BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

Facultad de Medicina

Licenciatura en Biomedicina

Eje Microbiología

Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas

Instituto de Ciencias de la Universidad Autónoma de Puebla

TESIS

"Características de virulencia, resistencia y transferencia del material genético en cepas de *E. coli* uropatógena"

TÍTULO A OBTENER:

Licenciada en Biomedicina

PRESENTA:

Claudia Ixtepan Tejero

DIRECTORA DE TESIS:

D.C. Margarita María de la Paz Arenas Hernández

Puebla, Pue. Diciembre, 2018

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Juan Carlos Ixtepan G. y Liliana Tejero G., quienes han sido mi pilar e inspiración para trabajar constantemente, superarme día a día y enseñarme a nunca darme por vencida, por apoyarme en cada paso, ser mi guía y brindarme su amor incondicional. Siempre les estaré agradecida por todo lo que me han dado.

A mi hermana y confidente Karla Liliana Ixtepan T., quien me ha apoyado incansablemente en cada uno de los proyectos que emprendo y siempre ha confiado en mí, brindándome todo su cariño y afecto en cada momento.

A mi novio J. Miguel Capilla, por sus palabras de ánimo, así como su paciencia y cariño constante al apoyar las metas que me proponía y nunca dudar de mi capacidad.

A mis compañeros y amigos del eje en Microbiología, por las charlas y todos los momentos que pasamos en nuestros dos últimos años de formación profesional. Siempre los llevaré en mi memoria.

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

A la D.C. Margarita María de la Paz Arenas Hernández, por guiarme a través de mi formación profesional al brindarme sus conocimientos y sabios consejos.

Al Maestro Joaquín, por su incansable apoyo y consejo durante mi estancia de trabajo en el laboratorio de Biología Molecular de Enteropatógenos.

A la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado, por la darme la oportunidad de participar en programas como:
“La ciencia en tus manos” y “Jóvenes investigadores”

A la unidad de síntesis y secuenciación del IBT
E. Lopez, S. Becerra, J. Yañez y P. Gaytan

A mi comité tutoral, las Doctoras: Rosa del Carmen Rocha, Claudia Fabiola Martínez y Margarita Arenas por sus valiosos consejos y aportaciones a esta tesis.

CONGRESOS

1.-XXIII Congreso Latinoamericano de Microbiología. XIV Congreso Argentino de Microbiología 2016. Septiembre 26 al 30 del 2016. Buenos Aires, Argentina. Rosario, Santa Fe, Argentina.

Presentación de poster científico durante el congreso.

Título del cartel:

“Analysis of Virulence Determinants of Uropathogenic *E. coli* O25 clinical isolates from a Mexican Population”.

2.-XL Congreso Nacional de Microbiología. Abril 02 al 09 del 2017. Asociación mexicana de microbiología. Guadalajara, Jalisco.

Presentación de poster científico durante el congreso

Título del cartel:

"Evaluation of antibiotic resistance and extended spectrum β-lactamases (BLEE) production in *E. coli* strains isolated from women with urinary tract infection in a public hospital in Puebla, Mexico”

3.-V Congreso de Bioquímica y Biología Molecular de Bacterias del 1 al 5 de octubre de 2017 en Ex - Hacienda de Chautla, Puebla.

Presentación de poster científico durante el congreso.

Título del cartel:

“Evaluation of Antibiotic Resistance, BLEE Production and Biofilm formation in Two *E. coli* strain collections Isolated of patients with ITU in the State of Puebla “”

Reconocimiento obtenido: Mención honorifica, por excelente presentación en cartel a nivel licenciatura en el V Congreso de Bioquímica y Biología Molecular de Bacterias del 1 al 5 de octubre de 2017 en Ex - Hacienda de Chautla, Puebla.

4.-XXIV Congreso Latinoamericano de Microbiología 2018. Noviembre 13 al 16 del 2018. Asociación Latinoamericana de microbiología. Santiago, Chile.

Presentación de poster científico durante el congreso

Título del cartel:

"Antibiotic Resistance, Biofilm production, Adherence and Conjugation properties of *E. coli* O25 isolated of Urinary Tract Infection in Mexico.”

INDICE

1. ABREVIATURAS 6
2. RESUMEN 7
3. INTRODUCCIÓN 8
3.1 DEFINICIÓN Y EPIDEMIOLOGÍA DE ITU 8
3.2 *ESCHERICHIA COLI* UROPATÓGENA 9
3.3 MECANISMO DE PATOGENICIDAD Y FACTORES DE VIRULENCIA EN UPEC 10
3.4 RESISTENCIA ANTIBIÓTICA EN UPEC 11
3.5 CAPACIDAD DE FORMACIÓN DE BIOFILM EN UPEC 13
3.6 TRANSFERENCIA DE MATERIAL GENÉTICO EN UPEC 14
3.7 FAMILIA MOB_F 15
4.ANTECEDENTES 16
4.1. ANTECEDENTES GENERALES 16
4.2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS 17
5.JUSTIFICACIÓN 19
6. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA 19
7.HIPÓTESIS 19
8.OBJETIVOS 20
8.1 GENERALES 20
8.2. ESPECÍFICOS 20
9. MATERIAL Y MÉTODOS 21
9.1 MATERIAL BIOLÓGICO. 21
9.1.1. CEPAS DE *E. COLI* AISLADAS DE ITU. 21
9.1.2 CEPAS CONTROL 21
9.2 MÉTODOS 21
9.2.1 PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA EXTRACCIÓN DE MATERIAL GENÉTICO 21
9.2.2 EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO. 22
9.2.3 EXTRACCIÓN DE DNA PLASMÍDICO 22
9.3 PERFIL DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIBIÓTICA POR EL MÉTODO DE KIRBY-BAUER 22
9.4 CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) A COLISTINA 24
9.5 DETERMINACIÓN DE BIOFILM EN ENSAYO DE MICROPLACA 25
9.5.1 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS EN LOS ENSAYOS DE BIOFILM 26

9.6 DETECCIÓN DE BIOFILM EN AGAR ROJO CONGO 27
9.7 DETECCIÓN DE GENES DE VIRULENCIA 28
9.8 DETECCIÓN DE GENES CODIFICANTES DE BLEE 29
9.9 DETECCIÓN DE GENES *traT y* MOB_{F12} 29
9.10 ENSAYOS DE CONJUGACIÓN 30
10.ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO 31
11.RESULTADOS 32
11.1 PERFIL DE SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS 32
11.2 CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) A COLISTINA 35
11.3 DETERMINACIÓN DE FENOTIPO DE B-LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO 36
11.4 EVALUACIÓN DE LA FORMACIÓN DE BIOFILM EN MICRO PLACA Y AGAR ROJO CONGO 38
11.4.1 CEPAS ISSSTE 38
11.4.2 CEPAS O25 41
11.5 EVALUACIÓN DE LA FORMACIÓN DE BIOFILM- DETECCIÓN DE PROTEINAS 42
11.6 DETERMINACIÓN DE LOS BIOMARCADORES DE VIRULENCIA 43
11.7 DETERMINACIÓN DE GENES CODIFICANTES A B-LACTAMASAS 47
DE ESPECTRO EXTENDIDO 47
11.8 PERFIL PLASMÍDICO 49
11.9 DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE GENES MOB_{f12} Y *traT* EN LAS CEPAS 50
11.10 ENSAYOS DE CONJUGACIÓN 51
11.11 ASOCIACIÓN INTEGRAL DE DATOS 52
11.11.1 BIOFILM, GENES DE VIRULENCIA Y RESISTENCIA POR MDR Y XDR 52
12.DISCUSIÓN 54
13.CONCLUSIONES 67
14. PERSPECTIVAS 68
15. REFERENCIAS 69

1. ABREVIATURAS

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

2. RESUMEN

E. coli Uropatógena (UPEC), es el principal agente etiológico de infecciones del tracto urinario (ITU). Se han reportado cepas de UPEC con una alta resistencia antibiótica lo cual dificulta el tratamiento de pacientes con Infección del tracto urinario (ITU) a nivel hospitalario y en la comunidad. Se trabajaron con dos ceparios, el primero con 65 cepas de *E. coli* de serogrupo O25, aisladas de pacientes masculinos (8) en un rango de 53 a 94 años, femeninos (50) de 19 a 96 años y niños (7) de 0 a 5 años, cursando con ITU provenientes de hospitales públicos y privados durante el periodo del 2011-2015. El segundo cepario, consta de 51 cepas obtenidas de pacientes femeninos cursando una ITU y en un rango de 21 a 86 años. Provenientes del Hospital ISSSTE de la ciudad de Puebla en el 2016.

Para las cepas del serogrupo O25 se completó la determinación del perfil de susceptibilidad a polimixinas (Colistina), fosfonatos (Fosfomicina), carbapenémicos (Ertapenem) y Tetraciclina, usando el método de Kirby-Bahuer para un total de 4 familias de antibióticos, obteniéndose un perfil de resistencia a antibióticos β-lactámicos de primera generación de 96.9%, así como a Quinolonas de segunda generación en 81.1%. En las cepas provenientes del ISSSTE, se realizó el perfil completo para un total de 12 familias de antibióticos, obteniéndose un perfil de resistencia alto a antibióticos β-lactámicos 95.2% y Quinolonas 94.9%. Se determinó la concentración mínima inhibitoria para Colisitina por el método de dilución en caldo para cepas reportadas como resistentes por el método de difusión. Se confirmó que el 100% (n=21) fue resistente a Colistina. La formación de biofilm se realizó por el método de Cristal Violeta, los resultados se compararon con el método de Agar Rojo Congo para ambos ceparios. La formación de biofilm se reporta en D.O/mg de proteína para ambos ceparios en cepas seleccionadas (n=20).

Se detectaron biomarcadores de virulencia para el cepario del ISSSTE a través de tres PCR múltiples y una PCR individual (gen *cnf)*. Los genes asociados a virulencia se determinaron en el siguiente orden: PCRm1 (*fimH, fliC, satA e iucD*), PCRm2 (*iha, vatP, vat A, papGII y papGII*), PCRm3 (*papA, satP y hlyA*) y PCR *cnf*. Detectándose en mayor porcentaje el gen *fimH* 96%, seguido de *iucD* 65%, y en general se encontróla presencia de 1 a 9 genes en el 96% de las cepas.

Se determinaron por PCR los marcadores de resistencia *blaCTX-M, blaOXA, blaTEM y blaSHV* en ambos ceparios. Para las cepas serogrupo O25 se obtuvo un alto porcentaje para los genes bla_{TEM} con 40%, bla_{OXA-1} con 17% y bla_{CTX-M} con 13%. En las cepas del ISSSTE se presenta un mayor porcentaje para los genes bla_{TEM} con un 66%, seguido de bla_{CTX-M} con 25%. Finalmente se utilizó el perfil de susceptibilidad a Ap y Rf, la presencia de plásmidos y de los genes *traT* y MOB_{F12} como criterios para seleccionar las cepas a ser usadas en ensayos de conjugación, usando como cepa receptora una *E. coli* K12 cepa C600 Rfr. Se realizaron tres ensayos de conjugación con 3 cepas O25 con un perfil plasmídicos electroforético de 6 bandas cada una según lo previamente reportado, obteniéndose 4 cepas transconjugantes las cuales poseen los mismos factores de virulencia*, fimH, sat, iucD* e *iha*, que la cepa donadora.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 DEFINICIÓN Y EPIDEMIOLOGÍA DE ITU

Se define a una infección de tracto urinario o ITU como la presencia de bacterias en sectores normalmente estériles del aparato urinario con o sin presencia de síntomas (Zarate y cols., 2006). Constituye una patología frecuente y de elevada morbilidad que en muchos de los casos se puede volver crónica, afectando tanto a hombres, como a mujeres de diferentes grupos de edad (Arenas M. y cols*.,* 2011). A nivel mundial existen 150 millones de casos de ITU por año en todo el mundo(Trejo y cols,. 2016), mientras que, en nuestro país, la Dirección General de Epidemiología, reporta en el 2015 en su informe anual que las Infecciones del tracto urinario se encuentran en una frecuencia del 15.7%, correspondiendo al tercer lugar entre las principales infecciones reportadas (DGE, 2015).

Las ITU son clasificadas de diversas formas: por su distribución anatómica se considera ITU alta e ITU baja. Se considera ITU alta cuando afecta a nivel ureteral y el parénquima renal, con signos y síntomas sistémicos como, escalofríos, fiebre, dolor lumbar, náuseas y vómitos. En este grupo se encuentran las pielonefritis.

Por otro lado, se considera ITU baja, al presentarse en vejiga y uréteres que normalmente se asocia a la presencia de síntomas y signos urinarios, como son la urgencia para orinar, disuria, polaquiuria, turbidez y olor fetido en la orina. Dentro de estas ITU están la cistitis y uretritis.

Clínicamente, las ITU se clasifican en complicadas y no complicadas. Diferenciándose en que las complicadas por lo general afectan a individuos con anormalidades estructurales o con presencia de instrumental médico como en el caso de los catéteres. Mientras que las ITU no complicadas afectan al resto de la población y cuyos síntomas están confinados a la uretra y vejiga. Estas infecciones son muy frecuentes en mujeres jóvenes con una vida sexual activa (Flores-Mireles y cols. 2015; Zarate y cols.,2006).

Las ITU son causadas por bacterias Gram negativas y positivas, así como por hongos. Entre los microorganismos que con mayor frecuencia son aislados en este tipo de infecciones se encuentran *Escherichia coli (E. coli), Klebsiella spp, Enterobacter spp, Enterococcus spp, Pseudomonas spp, Proteus spp y Staphylococcus saprophyticus,* aunque con diferencias importantes en su magnitud y sus factores asociados, según la población, su edad y sexo (Orrego *y cols.,* 2014).

El tratamiento de las ITU incluye generalmente antibióticos β-lactámicos, fluoroquinolonas, o trimetoprim/sulfametoxazol, pero puede variar según la edad del paciente, sexo, patógeno, el curso de la enfermedad y el tracto urinario anatómico (Molina López 2011). La elección de un antibiótico, en diversas infecciones, depende de los niveles de concentración plasmática que alcanza el antibiótico para lograr una susceptibilidad antimicrobiana alta. Pero en el caso de una ITU, lo importante es la concentración del antibiótico en el parénquima renal, en la capa más profunda de la pared de la vejiga y de la próstata. Por lo tanto, la excreción de la concentración en orina, así como la determinación de la actividad del antibiótico en la orina son importantes para la decisión de si su uso es necesario o no en el tratamiento de ITU (Zarate *y cols.*,2006). En la tabla 1. se resumen las principales opciones de tratamiento para ITU según la categoría y el criterio diagnóstico.

TABLA 1. INFECCIÓN DEL TRACTO URINARIO EN EL ADULTO.

CATEGORÍA	CRITERIO DIAGNÓSTICO	TERAPIA DE PRIMERA LÍNEA
CISTITIS AGUDA NO COMPLICADA	Análisis de orina con piuria y hematuria	Nitrofurantoína, Cefalosporinas de 1° generación, TMP-SMX DS, Ciprofloxacina, Norfloxacina, Amoxicilina/acido clavulánico
CISTITIS RECURRENTE EN MUJER JOVEN	Presencia de síntomas y urocultivos:>100 UFC/ml	Ciprofloxacina, Norfloxacina
CISTITIS AGUDA EN HOMBRE JOVEN	Urocultivo con un conteo de 1000 a 10 000 UFC/ml	Nitrofurantoina, Cefalexina, Cefadroxilo, TMP-SMX DS, Ciprofloxacina, Norfloxacina
PIELONEFRITIS AGUDA NO COMPLICADA	Urocultivo con un conteo de 100 000 UFC/ml	Gram negativos: Fluoroquinolona Gram positivos: Amoxicilina
ITU COMPLICADA	Urocultivo:>10 000 UFC/ml	Gram negativos: Fluoroquinolona Vía parenteral: Cefalosporinas, y/o gentamicina, amikacina
BACTERIURIA ASINTOMÁTICA EN EL EMBARAZO	Urocultivo:>10 000 UFC/ml	Amoxicilina, Nitrofurantoina, Cefalexina, Aztreonam. Evitar: Tetraciclinas y fluoroquinolonas
ITU ASOCIADA A CATÉTER	Síntomas y urocultivo >100 UFC/ml	Gram negativos: fluoroquinolonas Gram positivos: Amoxicilina más gentamicina

TMP-SMX = trimetoprim-sulfametoxazol; UFC= unidad formadora de colonias; Adaptada de Zarate *et.al* 2006.

3.2 *ESCHERICHIA COLI* UROPATÓGENA

Escherichia coli uropatógena (UPEC) es el principal agente etiológico en ITU. Se presentá tanto en hombres como en mujeres de cualquier edad, siendo más frecuentes en pacientes del sexo femenino y estimándose que del 10 al 30 % de las mujeres presentarán una ITU a lo largo de su vida (Flores-Mireles y cols.,2015). Dentro de las ITU producidas por UPEC, de un 70% a 95% son de origen comunitario mientras que el 50% son de origen nosocomial (Millán y cols.,2014).

Las ITU se consideran una de las patologías que afecta tanto a riñón como a vías urinarias, con una tasa de ocurrencia que oscila entre 0,3 y 7,8% en primera infancia. En edad escolar se encuentra entre el 1 y el 3%, aumentando en los adolescentes (Rondón M. y cols., 2007).
Las cepas de *Escherichia coli* se pueden agrupar en cepas comensales, patotipos intestinales y patógenos extraintestinales (ExPEC), se considera como uno de los agentes más importantes que causan infecciones extraintestinales. En el grupo de ExPEC se encuentran las cepas de UPEC, las productoras de sepsis y meningitis (Millán y cols.,2014). Filogenéticamente las cepas de *E. coli* se clasifican en los grupos: A, B1, B2, D, E y F. UPEC pertenece principalmente al grupo filogenético B2 y en menor medida al grupo D, mientras que las cepas comensales se encuentran dentro de los grupos filogenéticos A y B1 (Molina J. 2011; Clermont O. *y cols.,*2013).

3.3 MECANISMO DE PATOGENICIDAD Y FACTORES DE VIRULENCIA EN UPEC

Dentro del mecanismo de patogenicidad en cepas de UPEC se encuentra:
La colonización en área periuretral y vaginal con colonización de la uretra, ascenso hasta el lumen de la vejiga, crecimiento bacteriano como célula plantónica en orina, adherencia a superficies, así como la interacción del sistema de defensa del epitelio de la vejiga, formación de biofilm, invasión, replicación formando comunidades bacterianas intracelulares a nivel de la vejiga. En casos graves de la enfermedad, se produce una colonización del riñón y tejido dañado del huésped incrementando el riesgo de bateremia/sepsis.
Son diversos los factores de virulencia que contribuyen a la colonización y patogenicidad de UPEC, dentro de los cuales destacan aquellos relacionados en el proceso de adherencia e invasión, lo cual le permite a este patogeno infectar de manera exitosa a su hospedero. De este modo, los factores de virulencia le que permiten a *E. coli* superar el sistema inmune del huésped y causar múltiples enfermedades. (Neamati F. y cols., 2015;Terlizzi. y cols.,2017).
Se han caracterizado varios factores de virulencia que participan en cada una de las etapas anteriormente mencionadas en la patogénesis de UPEC, entre los que se incluyen factores de adherencia (fimbrias P, de tipo 1 y S), alfa-hemolisina (Hly), lipopolisacárido (LPS), aerobactinas, proteasas auto trasportadoras (Sat), la toxina Vat, Factor Necrosante Citotóxico 1 (CNF-1), mecanismos de adquisición de nutrientes (sideróforos), resistencia al suero, formación de biofilm y capsula. (Arenas M. y cols., 2011; Tabasi M. y cols., 2015).
Entre los genes asociados a factores de adherencia, el gen más estudiado (y conocido) es el gen *fimH* el cual codifica para la adhesina de unión a manosa FimH localizada en la región apical de la fimbria, media la adhesión a las células de todo el uroepitelio y determina la adherencia por las fimbrias de tipo 1 (Casellas 2008).

Otros factores de virulencia asociados a UPEC son, la fimbria P (otro tipo de pili), la cual está particularmente asociada con pielonefritis y se encuentra codificada por los genes *pap;* y las toxinas que actúan como factores de virulencia secretores. El factor de virulencia secretado más importante es la α-hemolisina (HlyA), que está codificada por el gen *hly*. Ademas, el factor necrotizante citotóxico 1 (CNF1) el cual se encuentra en un tercio de las cepas pielonefrogénicas (Da Silvaa G. *et al.*, 2012), y la capacidad de resistencia al suero debido a la proteína de membrana externa TraT codificada por los genes *traT.* El cual juega un papel importante en la virulencia de UPEC (Neamati F. y cols., 2015).

Los genes *tra* codifican proteínas que son útiles para la propagación del plásmido por conjugación de la célula huésped a una célula receptora compatible o para el mantenimiento del plásmido. El locus *tra* incluye el gen de pilina y los genes reguladores encargados de formar un Pili sexual o conjugativo en la superficie celular, además incluye a las proteínas poliméricas que pueden adherirse a la superficie de bacterias F^- e iniciar la conjugación (Grohmann y cols., 2003).

Dada la importancia de los factores de virulencia en el mecanismo de patogenicidad en UPEC, la identificación de los factores de virulencia puede ser útil para el diagnóstico y estrategias terapéuticas (Flores A*. y cols.,* 2015).

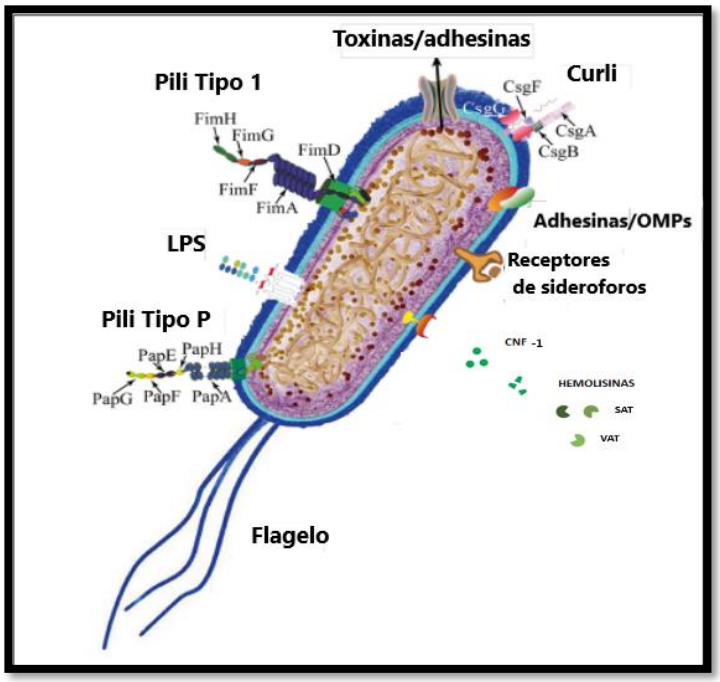


Figura 1. Imagen representativa de los principales factores de virulencia. Adaptada de Terlizzi, *et.al*.2017.

3.4 RESISTENCIA ANTIBIÓTICA EN UPEC

Según la OMS (Organización Mundial de la Salud), cada año la resistencia a los antibióticos está aumentando entre las cepas de UPEC, por lo que dicha resistencia antimicrobiana reduce significativamente las opciones terapéuticas y aumenta los costos de tratamiento y las tasas de mortalidad (Neamati y cols., 2015).

Las cepas de UPEC pueden causar infecciones agudas e infecciones recurrentes, lo cual complica el manejo clínico de las ITU debido al incremento en la incidencia de infecciones causadas por cepas de *E. coli* que son productoras de biofilm y resistentes a los antibióticos comúnmente utilizados (Millán y cols*.,* 2014). En el 2012, el centro europeo para la prevención y control de enfermedades (ECDC) y el centro para el control y prevención de enfermedades de E.E.U.U (CDC) crean una terminología estándar, a nivel internacional, en la cual se describen los perfiles de resistencia para *Staphylococcus aureus, Enterococcus spp., Enterobacteriaceae., Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter spp.* Todas bacterias responsables de infecciones con alto potencial a la multiresistencia antibiótica. Para el caso de *E.coli* uropatógena se realizó la evaluación de la resistencia según 13 grupos de antibióticos, obteniendo 4 categorías: **NMDR** (no multidrogo resistente) resistencia en 2 o menos grupos; **MDR** (multidrogo resistente) resistencia en 3 o más grupos evaluados; **XDR** (extremadamente resistente) susceptibilidad en 1 o 2 grupos, PDR (pandrogo resistente) resistencia en todos los grupos (Magiorakos y cols., 2012.)

La resistencia a diversos antimicrobianos puede considerarse como otro factor de virulencia de estas cepas porque son un elemento importante en las fallas en el tratamiento. Recientemente una clona de *E. coli* O25-ST131 productora de β-lactamasas de espectro extendido, multirresistentes y con alta virulencia ha emergido a nivel mundial como una causa importante de las ITU adquiridas en la comunidad (Millán y cols*.,* 2014). La hidrolisis de los antibióticos β-lactamicos por medio de las β-lactamasas es el mecanismo más común de resistencia a esta clase de agentes antibacterianos de importancia clínica en bacterias Gram negativas (Bush & Jacoby, 2010).

Las β-lactamasas de espectro extendido (BLEE), son enzimas las cuales se caracterizan fenotípicamente por conferir resistencia a Penicilina y Cefalosporinas, incluyendo las de tercera y cuarta generación. Pueden ser inhibidas por el Ácido Clavulánico u otros inhibidores como el Tazobactam y Sulbactam. Las cepas que producen BLEE, en su mayoría son enterobacterias, particularmente *E. coli*, por lo cual son resistentes a todos los antbióticos β-lactamicos con excepción de las Carbapenemasas.

Las β-lactamasas de espectro extendido, son enzimas capaces de inactivar además de las penicilinas y las cefalosporinas de primera y segunda generación, a las oximino-cefalosporinas y a aztreonam. Dado que la familia de enzimas BLEE está en continuo crecimiento, se reconocen según sus características funcionales y genotípicas. Esto mediante la clasificación de Bush, Jacoby y Mederos asi como su correlación con la clasificación molecular de Ambler (Bush y cols., 2010).

Las BLEE “clásicas” derivan de β-lactamasas pertenecientes al grupo 2b (TEM-1, TEM-2 y SHV-1) producto de mutaciones de los genes que codificaban estas betalactamasas aparecieron las actuales betalactamasas de espectro extendido (BLEE) siendo estas de naturaleza plasmídica. Estas β-lactamasas 2b poseen actividad penicilinasa y son sensibles el ácido clavulánico (inhibidor de betalactamasas). Hasta la fecha se han descrito más de cien variantes distintas de BLEE, derivadas de las TEM-1 o TEM-2 y más de cincuenta de las derivadas de SHV (Álvarez D., 2010). OXA-1 es una oxaciclina que confiere un fenotipo silimar a las betalactamasas resistentes a los inhibidores, se caracteriza por la resistencia a aminopenicilinas, caboxipenicilinas y ureidopenicilinas (García y cols.,2010).

En los últimos años, han adquirido gran relevancia el tipo BLEE plasmídicas, denominada CTX-M las cuales han remplazado a las clásicas TEM y SHV en muchos países, pues existen más de 80 variantes descritas en este grupo de enzimas, las cuales son la causa de la resistencia a cefalosporinas de amplio espectro (Hussain y cols.,2012).

3.5 CAPACIDAD DE FORMACIÓN DE BIOFILM EN UPEC

La formación de biofilm se define como un ensamble de células microbianas que se asocian de manera irreversible a una superficie, siendo embebidos en un matriz de polisacáridos primarios permitiendo el crecimiento y la sobrevivencia ante un ambiente agresivo. Estas células secretan sustancias poliméricas extracelulares que mantienen a las células agregadas. En algunas ocasiones estos cúmulos de células son separadas por canales por los cuales se pueden movilizar algunos fluidos. A medida que las células bacterianas asociadas en comunidades se adaptan al crecimiento en estas superficies hidratadas, éstas expresan diferentes fenotipos en comparación al fenotipo mostrado por las células bacterianas que viven en estado plantónico. Estas manifestaciones fenotípicas se expresan en diferentes maneras dependiendo de la especie bacteriana, destacando el hecho de que más del 50% de todas las infecciones producidas por bacterias que se han reportado involucran la formación de biofilm.
UPEC presenta cambios morfológicos como la filamentación lo cual le permite evadir el sistema inmune del hospedero (Marhova y cols., 2010).
La formación de biofilm es de importancia médica dado que los patógenos que presentan esta capacidad son difíciles de erradicar, desarrollando infecciones graves que en muchas ocasiones se vuelven crónicas.
En el caso de UPEC, la formación de biofilm le permite persistir por un largo tiempo en el tracto genitourinario e interferir en la erradicación de la bacteria.

La formación de biofilm de UPEC se da en comunidades intracelulares bacterianas (CIB), protegiendo a sus miembros del ataque por neutrófilos, antibióticos y otros factores estresantes para la bacteria. La inducción para la formación de biofilm en estas cepas es mediada por las interacciones y la adhesión a superficies del Pili tipo 1, el antígeno 43 y fimbrias adhesivas tipo Curli. Se ha visto que, durante la maduración de las CIB, la expresión del supresor de iones (SulA) inhibe la polimerización de FtsZ en una subpoblación de UPEC, lo que bloquea la formación del anillo de septación y la división celular formando células filamentosas. Cuando las células filamentosas salen de las células epiteliales, estas se vuelven resistentes a la muerte por neutrófilos y pueden colonizar otras células uroepiteliales y reingresar en su ciclo como CIB, entendiéndose de este modo la importancia de las células filamentosas en el ciclo previo a la formación de biofilm (Marhova y cols., 2010; Flores A*. y cols.,* 2015). Ademas, se ha reportado que el Pili tipo 1 participa en la formación de biofilm por UPEC en catéteres.

Se ha reportado que la resistencia intrínseca de UPEC puede estar asociada con la capacidad de sobrevivir en un estado de biofilm que aumenta en gran medida la dificultad del tratamiento ante diversas situaciones clínicas. La capacidad de las bacterias de persistir y crecer en un biofilm parece representar un factor importante para la patogénesis y los fracasos terapéuticos, particularmente en infecciones del tracto urinario en pacientes cateterizados a largo plazo (Crémet L. y cols.,2013).

