



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARRERA DE BIOLOGÍA

“RELACIÓN FILOGENÉTICA DEL SEROTIPO O25:H4 DE *Escherichia coli*
UROPATÓGENA Y AVIAR”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

BIÓLOGA

(BIOLOGÍA DEL DESARROLLO)

P R E S E N T A

JANI AZUCENA OLVERA MALDONADO

DIRECTOR DE TESIS: DRA. MARIA DEL ROSARIO MORALES ESPINOSA

ASESOR INTERNO: M.EN C. JORGE ANTONIO VALDIVIA ANISTRO



México, D.F., Agosto 25, 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

"ZARAGOZA"

DIRECCIÓN

JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
P R E S E N T E.

Comunico a usted que la alumna **OLVERA MALDONADO JANI AZUCENA**, con número de cuenta **408090735**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **25 de agosto de 2015** a las **13:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

PRESIDENTE Dr. MANUEL FERIA ORTIZ

VOCAL Dra. MARÍA DEL ROSARIO MORALES ESPINOSA*

SECRETARIO M. en C. JORGE ANTONIO VALDIVIA ANISTRO

SUPLENTE M. en C. CATALINA MACHUCA RODRÍGUEZ

SUPLENTE Dra. HORTENSIA ROSAS ACEVEDO

[Handwritten signatures and names of the jury members]

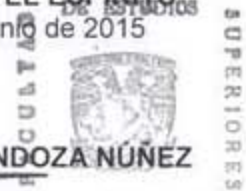
El título de la tesis que presenta es: **Relación filogenética del serotipo O25:H4 de *Escherichia coli* uropatógena y aviar.**

Opción de titulación: Tesis.

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
México, D. F., a 05 de junio de 2015

DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ
DIRECTOR



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"
DIRECCIÓN

VO. BO.
M. en C. ARMANDO CERVANTES SANDOVAL
JEFE DE CARRERA

RECIBÍ
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO



Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Genómica Bacteriana del Departamento de Microbiología y Parasitología, ubicado en el 5to piso de la Torre de Investigación de la Facultad de Medicina, UNAM.

Este proyecto fue apoyado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica de la Dirección General de Apoyo al Personal Académico, UNAM (DGAPA-UNAM PAPIIT) con el proyecto PAPIIT IN212513 y por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con el proyecto 100343.

Agradecimientos

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** por permitirme entrar a sus aulas para formarme como profesionista, así como por brindarme la oportunidad de aprender y desarrollarme en otras disciplinas.

A la **Dra. María del Rosario Morales Espinosa** por abrirme las puertas de su laboratorio y permitir que formara parte de este proyecto, así como por mostrarme su apoyo y brindarme asesoría, al dirigir este trabajo.

Al **M.en C. Jorge Antonio Valdivia Anistro** por su asesoría y ayuda para la elaboración del presente escrito, muchas gracias por la enorme paciencia y los consejos.

A la **Dra. Gabriela Delgado Sapién** por su amistad, interés y consejos, así como por su asesoría técnica en el proceso experimental y por su asesoría y tutela en la parte teórica de este trabajo.

Al **Biol. José Luis Méndez** por su amistad, su gran sentido del humor y por hacerme la estancia en el laboratorio tan amena, por su ayuda y asesoramiento en todo el proceso experimental de esta tesis.

A los miembros del jurado:

Dr. Manuel Feria Ortiz

Dra. María del Rosario Morales

M.en C. Jorge Antonio Valdivia Anistro

M. en C. Catalina Machuca Rodríguez

Dra. Hortensia Rosas Acevedo

Por la dedicación de su tiempo para contribuir con sus observaciones al mejoramiento de esta tesis. Gracias.

Dedicatorias

A mi familia:

“El amor auténtico se encuentra siempre hecho. En este amor un ser queda adscrito de una vez para siempre y del todo a otro ser. Es el amor que empieza con el amor.”

José Ortega y Gasset

Gracias por la paciencia, los momentos (buenos y malos), las risas, los consejos, los regaños, los abrazos, el cariño, la confianza, la vida, los acuerdos y desacuerdos, el consuelo, la amistad, la hermandad, las pláticas, el amor incondicional.

El diccionario de la Real Academia Española define la palabra proveniente del latín *totus* en español todo, como el adjetivo que se toma o se comprende enteramente en la entidad o el número, cosa íntegra, algo que es enteramente. A mi familia muchas gracias por todo, absolutamente todo.

A mis amigos:

“No hay soledad más triste ni aflictiva que la de un hombre sin amigos, sin los cuales, el mundo es un desierto, pues vivir sin amigos no es vivir.”

Francis Bacon

Gracias a todos ustedes por hacer de mi mundo, un mundo mejor, gracias por caminar a mi lado.

“No podemos confiar en construir un mundo mejor sin mejorar los individuos. Con este propósito cada uno de nosotros debe trabajar su propio perfeccionamiento, aceptando en la vida general de la humanidad, su parte de responsabilidad, ya que nuestro deber particular es el de ayudar a aquellos a quienes podemos ser útiles.”

Marie Curie

Índice

Índice de tablas.....	i
Índice de figuras.....	ii
Resumen	iii
1. Introducción.....	1
1.1 <i>Escherichia coli</i>.....	1
1.2 <i>E.coli</i> uropatógena (UPEC).....	5
1.3 Infección del tracto urinario	7
1.3.1 Etiología de ITU	9
1.4 <i>E. coli</i> patógeno aviar (APEC).....	11
1.5 Colibacilosis	12
1.6 <i>E.coli</i> serotipo O25:H4	13
1.7 Métodos básicos de tipificación bacteriana	15
1.7.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	17
1.7.2 Electroforesis en gel de agarosa	18
1.7.3 Tipificación de secuencias multilocus (MLST).....	19
2. Hipótesis	23
3. Objetivo	24
3.1 Objetivo General.....	24
3.2 Objetivos Particulares.....	24
4. Material y Método	25
4.1 Cepas de <i>E. coli</i> uropatógena (UPEC) y patógena aviar (APEC)	25
4.1.1 Procedencia de las cepas.....	26
4.1.2 Aislamiento, identificación con pruebas bioquímicas y almacenamiento	26

4.2 Extracción de DNA genómico bacteriano por el método de GES	27
4.3 Reacción de cadena de la polimerasa (PCR) de los genes de metabolismo básico	28
4.4 Secuenciación y edición de las secuencias	30
4.5 Obtención de tipo de secuencia (ST).....	31
4.6 Análisis filogenético	32
5. Resultados	33
5.1 Determinación de tipo de secuencia (ST)	33
5.2 Análisis filogenético	36
6. Discusión	46
7. Conclusión y perspectivas	49
8. Bibliografía.....	50
9. Apéndices	57

Índice de tablas

Tabla 1. Características bioquímicas de <i>E. coli</i>	2
Tabla 2. Cepas UPEC y APEC y la fuente de su obtención	25
Tabla 3. Genes de metabolismo básico y su producto	28
Tabla 4. Preparación de los tubos de reacción de PCR para genes de metabolismo básico.....	29
Tabla 5. Programa de amplificación por PCR para los 7 genes de metabolismo básico.....	29
Tabla 6. Genes de metabolismo básico, temperatura de alineamiento y tamaño del amplificado	30
Tabla 7. Cepas de referencia.....	31

Índice de figuras

Figura 1. Interacción entre UPEC y huésped en ITU.....	5
Figura 2. Visitas por cistitis e infección del tracto urinario (ITU)	8
Figura 3. Variación de la bacteriología de ITU de acuerdo a la población.....	10
Figura 4. Distribución internacional de <i>E.coli</i> O25:H4 ST 131 con ESBL CTX-M y multi-resistencia a antibióticos.....	14
Figura 5. Esquema de técnica de PCR	18
Figura 6. Esquema de procedimiento utilizado en la técnica de MLST	22
Figura 7. Carta de aceptación de secuencia de nuevo alelo de <i>mdh</i>	34
Figura 8. ST de cepas de UPEC y APEC	34
Figura 9. ST de cepa UPEC17	35
Figura 10. ST de cepa UPEC21	35
Figura 11. Dendograma del gen <i>adh</i>	38
Figura 12. Dendograma del gen <i>fumC</i>	39
Figura 13. Dendograma del gen <i>gyrB</i>	40
Figura 14. Dendograma del gen <i>icd</i>	41
Figura 15. Dendograma del gen <i>mdh</i>	42
Figura 16. Dendograma del gen <i>purA</i>	43
Figura 17. Dendograma del gen <i>recA</i>	44
Figura 18. Concatenado de 7 genes de metabolismo básico	45

Resumen

Escherichia coli es una bacteria que coloniza el tracto gastrointestinal de humanos, comúnmente es una bacteria comensal, sin embargo existen cepas que ocasionan diferentes patologías. Los síndromes clínicos resultantes de la infección por *E. coli* pueden ser: enfermedad diarreica acuosa o diarrea con moco y sangre, infección del tracto urinario, sepsis o meningitis. *E. coli* uropatógena (UPEC) coloniza el tracto urinario, este patotipo ha desarrollado diversas estrategias con el fin de persistir en este y son capaces de causar brotes de infecciones. La infección del tracto urinario (ITU), se define como la colonización y multiplicación de cualquier microorganismo en el aparato urinario con una respuesta inflamatoria del urotelio. *E. coli* es parte de la microbiota normal del intestino de aves, las cepas denominadas patógeno aviar (APEC) han adquirido factores de virulencia, que les confieren la habilidad de colonizar órganos internos y producir colibacilosis, enfermedades de tracto respiratorio y septicemia en aves de corral, siendo la colibacilosis la enfermedad más frecuentemente reportada en la industria avícola, ya que acarrea grandes pérdidas, por la mortandad que genera.

Se ha manejado que *Escherichia coli* del serotipo O25:H4 asociado a infección de vías urinarias es una zoonosis derivada de *E. coli* del mismo serotipo que afecta a aves de postura. En el presente trabajo utilizando la técnica de Tipificación de secuencias multilocus (MLST), se determinó la relación filogenética de 40 cepas de *E. coli* del serotipo O25:H4 aisladas de infección de vías urinarias de humanos y de infecciones de aves de postura, a través de la caracterización de alelos de 7 genes de metabolismo básico.

Se obtuvieron 7 dendogramas, uno por cada gen, que muestran la relación genética que existe entre las cepas analizadas, y uno que concatena a los 7 genes analizados. En la mayoría de los genes se agruparon 39 de las 40 cepas estudiadas perteneciendo al mismo tipo de secuencia (ST), siendo la excepción UPEC 17 cuyo ST fue distinto ya que presentó un mayor número de cambios en sus secuencias respecto a las otras cepas analizadas y UPEC 21 cuya secuencia del gen *mdh* presentó un cambio de nucleótido en un loci no registrado con anterioridad, lo cual conlleva a un nuevo registro en la base de datos de MLST de la Universidad de Warwick y en la obtención de un ST y un complejo ST nuevos. Analizando conjuntamente los 7 genes de metabolismo básico en el concatenado, se tiene que 38 cepas se encuentran en el mismo grupo y su ST es el mismo, lo que indica que respecto al genoma conservado, no existe diferencia entre APEC y UPEC y que en ambos patotipos existen cepas clonales, lo cual indica que es probable que ambas cepas tienen un ancestro común.

1. Introducción

1.1 *Escherichia coli*

El género de bacterias *Escherichia* está conformado por diversas especies, *Escherichia coli* es una de ellas; se trata de una bacteria que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, posee diversas características como ser Gram-, no desarrollar esporas, tener forma de bacilo, y un tamaño aproximado de 2 a 3 x 0.6 µm (Eslava *et al.*, 1994; Farmer, 1995; Nataro y Kaper, 1998).

Se trata de una bacteria cuyo genoma contiene un total de 5,000 genes. También posee plásmidos que son responsables tanto de la producción de toxinas como de la resistencia a diversos antimicrobianos (Barnes *et al.*, 2003; Romero-Caballo, 2007).

E. coli crece en medios nutritivos a temperaturas de 18 a 44°C. En placas de agar incubadas por 24 horas a 37°C, crecen colonias de apariencia convexa, con aspecto liso y de color rosa brillante, con un diámetro de 1 a 3 mm y textura granular (Barnes *et al.*, 2003).

Esta bacteria coloniza el tracto gastrointestinal de los humanos en las primeras horas después del nacimiento, se trata de un competidor exitoso, siendo el organismo anaerobio facultativo más abundante de la microbiota intestinal en humanos; además de estar presente en el intestino de otros animales de sangre caliente. Por lo general, la interacción de *E. coli* con su hospedero, les permite obtener beneficios mutuos, por ello es conocida como una bacteria comensal; sin embargo existen cepas que pueden ocasionar diferentes patologías en el hospedero. *E. coli* es un organismo móvil, ya que cuenta con flagelos peritricos, fimbrias y pilis, cabe mencionar que muchas cepas producen una pequeña microcápsula (Eslava *et al.*, 1994; Farmer, 1995; Nataro y Kaper, 1998).

E. coli tiene un patrón de susceptibilidad a agentes físicos y químicos, así como a elevadas temperaturas, entre 60 y 70°C, por 2 a 30 minutos inactivan la mayoría de las cepas, sin embargo, este organismo sobrevive al congelamiento y a

periodos largos a bajas temperaturas, sobreviviendo de 1 a 2 días a 37°C y de 6 a 22 semanas a 4 °C. La reproducción de la mayoría de las cepas es inhibida a un pH menor a 4.5 o mayor a 9; concentraciones salinas de 8.5 % prevendrán el crecimiento pero no inactivan a esta bacteria (Barnes *et al.*, 2003).

Bioquímicamente *E. coli* presenta distintas características que permiten su identificación y diferenciación en laboratorio (Tabla 1).

Prueba bioquímica	% de positividad	Prueba bioquímica	% de positividad	Prueba bioquímica	% de positividad
Oxidasa	0	Movilidad a 36 °C	95	Fermentación de L-ramnosa	80
Producción de indol	98	Hidrólisis de gelatina a 22 °C	0	Fermentación de maltosa	95
Rojo de metilo	99	KCN crecimiento en	3	Fermentación de D-xilosa	95
Voges-Proskauer	0	Fermentación de lactosa	95	Fermentación de trealosa	98
Citrato de Simmons	1	Fermentación de la sacarosa	50	Fermentación de celobiosa	2
H ₂ S (TSI)	1	Fermentación de D-manitol	98	Fermentación de α-metil-D glucósido	0
Hidrólisis de urea	1	Fermentación de D-sorbitol	94	Fermentación de eritritol	0
Utilización de malonato	0	Fermentación de mucato	95	Hidrólisis de la esculina	35
Acido de glucosa	100	Fermentación de dulcitol	60	Fermentación de melobiosa	75
Gas de glucosa	95	Fermentación de salicina	40	Fermentación de D-arabitol	5
Fenilalanina desaminasa	0	Fermentación de adonitol	5	Fermentación de D-manosa	98
Lisina descarboxilasa	90	Fermentación de inositol	1	Fermentación de glicerol	75
Arginina dihidrolasa	17	Fermentación de L-arabínosa	99	Nitrato a nitrato	100
Ornitina descarboxilasa	65	Fermentación de la refinosa	50	Tartrato de Jordán	95

Tabla 1. Características bioquímicas de *E. coli*

(Tomado y modificado de Farmer, 1995)

Los serotipos de *E. coli* son clasificados de acuerdo al esquema creado por Ewing, (1986), el cual está basado en el reconocimiento de los antígenos O, K, H y F. Hasta el momento, se han cuantificado 167 antígenos O; 74 K; 53 H y 17 F (Ewing, 1986). Los antígenos O (somáticos), están compuestos por un complejo de polisacáridos y fosfolípidos con una fracción proteica que les otorga resistencia a la ebullición, estos son liberados durante la lisis celular. Los antígenos K (capsulares), son ácidos poliméricos que contienen 2% de azúcares reducidos, éstos están asociados a virulencia y se encuentran presentes en la superficie de la célula, interfieren con la aglutinación del antígeno O y pueden ser removidos por calentamiento a 100°C durante una hora, con base a la estabilidad térmica los antígenos K se subdividen en L, A y B. Para examinar los antígenos H (flagelares) deben de cultivarse en condiciones que promuevan movilidad en el organismo, no se correlacionan con patogenicidad, se tratan de proteínas que son destruidas al calentarse a 100 °C. Los antígenos F (pilus) están involucrados en la adhesión celular (Ewing, 1986; Barnes *et al.*, 2003).

Aparte de la serotipificación los aislados de *E.coli*, pueden ser caracterizados de acuerdo a su resistencia a antibióticos, toxigenicidad, presencia de adhesinas, patrón de adherencia celular, hemaglutinación, lisogenia, y presencia de plásmidos (Barnes *et al.*, 2003).

E. coli se puede aislar a partir de muestras clínicas en medios selectivos e identificarse por el estudio de sus propiedades metabólicas; sin embargo, únicamente ciertas cepas poseen mecanismos de patogenicidad y factores de virulencia. Los factores de virulencia se definen como productos codificados por genes presentes en el cromosoma o en un elemento móvil que contribuyen a la patogénesis, generalmente estos factores de virulencia le confieren a la bacteria la capacidad de adaptarse a nuevos nichos, así como de causar diversas enfermedades. Los genes que codifican para estos factores pueden ser transferidos entre diferentes cepas de la misma especie e incluso entre géneros, creándose nuevas combinaciones, solo las combinaciones más exitosas persisten para volverse nuevos patotipos (Nataro y Kaper, 1998).

Los mecanismos de patogenicidad, corresponden fundamentalmente a dos tipos: 1) adherencia, indispensable para que la bacteria puede acercarse, adherirse a la superficie de la célula epitelial y colonizar el epitelio de ciertas áreas del intestino; 2) producción de proteínas (enzimas, toxinas), liberadas una vez que la bacteria ha colonizado el intestino y con un efecto final en la célula blanco. Existe un tercer mecanismo, el cual es invasión y reproducción bacteriana dentro del citoplasma de las células epiteliales del intestino, lo cual permite a las bacterias evadir los mecanismos de protección del hospedero una vez que se encuentra en el interior de la célula, sin embargo este mecanismo, no es general, ya que no todas las bacterias evaden respuesta inmune internalizándose, siendo únicamente las que son intracelulares facultativas u obligadas. Utilizando el esquema serológico de Kauffman-White, que está basado en la identificación de antígenos de superficie, se han identificado cepas de *E. coli* caracterizadas por compartir el antígeno O (polisacárido) y el H (flagelar), concluyéndose, que únicamente un grupo restringido de serotipos están asociados con la enfermedad diarreica (Nataro y Kaper, 1998).

Diferentes síndromes clínicos pueden resultar de la infección por *E. coli*, estos son: enfermedad diarreica acuosa o diarrea con moco y sangre, infección del tracto urinario, sepsis o meningitis. Entre los patotipos causantes de enfermedades intestinales se encuentran siete categorías bien definidas, *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigenica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* adherente difusa (DAEC) y *E. coli* adherente invasiva (AIEC). Dentro de los patotipos extraintestinales (ExPEC) se tienen tres categorías, *E. coli* asociada a la meningitis (MNEC), causante de meningitis y sepsis, *E. coli* uropatógena (UPEC), causante de infecciones del tracto urinario y *E. coli* patógeno aviar (APEC), causante de infecciones respiratorias, septicemia, pericarditis en aves de corral (Nataro y Kaper, 1998; Croxen *et al.*, 2013).

