



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

**Facultad de Medicina**  
**Licenciatura en Biomedicina**  
**Eje de Microbiología**

**TESIS**

“Análisis de determinantes de virulencia de cepas de *Escherichia coli* uropatógena de serogrupo O25”

**Que para obtener el Título de:**

Licenciada en Biomedicina

**Presenta la Alumna:**

Imelda Cecilia Zarzoza Mendoza

**Directora de Tesis:**

**D.C. Margarita María de la Paz Arenas Hernández**

Lugar de realización:

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

Puebla, Pue.

Diciembre, 2016

## **Agradecimientos**

Al laboratorio de Biología Molecular de Enteropatógenos del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas.

A la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado.

# Índice

Resumen.....	1
Tabla de Abreviaturas .....	2
Introducción .....	3
<i>Mecanismo de infección</i> .....	5
<i>Factores de Virulencia</i> .....	7
<i>Islas de patogenicidad</i> .....	12
<i>Plásmidos</i> .....	13
<i>Serotipo O25:H4</i> .....	13
<i>Filogenia</i> .....	14
<i>Tratamiento</i> .....	15
<i>Resistencia a Antibióticos</i> .....	16
Antecedentes Generales.....	18
Antecedentes específicos .....	20
Justificación .....	22
Hipótesis .....	22
Objetivo General .....	23
Objetivos Particulares.....	23
Material y Métodos.....	24
<i>Extracción de ADN genómico</i> .....	24
<i>Extracción de ADN plasmídico</i> .....	25
<i>Determinación de perfiles de sensibilidad a antibióticos</i> .....	25
<i>Producción de <math>\beta</math>-lactamasas de Espectro Extendido</i> .....	27
<i>Confirmación molecular de serogrupo O25</i> .....	28
<i>Clasificación filogenética</i> .....	29
Esquema general de trabajo .....	31
Resultados .....	32
<i>Confirmación molecular de serogrupo O25</i> .....	32
<i>Determinación del grupo filogenético</i> .....	33
<i>Determinación de la presencia de biomarcadores moleculares de virulencia</i> .....	35

<b><i>Determinación de Islas de Patogenicidad</i></b> .....	40
<b><i>Análisis del perfil plasmídico</i></b> .....	43
<b><i>Análisis del perfil de susceptibilidad a antibióticos y determinación de la producción de <math>\beta</math>-lactamasas de espectro extendido</i></b> .....	47
<b><i>Análisis estadístico de correlación entre Factores de Virulencia-Resistencia a antibióticos y Factores de Virulencia-Plásmidos</i></b> .....	53
<b>Discusión</b> .....	55
<b>Conclusiones</b> .....	64
<b>Perspectivas</b> .....	65
<b>Referencias</b> .....	66
<b>Anexos</b> .....	75
<b><i>a) Diámetro de los halos obtenidos en los antibiogramas, resultados de resistencia y sensibilidad y producción de BLEE, de las cepas UPEC de serotipo O25:H4</i></b> .....	75
<b><i>b) Diámetro de los halos obtenidos en los antibiogramas, resultados de resistencia y sensibilidad y producción de BLEE, de las cepas UPEC de serotipo O25:H</i></b> .....	77
<b><i>c) Factores de virulencia encontrados en las cepas UPEC de serotipo O25:H4</i></b> .....	78
<b><i>d) Factores de virulencia encontrados en las cepas UPEC de serotipo O25:H</i></b> .....	79
<b><i>e) Datos generales, grupo filogenético, PAIs y número de plásmidos de las cepas UPEC de serotipo O25:H4</i></b> .....	80
<b><i>f) Datos generales, grupo filogenético, PAIs y número de plásmidos de las cepas UPEC de serotipo serotipo O25:H</i></b> .....	81
<b><i>g) Tamaño de los plasmidos encontrados en las cepas de UPEC de serotipo O25:H4</i></b> .....	82
<b><i>h) Tamaño de los plasmidos encontrados en las cepas de UPEC de serotipo O25:H</i></b> .....	83
<b><i>i) Pruebas de normalidad de resistencia a antibióticos, factores de virulencia y número de plásmidos</i></b> .....	84

## Resumen

*Escherichia coli* uropatógena (UPEC) es el principal agente causal de infecciones de tracto urinario (ITU) a nivel mundial y, anualmente, se reportan aproximadamente 150 millones de personas infectadas por esta bacteria. Para causar la enfermedad, UPEC cuenta con elementos llamados factores de virulencia que participan en la adhesión, movilidad, secreción de toxinas y captación de hierro que le permite dañar el tejido, adquirir nutrientes y diseminarse a través del tracto urinario. Además de la clasificación por patotipos, existe una clasificación denominada serotipificación que consiste en la identificación de los antígenos de lipopolisacárido (O), flagelina (H) y el antígeno de cápsula (K); el antígeno O determina el serogrupo mientras que los antígenos O:H:K dan el serotipo. La serotipificación es importante porque contribuye a distinguir el número pequeño de serogrupos que causan enfermedad, el serotipo O25:H4 es el serotipo causante de ITU más frecuentemente reportado. En el año 2008 se describió la secuencia tipo 131, del serotipo O25:H4 (ST131), presente en diversos países en tres continentes. A partir de este descubrimiento, en muchos países, se han realizado estudios en los que se busca esta clona ya que está asociada a la multirresistencia a antibióticos, así como a un gran potencial de virulencia; y las cepas pertenecientes a este grupo clonal son de grupo filogenético B2. En este trabajo se analizaron las características de virulencia de 65 cepas de UPEC de serogrupo O25; de las cuales, 57 cepas pertenecen al serotipo O25:H4 y 8 cepas pertenecen al serotipo O25:H<sup>-</sup>. Se realizó la confirmación molecular de este serotipo y todas las cepas resultaron O25. En la clasificación filogenética el 92% de las cepas resultaron B2, se encontró un 5% de cepas de filogrupo C y un 3% de filogrupo A. Los biomarcadores de virulencia de mayor prevalencia son la fimbria tipo 1 (*fimH*) encontrada en el 100% de las cepas; el receptor de enterobactina/adhesina de superficie homólogo a IrgA de *V. cholerae* (*iha*) presente en el 91% de las cepas; aerobactina (*iucD*) encontrada en 89% de las cepas y la toxina autotransportadora secretada (*sat*) presente en el 71% de las cepas. Se encontró una combinación frecuente de genes de virulencia (*fimH+sat+iucD+ihA*) presente en el 49% de las cepas. Se buscaron cuatro islas de patogenicidad, siendo la PAI ICFT073 la de mayor prevalencia, presente en el 95% de las cepas, seguida de la PAI IICFT073 presente en el 63%, la PAI IJ96 no se encontró en ninguna cepa y la PAI IIJ96 está presente en el 3% de las cepas. Se buscaron los plásmidos de estas cepas, encontrando que el 80% de las cepas contiene de 1 a 7 plásmidos, mientras que el 20% no cuenta con ningún plásmido; los tamaños de los plásmidos más frecuentes son 1-3 kb, 50-70 kb y 100-127 kb. La resistencia a antibióticos presente en mayor porcentaje fue la resistencia a ampicilina y cefalotina con 97%, seguida de ácido nalidíxico 85%, ciprofloxacina 83%, levofloxacina 82% y norfloxacina 80%, la nitrofurantoína podría utilizarse como tratamiento de primera elección ya que el 91% de las cepas analizadas son sensibles a este antibiótico. El 100% de las cepas es multidrogo resistente y dentro de esta clasificación el 54% es extremadamente resistente, el 28% es pandrogo resistente y el 18% es multidrogo resistente. Se analizó la producción de BLEE y se encontró que el 83% de las cepas no son productoras de BLEE, mientras que el 17% si producen estas enzimas.

### Tabla de Abreviaturas

CBIs	Colonias Bacterianas Intracelulares
μl	Microlitro
BLEE	β-lactamasas de Espectro Extendido
DAEC	<i>E. coli</i> Difusivamente Adherente
DO	Densidad Óptica
EAEC	<i>E. coli</i> Enteroagregativa
EHEC	<i>E. coli</i> Enterohemorrágica
EIEC	<i>E. coli</i> Enteroinvasiva
EPEC	<i>E. coli</i> enteropatógena
ETEC	<i>E. coli</i> Enterotoxigénica
ExPEC	<i>E. coli</i> Extraintestinales
ITU	Infección de tracto Urinario
M	Molar
MDR	Multidrogo resistente
min	Minuto
ml	Mililitro
mM	Milimolar
NEMEC	<i>E. coli</i> asociada a sepsis y meningitis
ng	Nanogramo
nm	Nanómetro
PAIs	Islas de Patogenicidad
PCRm	Reacción en Cadena de la Polimerasa múltiple
PDR	Pandrogo resistente
RIQs	Reservorios quiescentes intracelulares
RPM	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
seg	Segundo
UPEC	<i>Escherichia Coli</i> uropatógena
VTEC/STEC	<i>E. coli</i> productora de toxina Shiga/Vero
XDR	Extremadamente resistente

## Introducción

Las ITU son de las infecciones bacterianas más comunes, afectan a 150 millones de personas cada año a nivel mundial (Stamm *et al.*, 2001). Afectan a ambos sexos, con altas tasas de incidencia en niños y mujeres. Aproximadamente el 12% de los hombres y el 20% de las mujeres sufren de al menos una infección urinaria en su vida. La prevalencia de estas infecciones varía con el sexo y la edad. En recién nacidos y lactantes son más comunes en varones y suelen asociarse a anomalías congénitas. Ya en edad escolar predominan en mujeres, lo cual se mantiene durante la edad adulta (Foxman, 2010). Algunas condiciones como el embarazo y la diabetes, se asocian a una mayor incidencia. En la vejez, las tasas de ITU son mayores en mujeres pero se observa un aumento de los casos en hombres, asociado a enfermedades tales como pobre vaciamiento vesical debido a prolapso uterino o uropatía obstructiva por enfermedad prostática (Flores-Mireles *et al.*, 2015).

Las ITU son causadas tanto por bacterias Gram-negativas, como por Gram-positivas, así como por hongos, sin embargo, el principal agente causal es *Escherichia coli* uropatógena, conocida por sus siglas en inglés como UPEC (Nielubowicz *et al.*, 2010). *Escherichia coli* forma parte de los comensales no patógenos aislados de la flora bacteriana normal de humanos y de muchos animales (Kaper *et al.*, 2004). Sin embargo, se ha descrito que distintas variantes causan infección en el sistema gastrointestinal, mientras que otras causan infecciones fuera del sistema gastrointestinal. Las *E. coli* capaces de infectar el tracto digestivo se conocen como diarreagénicas (DEC) y se clasifican en 6 grupos, que son (Nataro *et al.*, 1998, Kaper *et al.*, 2004, Croxen *et al.*, 2010, Croxen *et al.*, 2013):

- *E. coli* enteropatógena (EPEC)
- *E. coli* productora de toxina Shiga/Vero (VTEC/STEC)
- *E. coli* Enterotoxigénica (ETEC)
- *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC)
- *E. coli* Enteroinvasiva (EIEC)
- *E. coli* Enteroagregativa (EAEC) y

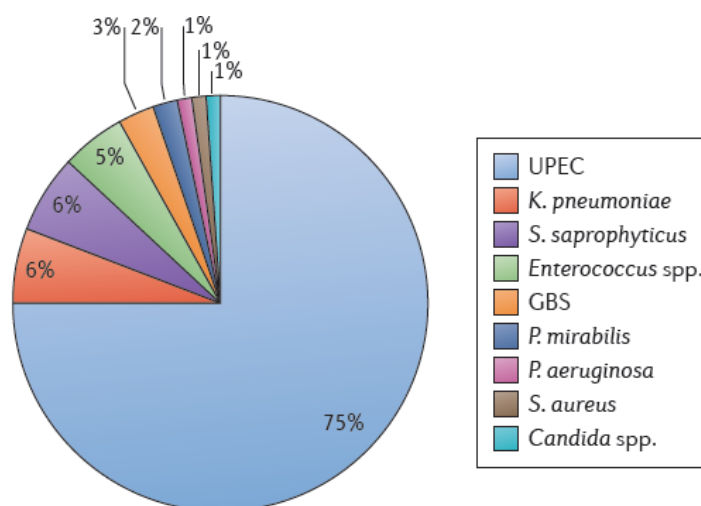
→ *E. coli* Difusivamente Adherente (DAEC)

Mientras que las *E. coli* que causan infecciones extraintestinales (ExPEC) son:

→ *E. coli* Uropatógena (UPEC) y

→ *E. coli* asociada a sepsis y meningitis (NEMEC)

UPEC es responsable del 75-95% de las ITU comunitarias y del 50% de las ITU nosocomiales, por lo tanto representa importantes tasas de morbilidad, mortalidad y gastos médicos (Foxman, 2010, Flores-Mireles *et al.*, 2015).



**Figura 1.** Epidemiología de las ITU. Tomado de (Flores-Mireles *et al.*, 2015)

A partir de la localización anatómica de las ITU, se consideran como bajas a la bacteriuria (orina), cistitis (vejiga) y uretritis (uretra); son altas complicadas la pielonefritis (riñón) y bacteriemia (sangre) (Bien *et al.*, 2012). El cuadro clínico depende tanto de la localización anatómica, como de las defensas del hospedero y de la virulencia del microorganismo. Es importante mencionar que el 5% de los pacientes con ITU no presentan ningún síntoma y son diagnosticados con bacteriuria asintomática (Wiles *et al.*, 2008, Rudick *et al.*, 2010).

Cuando los microorganismos colonizan el tracto urinario, actúan una serie de mecanismos de defensa locales y sistémicos, que dificultan la penetración y localización bacteriana (Wiles *et al.*, 2008). Existen diversos mecanismos de defensa en el tracto urinario para evitar la colonización, entre ellos la alta



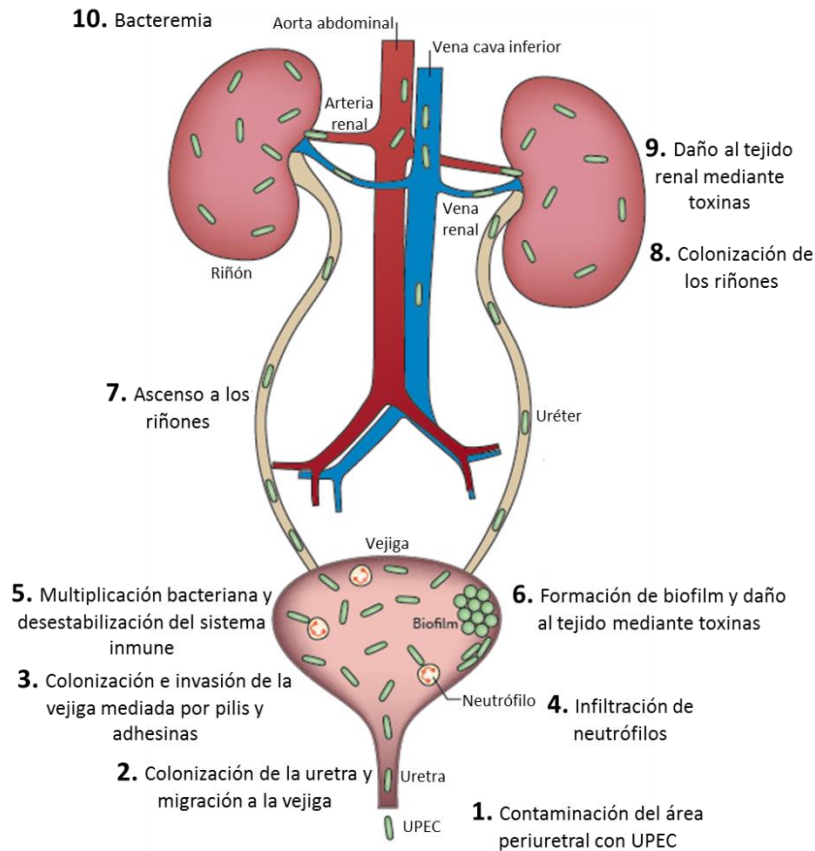
concentración de urea en la orina y el pH ácido, los cuales inhiben el crecimiento de algunos microorganismos que causan ITU, otro mecanismo es el flujo de la orina, lo cual evita que las bacterias que se encuentran en la uretra no lleguen a la vejiga (Ulett *et al.*, 2013). Las respuestas inflamatorias del hospedero se activan, dando lugar a la producción de citosinas, afluencia de neutrófilos, exfoliación de las células epiteliales infectadas de la vejiga, y generación de especies reactivas de hidrógeno y nitrógeno, junto con otros compuestos antimicrobianos (Mulvey *et al.*, 2000, Bower *et al.*, 2005).

### **Mecanismo de infección**

La infección de tracto urinario ocurre cuando UPEC asciende a través de la uretra y tiene éxito en la colonización de la vejiga. Dentro del tracto urinario UPEC tiene que superar varias líneas de defensa (Chromek *et al.*, 2008), por lo tanto, la adhesión firme e irreversible a las células uroteliales es el primer paso en el establecimiento de una infección, seguido por la invasión bacteriana en las células huésped y la multiplicación (Justice *et al.*, 2004).

Los principales receptores a los que se une UPEC a la superficie urotelial del tracto urinario inferior, son las uroplaquinas glicosiladas, expresadas por las células sombrilla expuestas en la superficie de la vejiga y uréteres. Estos receptores que contienen manosa son rápidamente reconocidos por la adhesina FimH, encontrada en la punta de fimbria tipo I, lo que permite una adhesión estrecha que protege a la bacteria de las tensiones mecánicas en la vejiga. Las respuestas inflamatorias del hospedero, incluyendo la infiltración de neutrófilos eliminan a las bacterias extracelulares. Algunas UPEC son capaces de evadir el sistema inmune mediante cambios morfológicos, lo que resulta en resistencia a los neutrófilos (Mulvey, 2002, Nielubowicz *et al.*, 2010). Otra ventaja que tienen estas bacterias es que FimH también puede unirse a las  $\alpha 3$  y  $\beta 1$  integrinas, que están agrupadas con la actina en los sitios de invasión. Estas interacciones desencadenan rearrreglos locales de actina, estimulando cinasas y la familia de las Rho-GTPasas, lo que resulta en la internalización de la bacteria. Una vez dentro de la célula, UPEC puede replicarse rápidamente y formar complejos similares a biopelículas, denominados comunidades bacterianas intracelulares (CBIs), que sirven como entorno transitorio

de protección. La maduración de las CBIs provoca la dispersión de las bacterias, lo que conlleva a la invasión de otras células del hospedero, formándose así un ciclo de CBIs. Alternativamente UPEC puede establecer reservorios quiescentes intracelulares (RIQs) en las células de transición subyacentes. Los RIQs consisten en conjuntos de 4 a 10 bacterias no replicantes, se encuentran dentro de los compartimentos de membrana encerradas en F- actina, pueden permanecer viables durante meses (Kaper *et al.*, 2004, Croxen *et al.*, 2010, Hunstad *et al.*, 2010, Flores-Mireles *et al.*, 2015). UPEC produce toxinas y proteasas que inducen daño a las células hospederas, entre ellas hemolisina, que promueve la lisis de la célula hospedera a través de la formación de poros, facilitando la liberación de hierro, lo que les permite obtener los nutrientes necesarios para subsistir y ascender a los riñones, gracias al flagelo (Wright *et al.*, 2005). La colonización de riñón resulta en la producción de toxinas como el factor citotóxico necrotizante 1, el cuál promueve la invasión a las células hospederas, otras toxinas que participan en esta etapa son la toxina autotransportadora secretada y la toxina autotransportadora vacuolizante, las cuales tienen efecto citopático, si la ITU no es tratada, gracias a la actividad de todas las toxinas UPEC es capaz de atravesar la barrera epitelial del riñón, llegando así al torrente sanguíneo (Kaper *et al.*, 2004, Flores-Mireles *et al.*, 2015).



**Figura 2.** Mecanismo de patogenicidad de UPEC. (Flores-Mireles *et al.*, 2015)

### Factores de Virulencia

La uretra es un portal para la salida de la orina, pero también permite la entrada de microorganismos, incluyendo patógenos. Debido a que el principal reservorio de UPEC es el tracto intestinal humano, emplea diversos factores de virulencia para colonizar de forma ascendente, adquirir nutrientes esenciales, multiplicarse en un ambiente hostil, causar daño al tejido y diseminarse dentro del tracto urinario (Kaper *et al.*, 2004, Yamamoto, 2007).

La mayoría de las cepas de UPEC exhiben ciertos factores de virulencia, que incluyen adhesinas, sistemas de captación de hierro, citotoxinas y serotipos O:K:H específicos (Figura 3) (Yamamoto, 2007). Los principales factores de virulencia con los que cuenta UPEC son los siguientes:

## Adhesinas

UPEC cuenta con adhesinas fimbriales y afimbriales, entre ellas se encuentran:

- La fimbria tipo 1, que con su adhesina FimH se une a los receptores de uroplaquina manosilados localizados en la vejiga (Mulvey, 2002).
- La fimbria P, que se asocia clásicamente a pielonefritis, contiene la adhesina PapG, la cual reconoce motivos Gal $\alpha$ 1-4Gal en los glicolípidos de las membranas del hospedero. Estos motivos son reconocidos por distintas variantes de PapG, la afinidad de unión influencia la preferencia de PapG por diferentes tejidos. PapG III está asociada preferentemente a cistitis; PapG II se une a la globotetraosilceramida (antígeno Forssman), presente en los riñones, por lo tanto se asocia a pielonefritis y a bacteremia; la variante PapG I se une preferiblemente a globotriosilceramida (GbO<sub>3</sub>), sin embargo la relevancia de esta afinidad en la enfermedad no está bien documentada (Johnson, 1991, Lüthje *et al.*, 2014).
- La fimbria curli representa uno de los principales componentes en *E. coli* y otras enterobacterias, son expresadas tanto por bacterias patógenas como por comensales, junto con la celulosa el curli es uno de los componentes esenciales de las biopelículas (Norinder *et al.*, 2012). El curli actúa como adhesina, media la invasión celular e induce fuertes repuestas inmunológicas; interactúa con proteínas del suero, lo que promueve la diseminación y entrada al torrente sanguíneo.
- El antígeno 43 (Ag43) expuesto en la superficie es una proteína adhesiva autotransportadora. Tiene capacidad de autorreconocimiento, lo que conduce a la autoagregación de las células que lo producen y promueve la formación de biopelícula así como la adhesión a las células del hospedero (Anderson *et al.*, 2004). Además tiene un rol importante en la formación de las CBI. Una ventaja de este antígeno es que no es altamente inmunogénico, incluso se sugiere que confiere protección inmune a la bacteria (Fexby *et al.*, 2007). Hay dos variantes reportadas de esta proteína, que se encontraron en la cepa prototipo UPEC CFT073, codificadas por los genes *fluA* (Ag43a) y *fluB* (Ag43b). Mientras que Ag43a presenta propiedades de autoagregación

y promueve la persistencia de UPEC en el tracto urinario Ag43b participa en la colonización inicial, pero no afecta estadíos posteriores de la infección (Lüthje *et al.*, 2010). Esto sugiere que un alto grado de autoagregación en bacterias que expresan *fluA* puede reducir la exposición a superficies de estructuras inmunogénicas, permitiendo así la evasión del sistema inmune y mayor persistencia de la bacteria en el hospedero (Ulett *et al.*, 2007).

- ihA es una proteína de membrana externa, que funciona como adhesina afimbrial, pero también como un receptor de sideróforo, con lo que permite la captación de hierro. Fue descrita primero en una cepa de *E. coli* enterohemorrágica O157:H7, y fue llamada “adhesina homóloga IrgA”, debido a su homología con el receptor de sideróforo IrgA de *V. cholerae* (Léveillé *et al.*, 2006).
- Afa/Dr es una familia de fimbrias que están asociadas típicamente con infecciones intestinales, pero son comúnmente encontradas en cepas extraintestinales que causan ITU. Las adhesinas Dr se unen a colágeno tipo VI y al factor acelerador del decaimiento (DAF) (Le Bouguéneq *et al.*, 2006).
- ECP es conocido como el pili común de *E. coli*, está involucrado en la adherencia a las células hospederas, así como en la formación de biofilm. Sin embargo aún se desconocen los detalles de la interacción de este pili de UPEC con el uroepitelio (Saldaña *et al.*, 2014).

## **Movilidad**

Al igual que la adhesión, la movilidad bacteriana está asociada a la virulencia, está mediada por estructuras poliméricas superficiales, los flagelos. El flagelo de UPEC contribuye en la patogenicidad durante el proceso de ITU. La síntesis de flagelo es altamente regulada y coincide con la ascensión de la bacteria desde la vejiga hasta los riñones (Lane *et al.*, 2005, Wright *et al.*, 2005).

## **Toxinas**

Las toxinas ayudan a UPEC a propagarse dentro de los tejidos más profundos, esto después de quebrantar la integridad de las células; a obtener nutrientes dentro de las células o a destruir células efectoras del sistema inmune. La actividad tóxica

resulta en una respuesta inflamatoria fuerte (Yamamoto, 2007, Wiles *et al.*, 2008, Bien *et al.*, 2012).

- El lipopolisacárido (LPS) es considerado como una endotoxina. Es el principal componente de la pared de bacterias Gram negativas y es altamente inmunogénico. Está formado por una región hidrofóbica que es el lípido A localizado en la región exterior de la membrana externa, éste es la endotoxina bacteriana; por un núcleo que es un oligosacárido y por el antígeno O que está expuesto en la superficie de la bacteria y constituye el principal inmunógeno (Klena *et al.*, 2005). El lípido A está altamente conservado y media los efectos tóxicos del LPS. El núcleo y el antígeno O son más variables en estructura y función. Algunos antígenos O son comunes de UPEC, entre ellos el O1, O2, O4, O6, O7, O8, O15, O16, O18, O21, O22, O25, O75 y O83 (Bidet *et al.*, 2007, Lloyd *et al.*, 2007, Li *et al.*, 2010).
- Durante la infección, el influjo de células polimorfonucleares causa daño en el tejido y el ataque e invasión por UPEC resulta en la apoptosis y exfoliación de las células. Además de que concentraciones sublétricas de la toxina formadora de poros hemolisina A (HlyA) induce estas respuestas, lo que expone a las células subyacentes transicionales a la invasión y diseminación de UPEC (Croxen *et al.*, 2010). La HlyA es citotóxica para diversos tipos de células nucleadas así como para células inmunes, endoteliales y epiteliales en el tracto urinario (Mobley *et al.*, 1990). Esta toxina se asocia a ITU altas (pielonefritis) (Bien *et al.*, 2012, Dhakal *et al.*, 2012).
- El factor necrotizante citotóxico 1 (CNF1), es producido por un tercio de las cepas de UPEC que causan pielonefritis, y posiblemente están involucrados en la invasión del riñón y también causa apoptosis en las células de la vejiga, lo que estimula la exfoliación de éstas (Nielubowicz *et al.*, 2010). CNF1 no es un factor esencial en la infección, pero es un factor de mantenimiento. Además se ha reportado que las cepas que lo contienen causan más inflamación que las que no lo tienen (Bien *et al.*, 2012). Esta toxina activa las GTP-etasas Rho induciendo cambios celulares basados en rearrreglos de actina del citoesqueleto, lo que promueve la internalización de la bacteria a

las células del urotelio (Davis *et al.*, 2005, Wiles *et al.*, 2008, Croxen *et al.*, 2010).

- UPEC secreta toxinas conocidas como autotransportadoras; la toxina autotransportadora secretada (Sat) es una serinproteasa que media el efecto citopático en la vejiga y en el riñón, mediante la formación de vacuolas en el citoplasma de las células uroepiteliales. Experimentalmente se ha encontrado que causa daño en glomérulo y tubos proximales además de que influye en la respuesta inmune (Guyer *et al.*, 2000). Y la toxina autotransportadora vacuolizante (Vat), pertenece a la misma familia, se sabe que aglutina hemo y actúa como hemoglobulinasasa. Sin embargo estas toxinas aún no están bien caracterizadas (Lüthje *et al.*, 2014).

