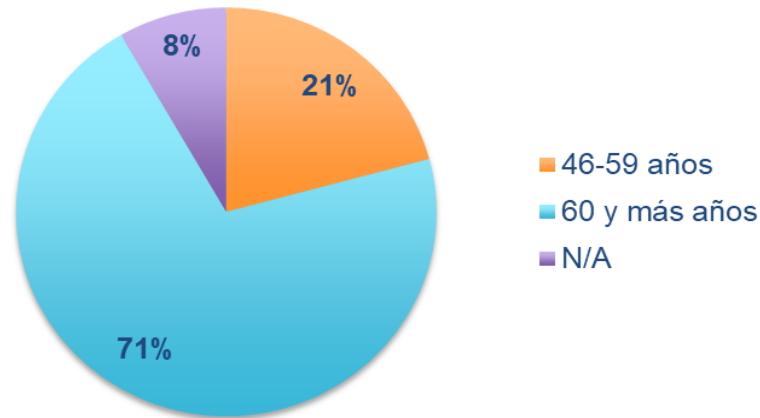
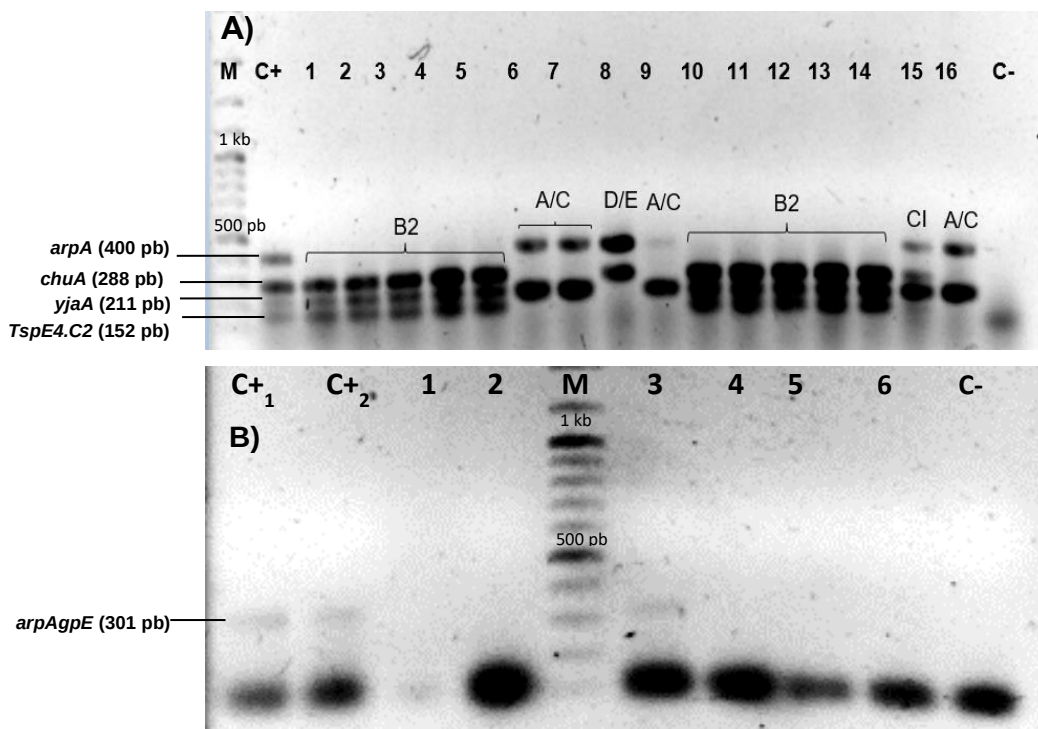


Figura 8. Distribución de la población de estudio según grupos de edad (n=24).

N/A: no hay datos.

7.2 Clasificación filogenética

Para clasificar filogenéticamente a las cepas de *E. coli* estudiadas, se realizaron las PCRs según la metodología previamente publicada por Clermont *et al.*, 2013 (figura 9) Dando como resultado, 6 filogrupos: 5 filogrupos de *E. coli sensu stricto* (A, B2, C, D y E) y un clado críptico (clado I). Una cepa perteneció a un clado indeterminado (CI/II). El filogrupo más prevalente fue el B2 (60%, n=14) seguido del filogrupo C (17%, n=4) y el A (9%, n=2). Los filogrupos D y E, así como el clado I e indeterminado (CI/CII) representaron el 4% (n=1) del cepario (figura 10).



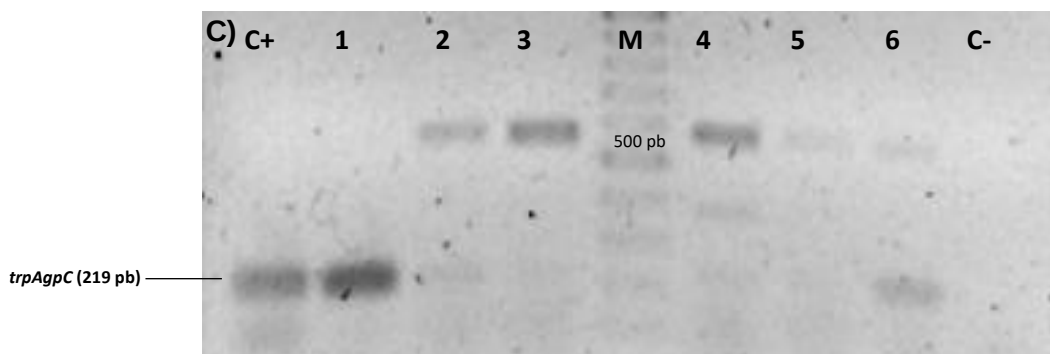


Figura 9. Electroforesis en geles de agarosa (1%) para la Identificación filogenética de cepas de aislados de *E. coli* de varones con ITU.

A) Determinación de los filogrupos B2, Clado I, A/C y D/E por PCR múltiplex amplificando *arpA*, *chuA*, *yjaA* y *tspE4*. C2. M, 100 pb plus DNA Ladder; C+, GAG1+MC4100; 1, GAG1; 2, 102-I; 3, 126-I; 4, 129-I; 5, 130-I; 6, 132-I; 7, 144-I; 8, 154-I; 9, 155-I; 10, 159-I; 11, 161-I; 12, 162-I; 13, 167-I; 14, 168-I; 15, 173-I; 16, 174-I; C-, control negativo. **B)** PCR para confirmación del filogrupo E amplificando *arpAgpE*. M, 100 pb plus DNA Ladder; C+₁, EHEC O157:H7 cepa EDL 933; C+₂, C7204; 1, 102-I; 2, 103-I; 3, 108-I; 4, 110-I; 5, 115-I; 6, 117-I y C-, control negativo. **C)** PCR para confirmación del filogrupo C amplificando *trpAgpC*. M, 100 pb plus DNA Ladder; C+, C7206; 1, 117-I; 2, 125-I; 3, 132-I; 4, 144-I; 5, 155-I; 6, 174-I; C-, control negativo.

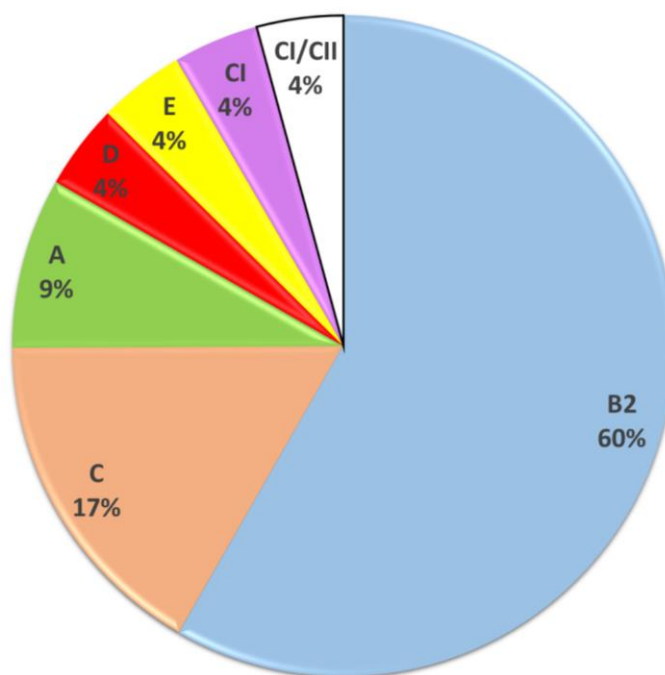
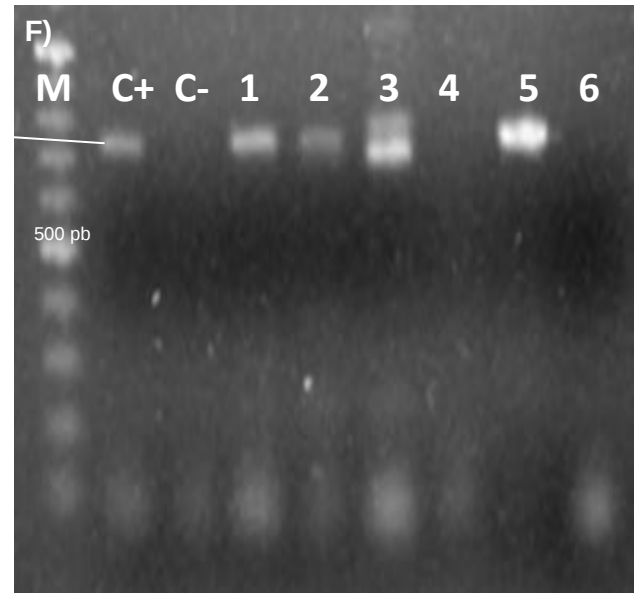
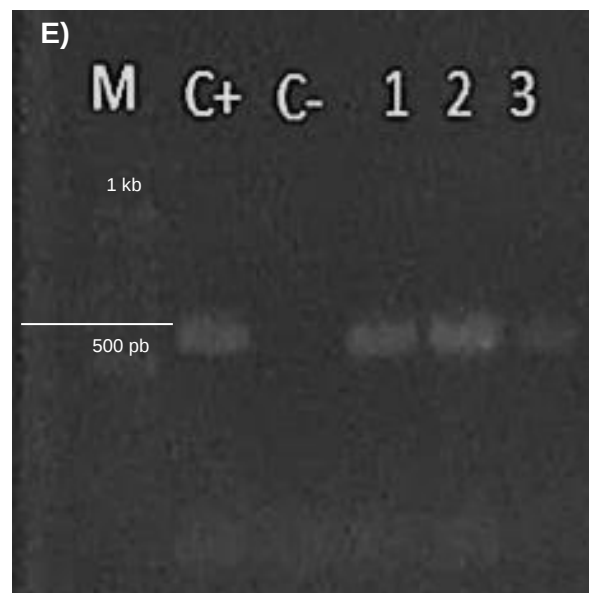
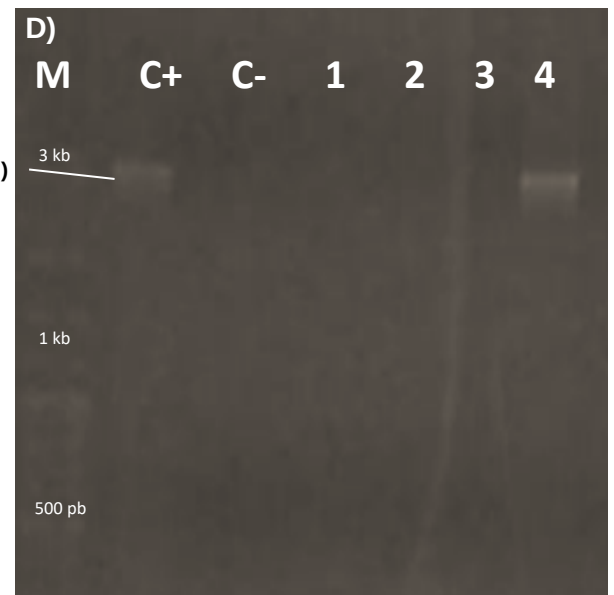
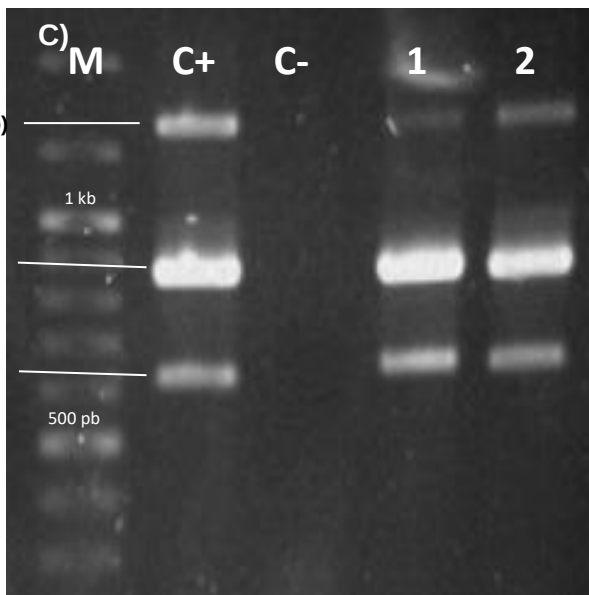
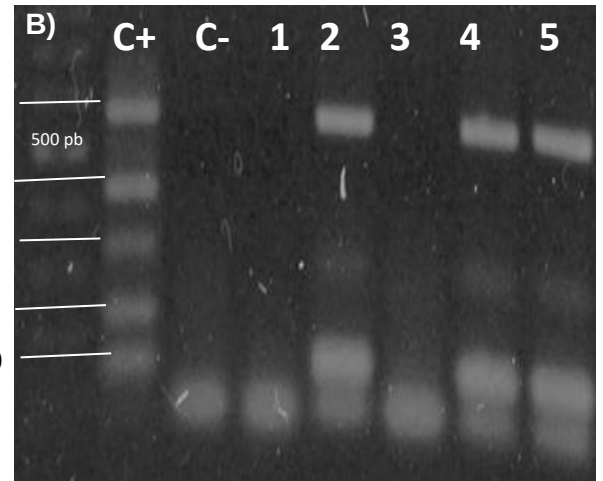
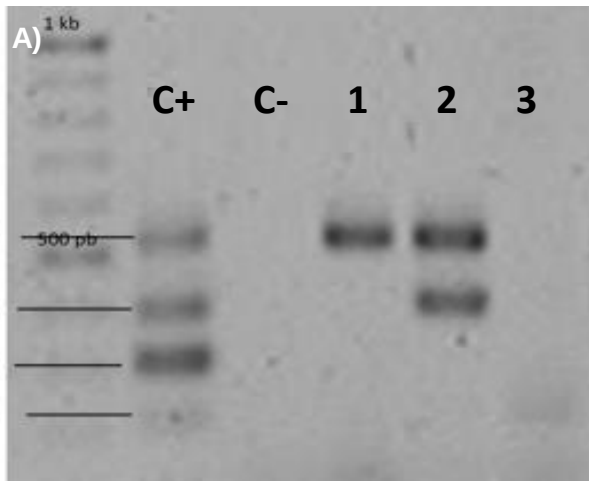


Figura 10. Distribución de Grupos Filogenéticos en aislados de *E. coli* de varones con ITU determinadas por PCR ($n=24$).

7.3 Características de virulencia asociadas a ExPEC

Para identificar la presencia de 15 genes de virulencia y 4 islas de patogenicidad (PAIs) asociados a las cepas tipo de ExPEC CFT073 y J96, se llevaron a cabo cinco PCR múltiplex y tres PCR individuales, previamente estandarizadas en el grupo de trabajo. En la figura 11 se muestran algunas fotografías representativas de las electroforesis llevadas a cabo para cumplir este objetivo.



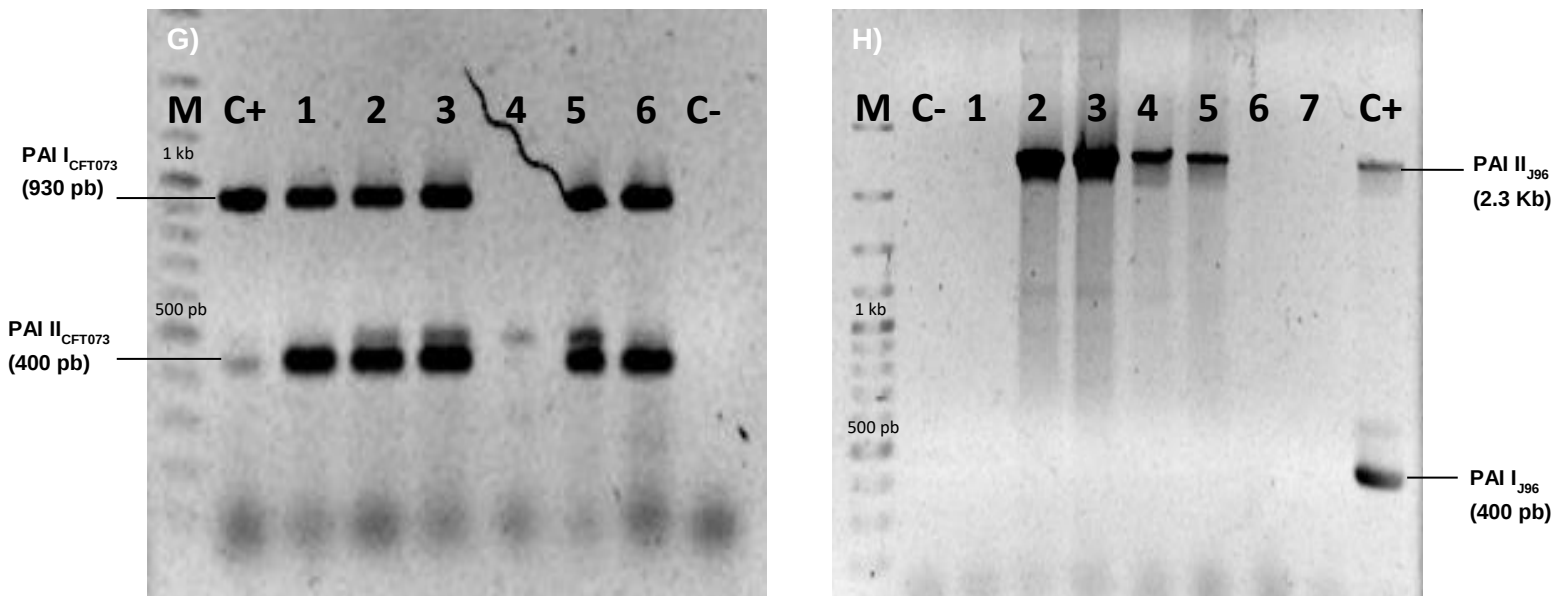


Figura 11. Electroforesis en geles de agarosa (1%) para la identificación de genes de virulencia asociados a ExPEC e islas de patogenicidad.

A) PCR múltiplex 1. M, 100 pb plus DNA Ladder; C+, CFT073; C-, control negativo; 1, 102-I; 2, 103-I; 3, 108-I. **B)** PCR múltiplex 2. M, 100 pb plus DNA Ladder; C+, CFT073+059I, C-, control negativo; 1, 102-I; 2, 103-I; 3, 108-I; 4, 110-I; 5, 115-I. **C)** PCR múltiplex 3. M, 100 pb plus DNA Ladder; C+, GAG1; C-, control negativo; 1, 128-I; 2, 129-I. **D)** PCR individual *cnf-1*. M, 100 pb plus DNA Ladder; C+, GAG1; C-, control negativo; 1, 102-I; 2, 103-I; carril 3, 108-I; 4, 110-I; 5, 115-I. **E)** PCR individual *kpsMT-II*. M, 100 pb plus DNA Ladder; C+: CFT073, C-: control negativo; 1, 103-I; 2, 108-I; 3, 110-I. **F)** PCR individual *traT*. M, 100 pb plus DNA Ladder; 1, 117-I; 2, 118-I; 3, 132-I; 4, 162-I; 5, 168-I; 6, 174-I; C+, 059I; C-, control negativo. **G)** PCR dúplex islas de patogenicidad PAI I_{CFT073} y II_{CFT073}. M, 100 pb plus DNA Ladder; C+, CFT073, 1, 108-I; 2, 110-I; 3, 115-I; 4, 126-I; 5, 127-I; 6, 128-I; C-, mezcla sin DNA. **H)** PCR dúplex islas de patogenicidad PAI I_{J96} y II_{J96}. M, 100 pb plus DNA Ladder; C-, control negativo; 1, 159-I; 2, 161-I; 3, 162-I; 4, 167-I; 5, 168-I; 6, 173-I; 7, 174-I; C+: J96

Los genes más frecuentes fueron *fimH* e *iucD* (92% y 88%, respectivamente) encontrados en un porcentaje significativamente alto con respecto a otros genes de virulencia (*iucD* vs *papA* y *satA*, $p < 0.05$; vs otros genes de virulencia, $p < 0.01$). Los genes *papGII*, *fliC* y la PAI I_{J96} estuvieron ausentes. Al menos dos factores de virulencia de cada categoría de virulencia (adherencia y movilidad, captación de hierro, citotoxicidad y evasión de la respuesta inmune) y tres PAIs (PAI I_{CFT073}, PAI II_{CFT073} y PAI II_{J96}) fueron identificados en al menos el 30% del cepario (figura 12).

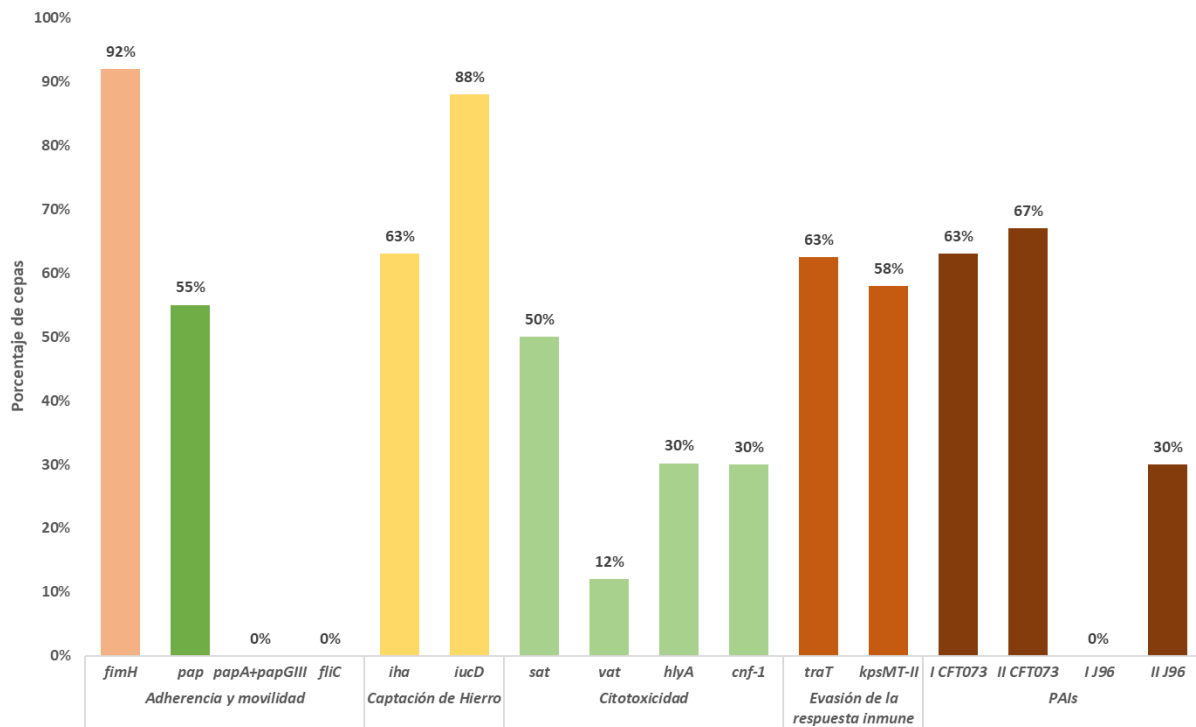


Figura 12. Genes de virulencia y PAIs presentes en aislados de *E. coli* de varones con ITU ($n=24$).

Los 15 genes de virulencia y 4 islas de patogenicidad fueron identificados por PCR. *fimH*= adhesina de la fimbria tipo 1; *pap(papA+papGII)*=, subunidad mayor fimbrial del pili asociado a pielonefritis y alelo 2 de la adhesina; *papA+papGIII*= subunidad mayor fimbrial del pili asociado a pielonefritis y alelo 3 de la adhesina; *fliC*, flagelina; *iha*, adhesina homóloga IrgA receptora de siderófo; *iucD*, aerobactina; *sat*, toxina autotransportadora secretada; *vat*, toxina autotransportadora vacuolizante; *hlyA*, hemolisina; *cnf-1*, factor de necrosis citotóxico-1, *traT*=proteína de resistencia al complemento; *kpsMT-II*=síntesis de la cápsula del grupo 2. PAI I_{CFT073}, Isla de patogenicidad I de la cepa CFT073; PAI II_{CFT073}: Isla de patogenicidad II de la cepa CFT073; PAI I_{J96}, Isla de patogenicidad I de la cepa J96; PAI II_{J96}, Isla de Patogenicidad II de la cepa J96. Cada categoría está indicada en el eje de las abscisas.