1.2 *E. coli* uropatógena (UPEC)

UPEC se caracteriza por colonizar el tracto urinario (Figura 1), preferentemente la vejiga, siendo el agente causante de cistitis. Algunas cepas pueden ascender a través de los uréteres a los riñones, ocasionando pielonefritis. En respuesta a esta invasión por parte de UPEC al tracto urinario, se desencadenan respuestas inflamatorias por parte del organismo huésped, liberándose citosinas, reclutándose neutrófilos y controlándose el microorganismo, utilizando mecanismos dependientes de especies reactivas de oxígeno (Wiles *et al.*, 2008).

UPEC ha desarrollado diversas estrategias para evadir las respuestas del sistema inmunológico, con el fin de colonizar y persistir en el tracto urinario. Este tipo de cepas poseen la habilidad de unirse a receptores específicos de tejidos del hospedero, lo cual le permite resistir el flujo de orina, facilitando la invasión de células uroteliales (Mulvey *et al.*, 1998). Dentro de las células epiteliales de la vejiga, UPEC es transportada en estructuras similares a los lisosomas. En las células de la superficie de la vejiga UPEC es capaz de irrumpir en el citosol en la célula hospedera y multiplicarse, formando comunidades de biofilms que contendrán miles de bacterias; en respuesta, las células de la vejiga comenzaran un mecanismo de exfoliación, lo cual ayudara a eliminar bacterias a través del flujo de orina. Sin embargo, este proceso dejará expuestas las capas inferiores de células epiteliales inmaduras, las cuales son más susceptibles a la infección (Mulvey *et al.*, 1998; 2001; Anderson *et al.*, 2003; Eto *et al.*, 2006; 2007).



1. Pili tipo-1 (excreción toxinas, factores de virulencia)
- 2,3. Sideróforos (enterobactina/salmoquelina) para adquirir hierro en competencia con moléculas quelantes de hierro del huésped y lipocalina-2 (discos blancos), Pili tipo-1, media adhesión e invasión a células epiteliales (vejiga).
4. Células epiteliales (hexagonales/pentagonales), blancos primarios de invasión, UPEC se multiplica formando biofilms, la exfoliación de células facilita la limpieza, las células inmaduras descubiertas son más susceptibles.
5. Liberación o flujo de salida de UPEC antes que termine exfoliación, esto promueve diseminación y persistencia en el tracto urinario
6. Generación de especies reactivas de O₂ y N₂ y péptidos antimicrobianos.

Figura 1. Interacción entre UPEC y huésped en ITU

(Tomado y modificado de Wiles *et al.*, 2008).

Los factores de virulencia expresados por UPEC son hemolisinas, adhesinas, proteínas de membrana, lipopolisacáridos, sistemas capsulares de adquisición de hierro, fimbrias, expresión de fimbria P, aerobactina, resistencia al suero y presencia de la capsula. Diferentes trabajos han asociado la presencia de algunos factores de virulencia con el desarrollo de pielonefritis aguda, cistitis o bacteriuria asintomática. El genoma secuenciado de algunas cepas UPEC muestra que éstas cepas difieren de las cepas intestinales comensales representado por *E. coli* K-12 (Bahrani-Mougeot *et al.*, 2002).

Las cepas de UPEC son capaces de causar brotes de infecciones, ya que portan largos bloques de genes de virulencia agrupados en islas asociadas a patogenicidad (PAIs, por sus siglas en inglés), las cuales le confieren a las cepas la habilidad de infectar el tracto urinario de un huésped inmunocompetente. Las PAIs fueron descritas por primera vez por Jorg Hacker y colegas (Hacker, 1990), refiriéndose a las regiones de DNA mayores a 30 Kb asociadas con organismos patógenos y que albergan genes asociados de virulencia no comúnmente encontrados en el genoma de una *E. coli* intestinal. Estas islas están asociadas a genes de ARNt, tienen un contenido G + C diferente que el ADN del huésped y presentan genes de movilidad (transposones y elementos de inserción). Todas estas características y propiedades sugieren que las PAIs han sido transferidas al cromosoma de UPEC vía transferencia horizontal. Múltiples PAIs han sido descritas en cada uno de las tres cepas uropatógenas de *E. coli* 536, J96 y CFT073 (Bahrani-Mougeot *et al.*, 2002).

1.3 Infección del tracto urinario

La infección del tracto urinario (ITU) se define como la colonización y multiplicación de cualquier microorganismo, habitualmente bacterias en el aparato urinario, que puede involucrar, ya sea únicamente la uretra o también riñones y próstata. Así mismo, se ha descrito la existencia de una respuesta inflamatoria del urotelio, resultado de dicha colonización (González y Schaeffer ,1999; Hernando-Avenida, 2008).

Las infecciones del tracto urinario se clasifican en bajas o superiores, se trata de ITU inferior cuando están confinadas a la vejiga y superior cuando involucra riñón. Se pueden clasificar también en no complicadas o complicadas, siendo las primeras aquellas que ocurren en un huésped que no posee anormalidades estructurales o funcionales, no se encuentra en estado de embarazo o no ha sido intervenido con algún instrumento (catéter), de lo contrario se les considera complicadas (Foxman, 2010).

Las ITU son diagnosticadas al relacionar una serie de síntomas urinarios junto con los resultados de un cultivo de orina, el criterio más utilizado en cultivos de orina, indica que al encontrarse más de 100 000 ufc/ml se considerara que existe infección urinaria, con una sensibilidad del 80.3% y especificidad de 53%, en otras palabras, esto se traduce a que 20% de pacientes con cultivo positivo no son diagnosticados y la mitad de aquellos con cultivos negativos son tratados innecesariamente.

Es importante mencionar que los síntomas y la bacteriuria pueden presentarse independientemente de la existencia de un cultivo positivo, ya que un número significativo de bacterias han sido encontrados en orina de individuos sanos o asintomáticos. Cabe decir que la bacteriuria asintomática se incrementa después de la actividad sexual, y de la edad. A pesar de que la bacteriuria asintomática aumenta el riesgo de ITU sintomática, esta no debe ser tratada, excepto en aquellas mujeres embarazadas o personas que tendrán procedimientos urogenitales invasivos, ya que el tratamiento de la bacteriuria asintomática puede causar daño, esto al afectar la microbiota del individuo y crear organismos

resistentes al antibiótico, síntomas como la microhematuria, y la constante urgencia de orinar se han observado en individuos saludables en ausencia de infección, sin causa aparente de efectos a largo término (Foxman, 2010).

Las ITU son el tercer tipo de infección más común en humanos, después de las infecciones respiratorias y gastrointestinales, siendo la causa principal más común de infecciones comunitarias y nosocomiales en pacientes ingresados a hospitales en los Estados Unidos Americanos (Figura 2.) (Najar *et al.*, 2009). Además, las infecciones del tracto urinario son de las más frecuentes en atención primaria a la salud, en los Estados Unidos de América, estudios reportan que más de 7 millones de consultas anuales son otorgadas por causa de esta afección, así como un millón de visitas adicionales a departamentos de emergencias, requiriéndose aproximadamente 100,000 hospitalizaciones (Schappert, 1999; Foxman, 2002; Kucheria *et al.* 2005).



Figura 2. Visitas por cistitis e infección del tracto urinario (ITU)

(Tomada y modificada de Foxman, 2002).

1.3.1 Etiología de ITU

La mayoría de las ITUs son causadas principalmente por poblaciones de UPEC, si bien también existen otros patógenos capaces de ocasionar ITUs, como son levaduras, estafilococos y estreptococos. Estudios revelan que en mujeres sanas, de edades entre 18 y 39 años, el 80% de las ITUs son causadas por UPEC (Stamm, 2002).

Estudios realizados en 2004 y 2005, en la ciudad de Calgary, Canadá, donde se registraron 40,618 casos de ITU entre 30,851 residentes, siendo la incidencia anual de 17.5 episodios por cada 1000 personas. En este estudio, el 74% de muestras se obtuvieron de pacientes ambulatorios, 18% de pacientes hospitalizados y 9% de pacientes con cuidados en casa. Utilizando únicamente métodos de cultivo, se encontró que la bacteria más comúnmente aislada fue *E. coli* en los tres grupos (Figura 3.) (Laupland *et al.*, 2007). Así también, en otro estudio realizado en Alemania, donde se monitorearon muestras de orina de 1449 pacientes en un hospital universitario y se utilizaron tanto técnicas con medios de cultivo como técnicas moleculares, se encontró que la mayoría de las muestras contenía *E. coli* (Imizarlloglu *et al.*, 2008). Un estudio realizado en Cuba donde se estudiaron 306 pacientes del sexo femenino con diagnóstico de infección urinaria baja, se obtuvieron 193 muestras de mujeres con ITU no complicada, en 138 muestras se identificó *E. coli* (75%) como principal patógeno (Muiños-Torres *et al.*, 2008).

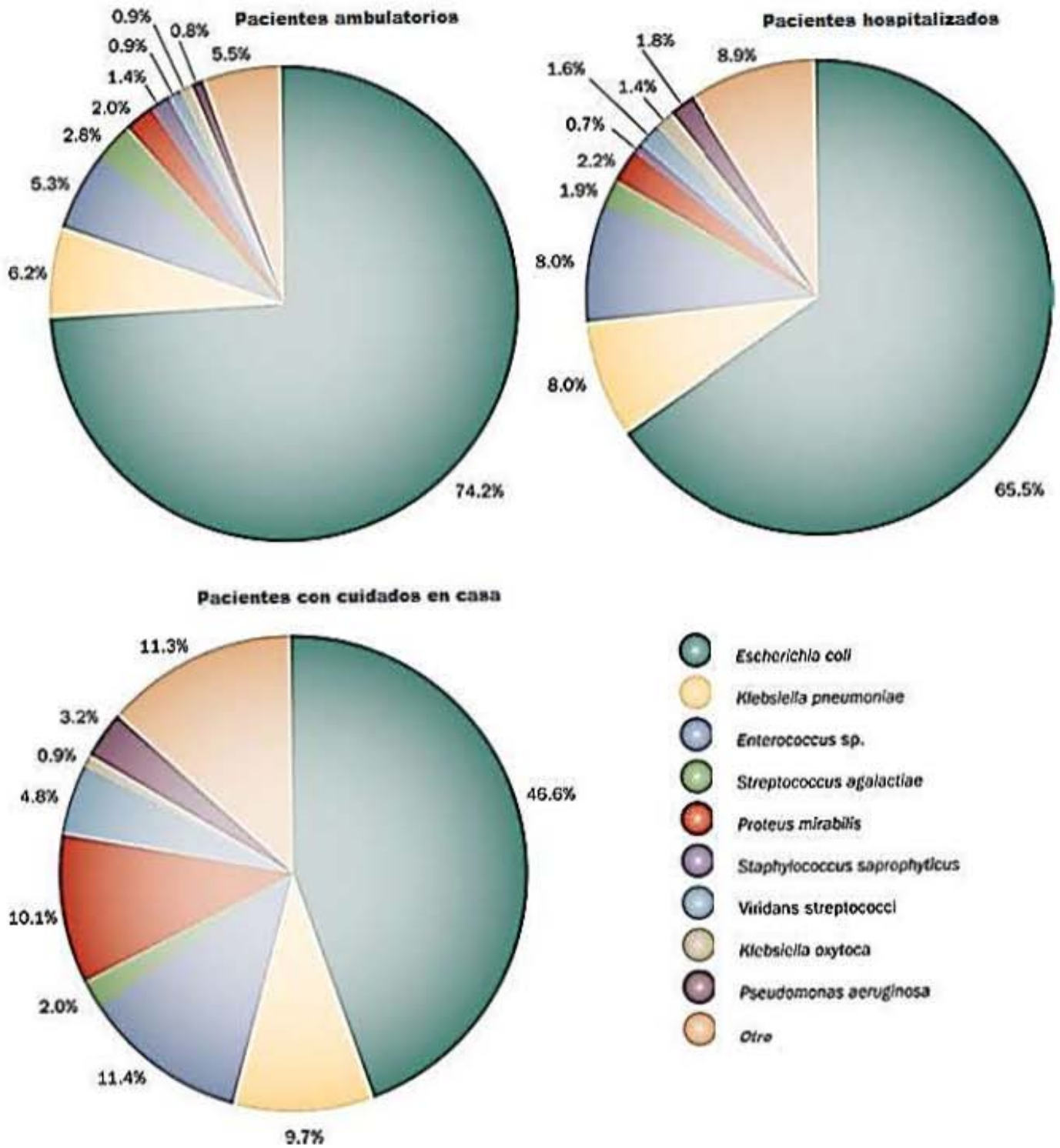


Figura 3. Variación de la bacteriología de ITU de acuerdo a la población

(Tomado y modificado de Foxman, 2010).

1.4 *E. coli* patógeno aviar (APEC)

E.coli es considerada una bacteria perteneciente a la microbiota normal del intestino de aves, de 10^4 a 10^7 ufc/gr de contenido intestinal son rangos normales encontrados en aves de postura (Dho-Moulin y Fairbrother, 1999). También coloniza el tracto respiratorio superior (faringe y tráquea) y puede ser aislado de piel y plumas, dependiendo del nivel de contaminación fecal ambiental.

La contaminación ocurre en las primeras horas después de la eclosión, así mismo diferentes cepas pueden ser adquiridas durante la vida del ave, la contaminación vertical resulta de la transmisión de los criadores al contaminarse los cascarones, mientras que la contaminación horizontal ocurre por el contacto con otras aves, por medio de heces, ingestión de agua y alimento o inhalación de polvo contaminado. Las cepas de *E. coli* denominadas patógeno aviar (APEC, por sus siglas en inglés) han adquirido factores de virulencia, que les confieren la habilidad de colonizar órganos internos y producir colibacilosis, enfermedades de tracto respiratorio y septicemia en aves de corral. Múltiples serogrupos son asociados con esta enfermedad especialmente los serogrupos O1, O2, O78 (Blanco *et al.*, 1997; 1998; Dho-Moulin y Fairbrother, 1999; Ewers *et al.*, 2007).

Al secuenciar la cepa prototipo, APEC-01 y al ser comparada con otras secuencias de aislados de APEC, se ha encontrado una similitud significativa de su genoma con el de UPEC. La mayoría de los marcos de lectura abiertos (ORFs, por sus siglas en inglés) identificados en APEC-01 presentan alta similitud con aquellos ORFs presentes en el cromosoma de las cepas de UPEC de referencia, como son UTI89 (93%), CFT 073 (90%), 536 (87%) Las cepas de APEC expresan factores de virulencia similares a los encontrados en cepas de UPEC, estos factores están codificados en plásmidos, así mismo se han encontrado genes en islas de patogenicidad similares tanto en APEC como UPEC (Rodriguez-Siek *et al.*, 2005; Johnson *et al.*, 2007; Moulin-Schouleur *et al.*, 2007).

Las variaciones genómicas entre aislados de UPEC y APEC posiblemente existen debido a la especialización que deben de tener para vivir en diferentes nichos y diferentes hospederos, sin bien existe un perfil genético de virulencia para ambas;

UPEC y APEC, ningún perfil es único para cada patotipo, enfatizándose el potencial de ambas de ser zoonóticas. La cepa de UPEC CFT073 resultó virulenta aplicada en un modelo de infección respiratoria aviar; sin embargo, cepas de APEC no han sido encontradas como virulentas en humanos. (Ron, 2006; Kariyawasam *et al.*, 2007; Moulin-Schouleur *et al.*, 2007).

1.5 Colibacilosis

La colibacilosis se refiere a la infección localizada o sistémica causada en parte o completamente por *E.coli* patógeno aviar (APEC). Entre aves normales de 10 a 15% de los coliformes intestinales pertenecen a serotipos patógenos, las cepas intestinales no son necesariamente de los mismos serotipos que aquellas cepas encontradas en el saco pericárdico de la misma ave. La transmisión de *E. coli* patogénica al huevo es común y puede ser responsable de alta mortalidad en polluelos, los coliformes patogénicos son más frecuentes en el intestino de aves recién eclosionadas que en el huevo del cual eclosionaron, la fuente de infección más importante es la contaminación fecal de la superficie del huevo ocasionando una futura penetración en el cascarón y membranas (Barnes *et al.*, 2003).

Esta infección viene acompañada de trastornos como colisepticemia, coligranuloma, enfermedad del saco aéreo (enfermedad respiratoria crónica, CRD), celulitis coliforme (proceso inflamatorio), peritonitis coliforme, salpingitis coliforme, osteomielitis coliforme, panoftalmitis coliforme e infección del saco vitelino. La colibacilosis en mamíferos se manifiesta como una enfermedad entérica, mientras que en aves de postura es una enfermedad localizada o sistémica que ocurre de modo secundario, cuando las defensas del hospedero han sido sobrepasadas por cepas virulentas de *E. coli*. Las infecciones causadas por *E. coli* acarrear grandes pérdidas en la industria de las aves de corral, la colibacilosis se trata de la enfermedad más frecuentemente reportada en la industria avícola (Barnes *et al.*, 2003).

La mayoría de las APEC aisladas de aves de corral son patógenas estrictas y representan un riesgo menor de enfermedad en personas u otros animales. A

través de estudios con la técnica de electroforesis de enzimas multilocus (MLLE, por sus siglas en inglés), se han identificado genotipos específicos que han demostrado que son pocos los grupos clonales que son responsables de diferentes formas de colibacilosis en pollos y pavos. La virulencia varía poco de acuerdo a aislados dentro de un grupo clonal, pero varía considerablemente entre grupos clonales, la electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE, por sus siglas en inglés) permite la identificación de aislados de *E.coli* de pollos con celulitis infecciosa, tipos específicos de organismos son encontrados con frecuencia asociados a granjas y rebaños (Barnes *et al.*, 2003).

1.6 *E. coli* serotipo O25:H4

Las infecciones ocasionadas por *E. coli* extra intestinal son causas importantes de morbilidad, mortalidad y aumento de costos en el área de la salud. Su manejo se está tornando complicado debido al aumento de la prevalencia de resistencia a agentes antimicrobianos debido a la producción de beta lactamasas de espectro extendido (ESBLs, por sus siglas en inglés); dentro de este incremento de bacterias resistentes encontramos el linaje de *E. coli* de tipo de secuencia ST 131, caracterizado por pertenecer al serogrupo O25:H4 (Peirano-Pitout, 2010; Rogers *et al.*, 2011).

Las ESBLs son un grupo de enzimas con la habilidad de hidrolizar el anillo betalactámico y causar resistencia a oxymino-cefalosporinas y monobactámicos, más no a cefamicinas o carbapenems. Las beta lactamasas son inhibidas por el ácido clavulanico, sulbactam y tazobactam; la mayoría de las ESBLs pertenecen a la clase A de la clasificación Amber e incluye a los tipos SHV y TEM, evolucionados de enzimas familiares debido a mutaciones puntuales alrededor del sitio activo de beta lactamasas. Las ESBLs están localizadas frecuentemente en plásmidos largos que también albergan genes de resistencia a otras clases de antimicrobianos y por lo tanto exhibirán multiresistencia (Paterson-Bonomo, 2005).

Las primeras ESBLs fueron reportadas en 1985, se identificaron como TEM-1, TEM-2 y derivados de SHV-1 y se encontraban relacionadas únicamente a infecciones hospitalarias; sin embargo, desde el año 2000 las ESBLs han

incrementado su aparición en infecciones entre la población general, este fenómeno coincide con la aparición de un nuevo grupo de betalactamasas mediadas por plásmidos llamadas enzimas CTX-M, las cuales al parecer están tomando el control a nivel global, tal es el caso de *E. coli* O25:H4 ST 131 CTX-M-15 (Figura 4.) (Bonnet, 2004, Pitout *et al*, 2005.; Canton-Coque, 2006).



Figura 4. Distribución internacional de *E.coli* O25:H4 ST 131 con ESBL CTX-M y multi-resistencia a antibióticos

(Tomada y modificada de Nicolas-Chanoine *et al.*, 2008).