3.6 TRANSFERENCIA DE MATERIAL GENÉTICO EN UPEC

Un factor importante en la diseminación de la resistencia a antibióticos es la presencia de plásmidos y la capacidad de estos de transferirse entre otras cepas mediante la conjugación. Los plásmidos ejercen un gran impacto evolutivo en las bacterias favoreciéndoles el colonizar nuevos nichos, así como obtener ventajas sobre sus competidores naturales. Los plásmidos portan frecuentemente genes relacionados a la detoxicación, virulencia, interacciones ecológicas y resistencia antibiótica.
El proceso de conjugación bacteriana es altamente específico, por el cual se da la transferencia del ADN de una cepa donadora a una cepa receptora. Este proceso se da por un complejo multiproteíco especializado, que involucra el contacto célula a célula por medio de filamentos extracelulares mejor conocidos como pili sexuales (Grohmann y cols.,2003). La capacidad de conjugación de una bacteria depende de la presencia en la bacteria de plásmidos conjugativos. Un ejemplo de plásmido conjugativo es el plásmido F de *E. coli* el cual codifica para las proteínas necesarias para la conjugación incluyendo el pili sexual. Las cepas bacterianas con el plásmido F tienen alta frecuencia de recombinación por lo que se denominan cepas hfr por sus siglas en ingles (high frecuency of recombination) (Betancor y cols., 2006).
Para la supervivencia del plásmido conjugativo se consideran esenciales dos funciones: la replicación del ADN y la transferencia horizontal. Dentro de los factores cruciales en la transferencia horizontal, la movilidad del plásmido conjugativo forma parte esencial de la habilidad de un plásmido, además de ser un el elemento clave para entender la epidemiología de los rasgos portados por plásmidos. El set de genes de movilidad (MOB) es esencial para el proceso de conjugación de ADN, además de un complejo de formación de pares de apareamiento (MPF) asociado a la membrana, el cual es una forma de sistema de secreción tipo 4 (T4SS), proporcionando el canal de acoplamiento.

Los plásmidos pueden ser clasificados en tres categorías según su movilidad: conjugativos, movilizables y no movilizables. Los plásmidos conjugativos codifican para un grupo completo de genes de transferencia (MOB+ T4SS). Un plásmido que codifica para su propio grupo de genes MPF se denomina auto-transmisible o conjugativo. Por otro lado, los plásmidos movilizables solo codifican a una mínima maquinaria de MOB que les permite ser transportados por otros plásmidos. Si usa MPF de otro elemento genético presente en la célula, se denomina movilizable, mientras que algunos plásmidos son llamados no movilizables dado que no entran en ninguna de las categorías previamente mencionadas, diseminándose por transformación natural o por transducción (Garcillán B. y cols.,2009;Smillie y cols.,2010 ;Alvarado A. y cols.,2012).

Los plásmidos conjugativos pueden ser agrupados en seis diferentes familias MOB basados en las 6 diferentes familias de genes relaxasa: MOB_F, MOB_H, MOB_Q, MOB_C, MOB_P y MOB_V. La proteína relaxasa es clave en el proceso de conjugación, puesto que reconoce el origen de transferencia (*oriT*), una secuencia corta de ADN quien es la única secuencia que requiere en cis un plásmido para ser trasmisible conjugativamente. La proteína relaxasa cataliza el estado inicial y final de la

conjugación. Participa en la escisión inicial de *oriT* en el donante, para finalmente producir la cadena de ADN que se transferirá, además participa en la ligación final del ADN transportado en la célula receptora (Smillie y cols.,2010; Westra y cols.,2013).
Se observan diferencias entre las diferentes familias de plásmidos MOB con respecto al mecanismo molecular y cinético de la transferencia plasmídica. La proteína relaxasa, se caracteriza por ser una proteína multidominio, siendo el único componente común entre los plásmidos conjugativos y movilizables. Su actividad reside en el dominio N-terminal y su estructura 3D de los dominios de cuatro relaxasas se relacionan a $MOB_{F.}$

3.7 FAMILIA MOB_F

Esta familia MOB se encuentra muy bien caracterizada, contiene 114 miembros y presenta dos relaxasas que consisten en dos dominios N-terminal en donde se encuentran dos tirosinas catalíticatemente activas y un dominio helicasa C-terminal.

En la familia MOB_F se presentan tres diferentes subclados de MOB_{F1} los cuales son: MOB_{F11}, MOB_{F12} y $MOB_{F13.}$ El subclado MOB_{F11} contiene dos ramas representadas por los plásmidos prototipo R388 (IncW) y R46 (IncN) para la rama de enterobacterias. El plásmido IncN se encuentra relacionado con la diseminación de la multidrogo resistencia en Enterobacterias. El subclado MOB_{F12} se encuentra comprendido por el complejo filogenético general IncF. Este complejo incluye al menos siete grupos de incompatibilidad, siendo prevalente en Enterobacterias y frecuentemente responsable de la diseminación de los determinantes de la resistencia antibiótica, siendo esto de gran importancia médica en la actualidad (Garcillán B. y cols.,2009).
La capacidad de las cepas de formar biofilm, la resistencia antibiótica, así como sus factores de virulencia y la capacidad de transferencia del material genético por conjugación representa un problema de salud pública que debe ser evaluado en la población en general, pero de manera particular en la población cautiva que permanece hospitalizada durante periodos prolongados (Sainz E. y cols.,2008).

4.ANTECEDENTES

4.1. ANTECEDENTES GENERALES

Antecedentes Internacionales

Rijavec *y colsl.,* 2006, trabajaron con 110 cepas de UPEC de Ljubljana, Slovenia, analizando su resistencia antibiótica, movilidad de elementos del ADN, serotipo y origen filogenético. Encontraron una alta prevalencia de resistencia y multiresistencia y el 56% de las cepas presentaban secuencias *rep* características de plásmidos tipo F.

Marhova *y cols*., 2010, trabajaron con 50 muestras de *E. coli* de pacientes con diferentes sintomatología y tipos de ITU. Determinaron que el 24% fue positivo a la formación de biofilm por cristal violeta en microplacas. Además, evaluaron la hemaglutinación y hemolisis para investigar la presencia de la fimbria tipo 1 y hemolisina. El 16% de las cepas presentaron fimbria tipo 1, la cual fue importannte en los primeros de formación de biofilm. El 38% de las cepas fue multidrogoresistente, 16% fueron productoras de BLEES. El perfil de resistencia antibiótica se encontró en un alto porcentaje en Ampicilina 74%, Trimetropim/sulfametoxazol 72%, Acido nalidixico 58%, Norfloxacina 46%, Gentamicina 40%.

Hussain y cols en, 2012 trabajaron con 100 muestras clínicas de *E. coli* aisladas de pacientes cursando ITU en un Hospital en Pune, India. Determinaron el perfil de susceptibilidad antibiótica, fenotipo y genotipo de BLEE, y la capacidad de las cepas de trasferir material genético por conjugación. 23% de las cepas fueron productoras de BLEE, 94% fue resistente a Tetraciclina, 81% Ciprofloxacina, 69% a Gentamicina y Trimetropim/Sulfametoxazol. Ademas determinaron la presencia de genes codificantes a BLEES, obteniéndose los siguientes porcentajes $bla_{CTX\text{-}M}$ 24%, bla_{TEM} 12%, bla_{OXA} *16%* y bla_{SHV} 0%*.* Determinaron también la capacidad de las cepas de transferir los genes codificantes de BLEES por conjugación, a usando un plásmido libre. El número y pesos aproximados de los plásmidos en las cepas ST131 y sus respectivas transconjugantes fue determinada por plásmidos conocidos como el RS478 (272 kb). Demostraron que los plásmidos transferidos eran plásmidos que contenían genes BLEES.

Crémet y cols., 2013, trabajaron con 34 cepas de *E. coli* aisladas del Hospital Universitario Nantes, Francia. De las cuales 11 provenientes de orina (incluyendo 7 de catéteres), 9 de cultivos en sangre, 8 del fluido peritoneal y 3 de fluido gástrico de neonatos. Determinaron la capacidad formar biofilm, usando tres diferentes métodos (Cristal violeta en microplaca, Test del anillo de biofilm y el ensayo con resazurina). Este estudio relaciona la capacidad de formación de biofilm con el trasfondo filogenético y los diferentes genes relacionados con la síntesis del biofilm. Encontrando que el gen *csgA* esta presente en un 76% de las cepas, este gen forma parte del operon *csgABC* el cual codifica para una adhesina de polisacáridos.

Neamati y cols., 2014, trabajaron con un total de 150 cepas de *E.coli* aisladas de pacientes con ITU en Kashan, Iran. Determinaron el perfil de susceptibilidad a 12 antibióticos. Utilizaron la técnica de PCR para detectar genes relacionados con la virulencia en cepas de UPEC. De las 150 cepas, el 74% fue multidrogo resistente, presentando un alto perfil de resistencia en Ampicilina 81.3%, Acido nalidixico 71.3. %, Cotrimoxazole 64.7% y Ciprofloxacino 61.3%.
Ademas el 84% de las cepas mostraron resistencia a Cepalosporinas de amplio expectro. El 74% de las cepas presentaron el gen *traT*, 61.3% los marcadores de PAIs y 16.6% el gen *pap* encontrándose en alta prevalencia para cepas de UPEC.

4.2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

Antecedentes Nacionales

Navarro y cols., 2011, trabajaron con muestras provenientes de hospitales de Hermosillo, Sonora. México. Un total de 1,412 aislamientos de *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae* tanto de infecciones comunitarias como nosocomiales, recopiladas de tracto urinario, piel, tejido blando y sangre. Realizaron la evaluación fenotípica de producción de BLEE por el método de sinergia de doble disco con y sin ácido clavulánico. Encontraron que un 31.8% de cepas fueron productoras de BLEE en aislados de *E. coli* a nivel hospitalario, además, 83% de las cepas de *E. coli* presentaron alto porcentaje de sensibilidad en Nitrofurantoína.

López y cols., 2014, trabajaron con 108 muestras de mujeres mexicanas cursando con ITU recopiladas del Hospital general Dr. Manuel Gea González en Tlalpan, México. Llevaron a cabo la detección de genes de virulencia, grupos filogenéticos, resistencia antibiótica y CMI. Los grupos filogenéticos y 16 genes de virulencia codificantes de adhesinas, toxinas, sideróforos, lipopolisacáridos e invasinas fueron identificas por PCR. La distribución de los grupos filogenéticos fue B1 9.3%, A 30%, B2 55.6% y D 4.6%. Las cepas presentaron altos porcentajes de los genes de virulencia *ecp* 98%, *fimH* 86%, *traT* 77%, *sfa/focDE* 74%, *papC* 62%, *iutA* 48% y *fyuA* 44%. La resistencia antimicrobiana se presentó por arriba del 50% en Ampicilina/Sulbactam, Ampicilina, Piperacilina, Trimetropim/Sulfametoxazol, Ciprofloxacin y Levofloxacin.

Paniagua y cols., 2015, trabajaron con 194 cepas de *E. coli* en México, llevaron a cabo la identificación de biomarcadores de virulencia, así como el perfil de susceptibilidad antibiótica. Las cepas presentaron un alto perfil de resistencia en Cefalotina 97.9%, Ampicilina 97.4%, Cefotaxima 72.7% y Trimetropim/Sulfametoxazol 66%. Se detectaron los biomarcadores de virulencia *pap 24.7%, papGII 21.1%, papGIII 21.1 %, fim 61.3%, iha 64.9%, iuc 16.5%, cnf-1 7.2%, hlyA 15.4%,* y *vat* 5.6% los cuales concuerdan con 9 de los genes que se estudiaran en el presente trabajo.

Estrada y cols., 2017, trabajaron con 50 aislamientos de *E. coli* aisladas de ITU en localidades de la ciudad de México (norte y sureste). Realizaron la serotipificación de las cepas, así como ensayos de adherencia, formación de biopelícula, producción de hemolisina, susceptibilidad antibiótica, grupo filogenéticos y genes de virulencia. Los grupos filogenéticos predominantes fueron B2 60% y F12%.

Los genes de virulencia presentes en altos porcentajes fueron *fimH* 96*%, iutA* 66% y *sat* 36%. El 21.5% del total de aislamientos pertenecieron al grupo O25 ST131.
La producción de hemolisina y biopelícula fue significativamente mayor en cepas del sureste. La resistencia de Ampicilina 92%, Tetraciclina 76% y Trimetropim/Sulfametoxazol 70%, fueron las más comunes en ambos grupos.

Antecedentes Directos

En los estudios previos que se han realizado en el grupo de investigación del laboratorio de biología molecular de enteropatógenos donde se desarrolló el presente trabajo de tesis, se ha trabajado con muestras de orina de pacientes mexicanos cursando con ITU para el aislamiento bacteriano desde el año 2011 al 2017. De estas muestras se tienen seis ceparios diferentes de UPEC. Además, se ha encontrado que la incidencia de infecciones por UPEC es mayor en mujeres (90%). Los ceparios anteriormente mencionados varían según su origen siendo éstos de Hospitales públicos y privados del estado de México, Puebla y Sonora. Existe una mayor prevalencia en muestras provenientes de pacientes femeninos que va de 60 al 90%. Se han encontrado de 52 a 59 serotipos diferentes en los seis ceparios, destacando el serogrupo O25:H4 (8-16%) después de los NT (18-22%). En estos ceparios, se reporta la presencia de grupos filogenéticos A, B1, B2, C, D y F en distintios porcentajes, siendo los mas altos el grupo filogenetico B2 con 36-92% y el Grupo A con 33-41%. A las cepas de *E. coli* aisladas de ITU se les determino perfil de resistencia a 12 antibióticos de 6 familias en el 2011, 15 antibióticos de 6 familias en el 2015, 20 antibióticos de 8 familias en el 2016, ampliándose el número de antibióticos con el paso de los años para finalmente determinarse 24 antibióticos pertenecientes a 10 familias (o 13 grupos según la clasificación por resistencia de Magiorakos y col. 2012). Con respecto a la clasificación de MDR en estos ceparios, esta se presenta de un 71-100%, presentándose cepas XDR 5-10% y NMDR 3%. A los seis ceparios se les determino la presencia de factores de virulencia. La búsqueda de genes asociados a estos factores se fue incrementando con el paso del tiempo, iniciando en el 2011 con la detección de los genes *hylA, papGII, papGIII, mH, fliC, iucD, vat, sat, iha y cnf-1,* para un total de 10 genes. En el 2015, se detectaron los genes *fimH, Iha, iucD, vat, fliC, satA, papGII, papGIII, Ecp1, Ecp2, fimH, iucD y sat*, para un total de 13 genes. En el año 2016, se incia la búsqueda de los factores de virulencia *fimH, Ecp1, Ecp2, Iha, iucD, sat, fliC, papA, vat* y *hylA*, para un total de 13 frangmentos geneticos (9 factores asociados a virulencia) manteniéndose la búsqueda de este numero de genes hasta el presente año. La determinación de bandas plasmídicas se realizó en los ceparios del 2016 al 2018 siendo los tamaños de plasmidos mas frecuentes 100-127kb, 50-70 kb, 3kb, 2kb y 1kb (Zarzosa,2016, Garcia, 2017, Ballesteros, 2018 y Perez, 2018).
Ademas, realizaron la búsqueda de islas de patogenicidad presente en los diferentes ceparios, encontrándose la isla PAI ICFT073 como la de mayor porcentanje en dos de los seis ceparios (Zarzosa, 2016 y Ballesteros, 2018), mientras que la isla PAI IICFT073 se encontró prevalente en uno de los seis ceparios (Perez, 2018)

5.JUSTIFICACIÓN

En los últimos años, la frecuencia con la que se producen infecciones de tracto urinario (ITU) causadas por *E. coli* uropatógena ha ido en aumento, aunado a la resistencia que ha desarrollado este microorganismo a las diferentes familias de antibióticos, se ha vuelto una problemática grave de salud pública en México. A la par del surgimiento de cepas de UPEC multirresistentes a nivel mundial, se ha reportado que el tratamiento administrado a pacientes que cursan una ITU es cada vez más ineficaz. Por lo cual, resulta de vital importancia comprender el comportamiento de este importante patógeno por medio del estudio del perfil de resistencia, de sus genes de virulencia y de resistencia, de la capacidad de formación de biofilm y de transferir propiedades de virulencia. Este análisis nos brindará un panorama amplio de la patogenicidad de este microorganismo, generando nuevo conocimiento que permitirá en un futuro ayudar al desarrollo de un tratamiento eficaz contra este importante agente bacteriano.

6. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la actualidad las infecciones de tracto urinario representan un serio problema de salud pública a nivel mundial, incrementando año con año las tasas de mortalidad, morbilidad y gastos médicos. En México, el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica reportó que en 2010 las ITU ocuparon el tercer lugar dentro de las principales causas de morbilidad. Dada la capacidad de transferencia de material genético en bacterias y el uso indiscriminado de antibióticos de amplio espectro, en nuestro país nos enfrentamos a la aparición de cepas de *E. coli* uropatógena altamente virulentas y resistentes a diferentes familias de antibióticos sobre todo a los antibióticos de primera y segunda elección para el tratamiento de ITU.

7.HIPÓTESIS

E. coli aislada de infección de tracto urinario de población mexicana, posee características de patogenicidad diferentes a las cepas reportadas en otros países, existiendo una relación genotípica entre los factores de virulencia y resistencia, así como una relación fenotípica entre la formación de biofilm y la resistencia a antibióticos.

8.OBJETIVOS

8.1 GENERALES

Determinar las características de virulencia, resistencia a antibiótica, capacidad de transferencia de material genético y formación de Biofilm en cepas de *E. coli* aisladas de infección urinaria en población mexicana.

8.2. ESPECÍFICOS

1) Determinar el perfil de susceptibilidad antibiótica en *E. coli* aisladas de pacientes con ITU de un Hospital de Salud Pública (ISSSTE).

2) Determinar la CMI a Colistina (ISSSTE y O25:H4).

3) Identificar la producción de BLEE de las cepas del ISSSTE.

4) Determinar la formación de biofilm (ISSSTE y O25:H4).

5) Obtener el patrón de virulencia de las cepas del ISSSTE.

6) Detectar la presencia de genes involucrados en la expresión de BLEE (bla-*SHV, bla-CTX-, bla-TEM* y *bla-OXA 1*) de dos ceparios (ISSSTE y O25:H4).

7) Determinar el perfil plasmídico del cepario del ISSSTE.

8) Determinación de la capacidad de transferencia del material genético por conjugación.

9. MATERIAL Y MÉTODOS

9.1 MATERIAL BIOLÓGICO.

9.1.1. CEPAS DE *E. COLI* AISLADAS DE ITU.

Se usaron un total de 116 cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con ITU pertenecientes a dos ceparios: el primero de 51 cepas de *E. coli* donadas por el Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSSTE) en el 2016 y el segundo por 65 cepas de *E. coli* serotipo O25 aisladas de pacientes cursando ITU provenientes de hospitales públicos y privados durante el periodo del en el periodo 2011-2015. Las cepas se encuentran almacenadas en crioconservación a -70°C.

9.1.2 CEPAS CONTROL

TABLA 2. **CEPAS CONTROLES USADAS EN EL PRESENTE TRABAJO.**

CEPA	CARACTERÍSTICAS
UPEC CFT073	Positivo a *iucD, vat, sat, hylA, papGII, fliC y fimH*
O59I	Positivo a *sat, vat y papGIII*
GAG1	Positivo a *iucD, sat, hlyA, papA, fliC, fimH y cnf*
EHEC/EDL	Cepa tipo EHEC, usada como control en perfil plasmídico por su plásmido de 92kb
E. coli ATCC 25922	Cepa control positivo en los ensayos de Biofilm, perfil de resistencia y CMI.
C7225	Positivo para *bla* $_{OXA-1}$ *y* bla_{CTX} M-U
SA42	Positivo para bla_{shv}
1550	Positivo para bla_{TEM}
O58I	Positivo para *traT*
C3304	Positivo para MOB_{F12}
E. coli K12 C600	Cepa control receptora en los ensayos de conjugación

9.2 MÉTODOS

9.2.1 PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA EXTRACCIÓN DE MATERIAL GENÉTICO

Se tomaron 20 µl de cada cepa almacenada en criovial a -70ºC para inocular 5 ml de caldo LB. Los tubos se incubaron a 37°C, 220 RPM por 18 a 24 hrs. Por una parte, a partir del precultivo, se obtuvo un paquete celular de 3 ml por centrifugación a 12,000 RPM 5 min, el cual fue usado para extracción de DNA plasmídico. Por otra parte, usando 80 µl del precultivo restante, se inocularon 5 ml de caldo LB hasta obtener una densidad óptica a 260 nm (DO_{260nm}) de 0.5. Se obtuvo un paquete celular de 500 µl por centrifugación a 12,000 RPM 5 min que fue usado para extracción de DNA genómico.

9.2.2 EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO.

Se resuspendió la pastilla en 570 µl de buffer SET (sacarosa, EDTA-TRIS), se agitó 30 segundos en vortex, se agregaron 60 ml de SDS al 20% invirtiendo para homogeneizar y se agitó 20 segundos en vortex evitando hacer burbujas. Se incubó a 80°c por 5 min, dejando enfriar antes de agregar 2µl de RNAsa e incubar 45 minutos a 37°c. Tras enfriar a temperatura ambiente, se adicionó 200 µl de NaCl 5 M para posteriormente invertir 20 segundos, dejar 60 segundos reposando, agitar 60 segundos y dejar reposar 60 segundos.
Las muestras se colocaron 5 minutos en hielo y se centrifugaron 10 minutos a 12000 RPM. Se pasó el sobrenadante aun tubo nuevo y se agregó 800 µl de isopropanol, invirtiendo las muestras durante 1 minuto. Se centrifugó 20 minutos 12,000 RPM, decantando el sobrenadante resultante. Se realizaron tres lavados de 800 µl de etanol al 70%, centrifugando 5 minutos. Se dejó secar a pastilla para posteriormente resuspender en 75 µl de TRIS 10mM pH 8.

9.2.3 EXTRACCIÓN DE DNA PLASMÍDICO

A la pastilla obtenida de 3 ml de precultivo, se le agregaron 152 µl de solución 1 (Lisozima, RNAsa y buffer SET), se resuspendió en vortex y se incubó a 37ºC por 15 minutos. Se agregó 300 µl de solución 2 (150 µl de NaOH 0.4N y 150 µl de SDS AL 2%) Se invirtió 5 veces y se mantuvo 5 minutos en hielo. Se añadió 420 µl de acetato de potasio 2.7 M, se invirtió 9 veces y se mantuvo en hielo 15 minutos para centrifugar 20 minutos a 12,000 RPM. Se pasó suavemente el sobrenadante con micropipeta a un tubo conteniendo 400 µl de fenol/ cloroformo, se invirtió 50 veces para homogeneizar y se centrifugó 5 minutos a 12,000 RPM.
Se transfirió el sobrenadante a otro tubo con 400 µl de cloroformo, se invirtió 100 veces y se centrifugó 5 minutos a 12,000 RPM. Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo, se añadió etanol absoluto hasta 1.5 ml manteniendo en refrigeración toda la noche. Se centrifugó15 minutos a 12,000 y se decantó el sobrenadante, se agregarón 800 µl de etanol al 70% y se centrifugó 5 minutos a 12,000. Se decantó y se dejó secar la pastilla, resuspendiendo en 70 µl de H_2O Tridestilada estéril.

9.3 PERFIL DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIBIÓTICA POR EL MÉTODO DE KIRBY-BAUER

La susceptibilidad antibiótica se determinó para 24 antibióticos mediante el método de difusión en disco (Kirby- Bauer) siguiendo los lineamientos del Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI 2016). Como cepas de referencia se usó *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 cuyos halos de inhibición y perfiles de susceptibilidad están indicados en la Tabla 8. Los antibióticos usados según la familia y la concentración de los sensidiscos indicada entre paréntesis son los siguientes:
Aminoglucósidos: Gentamicina(10ug), Netilmicina(30ug), Amikacina(30ug)
β-lactamicos: 1era generación- Ampicilina(10ug), Cefalotina(30ug), Cefuroxima(30ug), 3ra generación- Ceftriaxona(30ug), Ceftazidima(30ug), Cefotaxima (30ug), 4ta generación-Cefepime(30ug), Monobactam Aztreonam(30ug). Amoxicilina/Acido clavulánico(20/10ug).

Quinolonas: 1era generación- Ácido Nalidixico(30ug).
Fluoroquinolonas: 2da generación Norfloxacina(10ug), Ciprofloxacina(5ug), Ofloxacina(5ug). 3ra generación- Levofloxacina(5ug).
Carbapenémicos: Ertapenem(10ug).
Antagonistas del folato: Trimetropim/Sulfametoxazol (1.25/23.75ug).
Fenicoles: Cloranfenicol(30ug).
Fosfonatos: Fosmomicina(50ug).
Polimixinas: Colistina(10ug).
Tetraciclina: Tetraciclina(30ug).
Nitrofurantoína: Nitrofurantoina(300ug).

Se sembraron 5 µl de la cepa problema en placas de medio TSA por estría cruzada y se incubó estáticamente a 37ºC, 18-24 hrs. Con un asa bacteriológica se tomó una colonia aislada y se sembró en tubos con 5 ml de medio TSB, se incubó a 37º hasta alcanzar una turbidez equivalente a 1,5 x 10^6 UFC/ml (Equivale al tubo No. 5 de la escala de Mc Farland).
Posteriormente se sumergió un hisopo en el cultivo eliminando el exceso de este, rotándolo contra la pared interna del tubo y se sembró frotando el hisopo sobre la superficie de la placa de Agar Müller Hinton. Esta última acción se repitió tres veces girando la placa 45º para sembrar uniforme y masivamente la placa.
Se dejó secar la muestra durante tres minutos y se colocaron los discos de antibióticos con una pinza estéril oprimiendo ligeramente con la pinza para asegurar el buen contacto con el medio; los sensidiscos se colocaron dependiendo del tamaño del halo que forman, para que no existiera interacción entre ellos. (Figura 2). Finalmente se incubaron a 37ºC durante 18 horas y se midieron los halos de inhibición para determinar la resistencia o sensibilidad de las cepas a los antibióticos según la "Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing" (CLSI 2017). Se realizaron cinco placas por cepa, diferenciándose cada una de ella por colores como se muestra en la figura 2.

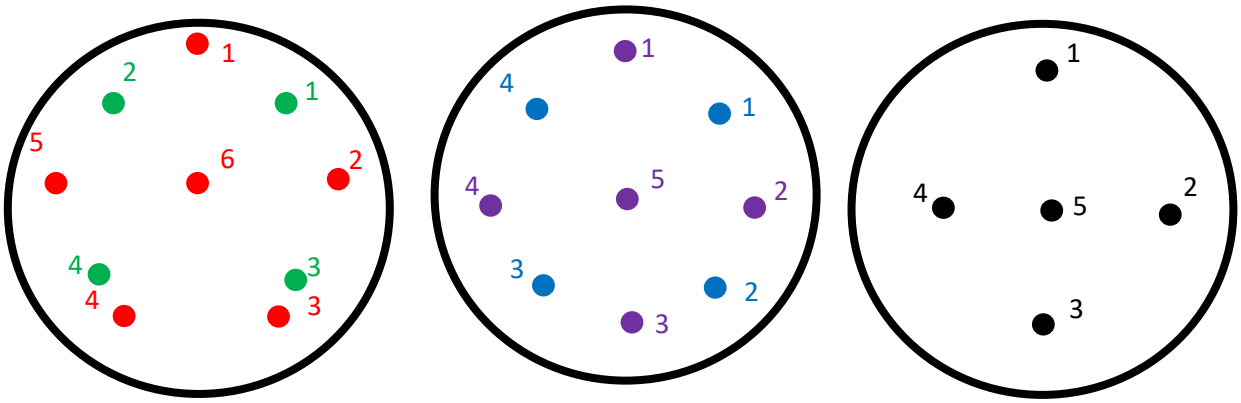


Figura 2. Distribución de discos de antibióticos. Rojo: 1 CRO (ceftriaxona), 2 CTX (cefotaxima), 3 CFZ (ceftazidima), 4 ATM (aztreonam), 5 FEP (cefepime), 6 AMC (amoxicilina/acido clavulánico). Verde: 1 C (cloranfenicol), 2 CFX (cefuroxima), 3 AN (ácido nalidixico), 4 CIP (ciprofloxacino). Morado: 1 GM (gentamicina), 2 NET (netilmicina), 3 OFX (ofloxacino), 4TSX (trimetropim/sulfametoxazol), 5 AMK (amikacina). Azul: 1 FOS (fosfomicina), 2 TC (tetraciclina), 3 COL (colistina), 4 ERT (ertapenem). Negro: 1 AM (ampicilina), 2 LVX (levofloxacina), 3 NF (nitrofurantoina), 4 NOR (norfloxacina), 5 CF (cefalotina).

TABLA 3. **VALORES DE REFERENCIA USADOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN Y PERFILES DE SUSCEPTIBILIDAD.**

Valores de referencia					Valores de resistencia		
Abreviatura	Antibiótico	Concentración	*Escherichia coli ATCC25922*	*Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853*	Resistencia	Intermedias	Sensibles
GM	Gentamicina	10µg	19-26	17-23	≤12	13-14	≥15
NET	Netilmicina	30 µg	22-30	17-23	≤12	13-14	≥15
OFX	Ofloxacina	5 µg	29-33	17-21	≤12	13-15	≥16
TSX	Trimetropim/sulfametaxazol	1.25/23.75 µg	23-29	-	≤10	11-15	≥16
AMK	Amikacina	30 µg	19-26	18-26	≤14	15-16	≥17
AM	Ampicilina	10 µg	16-22	-	≤13	14-16	≥17
LVX	Levofloxacina	5 µg	29-37	19-26	≤13	14-16	≥17
NF	Nitrofurantoina	300 µg	20-25	-	≤14	15-16	≥17
NOR	Norfloxacina	10 µg	28-35	22-29	≤12	13-16	≥17
CF	Cefalotina	30 µg	15-21	-	≤14	15-17	≥18
CFZ	Ceftazidima	30 µg	25-32	22-29	≤17	18-20	≥21
CFX	Cefuroxima (oral)	30 µg	20-26	-	≤14	15-22	≥23
C	Cloranfenicol	30 µg	21-27	-	≤12	13-17	≥18
AN	Ácido Nalidixico	30 µg	22-28	-	≤13	14-18	≥19
CRO	Ceftriaxona	30 µg	29-35	17-23	≤19	20-22	≥23
CIP	Ciprofloxacin	5µg	30-40	25-33	≤15	16-20	≥21
CTX	Cefotaxima	30 µg	29-35	18-22	≤22	23-25	≥26
AMC	Amoxicilina Ac/Clavulánico	20/10 µg	18-24	-	≤13	14-17	≥18
FEP	Cefepime	30 µg	31-37	24-30	≤14	15-17	≥18
ATM	Aztreonam	30 µg	28-36	23-29	≤17	18-20	≥21
FOS	Fosfomicina	200 µg	22-30	-	≤12	13-15	≥16
COL	Colistina	10 µg	22-30	-	≤10	-	≥11
ETP	Ertapenem	10 µg	22-30	-	≤18	19-21	≥22
TC	Tetraciclina	30 µg	28-36	23-29	≤11	12-14	≥15

Los valores fueron obtenidos del CLSI 2017.

