



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGIA EXPERIMENTAL

**RELACIÓN GENÉTICA, GRUPOS CLONALES Y CARACTERÍSTICAS
QUE COMPARTEN LAS CEPAS DE *E. COLI* UROPATÓGENA
AISLADAS DE INFECCIONES URINARIAS RECURRENTES**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

QFB. CHAVERO GUERRA PEDRO PABLO

TUTOR: DR. HIPÓLITO ÁNGEL MANJARREZ HERNÁNDEZ
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

COMITÉ TUTOR: DR. RAFAEL CAMACHO CARRANZA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS, UNAM.
DR. RODOLFO GARCÍA CONTRERAS
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

CD. MX., AGOSTO, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Asunto: Oficio de Jurado para Examen de Grado.

Lic. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Evolutiva y Sistemática del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 21 de mayo de 2018, aprobó la ratificación del jurado que le fue asignado en la reunión del Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina, en su sesión ordinaria del día 11 de septiembre de 2017, para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **CHAVERO GUERRA PEDRO PABLO** con número de cuenta **308050637**, con la tesis titulada "**RELACIÓN GENÉTICA, GRUPOS CLONALES Y CARACTERÍSTICAS QUE COMPARTEN LAS CEPAS DE *E. coli* UROPATÓGENA AISLADAS DE INFECCIONES URINARIAS RECURRENTE**", realizada bajo la dirección del **DR. HIPÓLITO ÁNGEL MANJARREZ HERNÁNDEZ**:

Presidente: DRA. FRANCISCA HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ
Vocal: DRA. BERTHA MARÍA JOSEFINA GONZÁLEZ PEDRAJO
Secretario: DR. RODOLFO GARCÍA CONTRERAS
Suplente: DRA. ANA MARÍA CEVALLOS GAOS
Suplente: DR. RAFAEL CAMACHO CARRANZA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd, Mx., a 19 de junio de 2018



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



Agradecimientos

Al Posgrado en Ciencias Biológicas y a la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada durante el periodo del 01 de febrero de 2016 al 31 de enero de 2018 para estudios de Maestría y al Comité Técnico del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) por el apoyo al Proyecto IN228916 (Responsable Dr. H. Ángel Manjarrez Hernández). A la Facultad de Medicina, Departamento de Salud Pública responsable del Laboratorio de Patogénesis Bacteriana.

A mi tutor de tesis Dr. H. Ángel Manjarrez Hernández y a mi comité tutor Dr. Rafael Camacho Carranza y al Dr. Rodolfo García Contreras por los comentarios, sugerencias y apoyo durante la realización del proyecto.

Dedicatoria

Este trabajo se lo dedico a mi esposa Karla, por brindarme su cariño y amor incondicional, por creer en mi capacidad y apoyarme en los momentos más complicados, por todos los sacrificios y esfuerzos que realizo para la realización de esta tesis.

A mis padres y hermana, por su apoyo, consejos, comprensión, amor y en todo lo que he emprendido. Porque me han enseñado todo lo que soy como persona, valores, principios y perseverancia para conseguir mis objetivos.

A todos los compañeros y amigos, que quizá sin saberlo forman parte de este trabajo ya que he aprendido de cada uno de ellos, porque me inspira a avanzar día tras día para ser mejor persona.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS	I
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	II
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
ANTECEDENTES	6
OBJETIVOS	16
HIPÓTESIS	16
METODOLOGÍA	17
RESULTADOS	26
DISCUSIÓN	36
CONCLUSIONES	43
LITERATURA CITADA	44

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Página

Tabla 1. Factores de virulencia que permiten a UPEC la colonización del tracto urinario.	9
Tabla 2. Concentraciones de reactivos para identificación del grupo clonal ST131	20
Tabla 3. Condiciones de PCR para identificación del grupo clonal ST131	20
Tabla 4. Concentraciones de reactivos para identificación del grupo clonal A	21
Tabla 5. Condiciones de PCR para identificación del grupo clonal A	22
Tabla 6. Concentraciones de reactivos para RAPD-PCR	23
Tabla 7. Condiciones para RAPD-PCR	24
Tabla 8. Comparación entre porcentaje de resistencia de cepas aisladas de infecciones recurrentes contra aisladas de infecciones agudas.	27
Tabla 9. Comparación de dos cepas aisladas de un mismo paciente en dos episodios o infecciones recurrentes.	33
Figura 1. Diagrama de Venn de los patotipos de <i>Escherichia coli</i> que causan enfermedades en humanos	3
Figura 2. Esquema de los seis patotipos de <i>E. coli</i> intestinal	5
Figura 3. Patogenia de las ITU.	8
Figura 4. Eventos que promueven el establecimiento y recurrencia de las infecciones del tracto urinario	15
Figura 5. Identificación del grupo clonal ST131.	28
Figura 6. Identificación del grupo clonal A.	29
Figura 7. Especificidad de la PCR para identificación de CGA.	29
Figura 8. Relación genética por análisis RAPD.	31
Figura 9. Patrones de bandas generados por RAPD	32
Figura 10. Dendograma generado a partir de las comparaciones entre cepas aisladas de un mismo paciente	35

INDICE DE ABREVIATURAS

BLEE – Beta-lactamasas de espectro extendido

CgA – Grupo clonal A

CLSI – Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio

dNTP – Desoxirribonucleótidos trifosfatados

E. coli – *Escherichia coli*

ERIC2-PCR - Consenso intergénico repetitivo enterobacteriano 2

ITU – Infecciones del tracto urinario

IrTU – Infecciones recurrentes del tracto urinario

MLST – Tipificación multilocus de secuencias

PCR – Reacción en cadena de la polimerasa

PFGE – Electroforesis de campos pulsados

RAPD – Amplificación aleatoria de ADN polimórfico

ST131 – Secuencia tipo 131

ST69 – Secuencia tipo 69

Taq pol – *Thermus aquaticus* ADN polimerasa

UPEC – *Escherichia coli* uropatógena

RESUMEN

Escherichia coli uropatógena (UPEC) es el agente etiológico causante de entre el 80-90% de las infecciones del tracto urinario. Una característica de estas cepas es que frecuentemente causan infecciones recurrentes del tracto urinario (IrTU). En México no existen estudios sobre las cepas de *E. coli* uropatógena causantes de IrTU, se desconoce si las cepas causantes de recurrencias cuentan con características distintas respecto a las cepas de infecciones no-recurrentes. El objetivo es conocer la relación genética entre los diferentes aislados de *E. coli* provenientes de pacientes con infecciones recurrentes del tracto urinario, y determinar si los aislados pertenecen a los grupos clonales de *E. coli* ST131 y ST69; además conocer el perfil de susceptibilidad a los antimicrobianos.

Se obtuvieron 88 cepas de UPEC aisladas de pacientes con IrTU. Las cepas se genotipificaron mediante RAPD-PCR para conocer la relación genética entre ellas y su huella genética y su relación genética entre los diferentes aislados. La identificación de los grupos clonales ST131 y ST69 se realizó utilizando alelos-específicos en el ensayo de PCR, finalmente se obtuvo el perfil de susceptibilidad a los antimicrobianos mediante el método de difusión en agar (método de Kirby-Bauer). Los resultados de aislados de IrTU revelaron un aumento (del 10% al 30%) en la resistencia a los antimicrobianos en contraste con cepas no-recurrentes; el 62.5% de los aislados fueron multiresistentes, duplicando el valor observado en cepas no-recurrentes. Se encontró que el 31.8% de las cepas pertenecieron al linaje ST131, lo cual representa un aumento de casi 3 veces en comparación con aislados de infecciones urinarias no-recurrentes. Respecto a la genotipificación se encontró diversidad genética entre las cepas estudiadas, sin embargo, se identificaron 3 *clusters*, en uno de ellos se agruparon la mayoría de las cepas pertenecientes al ST131. Se encontró que el 50% de las recurrencias se debieron a la persistencia de la misma cepa en el tracto urinario. En conclusión, nuestros resultados indican que los aislados de IrTU frecuentemente tienen la característica de ser multiresistentes a los antimicrobianos en contraste con los aislados no-recurrentes. Los miembros del clon ST131 se asociaron significativamente con las infecciones recurrentes y con resistencia a los antimicrobianos. En este estudio el 50% de las recurrencias se debieron a la misma cepa de *E. coli* que causó la infección primaria, lo cual significa que las bacterias persistieron en el tracto urinario a pesar de los tratamientos antimicrobianos.

ABSTRACT

Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) is the cause of 80-90% of the urinary tract infections. A characteristic feature of these strains is that they frequently cause recurrent urinary tract infection (RUTI). In Mexico, there are no studies about strains of uropathogenic *E. coli* causing RUTI, it is unknown whether the strains that cause recurrences have different characteristics to those of the causative strains of non-recurrent infections. The aim of the study is to know the genetic relationship between different *E. coli* isolates obtained from patients with recurrent urinary tract infections and to know if they belong to the clonal groups of ST131 and ST69; also to know the antibiotic susceptibility profiles.

Eighty-eight UPEC isolates were obtained from IRTU patients; Strains were genotyped by RAPD-PCR to know the genetic relationship between the isolates and their genetic fingerprint. Identification of clonal groups ST131 and ST69 was performed using an allele-specific PCR-based assay, finally the profile of antibiotic susceptibility was obtained. The results of RUTI isolates revealed an increase (from 10% to 30%) in antimicrobial resistance in contrast to non-recurrent strains; 62.5% of the isolates were multiresistant, doubling the value observed in non-recurrent strains. It was found that 31.8% of the strains belonged to the ST131 lineage, which represents an increase of almost 3 times compared with isolates of non-recurrent urinary tract infections. Regarding genotyping, genetic diversity was found among the strains studied, however, 3 clusters were identified and in one of them the majority of strains belonging to ST131 were grouped. It was found that 50% of the recurrences were due to the persistence of the same strain in the urinary tract. In conclusion, our results indicate that IRTU isolates frequently have the characteristic of being multiresistant to antibiotics in contrast to non-recurrent isolates. Members of the clone ST131 were significantly associated with recurrent infections and antibiotic resistance. In this study, 50% of the recurrences were due to the same strain of *E. coli* that caused the primary infection.