Independientemente del tipo de secuencia o cepa la mayoría de Enterobacterias productoras de betalactamasas son multiresistentes en más de un 80%. Se ha encontrado que cepas de *E. coli* ESBL positivo en bacteriemias en Reino Unido e Irlanda son resistentes a fluoroquinolonas y más del 40% son resistentes a gentamicina. Por consiguiente se incrementan las probabilidades de casos cuyo tratamiento sea con un componente al cual el aislado muestre resistencia, esto es de suma importancia, ya que se ha encontrado que los rangos de defunción entre pacientes con bacteriemias causadas por productores de ESBLs es más alta que en aquellos con bacteriemias producidas por agentes no productores de ESBLs.

1.7 Métodos básicos de tipificación bacteriana

En las dos últimas décadas el estudio de enfermedades emergentes y reemergentes, ha producido un interés creciente en aspectos relacionados con bacterias patógenas; como son, incrementos aparentes de virulencia, mayor transmisibilidad o aumento de la resistencia a antibióticos, entre otros. En este contexto, los planteamientos sociopolíticos como el de la globalización contribuyen a la incorporación de ideas, como la de la exposición global de agentes infecciosos antes confinados a pequeñas áreas remotas y endémicas, y la facilidad para una rápida dispersión de microorganismos con nuevas características de virulencia y/o de resistencia (Vázquez y Berrón, 2004).

Desde el punto de vista de la aportación de la microbiología a los estudios epidemiológicos, es básico diferenciar entre lo que se define como *epidemiología local o a corto plazo*, de lo que es la *epidemiología global o a largo plazo*. En la primera se intenta responder a cuestiones como son, los casos en los que se observa una infección recurrente en un paciente, saber si se trata de fracaso terapéutico, o si estamos ante una reinfección por una cepa diferente. En el caso de agrupamientos de casos en la comunidad o en el hospital, conocer si nos encontramos ante un brote o, alternativamente, ante una serie de infecciones independientes por diferentes cepas. En la segunda, su objetivo es establecer la relación clonal entre bacterias aisladas de cuadros clínicos de diferentes sitios en una región o regiones y trazar su diseminación global. Este nivel de la epidemiología debe ser capaz de trazar la dispersión de líneas clonales geográfica y temporalmente, distinguiendo las diferentes variedades que van surgiendo en el proceso de dispersión (Vázquez y Berrón, 2004).

Para dar respuesta a las necesidades de la *epidemiología local*, se han desarrollado los sistemas de tipificación microbiológicos que podríamos definir como clásicos, incluyendo ambos, los fenotípicos y los moleculares o genéticos. Entre éstos, destacan el análisis de ADN mediante electroforesis en gel por campo pulsado (Pulse Field Gel Electrophoresis, PFGE) y PCR-arbitrario (Arbitrary Primers-PCR, AP-PCR, por sus siglas en inglés). Estos métodos son altamente

discriminatorios y detectan pequeñas variaciones que se acumulan rápidamente en el genoma bacteriano. Sin embargo, dicha capacidad, puede ser una gran desventaja para trazar la dispersión de líneas clonales, ya que se puede perder la capacidad de analizar el origen común de esas variantes, y hoy en día, debido a la movilidad mundial es imprescindible el intercambio rápido y preciso de información entre diferentes laboratorios (Vázquez y Berrón, 2004).

A menudo los laboratorios no utilizan los mismos métodos, y aún en el caso de que lo hagan, los resultados son casi siempre difíciles de comparar. Los métodos mencionados, están basados en la generación de patrones de bandas en geles de agarosa y su comparación en formato de imagen. Así pues, con el empleo de estos métodos, compartir información es un proceso complejo que requiere la formación de redes amplias que permitan la estandarización del método y la implantación de una metodología similar para el análisis e intercambio de imágenes, lo cual complica mucho todo el procedimiento. La necesidad de desarrollar un marcador válido para epidemiología global se hace evidente (Vázquez y Berrón, 2004).

Un método fenotípico que fue ampliamente utilizado en la tipificación de procariontes y eucariontes fue el análisis de isoenzimas o MLEE (Multi Locus Enzyme Electrophoresis), el cual posee un poder discriminatorio y la capacidad de detectar o determinar clones con independencia de su estabilidad. El MLEE podría definirse como un método genético indirecto, que analiza la movilidad electroforética de un número concreto (generalmente entre 15 y 20) de enzimas metabólicas en geles de almidón o poliacrilamida. Las variaciones observadas en estas movilidades corresponden con variaciones en el locus o gen codificante de cada enzima. Por lo tanto, cada variante se define como variante alélica y los diferentes alelos de cada uno de los genes conforman el perfil alélico que a su vez define el tipo electroforético. Aún en el caso de encontrar tan sólo cuatro alelos por locus, o lo que es lo mismo, cuatro variantes en cada gen analizado, y estudiando 20 loci, se podrían conseguir hasta 420 genotipos diferentes (Vázquez y Berrón, 2004).

El hecho de utilizar enzimas del metabolismo básico, no sometidas a presión selectiva, permite detectar variaciones neutras que definen líneas clonales relativamente estables. En este caso el marcador tiene alguna de las cualidades deseables en la epidemiología a largo plazo, pero está nuevamente basado en la generación de patrones de bandas en geles, con los inconvenientes ya mencionados anteriormente (Vázquez y Berrón, 2004).

Así pues, las actuales facilidades de acceso a la secuenciación del ADN permitieron el desarrollo de la técnica de Tipificación de Secuencias Multilocus (Multilocus Locus Sequence Typing, abreviado MLST, de acuerdo a sus siglas en inglés), manteniendo los principios de MLEE (Vázquez y Berrón, 2004).

1.7.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa se vale de un proceso que ocurre de manera permanente en los sistemas vivos, la duplicación o replicación del DNA. La PCR se lleva a cabo por medio de ciclos de desnaturalización, alineación de los iniciadores o cebadores en las regiones homologas del fragmento de DNA y como último paso la extensión o síntesis de la nueva cadena de DNA, en pocas horas con la PCR se consigue tener miles de copias de DNA y sin necesidad de usar células vivas (Figura 5) (Curtis *et al.*, 2013).

La obtención de un gran número de copias requiere la repetición de los ciclos de unas 20 a 40 veces, el éxito de esta técnica depende del uso de una DNA polimerasa que no sea desnaturalizada por los repetidos ciclos de calentamiento (Curtis *et al.*, 2013).

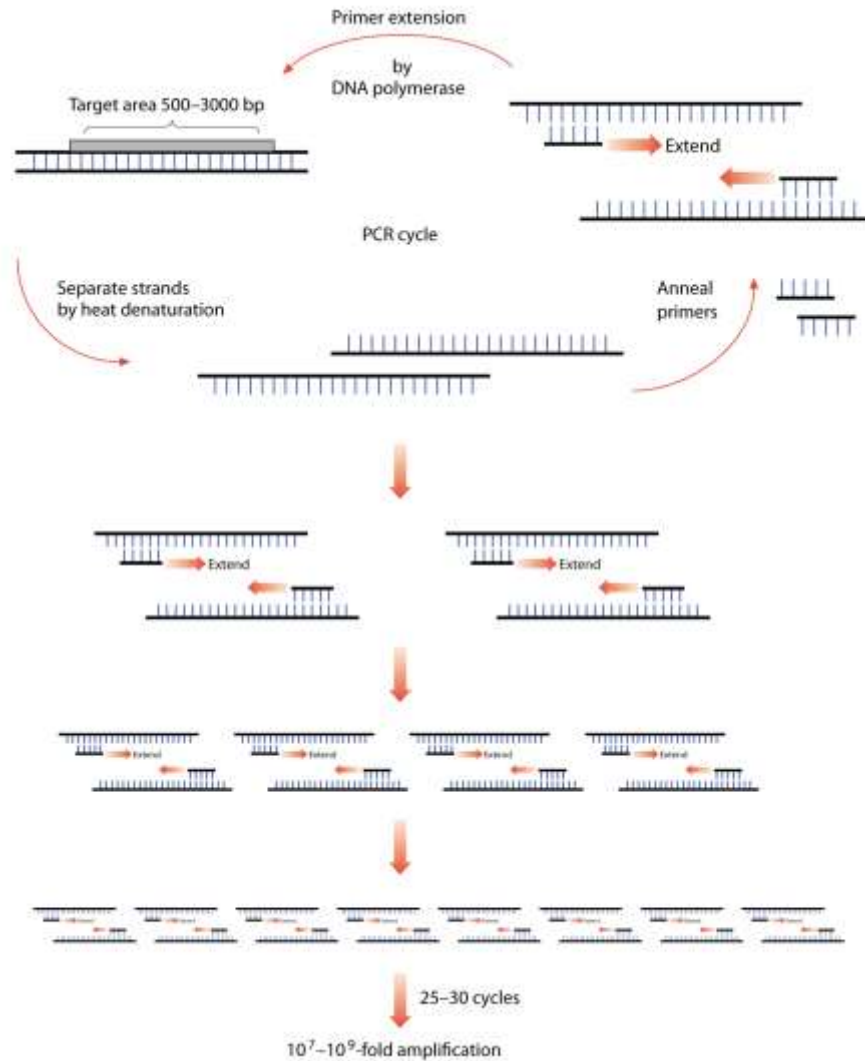


Figura 5. Esquema de técnica de PCR

(Tomada de Metzker & Caskey, 2001).

1.7.2 Electroforesis en gel de agarosa

La electroforesis en gel, es un método que se emplea para separar macromoléculas en función del tamaño, carga eléctrica y otras propiedades físicas. Así pues, la electroforesis en gel es una técnica que consiste en aplicar corriente eléctrica a las moléculas para que atraviesen una placa de gel. La fuerza motriz de la electroforesis es la tensión eléctrica aplicada a los electrodos en ambos extremos del gel. Muchas macromoléculas biológicas importantes, por

ejemplo, los aminoácidos, los péptidos, las proteínas, los nucleótidos y los ácidos nucleicos, poseen grupos ionizables y, a un pH determinado, existen en solución como especies cargadas eléctricamente, sean cationes (+) o aniones (-). Según la naturaleza de la carga neta, las partículas cargadas migrarán hacia el cátodo o hacia el ánodo. Así, por ejemplo, cuando se aplica un campo eléctrico a un gel con pH neutro, los grupos fosfato del ADN cargados negativamente lo harán migrar hacia el ánodo (Apéndice 2) (Westermeyer, 1997; Voet, 2006).

1.7.3 Tipificación de secuencias multilocus (MLST)

Los datos de secuencias de ADN pueden utilizarse para reconstruir la historia evolutiva de las cepas o aislados y establecer su relación filogenética con otros miembros de la población. Una filogenia puede ser usada como marco para asociar otras características como patogenicidad, serología, biogeografía y ecología; la habilidad de reconstruir filogenias a partir de un solo gen o grupo de secuencias concatenadas de la tipificación de secuencias multilocus (MLST), provee un riguroso significado de posicionamiento filogenético en el caso de aislados (Enright *et al.*, 1999; Terrance *et al.*, 2011).

El poder del MLST en la investigación epidemiológica ha sido demostrado frecuentemente, las ventajas significativas son la repetitividad, confiabilidad en ensayos de ADN, interpretación de resultados y precisión digital en la secuenciación de datos (Enright *et al.*, 1999; Terrance *et al.*, 2011).

MLST utiliza directamente las secuencias de nucleótidos, ya que muestran las variaciones en cada locus de los genes a comparar. Los juegos de datos son ingresados en bases de referencia, las cuales pueden consultarse junto con la información de secuencias de nuevos aislados, así mismo la asociación filogenética puede determinarse directamente por algoritmos de reconstrucción (Enright *et al.*, 1999; Terrance *et al.*, 2011).

A diferencia de otros métodos de tipificación, MLST examina la variación, esto al examinar por lo general siete *genes de mantenimiento* o *genes de metabolismo básico* (genes “housekeeping”, en inglés), los cuales no recombinan y son de lenta

evolución, además de que codifican proteínas involucradas en procesos metabólicos esenciales y son en la mayoría de los casos selectivamente neutrales (Enright *et al.*, 1999; Terrance *et al.*, 2011).

El gran número de alelos en cada uno de los siete genes brinda la habilidad de distinguir cientos de perfiles alélicos llamados también tipo de secuencia (ST, por sus siglas en inglés) diferentes, siendo extremadamente improbable que dos aislados diferentes no relacionados tengan el mismo perfil alélico. Cabe destacar que la acumulación de cambios de nucleótidos en los genes de mantenimiento es relativamente lenta y que el perfil alélico del aislado bacteriano es suficientemente estable (Enright *et al.*, 1999; Terrance *et al.*, 2011).

Los genes apropiados para ser usados en la técnica de MLST son aquellos que no estén involucrados en la transferencia horizontal de genes y que no estén localizados cerca de genes sujetos a procesos evolutivos. Los genes ideales serán aquellos flanqueados por otros genes de mantenimiento, y en los casos más óptimos son identificados y seleccionados para inclusión en un sistema de MLST a través del análisis detallado del genoma de referencia de algún microorganismo cercanamente relacionado o del mismo organismo (Enright *et al.*, 1999; Terrance *et al.*, 2011).

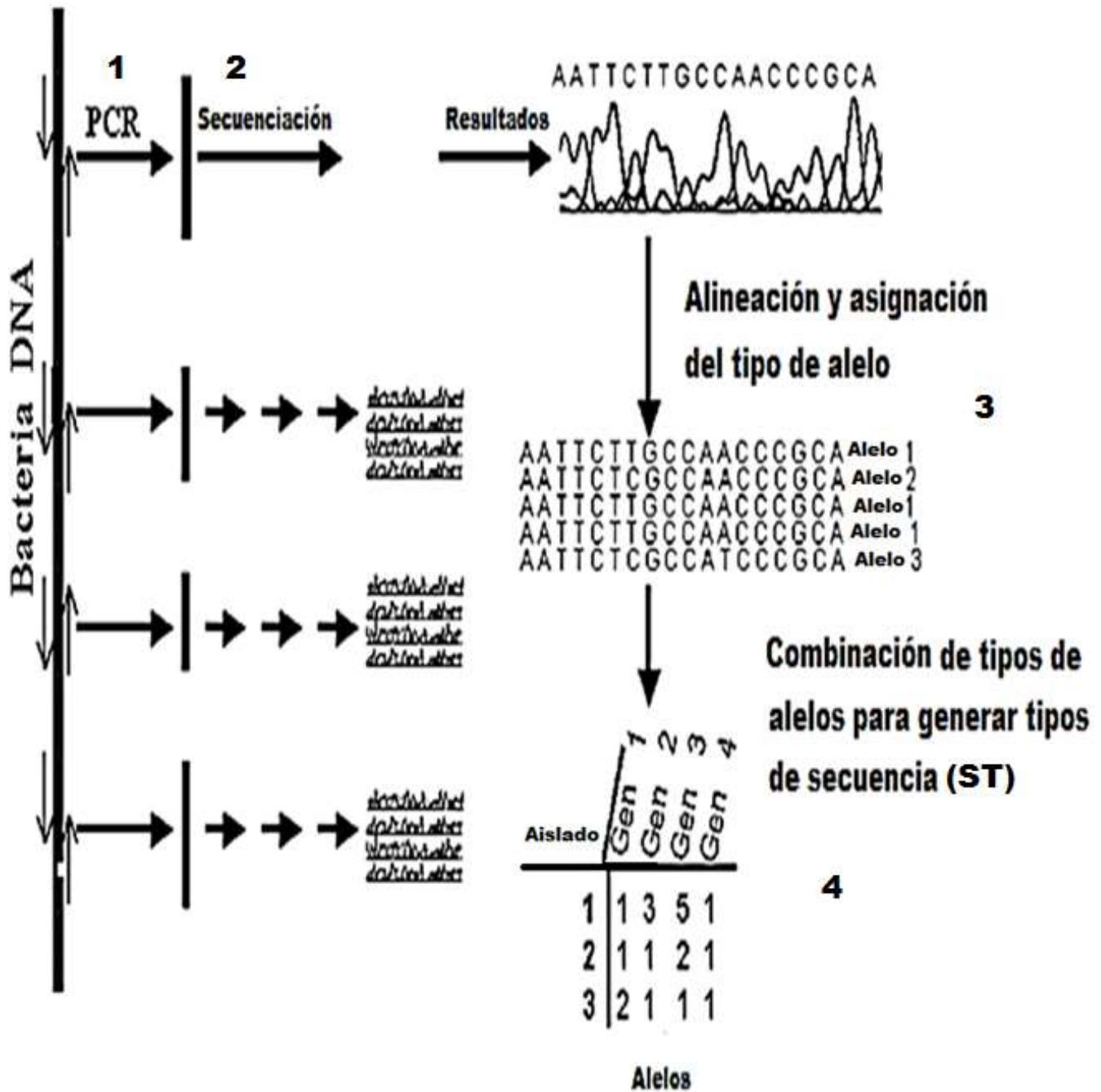
Para que la tipificación con esta técnica sea significativa y efectiva, las mismas regiones de los genes blanco, deben ser secuenciadas a través de una población filogenéticamente relevante, en lugar de la secuencia completa, lo cual es laborioso, caro y consume mucho tiempo, el sistema de MLST se enfoca en fragmentos de la secuencia de 450 a 500 pares de bases (pb), en una porción conservada del gen, cabe mencionar que el largo de la secuencia examinada no afectará el poder de discriminación del sistema, este rango de longitud se utiliza debido a que puede ser secuenciado con exactitud en ambas hebras, empleando un único par de iniciadores, además que en la mayoría de las bacterias patógenas existe suficiente variación para identificar alelos diferentes dentro de la población estudiada (Enright *et al.*, 1999; Terrance *et al.*, 2011).

MLST involucra la abstracción de la información de las secuencias de ADN en perfiles alélicos, cada secuencia variante en un locus es considerada un alelo y se le asigna un número alélico, a los diferentes aislados que presenten la misma secuencia en un locus se les asigna el mismo número alélico, aquellos loci con mayor variantes alélicas tendrán mayor poder de resolución (Enright *et al.*, 1999; Terrance *et al.*, 2011).

La combinación de alelos en un loci en el sistema de MLST es considerado el perfil alélico, este es la representación de las diferencias en una secuencia de ADN a través de un set de un loci blanco. En MLST las clonas son definidas operacionalmente como un único perfil alélico, la clonalidad está definida dentro del contexto de MLST por el juego de genes utilizado y no debe ser apoyado por otros juegos de genes (Enright *et al.*, 1999; Terrance *et al.*, 2011).

El poder de discriminación y la clonalidad son provistas por el juego de genes y están en función del número y la diversidad de dichos genes dentro de la población. El poder de discriminación está definido como la probabilidad de obtener un aislado con el alelo más común en cada locus, las probabilidades más bajas corresponden a un poder de discriminación mayor y reside en la diversidad de genes de mantenimiento incluidos en el sistema. En poblaciones clonales que carecen de diversidad, particularmente en secuencias conservadas como los genes de mantenimiento, MLST no tiende a ser discriminatorio por debajo del nivel de subespecies y no es congruente con el concepto tradicional de especie particularmente en grupos microbianos que no tienen estructuras clonales (Enright *et al.*, 1999; Terrance *et al.*, 2011).

La relación de los aislados es presentada como un dendograma construido empleando la matriz de las diferencias de los pares entre sus perfiles alélicos, el dendograma es útil solo en caso donde los aislados tienen perfiles alélicos idénticos o muy similares y que se asume derivan de un ancestro común, si la diferencia entre aislados es en más de tres loci no es recomendable inferir su filogenia, (Figura 6.) (Enright *et al.*, 1999; Terrance *et al.*, 2011).