Dado que los genes asociados a toxinas (*sat* y *vat*) son muy grandes para una PCR múltiplex, se amplificaron en sus subunidades autotransportadoras (*satA* y *vatA*) y sus subunidades proteasa (*satP* y *vatP*). También, se amplificaron 3 subunidades diferentes de los genes *pap*, a saber: la proteína mayor de la pilina (*papA*), el alelo II de la adhesina (*papGII*) y el alelo III (*papGIII*). En la figura 13. se muestra la distribución de genes *papA*, *papGII*, *papGIII*, *satA*, *satP*, *vatA* y *vatP*.

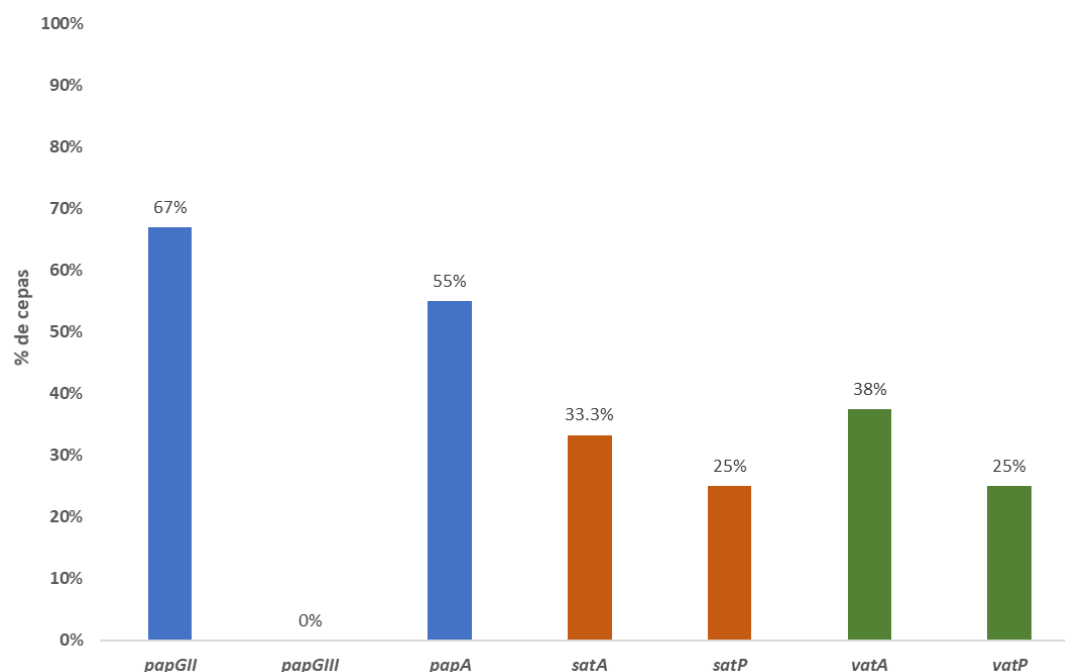


Figura 13. Distribución de los genes *papGII*, *papGIII*, *papA*, *satA*, *satP*, *vatA* y *vatP* en aislados de *E. coli* de varones con ITU (n=24).

Además, se obtuvo un perfil de las PAIs identificadas. Las cepas que presentaron las combinaciones: (PAI I_{CFT073} + PAI II_{CFT073}) y (PAI I_{CFT073} + PAI II_{CFT073} + PAI II_{J96}) y la ausencia de PAIs se presentaron en prácticamente (30% - 33%). La PAI II_{CFT073} sin ir acompañada de alguna otra PAI, se encontró solamente en una cepa (174-I). Las PAI I_{CFT073} y PAI II_{J96} sin ir acompañada de alguna otra PAI estuvieron ausentes (tabla 10). Interesantemente, 13 de las 15 cepas con los perfiles (PAI I_{CFT073} + PAI II_{CFT073}) y (PAI I_{CFT073} + PAI II_{CFT073} + PAI II_{J96}) pertenecieron al filogrupo B2 con excepción de las cepas 108-I y 127-I (Filogrupo E y clado indeterminado, respectivamente) (ver tabla 27 en Anexos).

Tabla 10. Perfil de las PAIs en aislados de *E. coli* de varones con ITU.

Perfil PAI	No. De cepas (%)	ID
Ninguna PAI	8(33.3)	102-I, 117-I, 125-I, 132-I, 144-I, 154-I, 155-I, 174-I
PAI I _{CFT073}	0	n/a
PAI II _{CFT073}	1(4.0)	173-I
PAI I _{J96}	0	n/a
PAI II _{J96}	0	n/a
PAI I _{CFT073} + PAI II _{CFT073}	8(33.3)	103-I, 108-I, 110-I, 118-I, 126-I, 127-I, 130-I, 159-I
PAI I _{CFT073} + PAI II _{CFT073} + PAI II _{J96}	7(30.0)	115-I, 128-I, 129-I, 161-I, 162-I, 167-I, 168-I

Tabla 11. Relación entre factores de virulencia y PAIs en aislados de *E. coli* de varones con ITU (n=24).

genes de virulencia	Islas de patogenicidad No (%)				TOTAL (n=24)
	PAI I CT073 (n=15)	PAI II CFT073 (n=16)	PAI I J96 (n=0)	PAI II J96 (n=7)	
<i>fimH</i>	15 (100%)	16 (100%)	0 (0%)	7 (100%)	22 (92%)
<i>pap</i>	13 (87%) *	13 (81.2%) *	0 (0%)	7 (100%) *	13 (54%)
<i>fliC</i>	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0(0%)	0 (0%)
<i>Iha</i>	13(87%) *	13 (81.2%) *	0 (0%)	7 (100%) *	15(65.5%)
<i>iucD</i>	15 (100%)	16 (100%)	0 (0%)	7 (100%)	21(87.5%)
<i>sat</i>	11 (73.3%) *	11 (68.75%) *	0 (0%)	6 (85.7%)	12(50%)
<i>vat</i>	1 (7%)	1 (6.25%)	0 (0%)	0(0%)	3 (12%)
<i>hlyA</i>	7 (46.6%) *	7 (43.75%)	0 (0%)	7(100%) *	7 (30%)
<i>cnf-1</i>	7 (46.6%) *	7 (43.75%)	0 (0%)	7(100%) *	7 (30%)
<i>traT</i>	10 (67%)	11 (68.75%)	0 (0%)	6 (85.7%)	15 (63%)
<i>kpsMT-II</i>	12 (80%) *	13 (81.2%) *	0 (0%)	6 (85.7%)	14 (58%)

*= Valor estadísticamente significativo ($p<0.05$), Prueba de Fisher.

Se hizo una prueba de Fisher ($p<0.05$) para saber si había o no alguna relación estadísticamente significativa entre los factores de virulencia y las PAIs como las reportadas por Lloyd *et al.*, 2007 y Oelschlaeger *et al.*, 2002 (ver tabla 3).

Existieron relación estadísticamente significativa entre los genes *pap*, *iha*, *sat*, *hlyA* *cnf-1*, *kpsMT-II* y la PAI I_{CFT073}, así como en los genes *pap*, *iha*, *sat*, *kpsMT-II* y la PAI II_{CFT073}; también, entre *pap*, *iha*, *hlyA* y *cnf-1* y la PAI II_{J96} (tabla 11).

Calculamos también el puntaje de virulencia (ver Materiales y Métodos) ya que predice la virulencia experimental *in vivo* y también para poder realizar análisis estadísticos de esta variable. El PV máximo fue de 10 y el mínimo de 1. La media fue de 6 ± 2.8 . El puntaje de virulencia más frecuente fue el de 3 y 9 presentes en 6 y 4 cepas, respectivamente (figura14).

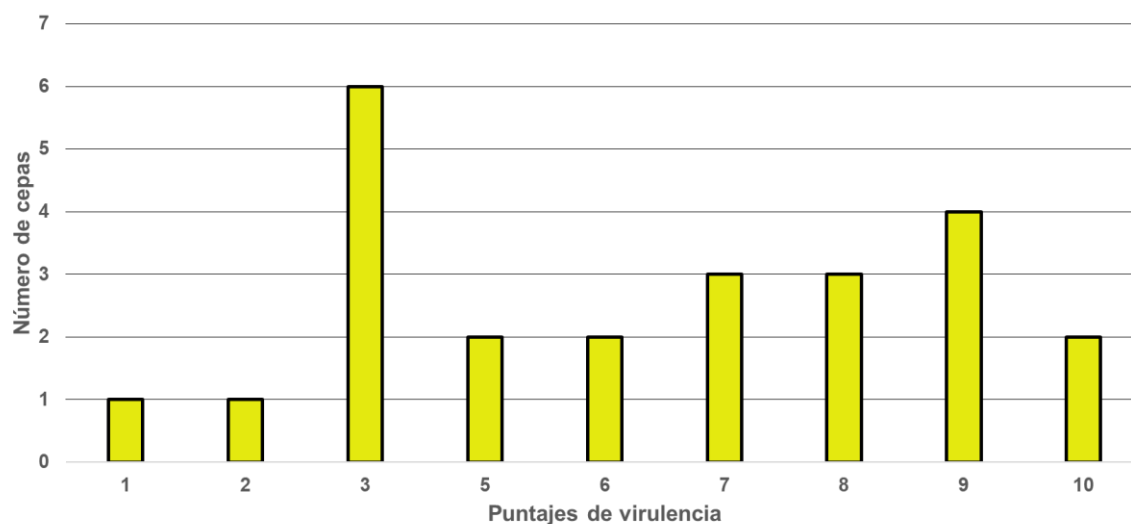


Figura 14. Distribución de los puntajes de virulencia en aislados de *E. coli* de varones con ITU (n=24).

En cuanto a la diversidad de la virulencia, se presentaron 22 perfiles de virulencia diferentes, uno de ellos fue compartido por dos cepas pertenecientes al filogrupo B2 (162-I y 167-I) (Tabla 12). Dicho virotipo contiene los siguientes genes y PAIs: *fimH*, *papGII*, *papA*, *iucD*, *iha*, *satA*, *satP*, *hlyA*, *cnf-1*, *traT* y *kpsMII*, PAIs: I y II de CFT073 y II de J96 con un puntaje de virulencia de 9.

Tabla 12. Virotipo y perfil PAI común en dos aislados de *E. coli* de varones con ITU (n=24).

cepa	Virotipo y perfil PAI	PV	Filogrupo
162-I	<i>fimH</i> , <i>papGII</i> , <i>papA</i> , <i>iucD</i> , <i>iha</i> , <i>satA</i> , <i>satP</i> , <i>hlyA</i> , <i>cnf-1</i> , <i>traT</i> , <i>kpsMII</i> , PAIs: I CFT073, II CFT073 y II J96	9	B2
167-I			

7.4 Resistencia antimicrobiana

Se realizaron antibiogramas por el método de Kirby-Bauer para caracterizar la resistencia antimicrobiana a 24 antibióticos de 14 grupos y se interpretaron bajo los lineamientos del CLSI, 2018.

Las cepas mostraron mayor resistencia antimicrobiana hacia las quinolonas y a los β -lactámicos (100% y 90%, respectivamente) que a los aminoglucósidos (50%) y otras familias de antibióticos como los nitrofuranos, fosfonatos, sulfas, fenicoles, polimixinas y tetraciclinas (figura 15).

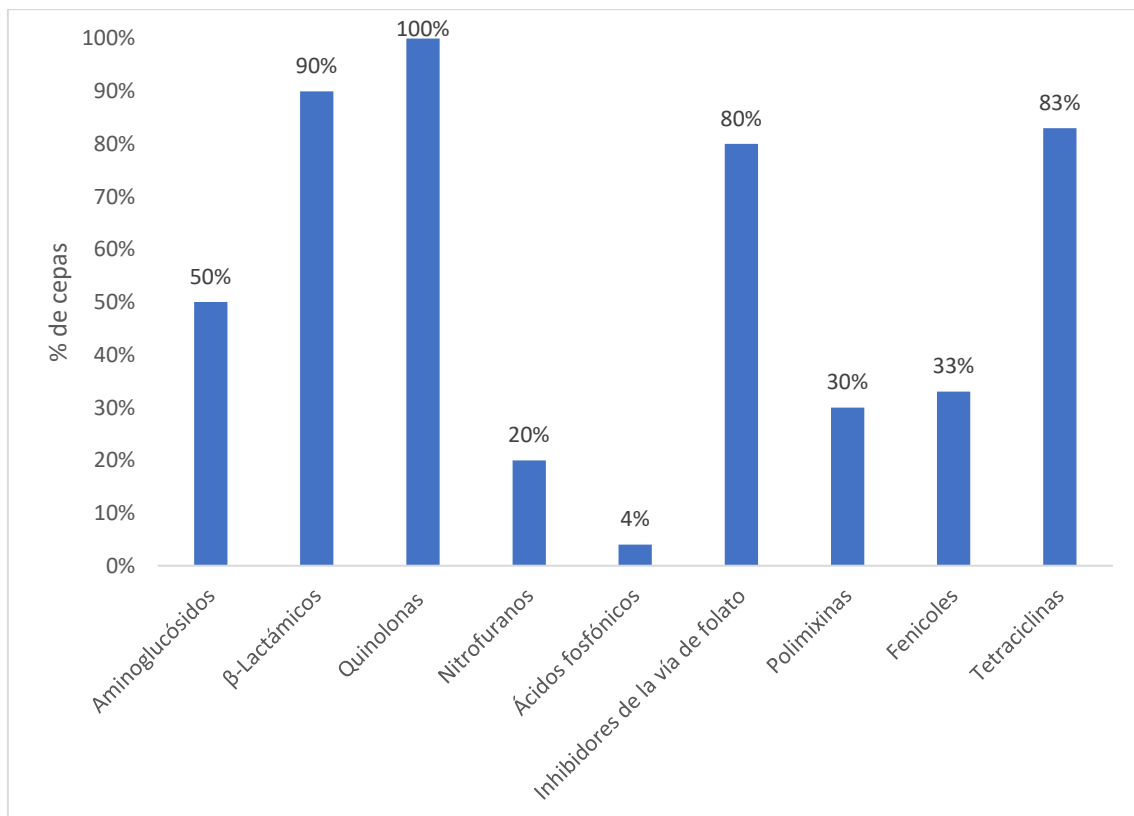


Figura 15. Resistencia antimicrobiana por familia de antibiótico en aislados de *E. coli* de varones con ITU ($n=24$).

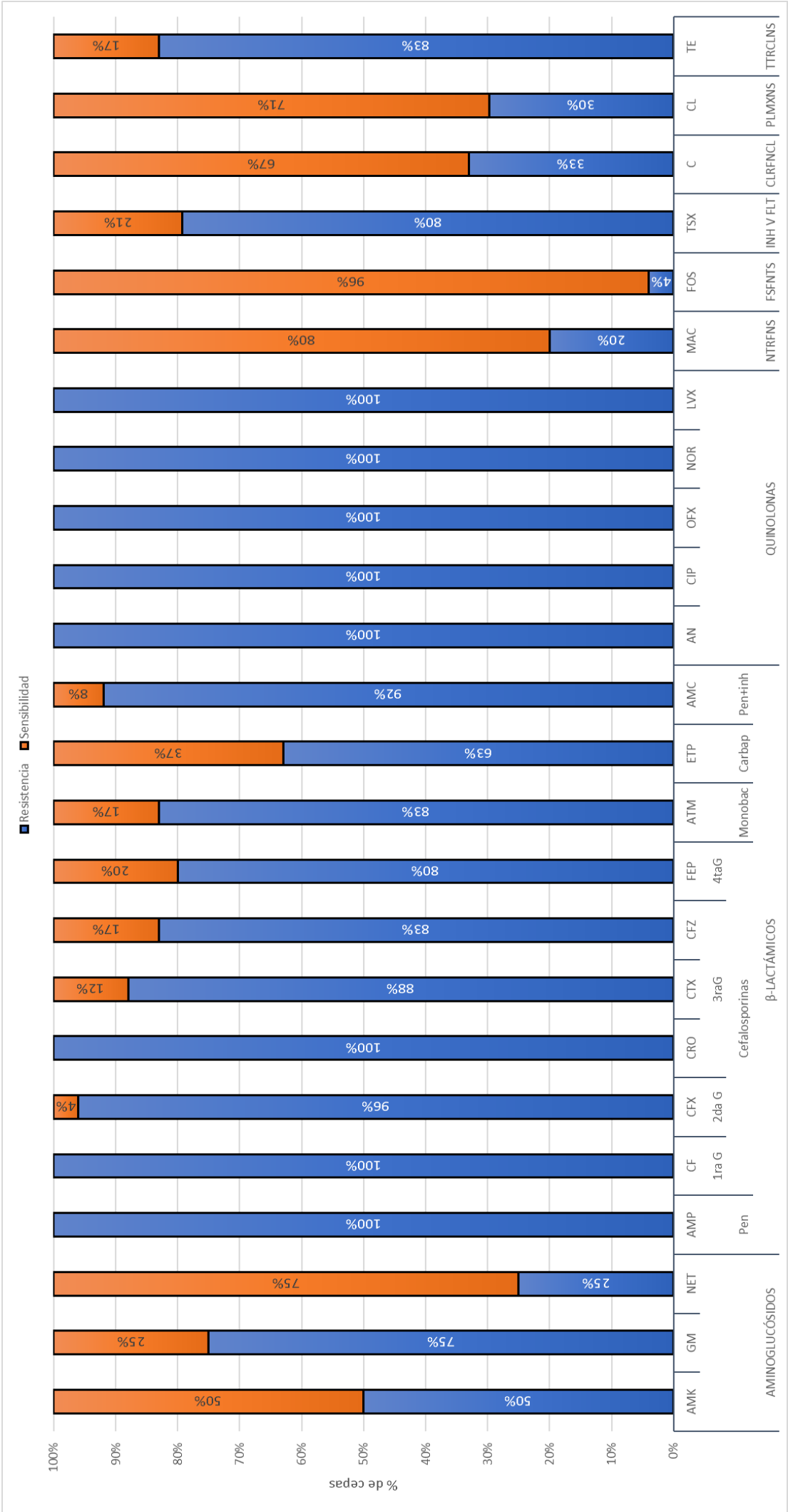


Figura 16. Porcentajes de resistencia antimicrobiana en aislados de *E. coli* de varones con ITU (n=24).

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 = acido nalidixico; CIP = ciprofloxacina, OFX = ofloxacina, NOR = norfloxacina, LVX = levofloxacina; MAC = nitrofurantoina, FOS = fosfomicina, TSX = trimetoprim/sulfametoxazol, C = cloranfenicol, CL = colistina, TE = tetraciclina; NTRFRNS = nitrofuranos, FSFNTS = fosfonatos, CLRNCL = cloranfenicol, PLMXNS = polimixinas y TTRCLNS = tetraciclinas.

En la figura 16 se muestra la distribución de la sensibilidad y resistencia a los 24 antibióticos pertenecientes a 15 grupos. La prevalencia en la resistencia fue desde 4% (fosfomicina) hasta el 100% (ácido nalidíxico, ciprofloxacina, ofloxacina, norfloxacina y levofloxacina, etc.). La resistencia a fosfomicina solo se presentó en la cepa 154-I, perteneciente al filogrupo D y con un perfil extremadamente resistente (XDR). Por lo tanto, el antibiótico al que presentó mayor sensibilidad el cepario fue la fosfomicina.

El número de patrones de resistencia diferentes fueron 22 y 1 compartido por dos cepas del filogrupo B2, con un puntaje de resistencia de 9, respectivamente (tabla 13).

Tabla 13. Resistotipo común en dos aislados de *E. coli* de varones con ITU (n=24).

Cepa	Resistotipo	Puntaje de Resistencia	Filogrupo
129-I	GM, AMP, CF, CFX, CFZ, CTX, CRO, FEP, ATM, AMC, AN, CIP, OFX, NOR, LVX, TSX, TE	9	B2
130-I			

Calculamos el puntaje de resistencia (ver materiales y métodos) para poder estimar cuantitativamente el grado de resistencia de cada cepa y posteriormente hacer análisis estadísticos cuantitativos. La media de los puntajes de resistencia en el cepario fue de 10 (rango:6-13) (figura 17).

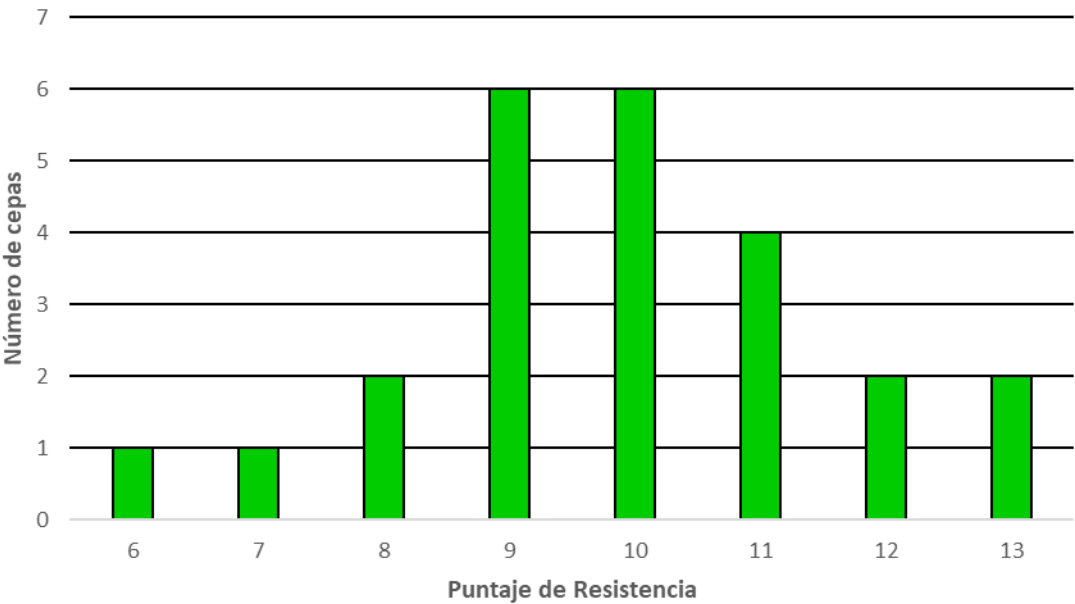


Figura 17. Distribución de los puntajes de resistencia en aislados de *E. coli* de varones con ITU (n=24).

Para caracterizar los patrones de resistencia de una forma cualitativa se siguieron los lineamientos publicados por Magiorakos *et al.*, 2012. (ver materiales y métodos). El 70% (n=19) de las cepas tuvieron un patrón de resistencia MDR y el 30% (n=5) mostró un patrón XDR (figura 18).

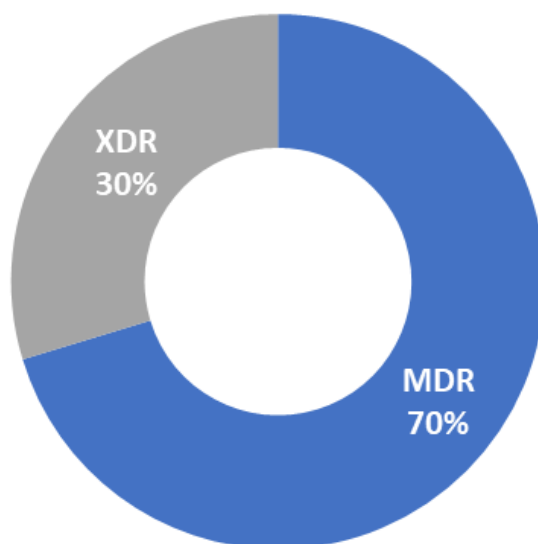
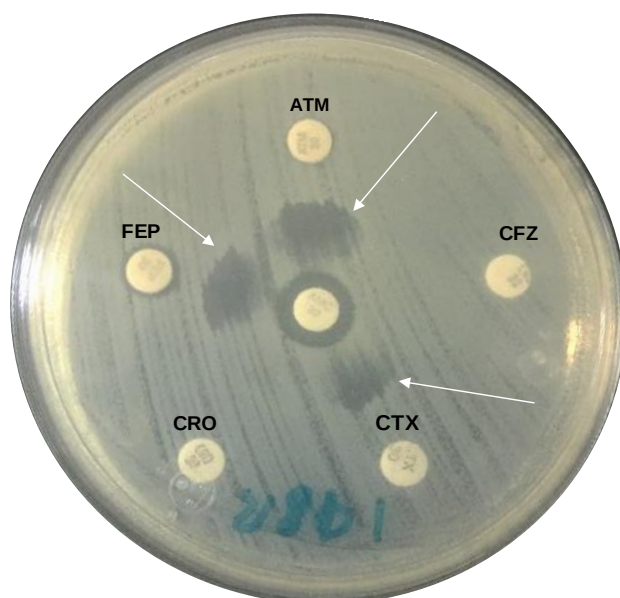


Figura 18. Porcentaje en aislados de *E. coli* de varones con ITU con fenotipo MDR/XDR según los criterios del CDC y EUCAST.

(Magiorakos *et al.*, 2012). MDR: Multidrogo resistente. XDR: Extremadamente resistente.

La identificación del fenotipo de producción de β -lactamasas de espectro extendido (BLEEs) se realizó mediante el método de difusión en doble disco. El 33% (n=8) del cepario presentó el fenotipo de producción de BLEEs (figura 19).