INTRODUCCIÓN

Escherichia coli (*E. coli*) es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, de la familia Enterobacteriaceae. Esta bacteria coloniza el intestino de los humanos pocas horas después del nacimiento. Las cepas de *E. coli* y los huéspedes pueden coexistir con mutuos beneficios por décadas. Sin embargo hay cepas patógenas que pueden causar daño y diferentes cuadros clínicos (Kaper, *et al.* 2004). Los atributos de virulencia están frecuentemente codificados en elementos genéticos que pueden transferirse entre diferentes bacterias, creando nuevas combinaciones de genes de virulencia dentro de una comunidad (Rodríguez-Ángeles, 2002).

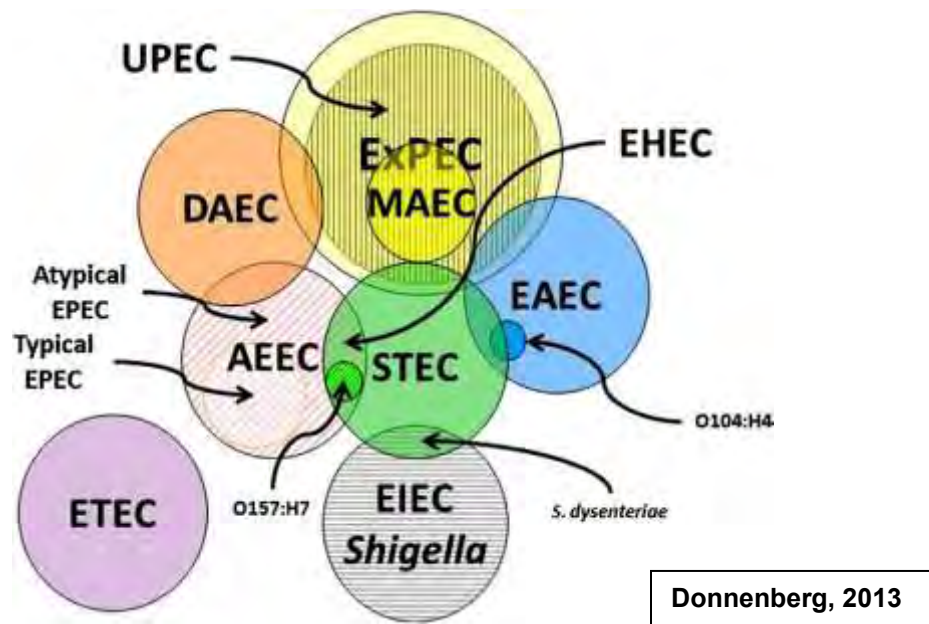
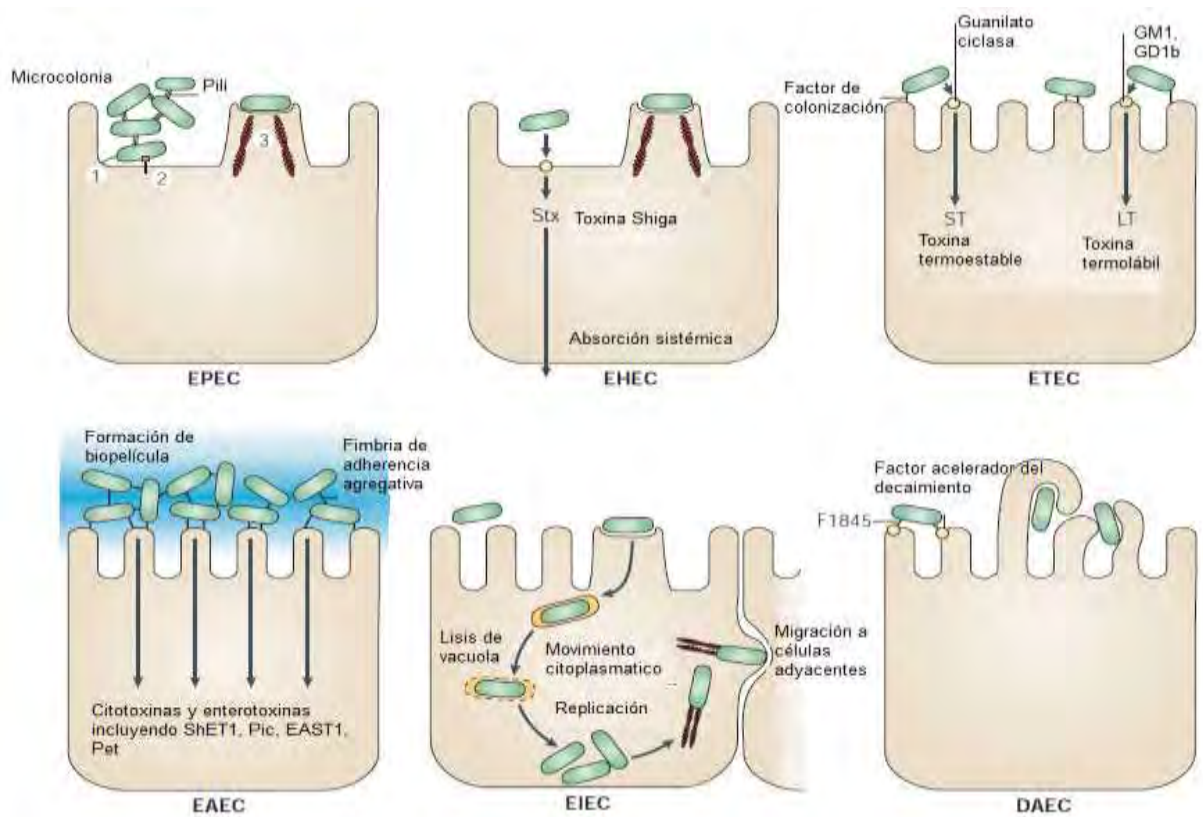


Figura 1. Diagrama de Venn de los diversos patotipos de *E. coli* que causan enfermedades en humanos. Los patotipos son representados por sus siglas en inglés. Los patotipos intestinales corresponden a ETEC (morado) – *Escherichia coli* enterotoxigénica; DAEC (naranja) – *Escherichia coli* Adherente Difusa; EIEC (líneas horizontales) – *Escherichia coli* enteroinvasiva; EAEC (azul) – *Escherichia coli* enteroagregativa; STEC (verde) – *Escherichia coli* productora de Toxina Shiga; EHEC – *Escherichia coli* enterohemorrágica; AEEC (líneas diagonales) – *Escherichia coli* de Adherencia y Esfacelamiento, que a su vez contiene a EPEC – *Escherichia coli* enteropatógena. ExPEC (amarillo claro) – *Escherichia coli* patógena extraintestinal. MAEC (amarillo) – *Escherichia coli* asociada a meningitis; UPEC (líneas verticales) – *Escherichia coli* uropatógena (Tomado de Donnenberg, 2013).

La presencia de *E. coli* en el organismo se compone de cepas comensales no patógenas, las cuales forman parte habitual de la microbiota intestinal de animales y humanos; sin embargo, también se encuentran cepas causantes de infecciones intestinales, a las que se les conoce como *E. coli* patógenas intestinales, mientras que existen otras que también causan infecciones fuera del tracto gastrointestinal, mejor conocidas como *E. coli* patógenas extraintestinales o ExPEC por sus siglas en inglés (Pitout, 2012). El potencial patógeno de las diversas cepas de *E. coli* depende del repertorio específico de factores de virulencia que porten. Las combinaciones particulares de factores de virulencia define a cada patotipo de *E. coli* y a su vez, cada patotipo causa manifestaciones clínicas específicas (Donnenberg, 2013). Los diversos patotipos se muestran en la figura 1 y 2.

E. coli uropatógena es la bacteria causante de entre el 80-90% de las infecciones del tracto urinario. Estas cepas pueden causar infecciones del tracto urinario recurrentes y se favorecen de características específicas que posiblemente contribuyen al establecimiento de dichas infecciones (Erjnaes, 2011; Hisano, *et al.* 2015; Schwartz, *et al.* 2015; Soto, *et al.* 2006).



Kaper, et al. 2013

Figura 2. Esquema de los seis patotipos de *E. coli* intestinal. Se muestra la forma en que las cepas se adhieren a la célula, y en el caso particular de EIEC la forma en la que se internaliza a la célula. Imagen tomada de Kaper, et al. 2004.

Este trabajo es uno de los primeros en estudiar las características de cepas de *E. coli* causantes de IrTU en pacientes de la Ciudad de México, con el fin de determinar características bacterianas que faciliten la identificación de cepas con potencial de establecer infecciones recurrentes. Esta investigación contribuye a la selección de tratamientos más efectivos para este tipo de infecciones.

ANTECEDENTES

Epidemiología de las infecciones del tracto urinario

Las infecciones del tracto urinario (ITU) son de las infecciones más comunes en humanos junto con las infecciones gastrointestinales y las infecciones del tracto respiratorio, afectando aproximadamente a 150 millones de personas al año en todo el mundo (Cusumano, *et al.* 2010; Flores-Mireles, *et al.* 2015; Oelschlaeger, *et al.* 2002; Pitout 2012; Schappert y Rechtsteiner, 2008).