1. Los genes blanco son amplificados en cada cepa utilizando cebadores locus específico 2. Los genes amplificados posteriormente son secuenciados 3. Las secuencias de nucleótidos de cada gen y cada cepa son alineadas y comparadas entre sí para verificar los cambios de nucleótidos existentes y se les asigna tipo de alelo 4. Los alelos asignados a cada locus son combinados para designar el tipo de secuencia (ST).

Figura 6. Esquema de procedimiento utilizado en la técnica de MLST

(Tomada y modificada de Singh *et al.*, 2006).

2. Hipótesis

Se ha manejado que *Escherichia coli* del serotipo O25:H4 asociado a infección de vías urinarias es una zoonosis derivada de *E.coli* del mismo serotipo que afecta a aves de postura. La caracterización de genes de metabolismo básico de cepas de *E. coli* aisladas de ambas poblaciones, mostrará una relación clonal entre cepas, sugiriendo que son derivadas del mismo linaje y que la posible variabilidad genética entre estas cepas, está dada por la incorporación de material genético extraño en el cromosoma a través de elementos móviles, proporcionando a la cepa una adaptación específica a los diferentes nichos entre aves y humanos.

3. Objetivos

3.1 Objetivo General

Determinar la relación filogenética de 40 cepas de *E. coli* del serotipo O25:H4 aisladas de infección de vías urinarias de humanos y de infecciones de aves de postura.

3.2 Objetivos Particulares

Caracterizar los alelos de los genes *icd*, *fumC*, *purA*, *mdh*, *gyrB*, *recA* y *adk* en las cepas de *E. coli* serotipo O25:H4 aisladas de cistitis, utilizando la tipificación de secuencias multilocus (MLST, por sus siglas en inglés).

Caracterizar los alelos de los genes *icd*, *fumC*, *purA*, *mdh*, *gyrB*, *recA* y *adk* en las cepas de *E. coli* serotipo O25:H4 aisladas de infección de saco vitelino, médula ósea, hígado, pulmón y peritonitis de pollitas y gallinas de postura respectivamente, utilizando la tipificación de secuencias multilocus (MLST, por sus siglas en inglés).

Determinar la clonalidad de las cepas *E. coli* del serotipo O25:H4 aisladas de las diferentes poblaciones de estudio, con base al análisis concatenado de las secuencias de los genes de metabolismo básico.

4. Material y Método

4.1 Cepas de *E. coli* uropatógena (UPEC) y patógeno aviar (APEC)

Para el presente trabajo se utilizaron 40 cepas O25:H4, siendo 20 cepas uropatógenas (UPEC) y 20 cepas patógeno aviar (APEC) (Tabla 2).

No. cepa	Patotipo	Fuente
1	UPEC	Tracto urinario de mujer
2	UPEC	Tracto urinario de mujer
3	UPEC	Tracto urinario de mujer
4	UPEC	Tracto urinario de mujer
5	UPEC	Tracto urinario de mujer
6	UPEC	Tracto urinario de mujer
7	UPEC	Tracto urinario de mujer
8	UPEC	Tracto urinario de mujer
9	UPEC	Tracto urinario de mujer
10	UPEC	Tracto urinario de mujer
11	UPEC	Tracto urinario de mujer
12	UPEC	Tracto urinario de mujer
13	UPEC	Tracto urinario de mujer
14	UPEC	Tracto urinario de hombre
15	UPEC	Tracto urinario de mujer
17	UPEC	Tracto urinario de mujer
18	UPEC	Tracto urinario de mujer
19	UPEC	Tracto urinario de mujer
20	UPEC	Tracto urinario de mujer
21	UPEC	Tracto urinario de mujer
2	APEC	Médula ósea
3	APEC	Hígado
4	APEC	Pulmón
9	APEC	Pulmón
10	APEC	Médula ósea
11	APEC	Hígado
17	APEC	Hígado
18	APEC	Saco vitelino
20	APEC	Hígado
21	APEC	Saco vitelino
24	APEC	Médula ósea
27	APEC	Exudado peritoneal
29	APEC	Médula ósea
31	APEC	Exudado peritoneal
45	APEC	Médula ósea
46	APEC	Exudado peritoneal
57	APEC	Médula ósea
58	APEC	Exudado peritoneal
63	APEC	Médula ósea

Tabla 2. Cepas UPEC y APEC y la fuente de su obtención

4.1.1 Procedencia de las cepas

Se recibieron las cepas de *Escherichia coli* Uropatógena (UPEC) previamente aisladas e identificadas a partir de pacientes con Infección de Tracto Urinario, por parte del Dr. Manjarrez del Departamento de Salud Pública de la Unidad de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina, UNAM, y por parte del Dr. Rigoberto Hernández Castro del Hospital General Manuel Gea González, dichas cepas también fueron aisladas e identificadas previamente a partir de pacientes con Infección de Tracto Urinario.

Las cepas de *Escherichia coli* Patógeno Aviar (APEC) previamente aisladas, identificadas y serotipificadas como O25:H4, fueron donadas por la Dra. Cecilia Rosario Cortés del Departamento de Medicina y Zootecnia de aves, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.

4.1.2 Aislamiento, identificación con pruebas bioquímicas y almacenamiento

Las cepas utilizadas en el presente trabajo nuevamente fueron sembradas en Agar Sangre (AS) y Agar MacConkey (MAC), por la técnica de cuadrante radial o agotamiento, con el fin de comprobar la viabilidad y pureza. Una vez que se realizó la siembra se incubaron a 35°C/24horas, posteriormente se observó el crecimiento, se seleccionó una colonia completamente aislada del Agar MAC y se transfirió a dos tubos con Agar Gelosa Especial y se incubaron a 35°C/24horas para su crecimiento, un vial se empleó para mantener una copia de trabajo, el otro fungió como reserva para el Cepario. Posteriormente, se sembraron las pruebas bioquímicas, para corroborar que las cepas aisladas pertenecían al género y especie *E. coli*, las pruebas bioquímicas se realizaron de acuerdo a lo establecido por MacFaddin en 2003 (en el Apéndice 1 se especifican las pruebas bioquímicas a detalle y los resultados obtenidos).

La serotipificación de las cepas se realizó por el Laboratorio de Referencia de Patógenos Entéricos de la Facultad de Medicina de la UNAM.

Todas las cepas se guardaron en leche-glicerol a -70°C y también se encuentran resguardadas en el Cepario del Laboratorio de Referencia de Patógenos Entéricos de la Facultad de Medicina de la UNAM.

4.2 Extracción de DNA genómico bacteriano por el método GES (Tiocianato de Guanidina- EDTA- Sarkosyl)

Existen diversos métodos para aislar DNA cromosomal de células procariotas, una técnica ampliamente usada por su efectividad en bacterias gram -, es aquella que utiliza Tiocianato de guanidina (Pitcher *et al.*, 1989).

El Tiocianato de guanidina actúa como desnaturizante de proteínas, es altamente recomendado con el fin de extraer el ácido nucleico en particular cuando existe alta actividad de nucleasas endógenas, ya que las inactiva. En este método se utiliza también acetato de amonio, el cual desaliniza las proteínas y estabiliza los ácidos nucleicos, asegurando la formación de una banda firme de proteína insoluble, por otra parte el uso de cloroformo permite la generación de una fase orgánica de desechos celulares no solubles en agua, la generación de las diferentes fases vuelve más sencilla la remoción del DNA que queda en la fase acuosa (fase superior), quedando libre de restos celulares (Pitcher *et al.*, 1989).

Para la extracción de DNA bacteriano se utilizó la técnica de Tiocianato de guanidina-EDTA-Sarkosyl (GES), según lo descrito por Pitcher *et al.*, 1989. Las cepas fueron crecidas en caldo Luria a 37°C por 18 horas, a 250 rpm y centrifugadas para obtener el paquete bacteriano. El paquete se resuspendió en buffer TE y se le añadió el reactivo de GES con la finalidad de lisar a las bacterias e inhibir la acción de las nucleasas. Posteriormente, las proteínas se precipitaron con acetato de amonio 7.5 M, para remover los lípidos y fosfolípidos, se agregó cloroformo: alcohol isoamilico 24:1. La fase acuosa fue seleccionada para trabajarse con isopropanol y precipitar el DNA. La pastilla de DNA se lavó con etanol al 70% y posteriormente se disolvió con agua de PCR. Se almaceno a -20°C (en el Apéndice 2 se describe detalladamente la técnica). Para determinar la integridad y calidad del DNA obtenido las muestras se observaron en un gel de

agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Se tomaron alícuotas de 5 µL de cada DNA, cada alícuota se mezcló con 2 µL de buffer de carga y se depositaron en los pozos de gel de agarosa, las muestras se corrieron en una electroforesis horizontal con buffer TBE 0.5X, para posteriormente ser observados en un transiluminador UV (en el Apéndice 3 se describe detalladamente la técnica).

4.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de los genes de metabolismo básico

Se amplificaron y secuenciaron 7 genes de metabolismo básico (Tabla 3). Los iniciadores utilizados para amplificar los genes se obtuvieron del esquema de tipificación por secuencia multilocus (MLST) de *E. coli* (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli>). Los protocolos para la amplificación de los genes fueron los establecidos por Wirth y cols. (Apéndice 4, Tabla 4 y 5) (Wirth *et al.*, 2006), con pequeñas modificaciones en las temperaturas de alineamiento (Tabla 6.)

Gen	Producto
<i>icd</i>	isocitrato deshidrogenasa
<i>gyrB</i>	DNA girasa
<i>recA</i>	proteína de recombinación
<i>fumC</i>	fumarato hidratasa
<i>mdh</i>	malato deshidrogenasa
<i>purA</i>	purina
<i>adk</i>	adenosina quinasa

Tabla 3. Genes de metabolismo básico y su producto

Reactivo	Por tubo (µl)
H ₂ O PCR	37
Buffer 10x	5
MgCl ₂ [50 mM]	1.5
dNTP's [10 mM]	1
Primer F [10 µM]	2
Primer R [10 µM]	2
Taq pol [5u/µL]	0.5
DNA	1

Tabla 4. Preparación de los tubos de reacción de PCR para genes de metabolismo básico

# de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (min.)
1	95°	1
30	95°	1
	Temperatura de Alineamiento	1
	72°	1
1	72°	5
1	4°	5
1	10°	∞

Tabla 5. Programa de amplificación por PCR para los 7 genes de metabolismo básico

Gen	Temperatura de alineamiento (°C)	Tamaño de amplificado (pb)
<i>icd</i>	58.4	878
<i>gyrB</i>	65.6	911
<i>recA</i>	66.5	780
<i>fumC</i>	66.5	806
<i>mdh</i>	66.5	932
<i>purA</i>	66.5	816
<i>adk</i>	62.5	583

Tabla 6. Genes de metabolismo básico, temperatura de alineamiento y tamaño del amplificado

Los productos de PCR se observaron en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, corriéndose las muestras en una electroforesis horizontal con buffer TBE 0.5X, el tamaño del producto amplificado fue determinado con base al marcador de peso molecular de DNA de 100 pb, y se observó en un transiluminador con luz UV (Apéndice 2).

4.4 Secuenciación y edición de las secuencias

Todos los productos se enviaron a secuenciar a la unidad de secuenciación High Throughput Genomics de la Universidad de Washington (<http://www.htseq.org>). Los productos de PCR se secuenciaron en ambas direcciones (5' a 3' y 3' a 5'), los fenogramas de todas las secuencias se inspeccionaron visualmente, cualquier ambigüedad se resolvió volviendo a secuenciar.

Para la edición en computadora de las secuencias se utilizó el programa SeqMan del paquete DNASTAR Lasergene® 7 (DNASTAR, Inc., Madison, WI). La edición de las secuencias consta de alinear las secuencias de ambas direcciones de cada muestra, para así obtener la secuencia consenso, la cual se guardó.

Posteriormente, las secuencias consenso de todas las muestras (en los 7 genes) se alinearon con el programa ClustalW2 del software Bio Edit® versión 7.0.9.0., cabe mencionar que todas las muestras se alinearon con una secuencia tipo obtenida del esquema de tipificación por secuencia multilocus (MLST) de *E. coli* y que todas las secuencias se cortaron al tamaño de la secuencia tipo, la secuencia tipo se trata de *E. coli* K12, también se utilizaron en la alineación las secuencias de cinco cepas de referencia de UPEC, APEC y *E. coli* adherente invasiva (Tabla 7) , estas se obtuvieron de la base de datos de Centro Nacional de Información Biotecnológica de los Estado Unidos de Norte América, NCBI (National Center for Biotechnology Information, por sus siglas en Inglés) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), las cuales también se alinearon con el resto de las secuencias y cortaron al tamaño de la secuencia tipo.

UPEC 536
UPEC UT189
UPEC CFT073
APEC 01
<i>E. coli</i> adherente invasiva

Tabla 7. Cepas de referencia

4.5 Obtención de tipo de secuencia (ST, secence type, por sus siglas en inglés)

Se obtuvo el ST de cada uno de los genes de las 40 cepas, para ello se utilizó la base de datos de MLST de la Universidad de Warwick (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst>).

4.6 Análisis filogenético

La reconstrucción de la filogenia se hizo utilizando el algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean, en inglés), con el programa MEGA versión 5.01. Los árboles filogenéticos generados por UPGMA se basan en matrices de distancias, obteniendo estas distancias entre pares de unidades operacionales taxonómicas (OTU, por sus siglas en inglés). Se realizó un concatenado final con los 7 genes, se utilizó para ello el programa DnaSP 5.10 versión 5.10.01 y utilizando el programa MEGA versión 5.01., se realizó un dendograma de cada uno de los 7 genes de metabolismo básico, así como del concatenado de los 7 genes.

5. Resultados

5.1 Determinación de tipo de secuencia (ST)

Se encontró que 39 de las 40 cepas tanto de APEC como de UPEC tuvieron el alelo 53 para el gen *adk*, siendo la única cepa UPEC 17 de un alelo distinto, alelo tipo 13. Respecto al gen *fumC*, 39 de las 40 cepas tuvieron el alelo 40, siendo UPEC 17 la única con el alelo 52. Con respecto al gen *gyrB*, 39 cepas presentaron el alelo 47, la cepa UPEC 17 presentó el alelo 156. Con el gen *icd*, en 39 cepas se detectó el alelo 13 y la cepa UPEC 17 presentó el alelo 14. Con lo que respecta al gen *purA*, 39 cepas tuvieron el alelo 28, siendo UPEC 17 diferente con el alelo 25. El análisis del gen *recA*, mostró que 39 de las 40 cepas tuvieron alelo 29 donde únicamente UPEC 17 tuvo el alelo 17. Por último, el análisis del gen *mdh*, mostró que en 38 cepas tuvieron el alelo 36, con este gen hubo dos cepas: la UPEC 17 que presentó el alelo 17 y la cepa UPEC 21 que presentó el alelo 379, cabe mencionar que de este último alelo nunca antes se había reportado entre las secuencias para el gen *mdh*, la secuencia presentó un cambio de nucleótido T por G en la posición 438 con respecto a la secuencia completa del gen o a la posición 198 de la secuencia amplificada por los iniciadores específicos (tamaño fijado por MLST), con el fin de que este nuevo alelo fuera incluido en la base de datos de MLST de la Universidad de Warwick, se enviaron los fenogramas para que el curador de dicha base determinara que las diferencias o cambios de nucleótido de este nuevo alelo eran reales y estables y así determinar si formaría parte de la base de datos de MLST. Una vez que los fenogramas fueron analizados y las diferencias aprobadas, a este alelo le fue asignado el número 379 (figura 7).

De acuerdo a los números de cada alelo en los 7 genes, se tiene que 38 cepas pertenecen al complejo ST131 y su ST es el 131 (figura 8). La cepa UPEC 17 pertenece a ningún complejo y su número de ST es 998 (figura 9). Por último la cepa UPEC 21 tampoco pertenece a ningún complejo y su número de ST es 4713 (figura 10).

You submitted traces and sequence for mdh379 (11 December, 2014).
 After curation, we are pleased to acknowledge that the traces support the
 uploaded sequence and this (these) allele has now been permanently accepted in the
 database.

We append a document with details on privacy and our criteria for accepting
 novel alleles and MLST patterns for your information.

Thank you very much for your contribution. Please feel free to contact me
 if there are any questions.

Mark Achtman
 Warwick Medical School, University of Warwick
 m.achtman@warwick.ac.uk

Figura 7. Carta de aceptación de secuencia de nuevo alelo de *mdh*

THE UNIVERSITY OF
WARWICK

MLST Databases at UoW

Warwick
 Medical School

[Back](#) | [UoW MLST Home](#) | [Allele / ST Query](#) | [Strain Query](#) | [Downloads](#) | [Analyses](#) | [Info](#) | [Login](#)

Escherichia coli MLST Database.

ST	<i>adk</i>	<i>fimC</i>	<i>gyrB</i>	<i>icd</i>	<i>mdh</i>	<i>purA</i>	<i>recA</i>	ST Complex
ST131	53	40	47	13	36	28	29	ST131 Cplx
ST131	53	40	47	13	36	28	29	ST131 Cplx
ST705	53	40	47	13	103	28	29	ST131 Cplx
ST4713	53	40	47	13	379	28	29	None
ST4468	53	573	47	13	36	28	29	None
ST4354	53	88	47	13	36	28	29	ST131 Cplx

Figura 8. ST de cepas de UPEC y APEC

[Back](#) | [UoW MLST Home](#) | [Allele / ST Query](#) | [Strain Query](#) | [Downloads](#) | [Analyses](#) | [Info](#) | [Login](#)

Escherichia coli MLST Database.

ST	<i>adk</i>	<i>fumC</i>	<i>gyrB</i>	<i>icd</i>	<i>msh</i>	<i>purA</i>	<i>recA</i>	ST Complex
ST998	13	52	156	14	17	25	17	None
ST998	13	52	156	14	17	25	17	None
ST2560	13	52	269	14	17	25	17	None
ST2247	13	4	156	14	17	25	17	None
ST1667	13	52	4	14	17	25	17	None
ST1655	13	52	156	14	17	179	17	None

Figura 9. ST de cepa UPEC17

[Back](#) | [UoW MLST Home](#) | [Allele / ST Query](#) | [Strain Query](#) | [Downloads](#) | [Analyses](#) | [Info](#) | [Login](#)

Escherichia coli MLST Database.

ST	<i>adk</i>	<i>fumC</i>	<i>gyrB</i>	<i>icd</i>	<i>msh</i>	<i>purA</i>	<i>recA</i>	ST Complex
ST4713	53	40	47	13	379	28	29	None
ST4713	53	40	47	13	379	28	29	None
ST705	53	40	47	13	103	28	29	ST131 Cplx
ST3483	53	40	47	13	17	28	29	ST131 Cplx
ST131	53	40	47	13	36	28	29	ST131 Cplx
ST1215	53	40	47	13	165	28	29	ST131 Cplx

Figura 10. ST de cepa UPEC21

5.2 Análisis filogenético

Se obtuvieron 7 dendogramas (uno por cada gen), que muestran la relación genética que existen entre las cepas analizadas, y un árbol de la secuencia que concatena a los 7 genes analizados. En general los árboles para cada uno de los genes por separado muestran dos ramas principales (I y II).