### **Sistemas de captación de hierro**

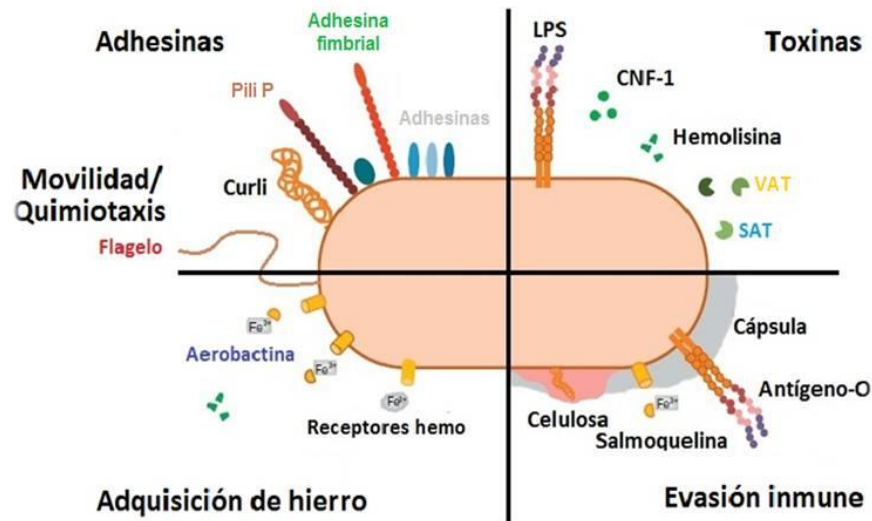
En el tracto urinario la disponibilidad del hierro es muy restringida, aproximadamente  $10^{-25}$  M en sangre, y esta concentración es más baja en otros tejidos. Para sobrevivir las bacterias necesitan una concentración de hierro citoplasmática de aproximadamente  $10^{-6}$  M debido a esto las bacterias han desarrollado múltiples estrategias que les permiten adquirir este elemento de las células del hospedero (Wiles *et al.*, 2008).

La captación de hemo, enterobactina y otros sideróforos contribuyen en el mantenimiento de UPEC, pero debido a la redundancia funcional de estos sistemas tanto en UPEC como en comensales, resulta difícil establecer la contribución a la virulencia de un solo sistema, o clasificarlos como factores de virulencia (García *et al.*, 2011).

- ChuA es el receptor de hemo más estudiado, se encuentra unido a la membrana externa de la bacteria, capta el hemo liberado de los enterocitos previamente lisados por hemolisina, y lo transportan al citosol. Este sistema está altamente regulado durante la replicación intracelular dentro de CBIs en el epitelio vesical (Johnson, 1991, Wiles *et al.*, 2008).
- Los sideróforos son moléculas secretadas quelantes de hierro, que toman este elemento a través de receptores específicos en la membrana externa de

la bacteria. Son cuatro sistemas de sideróforos los que han sido más estudiados, enterobactina y su receptor FebA, salmoquelina y IronN, aerobactina y IutA y yersiniabactina y FyuA (Gao *et al.*, 2012).

A pesar de que hasta la fecha se han identificado múltiples genes que están involucrados en la virulencia de las cepas UPEC no se ha determinado un perfil específico de urovirulencia, ya que con frecuencia los aislamientos de UPEC, contienen un número muy variable de estos genes (Marrs *et al.*, 2002).



**Figura 3.** Esquema general de los factores de virulencia de *Escherichia coli* uropatógena. (Lüthje *et al.*, 2014)

### Islas de patogenicidad

Los factores de virulencia están usualmente codificados en islas de patogenicidad, conocidas como PAIs, por sus siglas en inglés. Las PAIs proveen un mecanismo para la transferencia horizontal de los genes de virulencia; son elementos genéticos móviles formados por largos bloques de ADN > 10 Kb, se insertan adyacentemente a genes de tRNA, y usualmente están flanqueadas por secuencias cortas directas; contienen secuencias de inserción, integrasas y transposasas, así como un contenido de G+C que difiere del genoma de la bacteria (Sabaté *et al.*, 2006, Lloyd *et al.*, 2007, Koga *et al.*, 2014).

Las PAIs en UPEC fueron descritas por primera vez en la cepa prototipo 536, y desde entonces han sido identificadas en otras tres cepas prototipo J96 y CFT073 aisladas de pielonefritis y UTI89 aislada de cistitis. Han sido descritas y estudiadas ampliamente 13 PAIs de CFT073. Y se ha reportado que la que se encuentra con



más frecuencia en cepas de UPEC es la PAI I, que codifica diversos genes de virulencia: *sat*, *iutA*, *iucDCBA*, precursor del antígeno 43 y *kpsTM* (Oelschlaeger *et al.*, 2002, Koga *et al.*, 2014).

### **Plásmidos**

El mecanismo más importante de diseminación de genes de virulencia y de resistencia a antibióticos es la transferencia de plásmidos. Los plásmidos son elementos genéticos extracromosomales autorreplicables, formados por ADN circular de doble cadena, distinto del ADN cromosomal, no son esenciales para las bacterias, sin embargo contienen genes que les confieren resistencia a los antibióticos, virulencia y persistencia en condiciones extremas. Tienen una gran facilidad de conjugación entre especies, lo que les confiere un importante papel en la evolución de las bacterias por su fácil transmisión tanto horizontal como vertical. Los plásmidos reportados en UPEC varían bastante en cuanto al tamaño. (Szczepanowski *et al.*, 2005, Baral *et al.*, 2012, Beceiro *et al.*, 2012, Farshad *et al.*, 2012). En años recientes se ha reportado un plásmido que confiere multirresistencia a antibióticos, IncFII que contiene genes que codifican enzimas  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido, y su tamaño varía entre 82 y 200 kb (Coque *et al.*, 2008, Schembri *et al.*, 2015).

### **Serotipo O25:H4**

Kauffman desarrolló un esquema de serotipificación basado en la identificación de los antígenos O, pertenecientes a la parte externa del lipopolisacárido de las bacterias Gram negativas, del H que identifica la proteína flagelina de la punta del flagelo y el K, que sólo está presente en bacterias que presentan cápsula (Li *et al.*, 2010). Hasta el momento se cuenta con 186 antígenos somáticos (O) y 56 flagelares (H). La serotipificación con antisueros contra el antígeno O proporciona el serogrupo, el antígeno somático y flagelar juntos indican el serotipo (O:H). La serotipificación es importante porque contribuye a distinguir el número pequeño de serogrupos que causan enfermedad (Wiles *et al.*, 2008).

El serogrupo O25, en particular el serotipo O25:H4, es de gran importancia médica, ya que es el más frecuentemente reportado como responsable de un gran porcentaje de ITU tanto comunitarias, como nosocomiales, así como de bacteremia

a nivel mundial (Petty *et al.*, 2014). En el año 2008 dos grupos de trabajo, casi simultáneamente describieron la secuencia tipo 131, del serotipo O25:H4 (ST131), presente en diversos países en tres continentes. A partir de este descubrimiento, en muchos países, se han realizado estudios en los que se busca esta clona. Este grupo clonal está asociado a la multirresistencia a antibióticos, así como con un gran potencial de virulencia (Coque *et al.*, 2008, Nicolas-Chanoine *et al.*, 2008).

Esta clona se descubrió a partir de la tipificación de la secuencia multilocus de las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido CTX-M-15, provenientes de muestras de *E. coli* de tres continentes, estudios posteriores han confirmado que esta clona posee muchos genes de virulencia y resistencia que pueden estar contenidos en plásmidos transferibles. Del 30 al 60% de las clonas que se han identificado son resistentes a fluoroquinolonas, y poseen BLEE, principalmente de la familia CTX-M, esta clona también ha sido identificada en animales y alimentos (Clermont *et al.*, 2009, Platell *et al.*, 2011, Rogers *et al.*, 2011).

Se han propuesto diversos factores que explican la rápida y exitosa diseminación de la clona multirresistente a antibióticos *E. coli* ST131 en humanos (Pitout *et al.*, 2009, Ewers *et al.*, 2010, Peirano *et al.*, 2010, Vincent *et al.*, 2010):

- Alta prevalencia de portadores fecales en el ganado, dando lugar a la transmisión por alimentos
- Diseminación en el ambiente
- Animales domésticos o salvajes portadores
- Transmisión persona-persona
- Viajes internacionales
- Determinantes propios de la bacteria que potencian su actividad patógena, como plásmidos de resistencia y genes de virulencia.

### **Filogenia**

Una clasificación de las cepas aisladas de *E. coli* es determinada por el grupo filogenético. Los análisis filogenéticos han demostrado que las cepas de *E. coli*

caen dentro de cuatro grupos filogenéticos (A, B1, B2 y D) (Herzer *et al.*, 1990). Las cepas que son comensales pertenecen predominantemente al grupo A, y en menor proporción al B1, mientras que las cepas ExPEC pertenecen en su mayoría al grupo B2, y al grupo D (Picard *et al.*, 1999, Russo *et al.*, 2000, Duriez *et al.*, 2001, Bailey *et al.*, 2010).

Estos estudios han permitido un mejor entendimiento de cómo las cepas patógenas adquieren genes de virulencia (Clermont *et al.*, 2000). El grupo B2, se asocia con una mayor presencia de factores de virulencia, y formación de biofilm, sin embargo presentan baja multirresistencia a antibióticos. Mientras que las cepas pertenecientes al grupo A, presentan menor número de factores de virulencia y producen menor cantidad de biofilm, pero se asocian a una mayor resistencia a antibióticos (Soto *et al.*, 2007). Aunque las cepas de *E. coli* comensales de los grupos A o B1 conforman la microbiota, y se consideran no patógenas, ocasionalmente han sido responsables de infecciones extraintestinales (Duriez *et al.*, 2001).

### **Tratamiento**

El tratamiento inicial de las infecciones de tracto urinario generalmente es empírico, se inicia antes de tener los resultados del laboratorio del urocultivo y depende de diversos factores como los antecedentes personales, incluyendo la historia de alergias; reacciones adversas del fármaco, efectos colaterales a la microbiota, la disponibilidad del fármaco y el patrón local de resistencia de los uropatógenos. Los antibióticos de primera elección en México para tratar las ITU son ciprofloxacina, trimetoprim-sulfametoxazol y nitrofurantoína (Molina-López *et al.*, 2011, Calderón-Jaimes *et al.*, 2013, Pigrau, 2013).

El tratamiento empírico debe incluir la cobertura antibiótica de amplio espectro, en los últimos años se ha observado un incremento importante en la resistencia de *E. coli* para ampicilina, amoxicilina, trimetoprim-sulfametoxazol y quinolonas (Arredondo-García *et al.*, 2008). Por esto se sugiere el manejo con nitrofurantoína o cefalosporinas de segunda y tercera generación, ya que son seguras y bien toleradas. Otra opción es la fosfomicina, sobre todo en los casos donde se sospeche

o se haya demostrado infección por *E. coli* productora de betalactamasas de espectro extendido (BLEE), aunque esto ha sido poco estudiado (Falagas *et al.*, 2010, Barber *et al.*, 2013).

### **Resistencia a Antibióticos**

Las bacterias pueden ser resistentes a más de una familia de antimicrobianos intrínsecamente, o pueden volverse resistentes a causa de mutaciones o por la adquisición de genes de resistencia de otras bacterias (Frost *et al.*, 2005, Andersson *et al.*, 2010).

El uso inadecuado de antibióticos y el retraso en el inicio del tratamiento ha favorecido el desarrollo de resistencia a antibióticos por UPEC, esto debido a la aparición generalizada de una serie de mecanismos de resistencia, como los anteriormente mencionados. Este fenómeno se ha reportado a nivel mundial, principalmente a ampicilina, tetraciclina y cloranfenicol, también se ha reportado una alta resistencia a  $\beta$ -lactámicos (penicilina), aminoglucósidos (amikacina), cefalosporinas (cefalotina, cefotaxima, ceftazidima y ceftriaxona) y fluoroquinolonas como la ciprofloxacina (von Baum *et al.*, 2005, Lautenbach *et al.*, 2007, Mandal *et al.*, 2012).

*E. coli* O25:H4 ha adquirido plásmidos de la familia IncF que codifican  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) (Nicolas-Chanoine *et al.*, 2014). Estos plásmidos propagan rápidamente resistencia a cefalosporinas de tercera generación, así como a otros antibióticos (Flores-Mireles *et al.*, 2015). Las BLEE son enzimas catalíticas de naturaleza proteica que tienen la increíble capacidad de inactivar a todos los  $\beta$ -lactámicos, en distintos grados, con excepción de los carbapenems (Da Silva *et al.*, 2012, Phan *et al.*, 2013). Los factores de riesgo asociados con ITU causadas por cepas productoras de BLEE incluyen: ITU recurrentes, patología renal subyacente, tratamientos previos con cefalosporinas y fluoroquinolonas, hospitalización previa, diabetes Mellitus y viajes internacionales a zonas de alto riesgo (Rodríguez-Baño *et al.*, 2008). Se ha demostrado que las bacterias que producen BLEE contribuyen en el incremento de la mortalidad y morbilidad de las ITU, lo cual representa un grave

y creciente problema de salud pública, especialmente cuando al mismo tiempo estas bacterias poseen otros determinantes de resistencia (Peirano *et al.*, 2010).

Además de las BLEE otros mecanismos de resistencia son inhibición enzimática (p.ej. inhibición de topoisomerasas y cambio del blanco de acción del fármaco (p.ej. polimorfismo de nucleótidos) (von Baum *et al.*, 2005, Lautenbach *et al.*, 2007, Mandal *et al.*, 2012, Narciso *et al.*, 2012). La influencia del material genético en la resistencia a antibióticos se ve reflejada en genes como los *bla*<sub>AmpC</sub> que codifican para la  $\beta$ -lactamasa AmpC, presentes en la resistencia hacia cefalosporinas de 3era generación, o la expresión de  $\beta$ -lactamasa CTX-M-2 resistente a cefalosporinas (cefotaxima) y aminoglucósidos (gentamicina), o bien, la expresión de la  $\beta$ -lactamasa TEM-52 resistente a cefalosporinas (cefotaxima y ciprofloxacino) (Narciso *et al.*, 2012).

A su vez, el grupo filogenético B2, se ha asociado con la presencia de la  $\beta$ -lactamasa CTX-M-15, la cual ha tenido una exitosa adaptación evolutiva y por lo tanto una distribución mundial (Clermont *et al.*, 2008).

La presencia de diversos mecanismos de resistencia a la vez en estas bacterias da como resultado la multirresistencia a antibióticos, lo cual complica el tratamiento para las ITU. La aparición y constante incremento de cepas multirresistentes se ha convertido en un serio problema de salud pública, debido a esto ha surgido la necesidad de crear nuevas definiciones que permitan clasificar a estas bacterias multidrogo-resistentes (MDR). Las infecciones causadas por cepas MDR pueden dar lugar a un tratamiento inadecuado o tardío (Ibrahim *et al.*, 2000, Anderson *et al.*, 2006). Los términos utilizados para clasificar a las bacterias MDR son los siguientes (Magiorakos *et al.*, 2012):

- **MDR**: son bacterias resistentes a tres o más familias de antibióticos.
- **XDR**: son bacterias definidas como extensamente drogo-resistentes, son epidemiológicamente significativas, ya que suelen ser resistentes a todas o casi todas las familias de antimicrobianos probadas.
- **PDR**: estas bacterias se definen como pandrogo-resistentes y son resistentes a todas las familias de antibióticos probadas.

## Antecedentes Generales

En el año 2006 Sabaté *et.al.*, establecieron dos métodos de PCR múltiple para detectar ocho marcadores de PAIs, utilizando 50 cepas de *E. coli* comensales y 100 cepas de UPEC, encontrando que 20 de las 50 cepas comensales y 93 de las cepas de UPEC contenían marcadores de PAIs. La PAI más prevalente entre cepas comensales y de UPEC fue PAI IV<sub>536</sub> (30% vs. 73%) seguido de PAI I<sub>CFT073</sub> (26% vs 73%), PAI I II<sub>CFT073</sub> (14% vs. 46%), PAI II<sub>J96</sub> (8% vs. 34%), PAI I<sub>536</sub> (8% vs. 33%) and PAI II<sub>536</sub> (4% vs. 20%), respectivamente. PAI III<sub>536</sub> fue detectada únicamente en las cepas uropatogénicas (2%), mientras que PAI I<sub>J96</sub> no fue detectada en ninguna de las cepas aisladas.

En el 2007 Lloyd, *et.al.*, analizaron el genoma de la cepa CFT073, proveniente de un paciente con pielonefritis. Determinaron que esta cepa, contiene 10 PAIs, en su genoma, además de 3 regiones de origen fágico. Además siete de las PAIs contienen uno o más genes que codifican factores que intervienen en la virulencia. Reportaron también que la PAI I<sub>CFT073</sub>, contiene la mayor cantidad de genes que codifican factores de virulencia, y es la más común presentada en cepas de UPEC, seguida de las PAI II y PAI III.

En el año 2008 Coque *et. al.*, determinaron que la asociación de las enzimas CTX-M-15 con la clona ST131 es usualmente atribuible a la presencia de un plásmido que confiere multirresistencia a antibióticos, IncFII que contiene genes que codifican BLEE como *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *bla*<sub>TEM-1</sub> y *bla*<sub>OXA-1</sub> y el gen *aac(6)-Ib-cr* que confiere resistencia a aminoglucósidos y a fluoroquinolonas, estos plásmidos son de tamaño variable, entre 85 y 200 kb.

En el año 2011 Molina *et.al.*, realizaron un estudio con 119 cepas de *E. coli* obtenidas de pacientes que presentaron ITU, al realizar la serotipificación de éstas, encontraron que el 21.2% pertenecían al serotipo O25:H4 y los porcentajes de resistencia a antibióticos fueron los siguientes: Ampicilina 83.7%, Piperacilina 53.8%, fluoroquinolonas 55.5 a 60.6% y trimetrimprim-sulfametoxazol 56.4%. Este estudio es de gran importancia, ya que es el primero que establece la presencia del grupo clonal O25-ST131 en México.

En el año 2013 Phan *et.al.*, reportaron que *E. coli* ST131 se asocia con la producción de enzimas CTX-M-15, actualmente las  $\beta$ -lactamasas de amplio espectro más extendidas en el mundo. Además de ser resistente también a cefalosporinas, y monobactámicos. Usualmente también es co-resistente a fluoroquinolonas y además se ha reportado que algunas de estas cepas producen carbapenemasas, lo cual da lugar a limitadas opciones de tratamiento de ITU por UPEC. También se ha demostrado que esta clona posee una gran variedad de factores de virulencia que causan enfermedad invasiva, similares a los factores de otras cepas de UPEC.

En el año 2014 Koga *et. al.*, analizaron 20 cepas de bacteremia de recién nacidos, niños y adultos, para la determinación de secuencias asociadas a PAIs. 70% de las cepas de UPEC aisladas de hemocultivos presentaron secuencias asociadas a PAIs, mientras que el 52.94% de las cepas comensales también presentaron secuencias asociadas a PAIs. De acuerdo con publicaciones anteriores (Schubert *et al.*, 2004, Sabaté *et al.*, 2006, Ostblom *et al.*, 2011), la PAI IV<sub>536</sub> fue la más prevalente en ambos grupos seguida de la PAI I<sub>CF073</sub> y PAI II<sub>CF073</sub>. La PAI IV<sub>536</sub> ha sido descrita por varios investigadores como una isla estable, y es una de las más comunes encontradas en enterobacterias. 14 cepas tuvieron plásmidos, de 1 a 5 por cepa, y fueron 3 plásmidos confirmados como conjugativos.

### **Antecedentes específicos**

En el laboratorio de Biología Molecular de Enteropatógenos se cuenta con 5 ceparios distintos de *Escherichia coli* aisladas de pacientes mexicanos cursando con infección de tracto urinario, estas cepas fueron donadas por las siguientes instituciones, en periodos diferentes: Hospital Público de la ciudad de Puebla, 2 Clínicas Particulares de la Ciudad de Puebla, Facultad de Medicina de la UNAM, y el último grupo son cepas aisladas de mujeres de la ciudad de Puebla con displasia cervical. Molina en el 2011 analizó 114 cepas donadas por una clínica particular, el 93.8% de ellas fueron aisladas de mujeres. Se encontraron los siguientes genes de virulencia: *hlyA* en el 29.8%, *papGII* en el 37.7% y *papGIII* en el 21.9%

Aroche en el 2011 analizó 133 cepas donadas por la misma clínica particular, el 89.5% de éstas fueron aisladas de mujeres. Se encontraron los siguientes genes de virulencia: *fimH* en el 94% y *fliC* en el 30%.

En los dos trabajos mencionados anteriormente se analizaron los perfiles de susceptibilidad a 11 antibióticos y el 71% presentaron multirresistencia; AM (47%), NF (26%), TSX (33%), CF (29%) y LVX (38%) fueron los antibióticos a los que se presenta la mayor resistencia. Se realizó la serotipificación de estas 247 cepas y se encontró que el serotipo más representativo fue el O25:H4 (16%) seguido por O75:H- (7.5%), O1:H6 (5%), O1:H34 (4%), y O75:H45 (3%). Se analizó el grupo filogenético a 95 de estas cepas, encontrando con mayor frecuencia el grupo B2 (40.5%) seguido del grupo D (34%), grupo A (21.5%) y grupo B1 (3.8%).

En el 2012 Martínez analizó 125 cepas donadas por un Hospital de Salud Pública de la ciudad de Puebla, el 64% de las cepas fueron aisladas de mujeres, se analizaron los perfiles de susceptibilidad a 11 antibióticos y el 78% presentaron multirresistencia; AM (74%), TSX (66%), CF (48%), LVX (49%) y NF (14%) fueron los antibióticos a los que se presenta la mayor resistencia. Los genes de virulencia analizados fueron *sat* en el 25.7%, *vat* en el 38.1% e *iucD* en el 14.4%. En estas cepas predominó el serogrupo O25:H4 (8%) seguido de O17:H18 (2%) y O6:H1 (2%). A estas cepas no se les realizó análisis de grupos filogenéticos.



Ibarra en el 2015 analizó 171 cepas donadas por la Facultad de Medicina de la UNAM, éstas cepas fueron aisladas de infantes de 5 meses a 8 años de edad. Se analizaron los perfiles de susceptibilidad a 17 antibióticos y el 99% presentaron multirresistencia, CF (96%), AM (79%), TSX (60%), NF (35%), y LVX (32%) fueron los antibióticos a los que se presenta la mayor resistencia. El análisis de grupo filogenéticos mostro que la mayoría de cepas pertenecen al grupo B2 (36%) seguido del grupo A (35%), grupo D (27%), grupo B1 (2%). El serotipo más representativo de estas cepas fue el O25:H4 (8%) seguido por O102:H6, O1:H6, O6:H1 (5%) y O86:H18 (3%). Los genes de virulencia analizados en estas cepas fueron: *fimH* en el 84%, *iha* en el 60%, *iucD* en el 53% *sat* en el 22%, *fliC* en el 17%, *vat* en el 12% *papGII* en el 10% y *papGIII* en el 7%.

En el 2015 Flores trabajó con 16 cepas aisladas de mujeres con displasia cervical. Se analizaron los perfiles de susceptibilidad a 17 antibióticos y el 100% presentaron multirresistencia, CF (94%), AM (65%), TSX (53%), NF (29%), y LVX (24%) fueron los antibióticos a los que se presenta la mayor resistencia. El análisis de grupo filogenéticos mostro que la mayoría de cepas pertenecen al grupo B2 (35%) seguido del grupo A (24%), grupo D (24%), grupo B1 (18%). El serotipo más representativo de estas cepas fue el O25:H4 (12%). Los genes de virulencia analizados en estas cepas fueron: *fimH* y *ecp1* en el 94%, *ecp2* en el 76%, *iha*, *sat* e *iucD* en el 53%, *fliC* en el 35%, *pap* en el 29%, *vat* y *hlyA* en el 24%.

## **Justificación**

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 no se conoce la incidencia real de las ITU por *E. coli* y tampoco por UPEC de serogrupo O25. UPEC de serogrupo O25 es una línea clonal con características de virulencia importantes que han merecido la atención del sector salud a nivel mundial. Además será importante conocer los determinantes de virulencia que poseen las cepas de UPEC de serogrupo O25 aisladas de población mexicana.

Es importante estudiar molecularmente los factores que intervienen en la patogénesis de este género bacteriano, con la finalidad de plantear estrategias para mejorar el tratamiento adecuado y oportuno de estas infecciones.

## **Hipótesis**

Las cepas de UPEC del serogrupo O25 aisladas de población mexicana cursando con ITU, pertenecen al grupo filogenético B2, expresan BLEE y poseen genes que codifican diferentes factores de virulencia: *iucD* (aerobactina), *sat* (toxina autotransportadora secretada), *fimH* (fimbria tipo I), *fliC* (flagelo), *papG* (adhesina de la fimbria P), *vat* (toxina autotransportadora vacuolizante), *ihA* (receptor de sideróforo), *papA* (fimbria P) y *hlyA* (hemolisina).

### **Objetivo General**

Determinar las características de virulencia presentes en una colección de cepas de *E. coli* uropatógena de serogrupo O25 aisladas de pacientes cursando con infección urinaria.

### **Objetivos Particulares**

1. Confirmar serogrupo O25 a 65 cepas de *E. coli* aisladas de infección urinaria.
2. Determinar el grupo filogenético a cepas de UPEC O25.
3. Determinar la presencia de biomarcadores moleculares de virulencia a UPEC O25.
4. Determinar la presencia de cuatro islas de patogenicidad a cepas UPEC O25.
5. Analizar el perfil plasmídico de las cepas UPEC O25.
6. Determinar el perfil de susceptibilidad a antibióticos y la producción de  $\beta$ -lactamasas a cepas UPEC O25.

## **Material y Métodos**

Se usaron 65 cepas de *E. coli* uropatógena aisladas de pacientes con ITU, donadas por cuatro dependencias distintas 1 laboratorio de Salud Pública del Estado de Puebla, dos laboratorio clínicos Particulares de la Cd. De Puebla y del Departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina de la UNAM. Estas cepas pertenecen al serogrupo O25, se encuentran almacenadas en crioconservación a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Se tomaron 20  $\mu\text{l}$  del crioconservado y se inoculó en medio líquido LB, se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$ , a 220 rpm de 18 a 24 hrs. Se inoculó un tubo nuevo con 5 ml de LB usando 80  $\mu\text{l}$  del precultivo hasta obtener una  $\text{DO}_{260\text{nm}}$  de 0.4 a 0.5. Del tubo de precultivo se obtuvieron paquetes celulares de 500  $\mu\text{l}$  y del tubo con DO de 0.5 se obtuvieron paquetes de 3 ml. Los paquetes celulares de 0.5 y 3ml fueron usados para la extracción de ADN genómico y ADN plasmídico, respectivamente.

### **Extracción de ADN genómico**

Se inoculan 20  $\mu\text{L}$  de la cepa en 3 mL de medio líquido LB y se incuba de 4 a 5 hrs a  $37^{\circ}\text{C}$  hasta obtener una densidad óptica de 0.4 nm. Se toman 0.5 ml y se colocan en un tubo eppendorf para centrifugarlos a 12000 RPM por 5 min, se decanta y se obtiene el paquete celular y se le agregan 570 $\mu\text{L}$  de buffer SET (sacarosa, EDTA-TRIS), se agita en el vortex por 30 seg. y se agregan 30 $\mu\text{L}$  de SDS al 20% invirtiendo el tubo por 20 seg. Nuevamente se mezcla en vortex por 20 segundos, evitando hacer burbujas. Se incuba a  $80^{\circ}\text{C}$  por 5 min y se deja enfriar. Se agregan 2  $\mu\text{L}$  de RNasa y se incuba a  $37^{\circ}\text{C}$  por 45 min. Se deja enfriar y se adicionan 200  $\mu\text{L}$  de NaCl 5M, se invierte el tubo por 20 seg. y se deja reposar en hielo por 5 min. Se centrifuga a 12000 rpm y el sobrenadante se pasa a un tubo nuevo, al que se agregan 800  $\mu\text{L}$  de isopropanol. Se mezcla por 1 min y se centrifuga a 12000 RPM por 20 min. Se decanta el sobrenadante y se hacen 3 lavados con 800  $\mu\text{l}$  de etanol al 70%. Se seca la pastilla y se resuspende en 75  $\mu\text{L}$  de Tris 10 mM a pH 8. Finalmente se incuba a  $37^{\circ}\text{C}$  por 15 min y se almacena.