A)



B)

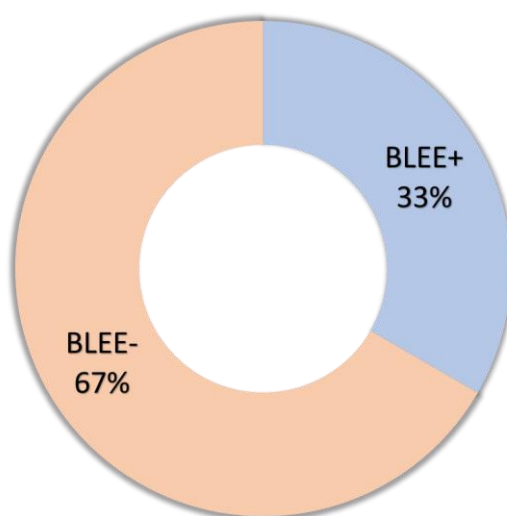


Figura 19. Identificación del fenotipo BLEE⁺ por el método de difusión de doble disco en aislados de *E. coli* de varones con ITU (n=24).

A) Foto representativa de identificación del fenotipo BLEE⁺ CFZ = ceftazidima; CTX = cefotaxima; CRO = ceftriaxona, FEP = cefepime; ATM = aztreonam; **B)** Porcentaje de cepas con fenotipos BLEE⁺/BLEE⁻.

En la figura 20 se presentan fotografías de los geles de agarosa representativos de los amplificados de las PCR de los genes de producción de β -lactamasas. La identificación de los genes de producción de β -lactamasas (*bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, *bla*_{OXA-1}, *bla*_{SHV}) se hizo mediante 4 PCR individuales. La frecuencia de los genes fue desde 0% (*bla*_{SHV}) hasta 80% (*bla*_{CTX-M}) (figura 21).

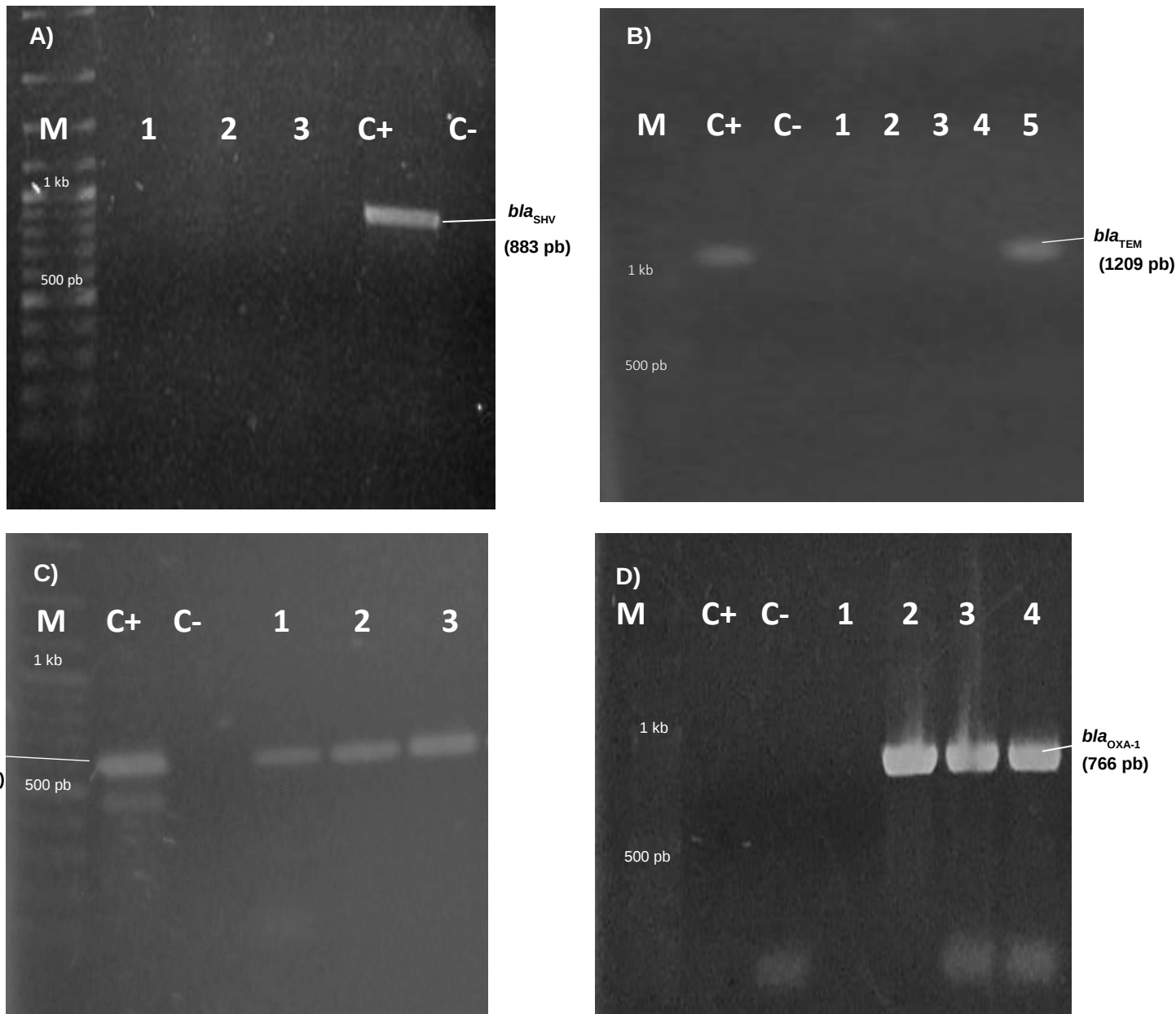


Figura 20. Geles representativos para la identificación de genes de producción de β -lactamasas.

A) Gel de agarosa a 1% representativo de la PCR de *bla*_{SHV} (750pb). **M:** 100 pb plus DNA Ladder; **C+,** SA42; **1,102-I;** **2,103-I;** **3,108-I;** **C-,** control negativo **B)** Gel de agarosa al 1% representativo de la PCR *bla*_{TEM} (1209 pb). **M:** 100 pb plus DNA Ladder; **C+,** 1550, **C-,** control negativo; **1,** 102-I; **2,103-I;** **3,** 108-I; **4,** 110-I; **5,** 115-I. **C)** Gel de agarosa al 1% representativo de la PCR *bla*_{CTX-M} (586 pb). **M,** 100 pb plus DNA Ladder; **C+,** C7225; **C-,** control negativo, **1,** 102-I; **2,** 103-I; **3,** 108-I. **D)** Gel de agarosa al 1% representativo de la PCR *bla*_{OXA-1} (766 pb). **M,** 100 pb plus DNA Ladder; **C+,** C7225; **C-:** control negativo, **1,** 102-I; **2,** 103-I; **3,** 108-I; **4,** 110-I.

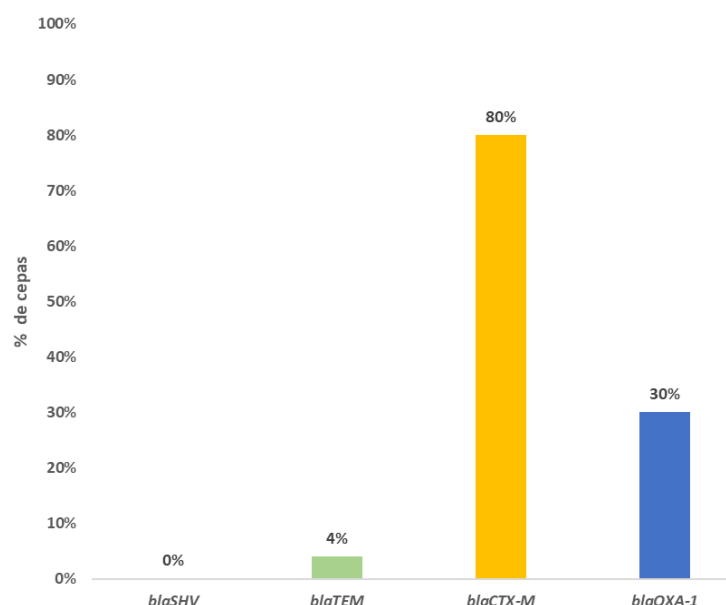


Figura 21. Distribución de los genes *bla* en las cepas de *E. coli* aisladas de varones con ITU ($n=24$).

Tabla 14. Perfiles de genes *bla* en las cepas de *E. coli* aisladas de varones con ITU.

Perfil genes <i>bla</i>	No. cepas (%)	ID
-	2 (8.3)	102-I y 127-I
<i>bla</i> _{OXA-1}	3 (12.5)	118-I, 130-I y 132-I
<i>bla</i> _{CTX-M}	15 (62.5)	103-I, 117-I, 125-I, 126-I, 128-I, 129-I, 144-I, 154-I, 155-I, 159-I, 162-I, 167-I, 168-I, 173-I y 174-I
<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{OXA-1}	3 (12.5)	108-I, 110-I y 161-I
<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{OXA-1}	1 (4)	115-I

En cuanto a la diversidad de perfiles de genes *bla* se encontraron 4 perfiles diferentes. El perfil más frecuente (62.5%) fue *bla*_{CTX-M} (tabla 14).

El análisis de perfil de sustrato de las cepas BLEE⁺ mostró actividad hidrolítica para ceftriaxona (CRO), cefepime (FEP), cefotaxima (CTX) y aztreonam (ATM). Se compartieron 2 pares de perfiles de sustrato y de genes *bla* entre las cepas BLEE⁺ (tabla 15).

Tabla 15. Perfil de sustrato y de genes *bla* en aislados BLEE⁺ de *E. coli* de varones con ITU (n=24).

Cepas BLEE ⁺	Perfil de sustrato	Perfil de genes <i>bla</i>
108-I	ATM, CTX	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{OXA-1}
110-I	FEP, ATM	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{OXA-1}
115-I	CRO, FEP, ATM, CTX	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{OXA-1}
118-I	FEP, ATM, CTX	
126-I	CRO, FEP, ATM, CTX	<i>bla</i> _{CTX-M}
155-I	CRO, FEP, ATM, CTX	<i>bla</i> _{CTX-M}
167-I	FEP	<i>bla</i> _{CTX-M}
173-I	FEP	<i>bla</i> _{CTX-M}

Tabla 16. Perfil de genes *bla* en aislados BLEE⁻ de *E. coli* de varones con ITU (n=24).

Cepas BLEE ⁻	Perfil de genes <i>bla</i>
102-I	-
103-I	<i>bla</i> _{CTX-M}
117-I	<i>bla</i> _{CTX-M}
125-I	<i>bla</i> _{CTX-M}
127-I	-
128-I	<i>bla</i> _{CTX-M}
129-I	<i>bla</i> _{CTX-M}
130-I	<i>bla</i> _{CTX-M}
132-I	<i>bla</i> _{CTX-M}
144-I	<i>bla</i> _{CTX-M}
154-I	<i>bla</i> _{CTX-M}
159-I	<i>bla</i> _{CTX-M}
161-I	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{OXA-1}
162-I	<i>bla</i> _{CTX-M}
168-I	<i>bla</i> _{CTX-M}
174-I	<i>bla</i> _{CTX-M}

Como se puede apreciar, una cepa BLEE⁺ poseyó un perfil de genes *bla* (cepa 115-I) que fue único entre las cepas BLEE⁺ y BLEE⁻ (tablas 15 y 16).

7.5 Formación de biopelícula *in vitro*

Para determinar si las cepas asiladas de pacientes varones tienen la capacidad de formar biopelícula *in vitro* se siguió la metodología de cristal violeta (Ver materiales y métodos). Encontrando que la capacidad para formar biopelícula varió considerablemente (rango D.O. _(595nm):0.3-2.4). La media de biomasa de biopelícula formada en el cepario fue de 0.8 ± 0.45 .

Según la cantidad de biopelícula formada las cepas fueron clasificadas en diferentes categorías acorde con Stepanovic et.al., 2009. El 96% (n=23) de las cepas son productoras de biopelícula con excepción de una cepa (174-I) (tabla 17).

La distribución de los valores de D.O. _(595nm) de biomasa de biopelícula se muestra en la figura 22.

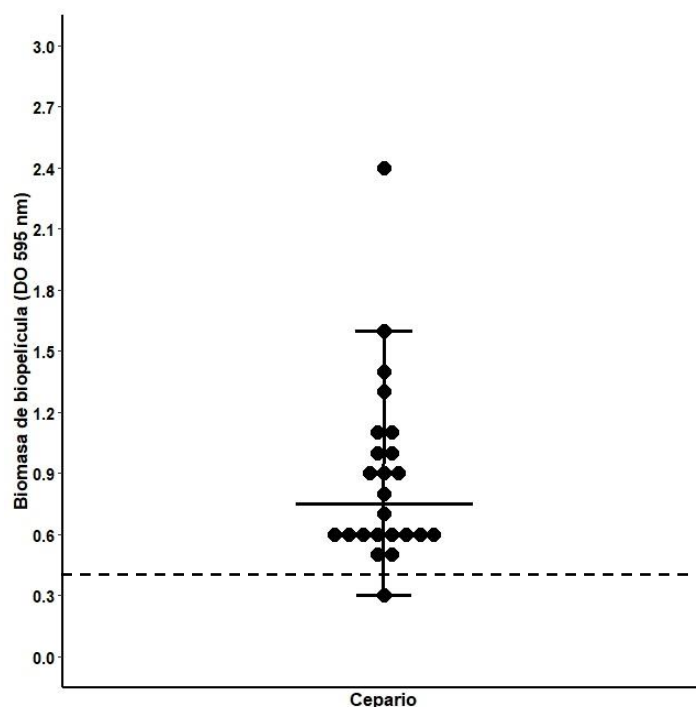


Figura 22. Distribución de la formación de biomasa de biopelícula (D.O._{595nm}) en asilados de *E. coli* de varones con ITU (n=24).

Cada punto es el promedio de tres experimentos independientes con 3 réplicas de cada cepa por experimento (n=9). La barra indica la mediana con rango intercuartil. La habilidad de formar biopelícula en poliestireno fue evaluada espectrofotométricamente utilizando la tinción cristal violeta. La línea punteada indica el punto de corte para las cepas formadoras de biopelícula.

Tabla 17. Categorías de formación de biopelícula de aislados de *E. coli* de varones con ITU (n=24).

Categoría de formación de biopelícula	No. cepas (%)	ID
Formadora de biopelícula	23 (96%)	
Formadora Fuerte	1 (4%)	132-I
Formadora Moderada	7 (30%)	102-I, 110-I, 117-I, 129-I, 130-I, 144-I
Formadora Débil	15 (63%)	103-I, 108-I, 115-I, 118-I, 126-I, 127-I, 128-I, 154-I, 155-I, 159-I, 161-I, 162-I, 167-I, 168-I, 173-I
No formadora	1 (4%)	174-I

La mayoría de las cepas productoras de biopelícula fueron productoras débiles, seguidas de las productoras moderadas de biopelícula (63% vs 30%; $p<0.05$). La única cepa clasificada como formadora fuerte fue la cepa 132-I, perteneciente al filogrupa A (D.O._{595nm} media:2.4).

7.6 Análisis de perfil plasmídico

Para analizar el perfil plasmídico del cepario se extrajo el DNA plasmídico mediante lisis alcalina (ver material y métodos) y se realizó un corrimiento electroforético en agarosa al 0.7% para visualizar las bandas plasmídicas de cada cepa (figura 23).

El 60% del cepario ($n=14$) presentó al menos una banda plasmídica (figura 24). Las cepas con bandas plasmídicas tuvieron en promedio 2 bandas (rango: 1 a 5 bandas) y la mayoría de estas presentó de 1 a 3 bandas plasmídicas. Las bandas con pesos de 1 Kb y de >10 Kb fueron las más frecuentes (figura 25).

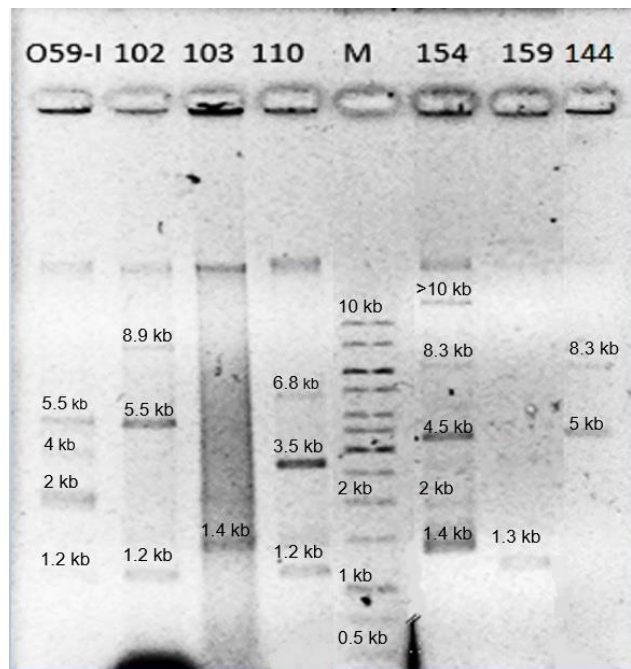


Figura 23. Electroforesis en geles de agarosa (0.7%) para perfil plasmídico de los aislados de *E. coli* de varones con ITU ($n=24$).

M: 1kb DNA Ladder.

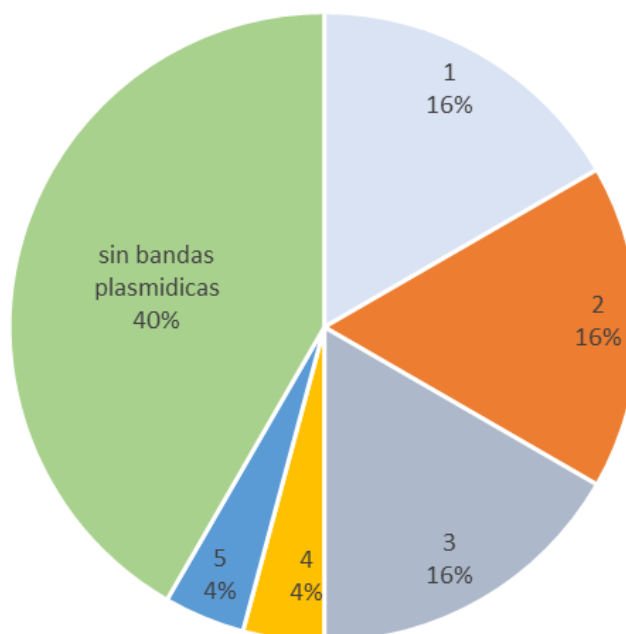


Figura 24. Porcentajes de cepas con bandas y sin bandas plasmídicas de los aislados de *E. coli* de varones con ITU ($n=24$).

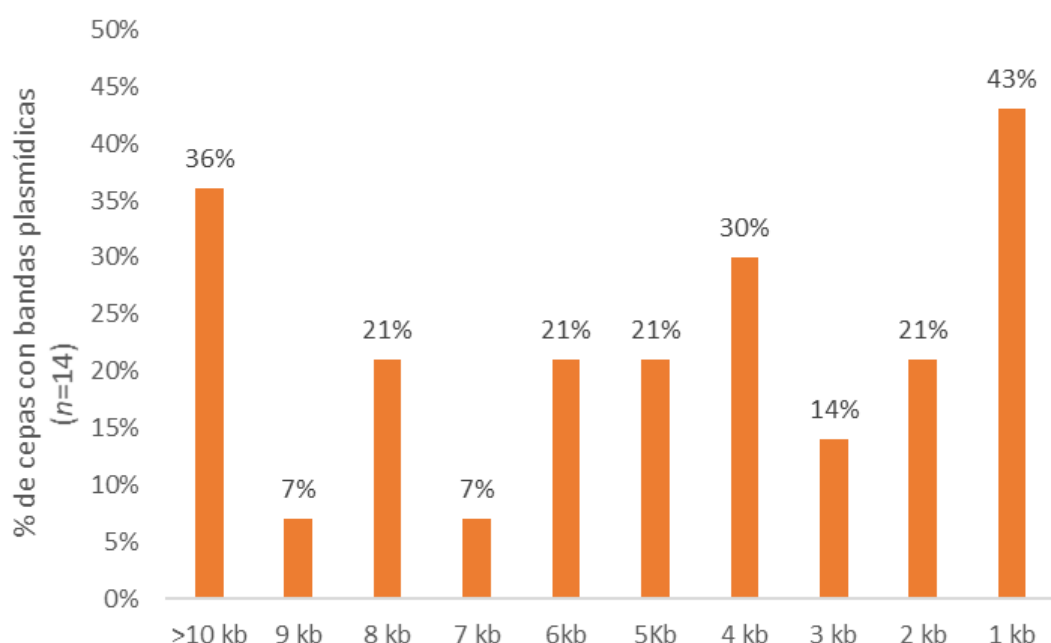


Figura 25. Distribución del tamaño de aproximado de plásmidos en los aislados de *E. coli* aislada de varones con ITU con bandas plasmídicas (n=14).

7.7 Asociación entre variables

7.7.1 Virulencia y Filogrupos

Para investigar si existían diferencias estadísticamente significativas entre la virulencia de cada filogrupo, se calcularon los puntajes de virulencia de cada filogrupo y se compararon las medianas de estos puntajes utilizando la prueba de U de Mann-Whitney ($p < 0.05$) dado que no se presentó distribución normal en las variables (Prueba Shapiro-Wilk, $\alpha < 0.05$).

La mediana del puntaje de virulencia y rangos (según el caso) para los distintos filogrupos fueron: filogrupo B2: [Me=7.7 (rango:3-10)], filogrupo D: (7), filogrupo A: [Me=3 (rango: 1-5)], clado I: (5), filogrupo C: [Me=2.5 (rango: 2-3)], filogrupo E: (3) y clado CII/CI: (3). Al comparar las medianas de los filogrupos B2 con los filogrupos A, y C se encontraron diferencias significativas (figura 26). El filogrupo B2 estuvo asociado significativamente con un mayor puntaje de virulencia con respecto los grupos A y C.

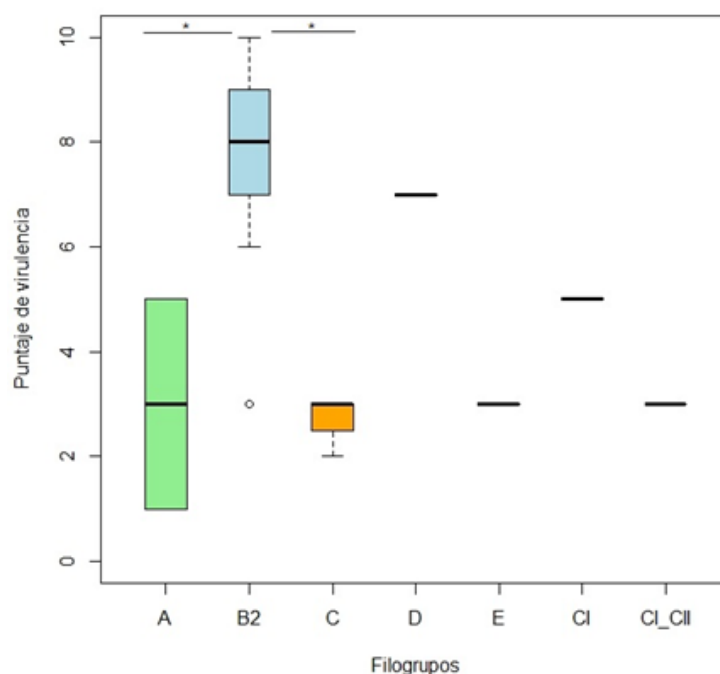


Figura 26. Distribución de los puntajes de virulencia por filogrupo.

Los resultados están mostrados en diagramas de cajas y alambres, mostrando la mediana con rangos intercuartiles. * $p < 0.05$, prueba U de Mann-Whitney. A (n=2), B2 (n=14), C (n=4), D (n=1), E (n=1), CI (n=1) y CI/CII (n=1).

También se compararon las prevalencias de cada gen de virulencia e isla de patogenicidad distribuida entre los diferentes grupos filogenéticos con $n > 1$ (A vs B2, B2 vs C y A vs C) utilizando la prueba de Fisher ($p < 0.05$). Esto para conocer si existía alguna asociación estadísticamente significativa entre las variables.

Los resultados están resumidos en la tabla 18.

Los genes *papA*, *papGII* e *iha* y la PAI I_{CFT073} y PAI II_{CFT073} estuvieron asociados al filogrupo B2 con respecto al A y al C.

Tabla 18. Distribución de los factores de virulencia por filogrupo.