9.4 CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) A COLISTINA

La CMI a colistina se llevó a cabo por medio de una modificación del método empleado por Liofilchem Sensi Test a Colisitina (Clinicians, 2017) sustituyendo la placa comercial por tubos chicos estériles de vidrio. Para obtener la solución stock de colistina (20 µg/ml) se realizó la dilución del antibiótico a partir de sensidiscos. Se disolvieron 4 sensidiscos de 10 µg (40 µg) en 2 ml de H_2O tridestilada estéril dejándose reposar 8 hrs. Se filtró la dilución del antibiótico, con la finalidad de eliminar los residuos que pudieran quedar del sensidisco. Se obtuvo una concentración final de 40 µg en 2 ml de H_2O. Según lo anterior, se realizó el cálculo equivalente para obtener la concentración más alta (16 µg/ml). Se colocaron 800 µl del stock a el tubo no.8 (16 µg/ml), al tubo no.7 (8 µg/ml) se le agregó 800 µl de H_2O y 800 µl de antibiótico, a partir del tubo no.6 (4 µg/ml) hasta el no. 2 (0.25 µg/ml), se agregó 800 µl de H_2O y 800 µl del tubo previo.

El tubo no. 1 (0 µg/ml) al no contener antibiótico fue usado como control de crecimiento bacteriano. Se usó la cepa control (suceptible a colistina) *Escherichia coli* ATCC® 25922 siendo su CMI (concentración mínima inhibitoria) 0.25 −2 µg/ml. Las concentraciones y su ubicación se pueden ver en la tabla 6.

A la par que se distribuyó el antibiótico en los tubos, sembraron 5 µl de la cepa problema a partir del criovial, en medio TSA por estría cruzada y se incubó durante toda la noche. Se tomó una colonia aislada, se resembró en 3 ml caldo TSB y se incubó a 37º hasta alcanzar una turbidez equivalente a 1,5 x 10^6 UFC/ml (0.5 de la escala de Mc Farland). Se hizo una dilución 1:20 de la suspensión bacteriana colocando 500 µl en 10 ml de solución salina (Solución A). Se añadieron 400 µl de la solución A en un tubo de 3.6 ml del caldo Mueller Hinton (Solución B). Se colocaron 100 µl de la Solución B en cada uno de los tubos de vidrio con su respectiva concentración de antibiótico y se incubaron a 36 ± 2°C por 16-20 horas en temperatura ambiente.

TABLA 4. **CONCENTRACIONES USADAS PARA LA DETERMINACIÓN CMI PARA COLISTINA.**

Control de crecimiento	Concentración de colistina (µg/ml)						
	Número de tubo						
1	2	3	4	5	6	7	8
0.0	0.25	0.5	1	2	4	8	16

9.5 DETERMINACIÓN DE BIOFILM EN ENSAYO DE MICROPLACA

Se sembraron 5 µl de cada cepa a partir de criovial en agar LB (placas Petri (35X10 mm) por estría cruzada, para obtener una colonia aislada. Se sembraron dos cepas por placa cuidando de inocular de manera inversa para evitar que se crucen entre ellas. Se recuperó una colonia de 1 a 2 mm y se inoculó en 3 ml de LB. Se incubó entre 2-2.5 hrs hasta la escala 2 del nefelómetro de MacFarland que corresponde a (6X10^{8} bact/ml) con una DO_{600nm} de 0.31. Posteriormente se realizó una dilución 1:250 en TSB (4 µl del cultivo en 1ml de TSB usando tubos eppendor agitando para homogeneizar la dilución).

De la dilución obtenida se colocó 200 µl en cada pocillo de la microplaca por triplicado y se dejó incubar por 24hrs a 37ºc. Se midió la $DO_{620\ nm}$ en el programa Biofilm 1 del lector de micro placas universal Elx800UV. Se retiró el medio y se realizaron dos lavados con agua tridestilada. Se colocaron 150 µl de Cristal violeta al 0.1% a cada pocillo dejándose incubar de 15 a 20 minutos. Se realizarón dos lavados con 200 µl de agua destilada y se dejó secar la micro placa, cuidando de no dejar rastros de Cristal violeta. Se colocarón 200 µl de ácido acético al 30% en cada pocillo y se midió la DO_{562nm} en el programa Biofilm 2 del lector de micro placa Elx800UV.

Se usó la formula **SBF = (AB-CW) / G** para calcular la formación específica de biofilm. Donde SBF es la formación específica de biofilm, AB es la DO_{560nm} de las bacterias teñidas, CW es el DO_{560} nm de los pocillos teñidos de control que contiene sólo medio libre de bacterias, y G es el DO_{620nm} de la célula crecida en el medio. Se sacó un promedio de los ensayos por triplicado y se calculó la desviación estándar junto con su porcentaje.

Se graficó y según los puntos de corte se clasificaron en formadoras de biofilm y no formadoras de biofilm. Los puntos de corte se realizaron según el promedio de la $DO_{562\ nm}$ de cuatro ensayos realizados para la cepa control positivo *Escherichia coli* ATCC® 25922, calculandose un Rango de 0.5 a 1.0 para las cepas formadoras de biofilm, las muestras inferiores a este rango se considearron como no formadoras de biofilm. (Modificado de: Crémet y cols.,2013; Tabasi y cols.,2015).

9.5.1 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS EN LOS ENSAYOS DE BIOFILM

Se sembraron 5 µl del crio vial en placas de LB (35X10mm) por la técnica de estría cruzada para obtener una colonia aislada. Se sembraron dos cepas por placa cuidando de inocular de manera inversa para evitar que se cruzaran entre ellas. Se recuperó una colonia de 1 a 2 mm y se inoculó en tubos de LB de 3 ml.
Se incubó de 2-2.5 hrs hasta obtener un crecimiento similar a la escala 2 del nefelómetro de MacFarland que corresponde a ($6X10^{8}$ bact/ml) con una DO_{600nm} de 0.31 A. Una vez alcanzada esta densidad, se realizó una dilución en tubos eppendor de 1:250 (4 µl del cultivo en un volumen final de 1 ml de TSB), agitando suavemente para homogeneizar la dilución. De la dilución obtenida se colocaron 200 µl en cada pocillo de la micro placa por triplicado y se dejó incubar por 24hrs a 37ºc.
Se realizó una primera medición de la DO_{620nm} en el programa Biofilm 1 del lector de micro placa Elx800UV. Se añadió 200 µl de la mezcla del reactivo A y B del Kit BCA Protein Assay Reagent PIERCE a 10 µl de la muestra, para realizarse un raspado de los pocillos por muestra (3 pocillos) juntándose en un tubo de restricción. Se colocó 10 µl de esta dilución en 190 µl de agua Tridestilada para posteriormente medir la DO_{620nm} en el programa de proteínas del lector de micro placas Elx800UV. Los valores obtenidos se comparan con los obtenidos de la curva de albumina la cual se realizó por duplicado en la misma placa siguiendo las diluciones en la tabla 5. Los valores obtenidos fueron graficados junto con la curva de albumina, se calculó la concentración obtenida después de la dilución hecha y se multiplicó por 20 para obtener la concentración real.

TABLA 5. **PREPARACIÓN DEL ESTÁNDAR DE LA CURVA DE ALBUMINA**

ESQUEMA DE DILUCIÓN PARA PROTOCOLO DE TUBO ESTÁNDAR Y PROCEDIMIENTO EN MICROPLACA			
Vial	Volumen del diluyente (µl)	Volumen de albumina (µl)	Concentración final de la albumina ((µg /ml)
A	0	300 del stock	2000
B	125	375 del stock	1500
C	325	325 del stock	1000
D	175	175 del vial B	750
E	325	325 del vial C	500
F	325	325 del vial E	250
G	325	325 del vial F	125
H	400	100 del vial G	25
I	400	0	0=Blanco

9.6 DETECCIÓN DE BIOFILM EN AGAR ROJO CONGO

Se sembraron 5 µl del criovial en placas de agar LB (placas Petri (35X10 mm) por la técnica de estría cruzada para obtener una colonia aislada. Se sembraron dos cepas por placa cuidando de inocular de manera inversa para evitar que se cruzaran entre ellas. Se recuperó una colonia de 1 a 2 mm y se inoculó en tubos con 3 ml de LB incubando a 37ºC 2-2.5 hrs hasta una turbidez igual a la escala 2 del nefelómetro de MacFarland que corresponde a ($6X10^{8}$ bact/ml) con una DO_{600nm} de 0.31 A.
Una vez alcanzada esta densidad, se procedió a hacer una dilución 1:250 (4 µl del cultivo en 1 ml de TSB usando tubos eppendor agitando para homogeneizar la dilución). De la dilución obtenida, se sembró 3 µl por gota en cada una de las divisiones realizadas en placas grandes de BHI-Rojo Congo, basado en una plantilla con 15 divisiones. Figura 3. Se dejó incubar por 24hr a 37ºc y se observó el cambio de coloración por gota. Según el cambio de coloración se clasificaron en no formadoras de biofilm (tonalidad rosa claro), formadoras de biofilm intermedias (tonalidad rosa con halo negro) y formadoras de biofilm (tonalidad negra) (Solati *et al.* 2015).

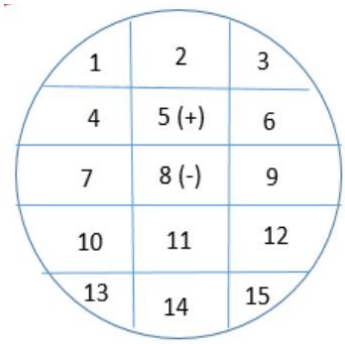


Figura 3. Plantilla usada en los ensayos de biofilm agar Rojo Congo. La plantilla corresponde a una placa grande de BHI-Rojo Congo, dividida en 15 secciones, en el centro se muestran los lugares a colocar la de las cepas controles positivo (*Escherichia coli* ATCC® 25922) y negativo (Cepa MC 4100).

9.7 DETECCIÓN DE GENES DE VIRULENCIA

Se llevó a cabo la búsqueda de 13 genes o fragmentos genéticos que constituyen 9 factores asociados a virulencia, para ello se realizaron 3 reacciones en cadena de la polimerasa múltiples (PCRm) y uno individual. La tabla 6 muestra el tipo de PCR usada (PCR múltiple o PCR individual), el nombre de los fragmentos genéticos o genes que se amplificaron, su longitud en pares de bases (pb), la cepa control utilizada para cada uno de los PCR y la temperatura de alineamiento (Tm).

Los amplificados fueron observados por electroforesis en geles de agarosa al 1%, teñidos con Bromuro de etidio (BET) a una concentración de 0.084 mM para su posterior foto documentación. Los resultados negativos para cada uno de los genes descritos fueron confirmados por PCR individual.

TABLA 6. **GENES DE VIRULENCIA AMPLIFICADOS Y CEPAS CONTROL UTILIZADAS EN CADA REACCIÓN DE PCR.**

PCR	Genes	Peso	Control +	Tm (C°)
PCRm1	*fimH* *fliC* *satA* *iucD*	210 pb 304 pb 384 pb 512 pb	CFT073	57.7
PCRm2	*iha* *vatP* *vatA* *papGIII* *papGII*	150 pb 226 pb 330 pb 412 pb 562 pb	CFT073+O59-I	61.4
PCRm3	*papA* *satP* *hlyA*	641 pb 880 pb 1,280 pb	GAG1	61.4
cnf-1	*cnf-1*	3,100 pb	GAG1	61.4

PCRm. Reacción en cadena de la polimerasa múltiple. ***fimH:*** Gen que codifica para la adhesina fimbrial del pili tipo 1**;** ***fliC****:* Gen que codifica para la adhesina flagelar; ***satA:*** Gen que codifica para la region autotransportadora de la toxina autotransportadora secretada; ***iucD:*** Gen que codifica para el receptor de aerobactina; ***iha:*** Gen que codifica para el receptor de enterobactina; ***vatP*****:** Gen que codifica para la region peptidasa de la toxina autotransportadora vacuolizante; ***vatA:*** Gen que codifica para la región autotransportadora de la toxina autotransportadora vacuolizante; ***papGII-III:*** Variantes alélicas del pili asociado a pielonefritis; ***papA*****:** Gen que codifica para la subunidad de pilina del pili asociado a pielonefritis; ***satP:*** Gen que codifica para la región peptidasa de la toxina autotransportadora secretada; ***hlyA*****:** Gen que codifica para la pro toxina α- hemolisina; **cnf-1:** Gen que codifica para el factor de necrosis citotóxico 1 . *Cepa donada por la Facultad de Medicina de la UNAM.

9.8 DETECCIÓN DE GENES CODIFICANTES DE BLEE

Se realizaron PCR individuales para los *genes* bla_{CTX-M}, bla_{OXA-1}, bla_{SHV} y bla_{TEM}, la obtención de resultados fue por medio de la metodología de electroforesis en gel de agarosa al 1% con tinción de bromuro de etidio. En la tabla 7, se muestran los pesos moleculares de cada producto según la PCR.

TABLA 7. **CARACTERÍSTICAS Y CONDICIONES DE LOS PRIMERS USADOS EN LAS DIFERENTES PCR PARA GENES CODIFICANTES PARA BLEES**

GEN	PRIMERS	TM	CEPA CONTROL	TAMAÑO DEL PRODUCTO	REFERENCIA
$\boldsymbol{BLA_{CTX-M}}$	CTXM-UNI-F: CGATGTGCAGTACCAGTAA CTXM-UNI-R: TTAGTGACCAGAATCAGCGG	52°	C7225	566 pb	Batchelor *et.al*, 2005
$\boldsymbol{BLA_{OXA-1}}$	F: ACA CAA TAC ATA TCA ACT TCG C R: AGT GTG TTT AGA ATG GTG ATC	61°	C7225	427 pb	Briñas et.al.,2003
$\boldsymbol{BLA_{SHV}}$	F: CAC TCA AGG ATG TAT TGT G R: TTA GCG TTG CCA GTG CTC G	52°	SA42	883 pb	Pitout.et.al.,2003
$\boldsymbol{BLA_{TEM}}$	F: ATT CTT GAA GAC GAA AGG GC R: ACG CTC AGT GGA ACG AAA AC	60°	1550	1209 pb	Belaaouaj et.al., 1994

Extraído de Cortés Cortés, 2016.

9.9 DETECCIÓN DE GENES *traT y* $\boldsymbol{MOB_{F12}}$

Se realizaron PCR individuales para los genes *traT* y MOB_{F12}, la obtención de los resultados fue por medio de la metodología de electroforesis en gel de agarosa al 1% con tinción de bromuro de etidio. En la tabla 8, podemos ver las cepas control utilizadas, así como el tamaño molecular por PCR. La presencia de ambos genes y la presencia de bandas plasmídicas fue un filtro de selección para las cepas a usar en los ensayos de conjugación.

TABLA 8. **PESO MOLECULAR Y CEPAS CONTROLES DE LAS PCR INDIVIDUALES *TRAT Y* $\boldsymbol{MOB_{F12}}$.**

TIPO DE PCR	PESO MOLECULAR	CEPA CONTROL
PCR *traT*	739PB	O58I
PCR $\boldsymbol{MOB_{F12}}$	243 PB	C3304

9.10 ENSAYOS DE CONJUGACIÓN

Previo a los ensayos por conjugación, se comprobó el fenotipo de resistencia sembrando las cepas en tubos con antibióticos respectivamente. Los ensayos de conjugación se realizaron a partir de las cepas sembradas en los tubos con antibióticos. Se sembraron 40 µl de la cepa donadora en 5ml de LB con antibiótico (Ampicilina); simultáneamente se sembró una asada de la cepa receptora en 20 ml de LB con antibiótico (Rifampicina). Se dejó incubar a 37°C O/N.

De los caldos crecidos, se tomaron 250 µl de la cepa donadora y 1 ml de la cepa receptora. Se realizó un lavado de ambas muestras centrifugando 5 min 12000 rpm. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió con medio LB con el fin de quitar el antibiótico, añadiéndose a un matraz con 20 ml de caldo LB. Se incubó la mezcla a 37°c durante 24hrs en estático, realizándose 6 placas para las diluciones de 10^0,10^{-1} hasta 10^{-5}.

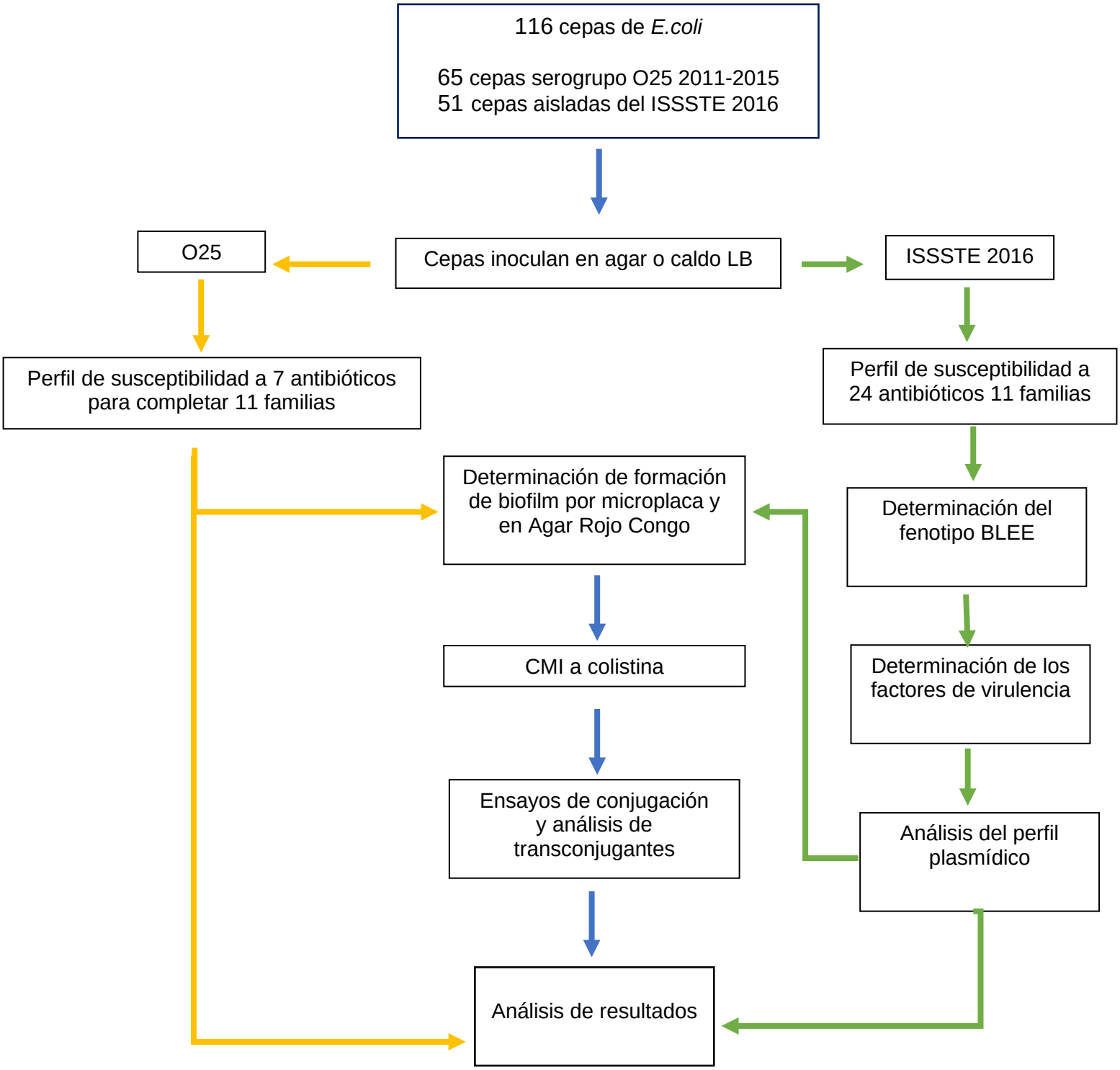
Se sembró en placas de agar LB con Ampicilina-Rimfapicina, colocándose 200 µl de cada dilución. Se dejó incubar por 24hrs. Tabla 9. A la par se realizaron placas chicas como controles para la cepa donadora y receptora de Ampicilina, Rifampicina y Ampicilina-Rifampicina juntos. Las cepas obtenidas en los ensayos fueron resembradas en una placa de antibiótico Ampicilina-Rifampicina con el fin de corroborar el fenotipo, aislarlas y almacenarlas por crioconservación a -70°c.

TABLA 9. **DILUCIONES REALIZADAS PARA EL ENSAYO DE CONJUGACIÓN EN MEDIO LB.**

10^0	**10^{-1}**	**10^{-2}**	**10^{-3}**	**10^{-4}**	**10^{-5}**
200µl **Inoculo puro**	100µl inoculo puro 900µl medio LB	100µl inoculo del tubo previo 900µl medio LB	100µl inoculo del tubo previo 900µl medio LB	100µl inoculo del tubo previo 900µl medio LB	100µl inoculo del tubo previo 900µl medio LB

Se realizaron 6 diluciones partiendo de 10^0 hasta 10^{-5}, de las cuales se tomó 200µl para inocular las placas de medio LB+ antibiótico (Ampicilina-Rifampicina).

10.ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO



11.RESULTADOS

En el presente trabajo se trabajó con dos ceparios. Se analizaron 116 cepas, de las cuales 51 cepas provenientes de pacientes femeninos cursando con ITU, del ISSSTE en la ciudad de Puebla en el 2016. Siendo el 7% pacientes en etapa fértil. En la tabla 10 se muestran los rangos de edad para cada uno de los ceparios utilizados en este trabajo. El segundo cepario, constituido por 65 cepas pertenecen al serogrupo O25 aisladas del 2011 al 2015. El 74% proviene de pacientes femeninos y el 12 % de pacientes masculinos y niños. Se desconoce el sexo de 1.5% (n=3) de las muestras.

TABLA 10. CARACTERÍSTICAS DE LOS DOS CEPARIOS DE *E. coli* OBTENIDOS DE PACIENTES CURSANDO CON ITU EN LA CIUDAD DE PUEBLA.

	PACIENTES	**Número de cepas**	**PACIENTES**
CEPARIO ISSSTE (2016)	21-86 años	51	Femeninos
CEPARIO O25 (2011-2015)	19-96 años	48	Femeninos
	53-94 años	8	Masculinos
	0-5 años	7	Niños
	-	2	Sexo no conocido

11.1 PERFIL DE SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS

A las 51 cepas de *E. coli* aisladas del ISSSTE, se les determinó el perfil de susceptibilidad antibiótica para 24 antibióticos de 10 familias distintas y a las cepas del serogrupo O25 se les completó con 4 antibióticos adicionales el perfil de susceptibilidad antibiótica previamente determinado por Zarzosa en el 2016 (20 antibióticos). Las cepas fueron clasificadas por perfil de susceptibilidad en sensible, intermedia y resistente. Siendo las cepas intermedias posteriormente consideradas como resistentes en todos los antibióticos exceptuando Colistina.

Las cepas de *E. coli* aisladas del ISSSTE son resistentes en un alto porcentaje a β-lactámicos 95.2%, quinolonas 94.9% y aminoglucósidos 52.2%, específicamente, representan de mayor a menor porcentaje de resistencia a los siguientes antibióticos: Ampicilina y Cefuroxima en un 100%, Norfloxacina y Ofloxacina, 98%, Ceftriaxona 97%, Amoxicilina-ácido clavulánico, Ciprofloxacina, Cefalotina y Levofloxacina 96%, Ceftazidima, Cefotaxima, Cefepime y Aztreonam 92%, Ácido nalidíxico y Tetraciclina 86%, Gentamicina 78%, Amikacina 63%, Netilmicina 16%, Fosfomicina y Colistina 12% (Figura 4).

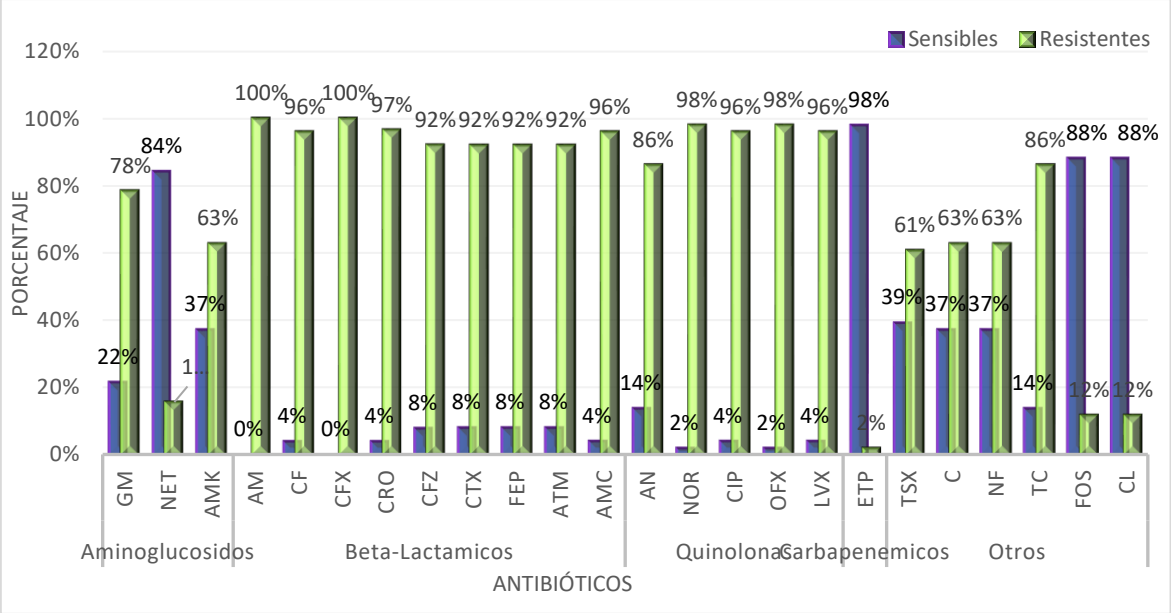


Figura 4. Perfil de susceptibilidad a 10 familias de antibióticos de cepas de *E. coli* aisladas de mujeres cursando con ITU del ISSSTE. GM: Gentamicina, NET: Netilmicina, AMK: Amikacina, AM: Ampicilina, CF: Cefalotina, CFX: Cefuroxima, CRO: Ceftriaxona, CFZ: Ceftazidima, CTX: Cefotaxima, FEP: Cefepime, ATM: Aztreonam, AMC: Amoxicilina/ ácido clavulánico, AN: Ácido nalidixico, NOR: Norfloxacina, CIP: Ciprofloxacina, OFX: Ofloxacina, LVX: Levofloxacina, ETP: Ertapemen, TSX: Trimetropim/sulfametoxazol, C: Cloranfenicol, NF: Nitrofurantoina, TC: Tetraciclina, FOS: Fosfomicina, CL: Colistina.

Estas cepas presentan una resistencia del 63 al 96% a los antibióticos usados como primera elección como lo es Cefalotina (CF), Trimetoprim sulfametoxazol (TSX) y Nitrofurantoína (NF) y del 86 al 98% para antibióticos usados como segunda elección (AN, NOR, OFX y LVX) (Figura 5).

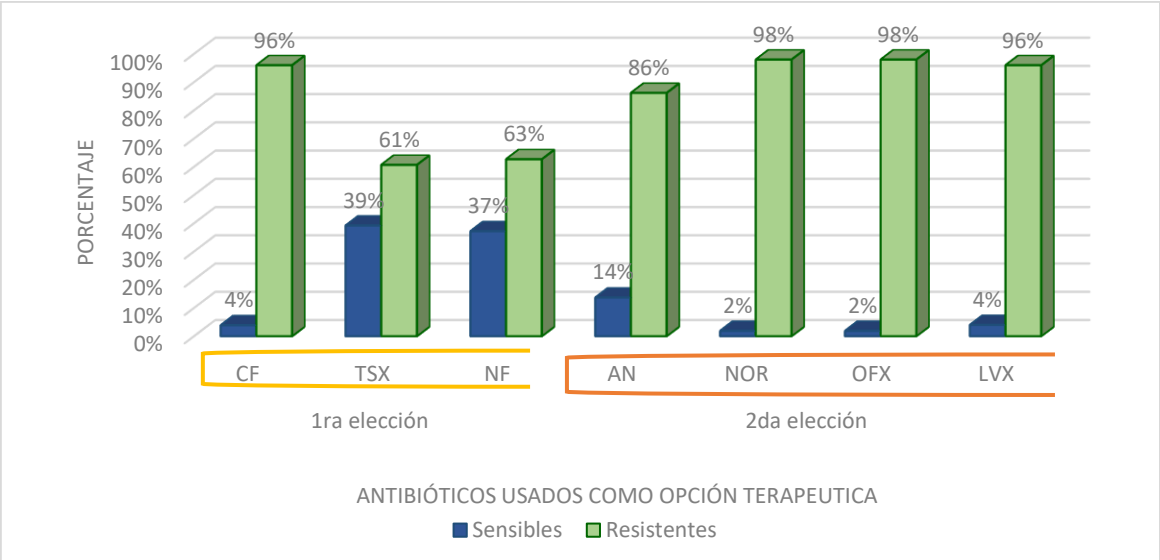


Figura 5. Perfil de susceptibilidad a antibióticos de primera y segunda elección en el tratamiento de ITU de cepas de *E. coli* aisladas de mujeres cursando con ITU del ISSSTE. CF: Cefalotina, TSX: Trimetropim/sulfametoxazol, NF: Nitrofurantoina, AN: Ácido nalidixico, NOR: Norfloxacina, OFX: Ofloxacina, LVX: Levofloxacina.

Las cepas del serogrupo O25, son resistentes en un alto porcentaje a β-lactámicos de primera generación (96.9%), así como a Quinolonas de segunda generación (81.1%) y aminoglucósidos (53.8%). Se presentó resistencia a Ampicilina 97%, Cefalotina en un 96% y Amoxicilina acido clavulánico 80%, Acido Nalidixico 85%, Norfloxacina 80%, Ciprofloxacina 83%, Ofloxacina 80%, y Levofloxacina 82%, Gentamicina 68% y Amikacina 66%, Trimetropim/sulfametoxazol 66% Colistina 23% y Fosfomicina 3%. Tal como se representa en la figura 8.