### **Extracción de ADN plasmídico**

Se inoculan 20 µL de la cepa en 3 mL de medio líquido LB y se incuba de 16 a 18 hrs a 37° C. Los 3 ml de precultivo se colocan en un tubo eppendorf para centrifugarlos a 12000 RPM durante 5 min, se decanta el sobrenadante y se obtiene el paquete celular, se resuspende en vortex y se agregan 152 µL de solución 1 (lisozima, RNAsa y buffer SET) se agita en vortex 10 seg y se incuba 15 min a 37° C. Se agregan 300 µL de solución 2 (NaOH 0.4N y SDS al 2%) se invierte el tubo 10 veces y se coloca en hielo durante 5 min. Se le agregan 420 µL de acetato de potasio, se invierte el tubo 3 veces y se coloca en hielo durante 15 min y después se centrifuga a 12000 RPM durante 20 min. Se decanta el sobrenadante en un tubo con 400 µL de formol: alcohol isoamílico (25:24:1), se invierte suavemente 50 veces y se centrifuga a 12000 RPM durante 5 min. Se transfiere el sobrenadante a un tubo con cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se invierte 100 veces suavemente y se centrifuga a 12000 RPM durante 5 min. Se transfiere el sobrenadante a un tubo nuevo y se añade etanol absoluto hasta que el tubo tenga un volumen de 1.5 ml. Se deja toda la noche en congelador a -20° C. al siguiente día se centrifuga a 12000 RPM durante 15 min y se decanta el sobrenadante. Se agregan 800 µL de etanol al 70% y se disuelve la pastilla, se centrifuga a 12000 RPM durante 5 min. Se decanta el sobrenadante, se seca la pastilla y se resuspende en 70 µL de H<sub>2</sub>O tridestilada estéril.

### **Determinación de perfiles de sensibilidad a antibióticos**

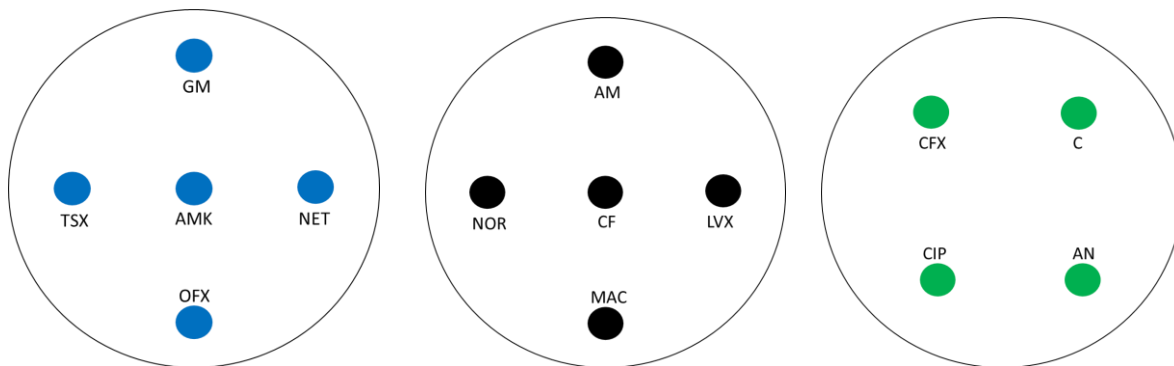
Se hace por medio del método Kirby-Bauer usando 17 sensibilizadores de los siguientes antibióticos: ácido nalidíxico, amikacina, ampicilina, levofloxacina, cefalotina, cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, cefuroxima, ciprofloxacina, cloranfenicol, gentamicina, netilmicina, nitrofurantoina, norfloxacina, ofloxacina, y trimetropim-sulfametoxazol. Se siembran 10 µL del crioconservado en agar soya tripticaseina (TSA) a 37°C toda la noche. Luego se toma 1 colonia y se cultiva de 2 a 3 horas a 37 °C en medio líquido soya tripticaseina (TSB) hasta que se obtiene una turbidez de MacFarland de 0.5. Con un hisopo se hace una siembra masiva en agar Mueller-Hinton, se deja secar y se colocan los sensibilizadores, se incuban por 18 hrs a 37°C y se realiza la lectura de los halos de

inhibición para que las cepas sean clasificadas según los criterios del CLSI como sensibles (S), intermedias (I) y resistentes (R) (Clinical Laboratory Standards Institute, 2015). Para la determinación de perfiles de resistencia se usarón como control, las cepas de referencia *Escherichia coli* ATCC25922 y *Pseudomona aeruginosa* ATCC27853 (ver tabla 1).

**Tabla 1.** Concentraciones de antibióticos, valores de cepas para el control de antibiogramas y valores de interpretación del antibiograma.

	Valores de Referencia				Valores de Resistencia		
	Antibiótico	Concentración	<i>E. coli</i> ATCC25922	<i>Pseudomona</i> <i>aeruginosa</i> ATCC 27853	Resistente	Intermedio	Sensible
<b>GM</b>	Gentamicina	10 µg	19-26	17-23	<12	13-14	>15
<b>NET</b>	Netilmicina	30 µg	22-30	17-23	<12	13-14	>15
<b>OFX</b>	Ofloxacina	5 µg	29-33	17-21	<12	13-15	>16
<b>TSX</b>	Trimetropim/ Sulfametoxazol	1.25/ 23.75 µg	23-29	-	<10	11-15*	>16
<b>AMK</b>	Amikacina	30 µg	19-26	18-26	<14	15-16	>17
<b>AM</b>	Ampicilina	10 µg	16-22	-	<13	14-16	>17
<b>LVX</b>	Levofloxacina	5 µg	29-37	19-26	<13	14-16	>17
<b>MAC</b>	Nitrofurantoina	300 µg	20-25	-	<14	15-16	>17
<b>NOR</b>	Norfloxacina	10 µg	28-35	22-29	<12	13-16	>17
<b>CF</b>	Cefalotina	30 µg	15-21	-	<14	15-17	>18
<b>CFZ</b>	Ceftazidima	30 µg	25-32	22-29	<17	18-20	>21
<b>CFX</b>	Cefuroxima	30 µg	20-26	-	<14	15-22	>23
<b>C</b>	Cloranfenicol	30 µg	21-27	-	<12	13-17	>18
<b>AN</b>	Ácido Nalidíxico	30 µg	22-28	-	<13	14-18	>19
<b>CRO</b>	Ceftriaxona	30 µg	29-35	17-23	<19	20-22	>23
<b>CIP</b>	Ciprofloxacina	5 µg	30-40	25-33	<15	16-20	>21
<b>CTX</b>	Cefotaxima	30 µg	29-35	18-22	<22	23-25	>26
<b>AMC</b>	Amoxicilina-Ácido clavulánico	20/10 µg	18-24	-	<13	14-17	>18
<b>FEP</b>	Cefepime	30 µg	31-37	24-30	<14	15-17	>18
<b>ATM</b>	Aztreonam	30 µg	28-36	23-29	<17	18-20	>21
<b>FOS</b>	Fosfomicina	200 µg	22-30	-	<12	13-15	>16

Los antibióticos fueron distribuidos en tres placas de agar Mueller Hinton, en la siguiente figura se muestra la distribución de los discos de antibióticos para analizar los perfiles de susceptibilidad a antibióticos, la distribución de éstos se muestra en la figura 4.

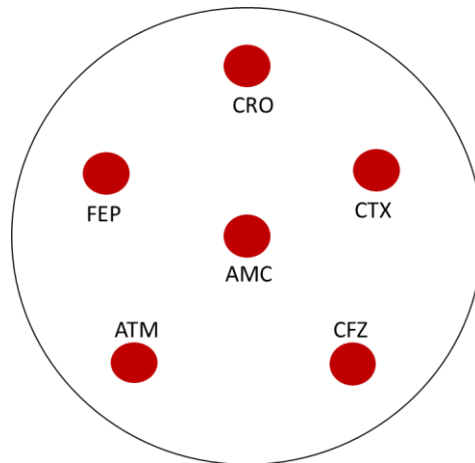


**Figura 4. Distribución de los discos de antibióticos utilizados para analizar la susceptibilidad de las cepas UPEC O25.**

### **Producción de $\beta$ -lactamasas de Espectro Extendido**

Se realiza mediante el método de difusión de doble disco. Primero se siembran las cepas en agar MacConkey adicionado con CTX a una concentración de 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , las cepas que crecen en estas condiciones se analizan para saber si son productoras de BLEE, para ello se utilizan sensidiscos de  $\beta$ -lactámicos: aztreonam, y cefalosporinas: cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, cefepime y un disco combinado con amoxicilina/ácido clavulánico (AMC). Se siembran 10  $\mu\text{L}$  del crioconservado en agar soya tripticaseína (TSA) a 37°C toda la noche. Luego se toma 1 colonia y se cultiva de 2 a 3 horas a 37 °C en medio líquido de soya tripticaseína (TSB) hasta que se obtiene una turbidez de MacFarland de 0.5. Con un hisopo se hace una siembra masiva en agar Mueller-Hinton, se deja secar y se colocan los sensidiscos, se incuban por 18 hrs a 37°C. El sensidisco de AMC se coloca en el centro, alrededor de este, a una distancia equidistante de 20mm se colocan los otros sensidiscos. Posteriormente se realiza la lectura, una zona de inhibición agrandada o distorsionada alrededor del disco de (AMC) es indicativo de sinergia entre el ácido clavulánico y cualquiera de los cinco antibióticos probados y se tomó como evidencia de producción de BLEE.

En la figura 5 se muestra la distribución de los sensidiscos utilizados en esta prueba.



**Figura 5. Distribución de los discos de antibióticos utilizados para analizar la producción de BLEE de las cepas UPEC O25.**

### Confirmación molecular de serogrupo O25

Se utilizaron oligonucleótidos para amplificar los genes *trpA* y *pabB*, que generan productos de 427 y 347 pb respectivamente. Se realizará la PCR siguiendo la condiciones reportadas en Clermont *et. al.*, 2009, ajustando la concentración de ADN para todas las muestras a 0.035 ng. El producto se corre en un gel de agarosa al 1%, junto con un indicador de peso molecular de 100 pb, además del control positivo (46U) y negativo (EDL933); se tiñe el gel con bromuro de etidio y se visualiza en un equipo de fotodocumentación (Tabla 2).

**Tabla 2. Cepas control utilizadas para la confirmación molecular del serogrupo O25.**

Cepa	Amplifica
Cepa 46U* (positivo)	<i>trpA</i> y <i>pabB</i>
EHEC O157:H7 cepa EDL933 (negativo)	<i>trpA</i>

\*Determinada por Ibarra-Valencia, 2014.

### → Determinación de genes de virulencia

Se realizaron tres PCR múltiples. PCRm1 (*fimH*, *fliC*, *satA* e *iucD*), PCRm2 (*iha*, *vatP*, *vatA*, *papGII* y *papGIII*) y PCRm3 (*papA*, *satP* y *hlyA*) (Tabla X). Y se realizó PCR individual para *cnf*; de acuerdo a las condiciones previamente establecidas



en el grupo de trabajo (Laboratorio de Biología Molecular de Enteropatógenos). Para estos ensayos se usarán las cepas control de la Tabla 3.

**Tabla 3.** Cepas control utilizadas para cada PCR y nombres de los genes de virulencia de UPEC que amplifica cada una.

Cepa Control	Genes que amplifica				
<b>Control PCRm1</b>	<i>fimH</i>	<i>fliC</i>	<i>satA</i>	<i>iucD</i>	
CFT073	+	+	+	+	
<b>Control PCRm2</b>	<i>lha</i>	<i>vatP</i>	<i>vatA</i>	<i>papGIII</i>	<i>papGII</i>
CFT073+059I	+	+	+	+	+
<b>Control PCRm3</b>	<i>papA</i>	<i>satP</i>	<i>hlyA</i>		
GAG1*	+	+	+		
<b>Control PCR <i>cnf</i></b>	<i>Cnf</i>				
GAG1*	+				

\*Donada por la Facultad de Medicina de la UNAM

**Tabla 4.** Nombre y tamaño de los productos de amplificación de los genes de virulencia de UPEC obtenidos por tres diferentes PCRm y PCR individual

PCRm1		PCRm2		PCRm3	
Gen	Tamaño	Gen	Tamaño	Gen	Tamaño
<i>iucD</i>	512 pb	<i>papGII</i>	562 pb	<i>hlyA</i>	1280 pb
<i>satA</i>	384 pb	<i>papGIII</i>	421 pb	<i>satP</i>	880 pb
<i>fliC</i>	304 pb	<i>vatA</i>	330 pb	<i>papG</i>	641 pb
<i>fimH</i>	210 pb	<i>vatP</i>	226 pb		
		<i>iha</i>	150 pb		

### Clasificación filogenética

Se utilizaron en una primera ronda de PCR los oligonucleótidos para amplificar los genes *chuA*, *yjaA* y el fragmento TSPE4.C2, dependiendo del resultado obtenido se realiza una segunda ronda confirmatoria; las cepas de filogrupo A se confirman para el filogrupo C, amplificando el gen; las cepas de filogrupo D se confirman para el filogrupo E. Esta PCRm se realizó siguiendo las condiciones reportadas en Clermont *et.al.* 2013 Se ajusta la concentración del DNA para todas las muestras a 0.035 ng. Una vez hecha la PCRm, el producto se corre en un gel de agarosa al 1.5% junto con un indicador de peso molecular de 100 pb,

además de los controles positivo y negativo. Se tiñe con bromuro de etidio y se visualiza en un equipo de fotodocumentación (Clermont *et al.*, 2013). Se usaron como control positivo las cepas indicadas en la Tabla X.

**Tabla 5.** *Controles utilizados para la determinación de grupos filogenéticos*

Cepa	Amplifica	Grupo filogenético
<b>EHEC O157:H7 EDL33</b>	<i>chuA</i>	D
<b><i>E. coli</i> K-12 cepa MC 4100</b>	<i>yjaA</i>	A
<b>UPEC cepa GAG1*</b>	<i>chuA, yjaA, TSPE4.C2</i>	B2
<b>C7206</b>	<i>trpA</i>	C
<b>C7204</b>	<i>Arpa</i>	E
<b>89U**</b>	<i>aceK</i>	F

\*Donada por la Facultad de Medicina de la UNAM

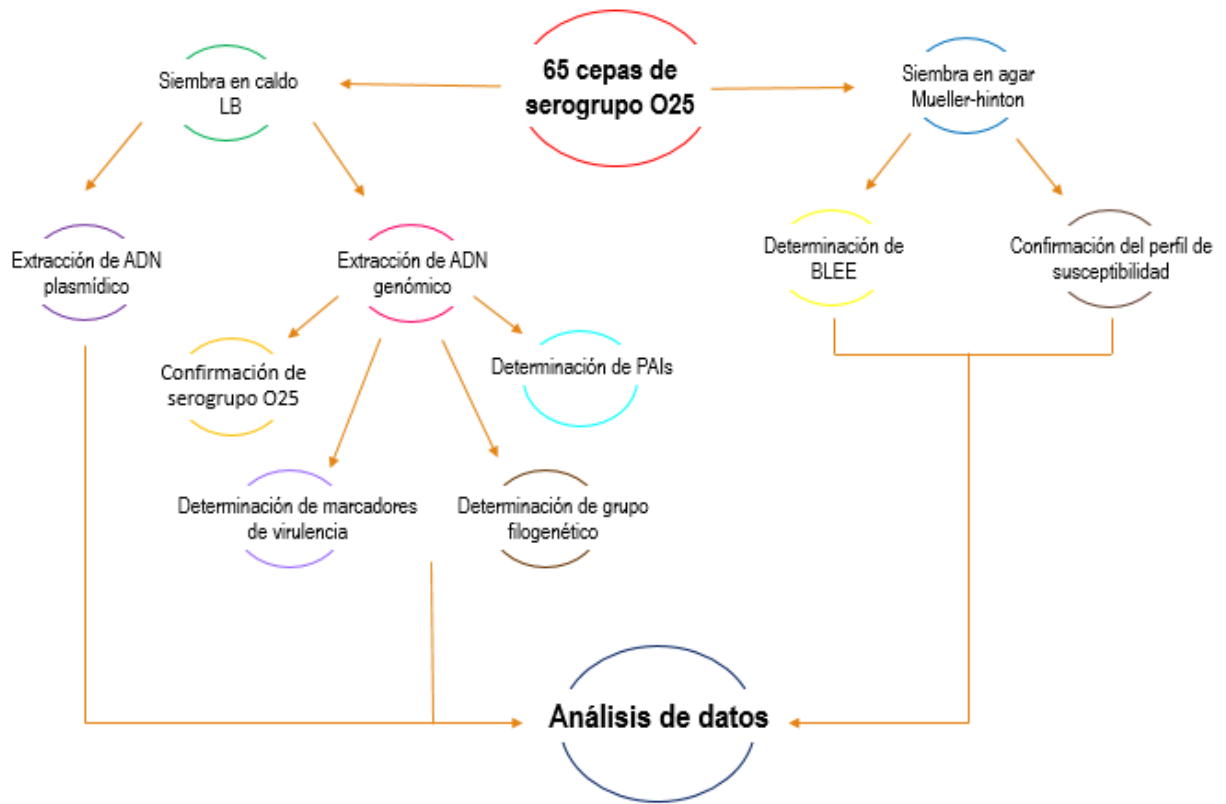
\*\* determinada por Ibarra-Valencia

**Tabla 6.** *Tabla interpretativa para la determinación de grupos filogenéticos de acuerdo a la clasificación de Clermont, 2013*

Grupo filogenético	<i>arpA</i>	<i>chuA</i>	<i>yjaA</i>	<i>TspE4.C2</i>
A	+	-	+/-	-
B1	+	-	-	+
C	+	-	+	-
E	+	+	+/-	+/-
D	+	+	-	+/-
F	-	+	-	-
B2	-	+	+	+

“+”: amplificado, “-” no amplificado.

## Esquema general de trabajo

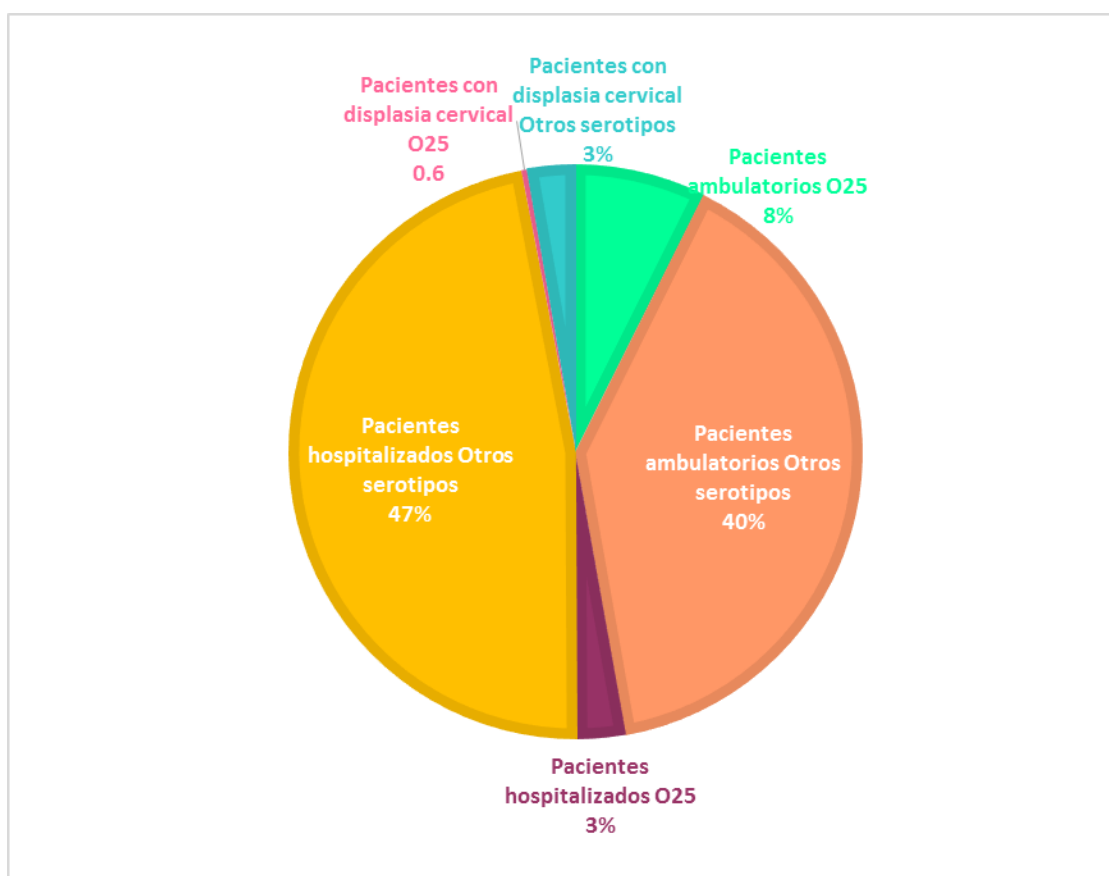


## Resultados

### Confirmación molecular de serogrupo O25

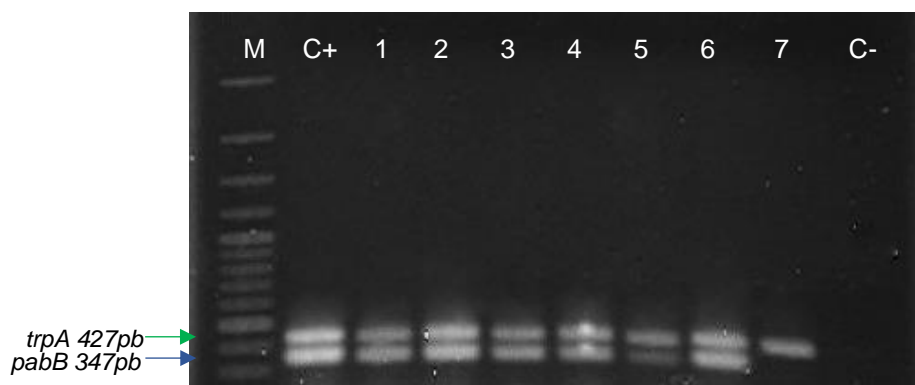
A partir de tres ceparios de *Escherichia coli* que suman un total de 560 cepas, que provienen de pacientes ambulatorios, pacientes hospitalizados y pacientes con displasia cervical cursando con ITU, se seleccionaron 65 cepas que pertenecen al serogrupo O25, de acuerdo a los resultados de la previa serotipificación la técnica de Kauffman.

De estas 65 cepas seleccionadas 88% (n=57) son de serotipo O25:H4, mientras que el 12% (n=8) son de serotipo O25:H<sup>-</sup>, después de analizar las características de las 65 cepas se decidió tomar a los dos serotipos como un único grupo, ya que no presentan diferencias significativas en sus características.



**Gráfica 1. Origen de las cepas de *E. coli* de serogrupo O25:** De un total de 560 (100%) de cepas de *E. coli* obtenidas de 3 poblaciones de pacientes cursando con ITU, se aisló 11.6% de cepas O25. La grafica muestra la proporción en que se aisló el serotipo O25:H4 de cada población analizada.

Una vez seleccionadas las cepas se realizó la confirmación molecular de serogrupo O25 cepas mediante una técnica de PCRm establecida por Clermont en el 2009. Esta metodología se basa en la identificación de dos genes, el gen *trpA* es considerado un gen de mantenimiento, está presente en todas las cepas de *E. coli* independientemente del serotipo al que pertenezcan; el otro gen es *pabB*, este gen está presente en las cepas de *E. coli* que pertenecen al serogrupo O25, interviene en la síntesis del lipopolisacárido (Clermont, 2009). Como control negativo en la electroforesis se utilizó la cepa EDL933 que es una *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) de serotipo O157:H7, así que únicamente amplifica el gen *trpA*, como se observa en la figura 6. El 100% de las cepas analizadas fueron positivas en la confirmación del serogrupo O25.

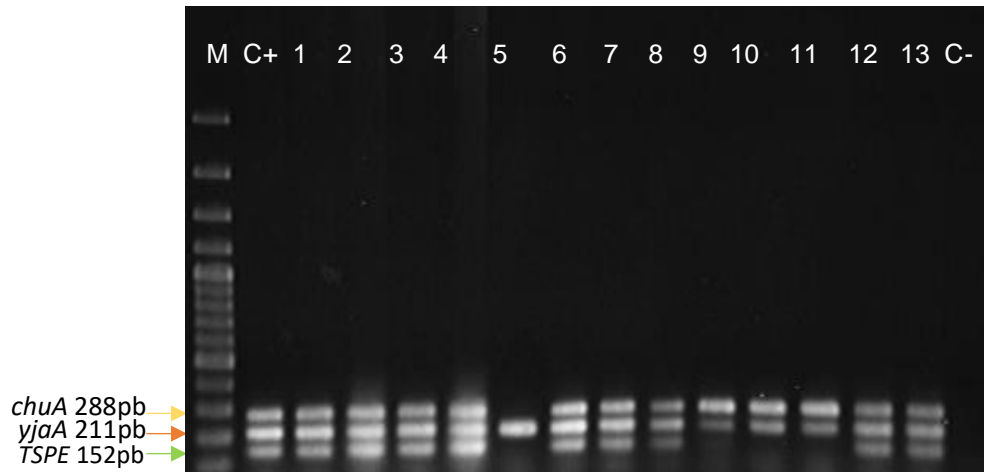


**Figura 6. Confirmación molecular del serogrupo O25 a cepas de UPEC de serotipo O25:H4 y O25:H<sup>-</sup> aisladas de ITU, por determinación de los genes *trpA* (427 pb) y *pabB* (347 pb).** Resultado representativo del corrimiento electroforético de los productos de PCRm en gel de agarosa al 1%. Carril M: 100 pb Plus DNA Ladder; carril C+: 46U; carril 1: CR04; carril 2: CR07; carril 3: CR14; carril 4: CR15; carril 5: CR19; carril 6: CR22; carril 7: CR33 carril C-: Mezcla sin ADN.

### **Determinación del grupo filogenético**

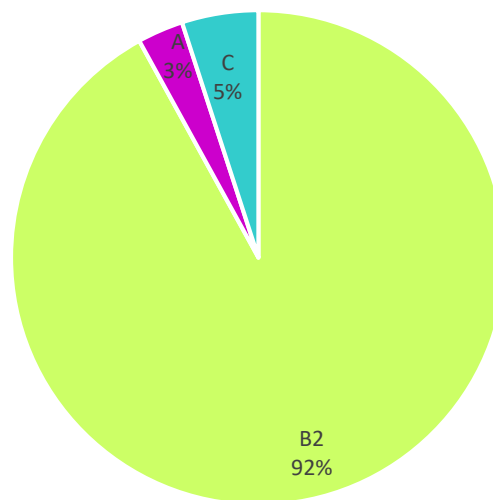
Se realizó la determinación de grupo filogenético tomando en cuenta que se ha reportado previamente que las cepas de UPEC de serogrupo O25 son patógenas y pertenecen al grupo filogenético B2, este análisis se llevó a cabo mediante PCR múltiple establecida por Clermont en el 2013 como se indica en material y métodos. Se utilizó la cepa GAG1 como cepa control, ya que es una UPEC que pertenece al

grupo filogenético B2. Posteriormente los productos se corrieron en un gel de agarosa al 1%.



**Figura 7. Determinación del grupo filogenético de cepas UPEC de serotipos O25:H4 y O25:H<sup>-</sup> aisladas de ITU, mediante el método de Clermont.** M:100 pb Plus DNA Ladder; C+: UPEC GAG1; carril 1: 55U; carril 2: 56U; carril 3: 63U; carril 4: 73U; carril 5: 168U; Carril 6: CR67; Carril 7: CR161; Carril 8: CR213; Carril 9: CR240; Carril 10: CR245; Carril 11: 28bl; Carril 12: 95l; Carril 13: 6U; Carril C-: Muestra sin ADN. A la izquierda de la figura se señala el nombre de los productos obtenidos y su peso molecular en pb.

A partir de esta determinación se encontró que el 92% (n=60) de las cepas analizadas pertenecen al grupo filogenético B2, como se esperaba, sin embargo se encontró que el 5% (n=3) pertenecen al grupo filogenético C y el 3% (n=2) pertenecen al grupo A (Gráfica 2).