Factor de virulencia	No. (% de cepas)								valor <i>p</i>	
	Total (n=24)	A (n=2)	B2 (n=14)	C (n=4)	D (n=1)	E (n=1)	CI (n=1)	CI/CII (n=1)	B2 vs. A	B2 v.s. C
<i>fimH</i>	22 (92.0)	1 (50.0)	14 (100.0)	3 (75.0)	1 (100.0)	1 (100.0)	1 (100.0)	1 (100.0)	NS	NS
<i>pap</i>	13 (55.0)	0	13 (92.8)	0	0	0	0	0	p<0.05	p<0.01
<i>fliC</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	NS	NS
<i>iha</i>	15 (63)	0	13 (92.8)	0	1 (100.0)	0	0	0	p<0.05	p<0.01
<i>iucD</i>	21 (88)	1 (50.0)	14 (100.0)	3 (75.0)	1 (100.0)	0	1 (100.0)	1 (100.0)	NS	NS
<i>sat</i>	12 (50)	1 (50.0)	11 (78.5)	0	0	0	0	0	NS	p<0.01
<i>vat</i>	3 (12)	0	1 (14.0)	1 (25.0)	1 (100)	0	0	0	NS	NS
<i>hlyA</i>	7 (30)	0	7 (50.0)	0	0	0	0	0	NS	NS
<i>cnf-1</i>	7 (30)	0	7 (50.0)	0	0	0	0	0	NS	NS
<i>traT</i>	15 (63)	1 (50.0)	9 (64.3)	1 (25.0)	1 (100.0)	1 (100.0)	1 (100.0)	0	NS	NS
<i>kpsMT-II</i>	14 (58)	0	11 (78.5)	0	1 (100.0)	1 (100.0)	1 (100.0)	0	NS	p<0.01
<i>PAI I CFT073</i>	15 (63)	0	13 (92.8)	0	0	1 (100.0)	0	1 (100.0)	p<0.05	p<0.01
<i>PAI II CFT073</i>	16 (67)	0	13 (92.8)	0	0	1 (100.0)	1 (100.0)	1 (100.0)	p<0.05	p<0.01
<i>PAI I J96</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	NS	NS
<i>PAI II J96</i>	7 (30)	0	7 (50.0)	0	0	0	0	0	NS	NS

15 factores de virulencia y 4 islas de patogenicidad fueron identificados mediante PCR. Los grupos filogenéticos fueron identificados utilizando la metodología descrita en Clermont *et al.*, 2013. Los valores en negritas son estadísticamente significativos ($p<0.05$), prueba de Fisher. NS: diferencia no significativa ($p>0.05$).

7.7.2 Resistencia antimicrobiana y filogrupos

Para investigar si había diferencias estadísticas significativas entre la resistencia antimicrobiana y la clasificación filogenética se calcularon los puntajes de resistencia de cada filogrupo y se compararon las medianas utilizando la prueba de U de Mann-Whitney ($p<0.05$), dado que no se presentó distribución normal en las variables (Prueba Shapiro-Wilk, $\alpha < 0.05$).

La distribución de los puntajes de resistencia por filogrupo se muestran en la figura 27. La mediana (M_e) del PR y rangos (según el caso) para los distintos filogrupos fue de: A: $M_e=8.5$ (rango: 8-9), B2: $M_e=10$ (rango: 6-12), C: $M_e=9.5$ (rango: 8-13), D=13, E=11, CI=11 y CI/CII=12. Al comparar las medianas entre los filogrupos A, B2 y C no se encontro alguna diferencia significativa (Prueba U de Man-Whitney, $p<0.05$).

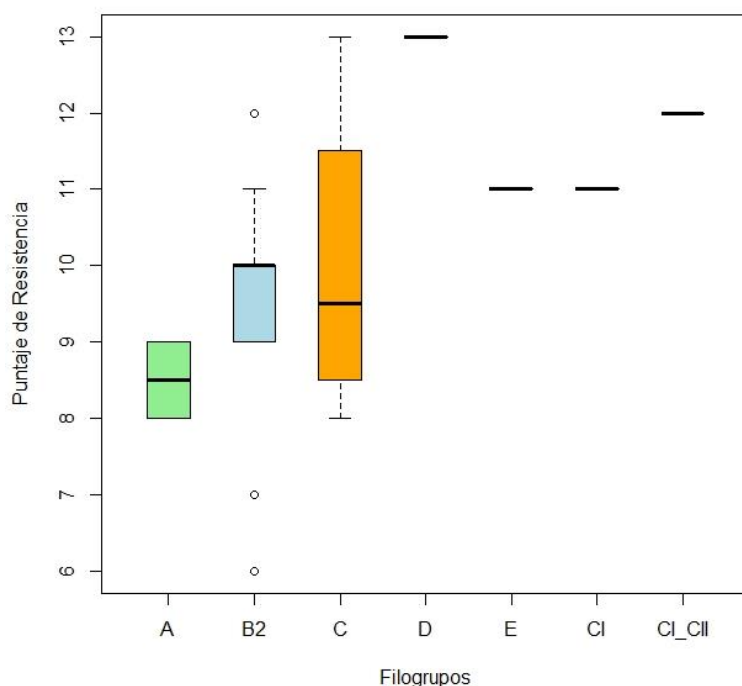


Figura 27. Distribución de los puntajes de resistencia por filogrupo.

Los resultados están mostrados en diagramas de cajas y alambres, mostrando la mediana con rangos intercuartiles.

* $p<0.05$, prueba U de Mann-Whitney.

También se compararon las frecuencias de la resistencia a cada antibiótico, cepas BLEE⁺ y de los perfiles MDR/XDR distribuidos en los filogrupos con $n>1$ (A vs B2, B2 vs C y A vs C) utilizando la prueba exacta de Fisher ($p<0.05$) para conocer si existían asociaciones estadísticamente significativas entre estas variables. Los resultados están resumidos en la tabla 19.

Tabla 19. Distribución de la resistencia antimicrobiana y por filogrupo.

Antibiótico o algún otro rasgo	Total (n=24)	No. (%) cepas resistentes							valor p	
		A(n=2)	B2 (n=14)	C(n=4)	D(n=1)	E(n=1)	CI(n=1)	CI/CI(n=1)	B2 vs A	B2 vs C
Amikacina	12 (50)	0	7(50)	1(33)	1(100)	1(100)	1(100)	1(100)	NS	NS
Gentamicina	18 (75)	2(100)	12(86)	1(33)	1(100)	1(100)	0	1(100)	NS	p<0.05
Netilmicina	6 (25)	0	4 (28.6)	1(33)	0	0	0	1(100)	NS	NS
Ampicilina	24 (100)	2(100)	14(100)	4(100)	1(100)	1(100)	1(100)	1(100)	NS	NS
Cefalotina	24 (100)	2(100)	14(100)	4(100)	1(100)	1(100)	1(100)	1(100)	NS	NS
Cefuroxima	23 (96)	2(100)	13(92.8)	4(100)	1(100)	1(100)	1(100)	1(100)	NS	NS
Ceftazidima	24 (100)	2(100)	14(100)	4(100)	1(100)	1(100)	1(100)	1(100)	NS	NS
Cefotaxima	21 (88.)	1(50)	12(86)	4(100)	1(100)	1(100)	1(100)	1(100)	NS	NS
Ceftriaxona	24 (100)	1(50)	12(86)	3(75)	1(100)	1(100)	1(100)	1(100)	NS	NS
Cefepime	19 (80)	0	12(86)	3(75)	1(100)	1(100)	1(100)	1(100)	NS	NS
Aztreonam	20 (83)	1(50)	12(86)	3(75)	1(100)	1(100)	1(100)	1(100)	NS	NS
Ertapenem	15 (63)	0	8(57.1)	4(100)	1(100)	1(100)	0	1(100)	NS	NS
Amoxicilina/ac. Clavulánico	22 (92)	2(100)	12(86)	4(100)	1(100)	1(100)	1(100)	1(100)	NS	NS
Ac. Nalidíxico	24 (100)	2(100)	14(100)	4(100)	1(100)	1(100)	1(100)	1(100)	NS	NS
Ciprofloxacina	24 (100)	2(100)	14(100)	4(100)	1(100)	1(100)	1(100)	1(100)	NS	NS
Ofloxacina	24 (100)	2(100)	14(100)	4(100)	1(100)	1(100)	1(100)	1(100)	NS	NS
Norfloxacina	24 (100)	2(100)	14(100)	4(100)	1(100)	1(100)	1(100)	1(100)	NS	NS
Levofloxacina	24 (100)	2(100)	14(100)	4(100)	1(100)	1(100)	1(100)	1(100)	NS	NS
Nitrofurantorína	5 (21)	0	3(21.4)	1(33)	0	0	1(100)	0	NS	NS
Fosfomicina	1 (4)	0	0	0	1(100)	0	0	0	NS	NS
Trimetoprim sulfa	19 (80)	1(50)	10(71)	4(100)	1(100)	1(100)	1(100)	1(100)	NS	NS
Cloranfenicol	8 (33)	0	1(7)	3(75)	1(100)	1(100)	1(100)	1(100)	NS	NS
Colistina	7 (30)	1(50)	3(21)	1(33)	1(100)	0	0	1(100)	NS	NS
Tetraciclina	20 (86)	2(100)	12(86)	2(50)	1(100)	1(100)	1(100)	1(100)	NS	NS
BLEE ⁺	8 (33)	1(50)	5(37.5)	0	0	1(100)	1(100)	0	NS	NS
MDR	17 (70.0)	2(100)	11 (79)	3(75)	0	0	1(100)	1(100)	NS	NS
XDR	7 (30.0)	0	3(21)	1(25)	1(100)	1(100)	0	0	NS	NS

La susceptibilidad antimicrobiana fue evaluada mediante el método de Kirby-Bauer, e interpretada según los lineamientos del CLSI, 2018. El fenotipo BLEE⁺ fue descrito según el método de doble disco. Los filogrupos fueron identificados utilizando la metodología descrita en Clermont *et al.*, 2013. MDR: Multidrogo resistentes. XDR: extremadamente resistentes. Los valores en negritas son estadísticamente significativos ($p<0.05$), prueba de Fisher.

Solo la frecuencia de la resistencia a gentamicina estuvo significativamente asociada a las cepas del filogrupo B2 con respecto a las del C.

Hubo un porcentaje considerable de cepas resistentes a cloranfenicol pertenecientes al filogrupo C con respecto al B2 y A.

La cepa del filogrupo D fue la única que poseyó resistencia a fosfomicina.

Los resultados de la prueba de Fisher al comparar las frecuencias de los genes *bla* (*bla_{CTX-M}*, *bla_{TEM}*, *bla_{OXA-1}*, *bla_{SHV}*) están resumidos en la tabla 20. No existió

alguna asociación estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre las variables. Se destaca que el gen *bla*_{CTX-M} fue el más distribuido entre los filogrupos y que el clado indeterminado no poseyó ningún gen *bla*.

Tabla 20. Distribución de los genes de resistencia *bla* por filogrupo.

genes <i>bla</i>	No. (%) cepas resistentes							valor <i>p</i>		
	A (<i>n</i> =2)	B2 (<i>n</i> =14)	C (<i>n</i> =4)	D (<i>n</i> =1)	E (<i>n</i> =1)	CI (<i>n</i> =1)	CI/CII (<i>n</i> =1)	B2 vs A	B2 vs C	A vs C
<i>bla</i> _{SHV}	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
<i>bla</i> _{TEM}	0	1 (7.1)	0	0	0	0	0	NS	NS	NS
<i>bla</i> _{CTX-M}	1 (50)	10 (71)	4 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	0	NS	NS	NS
<i>bla</i> _{OXA-1}	1 (50)	5 (36)	0	0	1 (100.0)	0	0	NS	NS	NS

Los genes de resistencia *bla* fueron identificados mediante PCRs individuales. Los filogrupos fueron identificados utilizando la metodología descrita en Clermont *et al.*, 2013.

7.7.3 Resistencia antimicrobiana y virulencia

Para buscar alguna correlación entre la resistencia y la virulencia se hizo un análisis de correlación lineal de Spearman ($p < 0.05$) dado que los resultados no presentaron distribución normal (Prueba Shapiro-Wilks, $\alpha < 0.05$). Los resultados del análisis se muestran en la figura 28. No hubo una correlación lineal entre las variables.

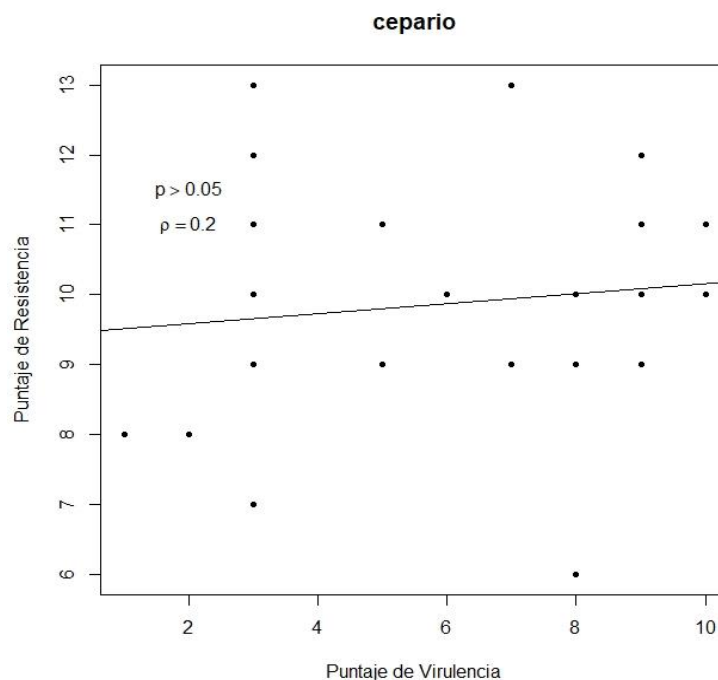


Figura 28. Correlación entre el puntaje de resistencia y el puntaje de virulencia de aislados de *E. coli* de varones con ITU (*n*=24).

El coeficiente ρ de Spearman y el valor p no mostraron alguna correlación lineal significativa.

Para conocer si había asociaciones estadísticamente significativas entre la frecuencia de la resistencia antimicrobiana y la de genes de virulencia y PAIs se realizó una prueba de Fisher ($p < 0.05$). Los resultados se resumen en la tabla 21.

Tabla 21. Asociación entre factores de virulencia y resistencia antimicrobiana en aislados de *E. coli* de varones con ITU (n=24).

	<i>fimH</i>	<i>papGII</i>	<i>papA</i>	<i>iha</i>	<i>iucD</i>	<i>Sat</i>	<i>vat</i>	<i>cnf-1</i>	<i>hlyA</i>	<i>traT</i>	<i>kpsM</i> T-II	<i>CFT073</i> I	<i>CFT073</i> II	<i>J96 I</i>	<i>J96 II</i>
Amikacina	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Gentamicina	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	$P < 0.05$	NS	NS	NS
Netilmicina	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Ampicilina	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Cefalotina	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Cefuroxima	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Ceftazidima	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Cefotaxima	NS	$P < 0.05$	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Ceftriaxona	$P < 0.05$	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Cefepime	$P < 0.05$	$P < 0.05$	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	$P < 0.05$	$P < 0.05$	NS	NS
Aztreonam	$P < 0.05$	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Ertapenem	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Amoxicilina/a c. Clavulánico	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Ac. Nalidíxico	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Ciprofloxacina	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Ofloxacina	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Norfloxacina	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Levofloxacina	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Nitrofurantoina	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Fosfomicina	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Trimetoprim sulfa	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Cloranfenicol	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Colistina	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Tetraciclina	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	$P < 0.05$	NS	NS	NS	NS	NS

La frecuencia del gen *fimH* fue significativamente mayor en las cepas resistentes a ceftriaxona, cefepime y aztreonam en comparación con las cepas sensibles. El gen *papGII* se asoció con la resistencia a cefotaxima y cefepime. El gen *traT* se asoció con la resistencia a tetraciclina. La PAI I_{CFT073} se asoció con la resistencia a gentamicina y cefepime y la PAI II_{CFT073} solo se asoció con cefepime.

7.7.4 Formación de biopelícula y filogrupos

La distribución de los valores de DO_(595nm) de biomasa de biopelícula de cada filogrupo se encuentran en la figura 29. La mediana y rango para cada filogrupo fue: A: Me=1.5 (rango: 0.6-2.4), B2: Me=0.65 (rango: 0.5-1.6), C: Me=1.2 (rango: 0.3-1.4), D=0.9, E=0.9, CI=0.6 y CI/CII=0.6. Al comparar las medianas entre los filogrupos A, B2 y C no se encontró alguna diferencia significativa entre ellos (Prueba U de Man-Whitney, $p < 0.05$).

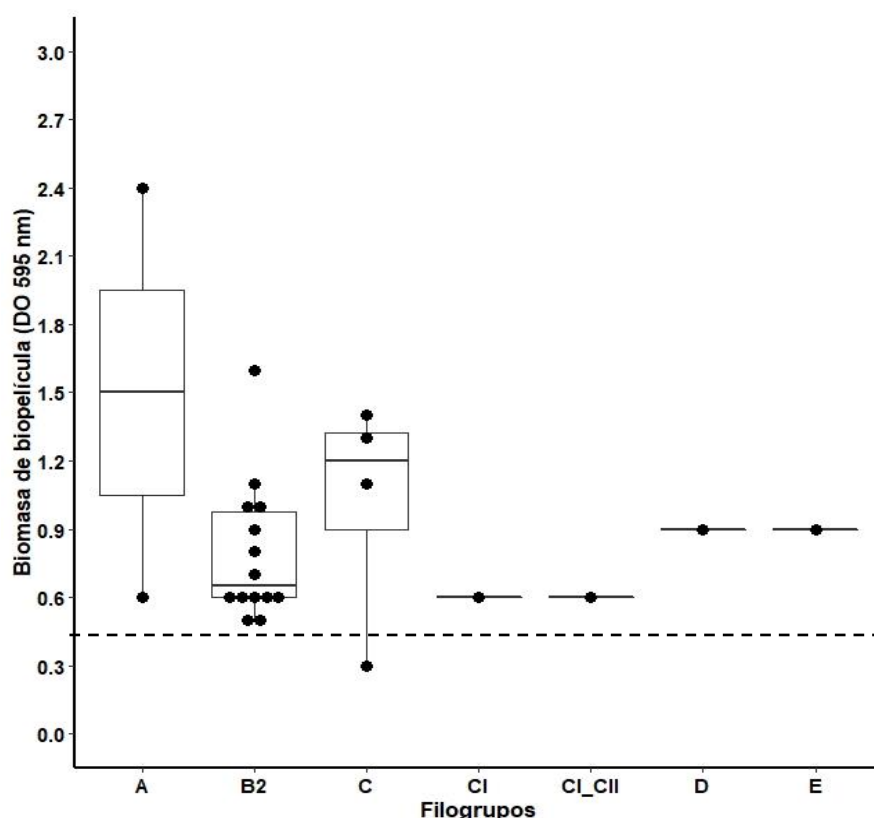


Figura 29. Distribución de la DO_(595nm) de biomasa de biopelícula por filogrupo.

Cada punto es el promedio de tres experimentos independientes con 3 réplicas de cada cepa por experimento (n=9). La barra indica la mediana con rango intercuartil. La línea punteada indica el punto de corte para las cepas formadoras de biopelícula.

Los resultados de la prueba de Fisher para buscar asociaciones entre la categoría de formación de biopelícula y los filogrupos están resumidos en la tabla 22. Solo se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la producción débil de biopelícula en el filogrupo B2 con respecto al C. Todas las cepas de los filogrupos D, E, CI y CI/CII fueron productoras débiles de biopelícula. La mayoría de las cepas del filogrupo C (75%) fueron productoras moderadas y una fue no productora. Las cepas del filogrupo B2 en su mayoría fueron productoras débiles (71.4%) y algunas fueron productoras moderadas (28.5%), finalmente el filogrupo A presentó una cepa productora débil y otra productora fuerte.

Tabla 22. Formación de biopelícula por filogrupo.

CATEGORÍA DE BIOPELÍCULA	No. de cepas (%)							valor p	
	A (n=2)	B2 (n=14)	C (n=4)	D (n=1)	E (n=1)	CI (n=1)	CI/CII (n=1)	B2 vs A	B2 vs C
Productora de Biopelícula	2(100)	14 (100)	3(75)	1(100)	1(100)	1(100)	1(100)	NS	NS
Productora débil	1(50)	10 (71.4)	0	1(100)	1(100)	1(100)	1(100)	NS	p<0.05
Productora Moderada	0	4 (28.5)	3(75)	0	0	0	0	NS	NS
Productora Fuerte	1 (50)	0	0	0	0	0	0	NS	NS
No productora	0	0	1(25)	0	0	0	-	NS	NS

7.7.5 Formación de biopelícula y virulencia

Los puntajes de virulencia y la biomasa de biopelícula formada del cepario mostraron una correlación lineal negativa (figura 30) (Spearman $\rho = -0.41$, $p < 0.05$).

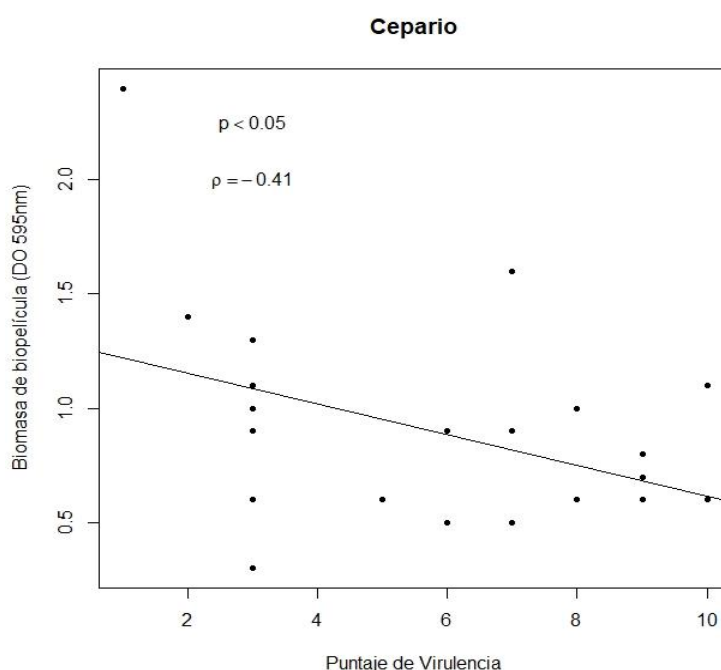


Figura 30. Correlación entre la DO_(595nm) de biomasa de biopelícula y el puntaje de virulencia de aislados de *E. coli* de varones con ITU ($n=24$).

El valor p mostró una correlación lineal significativa ($p < 0.05$).

La masa de biopelícula fue estratificada en la presencia o ausencia de cada factor de virulencia, y los resultados se muestran en la figura 31. La presencia de los genes *fimH*, *iucD*, y la PAI II_{CFT073} estuvieron asociados con una menor cantidad de biomasa de biopelícula formada (DO_{595nm} mediana: 0.7 vs 1.9, para cepas *fimH*⁺ y *fimH*⁻, respectivamente; DO_{595nm} mediana: 0.65 vs 1.4, para cepas *iucD*⁺ y *iucD*⁻, respectivamente; DO_{595nm} mediana: 0.6 vs 1.2, para cepas PAI II_{CFT073}⁺ y PAI II_{CFT073}⁻, respectivamente; $p < 0.05$).

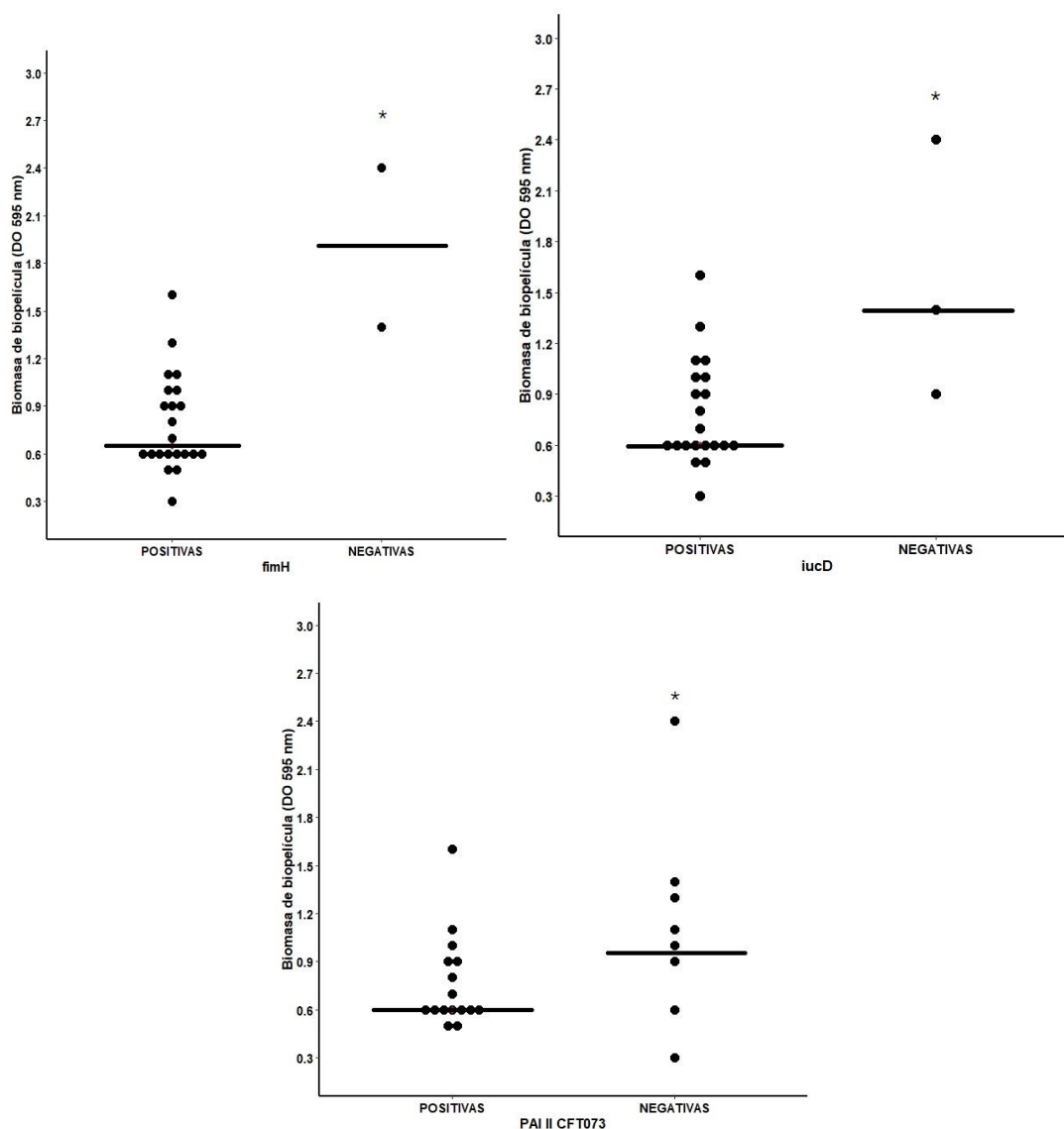


Figura 31. Formación de biopelícula acorde con factor de virulencia de aislados de *E. coli* de varones con ITU (n=24)

Cada punto es el promedio de 3 experimentos independientes con 3 replicados por cepa en cada experimento (n=9). Las barras horizontales son las medianas. * $p < 0.05$, prueba U de Mann-Whitney.