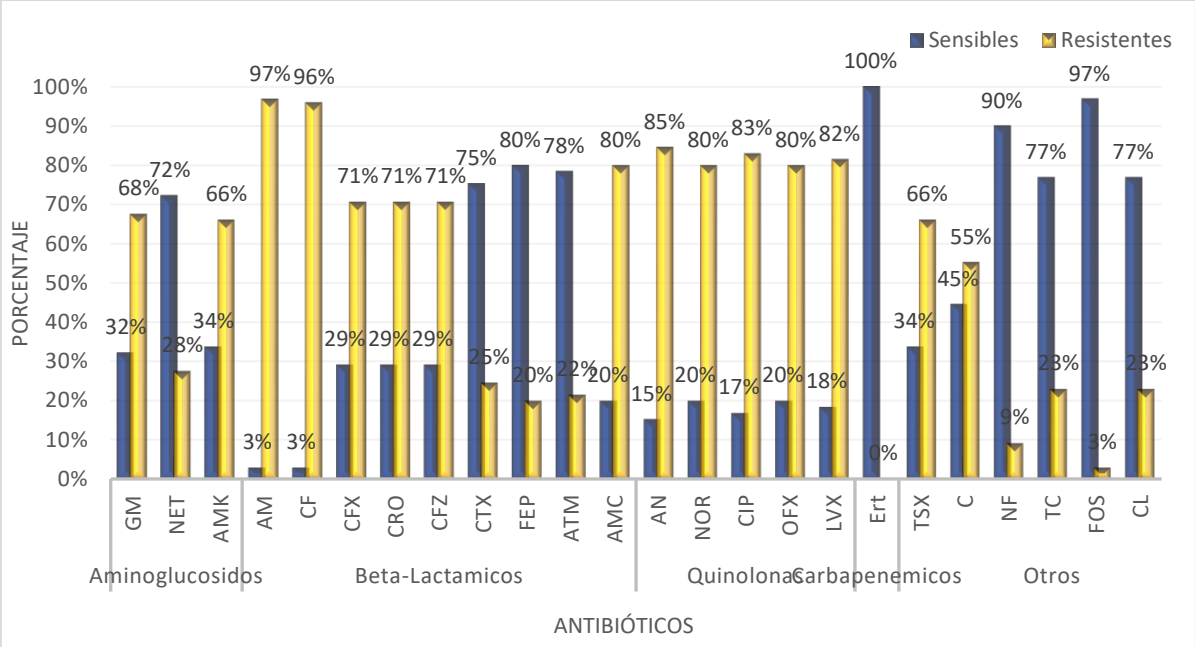


Figura 8. Perfil de susceptibilidad completo para las cepas O25. Se muestran las once familias (24 antibióticos totales), anexándose los antibióticos (Fosfomicina, Colisitina, Ertapenem y Tetraciclina) los cuales se realizaron en este trabajo (este estudio y Zarzoza Mendoza, 2016). GM: Gentamicina, NET: Netilmicina, AMK: Amikacina, AM: Ampicilina, CF: Cefalotina, CFX: Cefuroxima, CRO: Ceftriaxona, CFZ: Ceftazidima, CTX: Cefotaxima, FEP: Cefepime, ATM: Aztreonam, AMC: Amoxicilina/ ácido clavulánico, AN: Ácido nalidixico, NOR: Norfloxacina, CIP: Ciprofloxacina, OFX: Ofloxacina, LVX: Levofloxacina, ETP: Ertapemen, TSX: Trimetropim/sulfametoxazol, C: Cloranfenicol, NF: Nitrofurantoina, TC: Tetraciclina, FOS: Fosfomicina, CL: Colistina.

Estas cepas presentan una resistencia del 9 al 96% en el caso de los antibióticos usados como primera elección como lo es Cefalotina (CF), Trimetoprim Sulfametoxazol (TSX) y Nitrofurantoína (NF) y del 80 al 85% para antibióticos usados como segunda elección como lo es Ácido nalidixico (AN), Norfloxacina (NOR) , Ofloxacina (OFX) y Levofloxacina (LVX) (Figura 9).

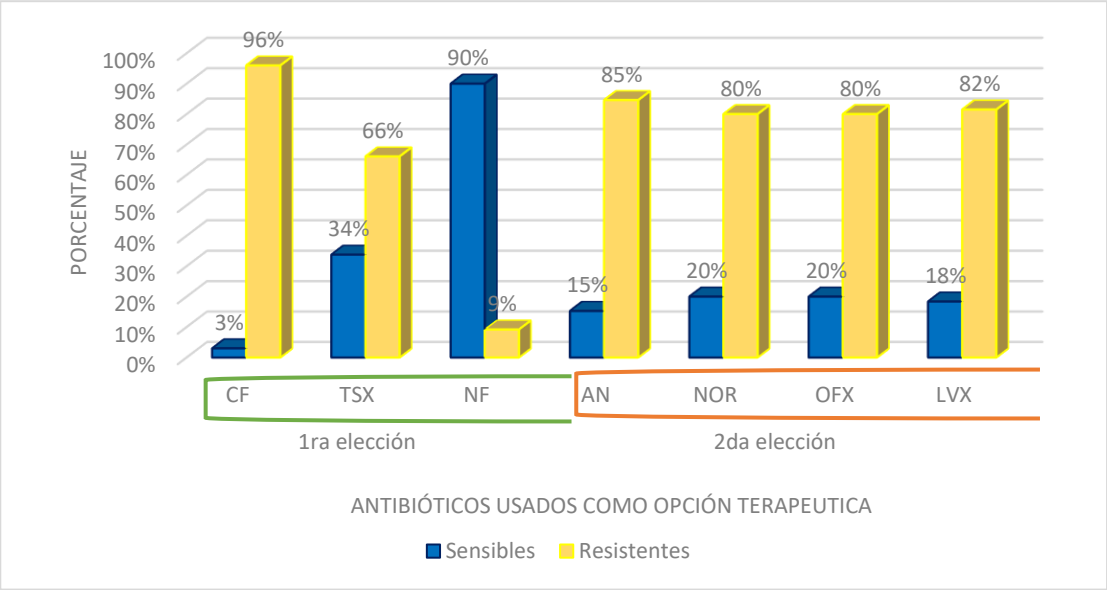


Figura 9. Perfil de susceptibilidad realizadas en las cepas del serogrupo O25. Se muestra los antibióticos usados como primera y segunda elección en cuanto a su porcentaje de susceptibilidad y resistencia. CF: Cefalotina, TSX: Trimetropim/sulfametoxazol, NF: Nitrofurantoina, AN: Ácido Nalidixico, NOR: Norfloxacina, OFX: Ofloxacina, LVX: Levofloxacina.

11.2 CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) A COLISTINA

Con la finalidad de confirmar el perfil de resistencia a colistina obtenido por el método de Kirby-Bauer, se realizó la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) a este antibiótico por el método de dilución en caldo (Figura 11 y Tabla 10). Se seleccionaron 21 cepas que resultaron resistentes a colistina por el método de Kirby –Bauer. De estas el 29% (6 cepas) pertenecen al cepario del ISSSTE mientras que el 71% (15 cepas) son de serogrupo O25 (Tabla 12).

TABLA 12. **DIÁMETRO EN MILÍMETROS DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN OBTENIDOS POR KIRBY-BAUER DE *E. coli* DE PACIENTES FEMENINAS (ISSTE) Y DEL SEROGRUPO O25.**

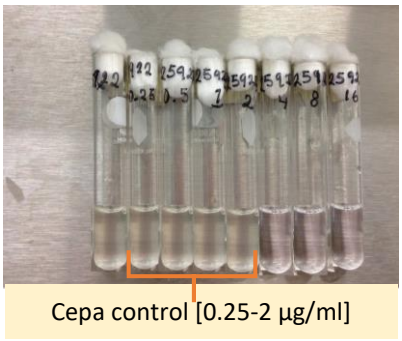
O25				**ISSSTE**	
Cepa	Polimixinas	**Cepa**	Polimixinas	**Cepa**	Polimixinas
	COL		COL		COL
CR14	10mm-R	**052I**	10mm-R	**157-I**	9mm-R
CR15	10mm-R	**070I**	10mm-R	**160-I**	9mm-R
CR22	10mm-R	**012H**	10mm-R	**165-I**	9mm-R
CR52	10mm-R	**73U**	10mm-R	**163-I**	10mm-R
CR70	6mm-R	**CR240**	10mm-R	**170-I**	10mm-R
CR115	8mm-R	**CR245**	10mm-R	**171-I**	10mm-R
003I	8mm-R	**020bI**	10mm-R	Total	6
030I	10mm-R				
Total	15				

R: clasificación del halo como resistente.

La CMI a colistina de las 21 cepas de *E. coli* probadas en este estudio fue de 16 µg/ml y de acuerdo con los criterios del CLSI, 2016, las cepas siguen siendo resistentes. En la figura 9. se muestran las imágenes de los resultados obtenidos con la cepa control (*E. coli* ATCC25922), así como una imagen representativa de las cepas probadas en este estudio.

A

.



B

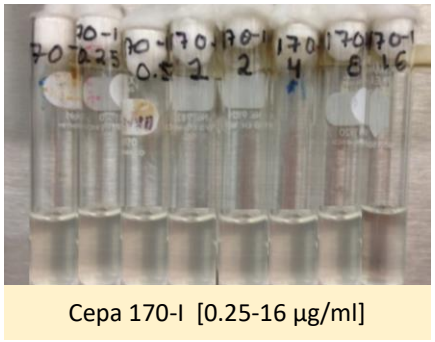


Figura 10. Resultados de CMI a colistina. A. Resultado de la cepa control *Escherichia coli* ATCC® 25922, el primer tubo es la cepa en caldo sin antibiótico, del segundo al quinto tubo se colocó una concentración de 0.25, 0.5, 1 y 2 µg/ml donde se observa turbidez. Del 6 al 8 tubo la concentración de colistina fue de 4, 8 y 16 µg/ml. B. Imagen que muestra los resultados de CMI para la cepa problema de *E. coli* 170-I, se puede apreciar la turbidez en donde hay crecimiento (tubos 1-7). La CMI para cada cepa aparece abajo de cada imagen

11.3 DETERMINACIÓN DE FENOTIPO DE B-LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO

La determinación del fenotipo BLEE solo se llevó a cabo con el ceparío del ISSSTE. El 23.5% de las cepas fueron productoras de BLEE, mientras que el 76.5% fue negativo para este fenotipo.

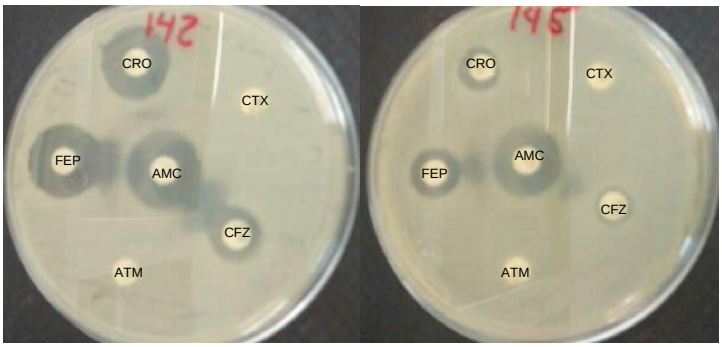


Figura 6. Perfil de susceptibilidad a antibióticos β-lactamicos. Se muestran dos imágenes representativas del perfil de susceptibilidad antibiótica a β-lactamicos, así como la formación de “cola de pescado” fenotipo típico de la producción de enzimas β-lactamasas. CRO: Ceftriaxona, CTX: Cefotaxima, CFZ: Ceftazidima, ATM: Aztreonam, FEP: Cefepime, AMC: Amoxicilina/ácido clavulánico.

TABLA 11. **POSIBLE CLASIFICACIÓN DE B-LACTAMASAS, SEGÚN SU INTERACCIÓN CON EL SUSTRATO PARA LAS CEPAS DEL ISSSTE.**

	3ra Generación			4ta Generación	Monobactam	No. sustratos	Perfil de sustrato	Posible β-lactamasa	Posible enzima presente
Cepa	CRO	CFZ	CTX	FEP	ATM				
112-I	R	R	R	R	R	2	CRO, ATM	2be, 2e o 2f	A
113-I	R	R	R	R	R	3	CRO, CTX, ATM	2be	A
114-I	R	R	R	R	R	3	CRO, CTX, ATM	2be	A
116-I	R	R	R	R	R	3	CRO, CTX, ATM	2be	A
119-I	R	R	R	R	R	3	CRO, CTX, ATM	2be,2e o 2f	A
131-I	R	R	R	R	R	2	FEP, ATM	2be,2e o 2f	A
134-I	R	R	R	R	R	3	CTX, FEP, ATM	2be	A
142-I	R	R	R	R	R	2	FEP, ATM	2be,2e o 2f	A
147-I	R	R	R	R	R	2	CTX, FEP, ATM	2be	A
148-I	R	R	R	R	R	3	CTX, FEP, ATM	2be	A
149-I	R	R	R	R	R	3	CTX, FEP, ATM	2be	A
150-I	R	R	R	R	R	1	ATM	2be,2e o 2f	A
*Interacción entre discos de antibióticos									

Anaranjado: Interacción entre los antibióticos probados. R: resistente, S: sensible.

Tras la determinación del perfil de susceptibilidad, se realizó la evaluación de la resistencia obtenida en 4 categorías, de acuerdo con sus características de resistencia a 13 grupos de antibióticos de acuerdo a los criterios de Magiorakos, *et. al.,* 2012 que son: **NMDR** (no multidrogo resistente) que presenta resistencia a 2 o menos grupos de antibióticos, **MDR** (multidrogo resistente) que presenta resistencia a 3 o más grupos evaluados, **XDR** (extremadamente resistente) que presenta susceptibilidad solo a 1 o 2 grupos de los 13 grupos evaluados y **PDR** (pandrogo resistente) resistencia a los 13 grupos clasificados por Magiorakos y cols.
El 10% de cepas de E. coli del ISSSTE analizadas fue XDR y el 90% de cepas fue MDR (Figura 7).

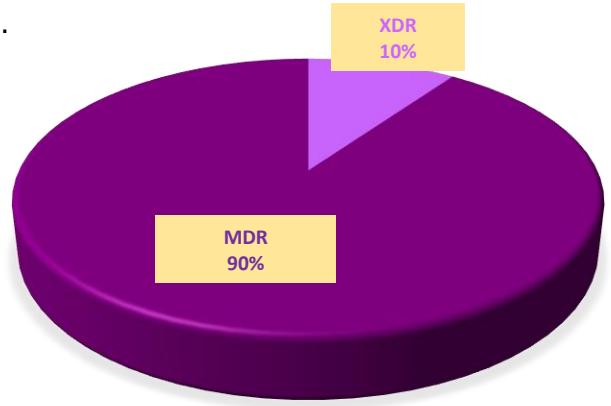


Figura 7. Clasificación de las cepas de *E. coli* provenientes de pacientes con ITU (ISSSTE, 2016) en base a los resultados del perfil de susceptibilidad a 13 grupos de antibióticos de acuerdo con Magiorakos *et. al.,* 2012. MDR: Multidrogo resistente y XDR: Extremadamente resistente.

Tras la determinación del perfil de susceptibilidad, se realizó la evaluación de la resistencia obtenida en 4 grupos según 13 grupo de antibióticos evaluados, de la misma manera en que se realizo para las cepas del ISSSTE. Obteniéndose un 100% de cepas MDR en las cepas del serogrupo O25. El estudio del fenotipo BLEE para este cepario, se reporta por Zarzosa en el 2016.

11.4 EVALUACIÓN DE LA FORMACIÓN DE BIOFILM EN MICRO PLACA Y AGAR ROJO CONGO

11.4.1 CEPAS ISSSTE

La formación de biofilm por micro placa se determinó para los dos ceparios. Esta técnica fue estandarizada en el presente trabajo haciéndose modificaciones a lo reportado por (Crémet *et.al*, 2013; Tabasi *et.al*, 2015). Las condiciones reportadas por estos autores son específicas para UPEC, por lo cual se utilizó los medios de cultivo LB y TSB según las condiciones reportadas por Crémet *et.al*, 2013, mientras que la DO a la que se dio lectura, la técnica de tinción con cristal violeta, la formula a partir de la cual se hizo el análisis y los puntos de corte fueron obtenidas de Tabasi *et.al*, 2015. Se obtuvieron los siguientes resultados: el 15% de las cepas del ISSSTE son productoras de biofilm y 85% de las cepas no presentan la capacidad de formar biofilm bajo las condiciones probadas (Figura 12).

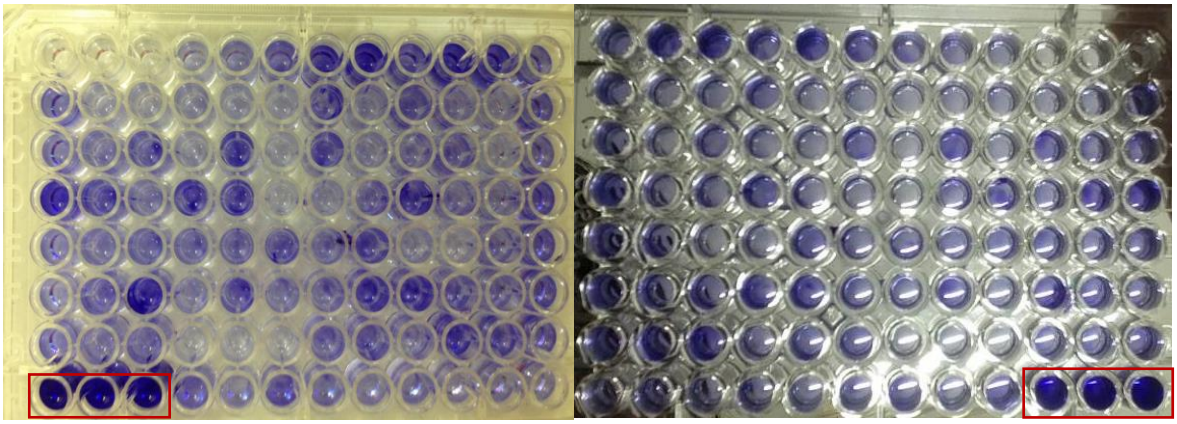


Figura 11. Imágenes representativas de los ensayos realizados para la determinación de formación de biofilm en micro placa. En rojo se muestra la coloración obtenida con la cepa control positivo ATCC *E. coli 25922* tras su tinción con cristal violeta.

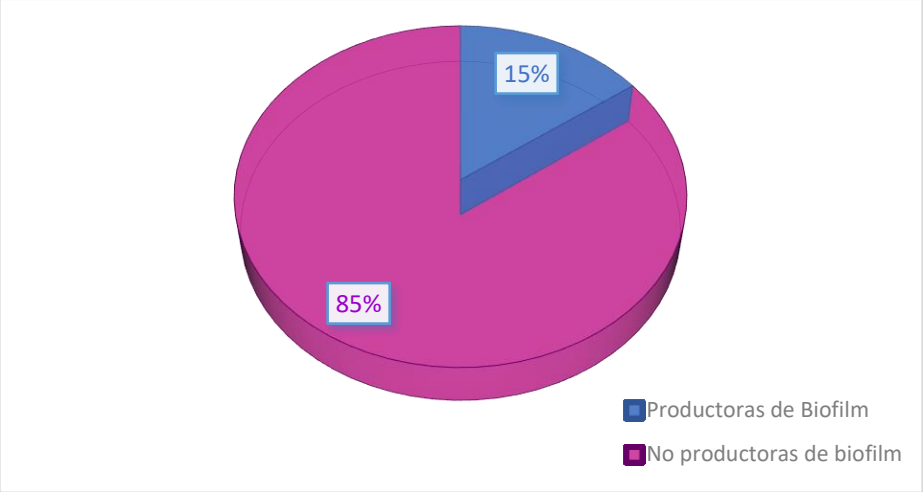


Figura 12. Evaluación de la formación de biofilm por la técnica en micro placa de 96 pocillos con cristal violeta en las cepas del ISSSTE. Productoras de biofilm: ≥ 0.5 $DO_{562nm,}$ No productoras de biofilm: ≤ 0.5 DO_{562nm}

El ensayo para determinar la formación de biofilm, se realizó por triplicado. Las cepas con una DO_{562nm} > 0.5 se consideraron como formadoras de biofilm, tal y como se representa en la gráfica de dispersión (Figura 13). Los puntos de corte se realizaron según el promedio de la $DO_{562\ nm}$ de cuatro ensayos realizados para la cepa control positivo *Escherichia coli* ATCC® 25922, calculandose un Rango de 0.5 a 1.0 para las cepas formadoras de biofilm, las muestras inferiores a este rango se considearon como no formadoras de biofilm (Modificado de: Cremmet *et.al*, 2013; Tabasi *et.al*, 2015).

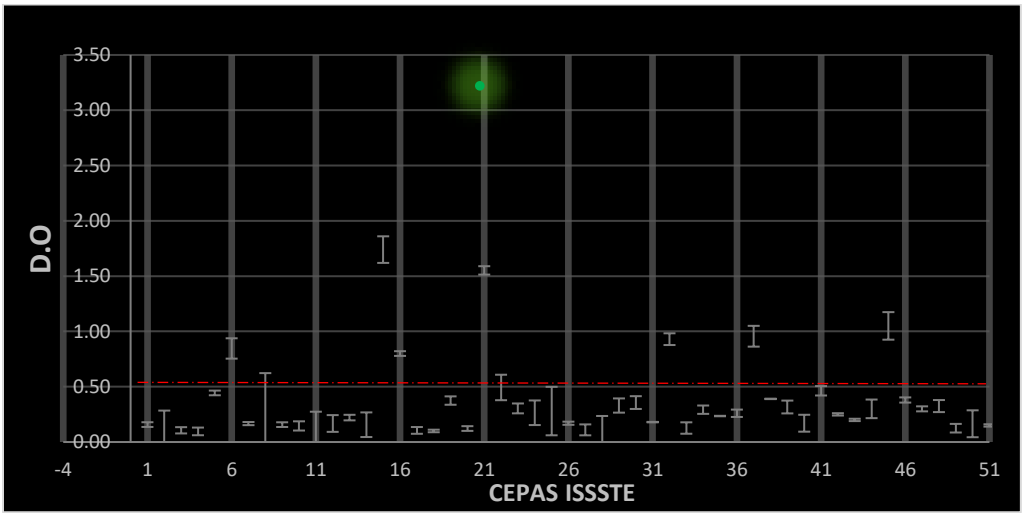


Figura 13. Formación de biofilm por micro placa en las cepas de *E. coli* del ISSSTE (2016). Grafica de dispersión de la formación de biofilm. Con una línea roja se indica el punto de corte. Las cepas con valores ≥0.5 fueron consideradas formadoras de biofilm. Los números en el eje de las abcisas indica el número de la cepa. Cepa control: punto verde grande con halo brillante. Cepas muestra: puntos verde chicos con halo brillante.

A la par que se realizaron los ensayos de formación de biofilm por microplaca, se realizaron ensayos en agar Rojo Congo. Esto con la finalidad de usarlo en estudios

posteriores como un medio de selección para las cepas altamente formadoras de biofilm, la técnica fue modificada según lo reportado por (Solati et al., 2015), adaptándose la técnica de sembrado por gota en agar Rojo Congo. Usando este medio se establece una clasificación de la bacteria formadora de biofilm en tres categorías: Formadora, Intermedia, No formadora (Figura 14). La comparación entre los ensayos de formación de biofilm por micro placa y agar Rojo Congo se pueden ver en la figura 15.

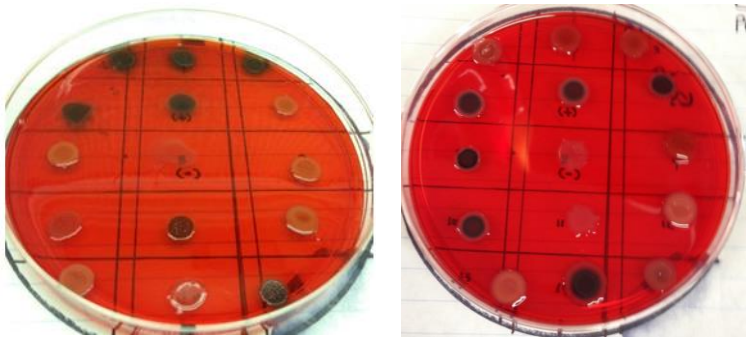


Figura 14. Imágenes representativas de los ensayos realizados para la determinación de formación de biofilm en agar Rojo Congo usando la cepa control positivo ATCC *E. coli 25922*. Colonias negras: formadoras de biofilm, Colonias rosa obscuro: formadoras intermedias de biofilm, Colonias rosa claro: no formadoras de biofilm.

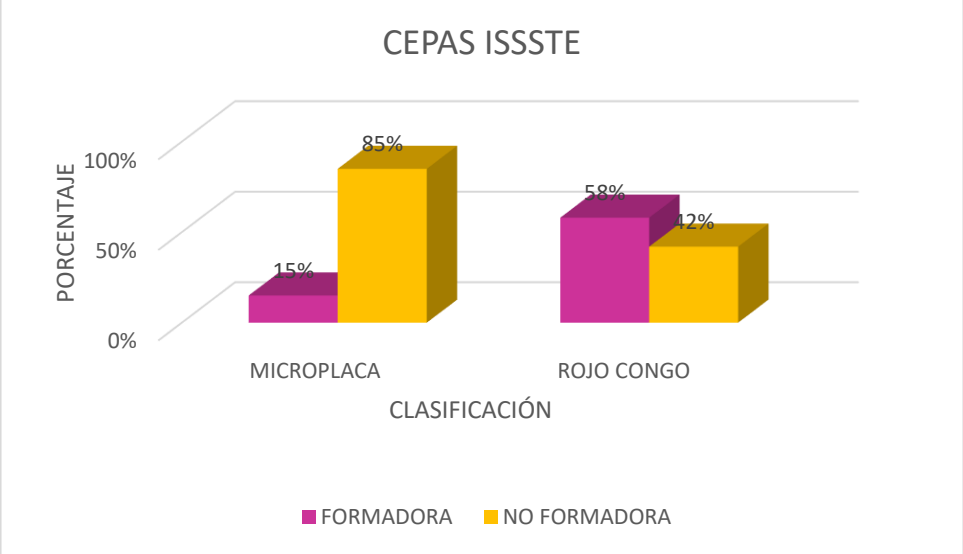


Figura 15. Comparación de ensayos para la detección de la formación de biofilm en micro placa y agar Rojo Congo en las cepas del ISSSTE. De las tres clasificaciones obtenidas en el método de agar Rojo Congo, se unifican: Formadoras de biofilm+ intermedias formadoras de biofilm. De este modo se compararon dos categorías de cada método.

11.4.2 CEPAS O25

Bajo las condiciones probadas, las cuales fueron modificadas según lo reportado por (Crémet *et.al*, 2013; Tabasi *et.al*, 2015), el 30% de las cepas de *E. coli* O25 aisladas de ITU son productoras de biofilm y el 70% de las cepas no presentan la capacidad de formar biofilm (Figura 16).

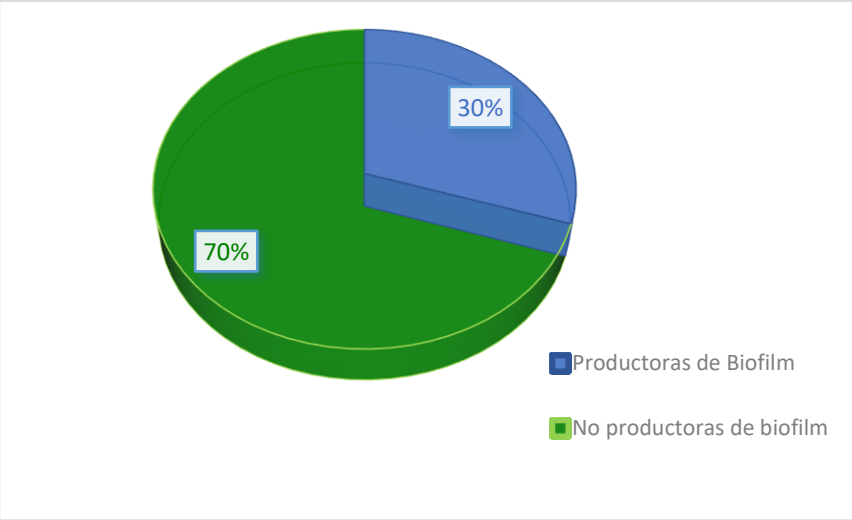


Figura 16. Evaluación de la formación de biofilm por la técnica en microplaca con cristal violeta para las cepas de *E. coli* del serogrupo O25. Productoras de biofilm: ≥ 0.5 $DO_{562nm,}$ No productoras de biofilm: ≤ 0.5 DO_{562nm}

El ensayo para determinar la formación de biofilm, se realizó por triplicado. Las cepas con una DO_{562nm} > 0.5 se consideraron como formadoras de biofilm, tal y como se representa en la gráfica de dispersión, figura 17 para las cepas O25. Los puntos de corte se realizaron según el promedio de la $DO_{562\ nm}$ de cuatro ensayos realizados para la cepa control positivo *Escherichia coli* ATCC® 25922, calculandose un Rango de 0.5 a 1.0 para las cepas formadoras de biofilm, las muestras inferiores a este rango se considearron como no formadoras de biofilm.

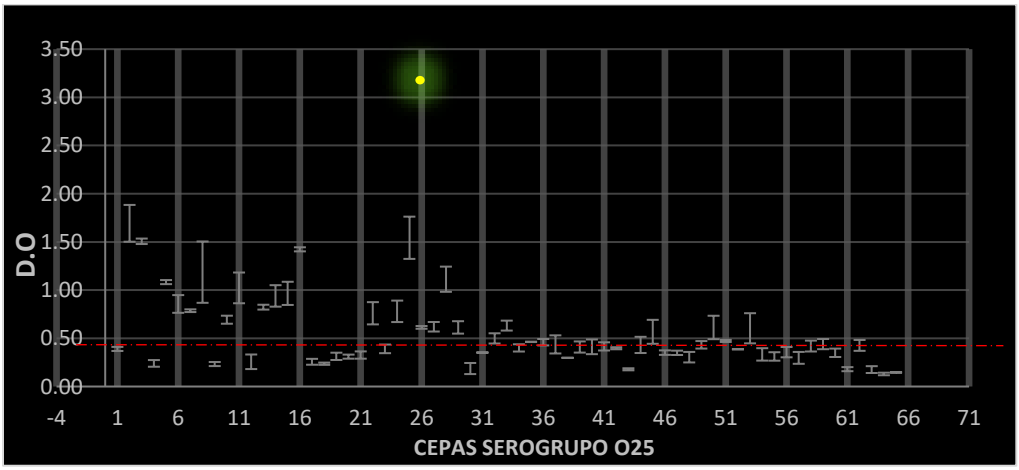


Figura 17. Grafica de dispersión de la formación de biofilm por micro placa en las cepas O25. Grafica de dispersión de la formación de biofilm. Con una línea roja se indica el punto de corte. Las cepas con valores ≥0.5 fueron consideradas formadoras de biofilm. Los números en el eje de las abcisas indica el número de la cepa. Cepa control: punto amarillo grande con halo brillante. Cepas muestra: puntos amarillos chicos con halo brillante.

Se realizaron ensayos para determinar la formación de biofilm en agar Rojo Congo para las cepas del serogrupo 025. La comparación entre los ensayos de formación de biofilm por microplaca y agar Rojo Congo se pueden ver en la figura 18.