**Gráfica 2. Distribución de grupos filogenéticos de cepas de UPEC de serotipos O25:H4 y O25:H<sup>-</sup> aisladas de ITU.** La gráfica muestra el porcentaje de cepas que pertenecen a tres grupos filogenéticos.

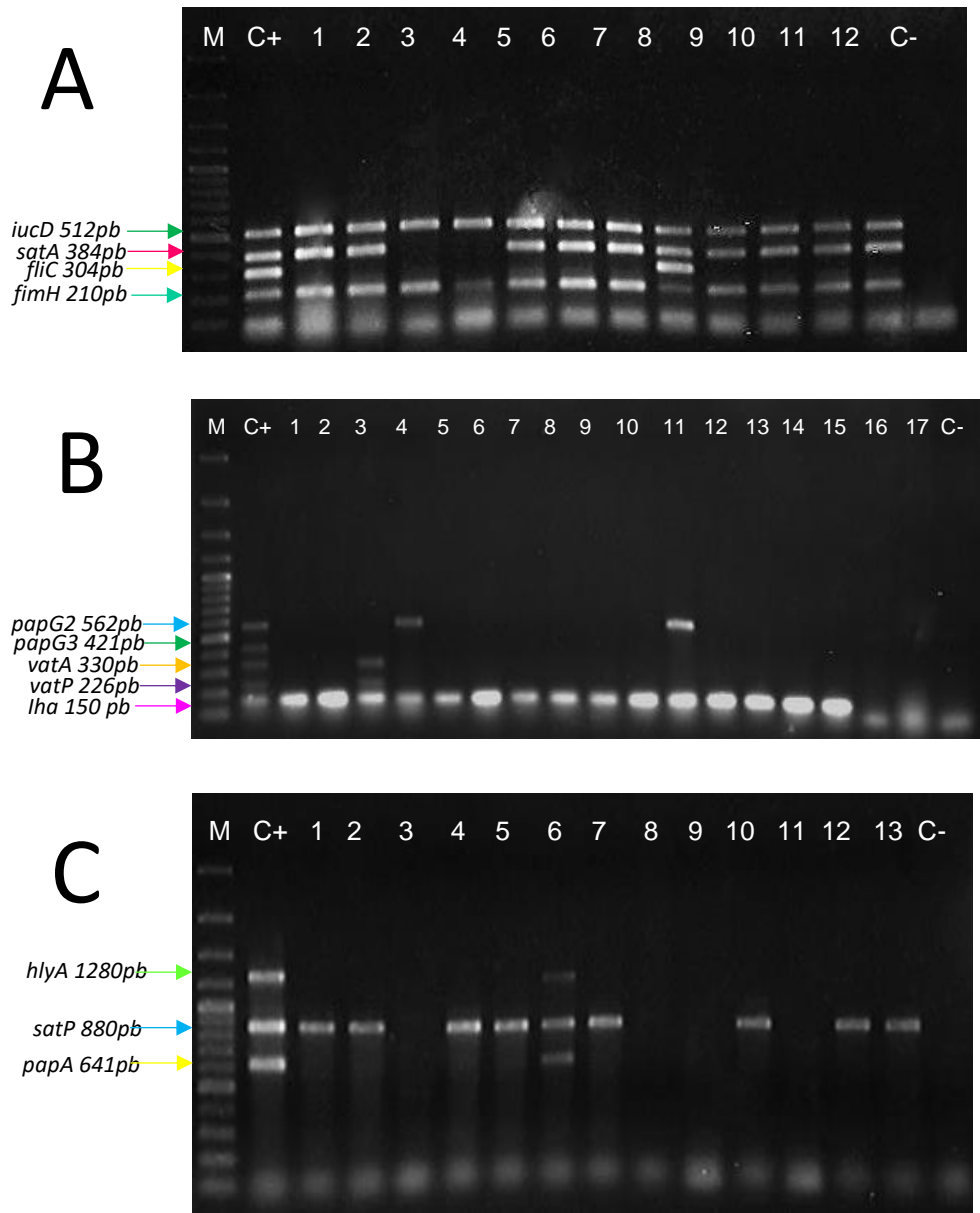
### **Determinación de la presencia de biomarcadores moleculares de virulencia**

Después de realizar la confirmación del serogrupo, se buscaron en las cepas de UPEC O25 nueve biomarcadores de virulencia, que son los más representativos de *E. coli* uropatógena. De acuerdo a su función los genes se dividen en tres grupos:

- **Adhesión y movilidad:** Gen que codifica para la adhesina del pili tipo 1 (*fimH*), gen que codifica para adhesina flagelar (*fliC*) y el gen que codifica para la pilina del pili P (*papA*).
- **Captación de hierro:** gen que codifica para el receptor de enterobactina/adhesina e superficie homólogo de IrgA de *V. cholerae* (*iha*), gen que codifica para la aerobactina (*iucD*).
- **Toxinas:** gen que codifica para toxina autotransportadora vacuolizante (*vat*), gen que codifica para la toxina autotransportadora secretada (*sat*), para hemolisina (*hlyA*) y gen que codifica para el factor necrotizante citotóxico 1 (*cnf*)

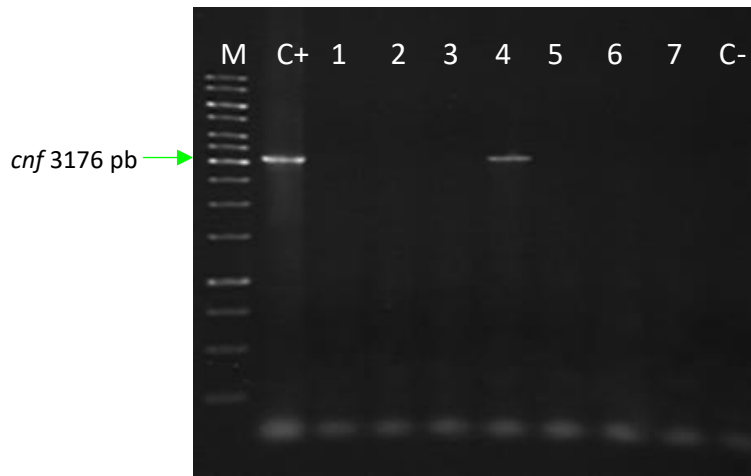
Este análisis se realizó a partir de tres PCRm estandarizados previamente en el grupo de trabajo.

En la PCRm1 se amplifican los genes *fimH* (210 pb), *fliC* (304 pb), *satA* (384 pb) e *iucD* (512 pb). En la PCRm2 se amplifican los genes *iha* (150 pb), *vatP* (226 pb), *vatA* (330 pb), *papGIII* (421 pb) y *papGII* (562 pb). En la PCRm3 se amplifican los genes *papA* (641 pb), *satP* (880 pb) y *hlyA* (1280 pb). Para el gen *cnf* (3176 pb) se realizó PCR individual. En la los paneles A-C de la figura 8 se muestran geles representativos de estas PCRm. Y en la figura 9 se muestra un gel representativo de la PCR individual para la determinación del gen *cnf*.



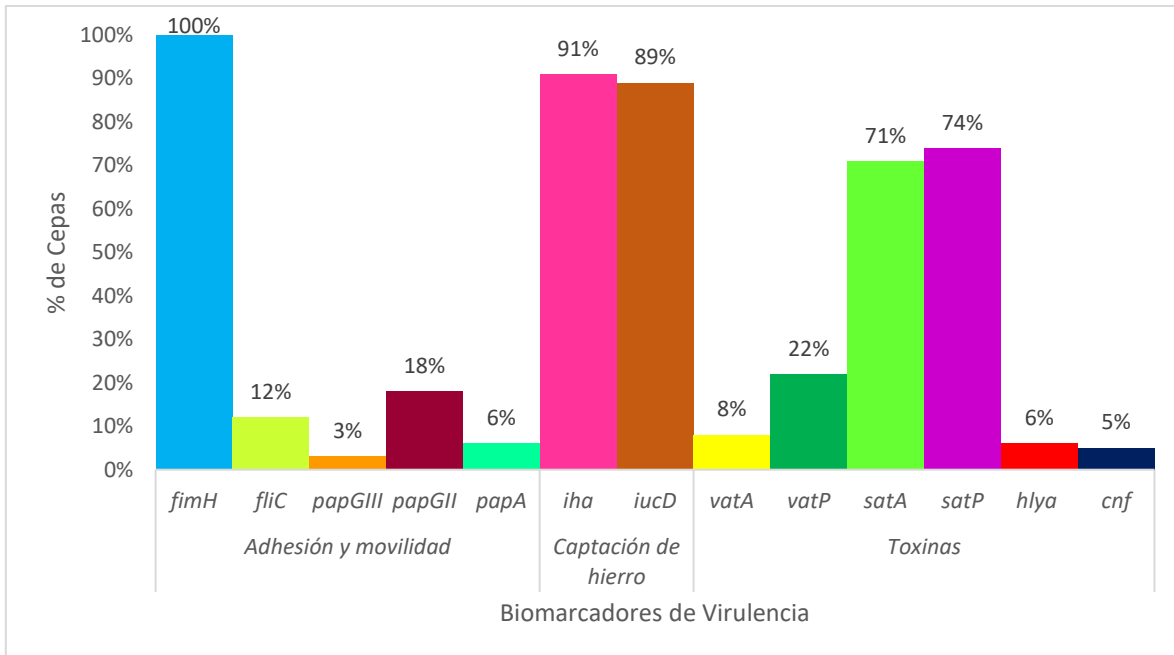
**Figura 8. Resultados de la determinación por PCRm de genes de virulencia en cepas de *E. coli* de serotipo O25:H4 y O24:H<sup>-</sup> aisladas de ITU. Los productos de cada PCRm se resolvieron por electroforesis en gel de agarosa al 1%. **Panel A. PCRm1** M:100 pb Plus DNA Ladder; C+: *E. coli* CFT073; carril 1: 56U; carril 2: 63U; carril 3: 73U; carril 4: 168U; carril 5: CR67. Carril 6: CR161; Carril 7: CR213; Carril 8: CR240; Carril 9: CR245; Carril 10: 28bl; Carril 11: 95l; Carril 12: 6U; Carril C-: Muestra sin ADN. **Panel B. PCRm2.** M:100 pb Plus DNA Ladder; C+: CFT073+059l; carril 1: CR04; carril 2: CR07; carril 3: CR14; carril 4: CR15; carril 5: CR19. Carril 6: CR22; Carril 7: CR33; Carril 8: CR35; Carril 9: CR50; Carril 10: CR51; Carril 11: CR52; Carril 12: CR53; Carril 13: CR59; Carril 14: CR69; Carril 15: CR70; Carril 16: CR72; Carril 17: CR93 Carril C-: Muestra sin ADN. **Panel C. PCRm3.** M:100 pb Plus DNA Ladder; C+: GAG1; carril 1: CR117; carril 2: CR122; carril 3: CR141; carril 4: CR150; carril 5: CR152; Carril 6: CR153; Carril 7: CR156; Carril 8: CR159; Carril 9: CR162; Carril 10: CR182; Carril 11: CR185; Carril 12: CR192; Carril 13: CR193; Carril C-: Muestra sin ADN.**





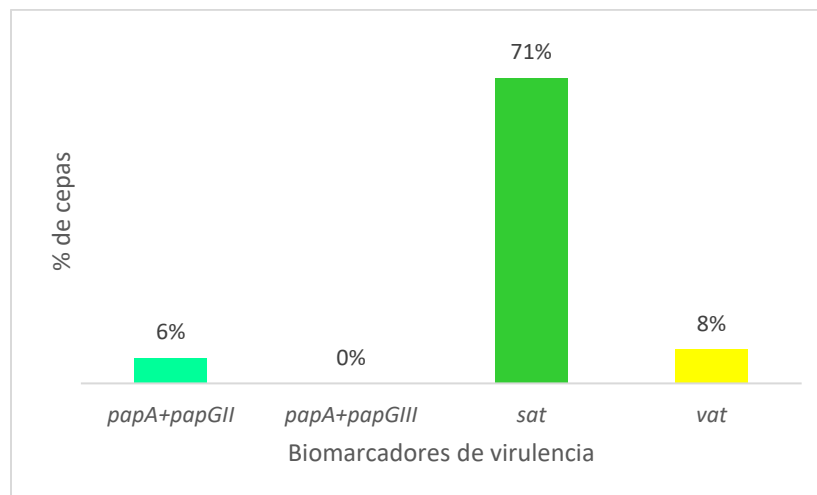
**Figura 9. Resultados de la determinación por PCR individual del gen *cnf* en cepas de *E. coli* de serotipo O25:H4 y O24:H<sup>-</sup> aisladas de ITU. El producto se resolvió por electroforesis en gel de agarosa al 1%. M: 1 kb DNA Ladder; C+: *E.coli* GAG1; carril 1: CR141; carril 2: CR150; carril 3: CR152; carril 4: CR153; carril 5: CR156. carril 6: CR159; carril 7: CR162; Carril C-: Muestra sin ADN.**

Después de realizar el registro de los resultados obtenidos se calculó el porcentaje de cepas de *E. coli* que presentaron cada uno de estos biomarcadores de virulencia y se graficó. Se encontró que el biomarcador de virulencia predominante en estas cepas fue el gen *fimH* que codifica la adhesina de la fimbria tipo I, encontrado en el 100% de las cepas; seguido de los genes involucrados en la captación de hierro *iha* e *iucD*, presentes en el 91% y 89% respectivamente; y el gen de la toxina *sat* presente en el 71% de las cepas. En menor porcentaje se encontraron los genes del pili P *papA* en el 6%, los alelos *papGII* y *papGIII* en el 18% y 3%; el gen de flagelo *fliC* en el 12% y las toxinas *vat*, *hlyA* y *cnf* en el 8%, 6% y 5% respectivamente (Gráfica 3).



**Grafica 3. Porcentaje de detección de biomarcadores de virulencia de *E. coli* uropatógena en 65 cepas de *E. coli* de serotipos O25:H4 y O25:H<sup>-</sup>.** En la gráfica se muestran los porcentajes en los que se encontraron los biomarcadores analizados. *fimH*: adhesina de pili tipo 1, *fliC*: adhesina flagelar, *papGIII* y *papGII*: alelos de adhesina del pili Pap *papA*: pili P, *ihA*: receptor de enterobactina/adhesina, *iucD*: aerobactina, *vat*: toxina autotransportadora vacuolizante, *sat*: toxina autotransportadora secretada, *hlyA*: hemolisina, *cnf*: factor necrotizante citotóxico 1. Los genes son graficados de acuerdo al papel que desempeñan en el proceso patogénico.

Una vez obtenida la prevalencia de cada uno de los genes anteriores, se graficó la prevalencia de los genes completos *papA*, *satA* y *satP* los resultados se muestran en la gráfica 4



**Gráfica 4. Porcentaje de detección de genes completos *pap*, *sat* y *vat* en las 65 cepas de *E. coli* uropatógena en 65 cepas de *E. coli* de serotipos O25:H4 y O25:H<sup>-</sup>.** En la gráfica se muestran los porcentajes en los que se encontró el gen *pap* en combinación con los genes que codifican los dos alelos de la adhesina PapG que fueron analizados, además de los genes completos *sat* y *vat*.

Posteriormente se analizaron las combinaciones de genes presentes en cada cepa, se encontraron 20 combinaciones, siete fueron las más frecuentes en las cepas de UPEC O25 analizadas (tabla 7).

**Tabla 7.** Combinaciones frecuentes de genes encontradas en las cepas de *E. coli* uropatógena de serotipo O25:H4 y O25:H.

Combinación de genes						
Adhesión y movilidad		Toxinas		Captación de hierro		Frecuencia
<i>fimH</i>		<i>sat</i>		<i>iucD</i>	<i>ihA</i>	49% (n=32)
<i>fimH</i>				<i>iucD</i>		17% (n=6)
<i>fimH</i>	<i>fliC</i>	<i>sat</i>		<i>iucD</i>	<i>ihA</i>	6% (n=4)
<i>fimH</i>	<i>fliC</i>			<i>iucD</i>		3% (n=2)
<i>fimH</i>		<i>sat</i>	<i>vat</i>	<i>iucD</i>	<i>ihA</i>	3% (n=2)
<i>fimH</i>				<i>iucD</i>	<i>ihA</i>	3% (n=2)

Con los resultados del análisis filogenético y la prevalencia de los factores de virulencia se realizó un análisis de los genes presentes en cada uno de los filogrupos encontrados, el cual indica que las cepas que pertenecen al grupo filogenético A solo presentaron dos genes de virulencia *fimH* e *iucD*; las cepas del filogrupo C presentaron tres genes *fimH*, *iucD* e *ihA*; mientras que las cepas del filogrupo B2 presentaron diversas combinaciones que incluyen todos los genes analizados, estos resultados se observan en la tabla 8.

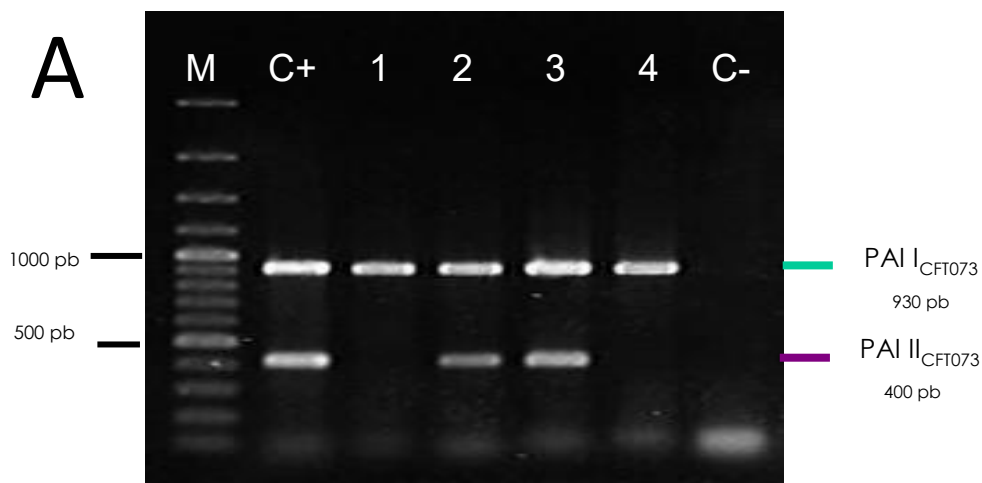
**Tabla 8.** Análisis de los genes de virulencia encontrados en cada uno de los grupos filogenéticos identificados en las cepas de *E. coli* uropatógena de serotipo O25:H4 y O25:H.

Distribución de genes de virulencia		Grupo filogenético			
		A (n=2)	C (n=3)	B2 (n= 60)	Total de cepas
Adhesión y movilidad	<i>fimH</i>	100% (n=2)	100% (n=3)	100% (n=60)	100% (n=65)
	<i>fliC</i>	-	-	13% (n=8)	12% (n=8)
	<i>pap</i>	-	-	7% (n=4)	6% (n=4)
Captación de hierro	<i>ihA</i>	-	33% (n=1)	97% (n=58)	91% (n=59)
	<i>iucD</i>	50% (n=1)	100% (n=3)	90% (n=54)	89% (n=58)
	<i>vat</i>	-	-	7% (n=4)	8% (n=4)

<b>Toxinas</b>	<i>sat</i>	-	-	72% (n=43)	71% (43)
	<i>hlyA</i>	-	-	7% (n=4)	6% (n=4)
	<i>cnf</i>	-	-	5% (n=3)	5% (n=3)

### Determinación de Islas de Patogenicidad

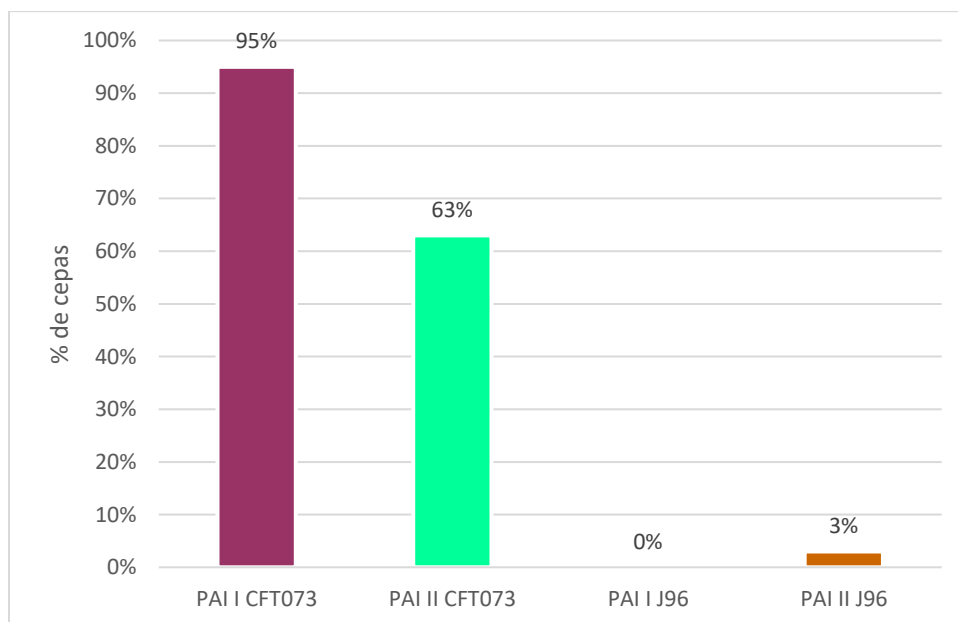
Se analizó en las 65 cepas de *E. coli* de serogrupo O25, la presencia de cuatro islas de patogenicidad, utilizando *E. coli* CFT073 y *E. coli* J96 como controles, las cuales son cepas prototipo de UPEC; para lo cual se siguió el procedimiento descrito por Sabaté, 2006. Cabe mencionar que en este trabajo no se analizaron todas las PAIs descritas para UPEC, solo fueron analizadas cuatro, dos presentes en *E. coli* CFT073 (PAI I<sub>CFT073</sub> y PAI II<sub>CFT073</sub>) y las otras dos en *E. coli* J96 (PAI I<sub>J96</sub> y PAI II<sub>J96</sub>). El análisis fue realizado a partir de PCR individual, y los productos de las PAIs de *E. coli* CFT073 y de las cepas problema fueron corridos en un mismo gel, para visualizarlos juntos, de igual manera se procedió con los productos de las PAIs de *E. coli* J96 y de las cepas problema (figura 10, Panel A y B respectivamente).





**Figura 10. Determinación de PAIs en cepas de UPEC de serotipo O25:H4 y O25:H<sup>-</sup> aisladas de ITU. Electroforesis en gel de agarosa representativo de la determinación de PAIs. Panel A PAIs I y II<sub>CFT073</sub>: carril M: 1 kb DNA Ladder; carril C+: *E. coli* CFT073; carril 1: CR152 carril 2: CR153; carril 3: CR156; carril 4: CR159; carril 5: CR162. Panel B PAIs I y II<sub>J96</sub>: carril M: 1Kb DNA Ladder; carril C+: *E. coli* J96; carril 1: CR50 carril 2: CR51; carril 3: CR52; carril 4: CR53; carril 5: CR70; carril C-: Mezcla sin ADN.**

El porcentaje en el que se encontraron las diferentes PAIs entre las cepas de UPEC O25 analizadas se muestra en la Gráfica X; se encontró que la PAI I<sub>CFT073</sub> fue la más predominante entre las cepas analizadas, con un 95% de las cepas, seguida de la PAI II<sub>CFT073</sub> presente en el 63% de las cepas. La PAI I<sub>J96</sub> no se encontró en ninguna cepa y la PAI II<sub>J96</sub> se encontró en el 3% de éstas (Gráfica 5).

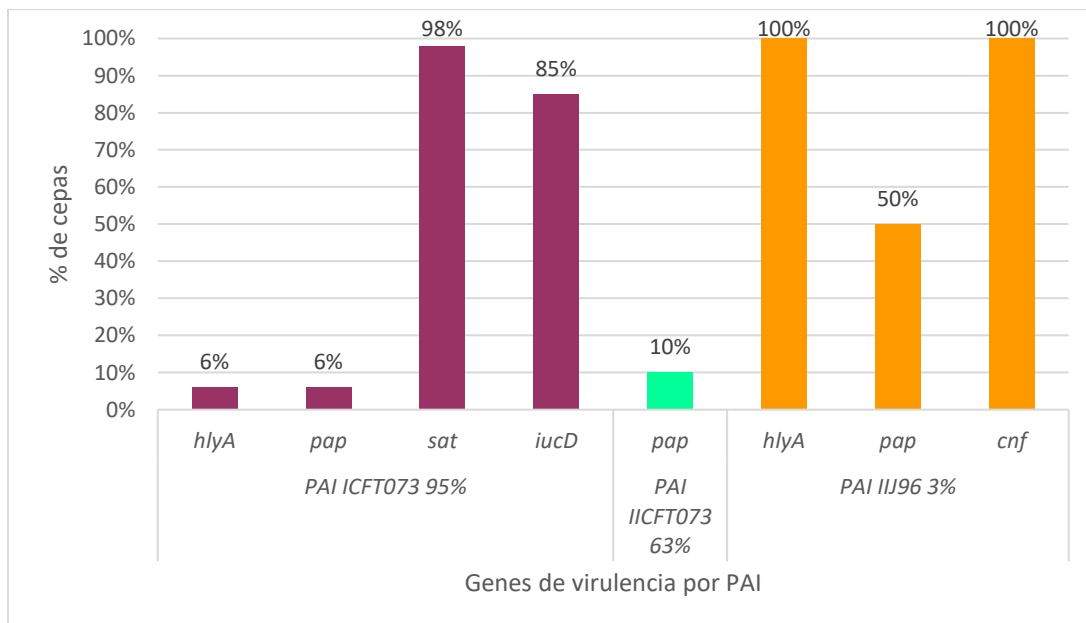


**Gráfica 5. Determinación de PAIS en cepas de UPEC O25.** La gráfica muestra el porcentaje de cepas que poseen las islas de patogenidad analizadas.

Después de identificar las PAIs se realizó un análisis de los genes que contiene cada una de estas islas reportados por Sabaté *et.al.*, en el 2006; identificando algunos de éstos en las cepas de UPEC O25, los resultados se muestran en la tabla 9 y en la gráfica 6.

**Tabla 9. Genes de virulencia reportados en las PAIs de las cepas prototipo de UPEC CFT073 y J96.**

PAI	Genes
I <sub>CFT073</sub>	<i>hlyA</i> , operón <i>pap</i> , <i>sat</i> , <i>lutA</i> , <i>iucDCBA</i> , precursor del antígeno 43, <i>kpsTM</i>
II <sub>CFT073</sub>	Operón <i>pap</i>
I <sub>J96</sub>	<i>hlyA</i> , operón <i>pap</i>
II <sub>J96</sub>	<i>hlyA</i> , operón <i>pap</i> , <i>cnf</i>



**Gráfica 6. Análisis de algunos de los genes presentes en las PAIs, determinados en este trabajo, en las cepas de UPEC de serotipo O25:H4 y O25:H<sup>-</sup> aisladas de ITU.**

### Análisis del perfil plasmídico

Se realizó extracción de ADN plasmídico a cada cepa a partir de lisis alcalina, como se menciona en la metodología y se realizó el corrimiento electroforético de cada muestra, en un gel de agarosa al 0.7%.