7.7.6 Formación de biopelícula y resistencia antimicrobiana

Los puntajes de resistencia y la biomasa de biopelícula formada del cepario mostraron una correlación lineal negativa (figura 32) (Spearman $\rho = -0.44$; $p < 0.05$).

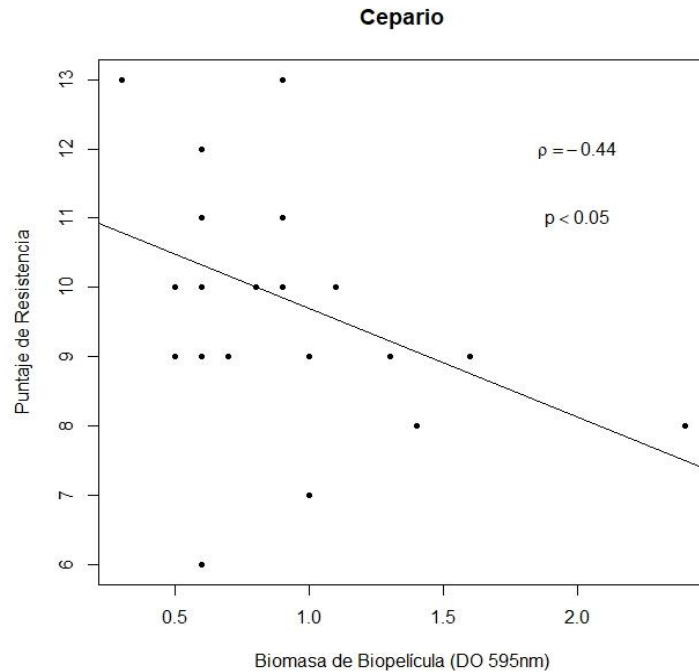


Figura 32. Correlación entre el puntaje de resistencia y la biomasa de biopelícula DO (595nm) de las cepas de *E. coli* aisladas de varones con ITU ($n=24$).

El coeficiente ρ de Spearman y el valor p mostraron una correlación lineal significativa ($p < 0.05$).

Las cepas sensibles a amikacina tuvieron una D.O. (595nm) mediana de biomasa de biopelícula significativamente mayor con respecto a las cepas resistentes (U de Mann-Whitney, $p < 0.05$). Las cepas *bla*_{OXA-1}⁺ tuvieron una D.O. (595nm) media de biomasa de biopelícula significativamente mayor con respecto a las *bla*_{OXA-1}⁻ (prueba t de Student, $p < 0.05$) (figura 33).

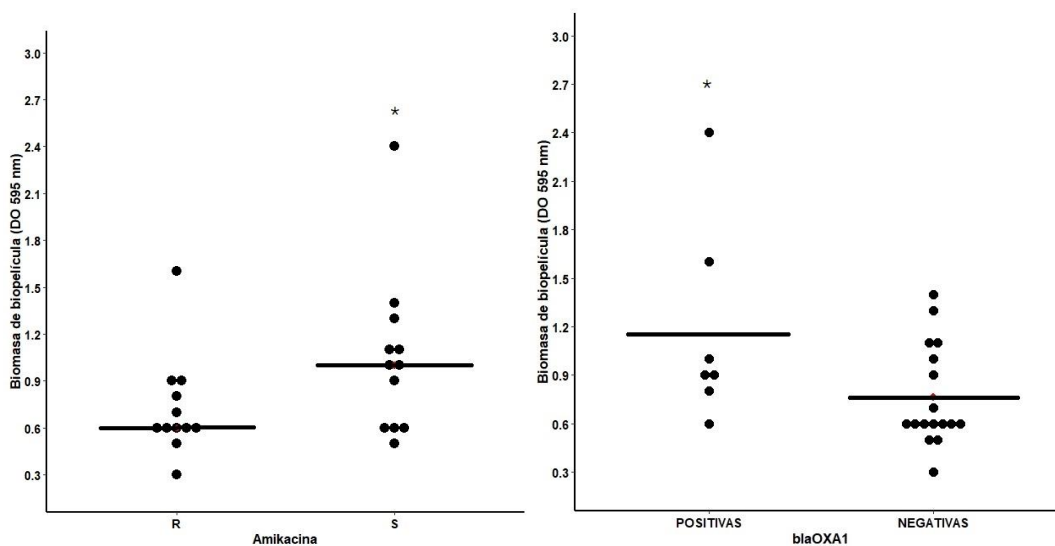


Figura 33. Formación de biopelícula de aislados de *E. coli* de varones con ITU ($n=24$) acorde con antibiótico y gen de resistencia.

Cada punto es el promedio de 3 experimentos independientes con 3 replicados por cepa en cada experimento ($n=9$). Las barras horizontales son las medianas. * $p < 0.05$, prueba U de Mann-Whitney (Amikacina), prueba t de Student (*bla*_{OXA-1}).

7.7.7 Bandas plasmídicas y filogrupos

Para analizar la relación entre las cepas con bandas plasmídicas y los filogrupos a los que pertenecían se realizó una prueba de Fisher ($p<0.05$). No hubo alguna asociación estadísticamente significativa entre estas variables. Las cepas con bandas plasmídicas son en su mayoría del filogrupo B2 (60%, $n=8$) (tabla 23 en Anexos).

También se analizaron las relaciones, mediante la misma prueba, entre los tamaños de las bandas plasmídicas clasificadas por rangos y los filogrupos. Solamente hubo una asociación significativa en las cepas con bandas plasmídicas de 4.1-5 Kb del filogrupo C al compararlo con el B2 (tabla 23 en Anexos).

Finalmente, se compararon las medianas de los conteos de bandas plasmídicas de los filogrupos B2 y C, pero no se encontraron diferencias significativas entre estos (Prueba U de Mann-Whitney, $p<0.05$) (figura 35 en Anexos).

Cabe señalar que la cepa del filogrupo D contó con el mayor número de bandas plasmídicas ($n=5$).

7.7.8 Bandas plasmídicas y Resistencia antimicrobiana

Para buscar asociaciones entre la susceptibilidad antimicrobiana y otros rasgos de resistencia y las cepas con bandas plasmídicas, se utilizó la prueba de Fisher ($p<0.05$). Los resultados no arrojaron alguna asociación estadísticamente significativa (Tabla 24 en anexos).

También, se buscó si existía alguna correlación lineal entre el número de bandas y el puntaje de resistencia del cepario mediante una correlación lineal de Spearman ($p<0.05$). Los resultados mostraron una tendencia a una correlación lineal positiva con un coeficiente $\rho=0.51$ y un valor $p=0.058$ (figura 34).

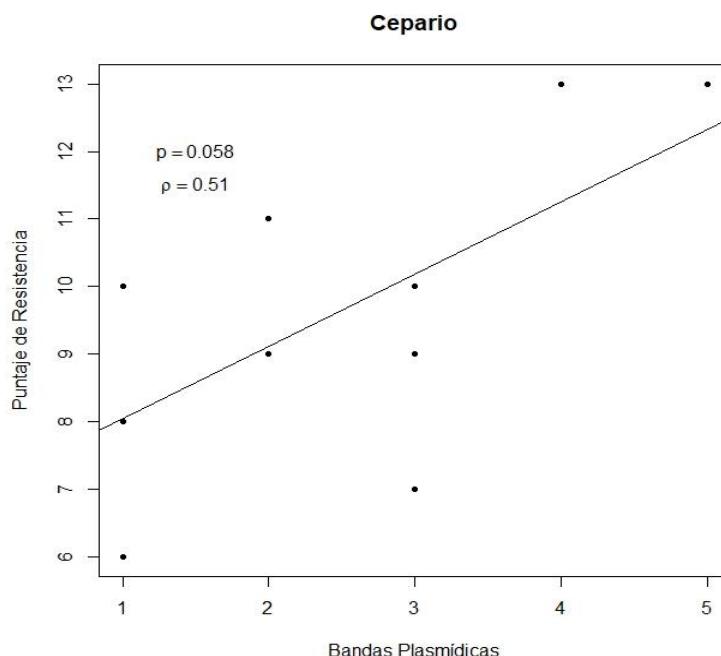


Figura 34. Correlación entre el puntaje de resistencia y el número de bandas plasmídicas de aislados de *E. coli* de varones con ITU ($n=24$).

El valor p mostró una tendencia hacia una correlación lineal significativa ($p < 0.05$).

7.7.9 Bandas plasmídicas y formación de biopelícula

Para analizar la D.O. ($_{595nm}$) de la biomasa de biopelícula de las cepas con bandas plasmídicas y de las que no tenían bandas se compararon ambos grupos mediante la prueba de U de Mann-Whitney ($p < 0.05$). Los resultados de la prueba estadística no mostraron alguna diferencia significativa entre los grupos (figura 36 en anexos).

Para conocer si existían asociaciones entre las categorías de formación de biopelícula y la presencia o ausencia de bandas plasmídicas en las cepas se utilizó la prueba de Fisher ($p < 0.05$), sin embargo, no se encontró alguna asociación estadísticamente significativa. Por otro lado, se encontró que la cepa formadora fuerte de biopelícula (132-I) posee un plásmido de aprox. 4 Kb (tabla 26 en anexos).

Para determinar si existía alguna correlación lineal entre el número de bandas plasmídicas y la D.O. ($_{595nm}$) de biomasa de biopelícula se realizó la prueba de correlación lineal de Spearman ($p < 0.05$). El modelo estadístico no encontró una correlación lineal entre estas variables (figura 38 en anexos).

7 Discusión

Durante los últimos ocho años, las infecciones de tracto urinario han permanecido como la tercera causa de enfermedad nacional en la población masculina adulta y de la tercera edad (SUIVE/DGE/Secretaría de Salud/Estados Unidos Mexicanos, 2018). En 2018, el Estado de Puebla se posicionó en el 6^{to} lugar con mayor número de casos de ITU en varones de 45-49 años a nivel nacional y el 8^{vo} en varones de 60 y más años (SUIVE/DGE/Secretaría de Salud/Estados Unidos Mexicanos, 2018). Hasta el momento no existen estudios previos sobre la caracterización de cepas de *E. coli* aisladas de varones con ITU atendidos en la región poblana. En el presente estudio, caracterizamos la filogenia, la virulencia, la resistencia y la formación de biopelícula de 24 cepas aisladas de varones adultos y de la tercera edad (media: 71, rango: 46-91 años) aisladas de derechohabientes del hospital regional del ISSSTE de la ciudad de Puebla durante el periodo 2015-2016. Para lograr el objetivo, se identificó y se analizó estadísticamente la distribución de características genotípicas (clasificación filogenética, genes de virulencia e islas de patogenicidad, genes de producción de β -lactamasas) y fenotípicas (susceptibilidad antimicrobiana, producción de biopelícula *in vitro* y perfil plasmídico) en el cepario.

Los resultados mostraron una diversidad filogenética de las cepas de *E. coli*. Estas pertenecieron a 6 filogrupos, 5 filogrupos de *E. coli sensu stricto* (A, B2, C, D y E) y un clado criptico (Clado I). Una cepa perteneció a un clado indeterminado (CI/II). El filogrupo que predominó fue el B2 (60%, $n=14$), seguido de C (17%, $n=4$) y el A (9%, $n=2$).

Estos resultados concuerdan con la alta frecuencia en la que se identifica el filogrupo B2 en aislados de *E. coli* de pacientes con ITU estudios internacionales, donde se estudiaron cepas de hombres y mujeres como en Lituania (mujeres: 49.4%, hombres: 53.8%) e Iran (mujeres: 46%, hombres: 48.3%) (Prakapaite *et al.*, 2019; Staji, Rassouli, & Jourablou, 2019). En el estudio de (Ramírez-Castillo *et al.*, 2018) en Aguascalientes, las cepas del filogrupo B2, aisladas de hombres, fueron identificadas en una menor proporción (4.5%), por lo que podría indicar la mayor frecuencia de algún otro filogrupo en dicha población, sin embargo, ese dato no lo hicieron público.

Como se ha reportado la mayoría de los aislados de cepas ExPEC han pertenecido al filogrupo B2 y D (Johnson & Stell, 2000; Picard *et al.*, 1999). No obstante, ExPEC, también, puede pertenecer a otros filogrupos como (A, C, E, y clado I) ya que no existe una asociación estricta entre un filogrupo y algún patotipo determinado (Leimbach *et al.*, 2013; Walk *et al.*, 2009) (véase figura 3). Por lo tanto, nuestros resultados también confirman que filogrupos considerados comensales, como el A, pueden adquirir genes de virulencia en el tracto gastrointestinal, y ello, les permite colonizar el tracto urinario en varones.

Cabe mencionar, que las diferentes proporciones en las que se identifica un filogrupo u otro de *E. coli* aislada de ITU puede deberse a la ubicación geográfica de la población de estudio más que por el sexo del paciente (Agarwal, Mishra, Srivastava, & Srivastava, 2013).

En nuestro estudio, las cepas del filogrupo B2 fueron más virulentas que los filogrupos A y C, significativamente ($p < 0.05$) (PV Mediana: 7.7).

Estos resultados, concuerdan con los trabajos de Kudinha *et al.*, 2013 y de de Souza da-Silva *et al.*, 2017 en donde las cepas B2 son también significativamente más virulentas que los filogrupos A y B1 ($p < 0.05$).

En el estudio de Kudinha *et al.*, 2013, los puntajes de virulencia fueron mayores en los aislados de pielonefritis del filogrupo B2 (Me: 14) y más bajos en los aislados fecales del filogrupo A y B1 (Mediana: 2) e intermedios en los aislados de pielonefritis del filogrupo A y B1, los de cistitis del D y los fecales del B2 (Mediana: 5-6). A diferencia de estos resultados, en nuestro estudio carecemos de los datos clínicos de los pacientes masculinos así que no podemos determinar esa asociación.

Se ha propuesto que, la virulencia extraintestinal en *E. coli* del filogrupo B2 surgió como una consecuencia del comensalismo de cepas de este filogrupo. Esto se ha demostrado, al observar que este “conjunto de genes extraintestinales” que comprenden reguladores transcripcionales, factores del metabolismo de hierro, adherencia, biosíntesis de lipopolisacárido (LPS) y el sistema de síntesis del péptido híbrido poliquetido, confieren, por un lado, mayor *fitness* a las cepas secuenciadas del filogrupo B2 intestinales -de donde provienen originalmente-, y por el otro, un fenotipo extraintestinal virulento en el modelo murino de septicemia (Le Gall *et al.*, 2007; Östblom, Adlerberth, Wold, & Nowrouzian, 2011).

Además, estos factores de virulencia extraintestinales se encuentran en elementos genéticos móviles como las PAIs que pueden transferirse horizontalmente entre cepas de *E. coli* de diferentes grupos filogenéticos (Messerer, Fischer, & Ren Schubert, 2017).

Encontramos que los genes *pap* (*papA+papGII*), *iha* y las islas de patogenicidad PAI ICFT073 y PAI IICFT073, estuvieron asociados significativamente ($p<0.05$) a las cepas del filogrupo B2. Estos resultados, son congruentes con los trabajos de Souza da-Silva *et al.*, 2017 y Kudinha *et al.*, 2013 en donde se reporta que las cepas del filogrupo B2 están asociadas significativamente a los genes *papA*, *papGII* y al marcador de la isla de patogenicidad PAI ICFT073, *MalX*. También se ha reportado, por experimentos de mutagénesis dirigida por transposones, la asociación entre genes del operón *pap* y las cepas CFT073 y F11 que pertenecen al filogrupo B2. Además, se reportó que el gen *papC* cumple con los postulados moleculares de Koch, lo que indica el papel esencial del pili P en la patogénesis de ExPEC en vejiga y riñón (Buckles *et al.*, 2015). Al mismo tiempo también se conoce que el operón *pap* se encuentra asociado a las PAIs I y II de CFT073 (Oelschlaeger *et al.*, 2002) las cuales, también estuvieron asociadas con las cepas B2 de este estudio (véase tabla 4).

Existen otros genes esenciales en la patogénesis de ExPEC en tracto urinario como *fimH* y *kpsMT-I/II*, los cuales codifican para la adhesina del pili tipo I y para la cápsula respectivamente (Buckles *et al.*, 2015). En este estudio, dichos genes se presentaron en diferentes filogrupos más que haber estado asociados significativamente con algún filogrupo en particular (*fimH*: A (50%), B2 (100%), C (75%), D (100%), E (100%), CI (100%), CI/CII (100%) ; *kpsMT-II* A (0%), B2 (78.5%), C (0%), D (0%), E (100%), CI (100%), CI/CII (0%)) (véase tabla 19).

Aunque no existe un patrón de virulencia extraintestinal determinado, sí existen categorías que definen la función de los genes de virulencia extraintestinales, que son: adhesinas, sistemas de captación de hierro, proteínas de daño a tejido y factores de evasión de la respuesta inmune; la mayoría se encuentran codificados en PAIs. Por esto, se caracterizó la distribución de factores de virulencia extraintestinales y PAIs de cepas prototipo de ExPEC (CFT073 y J96) (Oelschlaeger *et al.*, 2002) así como el puntaje de virulencia que predice la virulencia *in vivo* (Johnson *et al.*, 2006).

En nuestros resultados, los genes más frecuentes fueron *fimH* (92%) e *iucD* (88%) y las islas de patogenicidad PAI I_{CFT073} (63%) y II_{CFT073} (67%) fueron las más frecuentes. Además, el PV medio fue de 6 (rango:1-10). Estos resultados son similares a los de Kudinha *et al.*, 2013 en donde los genes más dominantes de los aislados de cistitis fueron *fimH* (adhesina del pili tipo 1) (96%), *iutA* (aerobactina) y *fyuA* (yersiniabactina) (83%, respectivamente), y los de pielonefritis fueron *fimH* (97%) y *fyuA* (91%). El PV medio de los aislados de cistitis fue de 7 (rango1-14) y de los de pielonefritis de 9 (rango: 1-16). En cepas aisladas de varones de Aguascalientes (n=24), los genes más dominantes fueron *fimH* (83.3%), seguido de *fyuA* (58.3%) y *agn43* (antígeno 43) (58.3%) (Ramírez-Castillo *et al.*, 2018).

Estas observaciones apoyan la importancia que tiene el pili tipo 1 y los sistemas de captación de hierro en la patogénesis de ExPEC en tracto urinario, ya que le permiten adherirse al urotelio y captar hierro (nutriente esencial para el desarrollo y multiplicación bacteriana); comenzando así la patogénesis en vías urinarias bajas y en una etapa posterior, adherirse al epitelio renal (Lüthje & Brauner, 2014; Subashchandrabose & Mobley, 2015b).

En nuestro estudio, no obtuvimos cepas que amplificaran el gen de la flagelina (*fliC*). Sin embargo, el 67% (n=16) presentaron un fenotipo de movilidad en el medio MIO (movilidad-Indol-ornitina) (tabla 27 en Anexos). Por ello, se evaluaron los oligonucleótidos utilizados en la PCR múltiplex y se encontró, mediante alineamientos, que estos estaban diseñados para hibridar en la región variable del gen, por lo que se propuso el diseño de nuevos oligos que amplificaran la región conservada y así identificar con mayor certeza el gen *fliC* en futuros experimentos (figura 39 en Anexos).

La diferencia de puntajes de virulencia con el trabajo de (Kudinha *et al.*, 2013), puede deberse al número de factores de virulencia analizados en el estudio. 15 FV analizados en este estudio y 22 en el trabajo de Kudinha. Aun así, el puntaje de virulencia obtenido en nuestro estudio (PV=6, rango: 1-10) junto con el hecho de que al menos dos factores de virulencia de cada categoría y tres PAIs (PAI I_{CFT073}, PAI II_{CFT073} y PAI II_{J96}) están presentes en al menos el 30% del cepario, indica que las cepas de *E. coli* aisladas de ITU de varones poblanos poseen un considerable potencial de virulencia extraintestinal (Oelschlaeger *et al.*, 2002).

Adicionalmente, la distribución en la que se encontraron las PAIs de CFT073 y de J96 en el estudio fue de 63% y 67% para las PAI I_{CFT073} y II_{CFT073}, respectivamente y 0% y 30% para las PAI I_{J96} y II_{J96}, respectivamente. Estos porcentajes son mas altos a los de otro estudio donde se analizaron cepas de *E. coli* de 28 varones con ITU, donde las PAIs de CFT073 también fueron más prevalentes que las de J96 (PAI I_{CFT073}:57% y PAI II_{CFT073}:46%, PAI I_{J96}: 0% y PAI II_{J96}:11%).La predominancia de las islas de patogenicidad de CFT073 sobre las de J96 se han observado en otros estudios de España y Suiza, como los de Sabate, *et al.*, 2006; Östblom *et al.*, 2011.

Estas islas de CFT073 contienen genes que codifican para adhesinas (*pap*, *iha*), sideróforos y receptor de hierro, (*aerobactina*, *iha*), toxinas (*hlyA*, *sat*) y factores de evasión de la respuesta inmune (*kpsMT-II*), todos previamente relacionados en la virulencia y el *fitness* de ExPEC tanto en vías urinarias bajas como en las altas y próstata (Flores-Mireles, Walker, Caparon, & Hultgren, 2015b; Krieger *et al.*, 2011; Lüthje & Brauner, 2014; Subashchandrabose & Mobley, 2015).

En nuestro estudio los perfiles de PAIs más frecuentes fueron: PAI I_{CFT073} + PAI II_{CFT073} (33%, n=8) y PAI I_{CFT073}+ PAI II_{CFT073} + PAI II_{J96} (30%, n=7).

Estos resultados concuerdan con los de Sabate *et al.*, 2006, en donde se encontraron porcentajes similares, de 84 aislados de *E. coli* de muestras fecales y de ITU, los patrones más frecuentes también fueron PAI I_{CFT073} + PAI II_{CFT073} (25% , n=21) y PAI I_{CFT073}+ PAI II_{CFT073} + PAI II_{J96} (40%, n=33). Además, al igual que en nuestro estudio, la PAI I_{J96} estuvo ausente (0%).

Estos hallazgos, confirman que la adquisición de las PAIs, no es un evento azaroso, sino uno secuencial. Es probable que primero se adquieran las PAI I y II de CFT073 y posteriormente la PAI II_{J96} (Sabate *et al.*, 2006). En nuestro estudio, 13 de las 15 cepas con los perfiles PAI I_{CFT073} + PAI II_{CFT073} y PAI I_{CFT073}+ PAI II_{CFT073} + PAI II_{J96} pertenecen al filogrupo B2. Como ya se ha establecido, la presentación de diferentes PAIs en aislados B2, son causadas principalmente por un bagaje genético, que permite numerosos eventos de transferencia horizontal génica en este filogrupo (Escobar-Páramo *et al.*, 2004).

También, se llevo a cabo una prueba de Fisher para averiguar si existían relaciones estadísticamente significativas entre los factores de virulencia y las PAIs de CFT073 y J96. Se encontraron relaciones estadísticamente significativas entre los genes *pap*, *iha*, *sat*, *hlyA* *cnf-1*, *kpsMT-II* y la PAI I_{CFT073}, así

como en los genes *pap*, *iha*, *sat*, *kpsMT-II* y la PAI II_{CFT073} y entre *pap*, *iha*, *hlyA* y *cnf-1* y la PAI II_{J96}.

Najafi *et al.*, 2018, obtuvieron resultados similares a los nuestros, pues también hubo relaciones estadísticamente significativas entre *hlyA* y *papG* y la PAI I_{CFT073}, así como entre *papG* y la PAI II_{CFT073} y *hlyA*, *cnf-1*, *papG* y la PAI II_{J96}.

Las diferencias radican en que esos autores no identificaron el gen *sat*, *iha*, *iucD* y *papA*, así como el perfil de las PAIs.

Las relaciones estadísticamente significativas entre factores de virulencia asociados a ExPEC y PAIs que se hallaron en nuestro estudio sí concuerdan con los genes de virulencia que se han caracterizado en cada una de las PAI I y II de CFT073 y de J96, por Lloyd *et al.*, 2007 y Oelschlaeger *et al.*, 2002.