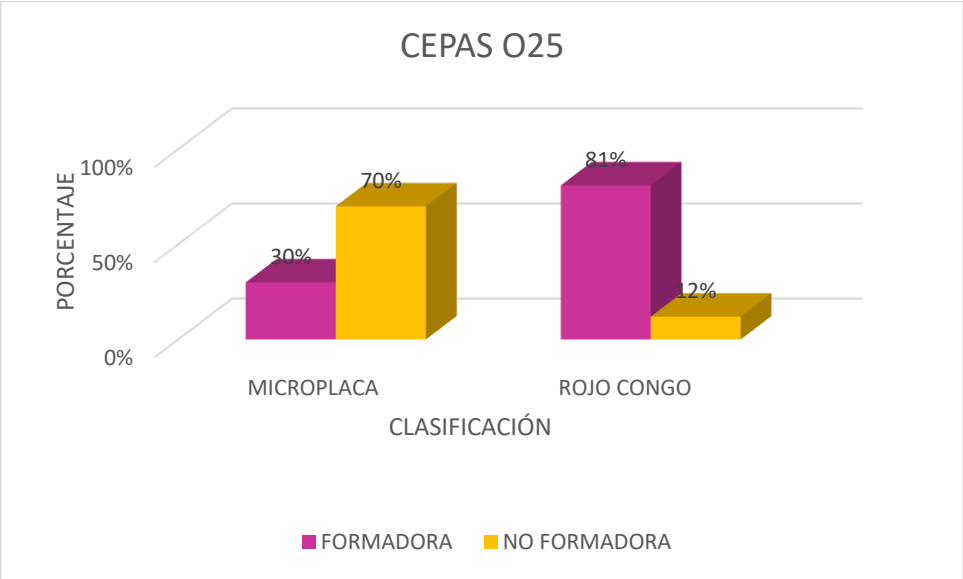


Figura 18. Comparación de ensayos para la detección de la formación de biofilm en micro placa y agar Rojo Congo en las cepas O25. De las tres clasificaciones obtenidas en el método de agar Rojo Congo, se unifican: Formadoras de biofilm+ intermedias formadoras de biofilm. De este modo se compararon dos categorías de cada método.

11.5 EVALUACIÓN DE LA FORMACIÓN DE BIOFILM- DETECCIÓN DE PROTEINAS

Como técnica de complementación para el ensayo de detección de biofilm por cristal violeta en micro placa, se realizó un ensayo y cuantificando proteínas presentes en la detección de biofilm. Con el Kit de PIERCE, se realizó una curva de albumina la cual se usó como estándar control de las cepas altas formadoras de biofilm usadas en este ensayo (Figura 19).

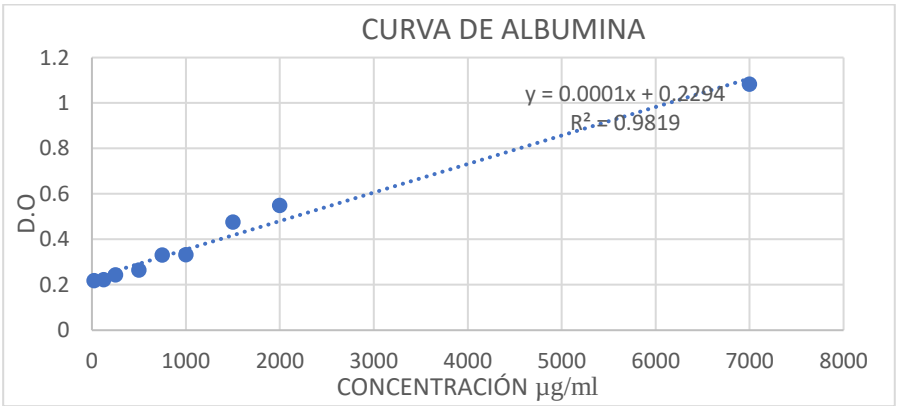


Figura 19. Curva de albumina expresada en DO_{620nm} en una concentración de 2000 a 8000. En puntos azules se observan las cepas problema. En línea punteada se observa la línea de tendencia y el valor de R^2 menor a 1.

Se realizo un ensayo seleccionando las cepas con alto rango de formación de biofilm provenientes de ambos ceparios (n=20; O25:H4= 17 e ISSSTE=3 y el control *E. coli*), a las cuales se les determinó la concentración de proteínas presentes en la formación de biofilm en micro placa, expresándose como DO/mg de proteína (Figura 20).

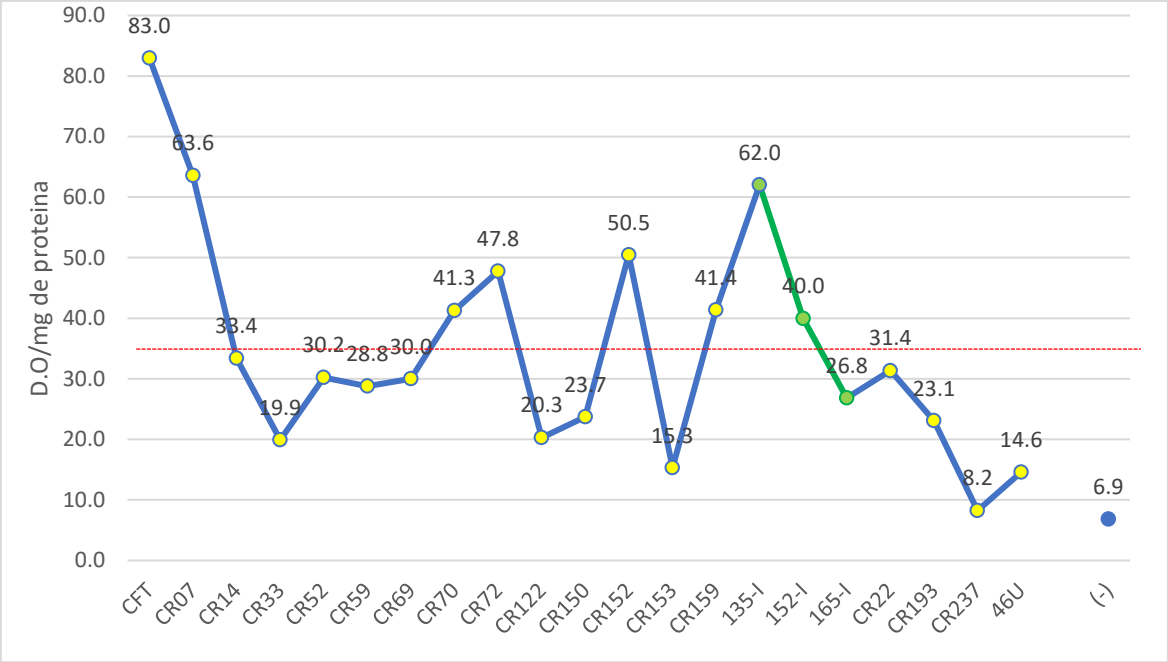


Figura 20. Resultados de cepas UPEC formadoras de Biofilm. La formaciòn de biofilm se expresa en DO por miligramo de proteína. Con puntos azules se marcan las cepas problema. En línea punteada se observa la línea de tendencia sin considerar el resultado de EAEC. En amarillo se muestran las cepas pertenecientes a el cepario O25, mientras que en verde claro se muestran las cepas provenientes del ISSSTE.

11.6 DETERMINACIÓN DE LOS BIOMARCADORES DE VIRULENCIA

Se detectó la presencia de 13 fragmentos y 9 genes codificantes de factores de virulencia asociados a UPEC por medio de PCR múltiple e individual, los cuales se clasifican según su función en el proceso de patogénesis en:
Adhesión:
fimH el cual codifica para la adhesina del pili tipo 1, *iha* el cual codifica para una adhesina no fimbrial, *papA+papGII* y *papGIII* los cuales codifican para la subunidad principal del Pili tipo P y las adhesinas en sus alelos II y III respectivamente. Sistemas de captación de hierro: *iucD* el cual codifica para el receptor de salmoquelina.
Toxinas: *vatA+vatP* los cuales codifican para las regiones autotransportadora y peptidasa de la toxina vacuolizante autotransportadora (Vat) respectivamente, *satA+satP* las cuales codifican para las regiones autotransportadora y peptidasa de la toxina autotransportadora secretada (Sat), *hlyA* el cual codifica para la α-hemolisina y cnf-1 que cual codifica para el factor de necrosis citotóxico 1.
Movilidad: *fliC* que codifica para la flagelina (Proteína estructural del flagelo).

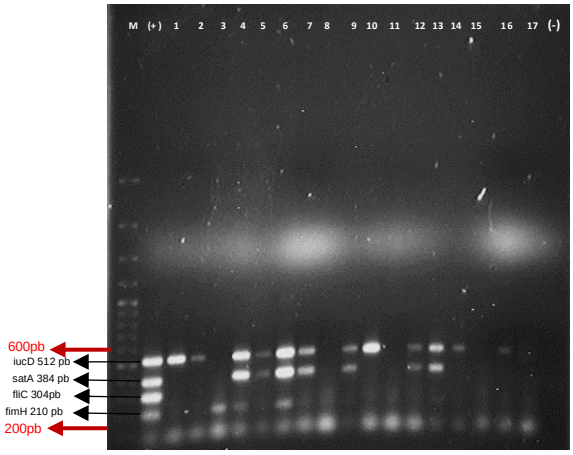


Figura 21. Geles representativos de la PCRm 1 para la determinación de genes que codifica factores de virulencia de cepas del ISSSTE aisladas de ITU: Carril M: 100 pb Plus DNA Ladder, Carril (+): ADN de CFT 073, Carril1: 150-I, Carril 2: 151-I, Carril 3: 152-I, Carril 4: 153-I, Carril 5: 156-I, Carril 6: 157-I, Carril 7: 158-I, Carril 8: 160-I, Carril 9: 163-I, Carril 10: 164-I, Carril 11: 165-I, Carril 12: 166-I, Carril 13: 169-I, Carril 14: 170-I, Carril 15: 171-I, Carril 16: 172-I, Carril 17: 175-I, Carril (-): mezcla maestra sin ADN.

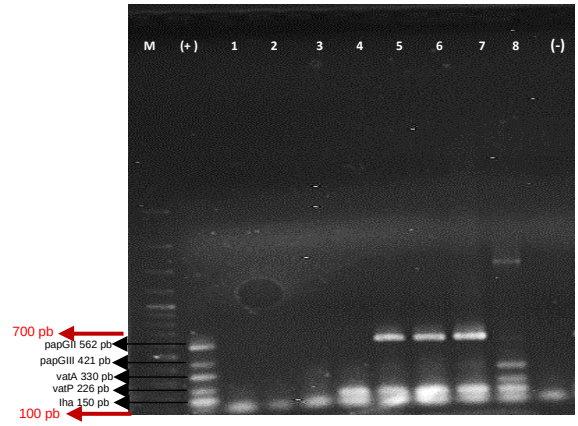


Figura 22. Geles representativos de la PCRm 2 para la determinación de genes que codifican factores de virulencia de cepas del ISSSTE aisladas del ITU: Carril M: 100 pb Plus DNA Ladder, Carril (+): ADN de CFT 073+ 059-I, Carril1: 150-I, Carril 2: 151-I, Carril 3: 152-I, Carril 4: 153-I, Carril 5: 156-I, Carril 6: 157-I, Carril 7: 158-I, Carril 8: 160-I, Carril (-): mezcla maestra sin ADN.

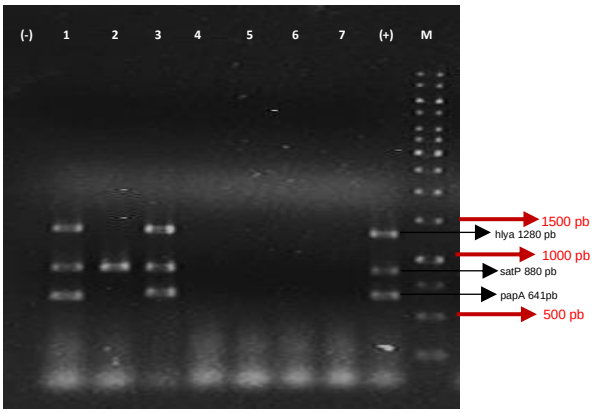


Figura 23. Geles representativos de la PCRm 3 para la determinación de genes que codifican factores de virulencia de cepas del ISSSTE aisladas de ITU. Carril (-): mezcla maestra sin ADN, Carril1: 157-I, Carril 2: 158-I, Carril 3: 160-I, Carril 4: 163-I, Carril 5: 164-I, Carril 6: 165-I, Carril 7: 166-I, Carril (+): ADN de GAG1, Carril M: 1kb DNA Ladder.

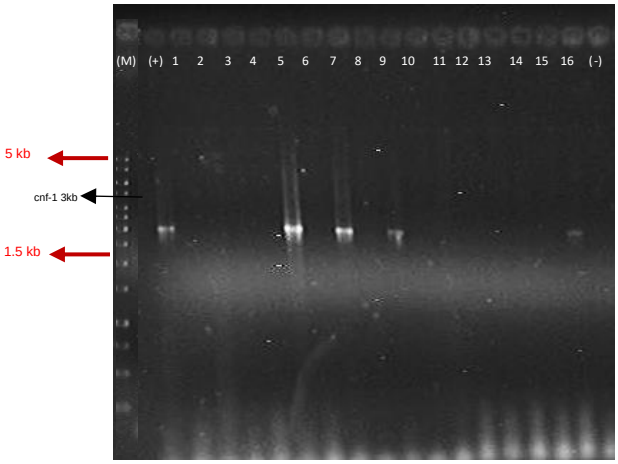


Figura 24. Geles representativos de la PCR individual para la amplificación del gen *cnf-1* en las cepas del ISSSTE aisladas del ITU: Carril M: 1kb DNA Ladder; Carril (+): ADN de GAG1, Carril 1: 101-I, Carril 2: 104-I, Carril 3: 105-I, Carril 4: 106-I, Carril 5: 107-I, Carril 6: 109-I, Carril 7: 111-I, Carril 8: 112-I, Carril 9:113-I, Carril 10: 114-I, Carril 11: 116-I, Carril 12: 119-I, Carril 13: 120-I, Carril 14: 121-I, Carril 15: 122-I, Carril 16: 123-I, Carril (-): mezcla maestra sin DNA.

La determinación de los biomarcadores de virulencia se llevó a cabo únicamente en las cepas del ISSSTE. Se analizó la prevalencia de los genes completos, detectándose en mayor porcentaje el gen *fimH* 96%, seguido de *iucD* 65%, *iha* 35%, *hlyA* 19% y *cnf-1* 11%, los cuales codifican a factores de virulencia asociados a la adhesión y producción de toxinas. En menor porcentaje se encontraron los genes *papA+papG, sat, fliC* con 8%, como podemos observar en la figura 25.

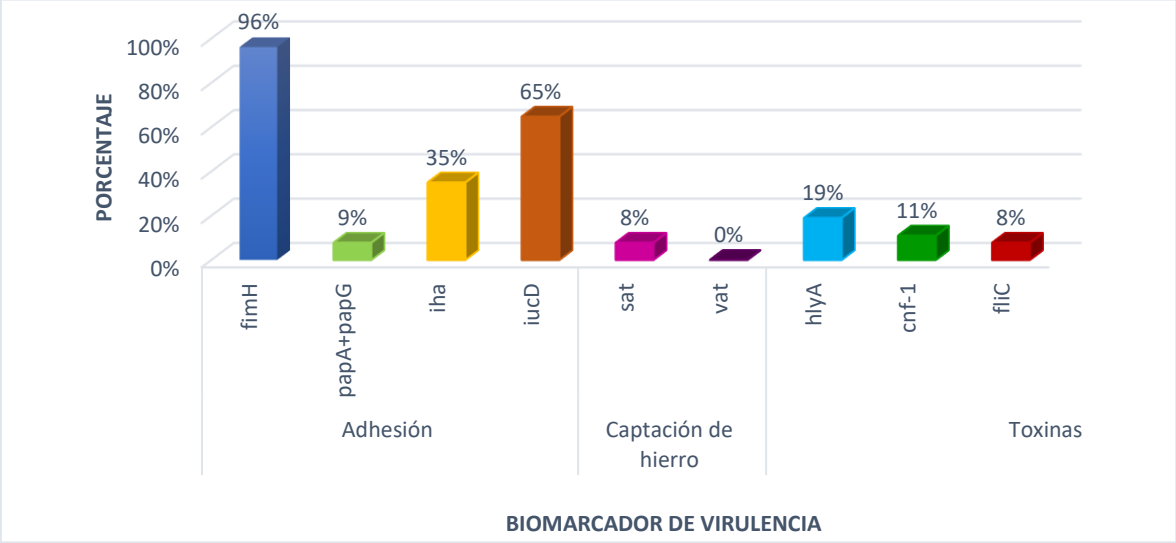


Figura 25. Presencia de biomarcadores de virulencia presentes en las cepas del ISSSTE. Se muestran los porcentajes en que se obtuvieron los genes relacionados a factores de virulencia, clasificándose según su función en la patogenicidad de UPEC. *fimH*: adhesina del Pili tipo I, *papA*: subunidad principal del Pili P, *papG*: adhesinas del Pili P en sus alelos II y III, iha: adhesinas y receptores de enterobactina, iucD: receptor de aerobactina, *satA* y *satP*: región autotrasnportadora y peptidasa de la toxina auto transportadora secretada, *vatA* y *vatP*: región autotrasnportadora y peptidasa de la toxina vacuaolizante auto transportadora, *hlya*: hemolisina, *cnf-1*: factor necrotizante citotóxico 1, *fliC*: flagelina.

Posteriormente se analizó por cepa la presencia de los genes codificantes a factores de virulencia obteniéndose de 1 a 9 genes en el 100% de las cepas del ISSSTE. De este análisis se obtuvo la presencia de 2 genes en un 25% (n=13), 1 gen con 16% (n=8), 3 y 6 genes con14% (n=7) y 5 genes con 12% (n=6). (Figura26).

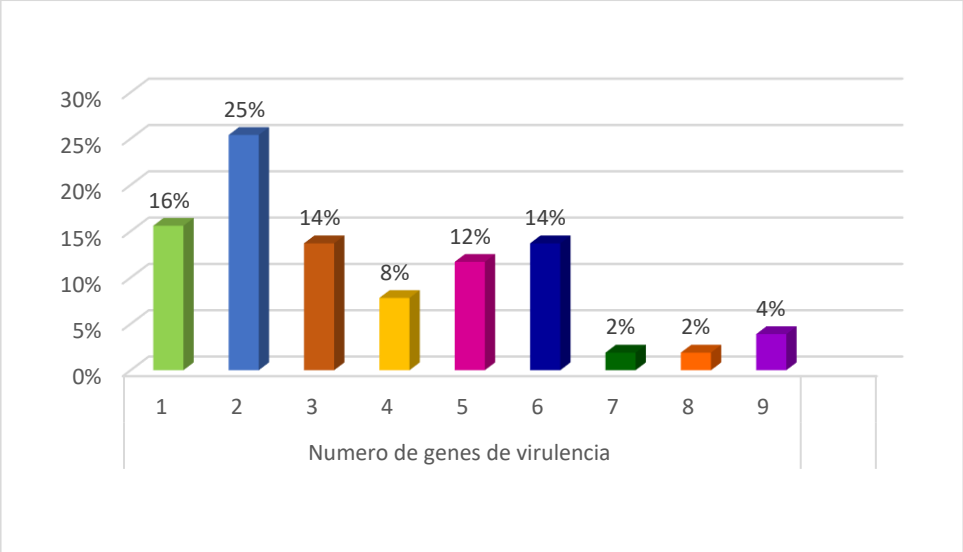


Figura 26. Número de genes de virulencia en cepas del ISSSTE aisladas de ITU. Se muestran los Porcentajes de la cantidad de genes que se obtuvieron en las cepas analizadas. Estos van de 1 a 9 genes de virulencia por cepa.

De las cepas que presentaban el mismo número de genes asociados a factores de virulencia, se realizó un análisis de los genes que amplificaron. De este modo se determinaron los virotipos compartidos entre dichas cepas, expresándose los resultados obtenidos en la tabla 13. Se encontraron 47 virotipos diferentes y 4 virotipos comunes en un rango de 2 a 9 cepas.

TABLA 13. **PERFIL DE VIRULENCIA COMUNES EN LAS CEPAS DEL ISSSTE AISLADAS DE PACIENTES CON ITU.**

VIROTIPO	NO. DE FV	NO. DE CEPAS
fimH	1	8
fimH, iucD	2	9
fimH,satA	2	3
fimH, iucD, papA, satP, hlyA, cnf-1	6	2

11.7 DETERMINACIÓN DE GENES CODIFICANTES A B-LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO

La detección de genes codificantes para BLEES, se realizó por PCR individual. Se encontró en las cepas del ISSSTE una mayor proporción de *bla*TEM con un 66%, seguido de *bla*$_{CTX-M}$ con 25% y *bla*$_{OXA-1}$ con 9%, cabe mencionar que el gen *bla*$_{SHV}$ no se detectó en ninguna de las muestras de este cepario (Figura 28).

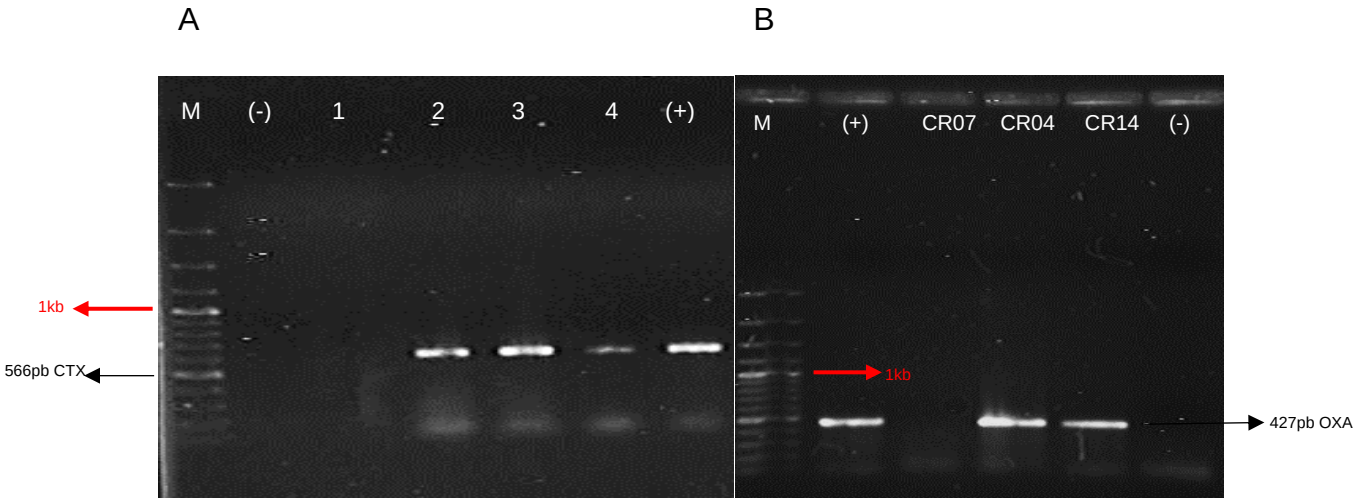


Figura 27. Detección de genes que codifican para BLEE´s CTX-M y OXA-1 en *E. coli* aisladas de mujeres con ITU (ISSSTE y O25 respectivamente). A) Gel representativo de la PCR CTX M (566 pb). Carril M: marcador de 1kb DNA Ladder, Carril (-): mezcla maestra sin DNA, Carril 1: 120-I, Carril 2: 122-I, Carril 3: 123-I, Carril 4: 124-I, Carril (+): ADN de C7225. B) Gel representativo de la PCR OXA-1 (427 pb). Carril M: marcador de 1kb DNA Ladder, Carril (+): ADN de C7225, Carril 1: CR07, Carril 2: CR04, Carril 3: CR14, Carril (-): mezcla maestra sin DNA.

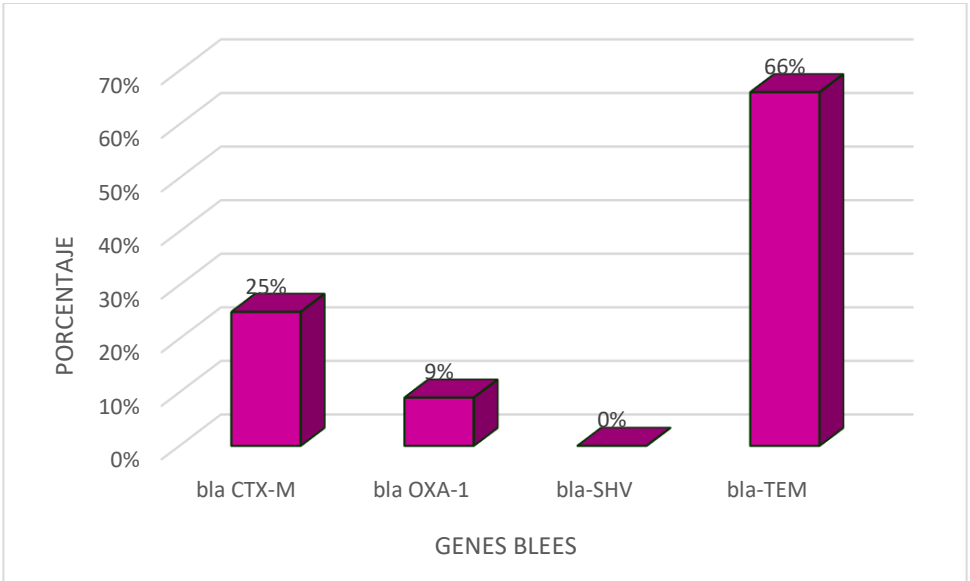


Figura 28. Detección de genes codificantes de BLEES expresando por porcentaje en las cepas del ISSSTE aislados de pacientes femeninos cursando con ITU. Se observa un alto porcentaje en los genes *bla*$_{TEM}$ y *bla*$_{CTX-M}$.

En las cepas O25 se encontró en mayor proporción *bla* $_{TEM}$ con 40%, seguido de *bla* $_{CTX-M}$ con 13%, y *bla* $_{OXA-1}$ con 17%, cabe mencionar que el gen *bla*$_{SHV}$ no se detectó en ninguna de las muestras de este cepario (Figura 12).

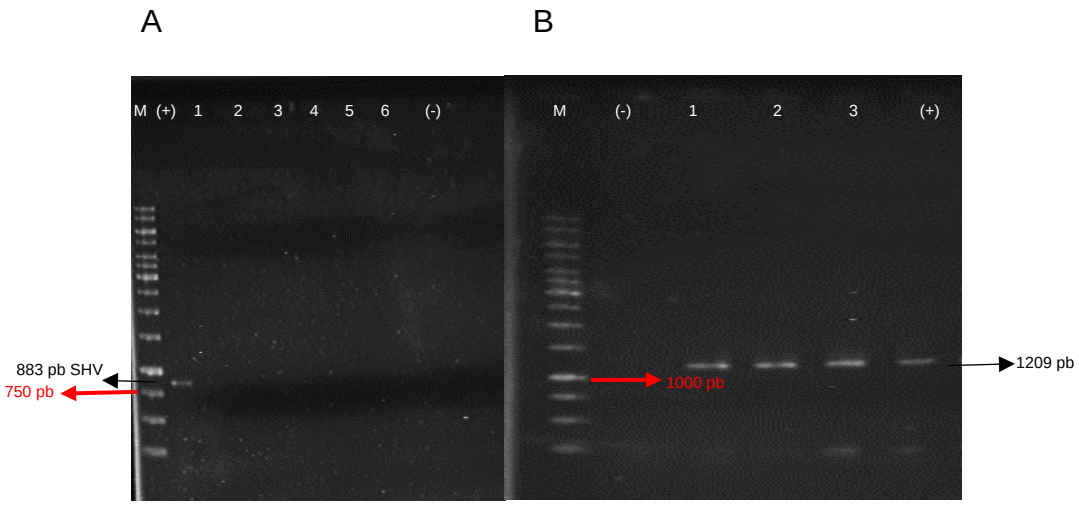


Figura 29. Detección de genes que codifican para BLEE´s SHV y TEM en *E. coli* aisladas de mujeres con ITU (ISSSTE y O25 respectivamente). A) Gel representativo de la PCR SHV (883 pb). Carril M: marcador de 1kb DNA Ladder, Carril (+): ADN de SA42, Carril 1: CR15, Carril 2: CR19, Carril 3: CR22, Carril 4: CR33, Carril 5: CR35, Carril 6:CR50, Carril (-): mezcla maestra sin DNA. B) Gel representativo de la PCR TEM (1,209 pb). Carril M: marcador de 1kb DNA Ladder, Carril (-): mezcla maestra sin DNA, Carril 1: 101-I, Carril 2: 104-I, Carril 3: 105-I, Carril (+): ADN de 1550.

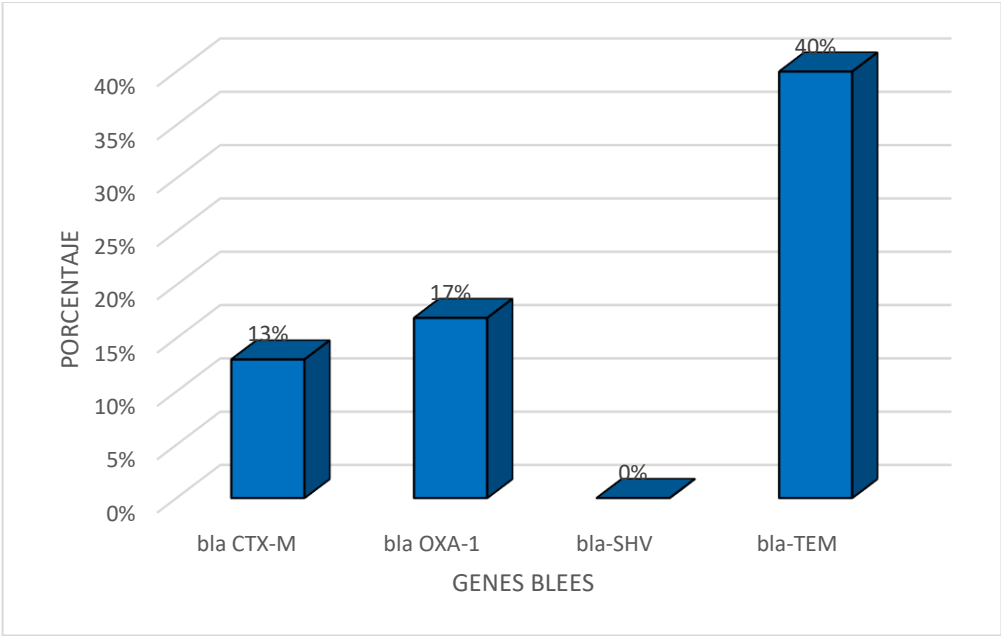


Figura 30. Detección de genes codificantes de BLEES expresando por porcentaje en las cepas O25 aislados de pacientes cursando con ITU. Se observa un alto porcentaje en los genes *bla*$_{CTX-M}$, *bla*$_{TEM}$ y *bla*$_{OXA-1}$.