En el árbol del gen *adk* (figura 11) la rama I se dividió en dos clados A y B. En el A hay tres grupos principales (a_1 - a_3), en a_1 se encontraron todas las cepas del alelo 53, en a_2 a una distancia de 0.001 se encontraron UPEC 17 alelo 13 y la cepa de referencia 536, en a_3 a una distancia de 0.003 se agruparon las cepas de referencia APEC O1, UTI89 y UM146. En el clado B se encontraron únicamente la cepa de referencia CFT073 y por último en la parte basal, rama II se encontró la cepa tipo. En el gen *fumC* (figura 12) el clado A, agrupo a las 39 cepas con el alelo 40, a una distancia de 0.004 se localizó la cepa UPEC 17 alelo 52, las cepa de referencia 536, CFT073, APEC O1 y UTI 89 se encontró a una distancia de 0.010, finalmente la cepa tipo se localizó a 0.042, en la rama II en la parte basal del árbol se localizó en el clado B la cepa de referencia UM146. En el gen *gyrB* (figura13) el clado A se divide en dos grupos a_1 y a_2 , en a_1 se agruparon las cepas de alelo número 47, en a_2 a una distancia de 0.006 se encontró únicamente UPEC 17 de alelo 156, en el clado B se tienen dos grupos, el primero comprendió las cepas de referencia 536, UM146, UTI89 y APEC O1, el segundo únicamente contuvo la cepa de referencia CFT 073, en la rama II en la parte basal del árbol se encontró la cepa tipo. En el gen *icd* (figura14) la rama I clado A incluyeron las cepas de alelo 13 y la cepa de referencia CFT073, a una distancia de 0.001 se agruparon tres cepas de referencia APEC O1, UTI89 y UM146, en el clado B se encontró la cepa UPEC 17 alelo 14, en la rama II se encontró la cepa de referencia 536 y la cepa tipo. En el gen *mdh* (figura15) el clado A tuvo dos grupos, en el primero estuvieron las cepas alelo 36 en su segundo clado esta únicamente UPEC 21 alelo 379 a una distancia de 0.002, en el clado B de esta misma rama se agruparon UPEC 17 alelo 17, la cepa de referencia 536 y UM146. En el gen *purA* (figura 16) en el clado A se concentraron 39 cepas del alelo 28, y a una distancia de 0.001 se situó la cepa UPEC 17 alelo 25 en B esta la cepa tipo y en la rama II

se agruparon las 5 cepas de referencia APEC O1, UTI89, UM146, CFT073 y 536. Por último en el gen *recA* (figura 17) la rama I agrupó las cepas de alelo número 29, la rama II agrupó la cepa tipo, la cepa UPEC 17, la cepa de referencia 536 la cepa CFT073, en estirpes independientes integradas por una sola cepa y en un grupo con secuencias idénticas se agruparon las 3 cepas de referencia UTI89, UM146 y APEC O1.

En el árbol del concatenado (figura 18) se tuvieron 2 ramas, la rama I se dividió en dos clados A y B. En el clado A en un grupo se localizaron 38 cepas con ST 131, a una distancia de 0.0002 se encontró la cepa UPEC 21 ST 4713 y a una distancia de 0.004 se encuentra UPEC 17 con ST 998, a una distancia de 0.007 se encontró en otro grupo la cepa de referencia 536, CFT073, APEC O1 y UTI 89. En el clado B estuvo únicamente la cepa tipo y por último en la parte basal del árbol en la rama II se encontró la cepa de referencia UM146.

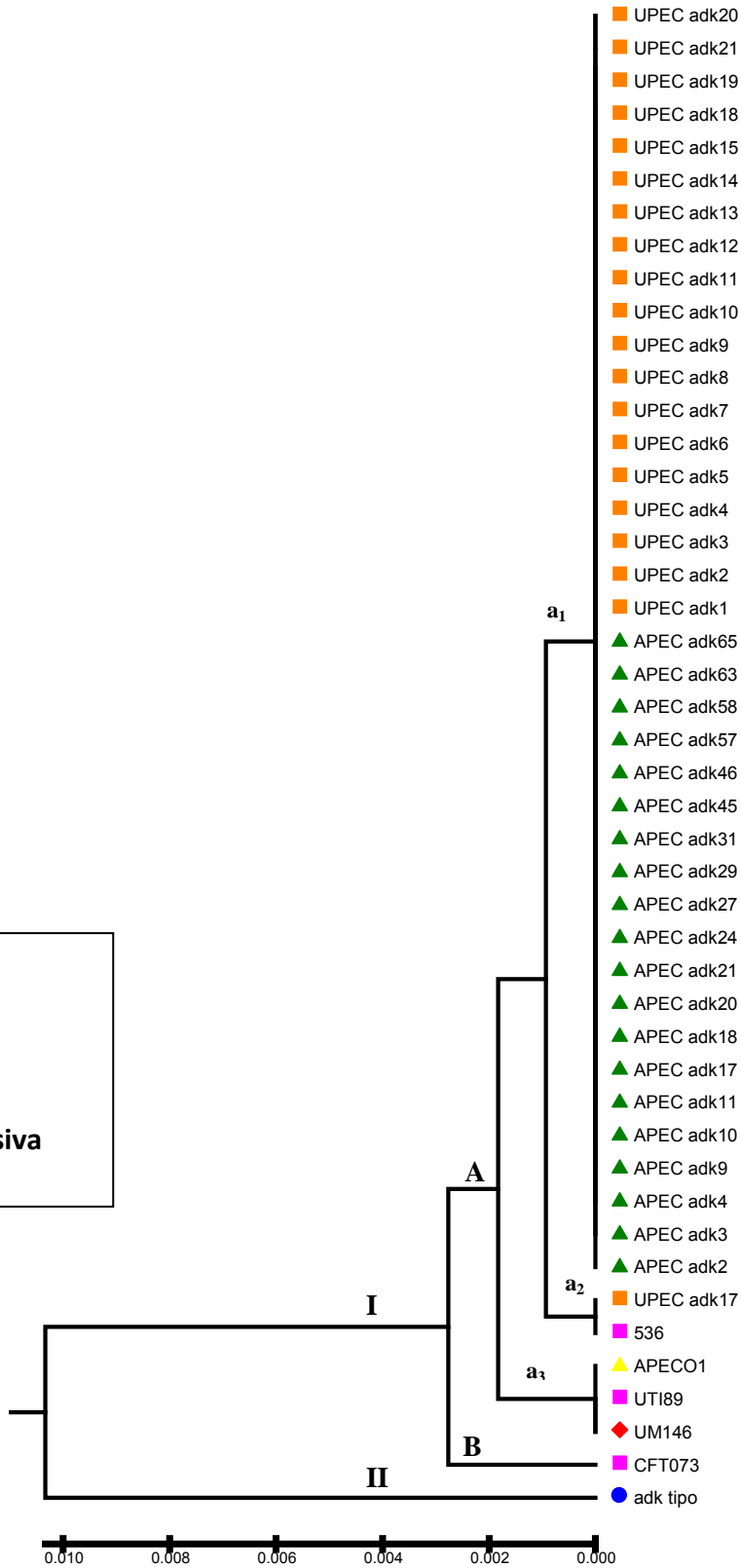
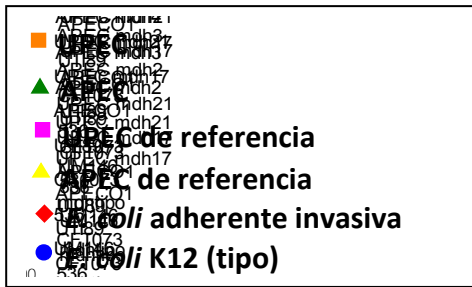


Figura 11. Dendrograma del gen *adk*

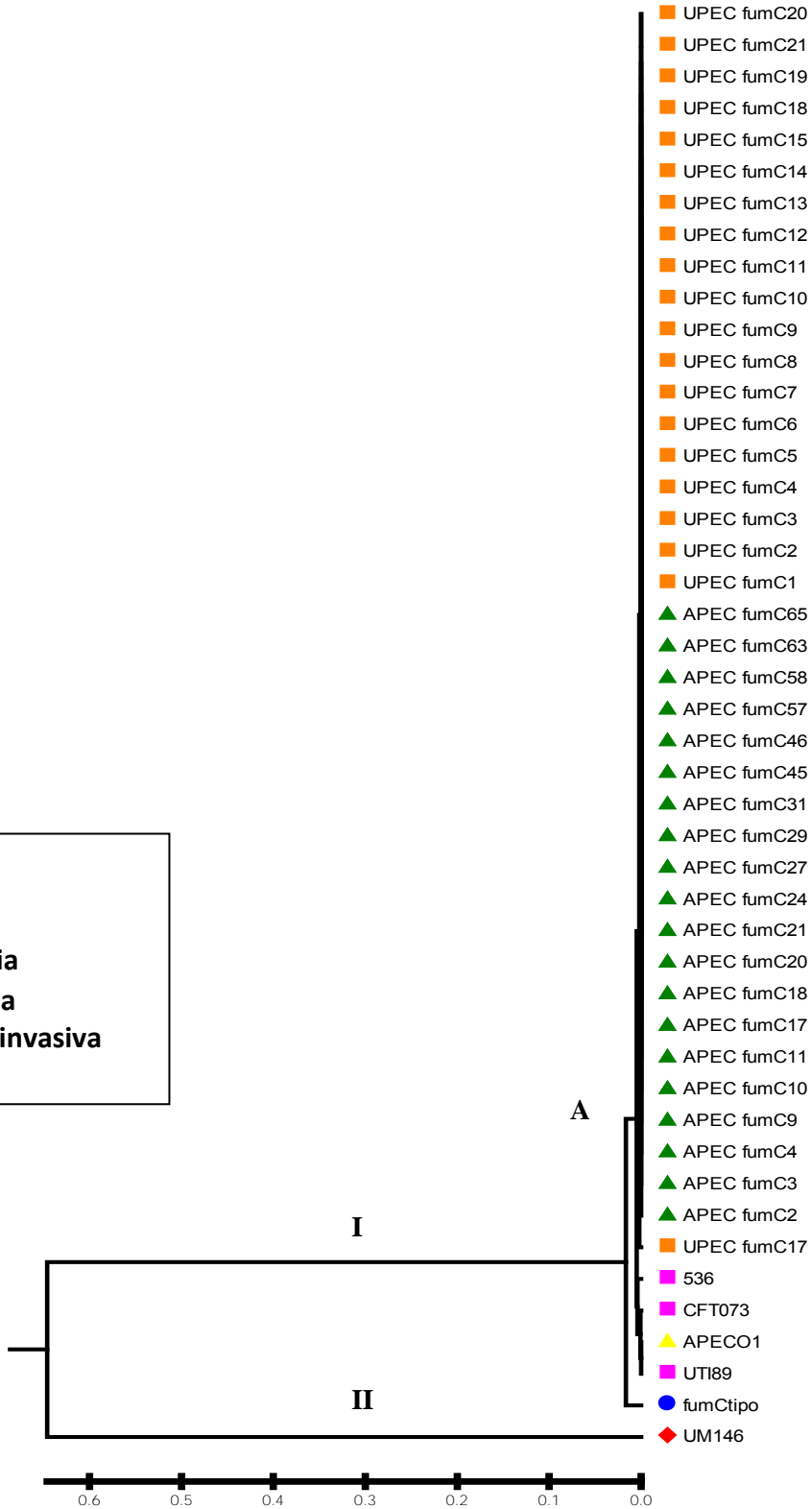
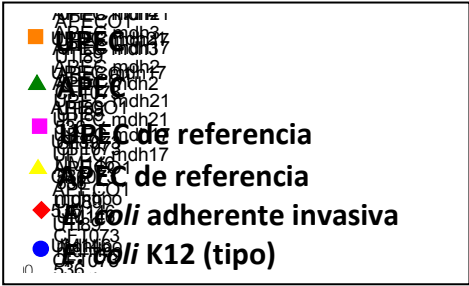


Figura 12. Dendrograma del gen *fumC*

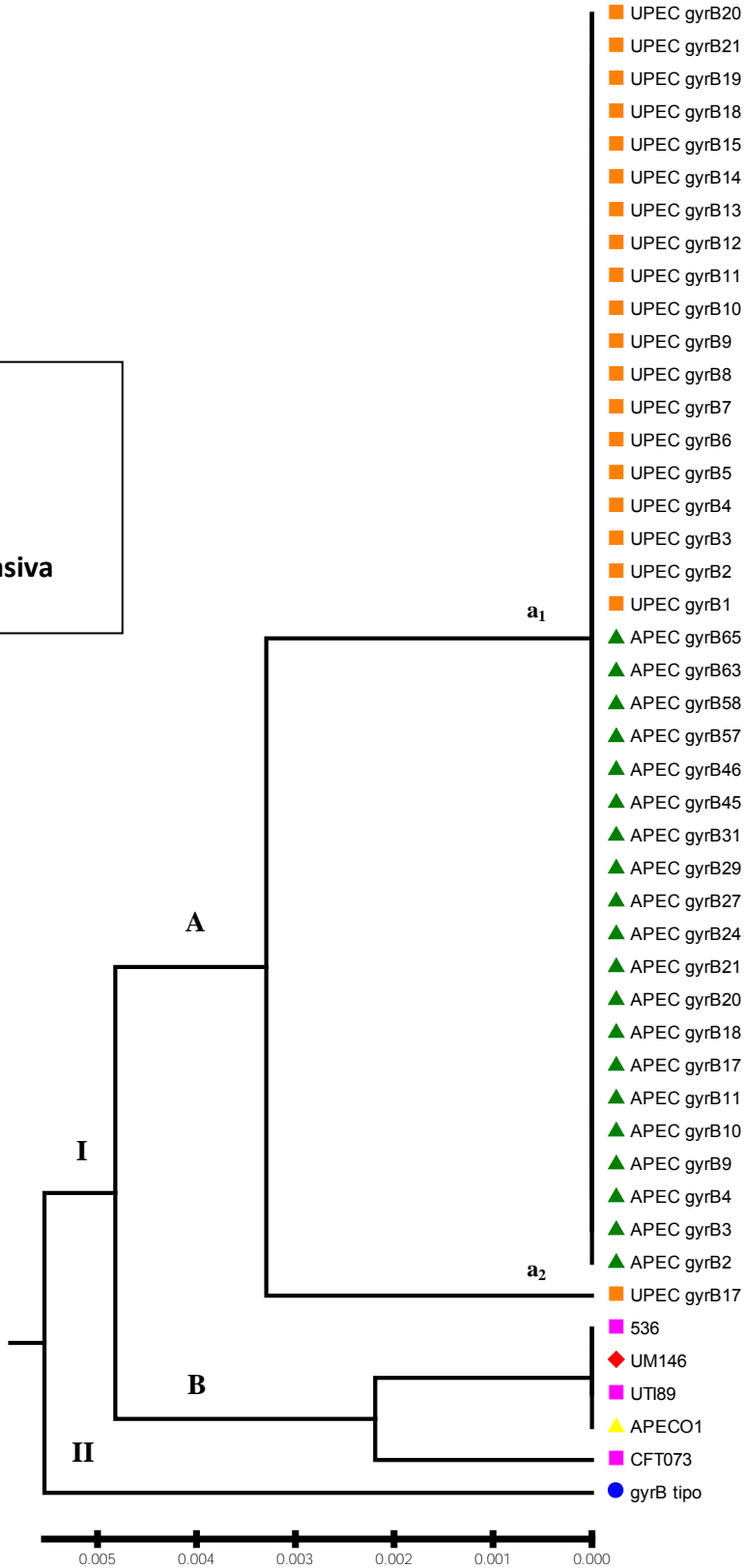
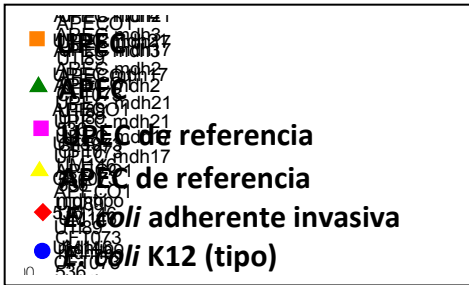