Para poder analizar los perfiles plasmídicos se examinaron detalladamente las bandas producto del corrimiento electroforético, con la finalidad de determinar cuáles indican la presencia de un plásmido. Esto debido a que las moléculas de ADN plasmídico pueden tener diferentes conformaciones, que se podrían observar en la figura 11:

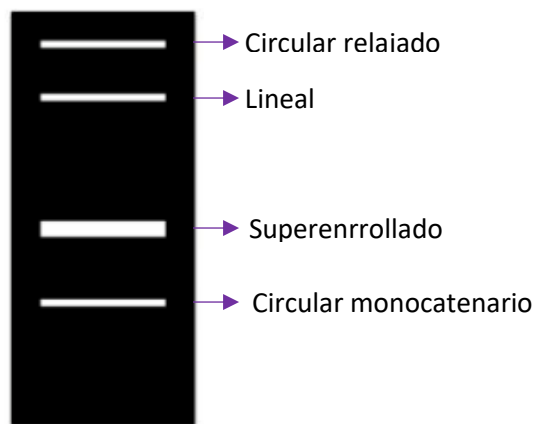


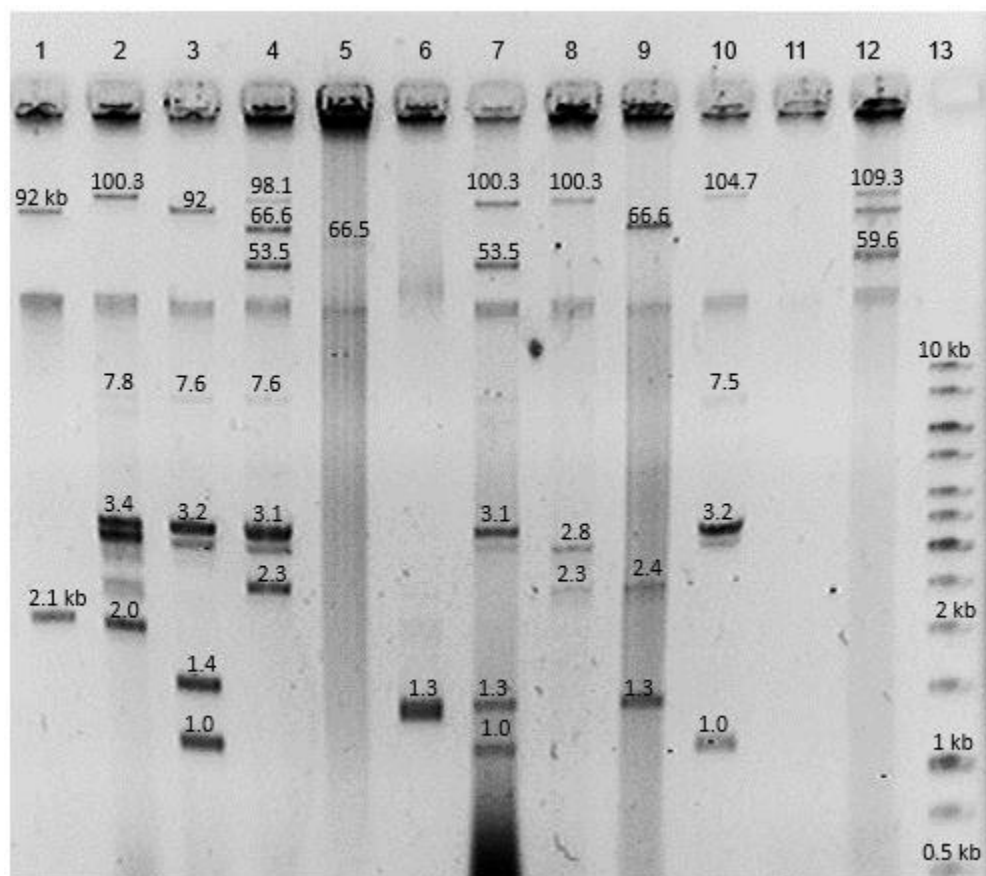
Figura 11. Esquema representativo de las diferentes conformaciones de ADN plasmídico que pueden encontrarse en un corrimiento electroforético (Tirabassi, 2014)

Los plásmidos superenrollados son la conformación nativa del ADN plasmídico, así se encuentran *in vivo*, y se produce cuando giros adicionales se introducen a la cadena de doble hélice, esta tensión superhelicoidal no puede ser relajada porque los extremos del plásmido se unen entre sí. El **ADN superenrollado** migran más rápido en un gel de agarosa, debido a su conformación. El **ADN circular relajado** se encuentra en esta conformación debido a la acción de las topoisomerasas, que hacen una hendidura en una de las cadenas del ADN y relajan la tensión superhelicoidal, el ADN en esta conformación es el más lento en migrar. El **ADN lineal** se produce cuando ambas cadenas de la hélice de ADN son cortadas en el mismo lugar, este tipo de ADN regularmente migra entre el ADN circular relajado y el superenrollado, sin embargo si se obtiene ADN lineal cuando se está buscando

ADN superenrollado, es posible que exista contaminación por nucleasas o a una mala purificación. Durante la purificación de plásmidos a partir de lisis alcalina, éstos se desnaturalizan, debido a que los enlaces de hidrogeno son afectados por las condiciones alcalinas, sin embargo las cadenas de ADN circular covalentemente cerrado permanecen intactas y cuando el pH se vuelve neutro nuevamente se restauran los puentes de hidrógeno y se forma nuevamente el ADN superenrollado. Sin embargo si la etapa de lisis alcalina fue muy extrema el ADN se desnaturaliza permanentemente, dando lugar al **ADN circular monocatenario**, que migra por delante de todas las demás formas de plásmidos en el gel de agarosa (Kieser, 1984).

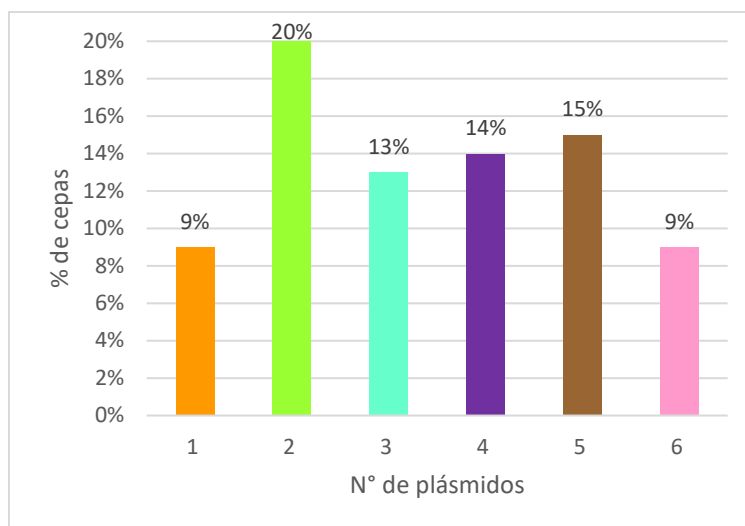
Una vez que se identificaron en el gel las bandas que representan plásmidos se realizó un análisis con el programa LabWorks, para conocer el tamaño relativo de los plásmidos encontrados, se utilizó la extracción de ADN plasmídico de una cepa control EHEC de serotipo O157:H7, como marcador de peso molecular para plásmidos grandes, ya que esta cepa posee un plásmido de 92 kb, y para conocer el tamaño de los plásmidos pequeños se utilizó el marcador de peso molecular 1kb DNA Ladder.





**Figura 12. Análisis del perfil plasmídico de cepas de UPEC de serotipo O25:H4 y O24:H<sup>-</sup> aisladas de ITU.** En la imagen se muestra el corrimiento electroforético en gel de agarosa al 0.7% de las extracciones de ADN plasmídico. Carril 1: EHEC O157; carril 2: CR67; carril 3: CR162; carril 4: CR213; carril 5: CR240. Carril 6: CR245; Carril 7: 028bl; Carril 8: 95l; Carril 9: 6U; Carril 10: 63U; Carril 11: 73U; Carril 12: 168; Carril 12: 1 kb DNA Ladder.

Se encontró que el 80% (n=52) de las cepas presentaron plásmidos, mientras que el 20% (n=13) no tiene ningún plásmido, las cepas tienen de 1 a 7 plásmidos, y los tamaños relativos van de 0.85 kB a 127 Kb (Gráfica 7).



**Gráfica 7. Número de plásmidos encontrados en las cepas de UPEC O25.** El 20% de las cepas tuvieron dos plásmidos, mientras que el 9% tuvo 1 o 6 plásmidos.

Los tamaños más frecuentes de los plásmidos encontrados se muestran resaltados en negritas en la tabla 10. En la tabla se observa que los tamaños de plásmidos más frecuentes entre las cepas son los de 100 kb, 50-70 kb, 3 kb, 2 kb, y predominan los de 1 kb.

**Tabla 10. Tamaños de los plásmidos encontrados en las cepas de UPEC de serotipo O25:H4 y O24:H aisladas de ITU.**

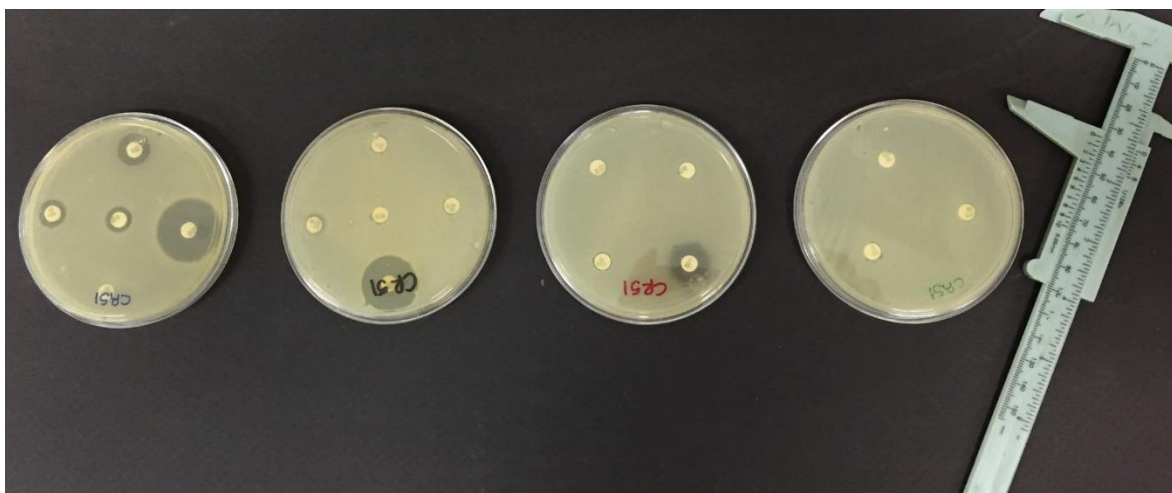
Tamaño	N° de plásmidos
<b>100 kb</b>	<b>20</b>
90 kb	6
<b>50-70 kb</b>	<b>16</b>
8 kb	1
7 kb	3
5 kb	2
4 kb	7
<b>3 kb</b>	<b>35</b>
<b>2 kb</b>	<b>33</b>
<b>1 kb</b>	<b>50</b>

### **Análisis del perfil de susceptibilidad a antibióticos y determinación de la producción de $\beta$ -lactamasas de espectro extendido.**

Fueron determinados los perfiles de susceptibilidad a 17 antibióticos de 6 familias diferentes, mediante el método de Kirby-Bauer, descrito en material y métodos:

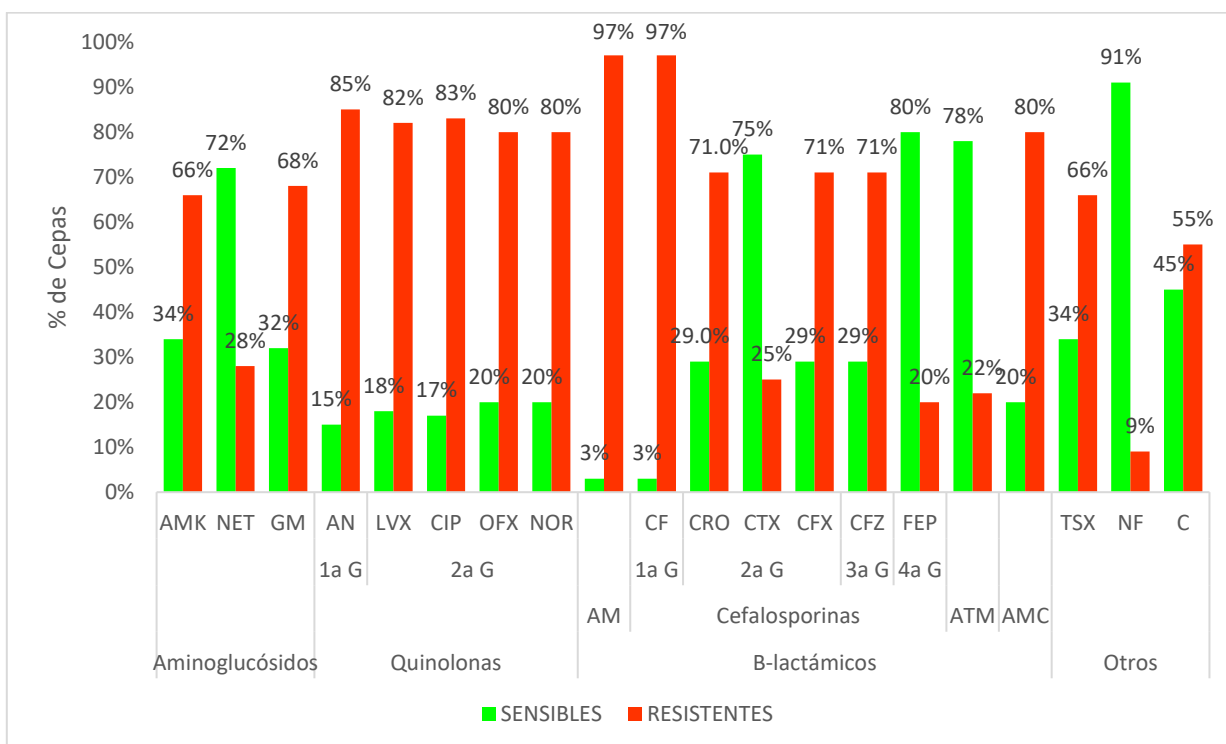
1. **Aminoglucósidos:** Amikacina, Netilmicina y Gentamicina
2. **Quinolonas:** Ácido nalidíxico, Levofloxacin, Ciprofloxacino, Ofloxacin y Norfloxacina
3.  **$\beta$ -lactámicos:** Ampicilina, Cefalotina (cefalosporina 1<sup>a</sup> generación), Ceftriaxona (cefalosporina 2<sup>a</sup> generación), Cefotaxima (cefalosporina 2<sup>a</sup> generación), Cefuroxima (cefalosporina 2<sup>a</sup> generación) y Ceftazidima (cefalosporina 3<sup>a</sup> generación)
4. Trimetoprim-Sulfametoxazol
5. Nitrofurantoina
6. Cloranfenicol

Para realizar esta prueba se utilizaron cuatro placas de agar Mueller-Hinton, cada una con una distribución específica de los sensidiscos, dependiendo del posible tamaño de los halos de inhibición establecidos en el CLSI, 2015, como se muestra en la figura 13. Para este trabajo se consideraron las cepas intermedias (I) como resistentes (R)



**Figura 13. Fotografía representativa de los antibiogramas realizados por el método Kirby-Bauer a las cepas de UPEC de serotipo O25:H4 y O25:H<sup>-</sup> aisladas de ITU (ver material y métodos).**

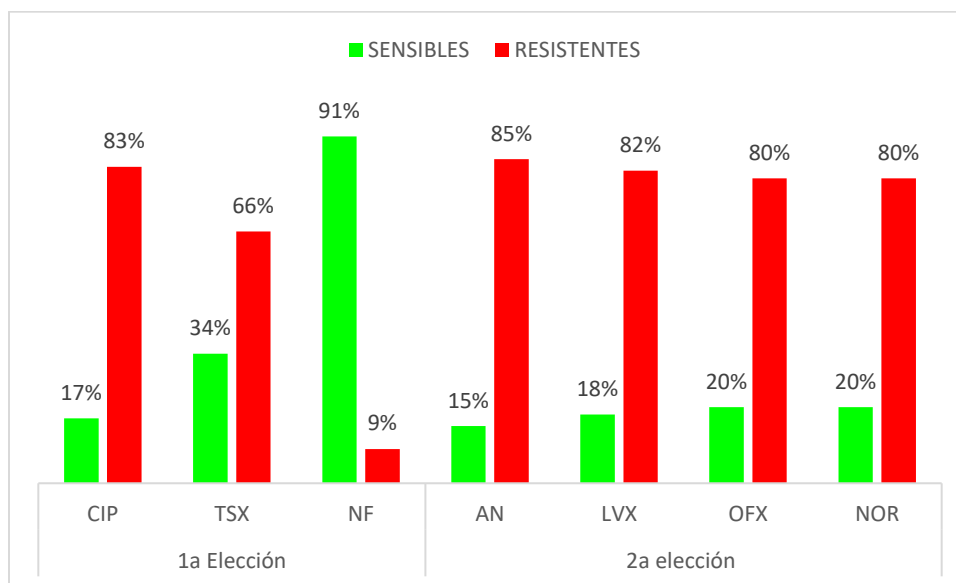
Se encontró que el 97% de las cepas de UPEC de serogrupo O25 son resistentes a ampicilina y a cefalotina, seguido de un alto porcentaje de cepas resistentes a quinolonas, tanto de primera como de segunda generación ácido nalidíxico 85%, ciprofloxacina 83%, levofloxacina 82% ofloxacina y norfloxacina 80%. Las cepas fueron mayormente sensibles a nitrofurantoina 91%, cefotaxima 75% y netilmicina 72%. El resultado de los perfiles de susceptibilidad a los 17 antibióticos probados se muestra en la gráfica 8.



**Gráfica 8. Perfil de susceptibilidad y Resistencia antibiótica de cepas de UPEC de serotipos O25:H4 y O25:H- aisladas de ITU.** En la gráfica se muestran los porcentajes de sensibilidad (verde) y resistencia (rojo) a diferentes antibióticos probados divididos por familias. AMK: Amikacina, NET: Netilmicina, GM: Gentamicina, AN: Ácido nalidíxico, LEV: Levofloxacina, CIP: Ciprofloxacino, OFX: Ofloxacina, NOR: Norfloxacina, AM: Ampicilina, CF: Cefalotina, CRO: Ceftriaxona, CTX: Cefotaxima, CFX: Cefuroxima, CFZ: Cefotaxidima, TSX: Trimetroprim-Sulfametoxazol, NF: Nitrofurantoina, C: Cloranfenicol

De acuerdo a los fármacos de primera elección, se encontró que la nitrofurantoina tuvo un menor porcentaje de cepas resistentes con un 9%, sin embargo el porcentaje de resistencia a ciprofloxacino 83% fue alto así como a trimetroprim-sulfametoxazol 66%. En cuanto a los antibióticos de segunda elección se encontró

un índice de resistencia muy similar, ácido nalidíxico 85%, levofloxacina 82%, ofloxacina 80% y norfloxacina 80% (Gráfica 9).



**Gráfica 9. Perfiles de Susceptibilidad y Resistencia a antibióticos de primera y segunda elección para el tratamiento de UTI, establecido por la secretaría de Salud (Referencia), de cepas de UPEC de serotipos O25:H4 y O25:H<sup>-</sup> aisladas de ITU.** CIP: Ciprofloxacino, TSX: Trimetoprim-Sulfametoxazol, NF: Nitrofurantoina, AN: Ácido nalidíxico, LEV: Levofloxacina, OFX: Ofloxacina, NOR: Norfloxacina. En la parte inferior de la gráfica separados por una línea los antibióticos de primera y segunda elección.

Tomando en cuenta que las bacterias pueden ser resistentes a múltiples familias de antibióticos, las cepas de UPEC de serotipos O25:H4 y O25:H<sup>-</sup> aisladas de ITU, fueron clasificadas de acuerdo a los criterios de MDR establecidos en el trabajo de Magiorakos y cols. 2012, de la siguiente forma

- Se considera MDR a una cepa si es  $R \geq 3$  categorías de antibióticos
- Se considera XDR a una cepa si es  $S \leq 2$  categorías de antibióticos
- Se considera PDR a una cepa si es  $R =$  todas las categorías de antibióticos

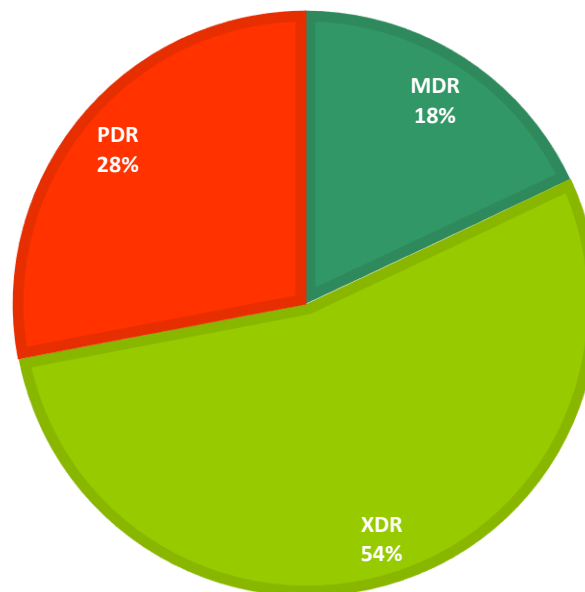
Las categorías de antibióticos se han definido a partir de la relevancia terapéutica de las mismas, y para hacer este análisis se tomaron en cuenta las categorías para la familia de bacterias *Enterobacteriaceae*.

Los 17 antibióticos utilizados en este trabajo se clasificaron en siete categorías, como se muestra en la Tabla 11.

**Tabla 11.** Clasificación por categorías de los 17 antibióticos probados en las cepas de UPEC de serotipos O25:H4 y O25:H<sup>-</sup> aisladas de ITU de acuerdo a Magiorakos et. al., 2012. C= categoría

Aminoglucósidos			Quinol	Fluoroquinolonas				Otros			B-lactámicos					
C1			C2	C3				C4	C5	C6	C7					
AMK	NET	GM	1ra G	2a G				TSX	NF	C	AM	Cefalosporinas				
			AN	LVX	CIP	OFX	NOR					1ra G	2a G	3a G		
												CF	CRO	CTX	CFX	CFZ

Se encontró que el 54% de las cepas fue XDR, esto indica que este porcentaje de cepas fue resistente a cinco o seis de las categorías establecidas; el 28% de las cepas fue PDR, lo cual indica que estas cepas son resistentes a las siete categorías usadas y el 18% de las cepas fue MDR, esto indica que estas cepas fueron resistentes a tres o cuatro categorías, estos resultados se muestran en la gráfica 10.



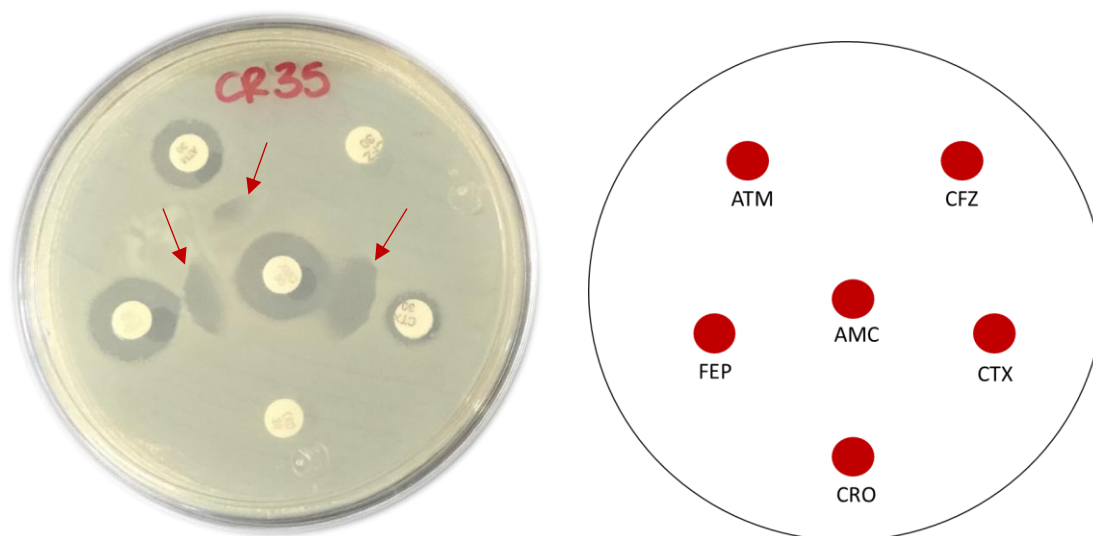
**Gráfica 10.** Porcentaje de cepas de UPEC de serotipos O25:H4 y O25:H<sup>-</sup>, clasificadas en MDR, XDR y PDR a partir de los criterios de (Magiorakos et al., 2012). La gráfica muestra el porcentaje de cepas que pertenecen a cada categoría de multidrogo-resistencia.

Se realizó también un análisis de los patrones de resistencia o resistotipos de cada una de las cepas de UPEC O25, con la finalidad de saber si se presentan patrones frecuentes en estas cepas, se encontraron 57 resistotipos diferentes, cinco los más frecuentes (Tabla 12).

**Tabla 12.** Patrones de resistencia frecuentes encontrados en las cepas de *E. coli* uropatógena de serotipo O25:H4 y O25:H.

Patrones																	
Aminoglucósidos			Quinolonas						Otros		β-lactámicos						Frecuencia
											Cefalosporinas						
											1ª G		2ª G		4ª G		
AMK		GM	AN	LVX	CIP	OFX	NOR	TSX	C	AM	CF	CRO		CFX	CFZ	4 cepas	
AMK	NET	GM	AN	LVX	CIP	OFX	NOR		C	AM	CF	CRO	CTX	CFX	CFZ	3 cepas	
AMK		GM	AN	LVX	CIP	OFX	NOR		C	AM	CF	CRO	CTX	CFX	CFZ	2 cepas	
AMK		GM	AN	LVX	CIP	OFX	NOR			AM	CF	CRO		CFX	CFZ	2 cepas	
AMK			AN	LVX	CIP	OFX	NOR	TSX		AM	CF			CFX		2 cepas	

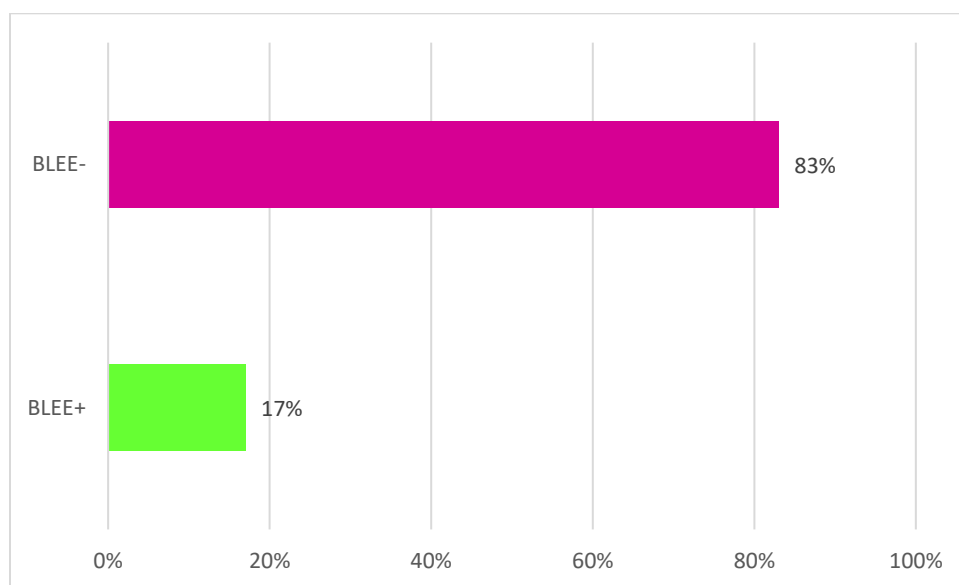
Simultáneamente a la determinación de los perfiles de susceptibilidad a antibiótica, se determinó la producción de β-lactamasas de espectro extendido, esto mediante la prueba de sinergia de doble disco, como se explica en material y métodos. Para determinar si la cepa es productora de BLEE se analiza si se forma una estructura en forma de cola de pescado entre el disco central de Amoxicilina/Ácido clavulánico y alguno de los discos periféricos de Cefotaxima, Cefuroxima, Ceftazidima, Aztreonam o Cefepime, como se muestra en la figura 14.



**Figura 14.** Determinación de la producción de BLEE en cepas de *E. coli* uropatógena de serotipo O25:H4 y O25:H<sup>-</sup> aisladas de ITU mediante la prueba de difusión de doble disco. En

la imagen de la derecha se muestra el esquema que se siguió para colocar los discos de antibióticos. En la imagen de la izquierda se muestra la prueba realizada a UPEC O25:H4 cepa CR35, se observan tres estructuras en forma de cola de pescado (flechas), lo cual indica que hay sinergia entre el disco de AMC (amoxicilina-ac. Clavulanico), CTX (cefotaxima), FEP (cefepime) y ATM (aztreonam).