11.8 PERFIL PLASMÍDICO

El perfil plasmídico se determinó tras la extracción del DNA plasmídico de las muestras del ISSSTE, se hizo la determinación de los tamaños aproximados de las bandas plasmídicas usando como referencia el marcador usado de 1kb DNA Ladder, así como la cepa control EHEC O157:H7 EDL 933 que tiene 1 plásmido conocido de 97 kb y un plásmido críptico de 2.1 kb. El mayor tamaño de los plásmidos que se encontraron fue 10.5 kb mientras que el menor tamaño de los plásmidos encontrados fue 0.25 kb. El 56.8% de las cepas no presento plásmidos.
En la figura 31. Se ve una imagen representativa de las extracciones de DNA plasmídico y su corrimiento electroforético, así como el análisis realizado por estimación de tamaño.

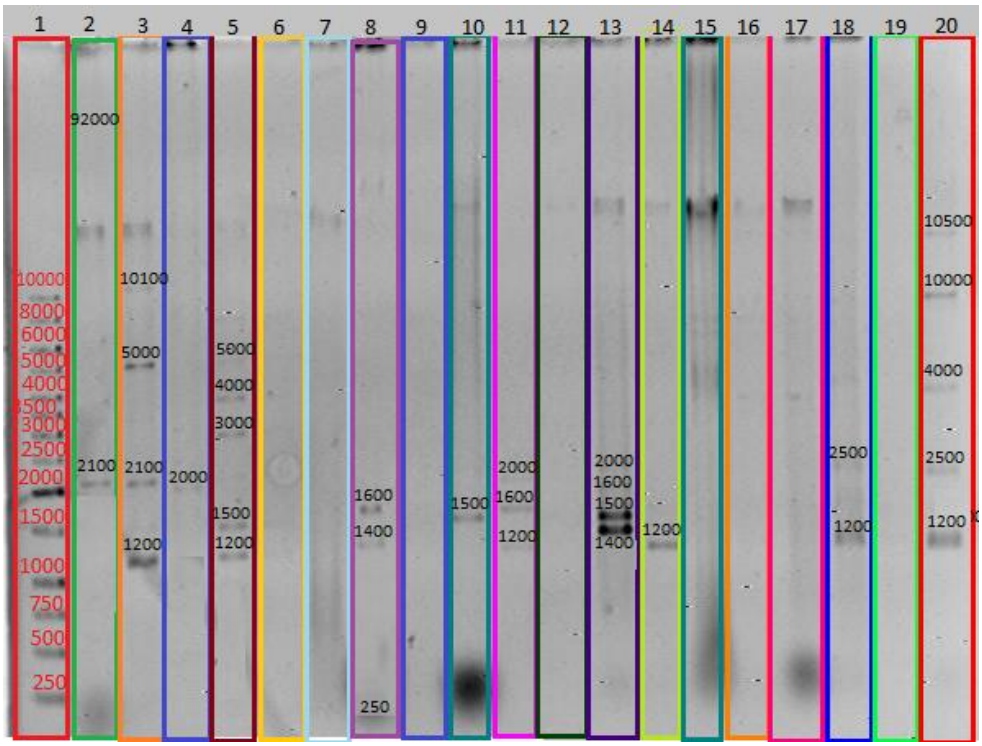


Figura 31. Perfil plasmídico en un gel de agarosa al 0.7%. Se analizó el ADN plasmídico de diferentes cepas de *E. coli* en base a los controles usados EHEC EDL 933 (92000 pb y 2100 pb y marcador de 1kb. Los números arriba de cada banda indican el peso aproximado molecular expresado en pares de bases (pb). Carril 1: marcador 1kb DNA Ladder, Carril 2: ADN plasmídico de EHEC 0157:H7 EDL933, Carril 3: 101-I, Carril 4: 104-I, Carril 5:105-I, Carril 6: 106-I, Carril 7: 107-I, Carril 8: 109-I, Carril 9: 111-I, Carril 10: 112-I, Carril 11: 113-I, Carril 12: 114-I, Carril 13: 116-I, Carril 14: 119-I, Carril 15: 120-I, Carril 16: 121-I, Carril 17: 122-I, Carril 18: 123-I, Carril 19: 124-I, Carril 20: 131-I.

11.9 DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE GENES MOB$_{f12}$ Y *traT* EN LAS CEPAS

La determinación de genes asociados a la movilidad de los plásmidos como es el caso de *MOB$_{F12}$* y *traT* se llevó a cabo por la técnica de PCR individual, se descartaron las cepas que por medio del perfil plasmídico no presentaran dichas bandas. Seleccionándose una población de 23 muestras para el cepario del ISSSTE y 25 muestras para el cepario O25.Por medio de esta técnica se encontró el gen *traT* en las cepas del ISSSTE en un porcentaje del 48%. El gen *MOB$_{F12}$* se encontró en un porcentaje del 34.7% (n=8).

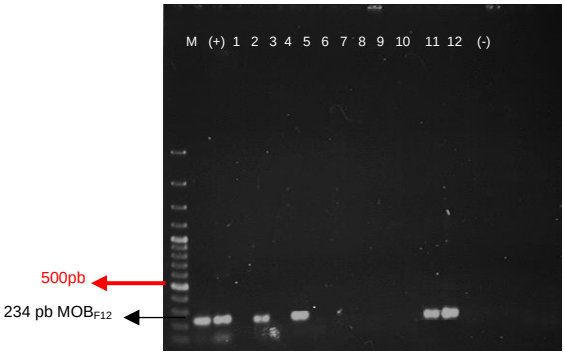


Figura 32. Gel representativo de la PCR MOB$_{F12}$ realizadas para las cepas O25. A) Gel representativo de la PCR MOB$_{F12}$ en las cepas del ISSSTE. Carril M: marcador de 100pb DNA Ladder, Carril (+): ADN de C3304, Carril 1: CR 222, Carril 2: CR19, Carril 3:CR152, Carril 4:CR 211, Carril 5: CR67, Carril 6: CR161, Carril 7: CR 185, Carril 8: CR 33, Carril 9: OO30-I, Carril 10: CR50, Carril 11: CR72, Carril 12: CR07, Carril (-): mezcla maestra sin DNA.

En cuanto al cepario del serogrupo O25, el gen *MOB$_{F12}$* se encontró en un 40%.
La detección del gen *Trat* fue determinada previamente en otro trabajo por Vázquez 2017, según lo cual las 25 cepas seleccionadas en este trabajo de este cepario cumplían con el 100% de presencia del gen *traT*.

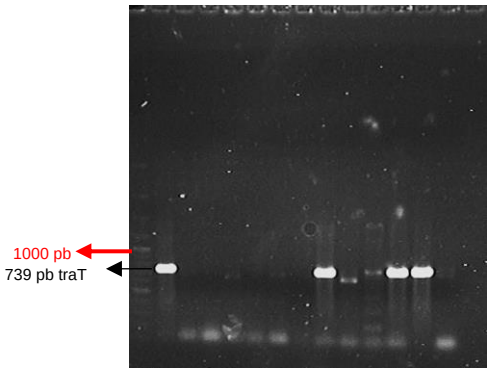


Figura 33. Gel representativo de la PCR traT realizadas para las cepas del ISSSTE. Carril M: marcador de 1kb DNA Laddr, Carril (+): ADN de O58-I, Carril 1: 175-I, Carril 2: 121-I, Carril 3: 135-I, Carril 4: 137-I, Carril 5: 156-I, Carril 6: 119-I, Carril 7: 140-I, Carril 8:171-I, Carril 9: 101-I, Carril 10:169-I, Carril 11: 150-I Carril (-): mezcla maestra sin DNA.

Las cepas presentaron el gen *traT* se compararon con las cepas que presentaron el gen *MOB$_{F12}$* y estas fueron seleccionadas para la realización de los ensayos de conjugación.

11.10 ENSAYOS DE CONJUGACIÓN

Las cepas seleccionadas como candidatas donadoras de los ensayos de conjugación cumplían con la presencia de bandas plasmídicas, genes asociados a la movilidad, factores de virulencia y multiresistencia antibiótica como podemos ver en la tabla 14 con mayor detalle. El caso de las cepas seleccionadas todas presentaban 6 bandas plasmídicas.

TABLA 14. CARACTERÍSTICAS DE LAS CEPAS USADAS COMO DONADORAS EN LOS ENSAYOS DE CONJUGACIÓN

	Sexo Edad	F.B.	PCRM1	PCRM2	PCRM3	*cnf*	NO. FV	MOB_{F12} traT	bla CTX	bla TEM	bla SHV	AMP	RIF
CR67	F -59 AÑOS	(-)	*fimH satA iucD,fliC*	Iha	satP	(-)	4	(+)	(-)	(+)	(-)	R	S
CR213	F-35 AÑOS	(-)	*fimH satA iucD, fliC*	Iha	satP	(-)	4	(+)	(-)	(-)	(-)	R	S
030I	F-61 AÑOS	(-)	*fimH satA iucD, fliC*	Iha	satP	(-)	4	(+)	(-)	(+)	(-)	R	S

Los principales criterios para su selección fueron Factores de Virulencia, traT (+), MOB_{F12} (+), No. de plásmidos, presencia de genes *blaBLEE,* resistencia a Ampicilina y sensibilidad a Rifampicina. F.B: Formación de biofilm. No. FV: Número de factores de virulencia. Amp: ampicilina. Rif: rifampicina.

Cabe destacar que, de las cepas muestreadas, las cepas donadoras que cumplían con los criterios anteriormente mencionados pertenecen al cepario del serogrupo O25. Los resultados obtenidos tras la realización de tres ensayos de conjugación 2 de 3 cepas O25 con 6 bandas plasmídicas fueron conjugativas, presentando una baja frecuencia, pues estas solo logran crecer en las placas con Amp+Rifam a una concentración de 10^0 del inoculo. De estos ensayos se obtuvieron 4 clonas transformantes, 3 del primer ensayo y 1 del segundo, las cuales poseen los mismos factores de virulencia, *fimH, sat, iucD e iha,* que la cepa donadora y receptora. En cuanto a la presencia de los genes codificantes a BLEE estas son bla_{TEM}+ concordando con las características de las cepas donadora.

A B C

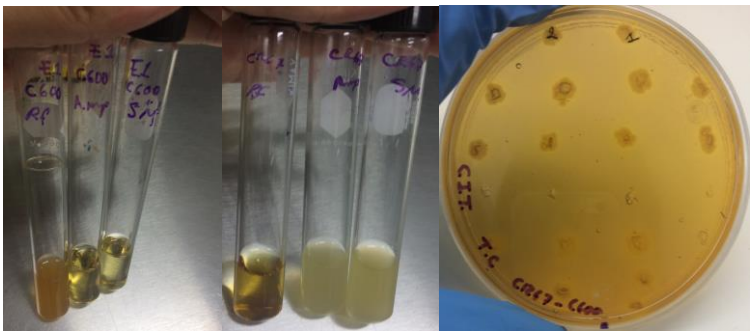


Figura 34. Imágenes representativas del primer ensayo de conjugación realizado. A) Crecimiento de la cepa receptora *E. coli* C600 en tres tubos de vidrio con medio LB + antibiótico (Rf, Amp y Sm) respectivamente. B) Crecimiento de la cepa donadora CR67 serogrupo O25 en tres tubos de vidrio con medio LB+ (Rf, Amp y Sm) respectivamente. C) Crecimiento de las cepas transconjugantes recolectadas en el primer ensayo de conjugación (CR67+C600) en una placa de medio LB + Rf+Amp a las

11.11 ASOCIACIÓN INTEGRAL DE DATOS

11.11.1 BIOFILM, GENES DE VIRULENCIA Y RESISTENCIA POR MDR Y XDR

Se realizó un análisis de las cepas con multidrogo y extremadamente drogo resistentes de cada cepario obteniéndose los siguientes resultados. En las cepas del ISSSTE (pacientes femeninos cursando ITU), el 20% de las cepas XDR presentaron la capacidad de formar biofilm, presentando en alto porcentaje los factores de virulencia *fimH* 100% e *iucD* 40%. El 17% de las cepas MDR presentaron la capacidad de formar biofilm, presentando en algo porcentaje los factores de virulencia *fimH* 95%, *iucD* 67%, *iha* 33%, *hlya* 18%, *cnf-1* 12% y *papA+papG* 10%. (Figura 35).

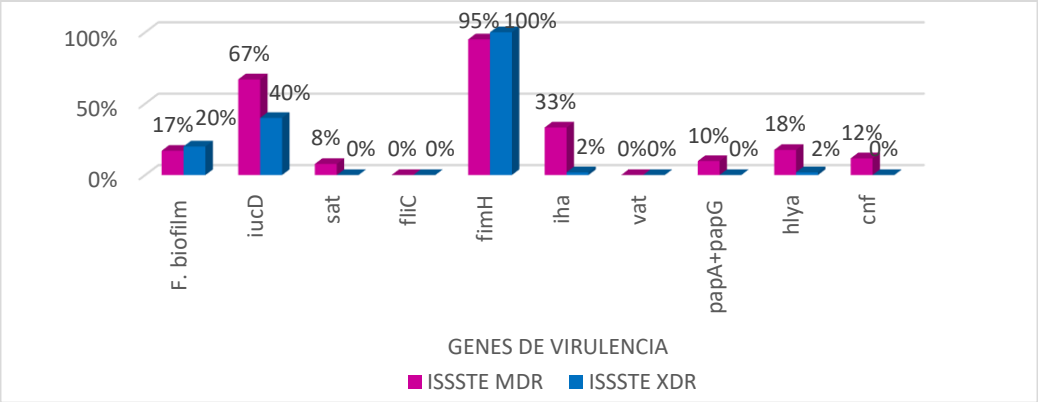


Figura 35. Relación entre la resistencia antibiótica en sus dos categorías presentes en el trabajo (MDR-XDR) la capacidad de formar biofilm y los genes de virulencia presentes en las cepas de ISSSTE 2016. Se destaca la relación entre un alto porcentaje en la presencia del gen *fimH* (95% y 100%) en cepas MDRy XDR respectivamente con la formación de biofilm.

En las cepas del serogrupo O25, el 34% de las cepas MDR presentaron la capacidad de formar biofilm, presentando en alto porcentaje los factores de virulencia *fimH* 100%, *iucD* 89%, sat 77% *iha* 66%, *fliC* 12% y *vat, hlya* 8%. Las cepas XDR de este cepario no compartían ninguna de las características representadas en la figura 36.

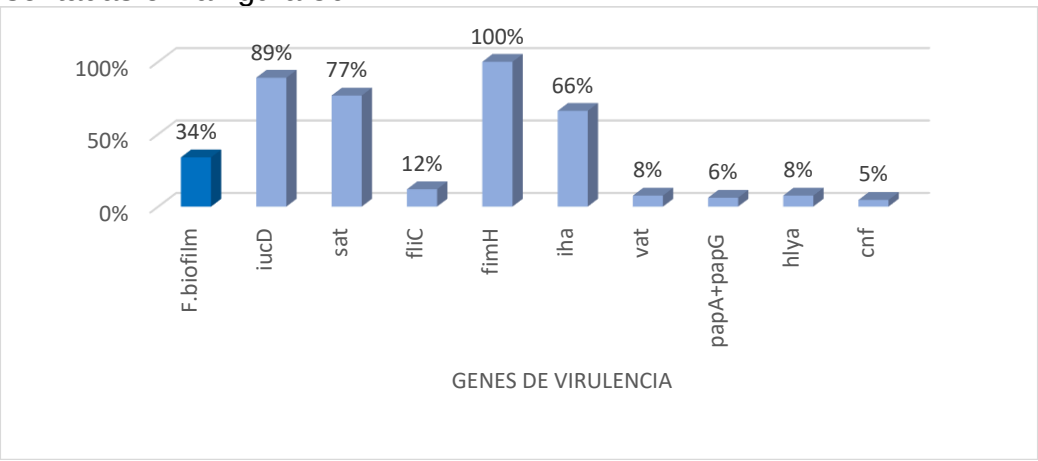


Figura 36. Relación entre la resistencia antibiótica en sus dos categorías presentes en el trabajo (MDR-XDR) la capacidad de formar biofilm y los genes de virulencia presentes en las cepas del serogrupo O25. Se destaca la relación entre un alto porcentaje en la presencia del gen *fimH* (100%) en cepas MDR con la formación de biofilm.

11.11.2 ASOCIACIÓN ENTRE FENOTIPO Y GENOTIPO DE BLEE'S

Se realizó un análisis comparativo de ambos cepario seleccionando las cepas con fenotipo BLEE positivo y el genotipo obtenido para estas cepas. Para las cepas del ISSSTE se encontró de 1 a 3 genes *bla* por cepa. Presentándose un solo gen en un 54.5%, dos genes en un 9% y un 18.1% en la presencia de tres genes *bla (bla$_{CTX-M}$, bla$_{OXA-1}$, blaTEM*). Concordando con el fenotipo FEP, ATM para estas últimas cepas. La ausencia de genes *bla* buscados en este trabajo, se presentó en un 18.1%.

TABLA 15. COMPARACIÓN ENTRE FENOTIPO Y GENOTIPO BLEE EN CEPAS SEROGRUPO O25

CEPAS	Fenotipo BLEE +	Genes *bla*				TOTAL
		CTX	OXA	TEM	SHV	
CR15	CTX, FEP, ATM	(-)	(-)	(+)	(-)	1
CR22	CTX, FEP, ATM	(-)	(-)	(+)	(-)	1
CR35	CTX, FEP, ATM	(-)	(-)	(-)	(-)	0
CR51	CTX, FEP, ATM	(-)	(+)	(+)	(-)	2
CR52	CTX	(-)	(-)	(-)	(-)	0
CR53	FEP, ATM	(+)	(+)	(+)	(-)	3
CR59	CTX, CFZ, FEP, ATM	(+)	(+)	(+)	(-)	3
CR159	CTX, FEP, ATM	(-)	(-)	(+)	(-)	1
018 I	FEP	(+)	(-)	(-)	(-)	1
070 I	CTX, FEP, ATM	(+)	(-)	(-)	(-)	1
6U	CTX	(+)	(-)	(-)	(-)	1
%TOTAL		45.40%	27.20%	54.50%	0%	

Para las cepas serogrupo O25 se encontró de 1 a 3 genes *bla* por cepa. Presentándose un solo gen en un 50%, dos genes en un 16.6% y un 8.3% en la presencia de tres genes *bla (bla$_{CTX-M}$, bla$_{OXA-1}$*, *bla*$_{TEM)}$. Concordando con el fenotipo CTX, FEP y ATM en cepas con ambos genes (*bla$_{CTX-M}$ y bla*$_{TEM}$). La ausencia de genes *bla* buscados en este trabajo, se presentó en un 25%.

TABLA 16. COMPARACIÓN ENTRE FENOTIPO Y GENOTIPO BLEE EN CEPAS ISSSTE

CEPAS	Fenotipo BLEE +	Genes *bla*				TOTAL
		CTX	OXA	TEM	SHV	
112-I	CRO,ATM	(-)	(-)	(+)	(-)	1
113-I	CRO,CTX,ATM	(-)	(-)	(+)	(-)	1
114-I	CRO,CTX,ATM	(-)	(-)	(+)	(-)	1
116-I	CRO,CTX,ATM	(-)	(-)	(+)	(-)	1
119-I	CRO,CTX,ATM	(-)	(-)	(+)	(-)	1
131-I	FEP,ATM	(-)	(-)	(-)	(-)	0
134-I	CTX,FEP,ATM	(+)	(+)	(+)	(-)	3
142-I	FEP,ATM	(-)	(-)	(-)	(-)	0
147-I	CTX,FEP,ATM	(+)	(-)	(+)	(-)	2
148-I	CTX,FEP,ATM	(+)	(-)	(+)	(-)	2
149-I	CTX,FEP,ATM	(-)	(-)	(-)	(-)	0
150-I	ATM	(-)	(-)	(+)	(-)	1
%TOTAL		25%	8.30%	75%	0%	

12.DISCUSIÓN

Las infecciones del tracto urinario causadas por UPEC, constituyen una de las infecciones más frecuentes en la atención primaria en salud y en el medio hospitalario. Se pueden presentar a cualquier edad y son más frecuentes en pacientes femeninos. Resulta de vital importancia un conocimiento apropiado de esta patología infecciosa, tomando en cuenta la presencia de patógenos resistentes a los antibióticos y las consecuencias que esto supone para el tratamiento de estas infecciones (Rondo y cols.,2007). En nuestro país se usa como tratamiento de primera elección para cistitis antibióticos como: Nitrofurantoína, Ciprofloxacina, Trimetroprim/sulfametoxazol, Amoxicilina/Ácido clavulánico y Fosfomicina. En el tratamiento de pielonefritis se usan antibióticos como: Ceftriaxona, Cefotaxima, Ciprofloxacina, Levofloxacina, Amikacina y Gentamicina (Zarate y cols.,2006).

En el presente trabajo se obtuvieron cepas del ISSSTE con resistencia intermedia a antibióticos como Amikacina 35% y Ampicilina 22% los cuales son usados como elección de tratamiento en nuestro país. Dentro de estas cepas se encuentran clonas resistentes y/o en proceso de adquirir la capacidad de resistir a esos antibióticos, por lo cual se sugiere tener estricto cuidado al emplear estos antibióticos, prescribiéndolos después de realizarse pruebas de susceptibilidad a antibióticos a cada paciente. De este modo se verificará que el antibiótico sea el indicado para erradicar el agente causal, evitando someter a las cepas a un proceso de presión de selección creando cepas resistentes. Por dicha razón en este estudio todas las cepas clasificadas como intermedias fueron consideradas como resistentes.

Por otro lado, el estudio de susceptibilidad de las 51 cepas aisladas del ISSSTE muestra alta resistencia a β-lactámicos 95.2% y Quinolonas 94.9% lo cual coincide con lo reportado por Stephenson y cols., en el 2016, quien reporta una resistencia a β-lactámicos del 93% y Quinolonas 98.5% en cepas de UPEC de pacientes cursando ITU en Kingston, Jamaica.
Ademas, se obtuvo en alto porcentaje resistencia a las otras familias de antibióticos como son Tetraciclinas 86.2%, Nitrofurantoina y Cloranfenicol 62.7%, Trimetropim/sulfametoxazol 60.7% y Aminoglucosidos 52.2%. Entre los trabajos reportados en nuestro país, donde se incluye la misma gama de antibióticos probados en el presente trabajo, destaca lo reportado por Ballesteros, 2018 quien encuentra un alto porcentaje en cepas de *E. coli* aisladas de ITU en mujeres no gestantes para las familias de antibióticos β-lactámicos 77.3 %, Quinolonas 70% Tetraclinas 72%, Nitrofurantoina y Trimetropim/sulfametoxazol 68%, y Aminoglucósidos 45.3%. Así como el estudio de Garcia, 2017 quien reporta un alto porcentaje para las familias de antibióticos Trimetropim/sulfametoxazol 73%, β-lactámicos 71%, Quinolonas 70% Tetraclinas 70%, Nitrofurantoina 50%, y Aminoglucosidos 29% en cepas de *E. coli* aisladas de ITU en nuestro país. Al comparar los resultados obtenidos en las cepas de ISSSTE y los estudios previos realizados en nuestro grupo, se observa un mayor porcentaje de resistencia a las diferentes familias de antibióticos en las cepas aisladas en el 2016 del Hospital de Salud Pública del estado de Puebla.

Los resultados con estas cepas son diferentes a los reportados por Estrada y cols., en el 2017 quien encontró un bajo porcentaje de resistencia a antibióticos usados como segunda elección (Norfloxacina 45% y Ofloxacino 29%) en cepas de *E.coli* aisladas de ITU en México en el período 2010-2011.

Estos datos resultan alarmantes, pues al presentar estas cepas altos porcentajes de resistencia a los antibióticos usados como primera opción en el tratamiento de ITU como lo es Cefalotina, y los usados como segunda opción Norfloxacina, Ofloxacina y Levofloxacina se observa la capacidad de las cepas provenientes del ISSSTE de resistir a los tratamientos actuales, al oscilar los porcentajes de resistencia en un aumento de más del 50% en el presente trabajo.

Se obtuvieron altos porcentajes de sensibilidad a Fosfomicina 88% y Netilicina 84%, por lo que en las cepas del ISSSTE se recomienda el uso de estos antibióticos como una terapia alternativa para tratar ITU. Además, se obtuvieron altos porcentajes de sensibilidad a Ertapenem y Colistina 88%. Sin embargo, el uso de antibióticos polimixinas como Colistina no se pueden usar de manera prolongada debido a sus riesgos de neurotoxicidad, hepatotoxicidad y secreción en leche materna siendo esto un riesgo para los lactantes.

El estudio de susceptibilidad de las 65 cepas del serogrupo O25 muestran alta resistencia a β-lactámicos de primera generación 96.9%, así como a Quinolonas de segunda generación 81.1%, concordando con lo reportado por Tsukamoto y cols., en el 2014 quien encuentra altos porcentajes de resistencia a Quinolonas en cepas de *E.coli* serogrupo O25 de diferentes tipos de pacientes en Japón. La importancia de este tipo de antibióticos radica en el uso frecuente como antibióticos de primera elección en el tratamiento de ITU. Siendo una característica de este serogrupo la multiresistencia, tratándose este tema más adelante en este trabajo.

Los principales porcentajes de resistencia reportados en este trabajo para el serogrupo O25 se presentan en las siguientes familias de antibióticos: Quinolonas 81.8%, Trimetropim sulfametoxal 66.1%, β-lactámicos 61.3%, Cloranfenicol 55.3% y Aminoglucosidos 53.8%. Estos resultados son diferentes a lo reportado por Molina y cols.,2011 quien encuentra altos porcentajes de resistencia a las familias de antibióticos Trimetropim/sulfametoxazol 66%, Quinolonas 58.2%, y β-lactámicos 33.2% en cepas de *E. coli* serogrupo O25 ST131 aisladas de ITU del 2004 al 2007 en la ciudad de Mexico. Se observa un bajo porcentaje de resistencia en familias de antibióitocos usados como primera y segunda elección en los años del 2004 al 2007, a comparación de las cepas aisladas del 2011 al 2015 en el presente trabajo, donde se encuentra un incrementeo del porcentaje en estas familias. Presentándose un incremento de resistencia de más del 50% en antibióticos como Amoxicilina/Ácido Clavulánico y Amikacina en cepas del serogrupo O25.

Los altos porcentajes de resistencia presentes en estas cepas concuerdan con lo reportado a nivel mundial sobre el serogrupo, ya que estas cepas presentan altos porcentajes de resistencia a los antibióticos usados como primera opción en el tratamiento de ITU como lo es Cefalotina y Trimetropim/sulfametoxazol, y a casi todos los antibióticos usados como segunda opción.

Se obtuvieron porcentajes elevados de sensibilidad a Fosfomicina, Netilmicina y Trimetropim/sulfametoxasol, por lo que en las cepas del serogrupo O25 se recomienda el uso de estos antibióticos como una terapia alternativa para tratar ITU. Se encontró un porcentaje elevado de sensibilidad a Colistina 90%; sin embargo, hay que considerar los riesgos del uso de Colistina como una primera opción de tratamiento por los efectos adversos que puede ocasionar a largo plazo, por lo cual se sugiere solo se use este antibiótico después de hacer un perfil de susceptibilidad, corroborando que el patógeno sea resistentes a otros antibióticos usándose como última elección (Biswas y cols.,2012).

En el presente trabajo, se realizó el perfil de susceptibilidad antibiótica por la técnica de difusión de disco. Esta técnica es comúnmente utilizada en muchos laboratorios clínicos y de investigación, es una técnica confiable para el escrutinio de la resistencia antibiótica y la selección de la terapia mas adecuada, sin embargo, si se requiere de conocer la diferencia entre las cepas estudiadas respecto a su nivel de resistencia debemos usar los métodos basados en CMI. El método de difusión en disco es poco confiable para la detección de resistencia a Colistina (Dafopoulou y cols.,2015). Por lo cual, como metodología de complemento, se realizó la CMI a Colistina. La importancia de este antibiótico como opción terapéutica en la actualidad se da tras el surgimiento de cepas Gram negativas multiresistentes a otros antibióticos. La importancia de aplicar un test de sensibilidad en Colistina surge en el año 2016 según lo reportado por la Organización Panamericana de la Salud y la Organización Mundial de la Salud quienes emitieron una alerta epidemiológica al encontrarse en varios países de la región de las Américas, microorganismos con mecanismos de resistencia transferible a Colistina, entre los que se destaca a *E.coli* productora de BLEE (OPS y OMS, 2016).

En el 2015, Dafopoulou y cols., realizan un ensayo comparativo de métodos para determinar la susceptibilidad en Colistina por CMI. Se toma a la técnica de dilución en agar y micro dilución en caldo como métodos estándar, en ese trabajo se explica que la prueba para determinar CMI Liofilchem SRL no presenta reportes de evaluación de forma que no se puede asegurar su precisión y exactitud. Por lo cual, a pesar de que en este trabajo nos basamos en dicha prueba, se realizó una combinación con la técnica de micro dilución en caldo usando tubos de vidrio de 13x100mm. Tras la realización de la técnica en difusión por disco por el método Kirby- Bauer, se seleccionaron 21 cepas resistentes a este antibiótico provenientes de ambos ceparios. De estas el 29% (6 cepas) pertenecen al cepario del ISSSTE mientras que el 71% (15 cepas) son de serogrupo O25. Se usó como control negativo la cepa *Escherichia coli* ATCC® 25922 siendo su CMI 0.25−2 µg/ml según lo reportado por (CLSI,2017). La CMI se realizó usando sensidiscos para extraer el antibiótico, conteniendo este proceso una variante importante a considerar en los

resultados. Pues según lo reportado por Karvanen y cols.,2017 el antibiótico Colistina tiende a adherirse a un amplio rango de materiales incluida una amplia gama de plásticos y vidrio. Karvanen realiza una evaluación de concentración de Colistina sobre tiempo en diferentes materiales, encontrando que en los ensayos realizados en vidrio presentaban un porcentaje de perdida menor que aquellos realizados en polipropileno, a pesar de lo cual la perdida sigue siendo significativa en ambos casos. Además, reporta que los ensayos en donde se hacen diluciones seriadas presentan un rango de pérdida del antibiótico del 0 al 80%.

En este trabajo, se reporta una CMI de 16µg/ml de Colistina para el 100% (n=21) de las cepas, considerándose como cepas resistentes. Sin embargo, nuestro trabajo no se encuentra exento de la perdida en la concentración de Colistina. Dafopoulou y cols.,en el 2015 reporta el uso del Polisorbato 80 o Tween 80 en ensayos con Colistina puesto que presenta la capacidad de minimizar la adhesión de este antibiótico en los tubos además de presentar sinergia con el mismo. Por lo cual, para futuros estudios, se propone modificar la técnica empleada, experimentando con diferentes surfactantes de la familia Polisorbato, con la finalidad de encontrar el surfactante ideal para los ensayos de CMI a Colistina.