Las ITU corresponden a la primera causa de morbilidad en niños, mujeres y hombres en edad avanzada. En México, las ITU representan la primer causa de consulta médica en mujeres en edad reproductiva, es la causa más frecuente de complicaciones perinatales serias y la tercer causa de sepsis neonatal (Calderón, *et al.* 2010; Flores-Mireles, *et al.* 2015).

La incidencia de las ITU es significativamente superior en mujeres debido a las diferencias anatómicas entre géneros, entre las que destacan la corta distancia del ano a la uretra femenina y de la uretra a la vejiga, lo cual favorece el ingreso de las bacterias al tracto urinario. Se estima que aproximadamente 1 de cada 2 mujeres presentan al menos un evento antes de los 20 años y cerca del 80% de ellas presentan por lo menos una ITU en algún momento de su vida (Barber, *et al.* 2013; Cusumano, *et al.* 2010; Foxman y Brown, 2003; Pitout, 2012).

E. coli uropatógena (UPEC) es causante de entre 80 y 90% del total de las ITU, del 10-20% restantes las infecciones son provocadas por bacterias Gram positivas y otras bacterias Gram negativas (Barber, *et al.* 2013; Calderón, *et al.* 2013; Flores-Mireles, *et al.* 2015; Foxman y Brown, 2003).

Escherichia coli

E. coli es una de las bacterias más estudiadas y es un importante miembro del tracto gastrointestinal de mamíferos. En condiciones habituales, *E. coli* establece relaciones simbióticas benéficas con su portador, ayudando a regular la microbiota, favoreciendo la homeostasis intestinal (Bien, *et al.* 2012). Actualmente, se reconocen cuatro grupos filogenéticos entre las cepas de *E. coli*, los cuales han sido nombrados: A, B1, B2 y D. Las cepas de los cuatro grupos tienen características fenotípicas diferentes entre sí. Las cepas de los cuatro grupos filogenéticos usualmente tienen nichos distintos entre ellas, así como el potencial de causar enfermedades. Históricamente, se han relacionado las cepas de los grupos A y B1, como cepas comensales del tracto gastrointestinal de mamíferos. En cambio, los grupos B2 y D, están relacionados a cepas causantes de enfermedades intestinales y extraintestinales (Gordon, *et al.* 2008).

Las cepas causantes de infecciones intestinales, se conocen como *E. coli* patógenas intestinales y las cepas de *E. coli* causantes infecciones fuera del tracto gastrointestinal, se conocen como *E. coli* patógenas extraintestinales o ExPEC por sus siglas en inglés. No se han encontrado factores de virulencia que compartan entre cepas ExPEC (Pitout, 2012; Rasko, *et al.* 2008, Riley, 2014, Sokurenko y Johnson 2011).

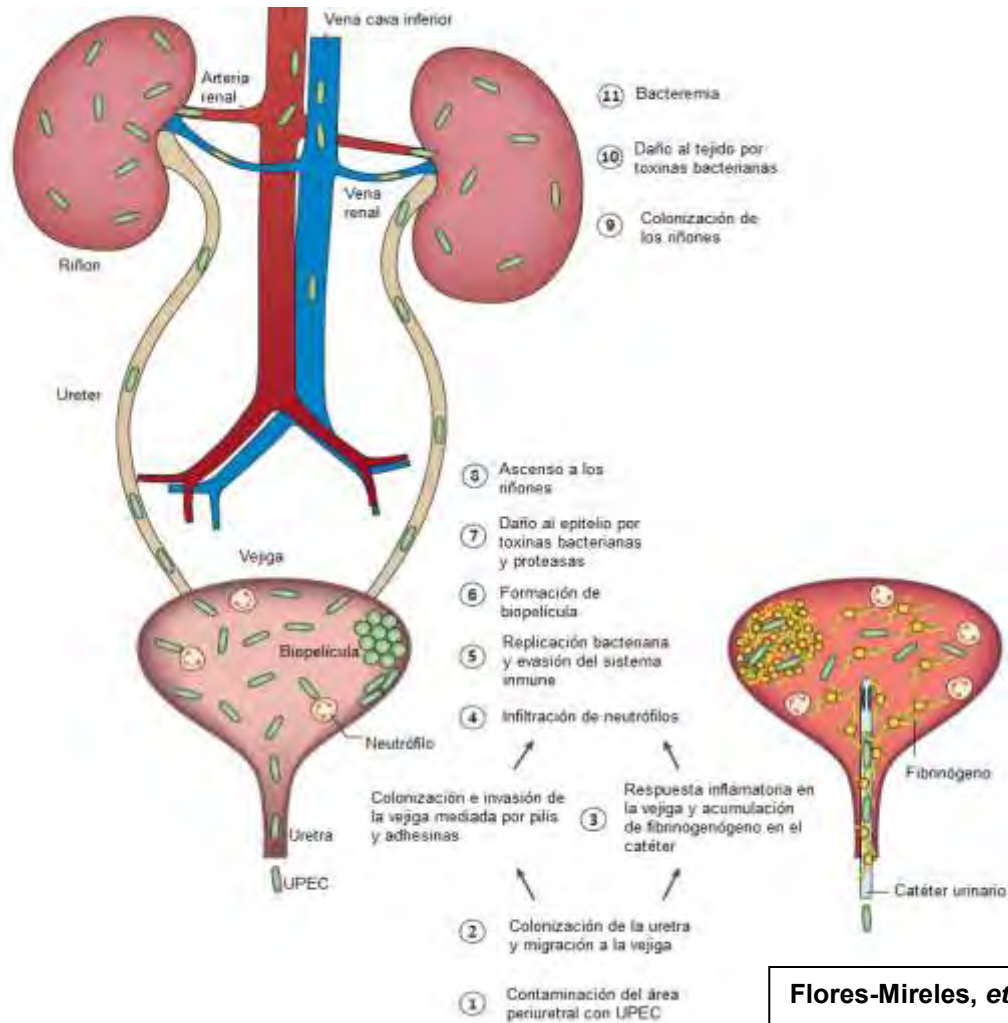


Figura 3. Patogenia de las ITU. Comienza cuando los microorganismos contaminan el área periuretral facilitando la colonización de la uretra. Subsecuentemente, las bacterias migran hacia la vejiga mediante la expresión de pilis y adhesinas que también facilitan la colonización e invasión de las células “sombrilla” superficiales. En este punto, el sistema inmunitario del hospedero actúa y responde con inflamación e infiltración de neutrófilos para eliminar a las bacterias, sin embargo, algunas logran evadir la respuesta inmunitaria mediante la invasión de las células del epitelio de la vejiga y mediante cambios morfológicos para resistir el ataque de los neutrófilos permitiendo su multiplicación. Otro mecanismo de evasión es la formación de biopelícula. Algunas bacterias pueden producir toxinas y proteasas que inducen daño en las células del tejido, provocando la liberación al medio de nutrientes esenciales para la supervivencia de las bacterias y propiciando el ascenso hacia los riñones. Ya en los riñones, colonizan el tejido produciendo de nuevo daño por medio de la secreción de toxinas. Si aún la infección no ha sido tratada, las bacterias pueden provocar bacteremia si logran cruzar la barrera epitelial tubular para ingresar al sistema circulatorio. (Tomado y editado de Flores-Mireles, *et al.* 2015)

De las cepas causantes de enfermedades extraintestinales, encontramos a un grupo de cepas que tienen la capacidad de colonizar principalmente la sangre, el sistema nervioso central y el tracto urinario. Las cepas que colonizan la sangre y el sistema nervioso central se denominan *E. coli* asociadas a meningitis y las que colonizan el tracto urinario, *E. coli* uropatógena (MNEC y UPEC, por sus siglas en inglés, respectivamente) (Bien, *et al.* 2011; Kaper, *et al.* 2004; Wiles, 2008).

***E. coli* uropatógena (UPEC)**

Las cepas de *E. coli* aisladas de las ITU no comparten los mismos factores de virulencia entre ellas; por lo tanto, no se puede definir a estas cepas como un patotipo (Marrs, *et al.* 2005). En la tabla 1 se muestran los factores de virulencia que más frecuentemente portan las cepas UPEC que causan ITU.

Tabla 1. Factores de virulencia de UPEC que facilitan la colonización del tracto urinario

Función	Factores de virulencia
Adherencia	Pili F1C Pili P Pili S Pili tipo 1 Adhesinas Dr
Toxinas	HlyA CNF1
Evasión del sistema inmune	HlyA Antígenos capsulares CNF1 Yersiniabactina
Captación de hierro	Aerobactina Enterobactina Salmoquelina Yersiniabactina
Otros	Antígeno 43 Flagelo

HlyA - Hemolisina; CNF1 - Factor necrotizante citotóxico tipo 1. Tomada y modificada de Flores-Mireles, *et al.* 2015.

Grupos clonales de *E. coli* uropatógena

Las infecciones del tracto urinario no son usualmente relacionadas con brotes epidémicos; sin embargo, algunas cepas de UPEC han mostrado la capacidad de diseminarse en la población. Se han reportado algunos grupos clonales en aislados de ITU, entre estos los más conocidos son: grupo clonal A (CGA o ST69), ST131 y *E. coli* O15:K52:H1, sin embargo, los grupos CGA y ST131 han sido más ampliamente reportados (Johnson, et al. 2009).