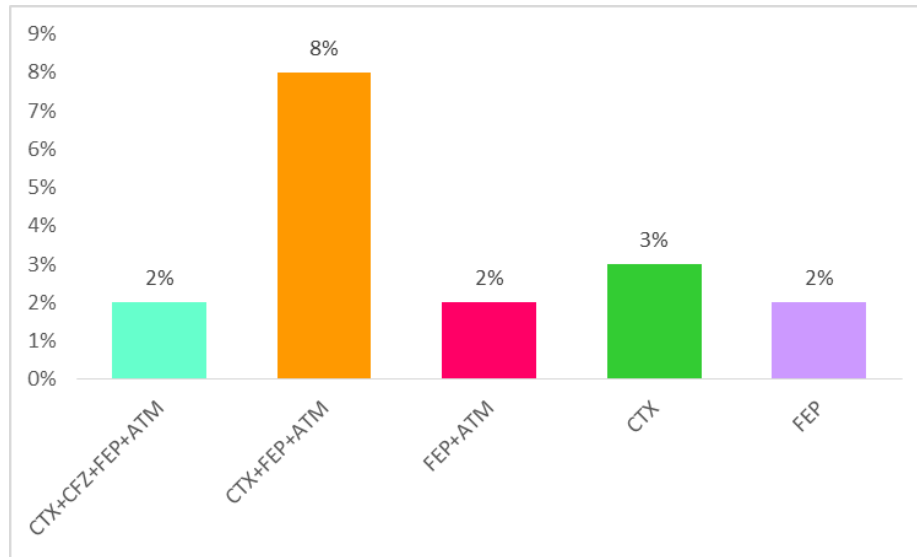
Se encontró que el 17% de las cepas son productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido, mientras que el 83% no producen estas enzimas (Gráfica 11).



**Gráfica 11. Porcentaje de cepas de UPEC de serotipos O25:H4 y O25:H+, que producen BLEE.**

Del 17% de las cepas que son productoras de BLEE en el 8% se encontró sinergia con CTX, FEP y ATM; el 3% presentó sinergia con CTX, y 2% presentó sinergia con CTX, CFZ, FEP y ATM; 2% presentó sinergia con FEP y ATM; 2% presentó sinergia con FEP. Estos resultados se muestran en la gráfica 12





**Gráfica 12. Perfiles de sustrato encontrados en las de cepas de UPEC de serotipo serotipos O25:H4 y O25:H- que producen BLEE.**

### **Análisis estadístico de correlación entre Factores de Virulencia-Resistencia a antibióticos y Factores de Virulencia-Plásmidos**

Para realizar este análisis se utilizó el coeficiente de correlación lineal de Pearson, el cual está pensado para variables cuantitativas, es un índice que mide el grado de covariación entre distintas variables relacionadas linealmente.

Para esta prueba se analizó la forma en que fueron capturados los datos, debido a que las pruebas que fueron realizadas para obtener la comprobación o refutación de la hipótesis planteada dependen del tipo de distribución que éstos datos sigan. Se espera que los datos se distribuyan de manera normal debido a que las muestras se tomaron de forma aleatoria de una población de 65 muestras, por lo cual se analizó mediante la prueba Anderson–Darling la normalidad de las muestras. (Ver gráficas en sección i de Anexos).

Con el coeficiente de correlación lineal de Pearson se encontró que existe una correlación positiva entre la resistencia a antibióticos y el número de factores de virulencia, que indica que a mayor número de antibióticos a los que resiste la muestra aumenta el número de factores de virulencia que se encuentren en cada muestra. A continuación de muestran los valores obtenidos

$r = 0.362$

P-value = 0.003

En cuanto al análisis de factores de virulencia-plásmidos, se encontró una correlación positiva, que en este caso indica que a mayor número de plásmidos observados también aumenta el número de factores de virulencia que se encuentren en cada muestra. Sin embargo en este caso es difícil concluir una correlación en donde ambos aumenten de manera evidente debido a que el coeficiente “r” es muy cercano a cero, es decir se tiene la prueba de una correlación, pero se deben tener más consideraciones así como obtener más datos, para poder realizar una predicción mediante un modelo lineal más preciso. A continuación se muestran los valores obtenidos.

$r = 0.192$

P-value = 0.0126

Se analizó también si existe una correlación entre la resistencia a antibióticos-plásmidos, encontrándose una correlación positiva que indica que, en las muestras se observarán mayor número de plásmidos cuando éstas sean resistentes a un mayor número de antibióticos (puede hacerse una interpretación inversa, “a mayor número de antibióticos a los que se es resistente, habrá un mayor número de plásmidos en la muestra”). A continuación se muestran los valores obtenidos.

$r = .212$

P- Value = .090

## Discusión

Los resultados de este estudio muestran que el serogrupo predominante de los tres ceparios que se tienen en el Laboratorio de Biología Molecular de Enteropatógenos es el O25, perteneciendo a éste el 11.6% de las cepas, este resultado es menor a los reportados previamente en trabajos como el de Molina y colaboradores, realizado en un hospital de la ciudad de México, en el que se aislaron 119 cepas de *Escherichia coli* de pacientes ambulatorios, diagnosticados con ITU, de las cuales el 21.2% fueron de serogrupo O25; el de Momtaz et.al., (2013) en el cual analizaron 123 cepas de *E. coli* aisladas de pacientes cursando con ITU, hospitalizados y ambulatorios en el hospital Baqiyatallah en Tehran, Iran, encontrando que el 26.01% pertenecen al serogrupo O25; el de Cheng et. al., (2015) en donde analizaron 111 cepas de *Escherichia coli* aisladas de niños cursando con ITU, de las cuales el 65% fueron O25; y el de Issazadeh y colaboradores (2015) en donde analizaron 110 cepas de *E. coli* aisladas de hombres y mujeres con síntomas de ITU, en un hospital al norte de Iran, encontrando que el 39.1% de éstas pertenecen al serogrupo O25 (Molina-López et al., 2011, Momtaz et al., 2013, Cheng et al., 2015, Issazadeh et al., 2015).

Las cepas que pertenecen al grupo clonal O25b:H4 ST131 se han reportado dentro del grupo filogenético B2 (Johnson et al., 2012, Novais et al., 2012). En este estudio hubo una prevalencia de cepas B2 92% (n=60), lo cual concuerda con la mayoría de los reportes, que indican que las cepas UPEC causantes de ITU pertenecen a este grupo (Navidinia et al., 2014, Lee et al., 2016), sin embargo también se encontró un pequeño porcentaje de cepas que pertenecen a los grupos A 3% (n=2) y C 5% (n=3), a pesar de que estas cepas pertenecen a filogrupos comensales, fueron positivas en la confirmación molecular del serogrupo O25, pero presentan la característica de los grupos comensales, presentan pocos factores de virulencia y una alta tasa de resistencia a antimicrobianos, lo cual concuerda con los estudios previos (Jauréguy et al., 2007). Encontrar cepas de grupo filogenético A, soporta la teoría de que las *E. coli* comensales tienen un rol como reservorio de genes que codifican resistencia a antimicrobianos y determinantes de virulencia (Picard et al.,

1999, Lay *et al.*, 2012). A partir de este resultado se propone la re-serotipificación en suero, para corroborar las cepas A y C.

Los factores de virulencia principalmente reportados en las cepas UPEC son adhesinas, toxinas y sistemas de captación de hierro, que son necesarios para vencer las defensas del hospedero (Jauréguy *et al.*, 2007, Tarchouna *et al.*, 2013); lo cual concuerda con los resultados obtenidos en este estudio, en donde encontramos el gen *fimH*, que codifica la fimbria tipo 1 en el 100% (n=65) de las cepas, esto concuerda con la información reportada por Lee *et al.*, en el 2016, en donde analizaron 58 cepas de UPEC y el 100% tuvo *fimH*. El gen *ihA*, que codifica una adhesina/receptor de enterobactina en el 91% (n=59), este resultado fue mayor a lo reportado en trabajos como el de Abe *et al.*, en el 2008 en el cual analizaron 225 cepas de UPEC, encontrando *ihA* en el 40.4% de las cepas (Abe *et al.*, 2008) y el de Hagan *et al.*, en el 2007, en donde analizaron la presencia de el gen *ihA* en 55 cepas UPEC, encontrándolo en el 45% de éstas (Hagan *et al.*, 2007). El gen *iucD* fue el tercero más prevalente, encontrado en el 89% (n=58), este resultado fue menor que lo reportado en trabajos como el de Rijavec *et al.*, en el 2008 en el cual analizaron 105 cepas de *E. coli* aisladas de ITU, en donde el 91% presentaron este gen (Rijavec *et al.*, 2008) y el de Narciso *et al.*, analizaron 29 cepas de *E. coli* aisladas de UTI y el 99% presentó el gen *iucD*. La alta prevalencia de los genes *ihA* e *iucD* en las cepas UPEC de serogrupo O25, corrobora que la captación de hierro es esencial para la supervivencia de la bacteria, y necesitan más de un sistema de captación, ya que el hierro se encuentra en concentraciones muy limitadas en el cuerpo, aproximadamente a  $10^{-25}$  M en sangre, y esta concentración es más baja en otros tejidos y para sobrevivir las bacterias necesitan una concentración de hierro citoplasmática de aproximadamente  $10^{-6}$  M (Wiles *et al.*, 2008).

El gen *sat*, que codifica la toxina autotransportadora secretada está presente en el 71% (n=43) de las cepas analizadas en este trabajo, esto es mayor a lo previamente reportado en el 2003 por Ananias *et al.*, en donde fueron analizadas 60 cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con sepsis, encontrando el gen *sat* en el 55% de las cepas (Ananias *et al.*, 2008). La presencia de estos genes de virulencia indica que

la mayoría de las cepas son capaces de adherirse al uroepitelio, causar daño en el tejido y adquirir los nutrientes necesarios para su supervivencia en el tracto urinario.

En el 2012 en el estudio de Asadi *et.al.*, analizaron la presencia del gen *fliC* que codifica la adhesina flagelar, en 22 cepas de UPEC, encontrando este gen en el 100% de las cepas. Sin embargo en el presente estudio se encontró *fliC* en el 12% (n=8) de las cepas. Este gen es importante, ya que contribuye a la movilidad de las bacterias a través de los uréteres para llegar a riñón, además de que puede estar involucrado en la adherencia a las células epiteliales (Girón *et al.*, 2002, Lane *et al.*, 2005).

El gen *vat* que codifica la toxina vacuolizante se encontró igualmente en un porcentaje bajo de las cepas 8% (n=4), lo cual no se relaciona con lo reportado en el trabajo de Nichols *et.al.*, realizado en el 2016, en donde analizaron la presencia del este gen en 45 cepas de UPEC, encontrándolo en el 68%. Los genes *hlyA* y *cnf* que codifican la toxina  $\alpha$ -hemolisina y el factor necrotizante citotóxico 1 respectivamente, son frecuentemente reportados en las cepas de UPEC. En el 2014 Firoozeh *et.al.*, analizaron la presencia de los genes *hlyA* y *cnf* en 72 cepas de UPEC de pacientes con pielonefritis y 78 cepas de UPEC de pacientes con cistitis, encontrando que en las cepas de pielonefritis *hlyA* estuvo en el 6.9% de las cepas y *cnf* no estuvo presente en ninguna cepa; mientras que en las cepas de cistitis *hlyA* estuvo presente en el 1.3% de las cepas y *cnf* tampoco se encontró. Esta información se relaciona con lo obtenido en el presente trabajo, en donde se encontró el gen *hlyA* en el 6% de las cepas (n=4) y *cnf* en el 5%(n=3) de éstas (Asadi *et al.*, 2012, Firoozeh *et al.*, 2014, Nichols *et al.*, 2016). Y finalmente el gen *papA* que codifica la fimbria P se encontró en el 6% de las cepas, en combinación con el gen *papGII* que codifica el alelo II de la adhesina *papG*, sin embargo en trabajos previos este gen se ha reportado en porcentajes mayores; en el 2014 Firoozeh *et.al.*, encontraron el gen *pap* en el 16.7% de las 150 cepas analizadas; en el 2016 Lee *et.al.*, encontraron este gen en el 39.6% de 58 cepas de UPEC analizadas. La presencia en bajo porcentaje de los últimos genes mencionados podría indicar que son pocas las cepas que son capaces de causar ITU altas, ya

que necesitan estos elementos para poder ascender por los uréteres y alojarse en el riñón.

Se han investigado los factores de virulencia presentes en las cepas de *E. coli* ST131 y se ha encontrado que estas cepas no presentan la adhesina PapG ni el factor necrotizante citotóxico 1 (Nicolas-Chanoine *et al.*, 2008). Mientras que los siguientes genes son los más frecuentemente reportados en cepas *E. coli* ST131: toxina secretada autotransportadora (*sat*), fimbria tipo 1 (*fimH*), receptor de yersiniabactina (*fyuA*), grupo 2 de la síntesis de cápsula (*kpsM II*), proteína uropatógena específica (*usp*), marcador de isla de patogenicidad (*malX*), adhesina/receptor de sideróforo (*iha*), receptor de membrana externa (*ompT*), aerobactina (*iucD*), receptor de aerobactina (*iutA*) y gen asociado a resistencia a suero (*traT*) (Karisik *et al.*, 2008, Johnson *et al.*, 2010, Van der Bij *et al.*, 2012, Blanco *et al.*, 2013). En este trabajo, se analizaron los patrones más frecuentes de genes de virulencia y se encontraron veinte. La combinación de genes prevalente es la siguiente: *fimH*, *sat*, *iucD*, *ihA* encontrada en el 49% de las cepas. Se realizó también un análisis los genes de virulencia presentes en cada grupo filogenético, en donde se observó que las cepas que pertenecen al grupo filogenético A solo presentaron dos genes de virulencia *fimH* e *iucD*; las cepas del filogrupo C presentaron tres genes *fimH*, *iucD* e *ihA*; mientras que las cepas del filogrupo B2 presentaron diversas combinaciones que incluyen todos los genes analizados. Estos genes encontrados concuerdan con los reportes de los genes frecuentes de las cepas *E. coli* ST131.

En el análisis de los marcadores de islas de patogenicidad se encontró que la PAI I<sub>CFT073</sub> es la más prevalente en las cepas de UPEC O25, encontrada en el 95% (n=62) de las cepas, seguida de la PAI II<sub>CFT073</sub> presente en el 63% (n=41) de las cepas. Las PAI I<sub>J96</sub> y PAI II<sub>J96</sub> se encontraron en el 0% (n=0) y 3% (n=2) de las cepas respectivamente. Esta información coincide con lo reportado en trabajos como el publicado por Sabaté *et al.*, en el 2006, en donde analizaron los marcadores de PAIs a 150 cepas de *E. coli*, de las cuales 50 cepas (comensales) fueron obtenidas de muestras fecales de pacientes sanas sin síntomas de ITU y 100 cepas (UPEC)

aisladas de pacientes con pielonefritis y sepsis. Encontrando que la PAI I<sub>CFT073</sub> se encontró en el 26% de las comensales y en el 73% de las UPEC; la PAI II<sub>CFT073</sub> se encontró en el 14% de las comensales y en el 46% de las patógenas; la PAI II<sub>J96</sub> estuvo en el 8% de las comensales y en el 34% de las UPEC; mientras que la PAI I<sub>J96</sub> no se encontró en ninguna cepa. Otro estudio que muestra datos similares a los que se obtuvieron en este trabajo es el de Koga *et.al.*, realizado en el 2014, en éste analizaron 20 cepas de bacteremia de recién nacidos, niños y adultos, para la determinación de secuencias asociadas a PAIs, encontrando la PAI I<sub>CFT073</sub> en el 85% de las cepas; la PAI II<sub>CFT073</sub> se encontró en el 35%; la PAI I<sub>J96</sub> se encontró en el 5% de las cepas y en este trabajo no se identificó la PAI II<sub>J96</sub>. Estos estudios sugieren que la PAI I<sub>J96</sub> probablemente no es muy importante en la patogénesis de UPEC, por esto es que se encuentra ausente en estas cepas. La presencia de estas PAIs en las cepas tanto comensales como patógenas da lugar al intercambio activo de genes de virulencia entre las cepas, a partir de la transferencia horizontal, lo cual contribuye al aumento de la diversidad genética de UPEC.

Estudios de los plásmidos de UPEC reportan que éstos son los principales vehículos de transmisión de los elementos genéticos que codifican tanto genes de virulencia, como genes de resistencia a antibióticos (Beceiro *et al.*, 2012). En un estudio realizado por Baral *et. al.*, en el 2012 se analizaron los perfiles plasmídicos de 29 cepas de *E. coli* MDR, encontrando plásmidos de 2 a 51 kb, el plásmido más común entre las cepas fue de 32 kb. En el 2012 Farshad *et.al.*, determinaron los perfiles plasmídicos de 76 cepas de *E. coli* causantes de ITU, encontrando plásmidos en todas las cepas, éstas tuvieron de 1 a 10 plásmidos, con un promedio de 5.5 plásmidos por cepa y los tamaños de éstos van de 1 a 33 kb, los de 4 a 5 kb fueron los más frecuentes. En el 2014 Ebenebe *et.al.*, encontraron que cepas de *E. coli* causantes de ITU, presentaron plásmidos comunes de 30 kb, 20 kb y 11kb (Baral *et al.*, 2012, Farshad *et al.*, 2012, C. *et al.*, 2014). Además en el 2008 en el trabajo de Coque *et.al.*, determinaron que la asociación de las enzimas CTX-M-15 con la clona O25b-ST131 es usualmente atribuible a la presencia de un plásmido que confiere multiresistencia a antibióticos, que pertenece al grupo de incompatibilidad IncFII y que contiene genes que codifican BLEE como *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *bla*<sub>TEM-1</sub> y *bla*<sub>OXA-1</sub>

y el gen *aac(6)-Ib-cr* que confiere resistencia a aminoglucósidos y a fluoroquinolonas, estos plásmidos son de tamaño variable, entre 85 y 200 kb, esto se ha corroborado en trabajos más recientes (Phan *et al.*, 2015, Shin *et al.*, 2015). En este trabajo se encontró una prevalencia de plásmidos en el 80% (n=52) de las cepas, mientras que el 20% (n=13) de las cepas no tuvieron ningún plásmido. Las cepas contienen de 1 a 7 plásmidos, siendo dos y cinco plásmidos los más frecuentes entre las cepas 20% (n=13) y 15% (n=10) respectivamente. Los tamaños relativos de estos plásmidos se encuentran entre 0.85 kb y 127 kb, los plásmidos más frecuentes fueron los de 1-3 kb y los de 100-127 kb, esto se relaciona a la información previamente reportada, y a partir de esto se puede inferir que los plásmidos grandes podrían contener genes de resistencia a antibióticos así como genes que codifican BLEE.

La multidrogo resistencia es característica de las UPEC O25, en México fue realizado por Molina *et al.*, el primer estudio en el que se identificó el grupo clonal O25b-ST131, en este trabajo se analizaron los perfiles de susceptibilidad de 119 cepas de *E. coli* aisladas de ITU a 20 antibióticos, encontrando los mayores índices de resistencia a los siguientes antibióticos: ampicilina 83.7%, piperacilina 53.8%, fluoroquinolonas 55.5 a 60.6% y trimetoprim-sulfametoxazol 56.4%. En el 2013 Phan *et al.*, reportaron que este grupo clonal es resistente principalmente a cefalosporinas, y monobactámicos y usualmente también es co-resistente a fluoroquinolonas. En este mismo año en otro trabajo se determinó que una característica determinante de este serogrupo es la resistencia a quinolonas asociada a mutaciones en los genes *gyrA* y *parC* (Johnson *et al.*, 2013). Ferjani *et al.*, en el 2014 analizaron los perfiles de susceptibilidad a antibióticos de 201 cepas de *E. coli* aisladas de ITU, encontrando la mayor resistencia a: ampicilina (72.1%), tetraciclinas (63.7%), ácido nalidíxico (41.8%) y ciprofloxacina (38.8%) (Ferjani *et al.*, 2014).

En este trabajo se encontró que el 97% (n=63) de las cepas de UPEC de serogrupo O25 son resistentes tanto a ampicilina y a cefalotina (cefalosporina de 1ª elección), seguido de un alto porcentaje de cepas resistentes a quinolonas, tanto de primera



como de segunda generación como es el ácido nalidíxico 85% (n=55), ciprofloxacina 83% (n=54), levofloxacina 82% (n=53), ofloxacina y norfloxacina 80% (52), así como el 80% (n=52) es resistente a amoxicilina con ácido clavulánico, estos resultados coinciden con los reportado anteriormente (Ewers *et al.*, 2010, Harada *et al.*, 2012, Nicolas-Chanoine *et al.*, 2014). En México se utilizan como tratamiento de primera elección los siguientes antibióticos: ciprofloxacino, trimetoprim-sulfametoxazol y nitrofurantoina, en este estudio los dos primeros tuvieron índices muy altos de resistencia 83% y 66% respectivamente, mientras que nitrofurantoina tuvo un índice de resistencia del 9% (n=6). Con estos resultados se puede sugerir hacer un cambio en la elección de los antibióticos considerando la nitrofurantoina como el tratamiento de elección para estas cepas de *E. coli* O25 causantes de ITU. Fueron analizados los resistotipos de estas cepas, y se encontraron 57 resistotipos distintos, y fueron cinco los más frecuentes en 13 cepas, sin embargo esto nos indica que no hay un resistotipo definido en las cepas de UPEC O25 analizadas.

En cuanto a la multidrogo resistencia se obtuvieron resultados alarmantes ya que la totalidad de las cepas son multirresistentes considerando que el 100% de las cepas son resistentes a dos o más familias de antibióticos. Se realizó una clasificación adicional de estas cepas en MDR, XDR y PDR tomando en cuenta los criterios establecidos en el trabajo de Magiorakos y *et.al.*, en 2015. Cabe mencionar que el esquema de clasificación de la resistencia a antibióticos que propone el autor para la familia *Enterobacteriaceae* en nuestro estudio es parcial, pero se consideran todos los antibióticos usados para el tratamiento de infecciones urinarias, lo cual valida la clasificación. A partir de este análisis se encontró que el 54% de las cepas fue XDR (extremadamente resistentes), esto indica las cepas fueron resistentes a cinco o seis de las 7 categorías establecidas; el 28% de las cepas fue PDR (pan-drogo resistentes), lo cual indica que estas cepas son resistentes a las siete categorías usadas y el 18% de las cepas fue MDR (multidrogo resistentes), esto indica que estas cepas fueron resistentes a tres o cuatro categorías. La multidrogo resistencia es un grave problema, de salud pública que complica y limita el tratamiento de las ITU causadas por el grupo clonal O25b-ST131, además de que retrasa el tratamiento adecuado, y aumenta el uso de antimicrobianos de “último

recurso”, lo cual contribuye al desarrollo de resistencia a más antibióticos por coselección (Russo *et al.*, 2000, Gupta *et al.*, 2001, Coque *et al.*, 2008, Pitout *et al.*, 2008).

La producción de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido es una característica particular del grupo clonal O25b-ST131, siendo las enzimas del grupo CTX-M las más frecuentemente reportadas (Nicolas-Chanoine *et al.*, 2008, Peirano *et al.*, 2010, Johnson *et al.*, 2012). En el año 2013 Blanco *et al.*, analizaron la producción de BLEE de 130 cepas *E. coli* ST131, y encontraron que el 74% producen CTX-M-15, el 12% producen CTX-M-14, el 7% produce SHV-12, el 5% CTXM-9 y el 4% produce CTXM-32. En el 2014 Ferjani *et al.*, analizaron la producción de BLEE en 201 cepas de UPEC, esto a partir del método de difusión de doble disco, encontrando que 35 cepas fueron positivas en esta prueba, además de que todas estas presentaron el gen *bla*<sub>CTX-M-15</sub>. En el mismo año en el trabajo de Peirano *et al.*, analizaron la producción de BLEE en 240 cepas de *E. coli*, ST131, y reportaron que el 80% de las cepas producen CTX-M-15, el 17% produce CTX-M-14, el 0.5% produce CTX-M-24, el 1% produce CTX-M-27, el 1% produce CTX-M-3 y el 0.5% produce TEM-52. Los resultados que se obtuvieron en este trabajo difieren de lo que se ha reportado, ya que solo el 17% (n=11) de las cepas UPEC O25 analizadas producen BLEE, mientras que el 83% (n=48) no producen dichas enzimas por el método de doble disco, sin embargo será interesante continuar el estudio de estas cepas con la búsqueda de genes que codifican para estas BLEE. Además, por los resultados de los perfiles de susceptibilidad a antimicrobianos se puede suponer que estas cepas cuentan con un gran repertorio de genes que les confieren resistencia a los antibióticos y que esta resistencia puede deberse a más de un mecanismo de resistencia, como puede ser alteración de la permeabilidad, mutaciones en PBP (penicillin binding protein) y bombas de eflujo (Blair *et al.*, 2015).

En el análisis estadístico se encontró una correlación entre los factores de virulencia y la resistencia a antibióticos que indica que a mayor número de antibióticos que resista la cepa, presentará un mayor número de factores de virulencia. De igual forma se encontró una correlación entre la resistencia a antibióticos y el número de plásmidos, lo que indica que a mayor número de antibióticos que resista la cepa,

presentará un mayor número de plásmidos. A partir de este análisis se hace evidente que las cepas estudiadas tienen un gran potencial de resistencia a antibióticos, como de virulencia.

Los datos obtenidos en el presente estudio son de gran importancia ya que en México no se ha profundizado en el análisis de las características del grupo clonal O25b-ST131, es necesario que se realicen más pruebas a estas cepas, debido a que se presentan en un gran porcentaje de los aislamientos, para optimizar tanto el diagnóstico como el tratamiento de la ITU producidas por *E. coli*.

## Conclusiones

1. Todas las cepas analizadas pertenecen al serogrupo O25.
2. El 92% de las cepas pertenecen al grupo filogenético B2, 5% pertenecen al filogrupo C y el 3% al filogrupo A.
3. Los genes de virulencia más prevalentes son aquellos involucrados en la adherencia, captación de hierro y daño al epitelio.
4. Se encontraron 20 patrones de virulencia, el 49% de las cepas tiene *fimH+sat+iucD+ihA*; se encontró una cepa con los nueve genes de virulencia buscados, y cinco cepas que solo presentaron *fimH*.
5. Las cepas de los grupos C y A presentaron de 2 a 3 genes de virulencia, mientras que las cepas B2 tienen en promedio cuatro.
6. La PAI I<sub>CFT073</sub> se encontró en el 92% de las cepas, seguida de la PAI II<sub>CFT073</sub> presente en el 63%, la PAI I<sub>J96</sub> no se encontró en ninguna cepa, mientras que la PAI II<sub>J96</sub> se encontró únicamente en el 3% de las cepas.
7. El 80% de las cepas presentaron plásmidos, los tamaños más frecuentes son 1-3 kb, 50-70 kb y 100-127 kb.
8. La mayor resistencia a antibióticos fue a ampicilina y cefalotina 97%; ácido nalidíxico 85%, ciprofloxacina 83%, levofloxacina 82% y norfloxacina 80%.
9. El 91% de las cepas analizadas son sensibles a nitrofurantoína antibiótico de primera elección.
10. Se encontraron 57 resistotipos distintos.
11. El 100% de las cepas es multidrogo resistente.
12. El 17% de las cepas son productoras de BLEE.

## **Perspectivas**

1. Incluir antibióticos monobactámicos, carbapenems, fosfomicina y colistina a los perfiles de susceptibilidad a antimicrobianos.
2. Ampliar el número de genes de virulencia estudiados, para poder clasificar a las cepas O25 en virotipos.
3. Determinar el gen *bla<sub>CTX-M-15</sub>*.
4. Realizar la caracterización de los plásmidos presentes en las cepas.
5. Realizar estudios de conjugación.
6. Determinar la Secuencia Tipo (ST).
7. Determinar la capacidad de formar biofilm.