A lo largo de los años, se han publicado múltiples estudios en la literatura médica acerca de la susceptibilidad antibiótica en uropatógenos, pero solo unos pocos se han enfocado en la multidrogo resistencia (Arana y cols.,2017). En este estudio se aplicó una clasificación para determinar los diferentes tipos de resistencia según lo reportado por el ECDC, CDC y CLSI para la familia *Enterobacteriacea* (Magiorakos y cols.,2012).

El perfil de susceptibilidad realizado mostró que las cepas del ISSSTE fueron MDR en un 90% mientras que el 10% de las cepas fue XDR. Esto concuerda con el estudio reportado por Taheri y cols.,2016 quien encontró un porcentaje de MDR del 90% y un porcentaje de cepas XDR del 8.5% en cepas de *E.coli* aisladas de pacientes con ITU en Iran. En nuestro país, el presente estudio concuerda con lo reportado por García y cols., en el 2017, quien encuentra un porcentaje de MDR del 97% y un porcentaje de cepas XDR resistentes del 3% en cepas de *E.coli* aisladas de ITU, siento ese último porcentaje menor a lo encontrado en el presente trabajo. Lo cual nos indica el potencial patógeno que tienen estas cepas al resistir a más de un antibiótico, enfatizando el hecho de la importancia del uso de terapias químicas alternativas.

La multidrogo resistencia es un grave problema de salud pública que complica y limita el tratamiento de las ITU causadas por el serogrupo O25, retrasando la eficacia del tratamiento y aumenta el riesgo al usar antimicrobianos de última elección. Este grupo clonal pertenece al grupo filogenético B2, caracterizada por presentar co-resistencia a varias clases de antibióticos y por su habilidad de adquirir nuevos mecanismos de resistencia antibióticas a traves de plasmidos (Coque y cols ., 2008).

El estudio y la clasificación en las cepas serogrupo O25 nos muestra que el 100% de las cepas fueron multidrogo resistentes, esto concuerda con las características reportadas del serogrupo por Estrada y cols., en el 2017 quien trabajo con 40 cepas de *E.coli* aisladas de pacientes cursando con ITU en México, pertenecientes a el serogrupo O25. Encontrando que el 86% de las cepas fueron multidrogo resistente. Indicando un incremento de la capacidad de multidrogo resistencia en nuestro país para este serogrupo.

La aparición de microorganismos productores de β-lactamasas de espectro extendido, capaces de inactivar potentes cefalosporinas, ha generado gran preocupación, debido a las implicaciones clínicas y terapéuticas que representa. Esto dada la capacidad de transmitirse por elementos como plásmidos diseminando la resistencia (Oliver y cols., 1990; Álvarez, 2010).
En el presente trabajo se realizó la determinación de β-lactamasas de espectro extendido (BLEE) a las cepas aisladas del ISSSTE. 23.5% de las cepas analizadas presentan el fenotipo positivo de producción de BLEE. Este resultado es diferente a los reportado por Navarro y cols.,2011 quien trabajo con cepas de *E. coli* aisladas de pacientes hospitalizados y de la comunidad, recopiladas de hospitales en Sonora, México quien reportó un porcentaje del 31.8% de cepas productoras de BLEE. Así como a lo reportado por Ballesteros en el 2018, quien reporta un porcentaje 46% en mujeres no gestantes de los estados de Puebla y Sonora.

En nuestro grupo Zarzosa, reportó 17% de BLEE positivas para las mismas cepas del serogrupo O25 (Zarzosa y cols.,2016). Esto es similar a lo reportado a nivel mundial para este serogrupo. En el 2014 Ferjani y cols., analizaron la producción de BLEE en 201 cepas de UPEC, encontrando que 17.4% (35 cepas) fueron BLEE positivas presentando simultáneamente el den $bla_{CTX\text{-}M\text{-}15}$. El rango de cepas $BLEE^{+}$ va de 17 al 23.5%, por lo que es posible que estas cepas posean más de un mecanismo de resistencia a betalactamicos, como puede ser mutaciones en PBP (penicillin bindin protein), bombas de flujo y alteración de la permeabilidad (Blair y cols.,2015).

La formación de biofilm es un mecanismo de patogenicidad el cual protege al organismo de su erradicación, es un factor clave en la cronicidad de infecciones bacterianas, sobre todo aquellas involucradas con la presencia de catéteres urinarios. El crecimiento de biofilm, constituido por bacterias patógenas en tejidos frecuentemente deriva en infecciones, las cuales presentan elevada tolerancia a los antimicrobianos, así como al sistema inmune del hospedero (Naves y cols., 2008 ; Crémet y cols., 2013).
Las cepas de UPEC, forman fácilmente comunidades multicelulares denominadas como biofilm. Este se forma tanto en la superficie de catéteres como en paredes y células epiteliales de la vejiga. En este proceso, las bacterias se encuentran en estrecha proximidad, permitiendo el intercambio de material genético, por medio de plásmidos conjugativos los cuales pueden transportar genes asociados a la resistencia antibiótica.

Por lo cual comprender los factores del hospedero y del microorganismo que facilitan este proceso durante una ITU, permitirá el desarrollo de mejores estrategias para combatir la formación de biofilm y lograr tratamientos más eficaces (Flores-Mireles *y cols.*, 2015; Eberly y cols., 2017).

En la determinación de la formación de biofilm, el ensayo en microplaca es una herramienta importante para estudiar estadios tempranos de la formación de biopelícula. Esta técnica, resulta efectiva para identificar factores requeridos para iniciar este proceso y permite la formación de biofilm en paredes y fondo de la microplaca siendo ideal para el análisis de múltiples muestras (O'Toole, 2011).

En el presente trabajo, se determinó la capacidad de las cepas de formar biofilm, por medio de la metodología de cristal violeta en microplaca de 96 pocillos, siendo complementado con la determinación de proteína en ensayos de microplaca. Las proteínas extracelulares se pueden unir firmemente a superficies celulares, asociarse con la matriz extracelular o encontrarse difundida libremente en la matriz del biofilm. Dependiendo de la especie bacteriana, la composición de la matriz extracelular variará, entre exopolisacaridos, ácidos nucleicos, lípidos y proteínas, demostrándose que proteínas especificas en el biofilm juegan un papel importante en su adhesión y fijación (Wu y cols.,2014).

Tras el análisis de la formación de biofilm en ensayo de microplaca, se obtuvo que el 15% de las cepas del ISSSTE presentan la capacidad de formar biofilm. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Mittal y cols.,2015 y Ponnusamy y cols.,2012 quienes reporta un 13.5% y un rango de 6 al 16% de formación de biofilm para 135 y 166 cepas de UPEC aisladas de ITU provenientes de Haryana, India y Tamil Nadu, India respectivamente. Sin embargo, es más bajo que el 50% reportado por Rijavec en el 2008, quien trabajo con 105 cepas de *E.coli* provenientes de pacientes de Slovenia de ambos sexos cursando con ITU complicada a bacteremia. Así como lo reportado por Sargol y cols, 2015 quien trabajo con cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con ITU en el Noroeste de Iran. Reportando que el 48% de estas cepas fueron positivas a la formación de biofilm por el método de detección en micro placa.

Además, en el presente estudio se encontró que el 30% de *E. coli* serogrupo O25 son productoras de biofilm. Estos resultados concuerdan segun Clermon y cols, 2008, quien reporta por primera vez la capacidad de este serogrupo de formar biofilm asociado a la presencia de plasmidos CTX-M. Contribuyendo de este modo a la persistencia de estas clonas en ambientes hostiles. En conjunto, Kudinha y cols 2013, realizaron la detección de biofilm en cepas O25 ST131 por ensayos de microplaca en 131 cepas de mujeres cursando cistitis y pielonefritis en Australia.

Encontrando que el 95% presentan la capacidad de formar biofilm en comparación de las cepas pertenecientes a un serogrupo diferente de las cuales solo el 56.7% formaba biofilm. Explicándose esta alta prevalencia de biofilm con la expresión de la fimbria tipo 1, pues se ha reportado esta se encuentra en estrecha relación con este fenómeno(Kudinha y cols., 2013 ;Sarkar y cols, 2016).

Esto concuerda con lo encontrado en el presente trabajo al comparar las cepas serogrupo O25 con las cepas aisladas del ISSSTE, en donde se puede ver una clara disminución de la formación de biofilm.

Se realizo un ensayo seleccionando las cepas con alto rango de formación de biofilm provenientes de ambos ceparios (n=21). Siendo 17 del serogrupo O25 y 4 del cepario proveniente del ISSSTE, obteniéndose la concentración de proteína total a para cada cepa expresándose la formación de biofilm en DO/mg de proteína. Las cepas control alta formadora de biofilm presenta un valor de 125.42 mientras que para el control negativo (medio LB sin inocular) fue de 6.86. El 100% de las cepas probadas (n=21) presenta un valor menor a la cepa control ATCC completar, pero mas cercano a aquel de UPEC CFTO73, siendo el promedio de 32.6.

Se sugiere continuar con el análisis de la formación de biofilm considerando la concentración de proteínas totales para el resto de las cepas, con el fin de tener una medición más exacta, así como determinar la identidad y proporción de las proteínas presentes. Esto debido a que la presencia de la familia de proteínas DNABII se ha reportado en cepas de UPEC como una familia de proteínas importante para el crecimiento del biofilm y se ha demostrado que la adición exógena de estas proteínas promueve la formación de biofilm dependiente del DNA extracelular (eDNA) (Devaraj y cols., 2015).

Se ha reportado que la formación de biofilm en interfaz aire-medio liquido, esta conformada por células bacterias rodeadas de peliculas de curli y celulosa. Depende del regulador maestro de biofilm CsgD (Hufnagel y cols., 2015). Este tipo de biofilm, se puede inhibir principalmente en presencia de glucosa y cambios de osmolaridad. Lo que explicaría la ausencia de este fenómeno en las cepas analizadas en este estudio en fase solida ya que el medio fue suplementado con este azúcar. Por lo cual se sugiere como en otros trabajos reportar la formación de la película indicando las condiciones y medios usados.

A la par de la determinación de biofilm en microplaca, se realizó la estandarización de la técnica para detectar fenotipo positivo a biofilm en medio agar Rojo Congo para ambos ceparios. Los resultados obtenidos en cada uno de los métodos fueron comparados según dos categorías: formadoras y no formadoras de biofilm. La categoría intermedia, fue considerada dentro de las cepas formadoras de biofilm en ambos métodos. Encontrándose una discordancia entre los datos obtenidos entre ambos métodos, pues la técnica de agar Rojo Congo arroja porcentajes elevados en la categoría Formadoras de biofilm en ambos ceparios.

Según lo reportado por Hassan *y cols* en e*l*, 2011 la metodología de microplaca presenta un porcentaje de sensibilidad del 73% y 92.5% de especificidad a diferencia de la metodología en agar Rojo Congo la cual presenta un porcentaje de sensibilidad del 11% y 92% de especificidad. Por lo cual se hipotetiza que la técnica de agar Rojo Congo al ser una técnica basada en el viraje de las colonias sembradas, permite falsos positivos pues la mayoría de las cepas intermedias se

muestran de color rosa obscuro, pudiéndose confundir con las cepas negativas las cuales se muestran rosa claro.
Recordando que al final, las cepas intermedias se consideraron dentro de las formadoras de biofilm al comparar las técnicas. Dado que la técnica en Rojo Congo presenta una exactitud de solo el 41% en contra de la técnica en micro placa (80%), se decidió descartar los resultados obtenidos por esta técnica, eliminando la posibilidad de usarla como método de selección de cepas formadora de biofilm.

Las cepas de UPEC posen factores de virulencia los cuales le permiten infectar a su hospedero, haciendo posible colonización, invasión y la persistencia en el tracto urinario. Los factores de virulencia son principalmente de dos tipos: los expresados en la superficie celular (que además desempeñan funciones de adhesión e invasión de tejidos, así como formación de biofilm) y los producidos dentro de la célula bacteriana. Entre estos factores se encuentran las adhesinas, fimbrias, sideróforos, toxinas entre otros (Terlizzi y cols., 2017; Walsh y cols*.,* 2017).

En este trabajo, se determinó la prevalencia de los genes asociados a factores de virulencia en las 51 cepas del ISSSTE obteniéndose de 1 a 9 factores de virulencia en el 100% de las cepas del ISSSTE. Se encontró que el 96% de las cepas de *E. coli* aisladas de pacientes femeninos del hospital del ISSSTE presentan el gen *fimH,* que codifica la adhesina de la fimbria tipo 1, concordando con lo reportado por (Estrada y cols*.*,2017) quien trabajó con dos poblaciones de cepas de *E. coli* aisladas de ITU, en México, observando un porcentaje del 91% del gen *fimH* y con un estudio de Eslovenia donde la frecuencia del gen fue de 97% (Starčič-Erjavec, Darja Žgur-Bertok, 2008) *.*

El gen *iucD* relacionado a la captación de hierro, fue el segundo más prevalente en el presente trabajo, encontrado en un 65%, seguido del gen *iha* el cual se relaciona a la captación de hierro y adherencia en un 35%. Siendo el valor de *iucD* menor a lo reportado en un estudio previo el cual encuentra en un 91% este gen (Rijavec y cols*.*,2008). Así como lo reportado por Panigua y cols., en el 2015 quien reporta un porcentaje mayor para *iha* 64.9%. Los genes *hlyA* y *cnf-1* que codifica la toxina alfa hemolisina y el factor necrotizante citotóxico 1, fueron encontrados en un porcentaje del 19% y 11% respectivamente, estos porcentajes concuerdan con lo reportado por Paniagua, y cols. en el 2015 con el gen *hlyA* en un 15.4%, mientras que *cnf-1* reportado por Rijavec*,y cols.*,2008 quien observa en sus cepas un 12% de este gen (Rijavec y cols*.*,2008).

Las fimbrias tipo P están codificadas por un clúster de genes, El clúster incluye el gen *papA*, que codifica para la subunidad estructural mayor, siendo *papG* la adhesina (Merino, 2018). En el presente estudio se condiera la presencia de los genes *papA*+ *papGII/papGIII* como cepas *pap*+. Se encontraron en menor porcentaje los genes *papA* en un 8% de las cepas en combinación con el gen *papGII* y *III* que codifica el alelo II y III de la adhesina *papG*. Sin embargo en trabajos previos estos genes se han reportado en porcentajes mayores, pues Firoozeh y cols.,2014 encuentra el gen *pap* en un 16% de las 150 cepas de UPEC que analizó.

El gen *sat* codificante de una de las toxinas encargadas de provocar daño celular a nivel de riñón y el subsecuente paso de UPEC al torrente sanguíneo; y el gen *fliC* que codifica la adhesina flagelar fueron encontrados en un 8% ambos. Estos resultados difieren de lo reportado por Estrada y cols., en el 2017 y Naves y cols., 2008, donde el gen *sat* aparece en un 26% y 46.7% respectivamente. Respecto al gen *fliC* en nuestro grupo de trabajo se encontro en un 16% en mujeres no gestantes y 44% en mujeres gestantes con ITU y no se ha reportado en ningun otro trabajo la frecuencia de este gen.

La importancia del flagelo radica en que este es un factor importante en la patogenicidad de UPEC, ya que este le permite la capacidad de ascender desde la vejiga por los uréteres y llegar a riñón. El bajo porcentaje de los genes que codifican la adhesina flagelar y la fimbria Pap, indica que son pocas las cepas capaces de causar pielonefritis ya que necesitan estos factores que le permiten ascender por los uréteres y alojarse en el riñón.

Como técnica complementaria en este trabajo se realizó la detección de genes codificantes de 4 tipos de BLEE´s: *bla*$_{CTX-M}$, *bla*$_{OXA-1}$, *bla*$_{TEM}$ y *bla*$_{SHV}$, para ambos ceparios. Se encontró en las cepas del ISSSTE una mayor proporción de *bla*$_{TEM}$ con un 66%, seguido de *bla*$_{CTX-M}$ con 25% y *bla*$_{OXA-1}$ con 9%, cabe mencionar que el gen *bla*$_{SHV}$ no se detectó en ninguna de las muestras de este cepario.

El porcentaje obtenido en este trabajo para *bla*$_{TEM}$ concuerda con lo reportado por Shahi y cols., en el 2013 quien trabajo con cepas de *E.coli en* Pradesh, India detectando el gen *bla*$_{TEM}$ en un 68%. Estos porcentajes concuerdan con lo reportado en la literatura universal, pues esta betalactamasa es la más común(Alvarez D.,2010). El 9% obtenido en el presente trabajo para *bla*$_{OXA-1}$ concuerda con el 10% reportado por Zhao y cols., en el 2015 quien analiza cepas de UPEC aislada de pacientes hospitalizados durante periodos largos en el Hospital Universitario Soochow en Asia. Sin embargo, los porcentajes para *bla*$_{CTX-M}$, y *bla*$_{SHV}$ encontrados en el presente trabajo (25% y 0% respectivamente) no concuerda con lo reportado por Zhao y cols., en el 2015 donde estos genes se encontraron en un 90%, y 10% respectivamente.

Al analizar el fenotipo y genotipo BLEE+ presente en las cepas del ISSSTE, se reporta la presencia de 1 a 3 genes *bla* por cepa. Presentándose un solo gen en un 54.5%, dos genes en un 9% y un 18.1% en la presencia de tres genes *bla (bla*$_{CTX-M}$, *bla*$_{OXA-1}$, *blaTEM*). La ausencia de genes *bla* buscados en este trabajo, se presentó en un 18.1%. Por lo cual se piensa, que estos bajos porcentajes son causados por la expresión de otros genes asociados a BLEE, los cuales no se buscaron en el presente trabajo, sugiriéndose ampliar la búsqueda de estos.

En las cepas O25 se encontró en mayor proporción *bla*$_{TEM}$ con 40%, seguido de *bla*$_{CTX-M}$ con 13%, y *bla*$_{OXA-1}$ con 17%, a pesar de que se realizó la detección del gen *bla*$_{SHV}$ tampoco se detectó su presencia en ninguna de las muestras de este cepario, siendo diferente a lo reportado por Hussain y cols.,2012 quien trabajo con cepas de *E. coli* aisladas de ITU en Malasia del serogrupo 025 obteniendo a *bla*$_{TEM}$ con 12%,

bla$_{CTX-M}$ en un 24%, *bla*$_{OXA-1}$ 16%, mientras que el gen *bla*$_{SHV}$ no se detectó. Los dos estudios coiciden respecto a bla oxa-1 y a SHV.
Existen diversos estudios donde las cepas del serogrupo O25 presentan en altos porcentajes el gen *bla*$_{CTX-M}$ (50%) pertenecientes al grupo filogenetico B2 (Coque y cols., 2008; Álvarez, 2010). Al analizar el fenotipo y genotipo BLEE+ en las cepas de este serogrupo, se encontró de 1 a 3 genes *bla* por cepa. Presentándose un solo gen en un 50%, dos genes en un 16.6% y un 8.3% en la presencia de tres genes *bla (bla*$_{CTX-M,}$ *bla*$_{OXA-1}$, *bla*$_{TEM}$) concordando con el fenotipo CTX, FEP y ATM en cepas con ambos genes (*bla*$_{CTX-M}$ *y bla*$_{TEM}$). La ausencia de genes *bla* buscados en este trabajo, se presentó en un 25%. Por lo que se hipotetiza algunas de las cepas presentan otro mecanismo de resistencia a estos antibióticos ya que su fenotipo es de resistencia a beta lactamicos.

Diversos estudios sobre los plásmidos, reportan que estos son elementos autoreplicativos que a pesar de no ser esenciales para la bacteria, frecuentemente cargan y diseminan genes que le confieren ciertas características como resistencia, virulencia, la habilidad para metabolizar substancias raras y persistir bajo condiciones extremas (Beceiro *y cols.*,2013; Mathers y cols., 2015). En este trabajo se encontró que el 43% de las cepas del ISSSTE aisladas en el 2016 alberga bandas plasmídicas. Reportandose de 1 a 5 bandas plasmídicas por cepa, con un tamaño relativo de 0.25 a 10.5 kb. Estos resultados discrepan con lo reportado con anterioridad en nuestro grupo de estudio por Garcia, 2017 quien trabajo con cepas provenientes del ISSSTE en el año 2011, reportando una oscilación entre el tamaño de las bandas plasmídicas de 1 a 179 kb, siendo los mas frencuentres 1,2,3 y ≥50 kb.

A pesar de este hecho se sugiere confirmar estas bandas plasmídicas por un método de mayor especificidad para la detección del peso y número de plásmidos como lo es la metodología de electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE). Esto con el fin de identificar plasmidos de mayor peso molecular, pues se ha reportado que plásmidos de más de 88Kb confieren genes relacionados a la resistencia antibiótica y factores de virulencia.

Zarzoza y cols., en el 2016, realizo el perfil plasmídico para las cepas pertenecientes al serogrupo O25, encontrando una prevalencia del 80% en las cepas, las cepas posen de 1 a 7 plásmidos, siendo dos y 5 los más frecuentes. Los tamaños relativos se encontraron de 0.85 kb y 127 kb, siendo los más frecuentes 1-3 kb y 100-127 kb. Esto resulta de suma importancia dado que los plásmidos grandes podrían contener genes de resistencia a antibióticos, así como genes que codifican BLEE. Estas cepas presentan una amplia variación en el número de bandas plasmídicas.

El conocer el contenido plasmídico para ambos ceparios, ISSSTE y del serogrupo O25 nos permitió evaluar y seleccionar las cepas que posteriormente fueron sometidas a ensayos de conjugación. Posteriormente se seleccionaron 23 y 25 cepas del ISSSTE y del serogrupo O25 respectivamente, se priorizaron las cepas con 3 a 6 bandas plasmídicas. Con finalidad de conocer las cepas capacez de conjugar a estas cepas se les determinó la presencia de los genes *traT* (solo cepas ISSTE) y MOB$_{F12}$ como factores determinantes de la movilidad de los plásmidos.

La importancia de la presencia de dichos genes en las cepas radica en que los genes *tra*, son algunos de los genes necesarios para la transferencia de material genético en bacterias Gram negativas (Grohmann y cols.,2003). Ademas, el locus *tra* incluye el gen de pilina y genes reguladores, que juntos forman un Pili conjugativo en la superficie celular, así como las proteínas poliméricas que pueden adherirse a la superficie de bacterias F^- e iniciar la conjugación, según lo cual logramos reconocer la importancia de estudiar la detección del gen *tra* como uno de los principales involucrados en la transferencia de material genético, así como en la adherencia. Mientras que el set de genes de movilidad (MOB) es esencial para el proceso de conjugación de ADN, además de un complejo de formación de cuatro pares de apareamiento (MPF) asociado a la membrana, el cual es una forma de sistema de secreción tipo 4 (T4SS), proporcionando el canal de acoplamiento (Smillie y cols., 2010).

Estos genes contribuyen a la movilidad de los plásmidos incrementando la posibilidad de la presencia de plásmidos movilizables en las cepas. En este grupo de 23 y 25 cepas, se encontró el gen *traT* en un 48% (n=11) y el gen MOB_{F12} en un 34.7% (n=8) en las cepas del ISSSTE. En las cepas del serogrupo O25 el gen MOB_{F12} se encontró en un porcentaje del 40% (n=10) y el 100% (n=25) de las cepas son $traT^+$ (Vasquez-Sanchez, 2017).

Al concluir el análisis de las cepas de ambos ceparios en busca de las cepas candidatas para los ensayos de conjugación se seleccionaron tres cepas provenientes del cepario del serogrupo O25 las cuales además de las características previamente mencionadas, presentan los genes *traT y* MOB_{F12}, son multidrogo resistente, presentan una amplia variedad de factores de virulencia, presentan sensibilidad al antibiótico Rifampicina y son resistentes a Ampicilina.
Rijavec y cols., en el 2006, realizaron un estudio con 110 cepas de UPEC, aisladas de la comunidad en Slovenia y reportó la transferencia de resistencia antibiótica por conjugación.

En el presente trabajo se realizaron tres ensayos de conjugación, obteniéndose 4 clonas transconjugantes, 3 de la cepa CR67 y 1 de la cepa CR213, las cuales además de crecer en medio con los antibióticos Rifampicina y Ampicilina, poseen los mismos factores de virulencia, *fimH, fliC, satAP, iucD e iha,* que su cepa donadora. En cuanto a la presencia de los genes codificantes a BLEE, las transconjugantes son bla_{TEM}+ simlar a las cepas donadoras. De estos ensayos podemos decir que las cepas donadoras presentan plásmidos conjugativos asociados a resistencia bacteriana, siendo una característica de estos ensayos su baja frecuencia de conjugación ya que solo se obtuvieron transconjugantes en la placa sin diluir. Se requiere caracterizar el perfil de susceptibilidad de las clonas transconjugantes para determinar que otros genes aparte de Amp fueron transferidos por conjugación.

Además, se propone detectar la presencia de secuencias *rep* con la finalidad de identificar la prevalencia de plásmidos tipo F que son los más frecuentemente reportados como plasmidos conjugativos en la familia *Enterobacteriaceae*.

Se ha reportado que lo plásmidos que pertenecen al grupo de incompatibilidad F acarrean genes codificantes para resistencia antibiótica y factores de virulencia (Rijavec y cols.,2006).

Como parte del análisis integral de los resultados obtenidos en el presente trabajo, se realizó un análisis de las cepas tomando como principal variable, la clasificación de la resistencia en multidrogo y extremadamente drogo resistentes, comparando estas cepas con su capacidad de formar biofilm y la presencia de genes asociados a factores de virulencia. Obteniéndose los siguientes resultados por cada cepario. En las cepas del ISSSTE de pacientes femeninos cursando ITU, el 20% de las cepas XDR presentaron la capacidad de formar biofilm, presentando en alto porcentaje los factores de virulencia *fimH* 100% e *iucD* 40%. El 17% de las cepas MDR presentaron la capacidad de formar biofilm, presentando en algo porcentaje los factores de virulencia *fimH* 95%, *iucD* 67%, *iha* 33%, *hlyA* 18%, *cnf-1* 12% y *papA+papG* 10%.

Esto concuerda con lo reportado mundialmente, pues una de las características fenotípicas que le proporciona la formación de biofilm a las cepas es la resistencia antibiótica al formar una barrera o incluso degradar o modificar la composición química de los antibióticos (Mittal y cols., 2015).

Se encuentra una estrecha relación entre los porcentajes de las cepas MDR y su incremento en el número y porcentaje de factores de virulencia (Rijavec y cols., 2008). En las cepas del serogrupo O25, el 34% de las cepas MDR presentaron la capacidad de formar biofilm, presentando en alto porcentaje los factores de virulencia *fimH* 100%, *iucD* 89%, sat 77% *iha* 66%, *fliC* 12% y *vat, hlya* 8%. No se presentan cepas XDR en este cepario, por lo cual se omitió esa relación. Se ha reportado que la formación de biofilm, se encuentra significativamente asociada a la presencia de los genes *fimH*, y *pap, así* como a los genes asociados a betalactamasas (Tajbakhsh y cols.,2016). Estos resultados reflejan la heterogeneidad en la distribución de genes de virulencia y resistencia antibióticos entre las cepas de UPEC.

Los estudios que se realizan en la actualidad sobre transferencia de material genético en cepas de UPEC son limitados, siendo el presente trabajo el primero en nuestro grupo de investigación y en nuestro país en comparar las características de virulencia, formación de biofilm, resistencia, presencia del genotipo BLEE positivo y transferencia del material genético por conjugación en dos ceparios diferentes. En nuestros resultados se pueden observar diferencias en cuanto al porcentaje de resistencia, capacidad de formación de biofilm y potencial para transferir material genético por conjugación en ambos ceparios.

Estos resultados permitirán comprender mejor el comportamiento de UPEC causante de ITU, en población cuya patología es causada por el serogrupo O25, así como en población femenina a nivel nosocomial de la ciudad de Puebla (ISSSTE), forjando las bases para investigaciones en nuestro País, dado que se ha observado que las cepas que analizamos cuentan con diversas características tanto de virulencia como de resistencia que han sido reportadas previamente en la literatura internacional, por lo cual podemos afirmar que las cepas de *E.coli* uropatógena que afectan a la población Mexicana presentan características únicas en comparación con lo reportado en otros países.

13.CONCLUSIONES

1.- Las cepas de *E. coli* aisladas de mujeres cursando con ITU son multidrogoresistentes en un alto porcentaje. La resistencia más elevada fue a antibióticos de primera elección como son los β-lactamicos y Quinolonas.

2.- Los antibióticos recomendados para el tratamiento de ITU son Ertapenem y Fosfomicina.

3.-Se recomienda realizar un tratamiento antibiótico individualizado de los pacientes cursando ITU.

4.- Los genes de virulencia *fimH* e *iucD* se encontraron en altos porcentages en las cepas del ISSSTE. Reportandose 4 virotipos comunes, una cepa con los nueve genes de virulencia y 8 cepas que solo presentaron *fimH.*

5.- El 23% de las cepas del ISSSTE son resistentes a antibióticos betalactámicos por la producción de BLEE. El 50% de cepas UPEC con fenotipo BLEE+ amplificaron al menos un gen para BLEE.

6.- El 54% de UPEC O25 con fenotipo BLEE+ amplificaron al menos un gen para BLEE.

7.-La prevalencia media de genes BLEE en el serogrupo O25, nos habla de que se debe ampliar la gama de genes determinados, con el fin de encontrar el mecanismo de resistencia a esta familia de antibióticos.

8.-Las cepas UPEC O25:H4 son más formadoras de biofilm (30%) respecto de las cepas del ISSSTE (15%).

9.- El serogrupo O25 presenta un mayor potencial (40%) para transferir características de resistencia y/o virulencia a través de los plásmidos presuntamente conjugativos respecto a las cepas del ISSTE (8.6%).

14. PERSPECTIVAS

1)Determinar el grupo filogenético de las cepas del ISSSTE

2) Determinar el serogrupo de las cepas del ISSSTE

3) Determinar la presencia de islas de patogenicidad en las cepas del ISSSTE

4) Realizar ensayos de adherencia e invasión en cepas O25 e ISSSTE

5)Determinar el perfil plasmídico de ambos ceparios por campos pulsados

6) Continuar con los ensayos de conjugación para las cepas O25

7) Continuar el análisis de las cepas transconjugantes de las O25 empleadas en el presente trabajo

8) Determinar la concentración de proteínas a las cepas altamente formadoras de las cepas restantes en ambos ceparios.

9) Completar para todo el cepario la determinación de biofilm considerando la concentración proteíca y como controles una cepa de UPEC CFTO73 y EAEC

10) Buscar otros mecanismos de resistencia a esta familia de antibióticos.

11) Determinar la asociación de formación de biofilm y la presencia de genes que codifican el curli

15. REFERENCIAS

Ambroz, Jerneja, Rolf Reissbrodt, Angelika Fruth, and Veronika Kriz. 2006. “High Prevalence of Multidrug Resistance and Random Distribution of Mobile Genetic Elements Among Uropathogenic Escherichia Coli (UPEC) of the Four Major Phylogenetic Groups.” 53: 158–62.