La identificación de los grupos clonales se ha llevado a cabo por medio de la tipificación de secuencia de multilocus (MLST) y se basa en la comparación de la variación genética de enzimas esenciales para el metabolismo de la bacteria. El análisis se lleva a cabo por la amplificación de las regiones centrales de siete genes housekeeping de la bacteria y que son secuenciados para determinar las mutaciones en los siete loci; se asigna un número de alelo de acuerdo a la secuencia específica de nucleótidos de la región amplificada del gen. La secuencia tipo se asigna mediante el perfil de los alelos específico de los siete loci para cada cepa (Wang, *et al.* 2015). Actualmente se han reportado 8301 secuencias tipo.

El grupo clonal A fue caracterizado en 2001, en un estudio realizado en tres centros universitarios de Estados Unidos, se encontró que el 22% de las cepas aisladas mostró resistencia a trimetoprim-sulfametoxazol, y de estos aislados se evaluaron cinco características: perfil de ERIC2-PCR [Amplificación de secuencias intergénicas de consenso repetitivas de enterobacterias, es una técnica de tipificación utilizada para estudiar la relación clonal en diversas bacterias Gram negativas. Esta técnica está

basada en la existencia de un elemento de ADN intergénico repetido a lo largo del genoma de las bacterias. Una secuencia consenso de estos elementos repetitivos fue usada para diseñar iniciadores que han sido utilizados en muchas especies bacterianas. Estos iniciadores se usan para amplificar por PCR, fragmentos del genoma entre cada elemento repetitivo, generando un patrón diferente para cada cepa (Talavera, *et al.* 2011)], perfil de PFGE [La electroforesis de campos pulsados es un método de huella genómica que discrimina entre cepas bacterianas por los patrones de bandeo generados a partir de la digestión con enzimas de restricción del ADN cromosómico para formar fragmentos de distinto tamaño del material genético. La comparación de los patrones de bandeo generados favorece la identificación de cepas bacterianas genéticamente relacionadas (Wang, *et al.* 2015).], serotipo, perfiles de factores de virulencia y perfil de resistencia a antibióticos. Aproximadamente el 50% mostró patrones similares, sugiriendo una relación clonal entre ellas (Manges, *et al.* 2001).

El grupo clonal A ha sido identificado como causante del 33 al 57% de los casos de cistitis agudas no complicadas con resistencia a trimetoprim-sulfametoxazol en Estados Unidos. Mediante la identificación por MLST, el grupo clonal A pertenece al ST69; también se conoce que cuenta con polimorfismos de un solo nucleótido en el gen *fimH* y está asociada al grupo filogenético D comúnmente relacionado con cepas patógenas (Platell, *et al.* 2010; Skjot-Rasmussen, *et al.* 2012).

Se han identificado cepas de CGA en regiones de Estados Unidos, Canadá, Brasil y Europa. Se ha observado que están distribuidas en la población en general, y pueden transmitirse de persona a persona o a través de fuentes en común como alimentos o agua contaminada. La importancia de identificar este grupo clonal radica en que el tratamiento de primera elección para las ITU suele ser con SXT (Platell, *et al.* 2010; Skjot-Rasmussen, *et al.* 2012).

En el año 2008 se identificó un grupo de *E. coli* serotipo O25:H4 causante de infecciones urinarias en tres continentes. La caracterización del grupo mostró que la mayoría de las cepas pertenecen al grupo filogenético B2; sin embargo, los diversos perfiles de PFGE y de genes de virulencia indican la presencia de diversas subclonas localizadas en todo el mundo (Banerjee y Johnson, 2014; Nicolas-Chanoine, *et al.* 2008).

El grupo de *E. coli* serotipo O25:H4 fue evaluado mediante la secuenciación de 7 genes *housekeeping* para la tipificación multilocus de secuencias o MLST por sus siglas en inglés, y se le otorgó la secuencia tipo 131 (ST131). También se asocia a la portación de enzimas BLEE y a una gran cantidad de genes de virulencia. De acuerdo a diversos estudios, el 70 al 80% de las cepas identificadas con esta secuencia tipo presentan resistencia a fluoroquinolonas y cerca del 66% son productoras de BLEE (Banerjee y Johnson, 2014; Nicolas-Chanoine, *et al.* 2008).

Las infecciones asociadas al ST131 han sido relacionadas con pacientes que han hecho viajes internacionales; también se han encontrado en diversas fuentes no humanas como animales de compañía y alimentos. Sin embargo, la colonización y la prevalencia de este grupo es más exitosa en humanos que en otros organismos, lo que favorece su diseminación en la población (Barenjee y Johnson, 2014).

UPEC en ITU recurrentes.

A pesar de la frecuencia de las ITU causadas por *E. coli*, se sabe poco sobre las características bacterianas asociadas con las IrTU. Se creía que las IrTU eran causadas principalmente era causa de reinfección con una nueva cepa de *E. coli*. Sin embargo, recientemente se demostró que las infecciones recurrentes son causadas por recaídas con la misma cepa que causo la primer infección, y a esto se le llama infección persistente. Los términos utilizados son los siguientes: recurrencia se utiliza para las ITU que ocurren repetidamente; la reinfección se utiliza para las IrTU causada por una nueva cepa, es decir, una cepa diferente de la primera cepa; y la persistencia se usa para la IrTU casuada por la misma cepa que causó el primer proceso infeccioso (Skjot-Rasmussen, *et al.* 2011).

Las ITU pueden complicarse si se convierten en recurrentes; los tratamientos clínicos con antimicrobianos frecuentemente fallan y no erradican las bacterias del tracto urinario. Las ITU recurrentes (IrTU) se identifican cuando un mismo paciente tiene dos episodios de ITU en 6 meses o 3 episodios en un año, comprobadas mediante urocultivos (Barber, *et al.* 2013). El 77% de las IrTU son causadas por una misma cepa de *E. coli* responsable de la primer infección (Erjnaes, *et al.* 2011).

Se ha encontrado que UPEC puede invadir las células epiteliales de la vejiga y formar biopelícula en ensayos en vejiga de ratón. Las bacterias también pueden permanecer en estado de latencia, lo cual implica que las células bacterianas no se dividen por periodos largos de tiempo, favoreciendo la sobrevivencia de las bacterias en presencia de antibióticos, así como la evasión de los mecanismos inmunitarios (Barber, *et al.* 2013; Erjnaes, *et al.* 2011; Sokurenko y Johnson, 2011).

De acuerdo con Rosen y colaboradores, existe evidencia de que en episodios de cistitis en humanos hay formación de comunidades bacterianas intracelulares, lo cual sugiere que en la vejiga humana las cepas de UPEC podrían estar siguiendo una estrategia similar a la descrita en vejigas de ratones (Rosen, *et al.* 2007). En México, no existen reportes sobre este tipo de infecciones recurrentes, no obstante que es un problema que ha aumentado y afecta en la población en general (Molina, *et al.* 2011).

El problema de las IrTU en el mundo es frecuente y se han encontrado un alto porcentaje de cepas multirresistentes a los antibióticos utilizados para el tratamiento de estas infecciones; desde hace algunos años se ha investigado un gran número de factores de virulencia asociados a la patogenicidad de UPEC, donde la invasividad ha sido reportada como un factor clave que explique la persistencia de estas bacterias en el tracto urinario. Además no se conoce si las cepas pertenecientes a grupos clonales de *E. coli* tienen características que favorezcan el establecimiento de IrTU en la población de nuestro país. En este trabajo se busca caracterizar a los aislados de *E. coli* de pacientes ambulatorios con IrTU de un hospital en la Ciudad de México para ampliar el conocimiento sobre estas cepas y sentar las bases para futuras investigaciones.