Figura 13. Dendrograma del gen *gyrB*

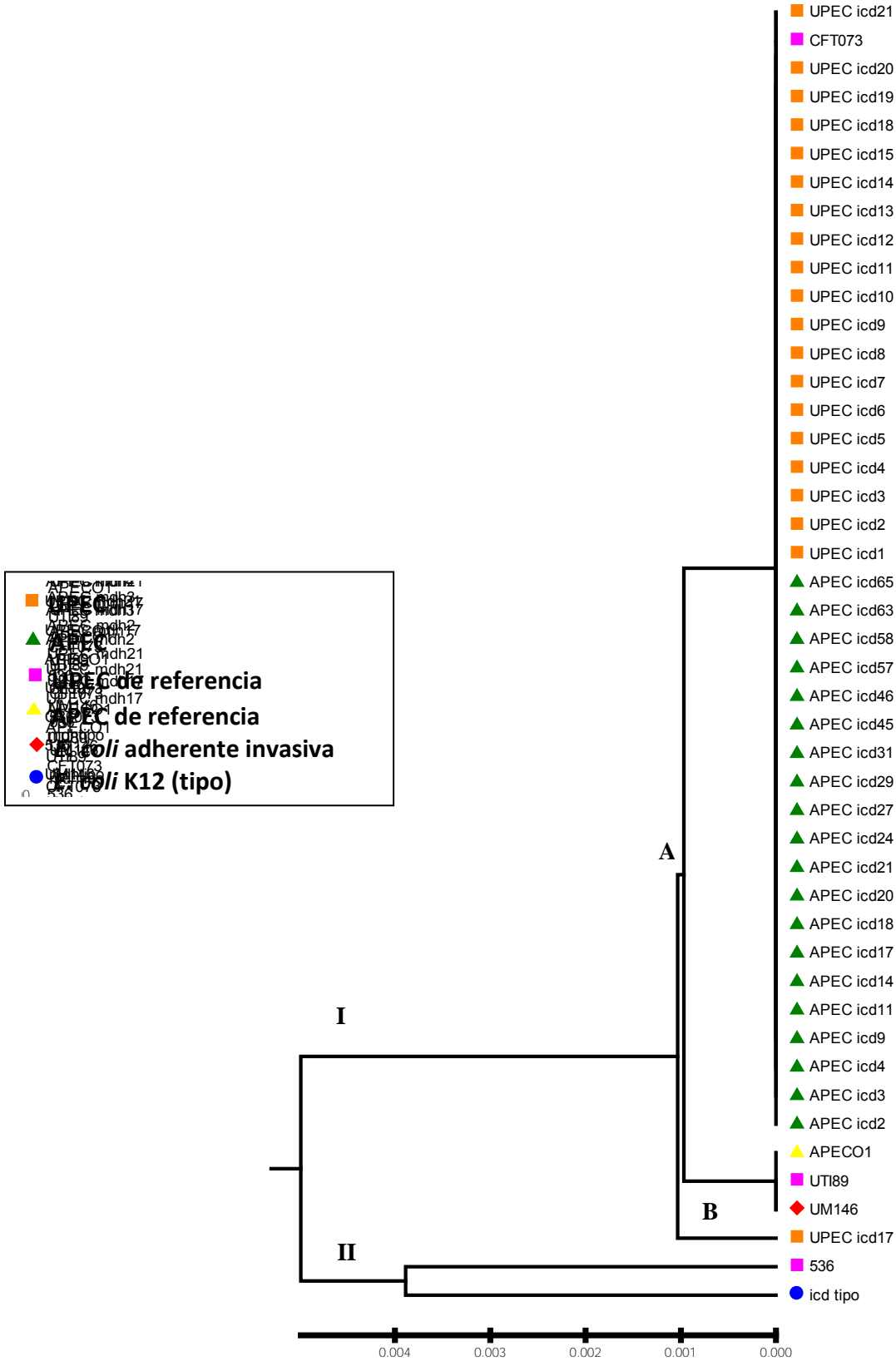


Figura 14. Dendograma del gen *icd*

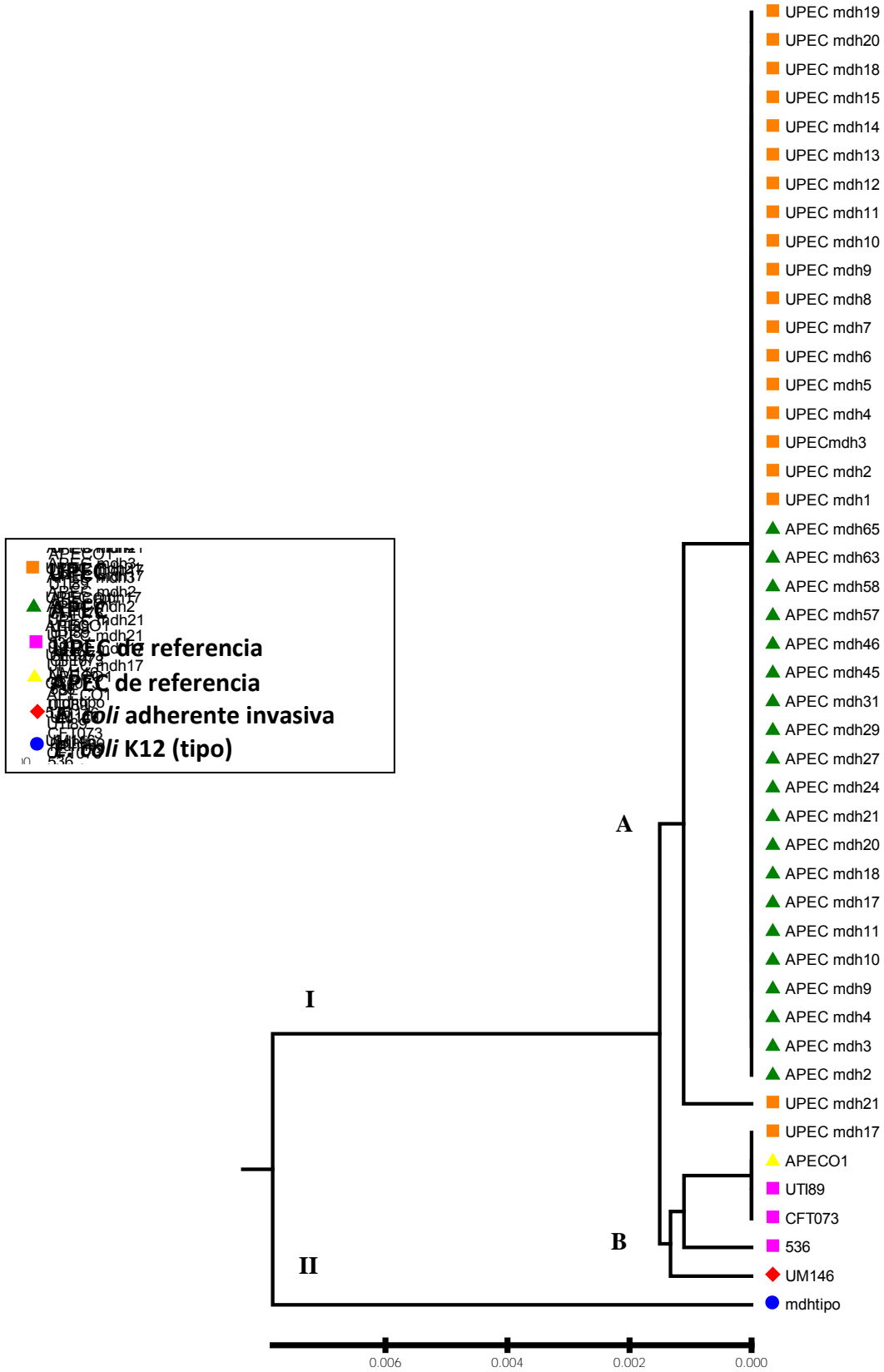


Figura 15. Dendrograma del gen *mdh*

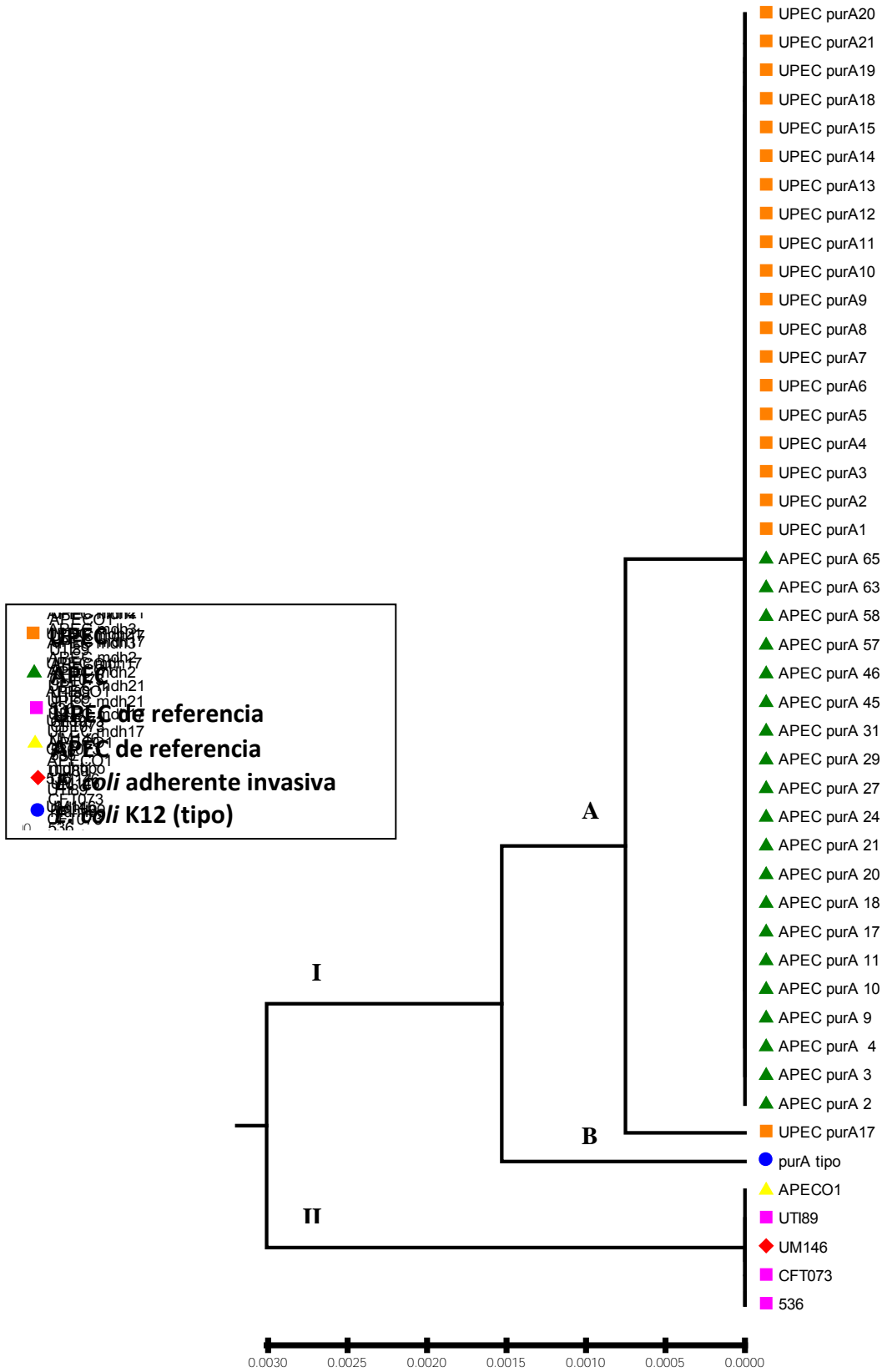


Figura 16. Dendrograma del gen *purA*

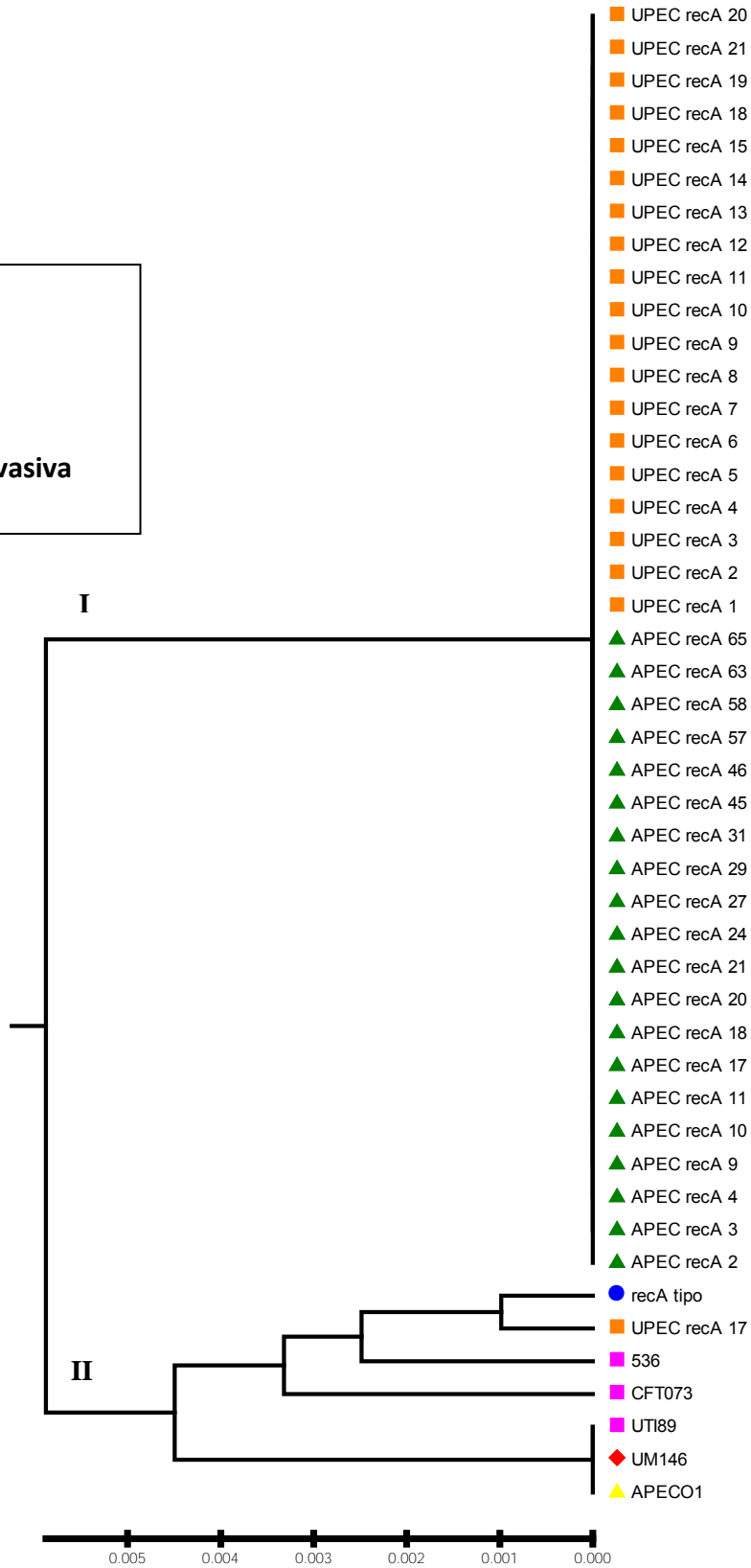
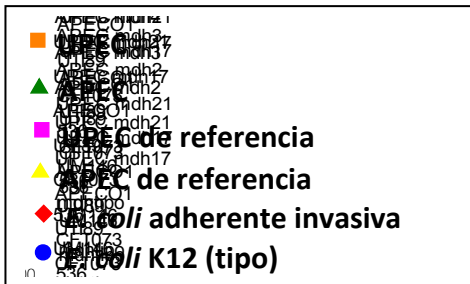


Figura 17. Dendrograma del gen *recA*

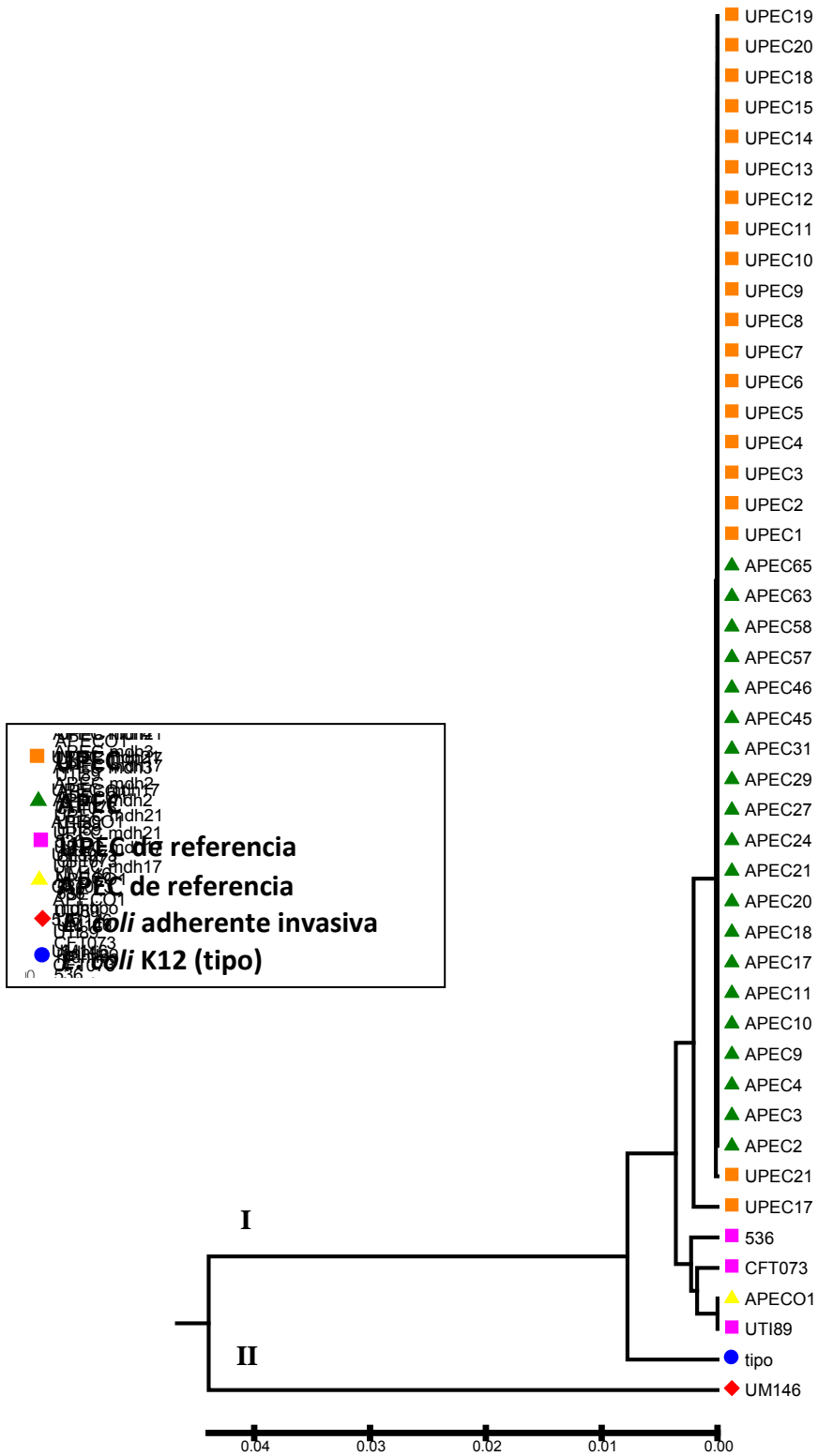


Figura 18. Concatenado de 7 genes de metabolismo básico

6. Discusión

El cromosoma de una bacteria está compuesto de un genoma conservado, el cual contiene la información genética requerida para sus funciones celulares básicas, y un genoma flexible o accesorio, que codifica para rasgos adaptativos benéficos para la bacteria, bajo ciertas condiciones ambientales. En el presente estudio, se analizaron genes de metabolismo básico, o sea pertenecientes a la región conservada del genoma, cabe destacar que mientras otros estudios utilizan cepas de diferentes serogrupos, lo cual dificulta una comparación precisa de las cepas aviares y humanas, en este se utilizaron cepas pertenecientes a un solo serogrupo.

Distintos estudios concluyen que UPEC y APEC poseen genes que codifican para adaptaciones similares para un estilo de vida extraintestinal, lo cual sugiere que existe una amplia posibilidad de que cepas APEC puedan ser patógenas en seres humanos y UPEC tenga la capacidad de ser patógena para aves, ya que ambas poseen un set común de genes de virulencia, adhesinas, sistemas de adquisición de hierro, sistemas de resistencia al complemento e invasinas (Arthur *et al.*, 1989; Kaper *et al.*, 2004; Rodriguez-Siek *et al.*, 2005).

No se han encontrado genes específicos y únicos en cepas de UPEC o APEC que codifiquen para factores de virulencia, esto indica que las cepas ExPEC pueden carecer de especificidad de huésped, estudios demuestran que algunos genes de virulencia presentes en plásmidos e islas de patogenicidad de APEC (aerobactina, salmoquelina y operones de sitio) también están presentes en islas de patogenicidad y plásmidos de UPEC. (Sorsa *et al.*, 2003; Rodriguez-Siek *et al.*, 2005; Ewers *et al.*, 2007). Una creciente evidencia apunta a que APEC puede tratarse de un fuente de transmisión de UPEC, apoyando la hipótesis de que las aves de postura pueden fungir como vehículo para *E. coli* uropatógena (Johnson *et al.*, 2003; Rodriguez-Siek *et al.*, 2005; Ron, 2006; Ewers *et al.*, 2007). Así mismo se ha encontrado que plásmidos de APEC contribuyen a la uropatogenicidad de *E. coli* en ratón (Skyberg *et al.*, 2006). Por otro lado, algunas

investigaciones han demostrado que cepas de APEC y sus plásmidos pueden ser transmitidos a hospederos humanos (Levy *et al.*, 1976; Saif, 2008), estudios donde aislados de APEC fueron comparados con aislados de infecciones del tracto urinario y meningitis neonatal, han revelado que estos patotipos tienen una superposición en serogrupos, grupos filogenéticos, genes de virulencia y en la capacidad de causar enfermedades en ciertos modelos animales (Rodriguez-Siek *et al.*, 2005; Ron, 2006; Ewers *et al.*, 2007; Moulin-Schouleur *et al.*, 2007).

En el presente trabajo, en los genes *adk*, *gyrB*, *fumC* y *purA*, se localizaron en el mismo grupo 39 de las 40 cepas analizadas, esto debido a que sus secuencias fueron idénticas y no presentaron cambios de nucleótidos, a una distancia sumamente corta, en otro grupo se encontró UPEC 17, ya que sus secuencias respecto a cada gen mencionado presentaron un cambio de nucleótido.

En el gen *icd*, 39 cepas se localizaron en el mismo grupo, mientras que UPEC 17 estuvo en un grupo distinto, ya que su secuencia presentó un cambio de nucleótido, además de ser el único gen, donde una cepa uropatógena de referencia (CFT073), se agrupó junto con las cepas de estudio, con una secuencia idéntica.

En *recA* UPEC 17, no solo se situó en un grupo distinto al de las otras 39 cepas estudiadas, sino que se localizó en un clado distinto, cabe destacar que UPEC 17 se encontró más lejana del grupo de cepas ST131, que incluso la cepa tipo, esto debido a que su secuencia presentó 5 cambios de nucleótidos respecto a las cepas de estudio, siendo en este gen donde UPEC 17 presentó mayor variación en su secuencia, en comparación con las otras 39 cepas.