Anusha, S U, S K Sundar, and S Rajan. 2015. “RAPD Pattern, Virulence Nature and Plasmid Profile of MDR Uropathogenic Escherichia Coli.” *Pelagia Research Library Advances in Applied Science Research* 6(7): 145–51. www.pelagiaresearchlibrary.com.

Arana, David M., Margarita Rubio, and Juan-Ignacio Alós. 2017. “Evolution of Antibiotic Multiresistance in Escherichia Coli and Klebsiella Pneumoniae Isolates from Urinary Tract Infections: A 12-Year Analysis (2003–2014).” *Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica (English ed.)* 35(5): 293–98. http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2529993X17301119.

Arenas M., Navarro A., Molina T., Martinez J., Aroche F. y Martinez Y. 2012. *Escherichia coli* Uropatógena. En modelos de la patogenesis de las enfermedades infecciosas II.Rocha García R., Lozano P. y Marinez Y. (Eds.) Publicación especial de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Puebla, México.

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

Alvarado A., Garcillán P. y De la Cruz F.2012. A Degenerate Primer MOB Typing (DPMT) Method to Classify Gamma-Proteobacterial Plasmids in Clinical and Environmental Settings.Plos One.España, 1-15.

Álvarez Almanza Delfín. 2010. “Identificación de Betalactamasas de Espectro Extendido En Enterobacterias Identification of Extended Spectrum â-Lactamases in Enterobacterias.” *Revista Habanera de Ciencias Médicas* 99(44): 516–24. http://scielo.sld.cu.

Asadi S., Kargar M., Solhjoo K. Najafi A. and GhorbaniDalini S., 2014. The Association of Virulence Determinants of Uropathogenic *Escherichia coli* With Antibiotic Resistance. Jundishapur J Microbiol. 7(5): 1-5.

Ballesteros Monrreal Manuel Gerardo.2018.Estudio de determinantes de virulencia y resistencia en cepas de Escherichia coli uropatógena aisladas de mujeres gestanes y no gestantes en los estados de Sonora y Puebla.Tesis de Posgrado. Maestría en ciencias.Instituto de ciencias. Centro de

Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Beceiro, Alejandro, María Tomás, and Germán Bou. 2013. “Antimicrobial Resistance and Virulence: A Successful or Deleterious Association in the Bacterial World?” *Clinical Microbiology Reviews* 26(2): 185–230.

Betancor, L, M Gadea, and K Flores. 2006. “Genética Bacteriana.” *Temas de bacteriología y virologia médica* (C): 59–80.

Biswas, Silpak et al. 2012. “Colistin: An Update on the Antibiotic of the 21st Century.” *Expert Review of Anti-Infective Therapy* 10(8): 917–34.

Blair, Jessica M A et al. 2015. “Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance.” *Nature Reviews Microbiology* 13(1): 42–51. http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro3380.

Bush, Karen, and George A. Jacoby. 2010. “Updated Functional Classification of β-Lactamases.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54(3): 969–76.

Casellas M.2008. Etiología (etiopatogenia) de las infecciones urinarias, Laboratorio CIBIC. Sanatorio Parque y Sanatorio de Niños.Rosario,Argentina.

Clinicians, Description, and Sensitest Colistin. 2017. “SensiTest Colistin.”

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 27th ed. CLSI Supplement M100S.Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017.

Coque, Teresa M et al. 2008. “Dissemination of Clonally Related *Escherichia Coli* Strains Expressing Extended-Spectrum Beta-Lactamase CTX-M-15.” *Emerging infectious diseases* 14(2): 195–200.

Crémet, Lise et al. 2013. “Comparison of Three Methods to Study Biofilm Formation by Clinical Strains of Escherichia Coli.” *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 75(3): 252–55.

Clermont O, Christenson J., Denamur E. y Gordon D. 2013.The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. Environmental Microbiology Reports.,58-65. http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2012.11.019.

Dafopoulou, Konstantina et al. 2015. “Comparative Evaluation of Colistin Susceptibility Testing Methods among Carbapenem-Nonsusceptible Klebsiella Pneumoniae and Acinetobacter Baumannii Clinical Isolates.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 59(8): 4625–30.

Da Silvaa G. y Mendonca N. 2012. Association between antimicrobial resistance and virulence in *Escherichia coli*. Virulence, 18-28.

Devaraj Aishwarya, Justice Sheryl and Goodman Steven. 2015. “HHS Public Access.” 91(2): 165–71.

DGE. 2015. “Informe Anual 2015.” *Secretaria De Salud*: 1689–99. www.epidemiologia.salud.gob.mx.

Eberly, Allison R. et al. 2017. “Biofilm Formation by Uropathogenic Escherichia Coli Is Favored under Oxygen Conditions That Mimic the Bladder Environment.” *International Journal of Molecular Sciences* 18(10): 1–12.

Estrada M., Laura Iveth et al. 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): 426–33.

Firoozeh, Farzaneh, Mahmood Saffari, Foroogh Neamati, and Mohammad Zibaei. 2014. “Detection of Virulence Genes in Escherichia Coli Isolated from Patients with Cystitis and Pyelonephritis.” *International Journal of Infectious Diseases* 29.

Flores A., Walker J., Caparon M y Hultgren S. 2015.Urinary tract infections: epidemiology, mechanims of infection and treatment options. *NATURE REVIEWS | MICROBIOLOGY*, 269-284.

Flores-Hernández I. 2015. Factores de virulencia y determinación plasmidica de Escherichia coli uropatógena en pacientes con displasia cervical. Tesis de licenciatura. México. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Flores-Mireles, Ana L., Jennifer N. Walker, Michael Caparon, and Scott J. Hultgren. 2015. “Urinary Tract Infections: Epidemiology, Mechanisms of Infection and Treatment Options.” *Nature Reviews Microbiology* 13(5): 269–84. http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrmicro3432.

Ferjani, S., Saidani, M., Ennigrou, S., Hsairi, M., Slim, A.F. and Ben Boubaker, I.B. (2014). Multidrug resistance and high virulence genotype in uropathogenic *Escherichia coli* due to diffusion of ST131 clonal group producing CTX-M-15: an emerging problem in a Tunisian hospital. Folia Microbiol (Praha)59,257-262.

García, Cristina Seral, María Pardos de la Gándara, and Francisco Javier Castillo García. 2010. “Betalactamasas de Espectro Extendido En Enterobacterias Distintas de Escherichia Coli y Klebsiella.” *Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clinica* 28(SUPPL. 1): 12–18. http://dx.doi.org/10.1016/S0213-005X(10)70003-3.

García García Jesús David. 2017. Estudio de determinación de virulencia en cepas de Escherichia coli uropatógena de un hospital del sector público. Licenciatura en Biomedicina. Instituto de ciencias. Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Garcillán-Barcia, María Pilar, María Victoria Francia, and Fernando De La Cruz. 2009. "The Diversity of Conjugative Relaxases and Its Application in Plasmid Classification." *FEMS Microbiology Reviews* 33(3): 657–87.

Grohmann, Elisabeth, Günther Muth, and Manuel Espinosa. 2003. "Conjugative Plasmid Transfer in Gram-Positive Bacteria." *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 67(2): 277–301, table of contents. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=156469&tool=pmcentrez&rendertype=abstract%0Ahttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12794193%0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC156469.

Hassan, Afreenish et al. 2011. "Evaluation of Different Detection Methods of Biofilm Formation in the Clinical Isolates." *The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases* 15(4): 305–11.

Hufnagel D., De Pas W. and Chapman M. 2015. "The Biology of the Escherichia Coli Extracellular Matrix." *Microbial Biofilms, 2nd Edition* 3(3): 249–67. http://www.asmscience.org/content/book/10.1128/9781555817466.chap12.

Hussain, Arif et al. 2012. "Multiresistant Uropathogenic Escherichia Coli from a Region in India Where Urinary Tract Infections Are Endemic: Genotypic and Phenotypic Characteristics of Sequence Type 131 Isolates of the CTX-M-15 Extended-Spectrum-β- Lactamase-Producing Lineage." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56(12): 6358–65.

Ibarra- Valencia Marco Antonio. 2015. Análisis de determinantes de patogenicidad de cepas de *Escherichia coli* aisladas de infecciones de tracto urinario. Tesis de grado. Licenciatura en Biomedicina. Escuela de Biología. Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Karvanen, Matti, Christer Malmberg, Lena E Friberg, and Otto Cars. 2017. "Crossm Colistin Is Extensively Lost During." 61(11): 1–9.

Kudinha, Timothy et al. 2013. "Escherichia Coli Sequence Type 131 as a Prominent Cause of Antibiotic Resistance among Urinary Escherichia Coli Isolates from Reproductive-Age Women." *Journal of Clinical Microbiology* 51(10): 3270–76.

López-Banda, Daniela A. et al. 2014. “Identification of Virulence Factors Genes in Escherichia Coli Isolates from Women with Urinary Tract Infection in Mexico.” *BioMed Research International* 2014.

Magiorakos, A. S.-L. 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standarddefinitions for acquired resistance. Clin Microbiol Infect, 268–281.

Marhova, M., S. Kostadinova, and S. Stoitsova. 2010. “Biofilm-Forming Capabilities of Urinary Escherichia Coli Isolates.” *Biotechnology and Biotechnological Equipment* 24(April): 589–93.

Marjanca STARČIČ-ERJAVEC, Darja ŽGUR-BERTOK, and Department. 2008. “Acta Biologica Slovenica.” 57: 13–23.

Martinez J. 2012. Determinación del serotipo y presencia de genes de virulencia en cepas de *E. coli* uropatógena (UPEC) multirresistentes. Tesis de licenciatura. México. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Mathers, Amy J., Gisele Peirano, and Johann D.D. Pitout. 2015. “The Role of Epidemic Resistance Plasmids and International High- Risk Clones in the Spread of Multidrug-Resistant Enterobacteriaceae.” *Clinical Microbiology Reviews* 28(3): 565–91.

Merino Velasco Irene. 2018. Resistencia, virulencia y estructura poblacional de *Escherichia coli* uropatógena. Tesis Doctoral.Facultad de Farmacia. Departamento de Microbiología II, Universidad Complutense de Madrid.

Millán, Ysheth, Erick Hernández, Beatriz Millán, and María Araque. 2014. “Distribución de Grupos Filogenéticos y Factores de Virulencia En Cepas de Escherichia Coli Uropatógena Productora de β-Lactamasa CTX-M-15 Aisladas de Pacientes de La Comunidad En Mérida, Venezuela.” *Revista Argentina de Microbiologia* 46(3): 175–81. http://dx.doi.org/10.1016/S0325-7541(14)70069-0.

Mittal, Seema, Madhu Sharma, and Uma Chaudhary. 2015. “Biofilm and Multidrug Resistance in Uropathogenic *Escherichia Coli*.” *Pathogens and Global Health* 109(1): 26–29 http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1179/2047773215Y.0000000001.

Molina López J.2011. Papel de plásmidos e integrones en la multirresistencia a antimicrobianos en cepas de Escherichia coli uropatógenas y su posible asociación con adherencia e invasividad en células cultivadas.Tesis Doctoral. México. Instituto Politécnico Nacional.

Molina-López, José et al. 2011. “Drug Resistance, Serotypes, and Phylogenetic Groups among Uropathogenic Escherichia Coli Including O25-ST131 in Mexico City.” *Journal of Infection in Developing Countries* 5(12): 840–49.

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

Navarro-Navarro, Moisés, Ramón Enrique Robles-Zepeda, Adriana Garibay-Escobar, and Eduardo Ruiz-Bustos. 2011. “Escherichia Coli y Klebsiella Pneumoniae Comunitarias y Hospitalarias Productoras de β-Lactamasas En Hospitales de Hermosillo, Sonora.” *Salud Publica de Mexico* 53(4): 341–44.

Naves, Plínio et al. 2008. “Correlation between Virulence Factors and in Vitro Biofilm Formation by Escherichia Coli Strains.” *Microbial Pathogenesis* 45(2): 86–91.

Neamati F., Firoozeh F., Saffari M., Zibaei M.2015.Virulence genes and antimicrobial resistance pattern in uropatogenic *Escherichia coli* isolated from hospitalized patients in Kashan, Iran.Jundishapur J Microbiol,1-6.

OMS y OPS. 2016. “ Alerta Epidemiológica Enterobacterias con resistencia transferible a colistina, Implicaciones para la salud publica en las Américas”https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=12148:10-june-2016-enterobacteriacea-plasmid-mediated-transferable colistin-resistance-public-health-implications-americas-epidemiological alert&Itemid=42346&lang=es.

O’Toole, George A. 2011. “Microtiter Dish Biofilm Formation Assay.” *Journal of Visualized Experiments* (47): 10–11. http://www.jove.com/index/Details.stp?ID=2437.

Oliver, Antonio, and Rafael Cantón. 1990. “Enterobacterias Productoras De B-Lactamasas Plasmídicas De Espectro Extendido.” *Control de calidad SEIMC*: 1–10.

Orrego, Claudia, Henao Claudia, and Jaiberth Cardona. 2014. “Prevalencia de Infección Urinaria, Uropatógenos y Perfil de Susceptibilidad Antimicrobiana.” *Acta Médica Colombiana* 39: 352–58. http://www.redalyc.org/pdf/1631/163132885008.pdf.

Paniagua-Contreras, Gloria Luz et al. 2015. “Virulence Factors, Antibiotic Resistance Phenotypes and O-Serogroups of Escherichia Coli Strains Isolated from Community-Acquired Urinary Tract Infection Patients in Mexico.” *Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi*. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26433755.

Pérez Ama Abraham. 2018.Estudio de las propiedades de virulencia en cepas de *Escherichia coli* uropatógena. Maestría en ciencias. Instituto de ciencias. Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Ponnusamy, Poovendran, Vidhya Natarajan, and Murugan Sevanan. 2012. "In Vitro Biofilm Formation by Uropathogenic Escherichia Coli and Their Antimicrobial Susceptibility Pattern." *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 5(3): 210–13. http://dx.doi.org/10.1016/S1995-7645(12)60026-1.

Rijavec, Matija, Manca Müller-Premru, Breda Zakotnik, and Darja Žgur-Bertok. 2008. "Virulence Factors and Biofilm Production among Escherichia Coli Strains Causing Bacteraemia of Urinary Tract Origin." *Journal of Medical Microbiology* 57(11): 1329–34.

Rondón M, Orence O., Rondón A. 2007. Infección del tracto urinario. Universidad De los Andes. Mérida,Venezuela : CODEPRE.

Sainz E., Drago E. y Bustos A.2008.Urinary Tract Infections in Psychiatric Patients.Research Gate.1-19.

Sargol, Fattahi et al. 2015. "Relationship of Biofilm Formation and Different Virulence Genes in Uropathogenic Escherichia Coli Isolates from Northwest Iran." *GMS Hygiene and Infection Control 2* 10: 1–7.

Sarkar, Sohinee, Dimitrios Vagenas, Mark A. Schembri, and Makrina Totsika. 2016. "Biofilm Formation by Multidrug Resistant Escherichia Coli ST131 Is Dependent on Type 1 Fimbriae and Assay Conditions." *Pathogens and disease* 74(3): 1–5.

Shahi, Shailesh K., Vinay K. Singh, and Ashok Kumar. 2013. "Detection of Escherichia Coli and Associated β-Lactamases Genes from Diabetic Foot Ulcers by Multiplex PCR and Molecular Modeling and Docking of SHV-1, TEM-1, and OXA-1 β-Lactamases with Clindamycin and Piperacillin-Tazobactam." *PLoS ONE* 8(7).

Smillie, C. et al. 2010. "Mobility of Plasmids." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 74(3): 434–52. http://mmbr.asm.org/cgi/doi/10.1128/MMBR.00020-10.

Stephenson S, Brown P D. Distribution of virulence determinants among antimicrobial-resistant and antimicrobial-susceptible Escherichia coli implicated in urinary tract infections. Indian J Med Microbiol [serial online] 2016 [cited 2018 Aug 29]; 34:448-56. Available from: http://www.ijmm.org/text.asp?2016/34/4/448/195354.

Solati S., Tajbakhsh E.,khamesipour F. y Gugnani H.2015. Prevalence of virulence genes of biofilm producing strains of *Staphylococcus epidermidis* isolated from clinical samples in Iran.AMB Expr.1-5.

Smillie, C. et al. 2010. “Mobility of Plasmids.” *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 74(3): 434–52. http://mmbr.asm.org/cgi/doi/10.1128/MMBR.00020-10.

Tabasi M., Reza M., Habibi M, Saeed M., Bouzari S. 2015. Phenotipic assay to determine virulence factors of Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) isolates and their correlation with antibiotic resistance Pattern. Onsong Public Health Res Perspect-Elsevier, 261-268.

Tabashki E.,Ahmadi P., Abedpour E., Arbad N. y Khamesipour F.2016. Biofilm formation, antimicrobial susceptibility, serogroups and virulence genes of uropathogenic E. coli isolated from clinical samples in Iran.Antimicrobial Resitance and Infection control.2-9.

Taheri, Marziye et al. 2016. “Antibiotic Resistance Pattern and Phylogenetic Groups of the Uropathogenic Escherichia Coli Isolates Recovered from the Urinary Catheters of the Hospitalized Patients.” *J Med Microbiol Infec Dis* 4(4): 76–82. http://jommid.pasteur.ac.ir.

Tajbakhsh, Elahe et al. 2016. “Biofilm Formation, Antimicrobial Susceptibility, Serogroups and Virulence Genes of Uropathogenic E. Coli Isolated from Clinical Samples in Iran.” *Antimicrobial resistance and infection control* 5(April): 11. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27042294%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4818419.

Terlizzi, Maria E., Giorgio Gribaudo, and Massimo E. Maffei. 2017. “UroPathogenic Escherichia Coli (UPEC) Infections: Virulence Factors, Bladder Responses, Antibiotic, and Non-Antibiotic Antimicrobial Strategies.” *Frontiers in Microbiology* 8(AUG).

Trejo, M., Rana, N., Nagel, C., Jesse, H. E., Smith, T. W., Wareham, L. K., Poole, R. K. (2016). Antimicrobial Activity of the Manganese Photoactivated Carbon Monoxide-Releasing Molecule [Mn(CO) $_3$ (tpa-κ ^{3} *N*)] $^+$ Against a Pathogenic *Escherichia coli* that Causes Urinary Infections. *Antioxidants & Redox Signaling*, *24*(14), 765–780. https://doi.org/10.1089/ars.2015.6484

Tsukamoto, Naoyuki et al. 2014. “High Prevalence of Cross-Resistance to Aminoglycosides in Fluoroquinolone-Resistant Escherichia Coli Clinical Isolates.” *Chemotherapy* 59(5): 379–84.

Vázquez Sánchez Maricela.2017. Determinación de características genotípicas asociadas a la virulencia en cepas de *Escherichia coli* uropatógena. Ingenieria en Biotecnología. Universidad Politécnica de Puebla. Instituto de ciencias. Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Westra, Edze R et al. 2013. “CRISPR-Cas Systems Preferentially Target the Leading Regions of MOB F Conjugative Plasmids CRISPR-Cas Systems Preferentially Target the Leading Regions of MOB F Conjugative Plasmids.” 6286(September 2016): 749–61.

Wu, Siva et al. 2014. 72 Pathogens and Disease *Biofilm-Specific Extracellular Matrix Proteins of Nontypeable Haemophilus Influenzae*.

Zarate, Juan Echevarría.Aguilar, Elsa Sarmiento.Osores-Plenge, Fernando. 2006. “Simposio Infección Del Tracto Urinario y Manejo Antibiótico.” *Acta Med Per* 23(22): 26–31. chito@upch.edu.pe.

Zarzoza Mendoza Imelda Cecilia. 2016. Análisis de determinantes de virulencia de cepas de *Escherichia coli* uropatógena. Licenciatura en Biomedicina. Instituto de ciencias. Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Zhao, Ruike. 2015. “Phylogenetic Distribution of Virulence Genes Among ESBL-Producing Uropathogenic Escherichia Coli Isolated from Long-Term Hospitalized Patients.” *Journal of Clinical and Diagnostic Research*: 1–4. http://jcdr.net/article_fulltext.asp?issn=0973709x&year=2015&volume=9&issue=7&page=DC01&issn=0973-709x&id=6157.

16. ANEXOS

16.1 Información por cepario de las cepas de *E. coli* usadas en este trabajo

Cepario ISSSTE

Cepas	Genero del paciente	Edad del paciente	Fecha de aislamiento	No. de factores de virulencia	No. de resistencias	No. de bandas plasmídicas	Categoría de Resistencia	Formación de Biofilm
101-I	F	83	16/06/2015	1	21	4	XDR	NO
104-I	F	21	15/10/2015	2	19	1	MDR	NO
105-I	F	53	11/11/2015	2	19	5	MDR	NO
106-I	F	40	05/11/2015	2	20	0	MDR	NO
107-I	F	62	13/10/2015	9	21	0	MDR	SI
109-I	F	57	15/10/2015	2	19	3	MDR	NO
111-I	F	66	13/10/2015	7	18	0	MDR	NO
112-I	F	55	26/11/2015	5	17	1	MDR	NO
113-I	F	53	19/10/2015	9	18	3	MDR	NO
114-I	F		12/10/2015	2	12	0	MDR	NO
116-I	F	73	22/10/2015	1	14	4	MDR	NO
119-I	F	3	27/10/2015	8	16	1	MDR	NO
120-I	F	70	22/10/2015	1	20	2	MDR	NO
121-I	F	86	17/11/2015	1	20	1	MDR	SI
122-I	F	75	28/09/2015	2	20	1	MDR	SI
123-I	F	75	23/10/2015	6	21	2	MDR	NO
124-I	F	59	26710/15	1	19	0	MDR	NO
131-I	F	79	26/10/2015	1	20	5	MDR	NO
133-I	F	22	20/10/2015	1	19	1	MDR	NO
134-I	F	65	19/10/2015	1	21	3	XDR	SI
135-I	F	86	21/10/2015	1	21	2	XDR	NO
136-I	F	61	28/10/2015	3	18	0	MDR	NO
137-I	F	54	26/10/2015	1	19	5	MDR	NO
138-I	F	78	28/10/2015	7	18	3	MDR	NO
139-I	F	78	28/10/2015	5	22	1	MDR	NO
140-I	F	74	20/10/2015	6	12	2	MDR	NO
141-I	F		14/12/2015	6	17	0	MDR	NO
142-I	F	72	10/12/2015	3	15	2	MDR	NO
143-I	F	33	02/12/2015	2	16	4	MDR	NO
145-I	F	55	10/12/2015	2	19	0	MDR	NO
146-I	F	66	02/12/2015	4	19	3	MDR	NO
147-I	F	63	07/12/2015	3	18	0	MDR	NO
148-I	F	56	09/12/2015	3	18	2	MDR	NO

149-I	F	54	06/01/2016	2	18	0	MDR	NO
150-I	F	54	09/12/2015	5	20	0	XDR	NO
151-I	F	76	14/12/2015	2	18	0	MDR	SI
152-I	F	78	01/12/2015	2	17	0	MDR	NO
153-I	F		17/12/2015	2	16	0	MDR	NO
156-I	F	27	26/01/2016	5	19	0	MDR	NO
157-I	F	67	25/01/2016	6	20	0	MDR	SI
158-I	F	63	14/01/2016	6	18	0	XDR	NO
160-I	F	62	21/01/2016	6	13	0	MDR	NO
163-I	F	51	11/02/2016	3	17	3	MDR	SI
164-I	F	61	15/02/2016	6	10	0	MDR	SI
165-I	F	55	10/02/2016	3	20	1	MDR	NO
166-I	F	49	17/02/2016	1	18	3	MDR	NO
169-I	F	75	17/02/2016	5	10	0	MDR	NO
170-I	F	73	22/09/2015	6	18	1	MDR	NO
171-I	F	65	18/09/2015	2	19	0	MDR	NO
172-I	F	53	22/09/2015	1	20	3	MDR	NO
175-I	F	67	17/02/2016	2	15	0	MDR	NO

Cepario serogrupo O25

***Cepas aisladas en el periodo 2011-2015**

Cepas	Genero de paciente	Edad del paciente	No. de factores de virulencia	No. de resistencias	No. de bandas plasmídicas	Categoría de Resistencia	Formación de biofilm
CR04	F	75	4	14	2	MDR	SI
CR07	F	59	3	15	2	MDR	SI
CR14	F	79	3	15	2	MDR	NO
CR15	F	57	4	17	2	MDR	NO
CR19	F	38	4	16	5	MDR	NO
CR22	M	75	4	20	3	MDR	SI
CR33	F	34	2	7	1	MDR	SI
CR35	F	67	5	19	5	MDR	NO
CR50	F	78	4	15	5	MDR	SI
CR51	F	26	4	19	4	MDR	SI
CR52	M	77	5	20	6	MDR	NO
CR53	F	30	4	17	4	MDR	SI
CR59	F	23	4	18	2	MDR	SI
CR69	F	4	6	7	0	MDR	SI
CR70	F	37	5	9	1	MDR	SI
CR72	F	88	1	15	5	MDR	NO
CR93	F	59	4	5	5	MDR	NO
CR98	F	73	6	14	2	MDR	NO
CR99	F	65	4	7	6	MDR	NO
CR115	F	19	3	13	1	MDR	NO
CR117	F	87	4	18	2	MDR	SI
CR122	F	4	4	13	5	MDR	NO
CR141	F	42	1	5	2	MDR	SI
CR150	F	21	4	14	2	MDR	SI
CR152	M	52	4	12	3	MDR	SI
CR153	F	64	9	15	4	MDR	NO
CR156	F	96	4	12	5	MDR	SI
CR159	F	77	4	18	6	MDR	SI
CR162	F	70	2	14	0	MDR	NO
CR182	F	84	4	14	0	MDR	NO
CR185	F	53	4	16	1	MDR	SI
CR192	M	53	4	13	2	MDR	SI
CR193	F	53	6	13	2	MDR	NO
CR204	F	81	1	19	0	MDR	NO
CR210	F	83	6	12	4	MDR	NO
CR211	F	60	4	13	4	MDR	NO
CR214	M	59	5	16	4	MDR	NO
CR222	F	62	6	16	3	MDR	NO
CR237	F	3	3	12	0	MDR	NO

003 I	F	56	4	17	0	MDR	NO
018 I	F	46	4	18	4	MDR	NO
019 I	F	3	5	14	3	MDR	NO
030 I	F	61	4	18	6	MDR	NO
052 I	F	63	5	13	3	MDR	NO
070 I	F	78	9	15	0	MDR	NO
079 I	F	54	5	13	0	MDR	NO
07 H	F	*	5	12	4	MDR	NO
12 H	F	*	5	15	0	MDR	NO
15U	Niños 0-5 años		4	15	2	MDR	SI
46U			1	8	0	MDR	SI
55U			3	14	4	MDR	NO
56U			3	12	0	MDR	NO
63U			3	13	5	MDR	NO
73U			2	9	0	MDR	NO
168U			4	6	2	MDR	NO
CD2-26	F		8	19	3	MDR	NO
CD2-40	F		1	10	0	MDR	NO
CR67	F	59	4	11	6	MDR	NO
CR161	M	94	4	10	5	MDR	NO
CR213	F	35	4	12	6	MDR	NO
CR240	F	21	6	11	1	MDR	NO
CR245	M	4	5	8	1	MDR	NO
028 bI	*	*	5	9	3	MDR	NO
095 I	M	65	4	14	5	MDR	NO
6U	Niños 0-5 años		4	13	3	MDR	NO

SOLUCIONES Y REACTIVOS

Soluciones para Extracción de DNA genómico y plasmídico

Solución 1:

EDTA .5M ---------- 4ml
TRIS 2M ---------- 2.5 ml
Sacarosa ---------- 30g
H_2O TDE ---------- 193.5 ml

Aforar a 200ml y esterilizar por filtración

Solución 2:

Mezcla 50:50 de NaOH .4N y SDS 2%

Solución 3:

CH_3CO_2K 2.7M pH 5.7 (ajustar pH con Ácido Acético Glaciar)

Reactivos para Electroforesis en gel de agarosa

Buffer de Carga:

Azul de bromofenol ----- .025g
Xilencianol ---------- .025g
Ficol ---------- 1.5g
H_2O TDE ---------- 10ml

Disolver el ficol en 10 ml de H_2O TDE, una vez que no haya grumos agregar el bromofenol y xilencianol y disolver, alicuotar en tubos eppendorf de 1.5 ml y esterilizar a 10 Lb durante 10 minutos

TAE 50X:

TRIS base ---------- 242g
Ácido Acético Glaciar ---------- 57.1ml
EDTA ----------37.2g
H_2O TDE ---------- 600ml

Disolver el EDTA en los 600 ml de H_2O TDE, una vez disuelto ir agregando poco a poco el TRIS base, ya disuelto agregar el Ácido Acético y ajustar pH a 8.3, aforar a 1L y esterilizar a 10 Lb durante 15 minutos

TRIS 10mM pH 8:

Usar la formula C1V1 = C2V2

El stock es TRIS 1M pH 8 (ajustar pH con HCl)

Reactivos para PCR

Buffer 10X taq pol:

TRIS-HCl ---------- 200mM
0.2 M →0.242 g

KCl ----------500Mm
0.5M→0 .372g

Ajustar pH 8.4

Buffer MgSO4 para pfu:

TRIS-HCl pH8 ---------- 3ml
KCl 10mM ----------15ml
$MgSo_4$ 10Mm----------0.3ml
Trifon x100 al 1%----------0.150ml
H_2O----------1ml
BSA----------0.015gr
NH_4So_4----------0.2gr

El total se afora a 15ml- Esterilizar por filtración

Buffer $MgCl_2$ para Taq.pol:

$MgCl_2$ .05M---------- 0.10165g

KCl 0.5M---------- 0.372g

Tris. 2M---------- .242g

Aforar a volume final de 10ml

Repartir en tubos eppendorf

Esterilzar 10 lb 10minutos

Medios de cultivo

Medio LB:

NaCl ---------- 5g
Extracto de levadura ------ 5g
Peptona de Caseína ----- 10g

Ajustar a pH 7.4 usando HCl y aforar a 1L

Agar Müller-Hinton:

Extracto de carne----------2g
Peptona de Caseína ácida ----------17.5g
Almidón---------- 1.5g
Agar ----------17g
Fórmula para 1L de medio

Agar MacConkey:

Peptona de gelatina ----------17g
Peptona de Caseína ----------1.5g
Petona de carne----------1.5g
Lactosa ----------10g
Sales Billiares----------1.5g
Cloruro de sodio----------5g
Agar ----------13.5g
Rojo Neutro----------0.03g
Cristal Violeta----------0.001g

Fórmula para 1L de medio

Agar Rojo Congo:

Caldo BHI----------37g/l
Sacarosa----------50g/l
Agar Bacteriológico----------15g/l
Rojo Congo----------0.8g/l