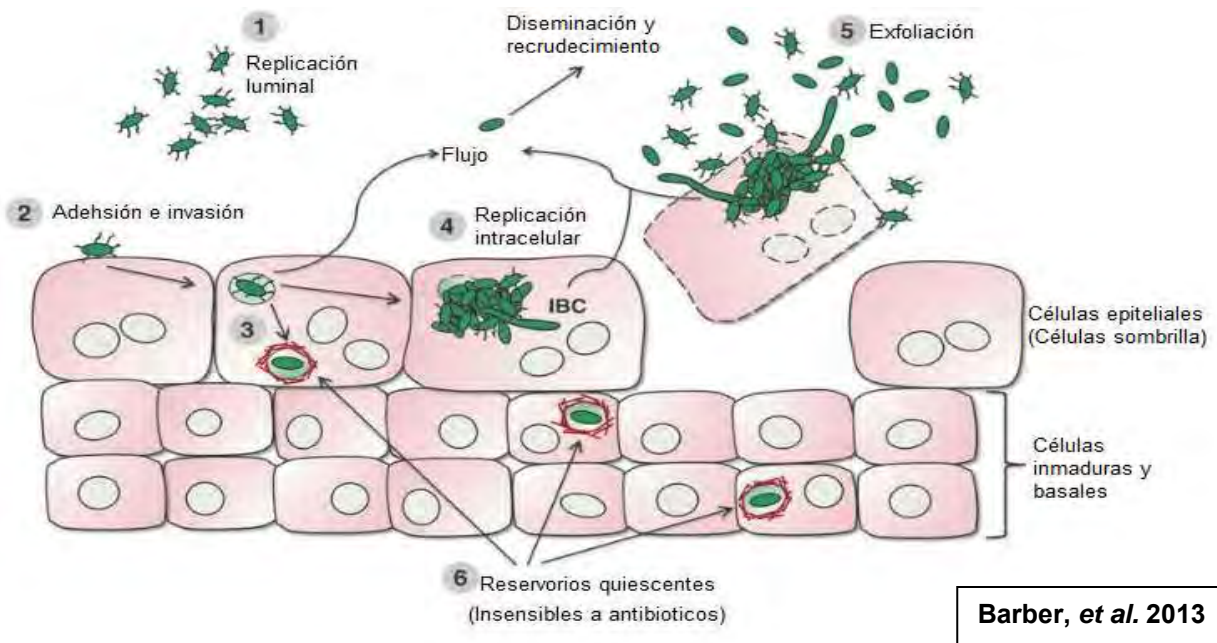


Figura 4. Eventos que promueven el establecimiento y recurrencia de las infecciones del tracto urinario (ITU). 1) Durante la ITU, *E. coli* uropatógena (UPEC) puede replicarse en el lumen de la vejiga o 2) adherirse a las células epiteliales. 3) Continuando con la invasión, UPEC ingresa a las células formando compartimentos parecidos a endosomas cubiertos por filamentos de actina. 4) La alteración de estos compartimentos, permite a UPEC entrar al citosol de la célula, permitiendo una rápida replicación intracelular y la formación de comunidades bacterianas intracelulares (IBC). Durante estos eventos, la morfología de las bacterias puede variar, como formar células parecidas a filamentos largos que evaden la respuesta inmunitaria de los neutrófilos. 5) La infección puede desencadenar la exfoliación de las células dado que este proceso puede ayudar a la eliminación de las bacterias adheridas e internalizadas. El flujo que siguen las bacterias después de la exfoliación puede promover la diseminación de los patógenos provocando el recrudescimiento de la ITU. 6) UPEC permanece en reservorios quiescentes de larga duración dentro de las células, gracias a los compartimentos parecidos a endosomas rodeados de actina que formaron al internalizarse. Esto hace que sea extremadamente difícil erradicar las bacterias dada su insensibilidad a los tratamientos con antibióticos. El resurgimiento de UPEC desde estos reservorios puede iniciar ITU recurrentes. Tomado y editado de Barber, et al. 2013.

OBJETIVOS

Objetivo general

- Investigar la susceptibilidad a los antimicrobianos en los diferentes aislados de *E. coli* provenientes de pacientes con infecciones recurrentes del tracto urinario. Identificar los grupos clonales de *E. coli* ST131 y CgA (ST69) y conocer si las cepas aisladas están relacionadas genéticamente entre sí.

Objetivos particulares

- Evaluar la susceptibilidad a los antimicrobianos en los aislados clínicos de UPEC y obtener sus perfiles de resistencia.
- Determinar la presencia de los grupos clonales de *E. coli* ST131 y CgA (ST69) entre los aislados de infecciones recurrentes.
- Investigar la relación genética entre los diversos aislados de *E. coli* mediante RAPD y la construcción de dendogramas.

HIPÓTESIS

La mayoría de los aislados de *E. coli* obtenidos de infecciones recurrentes se relacionan genéticamente entre ellas mismas, y algunas de estas cepas pertenecen a los grupos clonales ST131 y CgA (ST69). Dichas cepas además muestran patrones de resistencia a los antimicrobianos distintos a los aislados de infecciones no-recurrentes.

METODOLOGÍA

Cepas bacterianas

Se estudiaron 88 cepas de *E. coli* aisladas de muestras de orina de pacientes ambulatorios con infecciones recurrentes del tracto urinario del Hospital General “Dr. Manuel Gea González”. Los aislados fueron recolectados por el laboratorio de análisis clínicos y la identificación de las cepas de *E. coli* se realizó por medio del sistema automatizado MicroScan WalkAway (Beckman Coulter). Se consideraron los aislados de los pacientes que tuvieran un registro previo en la base de datos del laboratorio clínico de ITU causada por *E. coli*, de acuerdo a la definición de las infecciones recurrentes como se ha reportado: 2 o más en 6 meses o más de 3 infecciones en un año. La valoración clínica se realizó por los médicos de dicho hospital. Los pacientes no presentaron alteraciones morfológicas en el tracto urinario; en el caso de las mujeres no presentaban embarazo y no padecían alguna enfermedad degenerativa grave.

Para confirmar la identidad de las cepas se sembraron en placas de agar UTI (Chromogenic UTI Medium catálogo: CM0949A, OXOID, Inglaterra), que es un medio cromogénico selectivo y diferencial para identificar presuntivamente cepas de *E. coli* cuando las colonias bacterianas se tornan de color rosa debido a la hidrólisis de un cromógeno por parte de la enzima β -galactosidasa. Se incubaron de 16 a 18 horas a 37°C y para la conservación de los aislados se mantienen en medio Luria-Bertani con glicerol en congelación a -20°C.

Prueba de susceptibilidad a antimicrobianos

La evaluación de la susceptibilidad a los antibióticos se realizó mediante el método de Kirby-Bauer (Bauer, *et al.* 1966), de acuerdo a los lineamientos de la Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) documento M100-S25 de 2015.

Los aislados se sembraron una noche previa al ensayo para tener bacterias viables. Se tomó muestra de una colonia y se diluyó en solución salina isotónica estéril alcanzando un valor de 0.5 en la escala de MacFarland.

Se inocularon placas de agar Mueller-Hinton de 4 mm de espesor y se colocaron los discos con los antibióticos a probar. Los antibióticos utilizados fueron: Penicilinas - Ampicilina 10 µg (AMP10); Amoxicilina-Ácido clavulánico 2:1 30 µg (AMC30); Cefalosporinas - Cefazolina 30 µg (KZ30); Ceftriaxona 30 µg (CRO30); Cefepima 30 µg (FEP30); Fluoroquinolonas - Ciprofloxacina 5 µg (CIP5); Nitrofuranos - Nitrofurantoina 300 µg (F300); Sulfas - Trimetoprim-Sulfametoxazol 25 µg (SXT25); todos los sensidiscos marca OXOID.

Las placas se incubaron de 16 a 18 horas a 37°C. Se midieron los halos de inhibición con un vernier para cada uno de los antibióticos probados. El resultado de la sensibilidad a los antibióticos fue interpretado según los parámetros recomendados por la CLSI.

Identificación de grupos clonales mediante PCR

La identificación de grupos clonales mediante PCR se realizó con el ADN bacteriano de las 88 cepas utilizadas. El ADN se obtuvo mediante el kit de Qiagen DNeasy tissue kit (Qiagen, Cat. 69506) siguiendo las indicaciones del fabricante. El ADN se utilizó inmediatamente, o en algunos casos, se conservó en congelación a -20°C hasta su uso.

Identificación del grupo clonal ST131

La identificación se llevó a cabo mediante PCR. Se utilizaron los iniciadores diseñados por Clermont y colaboradores. Estos iniciadores son utilizados en los esquemas de MLST Achtman para el gen *pabB* específico de la clona O25b (enzima aminodesoxicorismato sintasa, involucrada en la síntesis de ácido fólico): O25pabBspe.F (5'-TCCAGCAGGTGCTGGATCGT-3') y O25pabBspe.R (5'-GCGAAATTTTTCGCCGTACTGT-3'), que amplifican un fragmento de 347 pares de bases. Como control positivo de la reacción de PCR se utilizaron los iniciadores para el gen *trpA* (enzima triptófano sintasa, involucrada en la biosíntesis de triptófano): trpA.F (5'-GCTACGAATCTCTGTTTGCC-3') y trpA2.R (5'-GCAACGCGGCCTGGCGGAAG-3'), que amplifican un fragmento de 427 pares de bases. (Clermont, *et al.* 2009).

Tabla 2. Concentraciones de reactivos para identificación del grupo clonal ST131. (Clermont, *et al.* 2009).

Mezcla de reacción (1X) para PCR (O25-ST131)	
Reactivo	Concentración
dNTPs	0.02 mM
MgCl ₂	1.5 mM
Solución amortiguadora 10X	2X
Iniciador: pabB 1 (100 pmol/μL)	1 pmol/μL
Iniciador: pabB 2 (100 pmol/μL)	1 pmol/μL
Iniciador: trpA 1 (100 pmol/μL)	0.6 pmol/μL
Iniciador: trpA 2 (100 pmol/μL)	0.6 pmol/μL
Taq pol	1U
DNA	100 ng
Volumen final	20 μL

Tabla 3. Condiciones de PCR para identificación del grupo clonal ST131 (Clermont, *et al.* 2009).

Programa para PCR (O25-ST131)		
Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (s)
1	94	240
35	94	5
	65	10
	72	30
1	72	420

Se utilizó el set de Taq polimerasa Vivantis (Vivantis, No. PL1202) y dNTP's de Thermo-Scientific (Thermo-Scientific, No. R0192). La reacción se llevó a cabo en el termociclador T100 ThermalCycler (BioRad).

Al término de la reacción se realizó la electroforesis correspondiente. Se preparó un gel de agarosa (Agarose, Low EEO. Research Organics. Cat. 1170A) al 1.7% (m/v) y se corrió en una cámara para electroforesis Sub-Cell GT Mini (Bio Rad) a 70 V con una fuente de poder PowerPac Basic (BioRad), durante 90 minutos. El gel de agarosa se tiñó con bromuro de etidio (Bio Rad) 10% (v/v) durante 30 minutos, se enjuagó dos veces y se colocó en un transiluminador con luz ultravioleta (High Performance Ultraviolet

Transilluminator, UVP). Una cepa se considera perteneciente al grupo O25ST131 cuando en la imagen del gel se observan las bandas correspondientes al control positivo de la *trpA* (427 pb) y la amplificación del alelo específico *pabB* (347 pb).

Identificación del grupo clonal CgA

La identificación se llevó a cabo también mediante PCR. Los iniciadores se diseñaron a partir de un consenso de los cebadores utilizados para amplificar un alelo específico del gen *fumC* de las cepas identificadas como CGA. Los iniciadores son CGAr (5'-CGTGCATCGCCGTTGGAAAG-3') y CGAf (5'-GCTATCTGGCAGACT-3') (Johnson, *et al*, 2004).