Cabe señalar, que obtuvimos 22 virotipos diferentes y uno compartido, lo que significa que, como se había ya mencionado, no existe un solo patrón de virulencia para que ExPEC colonice y provoque una infección en el tracto urinario masculino o femenino sino que más bien diferentes combinaciones de genes pertenecientes a las diferentes categorías de virulencia extraintestinal son posibles para que tal evento ocurra (Russo & Johnson, 2002).

Respecto a la resistencia antibiótica, las cepas mostraron mayor resistencia hacia la familia de las quinolonas y a los β -lactámicos (100% y 90%, respectivamente). El antibiótico al cual las cepas de *E. coli* presentaron la mayor sensibilidad fue fosfomicina (96%).

Estos resultados concuerdan con el trabajo de (Ramírez-Castillo *et al.*, 2018) en Aguascalientes, en dicho trabajo se evaluó el perfil de susceptibilidad a aminoglucósidos, β -lactámicos y fluoroquinolonas. La resistencia de las cepas de *E. coli* también fue mayor a fluoroquinolonas y a los β -lactámicos (50% y 44%, respectivamente). La diferencia en porcentaje de resistencia entre nuestro trabajo y el de Ramírez-Castillo, se debe posiblemente a la diferencia en las técnicas utilizadas, Kirby-Bauer vs dilución en agar, o bien a que se trata de cepas aisladas de pacientes con ITU de regiones diferentes del país (Puebla vs Aguascalientes).

Los antibióticos a los que (Ramírez-Castillo *et al.*, 2018) observaron mayor sensibilidad, es decir porcentajes de resistencia <20%, fueron netilmicina (8.3%), amikacina (16.7%), norfloxacin (12.5%), ertapenem (0%) e imipenem (0).

Nosotros no obtuvimos proporciones <20% en la resistencia a alguno de estos fármacos, de nuevo, posiblemente debido a la diferencia de regiones. Sin embargo, en nuestro estudio ertapenem también fue el antibiótico con menor resistencia dentro de la familia de los β -lactámicos.

El alto porcentaje de resistencia a fluoroquinolonas se puede deber a que estos antibióticos son de primera elección en el tratamiento de las ITU en varones debido a sus propiedades farmacocinéticas, ya que después de su administración oral, sus concentraciones en orina, fluido prostático y tejido prostático son altas (Andriole, 1991).

Según algunos estudios del 2002, 2005 y 2009 sobre la vigilancia de la resistencia en países de Norte América, Sur América y Europa, reportaron que la frecuencia de resistencia de *E. coli* aislada de ITU en México presenta frecuencias de resistencia del 72% a ciprofloxacina y levofloxacina; valores que están muy por encima de la media del estudio ($\bar{x}_{\text{ciprofloxacina}}=12.4\%$ y $\bar{x}_{\text{levofloxacina}}=13\%$) (Foxman, 2010).

El tratamiento de las ITU en general siempre debe hacerse tomando en cuenta los valores de resistencia local (Urology, 2018). Esto y los resultados obtenidos en el presente estudio, indicarían que las fluoroquinolonas son una familia de antibióticos que deberían dejar de usarse en aquellos pacientes varones con ITU del hospital regional del ISSSTE en Puebla con cepas resistentes y sustituirlos por aquellos a los que son susceptibles, hasta que el porcentaje de resistencia disminuya considerablemente.

En cuanto a los β -lactámicos, se han observado altas tasas de resistencia en aislados de *E. coli* de ITU en diferentes estudios de distintas regiones del país (Miranda-Estrada *et al.*, 2017; Paniagua-Contreras *et al.*, 2018; Ramírez-Castillo *et al.*, 2018; Villalobos-Ayala, Castillo, & Licea-Serrato, 2017). No obstante, los carbapenémicos son recomendados para el tratamiento empírico de ITU complicadas (Sotomayor de Zavaleta *et al.*, 2015). Y como se observó en nuestro estudio y el de (Ramírez-Castillo *et al.*, 2018), ertapenem fue el β -lactámico con mayor sensibilidad, sin embargo, es un antibiótico costoso y su aplicación debe ser hospitalaria (Urology, 2018).

De un estudio hecho en 47 centros médicos de 20 estados de México durante un periodo de 6 meses (enero-junio del 2018) por (Garza-González *et al.*, 2019) se reportó una resistencia hacia los carbapenémicos de *E. coli*, aislada de

muestras de orina del 1.2%, mientras que para los demás β -lactámicos fue del 41% al 81%. Estas observaciones se deben a que las carbapenemasas no son suficientes para un fenotipo de resistencia a carbapenémicos *in vivo*, sino que se requiere además de una combinación de disminución en el influjo del antibiótico y una β -lactamasa (Sotomayor de Zavaleta *et al.*, 2015).

El antibiótico trimetoprim-sulfametoxazol (TMP/SMX), presentó en nuestro estudio un porcentaje de resistencia del 79%, muy similar al encontrado por Ramírez-Castillo *et al.*, 2018 en el mismo número de individuos (75%). Al parecer, este antibiótico dejaría de ser una opción de tratamiento de primera línea.

Dada la resistencia a la mayoría de los β -lactámicos y TMP/SMX en aislados de *E. coli*, se ha optado por el uso de -además de los carbapenémicos- de fosfomicina, antibiótico que había sido infravalorado por varios años en el tratamiento de ITU bajas no complicadas, pero que ahora está aprobado por la FDA para tal uso (Candel & Cantón, 2018; Garau, Latorre, & Alonso-Sanz, 2001). Se trata de un bactericida, cuya sensibilidad en *E.coli* se ha demostrado que alcanza >95% según varios estudios mexicanos (Sotomayor de Zavaleta *et al.*, 2015).

Además, hay evidencia de que la fosfomicina oral es una buena alternativa a las fluoroquinolonas para el tratamiento de la prostatitis crónica, dadas los altos índices reportados de resistencia a fluoroquinolonas (Karaiskos *et al.*, 2019). Sin embargo, aún no existe alguna guía clara para su implementación y también se necesitan más estudios para dilucidar su papel terapéutico en las ITU complicadas (López-Montesinos & Horcajada, 2019).

Adicionalmente, encontramos que la mayoría de las cepas del presente estudio presentaron el fenotipo MDR (70%). Esto también concuerda con el estudio de Ramírez-Castillo *et al.*, 2018, en donde ellos reportaron que el fenotipo MDR estaba asociado a las infecciones en varones (83.33%, $p<0.05$).

El 33% ($n=8$) de nuestras cepas de *E. coli*, presentó el fenotipo de producción de BLEEs y el gen de BLEE más prevalente en el cepario fue el de *bla*_{CTX-M} (80%) en donde el 87.5% ($n=7$) de las cepas con fenotipo BLEE⁺, presentaron el gen de *bla*_{CTX-M}. Respecto a este punto, también, Ramírez-Castillo *et al.*, 2018

encontraron el gen *bla*_{CTX-M} en los aislados de varones, aunque ellos no hicieron determinación del fenotipo de producción de BLEE.

Con todo lo anterior, podemos decir que dadas las proporciones de la resistencia a antibióticos de primera línea para tratar ITU en varones, del fenotipo MDR, del fenotipo BLEE y los genes de BLEEs en el cepario, es posible que las ITU en varones sean difíciles de erradicar, lo que podría conducir a ITUs recurrentes o crónicas. Es por esto que el tratamiento debe de llevarse a cabo con cuidado y basado en el análisis de la susceptibilidad del patógeno aislado de cada paciente.

Con respecto a la relación entre el perfil de sustrato y de los genes *bla* en cepas BLEE⁺ (ver tabla 16), los resultados nos hacen pensar en la presencia de diferentes variantes del gen *bla*_{CTX-M} en estas cepas, unas con un perfil de sustrato más amplio que otras (cepas 126-I, 155-I, 167-I y 173-I).

Al analizar los resultados del perfil de genes *bla* en cepas BLEE⁺ y BLEE⁻, los resultados hacen pensar en que el hecho de que una cepa exprese el fenotipo BLEE^{+/-} *in vitro* con las concentraciones de antibiótico recomendadas por el CLSI, 2018 no depende de que la cepa posea o no alguno de los genes *bla* aquí identificados o de la presencia de un cierto perfil de genes *bla*, sino más bien de la variante de estos genes, ya que debe haber ciertas variantes de *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM} y *bla*_{OXA-1} que son inhibidas por el clavulanato y otras que no. También, el fenotipo BLEE^{+/-} por este método puede deberse a la presencia de otros genes *bla* no buscados en este estudio (cepa 118-I), así como de sus respectivas variantes.

Con esto queda claro que no existe una relación de asociación, apartir de los datos obtenidos, entre el fenotipo BLEE^{+/-} y la presencia o ausencia de los genes *bla* identificados y sus diferentes combinaciones.

Acerca de la relación entre resistencia y virulencia, en nuestro estudio, el gen *fimH* estuvo asociado a las cepas CRO^R, FEP^R y ATM^R; el gen *traT* a las cepas TE^R; la PAI I_{CFT073} a las GM^R y FEP^R y la PAI II_{CFT073} a las FEP^R ($p < 0.05$).

Los resultados de otros estudios con el nuestro sobre las relaciones estadísticas entre genes de virulencia y resistencia a antibióticos utilizados para tratar ITU, discrepan entre sí (Calhau, Domingues, Ribeiro, Mendonça, & Da Silva, 2015; Miranda-Estrada *et al.*, 2017), ya que cada investigador a optado identificar

ciertos factores de virulencia que otro no, así como incluir ciertos antibióticos que otro excluye.

Nuestros resultados con los de Calhau *et al.*, 2015 concuerdan en que la PAI *lcFT073* está asociada a las cepas GM^R, sin embargo, el no incluyó en su estudio la susceptibilidad antimicrobiana a cefepime.

Por otra parte, Miranda-Estrada *et al.*, 2017, difiere completamente de nuestros resultados. Ellos reportan una asociación entre las cepas *fimH*⁺ y las AMP^R, CTX^R, CFZ^R y TE^R y si incluyeron a cefepime en su trabajo.

Ninguno de los dos trabajos anteriores identificó el gen *traT*.

Estos resultados, reflejan que la distribución de los genes de virulencia y resistencia son heterogéneos entre las cepas de ExPEC aisladas de ITU de diferentes poblaciones (Miranda-Estrada *et al.*, 2017).

Evaluar la formación de biopelícula *in vitro* es importante ya que se ha documentado que las bacterias formadoras de biopelícula presentan un incremento en la resistencia a antimicrobianos y a la cronicidad de la infección, además de estar asociado con ITUs recurrentes (Miranda-Estrada *et al.*, 2017). En el presente estudio, el 96% (*n*=23) de las cepas son productoras de biopelícula con excepción de una cepa (174-I). La mayoría de las cepas productoras de biopelícula son productoras débiles (63%), seguidas de las productoras moderadas de biopelícula (63% vs 30%; *p*<0.05). La única cepa clasificada como formadora fuerte es la cepa 132-I.

En el estudio de Noie Oskouie *et al.*, 2019, en Iran en 2016, se evaluó la formación de biopelícula de un total de 84 cepas de *E. coli* aisladas de mujeres (rango de edad 20 a >81) principalmente entre 41-60 años (41.7%) y de 36 varones del mismo rango de edad, principalmente de 61 a 80 años (36%).

De las 120 cepas, el 85% (*n*=102) fue formadora de biopelícula, un porcentaje similar al encontrado en nuestro estudio. El 15% (*n*=18) fue formadora fuerte, el 11.7% (*n*=14) fue formadora moderada y el 58.3% (*n*=70) fue formadora débil, mientras que el 15% (*n*=18) no formaron biopelícula.

Las diferencias en las proporciones de formadoras fuertes y moderadas pueden deberse al número de bacterias probadas y/o al contexto en el cual fueron aisladas (pacientes con ITU complicada y no complicada, cálculos renales diabetes mellitus insulino dependientes, desórdenes prostáticos o de catéteres).

La habilidad de formar biopelícula varió considerablemente (rango D.O. (595nm):0.3-2.4). La media de biomasa de biopelícula formada en el cepario es de 0.8 ± 0.45 (figura 22).

Estos resultados difieren con los de Pompilio *et al.*, 2018 que de 53 pacientes femeninas (rango de edad: 18 – 52 años, media: 30 años) con pielonefritis ($n=18$), cystitis recurrente ($n=19$) y controles ($n=16$) el rango de DO₄₉₂ varió de 0.183-0.771. La biomasa de biopelícula media formada por las cepas de pielonefritis y cistitis recurrente fue de DO₄₉₂: 0.394 ± 0.188 y 0.399 ± 0.141 , respectivamente y las controles de DO₄₉₂: 0.256 ± 0.05 .

Estas diferencias pueden deberse a que nosotros obtuvimos una cepa con DO₅₉₅=2.4 (132-I) y 9 valores con DO₅₉₅ ≥ 0.9 , mientras que ello su valor máximo es de DO₄₉₂=0.077. Estos valores distintos también pueden deberse a algunas diferencias que hubo en el protocolo, ya que Pompilio *et al.*, 2018, en el pazo de crecimiento del cultivo, utilizaron TSB, un medio más enriquecido que LB, y ajustaron a una DO₅₅₀ de 1.00 (correspondiente a 1×10^9 UFC/ml). Luego, cada pozo de la microplaca fue inoculado con 200 ul de una suspensión de TSB diluida 1:100 ($1-3 \times 10^7$ UFC/ml). En nuestro caso, partimos de 2 a 3 colonias aisladas que se sembraron en 3ml de caldo LB y que fueron ajustadas a una DO₆₀₀ de 1.0 (8×10^8) utilizando la escala 0.5 de McFarland y agregando caldo LB cuando fue necesario. Luego, se inoculó con 200 ul cada pozo con una suspensión de TSB diluida 1:100 ($1 - 3 \times 10^6$). Un medio enriquecido permite que las células planctónicas crezcan más en número, sin embargo, al adherirse a alguna superficie ocurre que, a mayor número de células adheridas, menor número de recursos para que estas crezcan en dicha superficie. Por el contrario, un menor número de células planctónicas permiten que la biopelícula se desarrolle de manera más óptima dada la mayor disponibilidad de nutrientes (Bowden & Li, 1997).

Los valores de DO₅₉₅ de la biomasa de biopelícula de cada filogrupo están resumidos en la figura 30. Todas las cepas de los filogrupos D ($n=1$), E ($n=1$), CI ($n=1$) y CI/CI ($n=1$) fueron productoras débiles de biopelícula. La mayoría de las cepas del filogrupo C (75%, $n=3$) fueron productoras moderadas y una fue no productora. Las cepas del filogrupo B2 en su mayoría fueron productoras débiles (71.4%, $n=10$) y algunas fueron productoras moderadas (28.5%, $n=4$).

Finalmente, el filogrupo A presentó una cepa productora débil y otra productora fuerte.

Los resultados de la prueba de Fisher ($p < 0.05$) para buscar asociaciones entre la categoría de formación de biopelícula y los filogrupos están resumidos en la tabla 23. Solo se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la producción débil de biopelícula en el filogrupo B2 con respecto al C. Pompilio *et al.*, 2018, tampoco encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la biomasa de biopelícula de los filogrupos que ellos encontraron (A, B1, B2 y D). Sin embargo, sí hubo una asociación estadísticamente significativa en la producción fuerte de biopelícula y el filogrupo A (20%, $n=1$), al igual que en nuestro estudio.

Nuestra cepa formadora fuerte de biopelícula del filogrupo A, (132-I) fue la de menor puntaje de virulencia ($PV=1$). De hecho, las 3 cepas del filogrupo C que fueron productoras moderadas de biopelícula tuvieron un puntaje de virulencia promedio de 2.6.

Estos resultados sugieren que algunas cepas poco virulentas de *E. coli* producen mayor biopelícula, debido a que ciertos genes involucrados en las rutas metabólicas de la formación de biopelícula suprimen a otros asociados a virulencia. Esto ya se ha comprobado en algunas especies como en *Antonibacillus pleuropneumoniae* y *Streptococcus suis* (Li *et al.*, 2008; Wang, Zhang, Wu, & Lu, 2011).

Este fenómeno también se apreció a nivel de cepario, en donde se obtuvo correlación lineal negativa ($p < 0.05$) con un coeficiente ρ de Spearman de -0.41, el cual no es muy alto, pero nos indica una tendencia de que, a mayor biomasa de biopelícula en nuestro cepario, menor puntaje de virulencia presentaron las cepas.

Esta correlación negativa también fue observada por Pompilio *et al.*, 2018, cuyas cepas aisladas de pielonefritis aguda presentaron una correlación lineal negativa ($p=0.0508$) con un coeficiente ρ de Spearman de -0.501.

Además, se encontró una asociación entre las cepas *fimH*⁺, *iucD*⁺, y la PAI II_{CFT073}⁺ y una menor cantidad de biomasa de biopelícula (DO_{595nm}) por parte de ellas (U de Mann-Whitney, $p < 0.05$).

Fattahi *et al.*, 2015 observaron que el 94% de sus cepas ($n=100$) amplificaron el gen *fimA* que codifica para la cadena A de la fimbria tipo I, y de estas cepas

fimA⁺, el 93.7% es formadora de biopelícula y las *fimA*⁻ (*n*=6) el 66.7% de ellas son formadoras de biopelícula. Esto concuerda con nuestro estudio, pues de las 2 cepas *fimH*⁻, ambas son formadoras de biopelícula.

Aunque fue dicho en la introducción que la fimbria tipo I es un factor importante para la formación de biopelícula de *E. coli* en superficies abióticas, la evidencia en otros estudios como los de Cordeiro *et al.*, 2016; Wurpel *et al.*, 2016 y el nuestro indican que no es un factor esencial, ya que existe, más bien, un conjunto de fimbrias que *E. coli* puede utilizar para adherirse a superficies abióticas y bióticas que incluyen: la fimbria tipo I, P, FIC/S y UCA-like (UCL).

En cuanto a la relación cuantitativa entre la formación de biopelícula y resistencia antimicrobiana, encontramos que los puntajes de resistencia y la biomasa de biopelícula formada del cepario mostraron una correlación lineal negativa (Spearman $\rho = -0.45$; $p < 0.05$). Y en lo particular, las cepas AMK^s y *bla*_{OXA-1}⁺ están asociadas a una mayor cantidad de formación de biopelícula (DO_{595nm}). Estos resultados concuerdan con los de un trabajo en Irán (Poursina, Sepehrpour, Sina, & Mobasherizadeh, 2019), en donde los aislados que no son MDR tienden a producir biopelículas más fuertes.

Parece que la formación de biopelícula es un mecanismo que permiten a las bacterias persistir en algún ambiente, particularmente cuando el nivel de resistencia no es suficientemente alto. De hecho, no hay muchos estudios reportados que clarifiquen la relación cuantitativa entre estas dos variables (Poursina *et al.*, 2019). No obstante, nuestro estudio aporta datos acerca de la relación lineal de estas dos variables.

Finalmente, con respecto al perfil plasmídico, el 60% del cepario presenta al menos una banda plasmídica y las bandas con pesos de 1 Kb y de >10 Kb son los más frecuentes en las cepas con bandas plasmídicas (figura 25).

Esto concuerda con un estudio hecho en Etiopía por Dadi *et al.*, 2018 en población varonil (*n*=265) y femenil (*n*=515). Ellos también reportaron una proporción de cepas con bandas plasmídicas, mayor a la mitad de los aislados (80%). Igualmente, la frecuencia de los pesos de los plásmidos concuerdan con los reportados por un estudio en Irán (Farshad, S., Ranjbar, R., Japoni, A., Hosseini, M., Anvarinejad, M., & Mohammadzadegan, 2012).

Es sabido que los genes de B-lactamasas que caracterizamos en este estudio están codificados en plásmidos, sin embargo, al igual que (Dadi *et al.*, 2018) no

encontramos alguna relación significativa entre resistencia y plásmidos. Por lo tanto, en el futuro podrían llevarse a cabo experimentos de conjugación para determinar si existen plásmidos conjugativos con algunas de las B-lactamasas u otras enzimas que confieren resistencia a los antibióticos aquí evaluados.

También es sabido que diversos genes que confieren resistencia a los antibióticos evaluados en este estudio se albergan en plásmidos. Por ejemplo, las β -lactamasas, los genes *qnr* que dan resistencia frente a quinolonas y las RNA metiltransferasas que confieren resistencia a aminoglucósidos. Por ello se buscó si existía una correlación lineal entre el puntaje de resistencia y el número de bandas plasmídicas en el cepario y se encontró una tendencia ($p=0.058$, $\rho=0.51$, prueba de Spearman) hacia una correlación lineal positiva entre estas dos variables en el cepario de estudio.

El estudio de Dadi *et al.*, 2018, no se encontró alguna asociación estadística entre la resistencia y la presencia de plásmidos. Esta diferencia puede deberse a que ellos utilizaron una prueba estadística llamada *odds ratio* (OR) o razón de probabilidades que determina si existe una asociación entre sujetos que presentan cierto desenlace esperado (la presencia de plásmidos) cuando estaban expuestos a cierta condición (resistencia) con respecto a los que no estaban en dicha condición. Nosotros, optamos por analizar a las variables de forma cuantitativa (Puntaje de resistencia y número de bandas) con el modelo de correlación lineal de Spearman ($p<0.05$) y buscar si existía una relación lineal entre dichas variables. Como se mencionó, el modelo nos dice que existe una tendencia lineal positiva entre las variables, es decir, que hay una tendencia en nuestro cepario de que mientras más clases de antibióticos presente resistencia una cepa en al menos un antibiótico de cada una de las 15 clases, mayor número de bandas plasmídicas posee. Y esto se asocia fenotípicamente también, pues observamos que las cepas con mayor número de bandas (4 y 5) presentan fenotipo XDR (tabla 25 en Anexos).

9. Conclusiones

1. Las cepas de *E. coli* aisladas de varones con ITU pertenecen a 6 grupos filogenéticos y el predominante es el B2 (60%).
2. Los genes de virulencia más prevalentes son *fimH* e *iucD* (92% y 88%, respectivamente).
3. Los perfiles de PAIs más frecuentes son: PAI I_{CFT073} + PAI II_{CFT073} (33%) y PAI I_{CFT073}+ PAI II_{CFT073} + PAI II_{J96} (30%).
4. Los factores de virulencia y las PAIs se asocian tal como se describe en la literatura el contenido genético de cada PAI.
5. Hay 22 virotipos y perfiles PAI diferentes y uno común en los aislados.
6. El puntaje de virulencia medio del cepario es de 6, con un rango de 1 a 10.
7. *E. coli* aislada de varones presenta un mayor porcentaje de resistencia a Quinolonas y β -lactámicos y una mayor sensibilidad a fosfomicina.
8. Las cepas de *E. coli* aisladas de varones presentan perfiles de resistencia muy variados.
9. La mayoría de las cepas son MDR.
10. La media de los puntajes de resistencia es de 10 (rango:6-13).
11. Un tercio del cepario posee el fenotipo de BLEE⁺.
12. El gen de BLEE más prevalente en el cepario es *bla*_{CTX-M} (80%).
13. Dos aislados BLEE⁺ comparten un mismo perfil de sustrato (CRO, FEP, ATM, CTX) y de perfil genes *bla* (*bla*_{CTX-M}).
14. La mayoría de los aislados BLEE⁻ tienen el gen *bla*_{CTX-M}
15. La habilidad de formar biopelícula varía considerablemente (rango D.O. (595nm): 0.3-2.4).
16. La media de biomasa de biopelícula formada en el cepario es de 0.8±0.45
17. El 96% de las cepas son productoras de biopelícula.
18. La mayoría de las cepas productoras de biopelícula son productoras débiles, seguidas de las productoras moderadas de biopelícula (63% vs 30%; $p<0.05$) y una es formadora fuerte (4%).
19. Los aislados con bandas plasmídicas tuvieron en promedio 2 bandas (rango:1 a 5 bandas) y en la mayoría presentó de 1 a 3 bandas plasmídicas.

20. Las bandas con pesos de 1 Kb y de >10 Kb fueron las más frecuentes.
21. Los aislados del filogrupo B2 son los más virulentos ($p<0.05$).
22. Los genes *pap*, *iha* y las PAIs I y II de CFT073 se asocian con aislados del filogrupo B2 ($p<0.05$).
23. La resistencia a gentamicina esta asociada a los aislados del filogrupo B2 con respecto a los del C ($p<0.05$).
24. La frecuencia del gen *fimH* es significativamente mayor en las cepas resistentes a ceftriaxona, cefepime y aztreonam en comparación con las cepas sensibles ($p<0.05$).
25. El gen *papGII* se asocia con la resistencia a cefotaxima y cefepime ($p<0.05$).
26. El gen *traT* se asocia con la resistencia a tetraciclina ($p<0.05$).
27. La PAI ICFT073 se asoció con la resistencia a gentamicina y cefepime y la PAI IICFT073 solo se asocia con cefepime ($p<0.05$).
28. La producción débil de biopelícula es significativamente mayor en los aislados del filogrupo B2 con respecto al C ($p<0.05$).
29. El puntaje de virulencia y la biomasa de biopelícula formada del cepario muestran una correlación lineal negativa (Spearman $\rho = -0.41$; $p<0.05$).
30. Los aislados *fimH*+, *iucD*+, y PAI IICFT073+ se asocian con una menor formación de biomasa de biopelícula (U de Mann-Whitney, $p<0.05$).
31. El puntaje de resistencia y la biomasa de biopelícula del cepario muestra una correlación lineal negativa (Spearman $\rho = -0.45$; $p<0.05$).
32. Los aislados sensibles a Amikacina se asocian con una biomasa de biopelícula mayor con respecto a los resistentes (U de Mann-Whitney, $p<0.05$).
33. Las cepas *bla*_{OXA-1}⁺ tienen una formación de biomasa de biopelícula significativamente mayor con respecto a las *bla*_{OXA-1}⁻ (prueba t de Student, $p<0.05$).