## Referencias

- Abe, C.M., Salvador, F.A., Falsetti, I.N., Vieira, M.A., Blanco, J., Blanco, J.E., *et al.* (2008). Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) strains may carry virulence properties of diarrhoeagenic *E. coli*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **52**, 397-406.
- Ananias, M. and Yano, T. (2008). Serogroups and virulence genotypes of *Escherichia coli* isolated from patients with sepsis. *Braz J Med Biol Res* **41**, 877-883.
- Anderson, D.J., Engemann, J.J., Harrell, L.J., Carmeli, Y., Reller, L.B. and Kaye, K.S. (2006). Predictors of mortality in patients with bloodstream infection due to ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **50**, 1715-1720.
- Anderson, G.G., Dodson, K.W., Hooton, T.M. and Hultgren, S.J. (2004). Intracellular bacterial communities of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract pathogenesis. *Trends Microbiol* **12**, 424-430.
- Andersson, D.I. and Hughes, D. (2010). Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nat Rev Microbiol* **8**, 260-271.
- Arredondo-García, J.L. and Amábile-Cuevas, C.F. (2008). High resistance prevalence towards ampicillin, co-trimoxazole and ciprofloxacin, among uropathogenic *Escherichia coli* isolates in Mexico City. *J Infect Dev Ctries* **2**, 350-353.
- Asadi, K.M., Oloomi, M., Habibi, M. and Bouzari, S. (2012). Cloning of *fimH* and *fliC* and expression of the fusion protein *FimH/FliC* from Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) isolated in Iran. *Iran J Microbiol* **4**, 55-62.
- Bailey, J.K., Pinyon, J.L., Anantham, S. and Hall, R.M. (2010). Distribution of human commensal *Escherichia coli* phylogenetic groups. *J Clin Microbiol* **48**, 3455-3456.
- Baral, P., Neupane, S., Marasini, B.P., Ghimire, K.R., Lekhak, B. and Shrestha, B. (2012). High prevalence of multidrug resistance in bacterial uropathogens from Kathmandu, Nepal. *BMC Res Notes* **5**, 38.
- Barber, A.E., Norton, J.P., Spivak, A.M. and Mulvey, M.A. (2013). Urinary tract infections: current and emerging management strategies. *Clin Infect Dis* **57**, 719-724.
- Beceiro, A., Tomás, M. and Bou, G. (2012). [Antimicrobial resistance and virulence: a beneficial relationship for the microbial world?]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **30**, 492-499.
- Bidet, P., Mahjoub-Messai, F., Blanco, J., Dehem, M., Aujard, Y., Bingen, E. and Bonacorsi, S. (2007). Combined multilocus sequence typing and O serogrouping distinguishes *Escherichia coli* subtypes associated with infant urosepsis and/or meningitis. *J Infect Dis* **196**, 297-303.
- Bien, J., Sokolova, O. and Bozko, P. (2012). Role of Uropathogenic *Escherichia coli* Virulence Factors in Development of Urinary Tract Infection and Kidney Damage. *Int J Nephrol* **2012**, 681473.
- Blair, J.M., Webber, M.A., Baylay, A.J., Ogbolu, D.O. and Piddock, L.J. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol* **13**, 42-51.

- Blanco, J., Mora, A., Mamani, R., López, C., Blanco, M., Dahbi, G., *et al.* (2013). Four main virotypes among extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing isolates of *Escherichia coli* O25b:H4-B2-ST131: bacterial, epidemiological, and clinical characteristics. *J Clin Microbiol* **51**, 3358-3367.
- Bower, J.M., Eto, D.S. and Mulvey, M.A. (2005). Covert operations of uropathogenic *Escherichia coli* within the urinary tract. *Traffic* **6**, 18-31.
- Calderón-Jaimes, E., Casanova-Román, G., Galindo-Fraga, A., Gutiérrez-Escoto, P., Landa-Juárez, S., Moreno-Espinosa, S., *et al.* (2013) Diagnóstico y tratamiento de las infecciones en vías urinarias: un enfoque multidisciplinario para casos no complicados. In *Bol Med Hosp Infant Mex*. pp. 3-10.
- Cheng, M.F., Chen, W.L., Hung, W.Y., Huang, I.F., Chiou, Y.H., Chen, Y.S., *et al.* (2015). Emergence of extended spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* O25b-ST131: a major community-acquired uropathogen in infants. *Pediatr Infect Dis J* **34**, 469-475.
- Chromek, M. and Brauner, A. (2008). Antimicrobial mechanisms of the urinary tract. *J Mol Med (Berl)* **86**, 37-47.
- Clermont, O., Bonacorsi, S. and Bingen, E. (2000). Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol* **66**, 4555-4558.
- Clermont, O., Christenson, J.K., Denamur, E. and Gordon, D.M. (2013). The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environ Microbiol Rep* **5**, 58-65.
- Clermont, O., Dhanji, H., Upton, M., Gibreel, T., Fox, A., Boyd, D., *et al.* (2009). Rapid detection of the O25b-ST131 clone of *Escherichia coli* encompassing the CTX-M-15-producing strains. *J Antimicrob Chemother* **64**, 274-277.
- Clermont, O., Lavollay, M., Vimont, S., Deschamps, C., Forestier, C., Branger, C., *et al.* (2008). The CTX-M-15-producing *Escherichia coli* diffusing clone belongs to a highly virulent B2 phylogenetic subgroup. *J Antimicrob Chemother* **61**, 1024-1028.
- Coque, T.M., Novais, A., Carattoli, A., Poirel, L., Pitout, J., Peixe, L., *et al.* (2008). Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15. *Emerg Infect Dis* **14**, 195-200.
- Croxen, M.A. and Finlay, B.B. (2010). Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat Rev Microbiol* **8**, 26-38.
- Croxen, M.A., Law, R.J., Scholz, R., Keeney, K.M., Wlodarska, M. and Finlay, B.B. (2013). Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* **26**, 822-880.
- Da Silva, G.J. and Mendonça, N. (2012). Association between antimicrobial resistance and virulence in *Escherichia coli*. *Virulence* **3**, 18-28.
- Davis, J.M., Rasmussen, S.B. and O'Brien, A.D. (2005). Cytotoxic necrotizing factor type 1 production by uropathogenic *Escherichia coli* modulates polymorphonuclear leukocyte function. *Infect Immun* **73**, 5301-5310.

- Dhakal, B.K. and Mulvey, M.A. (2012). The UPEC pore-forming toxin  $\alpha$ -hemolysin triggers proteolysis of host proteins to disrupt cell adhesion, inflammatory, and survival pathways. *Cell Host Microbe* **11**, 58-69.
- Duriez, P., Clermont, O., Bonacorsi, S., Bingen, E., Chaventré, A., Elion, J., *et al.* (2001). Commensal *Escherichia coli* isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human populations. *Microbiology* **147**, 1671-1676.
- Ebenebe, J. C., Emeka-Okafor, K. M., Akujobi, C. N., Ezeanya, C. C., Agbakoba, N. R., & Egwuatu, C. C. (2014). Plasmid profile of Uropathogens among Children. *Brit J of Med & Med Res*, **5**, 1195-1203.
- Ewers, C., Grobbel, M., Stamm, I., Kopp, P.A., Diehl, I., Semmler, T., *et al.* (2010). Emergence of human pandemic O25:H4-ST131 CTX-M-15 extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* among companion animals. *J Antimicrob Chemother* **65**, 651-660.
- Falagas, M.E., Vouloumanou, E.K., Togiias, A.G., Karadima, M., Kapaskelis, A.M., Rafailidis, P.I. and Athanasiou, S. (2010). Fosfomycin versus other antibiotics for the treatment of cystitis: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Antimicrob Chemother* **65**, 1862-1877.
- Farshad, S., Ranjbar, R., Japoni, A., Hosseini, M., Anvarinejad, M. and Mohammadzadegan, R. (2012). Microbial susceptibility, virulence factors, and plasmid profiles of uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from children in Jahrom, Iran. *Arch Iran Med* **15**, 312-316.
- 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.
- Fexby, S., Bjarnsholt, T., Jensen, P., Roos, V., Høiby, N., Givskov, M. and Klemm, P. (2007). Biological Trojan horse: Antigen 43 provides specific bacterial uptake and survival in human neutrophils. *Infect Immun* **75**, 30-34.
- Firoozeh, F., Saffari, M., Neamati, F. and Zibaei, M. (2014). Detection of virulence genes in *Escherichia coli* isolated from patients with cystitis and pyelonephritis. *Int J Infect Dis* **29**, 219-222.
- Flores-Mireles, A.L., Walker, J.N., Caparon, M. and Hultgren, S.J. (2015). Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nat Rev Microbiol* **13**, 269-284.
- Foxman, B. (2010). The epidemiology of urinary tract infection. *Nat Rev Urol* **7**, 653-660.
- Frost, L.S., Leplae, R., Summers, A.O. and Toussaint, A. (2005). Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat Rev Microbiol* **3**, 722-732.
- Gao, Q., Wang, X., Xu, H., Xu, Y., Ling, J., Zhang, D., *et al.* (2012). Roles of iron acquisition systems in virulence of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: salmochelin and aerobactin contribute more to virulence than heme in a chicken infection model. *BMC Microbiol* **12**, 143.



- Garcia, E.C., Brumbaugh, A.R. and Mobley, H.L. (2011). Redundancy and specificity of Escherichia coli iron acquisition systems during urinary tract infection. *Infect Immun* **79**, 1225-1235.
- Girón, J.A., Torres, A.G., Freer, E. and Kaper, J.B. (2002). The flagella of enteropathogenic Escherichia coli mediate adherence to epithelial cells. *Mol Microbiol* **44**, 361-379.
- Gupta, K., Hooton, T.M. and Stamm, W.E. (2001). Increasing antimicrobial resistance and the management of uncomplicated community-acquired urinary tract infections. *Ann Intern Med* **135**, 41-50.
- Guyer, D.M., Henderson, I.R., Nataro, J.P. and Mobley, H.L. (2000). Identification of sat, an autotransporter toxin produced by uropathogenic Escherichia coli. *Mol Microbiol* **38**, 53-66.
- Hagan, E.C. and Mobley, H.L. (2007). Uropathogenic Escherichia coli outer membrane antigens expressed during urinary tract infection. *Infect Immun* **75**, 3941-3949.
- Harada, K., Nakai, Y. and Kataoka, Y. (2012). Mechanisms of resistance to cephalosporin and emergence of O25b-ST131 clone harboring CTX-M-27  $\beta$ -lactamase in extraintestinal pathogenic Escherichia coli from dogs and cats in Japan. *Microbiol Immunol* **56**, 480-485.
- Herzer, P.J., Inouye, S., Inouye, M. and Whittam, T.S. (1990). Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of Escherichia coli. *J Bacteriol* **172**, 6175-6181.
- Hunstad, D.A. and Justice, S.S. (2010). Intracellular lifestyles and immune evasion strategies of uropathogenic Escherichia coli. *Annu Rev Microbiol* **64**, 203-221.
- Ibrahim, E.H., Sherman, G., Ward, S., Fraser, V.J. and Kollef, M.H. (2000). The influence of inadequate antimicrobial treatment of bloodstream infections on patient outcomes in the ICU setting. *Chest* **118**, 146-155.
- Issazadeh, K., Naghibi, S.N. and Reza, M.K.-P.M. (2015). Drug Resistance and Serotyping of Uropathogenic Escherichia coli among Patients with Urinary Tract Infection in Rasht, Iran. *Zahedan J Res Med Sci*, 5.
- Jauréguy, F., Carbonnelle, E., Bonacorsi, S., Clec'h, C., Casassus, P., Bingen, E., et al. (2007). Host and bacterial determinants of initial severity and outcome of Escherichia coli sepsis. *Clin Microbiol Infect* **13**, 854-862.
- Johnson, J.R. (1991). Virulence factors in Escherichia coli urinary tract infection. *Clin Microbiol Rev* **4**, 80-128.
- Johnson, J.R., Johnston, B., Clabots, C., Kuskowski, M.A. and Castanheira, M. (2010). Escherichia coli sequence type ST131 as the major cause of serious multidrug-resistant E. coli infections in the United States. *Clin Infect Dis* **51**, 286-294.
- Johnson, J.R., Tchesnokova, V., Johnston, B., Clabots, C., Roberts, P.L., Billig, M., et al. (2013). Abrupt emergence of a single dominant multidrug-resistant strain of Escherichia coli. *J Infect Dis* **207**, 919-928.
- Johnson, J.R., Urban, C., Weissman, S.J., Jorgensen, J.H., Lewis, J.S., Hansen, G., et al. (2012). Molecular epidemiological analysis of Escherichia coli sequence type ST131 (O25:H4) and blaCTX-M-15 among extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing E. coli from the United States, 2000 to 2009. *Antimicrob Agents Chemother* **56**, 2364-2370.

- Justice, S.S., Hung, C., Theriot, J.A., Fletcher, D.A., Anderson, G.G., Footer, M.J. and Hultgren, S.J. (2004). Differentiation and developmental pathways of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 1333-1338.
- Kaper, J.B., Nataro, J.P. and Mobley, H.L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* **2**, 123-140.
- Karisik, E., Ellington, M.J., Livermore, D.M. and Woodford, N. (2008). Virulence factors in *Escherichia coli* with CTX-M-15 and other extended-spectrum beta-lactamases in the UK. *J Antimicrob Chemother* **61**, 54-58.
- Kieser, T. (1984). Factors affecting the isolation of CCC DNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. *Plasmid* **12**, 19-36.
- Klena, J., Zhang, P., Schwartz, O., Hull, S. and Chen, T. (2005). The core lipopolysaccharide of *Escherichia coli* is a ligand for the dendritic-cell-specific intercellular adhesion molecule nonintegrin CD209 receptor. *J Bacteriol* **187**, 1710-1715.
- Koga, V.L., Tomazetto, G., Cyويا, P.S., Neves, M.S., Vidotto, M.C., Nakazato, G. and Kobayashi, R.K. (2014). Molecular screening of virulence genes in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from human blood culture in Brazil. *Biomed Res Int* **2014**, 465054.
- Lane, M.C., Lockatell, V., Monterosso, G., Lamphier, D., Weinert, J., Hebel, J.R., *et al.* (2005). Role of motility in the colonization of uropathogenic *Escherichia coli* in the urinary tract. *Infect Immun* **73**, 7644-7656.
- Lautenbach, E. and Polk, R.E. (2007). Resistant gram-negative bacilli: A neglected healthcare crisis? *Am J Health Syst Pharm* **64**, S3-21; quiz S22-24.
- Lay, K.K., Koowattananukul, C., Chansong, N. and Chuanchuen, R. (2012). Antimicrobial resistance, virulence, and phylogenetic characteristics of *Escherichia coli* isolates from clinically healthy swine. *Foodborne Pathog Dis* **9**, 992-1001.
- Le Bouguéneq, C. and Servin, A.L. (2006). Diffusely adherent *Escherichia coli* strains expressing Afa/Dr adhesins (Afa/Dr DAEC): hitherto unrecognized pathogens. *FEMS Microbiol Lett* **256**, 185-194.
- Lee, J.H., Subhadra, B., Son, Y.J., Kim, D.H., Park, H.S., Kim, J.M., *et al.* (2016). Phylogenetic group distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties of uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from patients with urinary tract infections in South Korea. *Lett Appl Microbiol* **62**, 84-90.
- Li, D., Liu, B., Chen, M., Guo, D., Guo, X., Liu, F., *et al.* (2010). A multiplex PCR method to detect 14 *Escherichia coli* serogroups associated with urinary tract infections. *J Microbiol Methods* **82**, 71-77.
- Lloyd, A.L., Rasko, D.A. and Mobley, H.L. (2007). Defining genomic islands and uropathogen-specific genes in uropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **189**, 3532-3546.
- Léveillé, S., Caza, M., Johnson, J.R., Clabots, C., Sabri, M. and Dozois, C.M. (2006). Iha from an *Escherichia coli* urinary tract infection outbreak clonal group A strain is expressed in vivo in the mouse urinary tract and functions as a catecholate siderophore receptor. *Infect Immun* **74**, 3427-3436.

- Lüthje, P. and Brauner, A. (2010). Ag43 promotes persistence of uropathogenic *Escherichia coli* isolates in the urinary tract. *J Clin Microbiol* **48**, 2316-2317.
- Lüthje, P. and Brauner, A. (2014). Virulence factors of uropathogenic *E. coli* and their interaction with the host. *Adv Microb Physiol* **65**, 337-372.
- Magiorakos, A.P., Srinivasan, A., Carey, R.B., Carmeli, Y., Falagas, M.E., Giske, C.G., *et al.* (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* **18**, 268-281.
- Mandal, J., Acharya, N.S., Buddhapriya, D. and Parija, S.C. (2012). Antibiotic resistance pattern among common bacterial uropathogens with a special reference to ciprofloxacin resistant *Escherichia coli*. *Indian J Med Res* **136**, 842-849.
- Marrs, C.F., Zhang, L., Tallman, P., Manning, S.D., Somsel, P., Raz, P., *et al.* (2002). Variations in 10 putative uropathogen virulence genes among urinary, faecal and peri-urethral *Escherichia coli*. *J Med Microbiol* **51**, 138-142.
- Mobley, H.L., Green, D.M., Trifillis, A.L., Johnson, D.E., Chippendale, G.R., Lockett, C.V., *et al.* (1990). Pyelonephritogenic *Escherichia coli* and killing of cultured human renal proximal tubular epithelial cells: role of hemolysin in some strains. *Infect Immun* **58**, 1281-1289.
- Molina-López, J., Aparicio-Ozores, G., Ribas-Aparicio, R.M., Gavilanes-Parra, S., Chávez-Berrocal, M.E., Hernández-Castro, R. and Manjarrez-Hernández, H. (2011). Drug resistance, serotypes, and phylogenetic groups among uropathogenic *Escherichia coli* including O25-ST131 in Mexico City. *J Infect Dev Ctries* **5**, 840-849.
- Momtaz, H., Karimian, A., Madani, M., Safarpour Dehkordi, F., Ranjbar, R., Sarshar, M. and Souod, N. (2013). Uropathogenic *Escherichia coli* in Iran: serogroup distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* **12**, 8.
- Mulvey, M.A. (2002). Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol* **4**, 257-271.
- Mulvey, M.A., Schilling, J.D., Martinez, J.J. and Hultgren, S.J. (2000). Bad bugs and beleaguered bladders: interplay between uropathogenic *Escherichia coli* and innate host defenses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 8829-8835.
- Narciso, A., Nunes, F., Amores, T., Lito, L., Melo-Cristino, J. and Duarte, A. (2012). Persistence of uropathogenic *Escherichia coli* strains in the host for long periods of time: relationship between phylogenetic groups and virulence factors. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **31**, 1211-1217.
- Nataro, J.P. and Kaper, J.B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* **11**, 142-201.
- Navidinia, M., Peerayeh, S.N., Fallah, F., Bakhshi, B. and Sajadinia, R.S. (2014). Phylogenetic grouping and pathotypic comparison of urine and fecal *Escherichia coli* isolates from children with urinary tract infection. *Braz J Microbiol* **45**, 509-514.
- Nichols, K.B., Totsika, M., Moriel, D.G., Lo, A.W., Yang, J., Wurpel, D.J., *et al.* (2016). Molecular Characterization of the Vacuolating Autotransporter Toxin in Uropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **198**, 1487-1498.

- Nicolas-Chanoine, M.H., Bertrand, X. and Madec, J.Y. (2014). Escherichia coli ST131, an intriguing clonal group. *Clin Microbiol Rev* **27**, 543-574.
- Nicolas-Chanoine, M.H., Blanco, J., Leflon-Guibout, V., Demarty, R., Alonso, M.P., Caniça, M.M., *et al.* (2008). Intercontinental emergence of Escherichia coli clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. *J Antimicrob Chemother* **61**, 273-281.
- Nielubowicz, G.R. and Mobley, H.L. (2010). Host-pathogen interactions in urinary tract infection. *Nat Rev Urol* **7**, 430-441.
- Norinder, B.S., Köves, B., Yadav, M., Brauner, A. and Svanborg, C. (2012). Do Escherichia coli strains causing acute cystitis have a distinct virulence repertoire? *Microb Pathog* **52**, 10-16.
- Novais, A., Pires, J., Ferreira, H., Costa, L., Montenegro, C., Vuotto, C., *et al.* (2012). Characterization of globally spread Escherichia coli ST131 isolates (1991 to 2010). *Antimicrob Agents Chemother* **56**, 3973-3976.
- Oelschlaeger, T.A., Dobrindt, U. and Hacker, J. (2002). Pathogenicity islands of uropathogenic E. coli and the evolution of virulence. *Int J Antimicrob Agents* **19**, 517-521.
- Ostblom, A., Adlerberth, I., Wold, A.E. and Nowrouzian, F.L. (2011). Pathogenicity island markers, virulence determinants malX and usp, and the capacity of Escherichia coli to persist in infants' commensal microbiotas. *Appl Environ Microbiol* **77**, 2303-2308.
- Peirano, G. and Pitout, J.D. (2010). Molecular epidemiology of Escherichia coli producing CTX-M beta-lactamases: the worldwide emergence of clone ST131 O25:H4. *Int J Antimicrob Agents* **35**, 316-321.
- Petty, N.K., Ben Zakour, N.L., Stanton-Cook, M., Skippington, E., Totsika, M., Forde, B.M., *et al.* (2014). Global dissemination of a multidrug resistant Escherichia coli clone. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 5694-5699.
- Phan, M.D., Forde, B.M., Peters, K.M., Sarkar, S., Hancock, S., Stanton-Cook, M., *et al.* (2015). Molecular characterization of a multidrug resistance IncF plasmid from the globally disseminated Escherichia coli ST131 clone. *PLoS One* **10**, e0122369.
- Phan, M.D., Peters, K.M., Sarkar, S., Lukowski, S.W., Allsopp, L.P., Gomes Moriel, D., *et al.* (2013). The serum resistome of a globally disseminated multidrug resistant uropathogenic Escherichia coli clone. *PLoS Genet* **9**, e1003834.
- Picard, B., Garcia, J.S., Gouriou, S., Duriez, P., Brahimi, N., Bingen, E., *et al.* (1999). The link between phylogeny and virulence in Escherichia coli extraintestinal infection. *Infect Immun* **67**, 546-553.
- Pigrau, C. (2013) Infección del tracto Urinario Madrid, SALVAT.
- Pitout, J.D., Campbell, L., Church, D.L., Gregson, D.B. and Laupland, K.B. (2009). Molecular characteristics of travel-related extended-spectrum-beta-lactamase-producing Escherichia coli isolates from the Calgary Health Region. *Antimicrob Agents Chemother* **53**, 2539-2543.
- Pitout, J.D. and Laupland, K.B. (2008). Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis* **8**, 159-166.

- Platell, J.L., Johnson, J.R., Cobbold, R.N. and Trott, D.J. (2011). Multidrug-resistant extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* of sequence type ST131 in animals and foods. *Vet Microbiol* **153**, 99-108.
- Rijavec, M., Müller-Premru, M., Zakotnik, B. and Zgur-Bertok, D. (2008). Virulence factors and biofilm production among *Escherichia coli* strains causing bacteraemia of urinary tract origin. *J Med Microbiol* **57**, 1329-1334.
- Rodríguez-Baño, J. and Pascual, A. (2008). Clinical significance of extended-spectrum beta-lactamases. *Expert Rev Anti Infect Ther* **6**, 671-683.
- Rogers, B.A., Sidjabat, H.E. and Paterson, D.L. (2011). *Escherichia coli* O25b-ST131: a pandemic, multiresistant, community-associated strain. *J Antimicrob Chemother* **66**, 1-14.
- Rudick, C.N., Billips, B.K., Pavlov, V.I., Yaggie, R.E., Schaeffer, A.J. and Klumpp, D.J. (2010). Host-pathogen interactions mediating pain of urinary tract infection. *J Infect Dis* **201**, 1240-1249.
- Russo, T.A. and Johnson, J.R. (2000). Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *J Infect Dis* **181**, 1753-1754.
- Sabaté, M., Moreno, E., Pérez, T., Andreu, A. and Prats, G. (2006). Pathogenicity island markers in commensal and uropathogenic *Escherichia coli* isolates. *Clin Microbiol Infect* **12**, 880-886.
- Saldaña, Z., De la Cruz, M.A., Carrillo-Casas, E.M., Durán, L., Zhang, Y., Hernández-Castro, R., *et al.* (2014). Production of the *Escherichia coli* common pilus by uropathogenic *E. coli* is associated with adherence to HeLa and HTB-4 cells and invasion of mouse bladder urothelium. *PLoS One* **9**, e101200.
- Schembri, M.A., Zakour, N.L., Phan, M.D., Forde, B.M., Stanton-Cook, M. and Beatson, S.A. (2015). Molecular Characterization of the Multidrug Resistant *Escherichia coli* ST131 Clone. *Pathogens* **4**, 422-430.
- Schubert, S., Rakin, A. and Heesemann, J. (2004). The *Yersinia* high-pathogenicity island (HPI): evolutionary and functional aspects. *Int J Med Microbiol* **294**, 83-94.
- Shin, J. and Ko, K.S. (2015). Effect of plasmids harbouring blaCTX-M on the virulence and fitness of *Escherichia coli* ST131 isolates. *Int J Antimicrob Agents* **46**, 214-218.
- Soto, S.M., Smithson, A., Martinez, J.A., Horcajada, J.P., Mensa, J. and Vila, J. (2007). Biofilm formation in uropathogenic *Escherichia coli* strains: relationship with prostatitis, urovirulence factors and antimicrobial resistance. *J Urol* **177**, 365-368.
- Stamm, W.E. and Norrby, S.R. (2001). Urinary tract infections: disease panorama and challenges. *J Infect Dis* **183 Suppl 1**, S1-4.
- Szczepanowski, R., Braun, S., Riedel, V., Schneiker, S., Krahn, I., Pühler, A. and Schlüter, A. (2005). The 120 592 bp IncF plasmid pRSB107 isolated from a sewage-treatment plant encodes nine different antibiotic-resistance determinants, two iron-acquisition systems and other putative virulence-associated functions. *Microbiology* **151**, 1095-1111.

- Tarchouna, M., Ferjani, A., Ben-Selma, W. and Boukadida, J. (2013). Distribution of uropathogenic virulence genes in *Escherichia coli* isolated from patients with urinary tract infection. *Int J Infect Dis* **17**, e450-453.
- Tirabassi, R. (2014). *How to Identify Supercoils, Nicks and Circles in Plasmid Preps*. *Bitesize Bio.* [online] *Bitesize Bio.* Available at: <http://bitesizebio.com/13524/how-to-identify-supercoils-nicks-and-circles-in-plasmid-preps/> [Accessed 24 Nov. 2016].
- Ulett, G.C., Totsika, M., Schaale, K., Carey, A.J., Sweet, M.J. and Schembri, M.A. (2013). Uropathogenic *Escherichia coli* virulence and innate immune responses during urinary tract infection. *Curr Opin Microbiol* **16**, 100-107.
- Ulett, G.C., Valle, J., Beloin, C., Sherlock, O., Ghigo, J.M. and Schembri, M.A. (2007). Functional analysis of antigen 43 in uropathogenic *Escherichia coli* reveals a role in long-term persistence in the urinary tract. *Infect Immun* **75**, 3233-3244.
- Van der Bij, A.K., Peirano, G., Pitondo-Silva, A. and Pitout, J.D. (2012). The presence of genes encoding for different virulence factors in clonally related *Escherichia coli* that produce CTX-Ms. *Diagn Microbiol Infect Dis* **72**, 297-302.
- Vincent, C., Boerlin, P., Daignault, D., Dozois, C.M., Dutil, L., Galanakis, C., *et al.* (2010). Food reservoir for *Escherichia coli* causing urinary tract infections. *Emerg Infect Dis* **16**, 88-95.
- von Baum, H. and Marre, R. (2005). Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and therapeutic implications. *Int J Med Microbiol* **295**, 503-511.
- Wiles, T.J., Kulesus, R.R. and Mulvey, M.A. (2008). Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Exp Mol Pathol* **85**, 11-19.
- Wright, K.J., Seed, P.C. and Hultgren, S.J. (2005). Uropathogenic *Escherichia coli* flagella aid in efficient urinary tract colonization. *Infect Immun* **73**, 7657-7668.
- Yamamoto, S. (2007). Molecular epidemiology of uropathogenic *Escherichia coli*. *J Infect Chemother* **13**, 68-73.