Tabla 4. Concentraciones de reactivos para identificación del grupo clonal A (Johnson, *et al*. 2004).

Mezcla de reacción (1X) para PCR (CgA)	
Reactivo	Concentración
dNTPs	0.4 mM
MgCl ₂	3 mM
Solución amortiguadora 10X	1X
Iniciador: CgA 1 (10 pmol/μL)	0.6 pmol/μL
Iniciador: CgA 2 (10 pmol/μL)	0.6 pmol/μL
Taq pol	1.25 U
DNA	100 ng
Volumen final	25 μL

Tabla 5. Condiciones de PCR para identificación del grupo clonal A (Johnson, *et al.* 2004).

Condiciones del termociclador para PCR (CgA)		
Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1	95	10
25	94	0.5
	61	0.5
	68	3
1	72	10

Se utilizó el set de Taq polimerasa de Vivantis (Vivantis, No. PL1202) y dNTP's de Thermo-Scientific (Thermo-Scientific, No. R0192). La reacción se llevó a cabo en el termociclador T100 ThermalCycler (BioRad).

Al término de la reacción se realizó la electroforesis correspondiente. Se preparó un gel de agarosa (Agarose, Low EEO. Research Organics. Cat. 1170A) al 1.7% (m/v) y se corrió en una cámara para electroforesis Sub-Cell GT Mini (Bio Rad) a 70 V con una fuente de poder PowerPac Basic (BioRad), durante 90 minutos. El gel de agarosa se tiñó con bromuro de etidio (Bio Rad) 10% (v/v) durante 30 minutos, se enjuagó dos veces y se colocó en un transiluminador con luz ultravioleta (High Performance Ultraviolet Transilluminator, UVP). Una cepa se considera perteneciente al CgA cuando la imagen del gel muestra una banda correspondiente al fragmento amplificado de 175 pb. Adicionalmente se realizó un experimento para comprobar la especificidad de la prueba al repetir las condiciones de PCR con los controles y dos repeticiones de mezclas de ADN del control negativo (90%) y ADN del control positivo (10%).

Amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD)

El RAPD se basa en la detección de polimorfismos aleatorios a lo largo del genoma bacteriano sin la necesidad de tener una secuencia de nucleótidos específica. Esto permite que la información obtenida de esta amplificación sirva como marcadores genéticos (Williams, *et al.* 1990). El RAPD se basa en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), sin embargo cuenta con una modificación correspondiente a la utilización de un solo iniciador para la reacción, ya que se basa en la amplificación aleatoria de regiones del ADN, para lo cual se utilizan iniciadores de 10 bases.

Para el ensayo se utilizaron dos iniciadores: 1254 (5'- CCGCAGCCAA-3'). Se realizó la estandarización de las concentraciones de reactivos y las condiciones de PCR y se llegó a las descritas en las tablas 6 y 7 (Bart, *et al.* 1998; Nielsen, *et al.* 2014; Schmidt, *et al.* 1999; Williams, *et al.* 1990).

Tabla 6. Concentraciones de reactivos para RAPD-PCR.

Mezcla de reacción (1X) para RAPD-PCR	
Reactivo	Concentración
dNTPs	0.2 mM
MgCl ₂	3 mM
Solución amortiguadora 10X	1X
Iniciador: 1254 (100 pmol/μL)	5 pmol/μL
Taq pol	1 U
DNA	100 ng
Volumen final	30 μL

Tabla 7. Condiciones para RAPD-PCR.

Condiciones para RAPD-PCR		
Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1	94	1
4	94	4
	36	4
	72	4
35	94	1
	36	1
	72	2
1	72	10

Se utilizó el set de Taq polimerasa de Vivantis (Vivantis, No. PL1202) y dNTP's de Thermo-Scientific (Thermo-Scientific, No. R0192). La reacción se llevó a cabo en el termociclador T100 ThermalCycler (BioRad).

Los productos de PCR se revelaron mediante una electroforesis SDS-PAGE, en geles de poliacrilamida al 10%. A cada reacción se le agregaron 7.5 µL de solución de Laemmli 4X como amortiguador de corrida. En los pozos del gel se colocaron 15 µL de las muestras y la electroforesis se corrió a 25 mA hasta pasar el gel concentrador y a 35 mA en el gel separador con una fuente de poder BioPac (BioRad), durante 60 minutos. El gel de poliacrilamida se tiñó con bromuro de etidio (Bio Rad) 10% (v/v) durante 15 minutos, se enjuagó con agua corriente y se colocó en un transiluminador con luz ultravioleta (High Performance Ultraviolet Transilluminator, UVP).

Las imágenes de las cepas fueron procesadas en el software GelJ v.2.0 (Heras, *et al.* 2015), se utilizó el coeficiente de Jaccard para determinar el porcentaje de similitud entre las muestras, el método de grupo de pares no ponderado con media aritmética o UPGMA por sus siglas en inglés para la formación de agrupamientos para la representación gráfica en un dendrograma.

RAPD de cepas obtenidas de un mismo paciente

Debido a que el resultado del análisis del RAPD con todas las cepas del estudio no se lograron identificar agrupamientos, se decidió realizar de nueva cuenta el experimento. El ensayo se realizó con 16 pares de cepas, que fueron parte del total de muestras del estudio. Cada par se seleccionó debido a que fueron aisladas de un mismo paciente en diferentes momentos.

La metodología es la misma empleada en el ensayo RAPD para todas las cepas, la mezcla de reacción y las condiciones para la reacción se describen en las tablas 6 y 7. La electroforesis fue modificada y se cambió el gel de poliacrilamida por un gel de agarosa al 1.7% (m/v) y se corrió en una cámara para electroforesis Sub-Cell GT Mini (Bio Rad) a 70 V con una fuente de poder PowerPac Basic (BioRad), durante 90 minutos. El gel de agarosa se tiñó con bromuro de etidio (Bio Rad) 10% (v/v) durante 30 minutos, se enjuagó dos veces y se colocó en un transiluminador con luz ultravioleta (High Performance Ultraviolet Transilluminator, UVP).

El cambio en la electroforesis se debió a que fue recomendado realizar el análisis de las imágenes solo con las bandas representativas de cada cepa, para lo que la realización de geles de agarosa ofrece un mejor resultado que con los geles de poliacrilamida. El procesamiento de las imágenes fue el mismo utilizado en el ensayo con el total de las cepas, sin embargo, en un primer agrupamiento se realizó una comparación entre las cepas de cada paciente y posteriormente se realizó la comparación entre los 16 pares de cepas.

RESULTADOS

- Patrones de resistencia a los antibióticos

De los 88 aislados se encontró que el 77.8% de las cepas son resistentes a ampicilina, 75% a ciprofloxacino y 55.6% a trimetoprim-sulfametoxazol. De la misma manera la resistencia a la familia de las cefalosporinas fue alta, no importando la generación a la cual pertenece cada antibiótico; la cefazolina (primera generación) 44.4%, ceftriaxona (tercera generación) 44.4% y cefepime (cuarta generación) 41.7% (Tabla 8).

El aumento en la resistencia observada en los aislados de infecciones recurrentes se comparó con los datos de los aislados de infecciones no-recurrentes, dicha comparación es pertinente debido a las muestras de orina, en ambos estudios se obtuvieron de pacientes de la Ciudad de México. La tabla 8 muestra que con ciprofloxacino la resistencia aumentó 20% respecto a cepas de ITU no-recurrentes, pasando de 55.5% a 75%.

Tabla 8. Comparación de la resistencia a antibióticos entre cepas aisladas de infecciones recurrentes y cepas aisladas de infecciones no-recurrentes, colectadas de pacientes ambulatorios de hospitales de la Ciudad de México.

Antibiótico	Porcentaje de resistencia en cepas de infecciones recurrentes	Porcentaje de resistencia en cepas de infecciones no recurrentes (Molina, <i>et al.</i> 2011)
Ampicilina	77.8%	83.7%
Ciprofloxacino	75%	55.5%
Trimetoprim-Sulfametoxazol	55.6%	56.6%
Cefazolina	44.4%	20.5%
Ceftriaxona	44.4%	10.2%
Cefepime	41.7%	7.6%
Amoxicilina-Ácido Clavulánico	41.7%	19.6%
Nitrofurantoina	15.3%	5.1%

La multiresistencia se considera cuando una cepa presenta resistencia a 3 o más familias de antibióticos. El 62.5% de las cepas colectadas de IrTU presentaron multiresistencia mientras que en cepas aisladas de ITU no-recurrentes el 30.2% fueron multiresistentes. El resultado presentó mayor incidencia de cepas multiresistentes en aislados de IrTU, duplicando el porcentaje respecto a cepas de infecciones no recurrentes.

- Grupos clonales

Los resultados del ensayo de PCR para la identificación de las cepas pertenecientes al grupo clonal ST131 mostraron que 28 de las 88 cepas mostraron las dos bandas esperadas, que corresponden a un ensayo positivo (Fig. 5), indicando que el 31.8% de las recurrencias fueron causadas por este grupo clonal de *E. coli*. El ensayo de PCR se basó en el reconocimiento y amplificación del alelo-específico *pabB* de este grupo clonal de *E. coli* O25-ST131.