10. Perspectivas futuras

1. Diseñar oligos para amplificar el gen *flu* (Ag43) e incorporarlo a una PCR múltiplex con *fliC* (flagelina) y *csgA* (fimbria curli), ya que estos están asociados a la formación de biopelícula.
2. Amplificar el gen *usp* (proteína específica uropatogénica).
3. Aumentar el número de muestras provenientes de varones, de hospitales regionales con registro de tiempo de recolección e información clínica de los pacientes.
4. Ensayos de conjugación para detectar transferencia horizontal de PAIs y genes de resistencia y virulencia codificados en plásmidos.
5. Realizar campos pulsados e identificar genes de resistencia en las cepas con bandas plasmídicas.
6. Búsqueda de ST131 en cepas del filogrupo B2.
7. Búsqueda de genes de resistencia a quinolonas.
8. Estudios fenotípicos para evaluar la virulencia *in vitro*.
9. Buscar las variantes del gen *bla_{CTX-M}* y otros genes *bla* de interés mediante secuenciación.

11. Bibliografía

- Agarwal, J., Mishra, B., Srivastava, S., & Srivastava, R. (2013). Genotypic characteristics and biofilm formation among *Escherichia coli* isolates from Indian women with acute cystitis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 107(3), 183–187. <https://doi.org/10.1093/trstmh/trs090>
- Andriole, V. T. (1991). Use of quinolones in treatment of prostatitis and lower urinary tract infections. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 10(4), 342–350. <https://doi.org/10.1007/bf01967009>
- Bowden, G. H., & Li, Y. H. (1997). Nutritional influences on biofilm development. *Advances in Dental Research*, 11(1), 81–99. <https://doi.org/10.1177/08959374970110012101>
- Brusch, J. (2018). Urinary Tract Infection (UTI) in Males: Practice Essentials, Background, Anatomy. Retrieved December 17, 2019, from <https://emedicine.medscape.com/article/231574-overview#a6>
- Buckles, E. L., Luterbach, C. L., Wang, X., Lockatell, C. V., Johnson, D. E., Mobley, H. L. T., & Donnenberg, M. S. (2015). Signature-tagged mutagenesis and co-infection studies demonstrate the importance of P fimbriae in a murine model of urinary tract infection. *Pathogens and Disease*, 73(4). <https://doi.org/10.1093/femspd/ftv014>
- Calhau, V., Domingues, S., Ribeiro, G., Mendonça, N., & Da Silva, G. J. (2015). Interplay between pathogenicity island carriage, resistance profile and plasmid acquisition in uropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Medical Microbiology*, 64(8), 828–835. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000104>
- Candel, F. J., & Cantón, R. (2018). Uso actual de la fosfomicina: del laboratorio a la práctica clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 37(1), 1–3. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2018.10.002>
- Clermont, O., Christenson, J. K., Denamur, E., & Gordon, D. M. (2013). The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: Improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environmental Microbiology Reports*, 5(1), 58–65. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12019>
- Clermont, O., Gordon, D. M., Brisse, S., Walk, S. T., & Denamur, E. (2011). Characterization of the cryptic *Escherichia* lineages: rapid identification and prevalence. *Environmental Microbiology*, 13(9), 2468–2477. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02519.x>
- Cortés, M. E., Consuegra Bonilla, J., Ruben, J., & Sinisterra, D. (2011). *Biofilm formation, control and novel strategies for eradication*.
- Coull, N., Mastoroudes, H., Popert, R., & O'Brien, T. S. (2008). Redefining urological history taking - anal intercourse as the cause of unexplained symptoms in heterosexuals. *Annals of the Royal College of Surgeons of England*, 90(5), 403–405. <https://doi.org/10.1308/003588408X301000>
- Croxen, M. A., & Finlay, B. B. (2010, January). Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology*, Vol. 8, pp. 26–38. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2265>
- Dadi, B. R., Abebe, T., Zhang, L., Mihret, A., Abebe, W., & Amogne, W. (2018). Drug resistance and plasmid profile of uropathogenic *Escherichia coli* among urinary tract infection patients in Addis Ababa. *Journal of Infection in Developing Countries*, 12(8), 608–615. <https://doi.org/10.3855/JIDC.9916>
- Davis, N. G., & Silberman, M. (2019). Bacterial Acute Prostatitis. In *StatPearls*. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29083799>
- de Souza da-Silva, A. P., de Sousa, V. S., Martins, N., da Silva Dias, R. C., Bonelli, R. R., Riley, L. W., & Moreira, B. M. (2017). *Escherichia coli* sequence type 73 as a cause of community acquired urinary tract infection in men and women in Rio de Janeiro, Brazil. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 88(1), 69–74. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2017.01.024>
- Devaraj, A., Justice, S. S., Bakaletz, L. O., & Goodman, S. D. (2015). *DNABII proteins play a central role in UPEC biofilm structure*. <https://doi.org/10.1111/mmi.12994>
- Donnenberg, M. S. (2013). *Escherichia coli: Pathotypes and Principles of Pathogenesis: Second Edition*. In *Escherichia coli: Pathotypes and Principles of Pathogenesis: Second Edition*. <https://doi.org/10.1016/C2011-0-07692-5>
- Escobar-Páramo, P., Clermont, O., Blanc-Potard, A. B., Bui, H., Le Bouguénec, C., & Denamur, E. (2004). A specific genetic background is required for acquisition and expression of virulence factors in *Escherichia coli*. *Molecular Biology and Evolution*, 21(6), 1085–1094. <https://doi.org/10.1093/molbev/msh118>

- Farshad, S., Ranjbar, R., Japoni, A., Hosseini, M., Anvarinejad, M., & Mohammadzadegan, R. (2012). Microbial Susceptibility, Virulence Factors, and Plasmid Profiles of Uropathogenic *Escherichia coli* Strains Isolated from Children in Jahrom, Iran. *Archives of Iranian Medicine*, 15(5), 312–316.
- Fattahi, S., Kafil, H. S., Nahai, M. S., Asgharzadeh, M., Aghazadeh, M., & Nori, R. (2015). Relationship of biofilm formation and different virulence genes in uropathogenic *Escherichia coli* isolates from Northwest Iran Zusammenhang zwischen Biofilmbildung und unterschiedlichen. In *GMS Hygiene and Infection Control* (Vol. 10).
- Flores-Mireles, A. L., Walker, J. N., Caparon, M., & Hultgren, S. J. (2015a). Urinary tract infections: Epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nature Reviews Microbiology*, 13(5), 269–284. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3432>
- Flores-Mireles, A. L., Walker, J. N., Caparon, M., & Hultgren, S. J. (2015b). 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. (2003). Epidemiology of urinary tract infections: Incidence, morbidity, and economic costs. *Disease-a-Month*, 49(2), 53–70. <https://doi.org/10.1067/MDA.2003.7>
- Foxman, B. (2010, December). The epidemiology of urinary tract infection. *Nature Reviews Urology*, Vol. 7, pp. 653–660. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2010.190>
- Garau, M., Latorre, A., & Alonso-Sanz, M. (2001). Fosfomicina: Un antibiótico infravalorado en infecciones urinarias por *Escherichia coli*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 19(10), 462–466. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(01\)72702-4](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(01)72702-4)
- Garcia, E. C., Brumbaugh, A. R., & Mobley, H. L. T. (2011). Redundancy and specificity of *Escherichia coli* iron acquisition systems during urinary tract infection. *Infection and Immunity*, 79(3), 1225–1235. <https://doi.org/10.1128/IAI.01222-10>
- Garza-González, E., Morfín-Otero, R., Mendoza-Olazarán, S., Bocanegra-Ibarias, P., Flores-Treviño, S., Rodríguez-Noriega, E., ... Camacho-Ortiz, A. (2019). A snapshot of antimicrobial resistance in Mexico. Results from 47 centers from 20 states during a six-month period. *PLoS ONE*, 14(3), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209865>
- Hacker, J., & Carniel, E. (2013). Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity: A Darwinian view of the evolution of microbes. *EMBO Reports*, 2(5), 376–381. <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kve097>
- Hadjifrangiskou, M., Gu, A. P., Pinkner, J. S., Kostakioti, M., Zhang, E. W., Greene, S. E., & Hultgren, S. J. (2012). Transposon mutagenesis identifies uropathogenic *Escherichia coli* biofilm factors. *Journal of Bacteriology*, 194(22), 6195–6205. <https://doi.org/10.1128/JB.01012-12>
- Harper, M., & Fowles, G. (2007). 3. Management of urinary tract infections in men. *Trends in Urology, Gynaecology & Sexual Health*, 12(1), 30–35. <https://doi.org/10.1002/tre.8>
- Jahandeh, N., Ranjbar, R., Behzadi, P., & Behzadi, E. (2015). Uropathogenic *Escherichia coli* virulence genes: Invaluable approaches for designing dna microarray probes. *Central European Journal of Urology*, Vol. 68, pp. 452–458. <https://doi.org/10.5173/cej.2015.625>
- Johnson, J. R., Clermont, O., Menard, M., Kuskowski, M. A., Picard, B., & Denamur, E. (2006). Experimental Mouse Lethality of *Escherichia coli* Isolates, in Relation to Accessory Traits, Phylogenetic Group, and Ecological Source. In *Bacterial Traits and Source • JID*.
- Johnson, J. R., & Stell, A. L. (2000). Extended Virulence Genotypes of *Escherichia coli* Strains from Patients with Urosepsis in Relation to Phylogeny and Host Compromise. *The Journal of Infectious Diseases*, 181(1), 261–272. <https://doi.org/10.1086/315217>
- Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. T. (2004, February). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, Vol. 2, pp. 123–140. <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>
- Karaiskos, I., Galani, L., Sakka, V., Gkoufa, A., Sopilidis, O., Chalikopoulos, D., ... Giamarellou, E. (2019). Oral fosfomicin for the treatment of chronic bacterial prostatitis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 74(5), 1430–1437. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz015>
- Kaylen O'Rourke and Peter A. Cadieux. (2019). The Role of Bacteria in Urology. In *The Role of Bacteria in Urology*. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-17542-9>
- Krieger, J. N., Dobrindt, U., Riley, D. E., & Oswald, E. (2011). Acute *Escherichia coli* prostatitis in previously healthy young men: Bacterial virulence factors, antimicrobial resistance, and clinical outcomes. *Urology*, 77(6), 1420–1425. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2010.12.059>

- Kudinha, T., Johnson, J. R., Andrew, S. D., Kong, F., Anderson, P., & Gilbert, G. L. (2013). *Escherichia coli* Sequence Type 131 as a Prominent Cause of Antibiotic Resistance among Urinary *Escherichia coli* Isolates from Reproductive-. 51(10), 3270–3276. <https://doi.org/10.1128/JCM.01315-13>
- Lane, M. C., Alteri, C. J., Smith, S. N., & Mobley, H. L. T. (2007). Expression of flagella is coincident with uropathogenic *Escherichia coli* ascension to the upper urinary tract. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(42), 16669–16674. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607898104>
- Le Gall, T., Clermont, O., Gouriou, S., Picard, B., Nassif, X., Denamur, E., & Tenaillon, O. (2007). Extraintestinal virulence is a coincidental by-product of commensalism in b2 phylogenetic group *Escherichia coli* strains. *Molecular Biology and Evolution*, 24(11), 2373–2384. <https://doi.org/10.1093/molbev/msm172>
- Leimbach, A., Hacker, J., & Dobrindt, U. (2013). *E. coli* as an all-rounder: The thin line between commensalism and pathogenicity. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 358, 3–32. https://doi.org/10.1007/82_2012_303
- Lezameta, L., Gonz  les-Escalante, E., & Tamariz, J. H. (2010). Comparison of four phenotypic methods to detect extended-spectrum betalactamases. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 27(3), 345–351. <https://doi.org/10.1590/S1726-46342010000300006>
- Li, L., Zhou, R., Li, T., Kang, M., Wan, Y., Xu, Z., & Chen, H. (2008). Enhanced biofilm formation and reduced virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* luxS mutant. *Microbial Pathogenesis*, 45(3), 192–200. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2008.05.008>
- Lipsky, B. A. (1989). Urinary Tract Infections in Men: Epidemiology, Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment. *Annals of Internal Medicine*, 110(2), 138–150. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-110-2-138>
- Lloyd, A. L., Rasko, D. A., & Mobley, H. L. T. (2007). Defining genomic islands and uropathogen-specific genes in uropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 189(9), 3532–3546. <https://doi.org/10.1128/JB.01744-06>
- Longhi, C., Comanducci, A., Riccioli, A., Ziparo, E., Marazzato, M., Aleandri, M., ... Conte, M. P. (2016). Features of uropathogenic *Escherichia coli* able to invade a prostate cell line. *The New Microbiologica*, 39(2), 146–149. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27196555>
- López-Montesinos, I., & Horcajada, J. P. (2019, May 1). Oral and intravenous fosfomycin in complicated urinary tract infections. *Revista Espanola de Quimioterapia: Publicacion Oficial de La Sociedad Espanola de Quimioterapia*, Vol. 32, pp. 37–44. NLM (Medline).
- Lukjancenko, O., Wassenaar, T. M., & Ussery, D. W. (2010, November). Comparison of 61 Sequenced *Escherichia coli* Genomes. *Microbial Ecology*, Vol. 60, pp. 708–720. <https://doi.org/10.1007/s00248-010-9717-3>
- Lüthje, P., & Brauner, A. (2014). Virulence Factors of Uropathogenic *E. coli* and Their Interaction with the Host. *Advances in Microbial Physiology*, 65, 337–372. <https://doi.org/10.1016/bs.ampbs.2014.08.006>
- Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., ... Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(3), 268–281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
- Mazzoli, S. (2015). Biofilm. In *Encyclopedia of Inflammatory Diseases* (pp. 1–16). https://doi.org/10.1007/978-3-0348-0620-6_82-1
- Messerer, M., Fischer, W., & Ren Schubert, S. (2017). Investigation of horizontal gene transfer of pathogenicity islands in *Escherichia coli* using next-generation sequencing. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179880>
- Miranda-Estrada, L. I., Ruíz-Rosas, M., Molina-López, J., Parra-Rojas, I., González-Villalobos, E., & Castro-Alarcón, N. (2017). Relación entre factores de virulencia, resistencia a antibióticos y los grupos filogenéticos de *Escherichia coli* uropatógena en dos localidades de México. *Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clinica*, 35(7), 426–433. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2016.02.021>
- Miryala, S., Makala, H., Yadavali, S. P., Venkatasubramanian, U., Subbaiah, N., & Srinandan, C. S. (2020). Disperse red 15 (DR15) impedes biofilm formation of uropathogenic *Escherichia coli*. *Microbial Pathogenesis*, 138. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103772>
- Naas, T.; Oueslati, S.; Bonnin, R. A.; Dabos, M. L.; Zavala, A.; Dortet, L.; Retailleau, P.; Iorga, B. I. (n.d.). Beta-Lactamase DataBase (BLDB): Structure and Function. Retrieved February 21, 2020, from <http://bldb.eu/alignment.php?align=A:class>

- 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 Microbiologica*, 63(3), 335–343. <https://doi.org/10.1007/s12223-017-0570-3>
- Nichols, K. B., Totsika, M., Moriel, D. G., Lo, A. W., Yang, J., Wurfel, D. J., ... Schembri, M. A. (2016). Molecular characterization of the vacuolating autotransporter toxin in uropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 198(10), 1487–1498. <https://doi.org/10.1128/JB.00791-15>
- NICKEL, J. C., OLSON, M. E., BARABAS, A., BENEDIKTSSON, H., DASGUPTA, M. K., & COSTERTON, J. W. (1990). Pathogenesis of Chronic Bacterial Prostatitis in an Animal Model. *British Journal of Urology*, 66(1), 47–54. <https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.1990.tb14864.x>
- Noie Oskouie, A., Hasani, A., Ahangarzadeh Rezaee, M., Soroush Bar Haghi, M. H., Hasani, A., & Soltani, E. (2019). A Relationship between O-Serotype, Antibiotic Susceptibility and Biofilm Formation in Uropathogenic *Escherichia coli*. *Microbial Drug Resistance*, 25(6), 951–958. <https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0330>
- O'Toole, G. A. (2011). Microtiter Dish Biofilm Formation Assay. *Journal of Visualized Experiments*, (47), 10–11. <https://doi.org/10.3791/2437>
- Ochman, H., & Selander, R. K. (1984). Standard Reference Strains of *Escherichia coli* from Natural Populations. In *JOURNAL OF BACTERIOLOGY* (Vol. 157).
- OECD. (2016). *Bacteria: Pathogenicity factors*.
- Oelschlaeger, T. A., Dobrindt, U., & Hacker, J. (2002). Pathogenicity islands of uropathogenic *E. coli* and the evolution of virulence. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 19(6), 517–521. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(02\)00092-4](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(02)00092-4)
- Olson, P. D., Hruska, K. A., & Hunstad, D. A. (2016). Androgens enhance male urinary tract infection severity in a new model. *Journal of the American Society of Nephrology*, 27(6), 1625–1634. <https://doi.org/10.1681/ASN.2015030327>
- Olson, P. D., & Hunstad, D. (n.d.). *Sex and other host factors influencing urinary tract infection pathogenesis*. 1–10.
- Östblom, A., Adlerberth, I., Wold, A. E., & Nowrouzian, F. L. (2011). Pathogenicity island markers, virulence determinants *malX* and *usp*, and the capacity of *Escherichia coli* to persist in infants' commensal microbiotas. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(7), 2303–2308. <https://doi.org/10.1128/AEM.02405-10>
- Paniagua-Contreras, G. L., Monroy-Pérez, E., Bautista, A., Reyes, R., Vicente, A., Vaca-Paniagua, F., ... Vaca, S. (2018). Multiple antibiotic resistances and virulence markers of uropathogenic *Escherichia coli* from Mexico. *Pathogens and Global Health*, 112(8), 415–420. <https://doi.org/10.1080/20477724.2018.1547542>
- Pérez Ama, A. (2018). *ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES DE VIRULENCIA EN CEPAS DE Escherichia coli UROPATÓGENA*.
- Picard, B., Garcia, J. S., Gouriou, S., Duriez, P., Brahimi, N., Bingen, E., ... Denamur, E. (1999). The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection? *Infection and Immunity*, 67(2), 546–553.
- Pompilio, A., Crocetta, V., Savini, V., Petrelli, D., Nicola, M. Di, Bucco, S., ... Bonaventura, G. Di. (2018). Phylogenetic relationships, biofilm formation, motility, antibiotic resistance and extended virulence genotypes among *Escherichia coli* strains from women with community-onset primitive acute pyelonephritis. *PLoS ONE*, 13(5), 1–26. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196260>
- Poursina, Sepehrpour, S., Sina, & Mobasherizadeh. (2019). Biofilm Formation in Nonmultidrug-resistant *Escherichia coli* Isolated from Patients with Urinary Tract Infection in Isfahan, Iran. *Advanced Biomedical Research*, 1–13. <https://doi.org/10.4103/abr.abr>
- Prakapaite, R., Saab, F., Planciuniene, R., Petraitis, V., Walsh, T. J., Petraitiene, R., ... Kavaliauskas, P. (2019). Molecular characterization of uropathogenic *Escherichia coli* reveals emergence of drug resistant o15, o22 and o25 serogroups. *Medicina (Lithuania)*, 55(11). <https://doi.org/10.3390/medicina55110733>
- Ramírez-Castillo, F. Y., Moreno-Flores, A. C., Avelar-González, F. J., Márquez-Díaz, F., Harel, J., & Guerrero-Barrera, A. L. (2018). An evaluation of multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates in urinary tract infections from Aguascalientes, Mexico: Cross-sectional study. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 17(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12941-018-0286-5>
- Russo, T. A., & Johnson, J. R. (2002). Proposal for a New Inclusive Designation for Extraintestinal

- Pathogenic Isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *The Journal of Infectious Diseases*, 181(5), 1753–1754. <https://doi.org/10.1086/315418>
- Sabate, M., Moreno, T., Perez, T., Andreu, A., & Prats, G. (2006). Pathogenicity island markers in commensal and uropathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 12(9), 880–886. <https://doi.org/10.1007/s12223-015-0433-8>
- Schaeffer, A. J., & Nicolle, L. E. (2016). Urinary Tract Infections in Older Men. *New England Journal of Medicine*, 374(6), 562–571. <https://doi.org/10.1056/NEJMcp1503950>
- Schaeffer, E. M. (2016). Re: Urinary Tract Infections in Older Men. *The Journal of Urology*, 196(2), 442–443. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2016.05.023>
- Scharff, A. Z., Rousseau, M., Mariano, L. L., Canton, T., Consiglio, C. R., Albert, M. L., ... Ingersoll, M. A. (2019). Sex differences in IL-17 contribute to chronicity in male versus female urinary tract infection. *JCI Insight*, 4(13). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.122998>
- Seminario, J. L., Aggarwal, G., & Sweetser, S. (2011). 26-year-old man with recurrent urinary tract infections. *Mayo Clinic Proceedings*, 86(6), 557–560. <https://doi.org/10.4065/mcp.2010.0600>
- Smelov, V., Naber, K., & Bjerklund Johansen, T. E. (2016). Improved Classification of Urinary Tract Infection: Future Considerations. *European Urology, Supplements*, 15(4), 71–80. <https://doi.org/10.1016/j.eursup.2016.04.002>
- Soto, S. M., Smithson, A., Martinez, J. A., Horcajada, J. P., Mensa, J., & Vila, J. (2007). Biofilm Formation in Uropathogenic *Escherichia coli* Strains: Relationship With Prostatitis, Urovirulence Factors and Antimicrobial Resistance. *Journal of Urology*, 177(1), 365–368. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2006.08.081>
- Sotomayor de Zavaleta, M., Ponce de León Garduño, A., Guzmán Esquivel, J., Rosas Nava, E., Rodríguez Covarrubias, F., González Ramírez, A., ... Escobar del Barco, L. (2015). Recomendaciones de expertos mexicanos en el tratamiento de las infecciones del tracto urinario en pacientes adultos, embarazadas y niños. *Revista Mexicana de Urología*, 72(2), 1–46.
- SRDJAN Stepanovic, DRAGANA VUKOVIC, E. H., & GIOVANNI DI BONAVENTURA, SLOBODANKA DJUKIC, IVANA C' IRKOVIC and RUZICKA2, F. (2009). Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci SRDJAN. *Apmis*, 115(3), 231–241. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm>
- Staji, H., Rassouli, M., & Jourablou, S. (2019). Comparative virulotyping and phylogenomics of *Escherichia coli* isolates from urine samples of men and women suffering urinary tract infections. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 22(2), 211–214. <https://doi.org/10.22038/ijbms.2018.28360.6880>
- Subashchandrabose, S., & Mobley, H. L. T. (2015a). Virulence and Fitness Determinants of Uropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology Spectrum*, 3(4), 1–20. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.uti-0015-2012>
- Subashchandrabose, S., & Mobley, H. L. T. (2015b). Virulence and Fitness Determinants of Uropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology Spectrum*, 3(4). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.uti-0015-2012>
- Sugumar, M., Kumar, K. M., Manoharan, A., Anbarasu, A., & Ramaiah, S. (2014). Detection of OXA-1 β -lactamase gene of *Klebsiella pneumoniae* from blood stream infections (BSI) by conventional PCR and in-silico analysis to understand the mechanism of OXA mediated resistance. *PLoS ONE*, 9(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091800>
- SUIVE/DGE/Secretaría de Salud/Estados Unidos Mexicanos. (2018a). *Distribución de casos nuevos de enfermedad por grupos de edad. Estados Unidos Mexicanos 2018. Población masculina.*
- SUIVE/DGE/Secretaría de Salud/Estados Unidos Mexicanos. (2018b). *Veinte principales causas de enfermedad en Puebla, por grupos de edad Estados Unidos Mexicanos 2018. Población Masculina.* 1–1.
- SUIVE/DGE/Secretaría de Salud/Estados Unidos Mexicanos. (2018c). *Veinte principales causas de enfermedad Nacional, por grupos de edad Estados Unidos Mexicanos 2018. Población Masculina.* 1–1.
- Sukupolvi, S., & O'Connor, C. D. (1990). TraT lipoprotein, a plasmid-specified mediator of interactions between gram-negative bacteria and their environment. *Microbiological Reviews*, Vol. 54, p. 331. <https://doi.org/10.1128/mmbr.54.4.331-341.1990>
- Theodorou, C., & Becopoulos, T. (2000). *Prostatitis*. (November 1999), 234–240.
- Urology, E. A. of. (2018). *Urological Infections EAU Guidelines on.*

- Vila, J., Sáez-López, E., Johnson, J. R., Römling, U., Dobrindt, U., Cantón, R., ... Soto, S. M. (2016). *Escherichia coli*: An old friend with new tidings. *FEMS Microbiology Reviews*, 40(4), 437–463. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuw005>
- Villalobos-Ayala, J. L., Castillo, B., & Licea-Serrato, J. D. (2017). Urinary tract infection etiology and antimicrobial sensitivity in a Mexican hospital from 2010 to 2015. *Revista Mexicana de Urologia*, 77(2), 97–105. <https://doi.org/10.24245/revmexurol.v77i2.1057>
- Walk, S. T., Alm, E. W., Gordon, D. M., Ram, J. L., Toranzos, G. A., Tiedje, J. M., & Whittam, T. S. (2009). Cryptic lineages of the genus *Escherichia*. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(20), 6534–6544. <https://doi.org/10.1128/AEM.01262-09>
- Wang, Y., Zhang, W., Wu, Z., & Lu, C. (2011). Reduced virulence is an important characteristic of biofilm infection of *Streptococcus suis*. *FEMS Microbiology Letters*, 316(1), 36–43. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.02189.x>
- Webb, S. A., & Kahler, C. M. (2008). Bench-to-bedside review: Bacterial virulence and subversion of host defences. *Critical Care*, 12(6), 234. <https://doi.org/10.1186/cc7091>
- Wilson, A. P. R., Tovey, S. J., Adler, M. W., & Gruneberg, R. N. (1986). Prevalence of urinary tract infection in homosexual and heterosexual men. *Genitourinary Medicine*, 62(3), 189–190. <https://doi.org/10.1136/sti.62.3.189>
- Zenati, F., Barguigua, A., Nayme, K., Benbelaïd, F., Khadir, A., Bellahsene, C., ... Timinouni, M. (2019). Characterization of uropathogenic ESBL-producing *Escherichia coli* isolated from hospitalized patients in western Algeria. *Journal of Infection in Developing Countries*, 13(4), 291–302. <https://doi.org/10.3855/jidc.10702>

12. Anexos

Tabla 23. Presencia de bandas plasmídicas y sus pesos por filogrupo.