En *mdh* se presentó un patrón muy similar, localizándose en el mismo grupo 38 cepas de estudio, sin embargo, en el caso de este gen a una distancia relativamente corta se encontró UPEC 21, ya que su secuencia presentó en comparación con las otras 38 un cambio de nucleótido, mientras que UPEC17 se situó en otro clado, ya que su secuencia, tuvo 2 cambios de nucleótidos, sin embargo en el caso de UPEC 21, el loci dónde se presentó el cambio de nucleótido no se encontraba registrado con anterioridad, lo cual conlleva a un

nuevo registro en la base de datos de MLST y en la obtención de un ST y un complejo ST nuevos.

Analizando conjuntamente los 7 genes de metabolismo básico en el concatenado, se tiene que 38 cepas se encuentran en el mismo grupo y su ST es el mismo, lo que indica que respecto al genoma conservado, no existe diferencia entre APEC y UPEC, y a pesar de que las cepas UPEC 21 y UPEC 17, se encontraron en grupos diferentes es de remarcarse que se localizaron a una distancia considerablemente corta del grupo más grande (grupo ST 131). Los resultados obtenidos en el presente estudio son consistentes con los resultados de otro estudio de MLST (Johnson *et al.*, 2007), donde al comparar secuencias de APEC O1 con secuencias de ExPEC incluidas cepas uropatógenas, se encontró que APEC O1 pertenecía al mismo ST (ST95) que las cepas uropatógenas. De igual modo el estudio realizado por Mora y colaboradores (2009), donde al analizar filogenéticamente con la técnica de MLST cepas de APEC y UPEC, encontraron que tanto APEC como UPEC pertenecían al mismo ST y que ambos patotipos se agruparon juntos (ST 59 grupo D o ST 95 grupo B2), así como encontraron grupos clonales de cepas con origen aviar y humano, siendo estos resultados consistentes a los del presente trabajo. De igual modo un estudio realizado en Brasil (Rojas *et al.*, 2014) en el cual se realizó una filogenia con la técnica de MLST, donde se incluyeron los mismos 7 genes de metabolismo básico que en el presente trabajo y se analizaron cepas aviares, uropatógenas y otras ExPEC, se encontró que las cepas brasileñas de APEC comparten similitudes genéticas con cepas de UPEC y en el análisis concatenado se agruparon juntas. Por último más no menos importante es de mencionarse que también consistente con el presente trabajo, el estudio realizado en 2010 por Lukjancenکو y colaboradores, quienes a través de la técnica de MLST compararon 61 secuencias de *E.coli* encontrando que en la filogenia cepas aviares y uropatógenas se localizaron en el mismo grupo y mismo clado. Lo cual indica que es probable que ambas cepas tienen un ancestro común; objetivo de este trabajo donde el análisis de secuencias ubica a las *Escherichia coli* O25:H4 en una misma rama.

7. Conclusión y Perspectivas

Los resultados obtenidos en este estudio, denotan que respecto a los genes de metabolismo básico, esto es el genoma conservado, tanto las cepas uropatógenas como las cepas aviar patógenas guardan una relación clonal.

Para evaluar de modo integral la relación entre APEC y UPEC es importante y necesario analizar su genoma, no sólo en su región conservada, sino en su región flexible, se recomienda realizar estudios de genes que codifican para factores de virulencia, así como realizar estudios acerca de plásmidos, elementos genéticos móviles e islas de patogenicidad.

El presente trabajo permitiría la realización de un análisis de genómica comparativa, dado que los genes del genoma conservado mostraron poca variación entre los patotipos analizados. Por lo que, el análisis de los genes del genoma accesorio podrían dar una perspectiva de los mecanismos de adaptación de dichas cepas a diferentes nichos y, por lo tanto, a diferentes hospederos.

8. Bibliografía

Anderson, G.G., Palermo, J.J., Schilling, J.D., Roth, R., Heuser, J., Hultgren, S.J. Intracellular Bacterial Biofilm-Like Pods in Urinary Tract Infections. *Science* 301, 105-107 (2003).

Arthur, M., Johnson, C.E., Rubin, R.H., Arbeit, R.D., Campanelli, C., Kim, C., Steinbach, S., Agarwal, M., Wilkinson, R., Goldstein, R. Molecular epidemiology of adhesion and hemolysin virulence factors among uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 57, 303-313 (1989).

Bahrani-Mougeot, F., Gunther, N.W., Donnenberg, M.S., Mobley, H.L.T. (2002). Uropathogenic *Escherichia coli*. En: *Escherichia coli virulence mechanisms of a versatile pathogen*. EUA: Elsevier. p.p. 239-259.

Barnes, H.J., Vaillancourt, J.P., Gross, W.B. (2003). Colibacillosis. En: *Diseases of Poultry*. (11^a ed.) EUA: Elsevier. p.p.631-650.

Blanco, J.E., Blanco, M., Mora, A., Blanco, J. Prevalence of bacterial resistance to quinolones and other antimicrobials among avian *Escherichia coli* strains isolated from septicemic and healthy chickens in Spain. *J. Clin. Microbiol.* 35, 2184-2185 (1997).

Blanco, J.E., Blanco, M., Mora, A., Jansen, W.H., García, V., Vazquez, M.L., Blanco, J. Serotypes of *Escherichia coli* isolated from septicemic chickens in Galicia (Northwest Spain). *Vet. Microbiol.* 61, 229-235 (1998).

Bonnet, R. Growing group of extended-spectrum β -lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* 49, 441-445 (2005).

Bower, J.M., Eto, D.S., Mulvey, M.A. Covert operations of uropathogenic *Escherichia coli* within the urinary tract. *Traffic* 6, 18-31 (2005).

Canton, R., Coque, T.M. The CTX-M β -lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol* 9, 466-475 (2006).

Clermont, O., Bonacorsi, S., Bingen, E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol* 66, 4555-4558 (2000).

Croxen, M.A., Law, R.J., Schulz, R., Keeney, K.M., Wludarska, M., Finlay, B.B. Recent advances in understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol.* 25, 822-880 (2013).

Curtis, H., Barnes, N.S., Schnek, A., Massarini, A. (2013). *Curtis Biología*. (7ªed.) Argentina: Editorial Panamericana.p.p. 185-187.

Dho-Moulin, M. y Fairbrother, J.M. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Vet. Res.* 30, 299-316 (1999).

Enright, M., Spratt, B.G. Multilocus sequence typing. *Trends in microbiology* 7 (12), 482-487 (1999).

Eslava, C., Mateo, J., Cravioto, A. (1994). Cepas de *Escherichia coli* relacionadas con la diarrea. En: *Diagnostico de laboratorio e infecciones gastrointestinales*. México: Secretaria de Salud. p.p. 251-265.

Eto, D.S., Sundsbak, J.L., Mulvey, M.A. Actin-gated intracellular growth and resurgence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Cell. Microbiol.* 8, 704-717 (2006).

Eto, D.S., Jones, T.A., Sundsbak, J.L., Mulvey, M.A. Integrin-Mediated Host Cell Invasion by Type 1–Piliated Uropathogenic *Escherichia coli*. *PLoS Pathog.* 3, e100 (2007).

Ewerst, C., Li, G., Wilking, H., Kiebling, S., Alt, K., Antaó, E.M., Laturus, C., Diehl, I. Glodde, S., Homeier, T., Böhnke, U., Steinrück, H., Philipp, H.C., Wieler, L. H. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: How closely related are they?. *International Journal of Medical Microbiology* 297, 163-176 (2007).

Ewing, W.H. (1986). *Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae*. (4ª ed.) EUA: Elsevier. p.p 510-518.

Farmer, J. (1995). Enterobacteriaceae: Introduction and identification. En: *Manual of clinical microbiology*. (6ª ed.) EUA: ASM Press.p.p. 438-449.

Foxman, B. Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. *American Journal of Medicine* 113 (1A), 5s-13s (2002).

Foxman, B. The epidemiology of urinary tract infection. *Nat. Rev. Urol.* 7, 653-660 (2010).

González, M.C., Schaeffer, A.J. Treatment of urinary tract infection: what's old, what's new, and what works. *World J Urol* 17, 372-382 (1999).

Hacker, J., Bender, L. Ott, M., Wingender, J., Lund, B., Marre, R., Goebel, W. Deletions of chromosomal regions coding for fimbriae and hemolysins occur *in vitro* and *in vivo* in various extraintestinal *Escherichia coli* isolates. *Microbial Pathogenesis* 8, 213-225 (1990).

Hernando-Avenidaño, L. (2008). *Nefrología clínica.* (3^a ed.) España: Editorial Médica Panamericana. p.p. 522-544.

Imirzaloglu, C., Hain, T., Chakraborty, T., Domman, E. Hidden pathogens uncovered: metagenomic analysis of urinary tract infections. *Andrologia* 40, 66-71 (2008).

Johnson, J.R., Murray, A.C., Gajewski, A., Sullivan, M., Snippes, P., Kuskowski, M.A., Smith, K.E. Isolation and molecular characterization of nalidixic acid-resistant extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* from retail chicken products. *Antimicrob Agents Chemother* 47 (2), 2161-2168 (2003).

Johnson, T.J., Kariyawasam, S., Wannemuehler, Y., Mangiamele, P., Johnson, S.J., Doetkott, C., Skyberg, J.A., Lynne, A.M., Johnson, J.R., Nolan, L.K. The Genome Sequence of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Strain O1:K1:H7 Shares Strong Similarities with Human Extraintestinal Pathogenic *E. coli* Genomes. *J. Bacteriol.* 189 (8), 8228-8238 (2007).

Kaper, J.B., Nataro, J.P., Mobley, H.L. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2, 123-140 (2004).

Kariyawasam, S., Scaccianoce, J., and Nolan, L.K. Common and Specific Virulence-Associated Markers of Avian and Human Extraintestinal Pathogenic

Escherichia coli as Determined by Genomic Subtractive Hybridization. *BMC Microbiol.* 7, 81-88 (2007).

Kucheria, R., Dasgupta, P., Sacks, S.H., Khan, M.S., Serrín, N.S. Urinary tract infections: new insights into a common problem. *Postgrad. Med. J.* 81, 83-86 (2005).

Laupland, K.B., Ross, T., Pitout, J.D., Church, D. L., Gregson, D.B. Community-onset urinary tract infections: a population-based assessment. *Infection* 35, 150-153 (2007).

Levy, S.B. FitzGerald, G.B., Macone, A.B. Spread of antibiotic-resistant plasmids from chicken to chicken and from chicken to man. *Nature* 260, 40-42 (1976).

Lukjancenko, O., Wassenaar, T.M., Uesery, D.W. Comparison of 61 Sequenced *Escherichia coli* Genomes. *Microb Ecol* 60, 708-720 (2010).

MacFaddin, J.F. (2003). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. (3ª ed.) México: Médica Panamericana. p.p. 92-97.

Metzker, M.L., Caskey, T.C. Polymerase Chain Reaction (PCR). *Encyclopedia of life sciences.* 1-9 (2001).

Mora, A., López, C., Dabhi, G., Blanco, M., Blanco, J.E., Alonso, M.P., Herrera, A., Mamani, R., Bonacorsi, S., Moulin-Schouleur, M., Blanco, J. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* O1:K1:H7/NM from human and avian origin: detection of clonal groups B2 ST95 and D ST59 with different host distribution. *BMC Microbiology* 9 (132), doi: 10.1186/1471-2180-9-132 (2009).

Moulin-Schouleur, M., Schouleur, P., Tailliez, M.R., Kao, A., Bree, P., Germon, E., Oswald, J., Mainil, M., Blanco, M., Blanco, J. Common virulence factors and genetic relationships between O18:K1:H7 *Escherichia coli* isolates from human and avian origin. *J. Clin. Microbiol.* 44, 3484-3492 (2006).

Moulin-Schouleur, M., Répérant, M., Laurent, S., Brée, A., Mignon-Grasteau, S., Germon, P., Rasschaert, D., Schouleur, C. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains of avian and human origin: link between phylogenetic

relationships and common virulence patterns. *J. Clin. Microbiol.* 45 (10), 3366-3376 (2007).

Mulvey M.A., Lopez-Boado, Y.S., Wilson, C.L., Roth, R., Parks, W.C., Heuser, J., Hultgren S.J. Induction and Evasion of Host Defenses by Type 1-Piliated Uropathogenic *Escherichia coli*. *Science* 282, 1494-1497 (1998).

Mulvey M.A., Schilling, J.D., Martinez, J.J., Hultgren, S.J. Bad bugs and beleaguered bladders: Interplay between uropathogenic *Escherichia coli* and innate host defenses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 8829-8835 (2000).

Mulvey M.A., Schilling, J.D., Hultgren, S.J. Establishment of a Persistent *Escherichia coli* Reservoir during the Acute Phase of a Bladder Infection. *Infect. Immun.* 69, 4572-4579 (2001).

Muñoz-Torres, J.C., Alvarez-Varela, E., Caravia-Pubillones, I., Peña-Brito, I. Resistencia a antibióticos en aislamientos de *Escherichia coli* en infecciones del tracto urinario inferior adquiridas en la comunidad: diferencias en relación con la edad. *Revista CENIC Ciencias Biológicas* 39, 179-182 (2008).

Najar, M.S., Saldanha C.L., Banday K.A. Approach to urinary tract infections. *Indian J Nephrol.*, 19 (4), 129-139 (2009).

Nataro, J.P., Kaper J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 11, 142-201 (1998).

Okeke, I.N., Laxminarayan, R., Bhutta, Z.A., Duse, A.G., Jenkins, P., O'Brien, T.F., Pablos-Mendez, A., Klugman, K.P. Antimicrobial resistance in developing countries. Part 1: recent trends and current status. *Lancet Infect Dis* 5, 481-493 (2005).

Paterson, D.L. Bonomo, R.A. Extended-spectrum- β -lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev* 18, 657-686 (2005).

Peirano, G., Pitout, J.D.D. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing CTX-M β -lactamases: the worldwide emergence of clone ST 131 O25:H4. *Int. J. Antimicrob. Agents* 35, 316-321 (2010).

- Pitcher, D.G., Saunders, N.A., Owen, R.J.** Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Letters in Applied Microbiology* 8, 151-156 (1989).
- Pitout J.D., Nordmann, P., Laupland, K.B., Poirel, L.** Emergence of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) in the community. *J.Antimicrob. Chemother* 56, 52-59 (2005).
- Rodriguez-Siek, K.E., Giddings, C.W., Doetkott, C., Johnson, T.J., Nolan, L.K.** Characterizing the APEC pathotype. *Vet. Res.* 36, 241-256 (2005).
- Rodriguez-Siek, K.E., Giddings, C.W., Doetkott, C., Johnson, T.J., Nolan, L.K.** Comparison of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis. *Microbiology* 151, 2097-2110 (2005).
- Rogers, B.A., Sidjabat, H.E., Paterson, D.L.** *Escherichia coli* O25b-ST131: a pandemic, multiresistant, community-associated strain. *J.Antimicrob. Chemother.* 66, 1-14 (2011).
- Rojas, T.C.G., Maluta, R.P., Koenigkan, L.V, Dias da Silveira, W.** *In silico* phylogenetic and virulence gene profile analyses of avian pathogenic *Escherichia coli* genome sequences. *Pesq. Vet. Bras.* 34 (2), 129-133 (2014).
- Romero-Caballo, R.** (2007). Microbiología y Parasitología humana: bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias (3^a ed.) México: Editorial Panamericana. p.p. 751-773.
- Ron, E.Z.** Host specificity of septicemic *Escherichia coli*: human and avian pathogens. *Current Opinion in Microbiology.* 9 (1), 28-32 (2006).
- Saif, Y.M.** (2008). Diseases of poultry (12a ed.). EUA: Blackwell Publishing. p.p. 266-276.
- Schappert, S.M.** Ambulatory care visits to physician offices, hospital outpatient departments, and emergency departments. *Vital Health Stat* 13,143:i-iv, 1-39 (1999).

Singh, A., Goering, R.V., Simjee, S., Foley, S.L. Zervos, M.J. Application of Molecular Techniques to the Study of Hospital Infection. *Clin. Microbiol.* 19 (3), 612-630 (2006).

Skyberg, J.A., Johnson, J.R., Clabots, C., Logue, C.M., Nolan, L.K. Acquisition of avian pathogenic *Escherichia coli* plasmids by a commensal *E. coli* isolate enhances its abilities to kill chick embryos, grow in human urine, and colonize the murine kidney. *Infect Immun* 74, 6287-6292 (2006).

Sorsa, L.J., Dufke, S., Heesemann, J., Schubert, S. Characterization of an iroBCDEN gene cluster on a transmissible plasmid of uropathogenic *Escherichia coli*: evidence for horizontal transfer of a chromosomal virulence factor. *Infect Immun* 71, 3285-3293 (2003).

Stamm, W.E. Scientific and clinical challenges in the management of urinary tract infections. *AM. J. Med.* 113, 1S-4S (2002).

Terrance, L., Randall, M. (2011). Biorepositories and their foundations microbial forensics considerations. En: *Microbial forensics*. (2^a ed.) EUA: Academic Press. p.p. 581-601.

Westermeier, R. (1997). *Electroforesis in Practice: a Guide to Methods and Applications of DNA and Protein Separation* (4^a ed.) Alemania: Wiley-VCH. p.p. 151-159.

Wiles, T.J., Kulesus, R.R., Mulvey, M.A. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Experimental and Molecular Pathology* 85, 11-19 (2008).

Wirth, T., Falush, D., Lan, R., Colles, F., Mensa, P., et al. Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Mol Microbiol* 60, 1136-1151 (2006).

Vázquez, J.A., Berrón, S. (2004). Multilocus sequence typing: el marcador molecular de la era de Internet. En: *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. Vol. 22, Nº. 2. España: Editorial Elsevier p.p. 113-120.

Voet, D. (2006). Electroforesis. En: *Bioquímica*. (3^a ed.) Argentina: Editorial Medica Panamericana. p.p. 152-163.

9. Apéndices

Apéndice 1

Siembra en medios de cultivo y Pruebas bioquímicas

Los medios de cultivo para el aislamiento y conservación de las cepas de *E. coli* se realizaron de acuerdo a lo descrito por el proveedor de cada medio.

Medios de cultivo para aislamiento y almacenamiento

Agar sangre (AS) BD Bioxon ®

Composición

Infusión de músculo corazón 2.0 g

Extracto de Levadura 5.0 g

Cloruro de sodio 5.0 g

Agar bacteriológico 15.0 g

Digerido pancreático de caseína 13.0 g

pH 7.3 ± 0.2

- a. Suspender 40 g de polvo en un litro de agua destilada, calentar hasta que hierva para disolver la agarosa.
- b. Esterilizar en autoclave por 15min/121°C
- c. Para la elaboración de placas con sangre, enfriar la base a 45-50°C y adicionar 5 % de sangre estéril desfibrinada.
- d. Vaciar a cajas Petri estériles y dejar solidificar, conservar 4 °C

Agar MacConkey (MAC) BD Bioxon ®

Composición

Digerido pancreático de gelatina 17.0 g

Digerido pancreático de caseína 1.5 g

Digerido peptídico de tejido animal 1.5 g

Sales biliares 1.5 g

Cloruro de sodio 5.0 g

Cristal violeta 0.001 g

Lactosa 10.0 g

Agar bacteriológico 13.5 g

Rojo neutro 0.03 g

pH 7.1 ± 0.2

- a. Suspender 50 g de polvo en un litro de agua destilada, calentar hasta hierva para disolver la agarosa.
- b. Esterilizar en autoclave por 15min/121°C
- c. Vaciar a cajas Petri estériles y dejar solidificar, conservar 4 °C

Gelosa Especial BD Bioxon ®

Composición

Base Agar Sangre 20.0 g

Agar bacteriológico 15.0 g

Extracto de carne 1.5g

pH 7.2

- a. Suspender en agua destilada (1L) y ajustar el pH del medio
- b. Calentar hasta que hierva para poder disolver la agarosa
- c. Vaciar 4mL por vial o tubo
- d. Esterilizar en autoclave por 20min. /120°C
- e. Inclinar el vial o tubo y dejar que solidifique, refrigerar a 4°C hasta su uso.