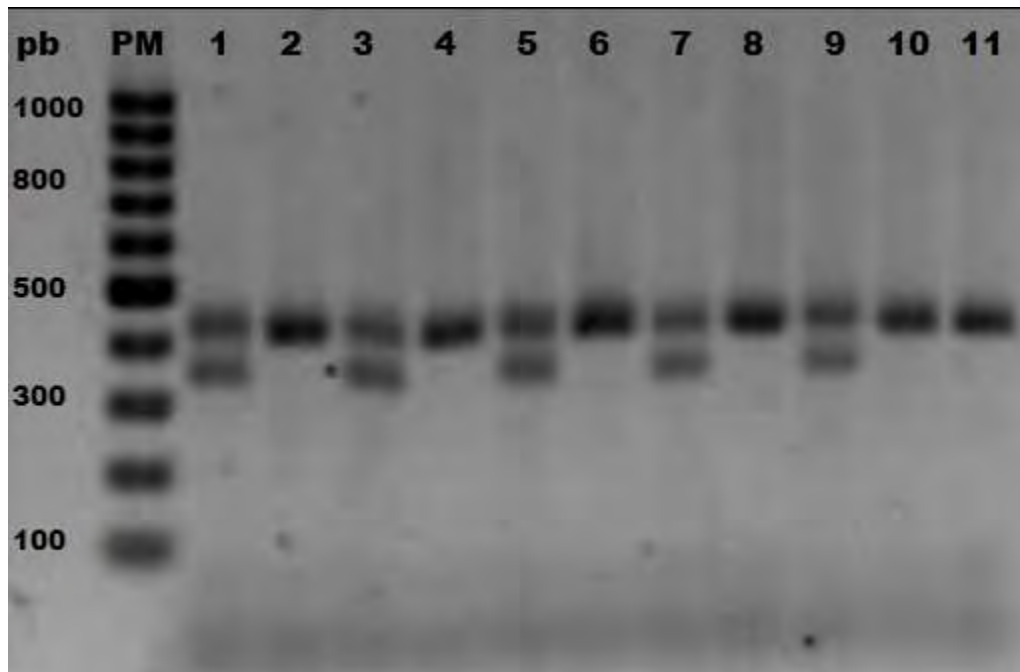


Figura 5. Identificación del grupo clonal ST131. Pozo 1: control positivo cepa TN03, Pozo 2: Control negativo cepa CFT073, Pozos 3-11 (Aislados clínicos de IrTU). El ensayo se considera positivo cuando se observan las bandas para la amplificación del fragmento del gen *trpA* (427 pb) y el fragmento del alelo específico del gen *pabB* (347 pb) que portan los aislados del grupo clonal ST131; es negativo cuando solo se amplificó el fragmento del gen *trpA* (427 pb).

La identificación de cepas pertenecientes al grupo CgA mostró que 4 (6.66%) de las 88 cepas evaluadas fueron positivas para este grupo, como se presenta en la figura 6. La identificación se realizó mediante el ensayo de PCR específico para un alelo representativo del gen *fumC* de *E. coli* CgA (Johnson *et al*, 2004). La figura 7 muestra el ensayo de la especificidad de la prueba, se observa la banda representativa para la región del gen *fumC* específico para CgA. En las reacciones se colocó una décima parte de ADN de una cepa perteneciente a CgA y el resto de ADN de una cepa no perteneciente al grupo clonal; lo que indica que la prueba es específica para la identificación del grupo clonal A.

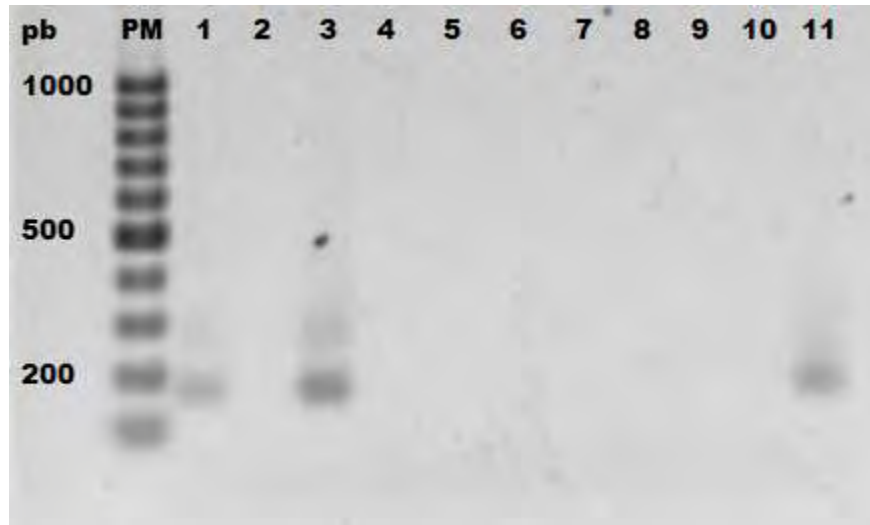


Figura 6. Identificación del grupo clonal A. Pozo 1: control positivo cepa ECOR13, Pozo 2: Control negativo cepa CFT073, Pozos 3-11: Aislados clínicos de IrTU. El ensayo se considera positivo cuando se observa las banda para la amplificación del fragmento del gen *fumC* (175 pb) que portan los aislados del grupo clonal CGA; es negativo en ausencia de la banda.

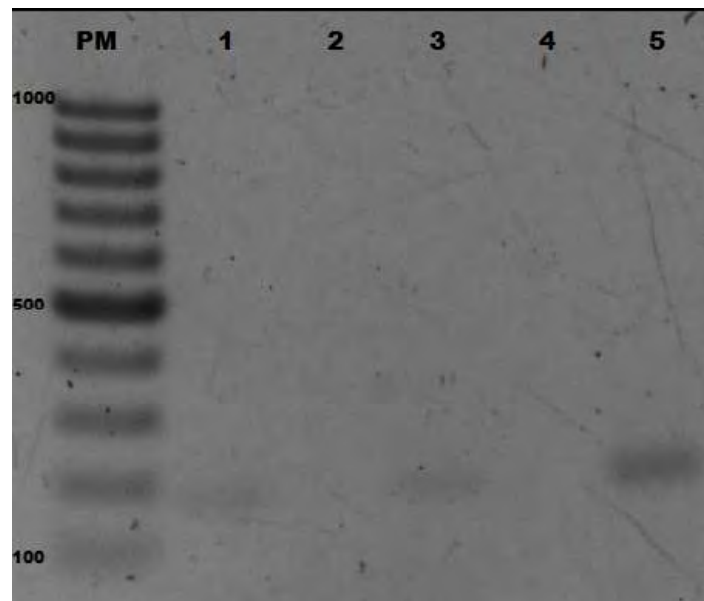


Figura 7. Especificidad de la reacción de identificación de CGA. Pozo 1: control positivo cepa ECOR13, Pozo 2: Control negativo cepa CFT073, Pozo 3 y 5: Reacción con mezcla de ADN de una cepa de resultado negativo (90%) y ADN de la cepa control positivo (10%). Pozo 4: reacción con ADN de un aislado de resultado negativo. El ensayo se considera positivo cuando se observa las banda para la amplificación del fragmento del gen *fumC* (175 pb).

- Relación genética entre los aislados

La relación genética se evaluó mediante el ensayo de RAPD-PCR, se utilizó el iniciador llamado 1254. Las imágenes de las bandas se analizaron en el software libre GelJ (Heras, *et al.* 2015). Para la formación del dendograma se utilizó el índice de Jaccard y el algoritmo UPGMA, con una tolerancia de 2.0% para las bandas.

De acuerdo al porcentaje de similitud mostrado en el dendograma se observó una gran diversidad entre las cepas. Se logró diferenciar en tres agrupaciones o clusters, se observa que hay una región donde se agruparon la mayoría de las cepas pertenecientes al grupo ST131.

Se realizó una comparación del patrón de amplificación (RAPD-PCR) para cada par de cepas provenientes del mismo paciente (de dos infecciones recurrentes), para obtener el porcentaje de similitud entre los aislados. El porcentaje calculado junto con las características que se encontraron se muestran en la tabla 9.