## Anexos

### a) Diámetro de los halos obtenidos en los antibiogramas, resultados de resistencia y sensibilidad y producción de BLEE, de las cepas UPEC de serotipo O25:H4

CEPA	Aminoglucosidos			Quinolonas	Fluoroquinolonas				OTROS			β-lactámicos								Producción de BLEE	
	AMK	NET	GM	1ra G	2a G				TSX	NF	C	AM	Cefalosporinas				ATM	AMC			
				AN	LVX	CIP	OFX	NOR					1ra G	2a G	3a G	4a G					
												OF	CRO	CTX	CFX	CFZ	FEP				
CR04	11	10	6	6	11	7	8	6	6	21	20	6	6	24	30	19	24	32	30	17	NO
	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	R	S	S	S	R	
CR07	20	8	6	6	10	6	6	6	6	24	9	6	14	29	27	20	6	29	29	17	NO
	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	R	R	S	S	R	
CR14	15	18	15	6	9	11	6	6	10	20	11	6	8	30	27	6	6	24	27	12	NO
	R	S	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	R	R	S	S	R	
CR15	18	19	18	6	10	6	12	6	29	22	6	6	6	6	10+	6	6	15+	16+	12	SI (CTX, FEP, ATM)
	S	S	S	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
CR19	14	11	6	6	8	6	6	6	6	19	15	6	6	25	31	22	6	30	29	17	NO
	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	R	R	S	S	R	
CR22	16	11	6	6	8	6	6	6	22	24	9	6	6	6	6+	6	6	12+	11+	15	SI (CTX, FEP, ATM)
	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
CR33	15	19	15	26	26	26	22	24	25	23	21	6	6	26	30	21	6	28	27	16	NO
	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	R	S	S	R	
CR35	15	19	13	6	9	6	6	6	6	19	9	6	6	6	7+	6	6	14+	12+	15	SI (CTX, FEP, ATM)
	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
CR50	15	10	6	6	10	6	6	6	6	20	12	6	6	29	30	21	24	30	28	16	NO
	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	
CR51	9	11	13	6	6	6	6	6	25	21	12	6	6	6	6+	6	6	8+	6+	10	SI (CTX, FEP, ATM)
	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
CR52	12	9	6	6	9	6	6	6	24	22	11	6	6	6	6+	6	10	11	10	9	SI (CTX)
	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
CR53	11	11	15	6	9	6	6	6	26	25	18	6	6	6	6+	6	10	13+	12+	13	SI (FEP, ATM)
	R	R	S	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
CR59	13	12	13	6	9	6	6	6	25	15	6	6	6	6	16+	6	20+	21+	23+	10	SI (CTX, CFZ, FEP, ATM)
	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	
CR69	11	18	12	20	25	20	23	20	25	22	12	18	6	20	29	15	23	29	28	20	NO
	R	S	R	S	S	R	S	S	S	S	R	S	R	R	S	R	S	S	S	S	
CR70	10	20	12	25	26	25	23	23	6	22	16	6	6	24	28	20	22	29	27	16	NO
	R	S	R	S	S	S	S	S	R	S	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	
CR72	11	11	6	6	6	6	6	6	6	12	6	6	6	27	33	22	25	33	34	16	NO
	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	R	
CR93	13	15	10	6	23	22	18	19	6	22	18	18	6	32	29	24	24	30	30	20	NO
	R	S	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	
CR98	9	6	6	6	10	6	6	6	28	21	12	6	6	21	28	13	22	29	26	14	NO
	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	R	S	S	S	R	
CR99	20	23	12	6	34	34	30	32	6	25	19	6	6	32	31	24	24	30	30	16	NO
	S	S	R	R	S	S	S	S	R	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	R	
CR115	20	25	15	6	9	6	6	6	6	22	6	6	6	28	28	22	22	29	28	10	NO
	S	S	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	
CR117	15	15	14	6	6	6	6	6	25	22	17	6	6	14	6	6	6	12	10	9	NO
	R	S	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
CR122	15	11	6	6	9	6	8	6	25	19	17	6	6	21	34	23	25	32	32	18	NO
	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	
CR141	20	22	15	30	33	35	27	34	29	22	9	6	6	29	31	26	24	30	30	16	NO
	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R	
CR150	14	15	12	6	9	6	6	6	6	17	12	6	6	26	27	17	20	25	27	10	NO
	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	S	S	R	

CR152	15	20	16	6	6	7	6	6	6	18	18	6	6	25	30	19	21	28	27	9	NO	
	R	S	S	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	R	S	S	S	R		
CR153	16	23	14	6	9	10	6	6	6	19	6	6	6	19	26	18	6	28	25	16	NO	
	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	S	S	R		
CR156	15	23	16	6	6	6	6	6	6	20	18	6	6	25	30	19	24	28	29	11	NO	
	R	S	S	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	R	S	S	S	R		
CR159	18	16	6	6	6	6	6	6	6	17	16	6	6	6	6+	6	6	12+	9+	13	S (CTX, REP, ATM)	
	S	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R		
CR162	6	16	14	6	6	6	15	6	6	16	10	6	6	13	26	26	22	25	27	10	NO	
	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R		
CR182	6	15	6	6	6	7	6	6	6	17	20	6	6	20	27	23	24	26	25	15	NO	
	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	R		
CR185	17	22	16	6	6	6	6	6	6	9	6	6	6	6	23	13	18	26	27	18	NO	
	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S		
CR192	7	15	13	6	7	6	6	6	6	25	19	19	6	6	10	26	21	18	25	27	10	NO
	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	S	R	S	S	S		
CR193	9	18	14	6	9	6	6	6	6	19	18	17	6	6	14	29	23	17	29	28	15	NO
	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	S	R	S	S		
CR204	16	19	15	6	27	15	14	15	13	10	6	6	6	6	6	6	13	12	12	10	NO	
	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R		
CR210	12	15	13	6	12	6	6	6	6	25	20	18	6	6	6	29	18	22	25	29	9	NO
	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	S	R	S	S	S		
CR211	12	15	14	6	10	6	6	6	6	25	18	17	6	6	9	28	15	22	23	27	9	NO
	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	R	S	S	S		
CR214	16	20	9	6	6	16	6	6	6	19	15	6	6	12	25	19	20	27	27	15	NO	
	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S		
CR222	14	20	11	6	10	6	6	6	6	17	6	6	6	11	27	20	19	28	27	14	NO	
	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S		
CR237	16	21	14	6	20	15	18	19	6	20	17	6	6	13	29	20	6	33	30	18	NO	
	R	S	R	R	S	R	S	S	R	S	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S		
003I	15	19	15	6	7	6	6	6	6	17	16	6	6	6	37	17	6	34	34	10	NO	
	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S		
018I	15	14	6	6	10	6	6	6	6	27	17	20	6	6	6	6	6	11+	13	11	S (FER)	
	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R		
019I	11	15	13	6	14	6	6	6	6	25	18	19	6	6	12	29	17	6	24	30	11	NO
	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	S	R	R	S	S		
030I	16	12	6	6	6	6	6	6	6	15	18	6	6	9	32	18	6	32	31	17	NO	
	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	R	S	S	R		
052I	19	15	6	6	6	6	6	6	6	20	19	6	16	15	33	21	6	31	27	17	NO	
	S	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S	S	R	S	S	S		
070I	16	16	6	6	7	6	6	6	6	23	19	16	6	6	15	6+	6	6	13+	12+	15	S (CTX, REP, ATM)
	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R		
079I	14	13	6	6	10	6	6	6	6	20	20	6	6	25	33	23	6	34	33	18	NO	
	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	R	S	S	S		
07 H	16	15	6	6	10	6	6	6	6	21	19	6	6	30	29	23	6	32	32	18	NO	
	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	R	S	S	S		
12 H	15	13	6	6	7	7	6	6	6	19	19	6	6	28	32	22	6	32	32	18	NO	
	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	R	R	S	S	S		
15U	17	14	6	6	6	6	6	6	6	18	19	6	6	13	29	17	6	27	32	11	NO	
	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S	R	R	S	S	R		
46U	16	21	16	25	16	23	25	24	24	19	20	6	6	20	33	19	6	34	32	22	NO	
	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	R	R	S	S	S		
55U	17	20	15	6	7	6	6	6	6	17	18	6	6	16	29	19	6	29	29	11	NO	
	S	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	S	S	R		
56U	20	19	17	6	11	7	7	6	6	17	21	6	7	17	29	19	6	28	29	14	NO	
	S	S	S	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	R	R	S	S	R		
63U	16	20	15	6	7	6	6	6	6	17	21	6	7	13	26	18	6	25	25	12	NO	
	R	S	S	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S	S	R	S	S	R		
73U	15	22	15	22	25	23	25	25	6	17	28	6	12	19	26	17	6	27	25	15	NO	
	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	R	R	S	S	R	S	S	R		
168U	21	23	19	22	32	27	30	32	11	20	17	11	21	21	30	21	6	30	28	19	NO	
	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	S	R	S	S	R	S	S	S		
CD2-26	19	12	6	6	6	6	6	8	6	18	6	6	6	6	6	6	6	15	13	12	NO	
	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R		
CD2-40	17	17	15	20	20	21	21	21	20	15	9	16	12	6	24	19	20	10	19	15	NO	
	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R		



b) Diámetro de los halos obtenidos en los antibiogramas, resultados de resistencia y sensibilidad y producción de BLEE, de las cepas UPEC de serotipo O25:H-

CEPA	Aminoglucósidos			Quinolonas	Fluoroquinolonas				OTROS			β-lactámicos								Producción de BLEE	
	AMK	NET	GM	1ra G	2a G				TSM	NF	C	AM	Cefalosporinas						ATM		AMC
				AN	LVX	CIP	OFX	NOR					1ra G	2a G		3a G		4a G			
												CF	CRO	CTX	CFX	CFZ	FBP				
CR67	24	19	7	6	14	6	7	6	6	22	22	6	27	19	30	21	6	30	29	18	NO
	S	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	R	S	S	R	S	S	S	
CR161	20	21	17	6	8	6	6	6	28	20	22	6	15	16	29	22	6	29	28	20	NO
	S	S	S	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	S	S	R	S	S	S	
CR213	18	22	16	6	11	6	6	6	6	17	20	6	13	15	26	16	6	25	24	18	NO
	S	S	S	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S	R	R	S	S	S	
CR240	18	19	15	6	12	6	6	6	6	21	19	6	16	16	28	22	10	29	28	20	NO
	S	S	S	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S	S	R	S	S	S	
CR245	18	22	18	20	28	29	29	26	6	17	23	6	17	15	26	20	6	27	30	17	NO
	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	R	R	S	S	R	S	S	R	
095I	17	18	6	6	11	6	6	6	6	19	17	6	14	16	26	19	6	29	24	17	NO
	S	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	S	S	R	
O28 bl	20	24	17	24	33	29	32	30	6	19	16	6	16	15	29	19	6	28	26	16	NO
	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	R	R	S	S	R	S	S	R	
6U	17	25	20	6	12	6	6	6	25	19	22	6	6	12	6+	6	6	6	6	15	SI (CTX)
	S	S	S	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	

c) Factores de virulencia encontrados en las cepas UPEC de serotipo O25:H4.

Muestra	Factores de Virulencia													Nº de FV
	PCRm1				PCRm2					PCRm3			cnf	
	fimH	fliC	satA	iucD	iha	vatP	vatA	papG3	papG2	papA	satP	hlyA		
CR04	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	4
CR07	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	3
CR14	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	3
CR15	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	4
CR19	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	4
CR22	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	4
CR33	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	2
CR35	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	5
CR50	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	4
CR51	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	4
CR52	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	5
CR53	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	4
CR59	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	4
CR69	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	6
CR70	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	5
CR72	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
CR93	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	4
CR98	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	6
CR99	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4
CR115	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	3
CR117	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	4
CR122	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	4
CR141	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
CR150	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	4
CR152	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	4
CR153	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	9
CR156	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	4
CR159	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	4
CR162	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	2
CR182	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	4
CR185	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	4
CR192	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	4
CR193	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	6
CR204	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
CR210	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	6
CR211	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	4
CR214	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	5
CR222	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	6
CR237	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	3
003 I	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	4
018 I	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	4
019 I	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	5
030 I	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	4
052 I	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	5
070 I	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	9
079 I	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	5
07 H	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	5
12 H	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	5
15U	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	4
46U	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
55U	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
56U	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
63U	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	3
73U	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
168U	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	4
CD2-2E	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	8
CD2-4C	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1

d) Factores de virulencia encontrados en las cepas UPEC de serotipo O25:H<sup>-</sup>.

Muestra	Factores de Virulencia													Nº de FV
	PCRm1				PCRm2					PCRm3			cnf	
	fimH	fliC	sata	iucD	iha	vatP	vatA	papG3	papG2	papA	satP	hlyA		
CR67	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	4
CR161	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	4
CR213	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	4
CR240	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	6
CR245	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	5
O28 bl	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	5
O95 I	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	4
6U	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	4

e) Datos generales, grupo filogenético, PAIs y número de plásmidos de las cepas UPEC de serotipo O25:H4.

Muestra	Sexo	Edad	Filogenia					Grupo	PAIs				# plásmidos
			Genes				PAI I <sub>gen</sub>		PAI II <sub>gen</sub>	PAI I <sub>sm</sub>	PAI II <sub>sm</sub>		
			stx2	stx1	hlyE	hlyN							
CR04	F	75	+	+	+	-	B2	+	+	-	-	2	
CR07	F	59	+	+	+	-	B2	+	+	-	-	2	
CR14	F	79	+	+	+	-	B2	+	+	-	-	2	
CR15	F	57	+	+	+	-	B2	+	+	-	-	2	
CR19	F	38	+	+	+	-	B2	+	+	-	-	5	
CR22	M	75	+	+	+	-	B2	+	+	-	-	3	
CR33	F	34	+	+	+	-	B2	+	-	-	-	1	
CR35	F	67	+	+	+	-	B2	+	-	-	-	5	
CR50	F	78	+	+	+	-	B2	+	+	-	-	5	
CR51	F	26	+	+	+	-	B2	+	-	-	-	4	
CR52	M	77	+	+	+	-	B2	+	+	-	-	6	
CR53	F	30	+	+	+	-	B2	+	+	-	-	4	
CR59	F	23	+	+	+	-	B2	+	+	-	-	2	
CR69	F	4	+	+	+	-	B2	+	+	-	-	0	
CR70	F	37	+	+	+	-	B2	+	-	-	+	1	
CR72	F	88	+	+	-	-	B2	+	-	-	-	5	
CR93	F	59	+	+	+	-	B2	+	-	-	-	5	
CR98	F	73	+	+	+	-	B2	+	-	-	-	2	
CR99	F	65	+	+	+	-	B2	+	-	-	-	6	
CR115	F	19	-	+	-	-	A	+	-	-	-	1	
CR117	F	87	+	+	+	-	B2	+	-	-	-	2	
CR122	F	4	+	+	+	-	B2	+	-	-	-	5	
CR141	F	42	+	+	+	-	B2	+	-	-	-	2	
CR150	F	21	+	+	+	-	B2	+	-	-	-	2	
CR152	M	52	+	+	+	-	B2	+	-	-	-	3	
CR153	F	64	+	+	+	-	B2	+	+	-	-	4	
CR156	F	96	+	+	+	-	B2	+	+	-	-	5	
CR159	F	77	+	+	-	-	B2	+	-	-	-	6	
CR162	F	70	-	+	-	+	C	-	-	-	-	0	
CR182	F	84	+	+	+	-	B2	+	+	-	-	0	
CR185	F	53	+	+	+	-	B2	+	+	-	-	1	
CR192	M	53	+	+	+	-	B2	+	+	-	-	2	
CR193	F	53	+	+	+	-	B2	+	-	-	-	2	
CR204	F	81	+	+	+	-	B2	+	-	-	-	0	
CR210	F	83	+	+	+	-	B2	+	+	-	-	4	
CR211	F	60	+	+	+	-	B2	+	+	-	-	4	
CR214	M	59	+	+	+	-	B2	+	-	-	-	4	
CR222	F	62	+	+	-	-	B2	+	+	-	-	3	
CR237	F	3	-	+	-	+	C	-	-	-	-	0	
003 I	F	56	+	+	+	-	B2	+	+	-	-	0	
018 I	F	46	+	+	+	-	B2	+	-	-	-	4	
019 I	F	3	+	+	+	-	B2	+	-	-	-	3	
030 I	F	61	+	+	+	-	B2	+	+	-	-	6	
052 I	F	63	+	+	+	-	B2	+	+	-	-	3	
070 I	F	78	+	+	+	-	B2	+	+	-	+	0	
079 I	F	54	+	+	+	-	B2	+	+	-	-	0	
07 H	F	*	+	+	+	-	B2	+	+	-	-	4	
12 H	F	*	+	+	+	-	B2	+	+	-	-	0	
15U			+	+	+	-	B2	+	+	-	-	2	
46U			+	+	+	-	B2	+	+	-	-	0	
55U			+	+	+	-	B2	+	+	-	-	4	
56U			+	+	+	-	B2	+	+	-	-	0	
63U			+	+	+	-	B2	+	+	-	-	5	
73U			+	+	+	-	B2	+	+	-	-	0	
168U			-	+	-	-	C	+	+	-	-	2	
CD2-26	F		+	+	+		B2	+	+	-	-	3	
CD2-40	F		-	+	-	-	A	+	+	-	-	0	

f) Datos generales, grupo filogenético, PAIs y número de plásmidos de las cepas UPEC de serotipo serotipo O25:H<sup>-</sup>.

Muestra	Sexo	Edad	Filogenia				Grupo	PAIs				# plásmidos
			Genes					PAI I <sub>gen</sub>	PAI II <sub>gen</sub>	PAI I <sub>pl</sub>	PAI II <sub>pl</sub>	
			stx2	ypj4	hlyE	hlyE <sub>2</sub>						
CR67	F	59	+	+	+	-	B2	+	+	-	-	6
CR161	M	94	+	+	+	-	B2	-	+	-	-	5
CR213	F	35	+	+	+	-	B2	+	+	-	-	6
CR240	F	21	+	+	-	-	B2	+	+	-	-	1
CR245	M	4	+	+	-	-	B2	+	+	-	-	1
O28 bl	*	*	+	+	+	-	B2	+	-	-	-	3
O95 l	M	65	+	+	-	-	B2	+	-	-	-	5
6U	Niños 0-5		+	+	+	-	B2	+	+	-	-	3

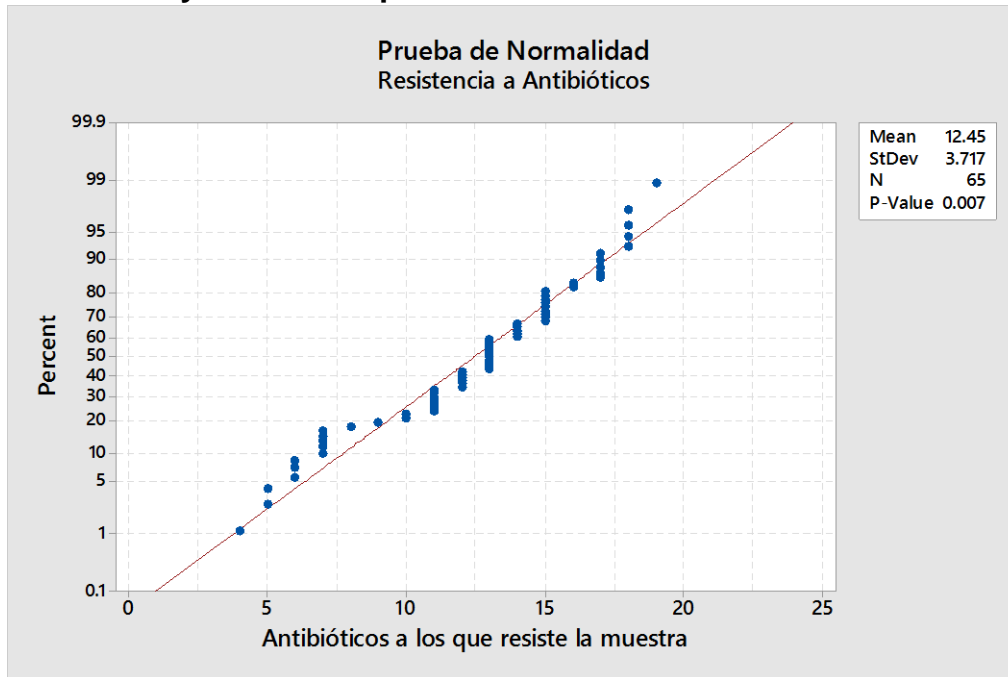
**g) Tamaño de los plásmidos encontrados en las cepas de UPEC de serotipo O25:H4.**

Cepa	100 kb	90 kb	>10 kb	8 kb	7 kb	5kb	4 kb	3 kb	2 kb	1 kb	< 1 kb	# plásmidos
CR04										1,2	0,9	2
CR07									2,6, 2,7			2
CR14										1,0, 1,7		2
CR15									2,9	1		2
CR19			37,8						2,8, 2,1, 2,2	1,2		5
CR22									2,8, 2,6	1,2		3
CR33										1,3		1
CR35			42,2					3,7	2	1,1, 1,8		5
CR50			42,3					3,5, 3,2		1,5, 1,1		5
CR51								3,4, 3,2	2,8	1,2		4
CR52			42,2					3,2, 3,5	2,6, 2,8	1,2		6
CR53								3,5, 3,2		1,6, 1,2		4
CR59			40,8, 38									2
CR60												0
CR70	105,9											1
CR72		92							2,2, 2,1	1,2	0,85	5
CR93	105,9								2,2, 2,1	1,2	0,85	5
CR98	105,9								2,6			2
CR99	119,5								2,6, 2,1	1,6, 1,3	0,85	6
CR115		92										1
CR117	119,5							3,7				2
CR122	119,5				7,3			3,7, 3,6		1		5
CR141	119,5							3,7				2
CR150	119								2,1			2
CR152	127						4			1		3
CR153	119,5							3,0, 3,7		1,5		4
CR156	127						4,2	3,3	2,9	1		5
CR159	119,5, 127								2,4, 2	1,8	0,9	6
CR162												0
CR182												0
CR185										1,2		1
CR192								3,9		1,3		2
CR193										1,7, 1,3		2
CR204												0
CR210		90,2				5,6	4,1			1,3		4
CR211						5,6		3,8, 3,6		1,2		4
CR214								3,5	2,8	1,9, 1,5		4
CR222	113,9									1,5, 1,1		3
CR237												0
003 I												0
018 I								3,7, 3,3		1,2, 1,5		4
019 I							4,7	3,3		1,2		3
030 I	116,1		77,2	8,8			4	3,3		1,2		6
052 I			58,8	8,8				3,8, 3,2				3
070 I												0
079 I												0
07 H			63,0					3,2	2,4	1,1		4
12 H												0
15U			75					3,5				2
46 U												0
55 U			59,7				4,3			1,4, 1		4
56 U												0
63U	104,7				7,4			3,2	2,9	1,1		5
73 U												0
168U	109,3		59,6									2
CD2-26			84							1,5, 1,1		3
CD2-40												0

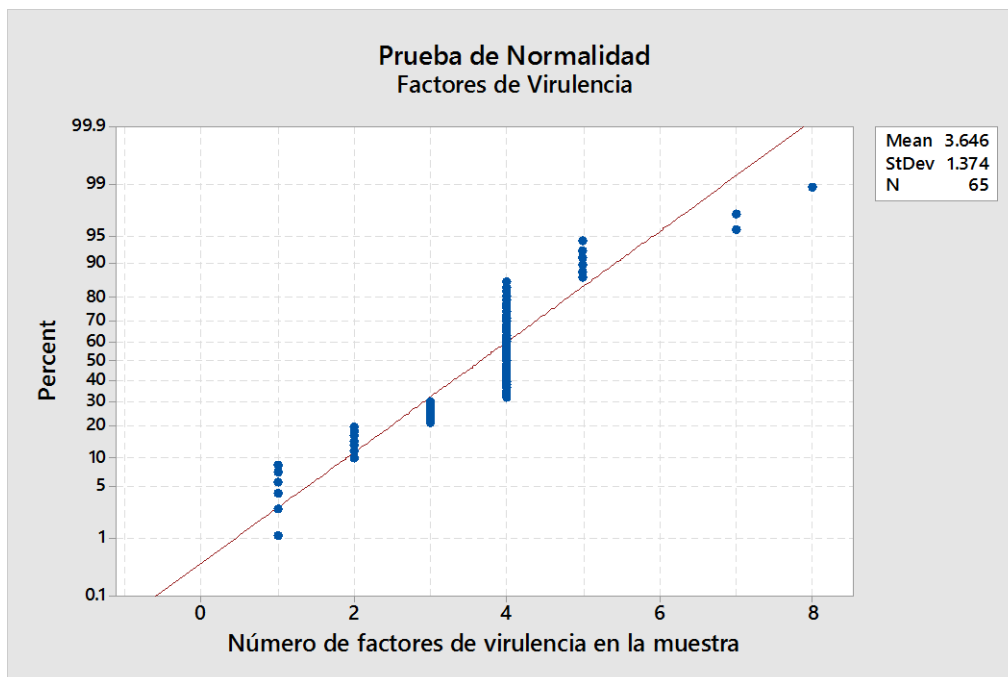
**h) Tamaño de los plásmidos encontrados en las cepas de UPEC de serotipo O25:H-**

Cepa	100 Kb	90 kb	>10 kb	8 kb	7 kb	5kb	4 kb	3 kb	2 kb	1 kb	< 1 kb	# plásmidos
CD2-40												0
CR67	100.3							3.3, 3.1	2, 2.9, 2.4			6
CR161		92						3.2, 3.1		1.5, 1.1		5
CR213		98.1	53.5		7.4		4.5	3.1	2.4			6
CR240			66.5									1
CR245										1.3		1
O95 I	100.3								2.9, 2.3			3
O28 bI	100.3		53.5					3.1		1.3, 1		5
6 U		91							2.4	1.3		3

i) Pruebas de normalidad de resistencia a antibióticos, factores de virulencia y número de plásmidos

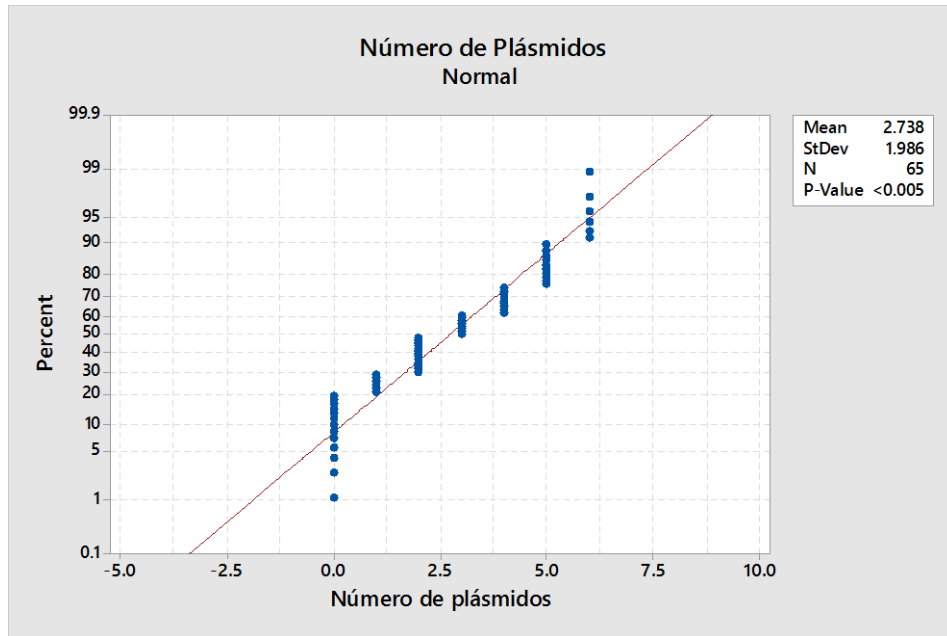


Gráfica 1. Prueba de normalidad de las resistencia a antibióticos de las cepas de UPEC de serogrupo O25.



Gráfica 2. Prueba de normalidad de los factores de virulencia de las cepas de UPEC de serogrupo O25.





**Gráfica 3. Prueba de normalidad del número de plásmidos de las cepas de UPEC de serogrupo O25.**