	No. (%) cepas con bandas							valor p		
	A (n=2)	B2 (n=14)	C (n=4)	D (n=1)	E (n=1)	CI (n=1)	CI_CII (n=1)	B2 vs A	B2 vs C	A vs C
bandas plasmídicas por filogrupo	1 (50.0)	8 (60.0)	2 (50.0)	1 (100.0)	0	1 (100.0)	0	NS	NS	NS
>10 Kb	0	3 (37.5)	2 (100.0)	1 (100.0)	0	1 (100.0)	0	NS	NS	NS
9.1-10 Kb	0	0	1(50.0)	0	0	0	0	NS	NS	NS
8.1-9 Kb	0	1 (12.5)	1(50.0)	1 (100.0)	0	0	0	NS	NS	NS
7.1-8 Kb	0	1 (12.5)	0	0	0	0	0	NS	NS	NS
6.1-7 Kb	0	2 (25.0)	1(50.0)	0	0	0	0	NS	NS	NS
5.1-6 Kb	0	1 (12.5)	1(50.0)	0	0	1 (100.0)	0	NS	NS	NS
4.1-5 Kb	1 (100.0)	0	2 (100.0)	1 (100.0)	0	0	0	NS	p<0.05	NS
3.1-4 Kb	0	2 (25.0)	0	0	0	0	0	NS	NS	NS
2.1-3 Kb	0	1 (12.5)	1(50.0)	1 (100.0)	0	0	0	NS	NS	NS
1-2 Kb	0	5 (62.5)	0	1 (100.0)	0	0	0	NS	NS	NS

P<0.05, Prueba de Fisher.

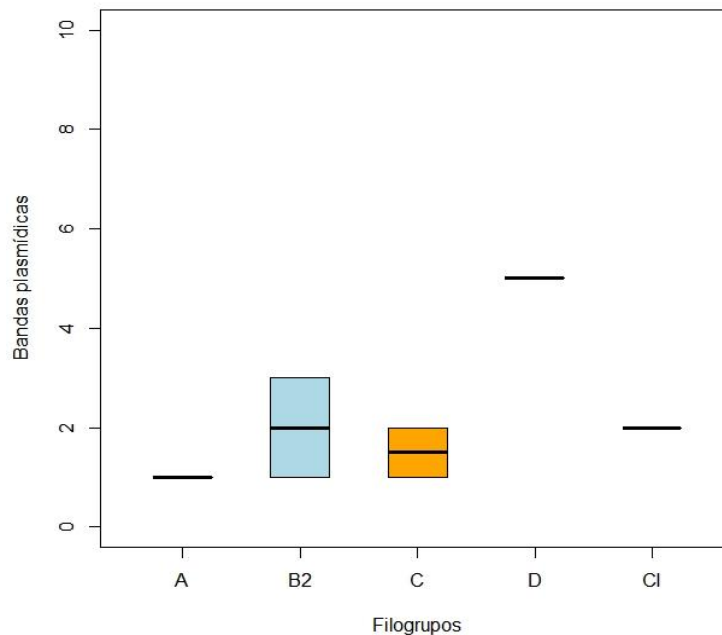


Figura 35. Número de bandas plasmídicas en cada filogrupo de *E. coli* aislada de varones con ITU (n=24).

Los resultados están mostrados en diagramas de cajas y alambres, mostrando la mediana con rangos intercuartiles.

*p<0.05, prueba U de Mann-Whitney.

Tabla 24. Distribución de rasgos de resistencia en cepas con bandas y sin bandas plasmídicas.

Antibiótico o algún otro rasgo	% de resistencia cepario (n=24)	(%) cepas		valor <i>p</i>
		con plasmídicas (n=14)	sin bandas plasmídicas (n=10)	
Amikacina	50%	43%	60%	NS
Gentamicina	75%	64%	90%	NS
Netilmicina	25%	22%	30%	NS
Ampicilina	100%	100%	100%	NS
Cefalotina	100%	100%	100%	NS
Cefuroxima	96%	93%	100%	NS
Ceftazidima	83%	70%	100%	NS
Cefotaxima	88%	78%	100%	NS
Ceftriaxona	100%	100%	100%	NS
Cefepime	80%	70%	90%	NS
Aztreonam	83%	70%	100%	NS
Ertapenem	63%	50%	80%	NS
Amoxicilina/ac. Clavulánico	92%	86%	100%	NS
Ac. Nalidíxico	100%	100%	100%	NS
Ciprofloxacina	100%	100%	100%	NS
Ofloxacina	100%	100%	100%	NS
Norfloxacina	100%	100%	100%	NS
Levofloxacina	100%	100%	100%	NS
Nitrofurantoína	20%	20%	20%	NS
Fosfomicina	40%	7%	0%	NS
Trimetoprim sulfa	80%	80%	80%	NS
Cloranfenicol	33%	36%	30%	NS
Colistina	30%	30%	30%	NS
Tetraciclina	83%	70%	100%	NS
Rasgo de resistencia	TOTAL (n=24)	con bandas (n=14)	sin bandas (n=10)	valor <i>p</i>
MDR	70%	80%	60%	NS
XDR	30%	20%	40%	NS
BLEE+	33%	30%	40%	NS
Genes de resistencia	TOTAL (n=24)	con bandas (n=14)	sin bandas (n=10)	valor <i>p</i>
<i>bla</i> _{SHV}	0%	0%	0%	NS
<i>bla</i> _{TEM}	4%	0%	10%	NS
<i>bla</i> _{CTX-M}	80%	70%	90%	NS
<i>bla</i> _{OXA-1}	30%	30%	30%	NS

p<0.05, Prueba de Fisher.

Tabla 25. Bandas plasmídicas, puntaje de resistencia y fenotipo global de resistencia de las cepas de *E. coli* aisladas de ITU.

CEPA	BP	PR	FENOTIPO GLOBAL DE RESISTENCIA
102-I	3	7	MDR (6 GRUPOS)
103-I	1	6	MDR (6 GRUPOS)
110-I	3	9	MDR (9 GRUPOS)
118-I	3	10	MDR (10 GRUPOS)
125-I	1	8	MDR (7 GRUPOS)
126-I	3	9	MDR (8 GRUPOS)
128-I	2	11	XDR (11 GRUPOS)
130-I	2	9	MDR (9 GRUPOS)
132-I	1	8	MDR (8 GRUPOS)
144-I	2	9	MDR (9 GRUPOS)
154-I	5	13	XDR (13 GRUPOS)
159-I	1	10	MDR (10 GRUPOS)
173-I	2	11	MDR (10 GRUPOS)
174-I	4	13	XDR (12 GRUPOS)

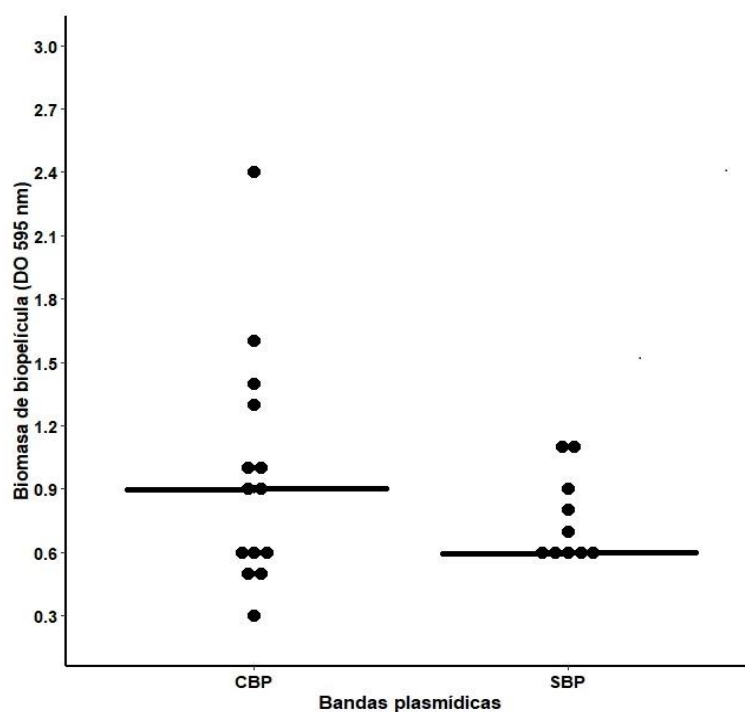


Figura 36. Formación de biopelícula de cepas de *E. coli* aisladas de varones con ITU ($n=24$) acorde con presencia y ausencia de bandas plasmídicas.

Cada punto es el promedio de 3 experimentos independientes con 3 replicados por cepa en cada experimento ($n=9$). Las barras horizontales son las medianas. CBP=Con bandas plasmídicas, SBP=Sin bandas plasmídicas. $p<0.05$, prueba U de Mann-Whitney.

Tabla 26. Distribución de las categorías de formación de biopelícula en cepas con bandas y sin bandas plasmídicas.

CATEGORIA DE FORMACIÓN DE BIOPELÍCULA	No. de cepas (%)		valor p
	Con Bandas (n=14)	Sin Bandas (n=10)	
Productora Fuerte	1(7.0)	0(0)	NS
Productora Moderada	5(36.0)	2(20.0)	NS
Productora débil	7(50.0)	8(80.0)	NS
No productora	1(7.0)	0(0)	NS

$p < 0.05$, Prueba de Fisher.

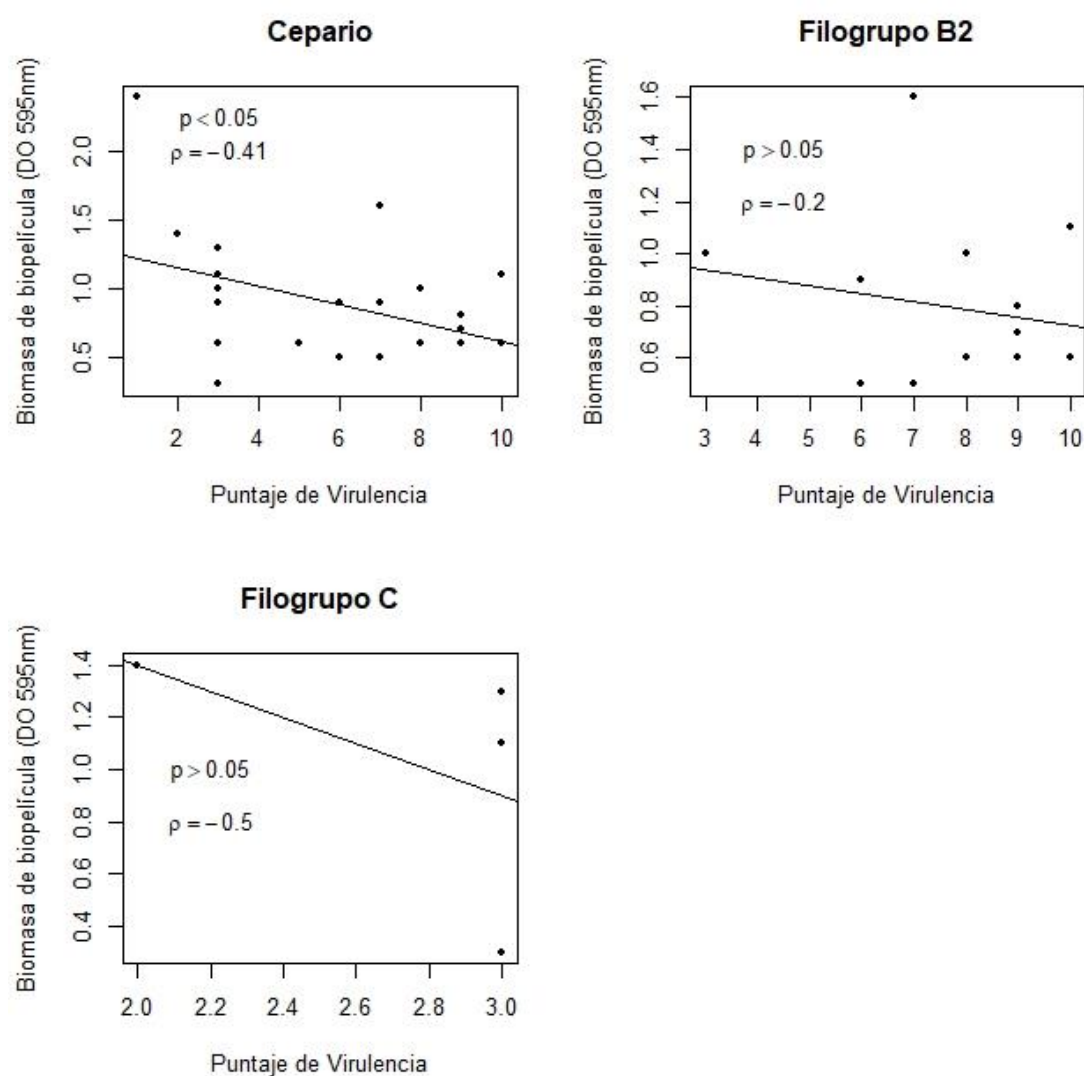


Figura 37. Correlación entre el puntaje de virulencia y la biomasa de biopelícula D.O. (595nm) del cepario y filogrupos B2 y C de las cepas de *E. coli* aisladas de varones con ITU ($n=24$).

No se encontró una correlación lineal significativa (Spearman, $p < 0.05$).

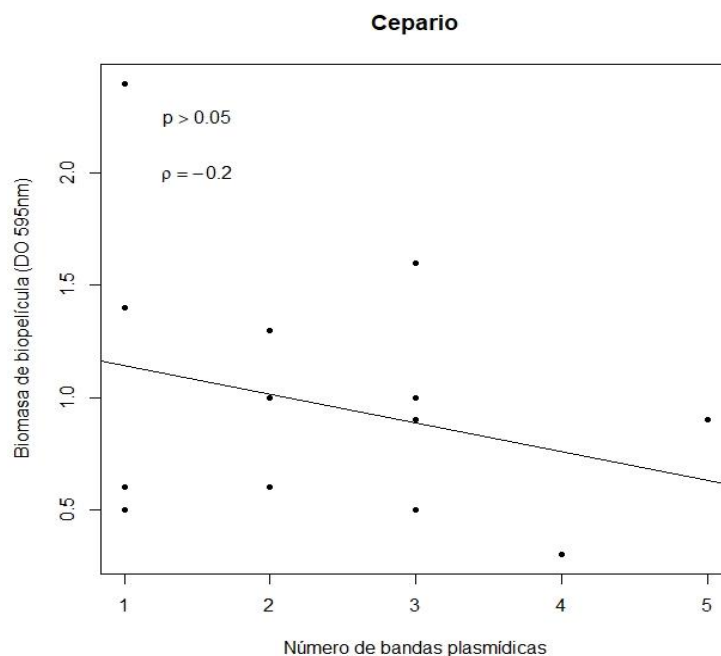


Figura 38. Correlación entre el puntaje de resistencia y la biomasa de biopelícula D.O. (595nm) de las cepas de *E. coli* aisladas de varones con ITU ($n=24$).
No se encontró una correlación lineal significativa (Spearman, $p < 0.05$).

Oligo Forward

5' gcacaagtcattaataccaacagc 3' (%GC=42, $T_m=62^{\circ}\text{C}$)

Oligo Reverso

5' cgctgtaagttggttgatttcg 3' (%GC= 42, $T_m=62^{\circ}\text{C}$)

Tamaño Amplicón: 442 pb

Del nucleótido 28 - 249

Figura 39. Oligonucleotidos propuestos para la amplificación de *fliC* por PCR en la región conservada del gen.

Tabla 27. Datos con todas las variables medidas en el cepario de E. coli aislada de varones con ITU del hospital regional del ISSSTE en Puebla, Pue., en el periodo 2015-2016 (n=24)

# Cepa	FILOGRUPOS	VIROTIPO Y PERFIL PAIS	PUNTAJE DE VIRULENCIA
102-I	B2	<i>iucD, fimH, vatP</i>	3
103-I	B2	<i>iucD, satA, fimH, iha, vatA, papGII, papA, satP, traT, kpsMII, PAIs: I y II CFT073</i>	8
108-I	E	<i>fimH, traT, kpsMII, PAIs: I y II CFT073</i>	3
110-I	B2	<i>iucD, satA, fimH, iha, vatA, papGII, papA, satP, kpsMII, PAIs: I y II CFT073</i>	7
115-I	B2	<i>iucD, satA, fimH, iha, vatA, papGII, papA, satP, hlyA, cnf-1, traT, PAIs: I y II CFT073 y II J96</i>	9
117-I	C	<i>iucD, fimH, traT</i>	3
118-I	B2	<i>iucD, satA, fimH, iha, vatA, papGII, papA, satP, PAIs: I y II CFT073</i>	6
125-I	C	<i>iha, papGII</i>	2
126-I	B2	<i>iucD, satA, fimH, iha, papGII, papA, satP, traT, kpsMII, PAIs: I y II CFT073</i>	7
127-I	CI/CII	<i>iucD, fimH, papGII, PAIs: I y II CFT073</i>	3
128-I	B2	<i>iucD, satA, fimH, iha, vatA, papGII, papA, satP, hlyA, cnf-1, traT, kpsMII, PAIs: I y II CFT073 y II J96</i>	10
129-I	B2	<i>iucD, satA, fimH, iha, papGII, papA, satP, hlyA, vatP, cnf-1, traT, kpsMII, PAIs: I y II CFT073 y II J96</i>	10
130-I	B2	<i>iucD, fimH, iha, vatA, papGII, papA, satP, vatP, traT, kpsMII, PAIs: I y II CFT073</i>	8
132-I	A	<i>traT</i>	1
144-I	C	<i>iucD, fimH, vatA, vatP</i>	3
154-I	D	<i>iucD, fimH, iha, vatA, vatP, satP, traT, kpsMII</i>	7
155-I	A	<i>iucD, satA, fimH, vatP, satP, traT</i>	5
159-I	B2	<i>iucD, satA, fimH, iha, papGII, papA, satP, kpsMII, PAIs: I y II CFT073</i>	6
161-I	B2	<i>iucD, satA, fimH, iha, papGII, papA, satP, hlyA, cnf-1, kpsMII, PAIs: I y II CFT073 y II J96</i>	8
162-I	B2	<i>iucD, satA, fimH, iha, papGII, papA, satP, hlyA, cnf-1, traT, kpsMII, PAIs: I y II CFT073 y II J96</i>	9
167-I	B2	<i>iucD, satA, fimH, iha, papGII, papA, satP, hlyA, cnf-1, traT, kpsMII, PAIs: I y II CFT073 y II J96</i>	9
168-I	B2	<i>iucD, fimH, iha, papGII, papA, satP, hlyA, cnf-1, traT, kpsMII, PAIs: I y II CFT073 y II J96</i>	9
173-I	CI	<i>iucD, fimH, papGII, traT, kpsMII, PAI: II CFT073</i>	5
174-I	C	<i>iucD, satA, fimH,</i>	3

# Cepa	Aminoglucósidos			β-LACTÁMICOS										Quinolonas					Nitrofur nos	Fosfo natos	Inhibidor es de la vía folato	Fenic oles	Poli miki nas	Tetr acidi nas	EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA	
				Penicilina s	CEF 1ra y 2da GEN	CEF 3ra y 4ta GEN				MONOBAC TÁMICOS	CARBAPENE MICOS	PENICILINA+I NHIBIDOR														
	AMK	GM	NET	AMP	CF	CFX	CEZ	CTX	CRO	FEP	ATM	ETP	AMC	AN	CIP	OFX	NOR	LVX	MAC	FOS	TSX	C	CL	TE		
102-I	S	S	S	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	R	MDR (5 GRUPOS)
103-I	S	R	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	S	S*	S	S	S	R	MDR (6 GRUPOS)
108-I	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S*	R	R	S	R	XDR (11 GRUPOS)
110-I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S*	R	S	S	S	MDR (8 GRUPOS)
115-I	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S*	R	S	S	R	MDR (10 GRUPOS)
117-I	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S*	R	R	S	R	MDR (10 GRUPOS)
118-I	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S*	R	S	S	R	MDR (10 GRUPOS)
125-I	S	S	S	R	R	R	R	R	S	SDD	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S*	R	S	S	S	MDR (7 GRUPOS)
126-I	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S*	S	S	S	R	MDR (9 GRUPOS)
127-I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S*	R	R	R	R	XDR (12 GRUPOS)
128-I	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S*	R	R	S	R	XDR(11 GRUPOS)
129-I	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S*	R	S	S	R	MDR (9 GRUPOS)
130-I	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	R	MDR (9 GRUPOS)
132-I	S	R	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S*	S	S	S	R	MDR (8 GRUPOS)
144-I	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S*	R	R	S	S	MDR (9 GRUPOS)
154-I	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	XDR (13 GRUPOS)
155-I	S	R	S	R	R	R	R	R	R	SDD	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	R	MDR (9 GRUPOS)
159-I	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	R	S	MDR(10 GRUPOS)
161-I	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	MDR (9 GRUPOS)
162-I	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	MDR (9 GRUPOS)
167-I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	R	R	XDR (11 GRUPOS)
168-I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	R	R	XDR (11 GRUPOS)
173-I	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S*	R	R	S	R	R	MDR (10 GRUPOS)
174-I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S*	R	R	R	R	R	XDR (12 GRUPOS)

# Cepa	BLEE ^{+/+}	PUNTAJE RESISTENCIA	Perfil de genes <i>bla</i>	D.O. (595nm) promedio (n=9)	Categorías de formación de biopelícula	No. de bandas plasmídicas	Movilidad medio MIO
102-I	-	7	-	1.0	Productora Moderada	3	-
103-I	-	6	blaCTX-M	0.6	Productora debil	1	+
108-I	+	11	blaCTX-M, blaOXA-1	0.9	Productora débil	-	+
110-I	+	9	blaCTX-M, blaOXA-1	1.6	Productora Moderada	3	+
115-I	+	10	blaCTX-M, blaTEM, blaOXA-1	0.8	Productora débil	-	+
117-I	-	10	blaCTX-M	1.1	Productora Moderada	-	+
118-I	-	10	blaOXA-1	0.9	Productora Débil	3	-
125-I	-	8	blaCTX-M	1.4	Productora Moderada	1	-
126-I	+	9	blaCTX-M	0.5	Productora débil	3	+
127-I	-	12	-	0.6	Productora debil	-	+
128-I	-	11	blaCTX-M	0.6	Productora debil	2	+
129-I	-	10	blaCTX-M	1.1	Productora Moderada	-	+
130-I	-	9	blaOXA-1	1.0	Productora Moderada	2	+
132-I	-	8	blaOXA-1	2.4	Productora Fuerte	1	-
144-I	-	9	blaCTX-M	1.3	Productora Moderada	2	-
154-I	-	13	blaCTX-M	0.9	Productora débil	5	-
155-I	+	9	blaCTX-M	0.6	Productora debil	-	+
159-I	-	10	blaCTX-M	0.5	Productora debil	1	+
161-I	-	10	blaCTX-M, blaOXA-1	0.6	Productora debil	-	+
162-I	-	9	blaCTX-M	0.7	Productora debil	-	+
167-I	+	11	blaCTX-M	0.6	Productora debil	-	+
168-I	-	12	blaCTX-M	0.6	Productora debil	-	+
173-I	+	11	blaCTX-M	0.6	Productora debil	2	-
174-I	-	13	blaCTX-M	0.3	No productora	4	-