Medios de cultivo para pruebas bioquímicas, así como reactivos utilizados para su lectura

Para las diferentes pruebas bioquímicas, se tomó un asa de la bacteria crecida en Gelosa Especial y sembró en agua peptonada al 1% (3mL) e incubo a 35°C/3horas. A partir de este cultivo bacteriano se inocularon los tubos de las distintas pruebas.

Agua peptonada 1 % Bioxon ®

Composición

Peptona de caseína

- a. Disolver 10g en un litro de agua destilada
- b. Ajustar pH del medio a 7.2
- c. Distribuir en tubos de ensayo de 15x150

d. Esterilizar en autoclave por 20min. /120°C

e. Inclinar el vial o tubo y dejar que solidifique, refrigerar a 4°C hasta su uso.

Agar hierro de Kligler DIBICO ®

Composición

Extracto de carne 3.0 g/L

Extracto de levadura 3.0 g/L

Peptona de caseína 15 g/L

Peptona de carne 5.0 g/L

Lactosa 10.0 g /L

D(+) glucosa 1.0 g/L

Citrato de amonio y hierro III 0.5 g/L

Cloruro de Sodio 5.0 g/L

Tiosulfato de Sodio 0.5 g /L

Rojo fenol 0.024 g /L

Agar 12.0 g/L

pH 7.1 ± 0.1

a. Suspender 55 g en un litro de agua destilada, calentar hasta que hierva para disolver el agar.

b. Vaciar 4mL a cada tubo de 13x100

c. Esterilizar en autoclave por 20min. /120°C

d. Inclinar los tubos y dejar que solidifique el agar, guardar en refrigeración a 4°C hasta su uso.

Con el asa o la aguja bacteriológica se tomó una asada de la bacteria en estudio o una colonia y se pinchó el agar hasta el fondo para posteriormente realizar una siembra en estriación en el bisel. Se incubo 24hrs a 37°C en condiciones aerobias. Es un medio de cultivo utilizado para la identificación de enterobacterias, en función de su capacidad para: fermentar glucosa, fermentar lactosa, producir gas a partir de la fermentación, producir hidrógeno sulfurado. Todas las cepas de este trabajo presentaron un patrón lactosa, glucosa y gas positivo y producción de H₂S negativo.

Agar SIM BD Bioxon ®

Composición

Peptona de caseína 20g/L

Peptona de carne 6.6 g/L

Citrato de amonio y hierro lli 0.2 g /L

Tiosulfato de Sodio 0.2 g /L

Agar 3.0 g/L

pH 7.3 ± 0.1

- a. Suspender 30 g en un litro de agua destilada, calentar hasta que hierva para disolver el agar.
- b. Vaciar 3mL a cada tubo de 13x100
- c. Esterilizar en autoclave por 20min. /120°C
- d. Inclinar los tubos y dejar que solidifique el agar, guardar en refrigeración a 4°C hasta su uso.

Se sembró en este medio, se incubo a 35°C/24 horas en condiciones de aerobiosis, posteriormente se agregaron 5 gotas de reactivo de Kovacs. Se observó movilidad en base a la turbidez en el medio. Todas las cepas del presente trabajo fueron indol positivas al desarrollar un color rojo al agregar al reactivo de Kovacs, indicando la capacidad de formar indol. Todas las cepas presentaron movilidad y fueron negativos para la producción de Ácido Sulfhídrico.

Agar Citrato de Simmons BD Difco ®

Composición

Fosfato Dihidrogenado de Amonio 1g/L

Fosfato Dipotásico 1g/L

Cloruro de Sodio 5.0 g /L

Citrato de Sodio 2.0 g/L

Sulfato de Magnesio 0.20 g/L

Agar 15.0 g /L

Azul Bromotimol 0.08 g/L

pH 6.9 ± 0.1

- a. Suspender 55 g en un litro de agua destilada, calentar hasta que hierva para disolver el agar.

- b. Vaciar 3mL a cada tubo de 13x100
- c. Esterilizar en autoclave por 20min. /120°C
- d. Inclinar los tubos y dejar que solidifique el agar, guardar en refrigeración a 4°C hasta su uso.

Medio utilizado para la diferenciación de enterobacterias en base a la capacidad de usar citrato como única fuente de carbono y energía. Se inocularon en este medio, se incubó a 35 °C/24 horas en condiciones de aerobiosis. Todas las cepas fueron negativas para esta prueba.

Prueba RM-VP BD Bioxon ®

Composición

Polipeptona o peptona tamponada 7.0 g /L

Dextrosa (glucosa) 5.0 g/L

Buffer fosfato dipotásico 5.0 g/L

pH 6.9 ± 0.1

- a. suspender en un litro de agua destilada y ajustar el pH del medio.
- b. vaciar 4mL a cada tubo
- c. Esterilizar en autoclave por 20min. /120°C
- d. Inclinar los tubos y dejar que solidifique el agar, guardar en refrigeración a 4°C

Se sembró en este medio, se incubó a 35°C/48horas en condiciones de aerobiosis, se dividió el medio para hacer las pruebas por separado. Para RM se agregó 5 gotas de rojo de metilo, se agitó hasta homogenizar, para VP se agregaron 12 gotas de α -naftol 5% y 4 gotas de KOH, se dejó reposar 15 minutos. Todas las cepas fueron negativas para esta prueba.

Prueba de gluconato

Composición

Peptona 1.5 g /L

Extracto de Levadura 1.0 g/L

Fosfato de Potasio 1.0 g/L

Gluconato de Potasio 40.0 g /L

pH 7.0 ± 0.1

- a. suspender en un litro de agua destilada, ajustar el pH del medio
- b. Vaciar 2mL para cada tubo
- c. Esterilizar en autoclave por 20min. /120°C
- d. Inclinar los tubos y dejar que solidifique el agar, guardar en refrigeración a 4°C

Esta prueba determina la capacidad de un microorganismo de oxidar gluconato como única fuente de carbono. Se inocularon los tubos se incubaron a 35°C/48horas, se agrega reactivo de Benedict. Todas las cepas fueron negativas para esta prueba.

Prueba de Malonato – Fenilalanina BD Difco ®

(Caldo para Malonato con Fenilalanina, medio de Shaw y Clarke)

Composición

Malonato de Sodio 3.0 g/L

DL- fenilalanina 2.0 g/L

Cloruro de Sodio 2.0 g/L

Sulfato de Amonio 2.0 g/L

Extracto de levadura 1.0 g /L

Fosfato dipotásico 0.6 g /L

Fosfato monopotásico 0.4 g /L

Glucosa (dextrosa) 0.25 g/L

Azul de bromotimol 0.025 g/L

pH 6.7 ± 0.2

- a. suspender en un litro de agua destilada y ajustar el pH del medio.
- b. Vaciar 3mL para cada tubo
- c. Esterilizar en autoclave por 20min. /120°C
- d. Inclinar los tubos y dejar que solidifique el agar, guardar en refrigeración a 4°C

Tanto la glucosa como el malonato sirven como fuentes de carbono, los organismos que no utilizan el malonato como fuente de carbono, crecerán en este medio, Medio de cultivo utilizado para diferenciar en base a la presencia de la enzima fenilalanina deaminasa. Se inocularon los tubos se incubaron a 35°C/48horas. Todas las cepas fueron negativas para esta prueba.

Reactivo de Kovacs

- a. Disolver 10g de p-dimetilaminobenzaldehido en 150mL de alcohol isoamilico puro
- b. Agregar lentamente 50mL de HCl concentrado
- c. Conservar en un frasco ámbar en refrigeración

α -naftol al 5% (reactivo utilizado en la prueba de Voges-Proskauer, actúa como intensificador de color)

- a. Disolver 5 g en 100mL de alcohol absoluto
- b. Transferir la solución a un frasco graduado de 100mL y llevarlo a 100mL con etanol absoluto, conservar en refrigeración.

Hidróxido de potasio al 40% (reactivo utilizado en la prueba de Voges-Proskauer, ayuda a la absorción de CO₂ en el medio RM-VP)

- a. Pesar con rapidez 40 g de KOH y disolver en menos de 100mL de agua destilada
- b. Transferir la solución a un frasco graduado de 100mL y llevarlo a 100mL con agua destilada
- c. Conservar en una botella de polietileno o recubierta de parafina

Rojo de metilo (indicador de pH en la prueba de RM-VP, denota los cambios de acidez por reacciones de color por encima de un rango de pH 4.4-6 o menor en el medio, el reactivo permanece rojo, mientras que con la acidez disminuida a pH 6, el indicador vira a amarillo)

- a. Disolver 0.1 g de rojo de metilo en 300mL de alcohol etílico al 95%
- b. Agregar 200 mL de agua desionizada a la mezcla de alcohol- indicador para obtener un volumen final de 500mL, mantener en refrigeración.

Las 40 cepas del presente trabajo presentaron el mismo perfil bioquímico, característico de Enterobacterias, bacilos Gram negativos, *E.coli*.

Apéndice 2

Extracción de DNA por método GES

Protocolo de extracción de DNA bacteriano por método de GES

Se realizó el siguiente protocolo en 20 cepas de *E. coli* uropatógena (Pitcher *et al.*, 1989).

1. Se incubo el cultivo bacteriano en agitación de 14 a 18 horas en un tubo de ensayo de 16x150 con 3 mL de caldo Luria pH 7.2 a 37° C.
2. Posteriormente a la incubación, se centrifugó toda la muestra en un tubo Eppendorf (Previamente etiquetado) a 12000 rpm por 5 min y se removió el sobrenadante.
3. Se resuspendió la pastilla obtenida por centrifugación en 100 µL de buffer TE pH=8.
4. Se añadieron 500 µL del reactivo de GES, se mezcló gentilmente a temperatura ambiente por 5 minutos (min.). Posteriormente se colocó en hielo.

Nota: Evitar la formación de burbujas durante la agitación con el reactivo de GES.

5. Se añadieron 250 µL de Acetato de amonio 7.5 M frío, se mezcló y se dejó reposar por 5 minutos en hielo.
6. Se añadieron 750 µL de una solución 24:1 de Cloroformo: Alcohol isoamilico, se dejó reposar 15 minutos en hielo, mezclando por inversión cada 5 minutos, posteriormente centrifugar a 13000 rpm por 15 min. Al finalizar la centrifugación se observaron 3 fases, el ADN permanece disuelto en la fase acuosa superior.
7. Se removió la fase acuosa (capa superior, aproximadamente 600 µL) y se transfirió a un tubo Eppendorf nuevo (previamente etiquetado).
8. Se añadieron 0.54 µL por volumen de isopropanol (aproximadamente 324 µL), se mezcló a temperatura ambiente en el agitador angular por 10 min., se dejó reposar en hielo por 10 minutos para permitir la precipitación y se centrifugo por 5

min a 13000 rpm para formar pastillas de ADN. Se desechó el isopropanol cuidadosamente.

9. Se lavó la pastilla de ADN 2 veces consecutivamente con 500 μ L de etanol al 70% en cada lavado, en cada lavado se centrifugo a 13000 rpm min por 3 minutos, al finalizar los lavados, se desechó el etanol por decantación.

10. Se dejó secar al aire, invierto el tubo sobre papel filtro.

11. Se disolvió en 100 μ L de agua para PCR.

12. Una vez obtenido el ADN se corre en un gel de agarosa al 1% a 100V por 20 minutos para ver la calidad del DNA.

13. Se almacena a -20°C .

Caldo Luria (LB): (Miller's LB Broth Base). Invitrogen ®. Lote 80265079.

- a. Suspender 25.0 g del medio en un litro de agua destilada.
- b. Dejar hidratar por 15 min.
- c. Hervir hasta completa disolución.
- d. Distribuir en tubos de ensayo de 16x150 mL con tapón de rosca (5 mL por tubo).
- e. Esterilizar en autoclave 15 min/ 121°C ó 15 lb.
- f. Conservar a 4°C .

Buffer TE (10mM Tris: 1mM EDTA, pH 8.0):

- a. 10 mL de Tris 1 M, pH 8.0.
- b. 2 mL de EDTA 0.5 M, pH 8.0.
- c. Aforar a 1000mL con agua estéril, o en caso contrario, esterilizar posteriormente la solución.

EDTA 0.5 M, pH 8.0:

- a. 186.1 g de EDTA dihidratado.
- b. 800 mL de Agua desionizada estéril.
- c. Agitar vigorosamente en agitador magnético y ajustar el pH a 8.0 con NaOH (aprox. 20 g).
- d. Aforar a 1000 mL con agua estéril o en caso contrario esterilizar la solución.

Solución de Tris-HCl 1M, pH 8.0:

- a. 121.14 g de Trizma base.
- b. Disolver en 600 mL de agua estéril agitando vigorosamente con ayuda de agitador magnético.
- c. Medir el pH con un potenciómetro.
- d. Ajustar el pH a 8.0 con HCl 1N o HCl concentrado.
- e. Aforar a 1000 mL con agua estéril o en caso contrario esterilizar posteriormente la solución.

GES

- a. 60 gr Tiocianato de Guanidina
- b. 20 mL 0.5 M EDTA pH 8.0
- c. 20mL agua desionizada estéril
- d. Calentar a 65°C y mezclar hasta disolver
- e. Añadir Sarkosyl al 10%
- f. Aforar a 100mL con agua desionizada estéril

Apéndice 3

Electroforesis en gel de agarosa

Componentes de la electroforesis en gel de agarosa

Agarosa

Coloide natural que se extrae de las algas, es un polisacárido lineal (con un peso molecular medio de ~12 000 Da), comprende unidades alternadas de galactosa y 3,6-anhidrogactosa. Los geles de agarosa poseen grandes «poros» y se emplean fundamentalmente para separar las moléculas grandes con un peso molecular de más de 200 kDa, permiten una electroforesis rápida, pero con una resolución limitada, por lo cual las bandas que se forman en los geles tienen tendencia a ser difusas y a esparcirse, ello obedece al tamaño de los poros y no puede controlarse (Westermeier, 1997; Voet, 2006).

Los geles de agarosa se obtienen por suspensión de agarosa seca en polvo en un tampón acuoso, tras lo cual se hace hervir la mezcla hasta que la agarosa se funde y se convierte en una solución transparente. A continuación, se vierte esta solución en un molde para gel y se deja enfriar a temperatura ambiente hasta que se forma un gel rígido. Al endurecerse, la agarosa forma una matriz cuya densidad viene determinada por su concentración (Westermeier, 1997; Voet, 2006).

Solución de electroforesis

La movilidad electroforética del ADN se ve afectada por la composición y la fuerza iónica del tampón de electroforesis. En ausencia de iones, la conductancia eléctrica es mínima y el ADN migra lentamente o ni siquiera se desplaza. En un tampón de elevada fuerza iónica la conductancia eléctrica es muy elevada y se genera una importante cantidad de calor. En el peor de los casos, el gel se funde y el ADN se desnaturaliza (Westermeier, 1997; Voet, 2006).

Se dispone de varios tipos de tampones para la electroforesis de ADN nativo bicatenario. Contienen EDTA (pH 8,0) y tris-acetato (TAE), tris-borato (TBE) o trifosfato (TPE) a una concentración de aproximadamente 50 mM (pH 7,5 – 7,8). Los tampones de electroforesis suelen prepararse en forma de soluciones

concentradas y se conservan a temperatura ambiente. El TBE se utilizaba inicialmente a una concentración de trabajo de 1x en el caso de la electroforesis en gel de agarosa. No obstante, una solución de trabajo de 0,5x proporciona un poder más que suficiente y en la actualidad prácticamente toda la electroforesis en gel de agarosa se practica utilizando esta concentración (Westermeier, 1997; Voet, 2006).

En función de la concentración de agarosa o tampón, se pueden separar segmentos de ADN que contengan de 20 a 50 000 pb. En los geles horizontales, la agarosa se emplea por lo general en concentraciones comprendidas entre un 0,7 % y un 3 % (Westermeier, 1997; Voet, 2006).

ADN marcador

Paralelo a las muestras de DNA amplificadas debe cargarse un DNA marcador de tamaño conocido en ambos extremos del gel enmarcando las muestras, lo cual facilita la labor de determinar el tamaño de los DNA amplificados (Westermeier, 1997; Voet, 2006).

Tampón de carga

Las muestras de DNA que cargan en el gel de agarosa se mezclan con un buffer de carga que por lo general contiene agua, sacarosa y un colorante. La cantidad mínima de DNA que puede detectarse mediante fotografía de los geles teñidos con bromuro de etidio es de aproximadamente 2 ng en una banda de 0,5 cm de ancho. El tampón de carga nos permite:

- aumentar la densidad de las muestras para que el ADN caigan uniformemente en el pocillo
- añadir color a la muestra, simplificando de este modo el proceso de carga
- incorporar un colorante a la muestra que, en un campo eléctrico, se desplace hacia el ánodo a una velocidad previsible (Westermeier, 1997; Voet, 2006).

Gel de agarosa

- a. Pesar agarosa de acuerdo al tamaño del gel a realizar.
- b. Agregar TBE .5x (el gel es al 1% de agarosa).
- c. Calentar para disolver la agarosa.
- d. Agregar bromuro de etidio.
- e. Dejar solidificar en el molde especial para gel de electroforesis horizontal.

Agarosa Invitrogen ® catalogo no. 15310019 lote 1106405

Bromuro de etidio 10mg/mL:

- a. 1 g de Bromuro de etidio.
- b. 100 mL de agua desionizada estéril.
- c. mezclar en agitador magnético durante horas hasta asegurar la disolución del colorante.

Buffer TBE 5x

- a. 54g Tris base.
- b. 27.5 g Ácido bórico (Merck ®).
- c. 20 mL EDTA pH 8.0.
- d. Mezclar todo, aforar a un litro con agua desionizada estéril.

TBE .5x

Diluir 1:10 el buffer TBE5x con agua desionizada estéril.

Apéndice 4

PCR

- a. **Oligos a concentración cada de 20pmol/μL Invitrogen®**

icd-F ATGGAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACA

icd-R GGACGCAGCAGGATCTGTT

FumC-F TCACAGGTCGCCAGCGCTTC

FumC-R GTACGCAGCGAAAAAGATTC

adk-F ATTCTGCTTGGCGCTCCGGG

adk-R CCGTCAACTTTCGCGTATTT

gyrB-F TCGGCGACACGGATGACGGC

gyrB-R ATCAGGCCTTCACGCGCATC

mdh-F ATGAAAGTCGCAGTCCTCGGCGCTGCTGGCGG

mdh-R TTAACGAACTCCTGCCCCAGAGCGATATCTTTCTT

purA-F CGCGCTGATGAAAGAGATGA

purA-R CATACGGTAAGCCACGCAGA

recA-F CGCATTGCTTTACCCTGACC

recA-R TCGTCGAAATCTACGGACCGGA

- b. Agua para PCR
- c. Buffer 10X para PCR Invitrogen®
- d. dNTP's 10mM Invitrogen®
- e. MgCl₂ 50mM Invitrogen®
- f. Taq DNA polymerase Invitrogen®