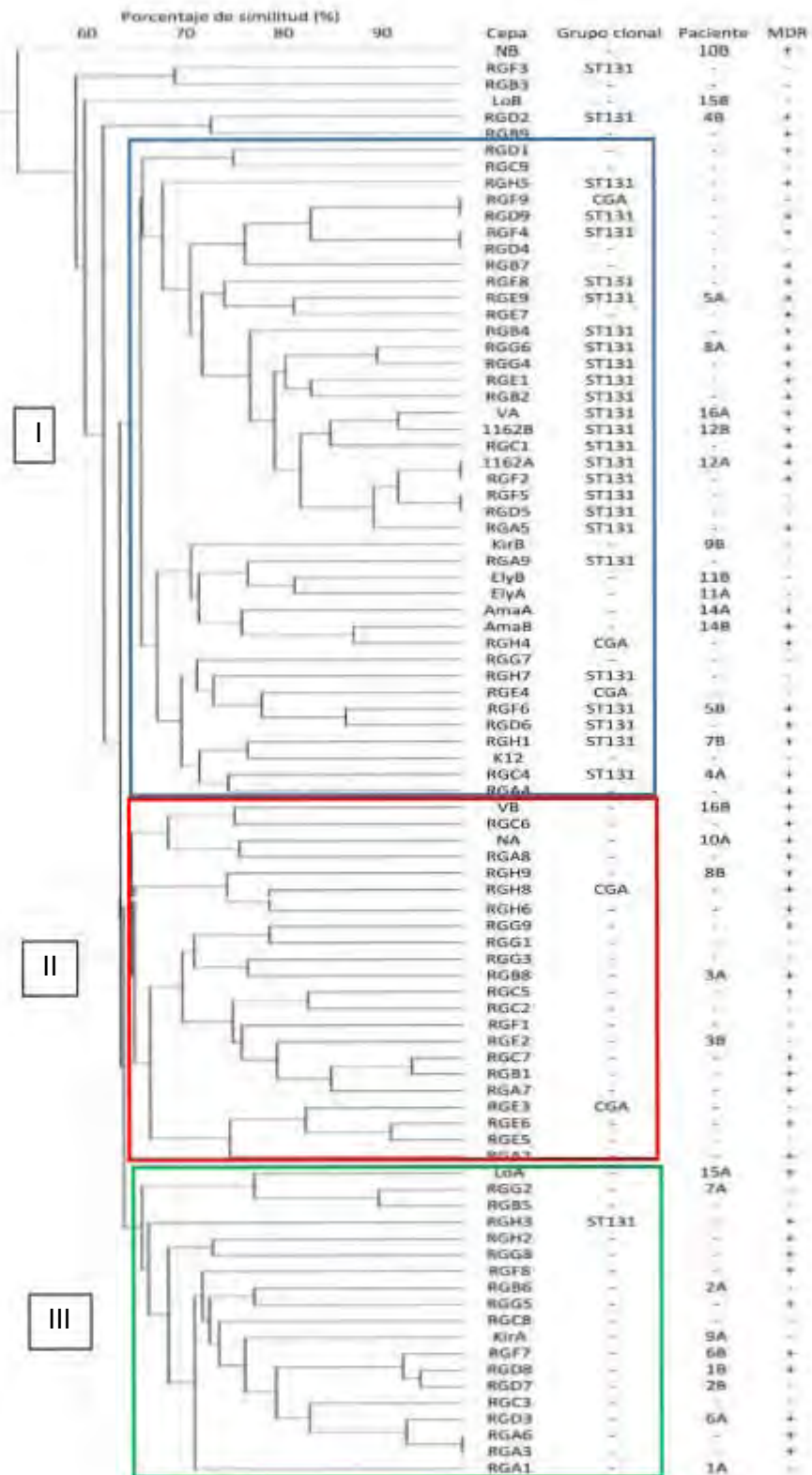


Figura 8. Relación genética inferida entre 88 aislados clínicos de UPEC por análisis RAPD con el iniciador 1254.

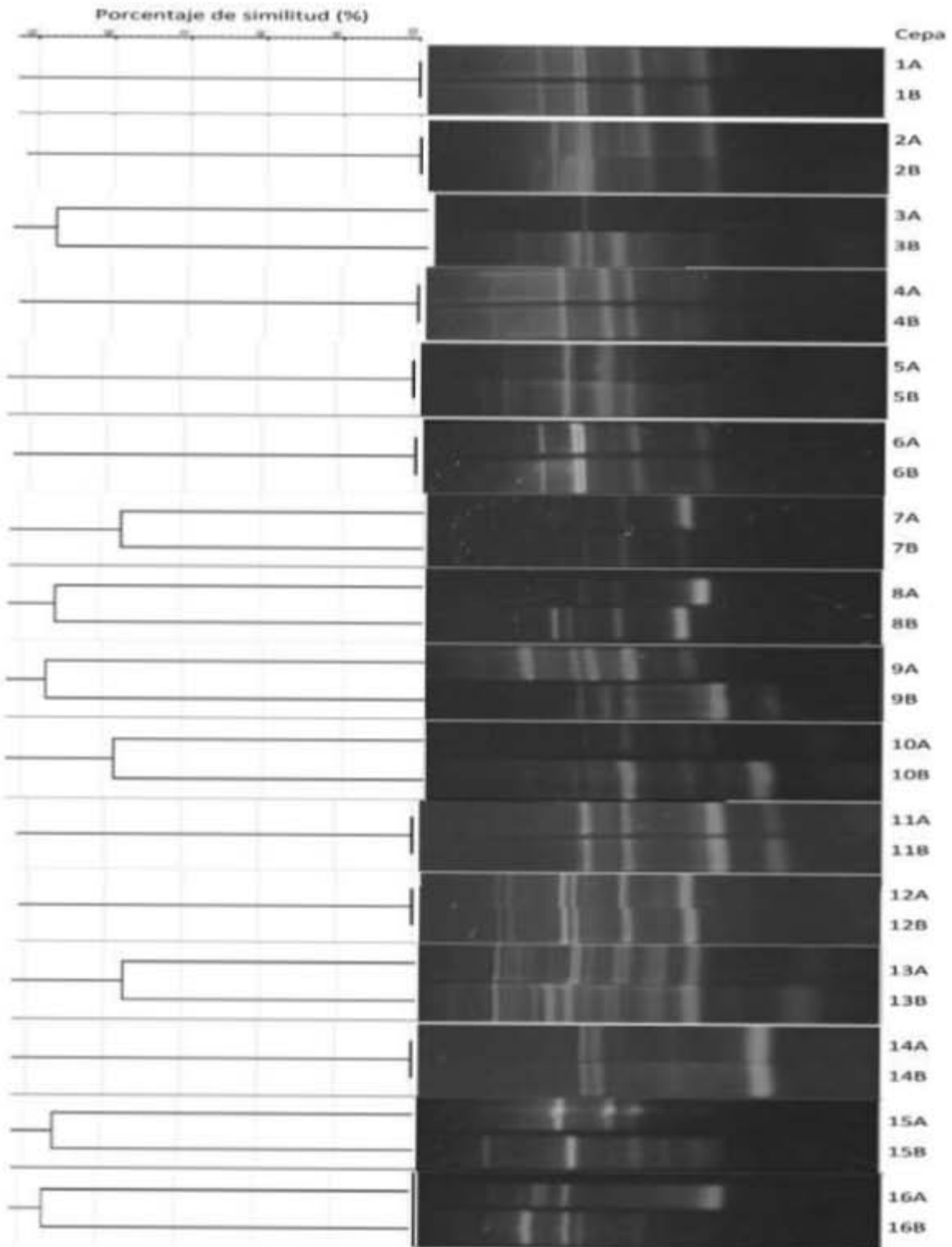


Figura 9. Patrones de bandeo generados por RAPD-PCR (huella genética). Gel de agarosa que muestra el patrón de amplificación de dos cepas aisladas del mismo paciente en dos episodios o infecciones recurrentes. Se empleó el iniciador 1254 en la PCR.

Tabla 9. Comparación de dos cepas (A y B) aisladas de un mismo paciente en dos episodios o infecciones recurrentes.

Cepa	Multirresistente	ST131	CgA	Similitud (%)
RGA1 (1A)	-	-	-	100
RGD8 (1B)	+	-	-	
RGB6 (2A)	-	-	-	100
RGD7 (2B)	-	-	-	
RGB8 (3A)	+	-	-	54
RGE2 (3B)	-	-	-	
RGC4 (4A)	+	+	-	100
RGD2 (4B)	+	+	-	
RGE9 (5A)	+	+	-	100
RGF6 (5B)	+	+	-	
RGD3 (6A)	+	-	-	100
RGF7 (6B)	+	-	-	
RGG2 (7A)	-	-	-	62
RGH1 (7B)	+	+	-	
RGG6 (8A)	+	+	-	55
RGH9 (8B)	+	-	-	
KIRA (9A)	-	-	-	54
KIRB (9B)	-	-	-	
NA (10A)	+	-	-	62
NB (10B)	+	-	-	
ELYA (11A)	-	-	-	100
ELYB (11B)	-	-	-	
1162A (12A)	+	+	-	100
1162B (12B)	+	+	-	
RA (13A)	+	-	-	63
RB (13B)	-	-	-	
AmaA (14A)	+	-	-	100
AmaB (14B)	+	-	-	
LoA (15A)	+	-	-	54
LoB (15B)	-	-	-	
VA (16A)	-	+	-	53
VB (16B)	+	-	-	

(+) Positivo, (-) Negativo; ST131 – Secuencia tipo 131, CgA – Grupo Clonal A.

Se observó que 8 de los 16 pares de cepas recolectadas de un paciente muestran un porcentaje de similitud del 100% entre los aislados. Esto indica que el 50% de las cepas aisladas de IrTU pueden ser persistentes.

De los 8 pares que presentaron 100% de similitud, 6 fueron multiresistentes a los antimicrobianos. De la misma manera, 3 de estos pares pertenecieron al grupo clonal ST131 y del total de cepas analizadas ninguna perteneció al grupo clonal CgA.

Se construyó un dendrograma con los 16 pares de cepas estudiadas en este apartado (Fig. 10), se determinó que a partir de 60% de similitud podrían generarse agrupamientos de acuerdo a las bandas que se observan en las imágenes de las electroforesis realizadas; de acuerdo con esto, se identificaron 3 grupos o clusters (A, B y C).

El cluster A lo integran 7 cepas, no pertenecen a grupos clonales y las 7 cepas muestran resistencia a ampicilina. Tres de las 7 cepas, son multiresistentes y se encuentra que dos pares (11 y 14) tienen 100% de similitud, además comparten resistencia a ampicilina y trimetoprim-sulfametoxazol. El cluster B está formado por 7 cepas, todos los integrantes de este grupo pertenecen al grupo clonal ST131 y son multiresistentes a antibióticos, comparten resistencia a ampicilina, amoxicilina-ácido clavulánico, ciprofloxacino y trimetoprim-sulfametoxazol. Los pares de cepas 4, 5 y 12 presentan similitud del 100%. El grupo C consta de 10 cepas, donde solo 2 cepas son multiresistentes y ninguna pertenece al grupo clonal ST131. En este grupo se encuentran 3 pares de cepas con similitud de 100% (1, 2, 6).

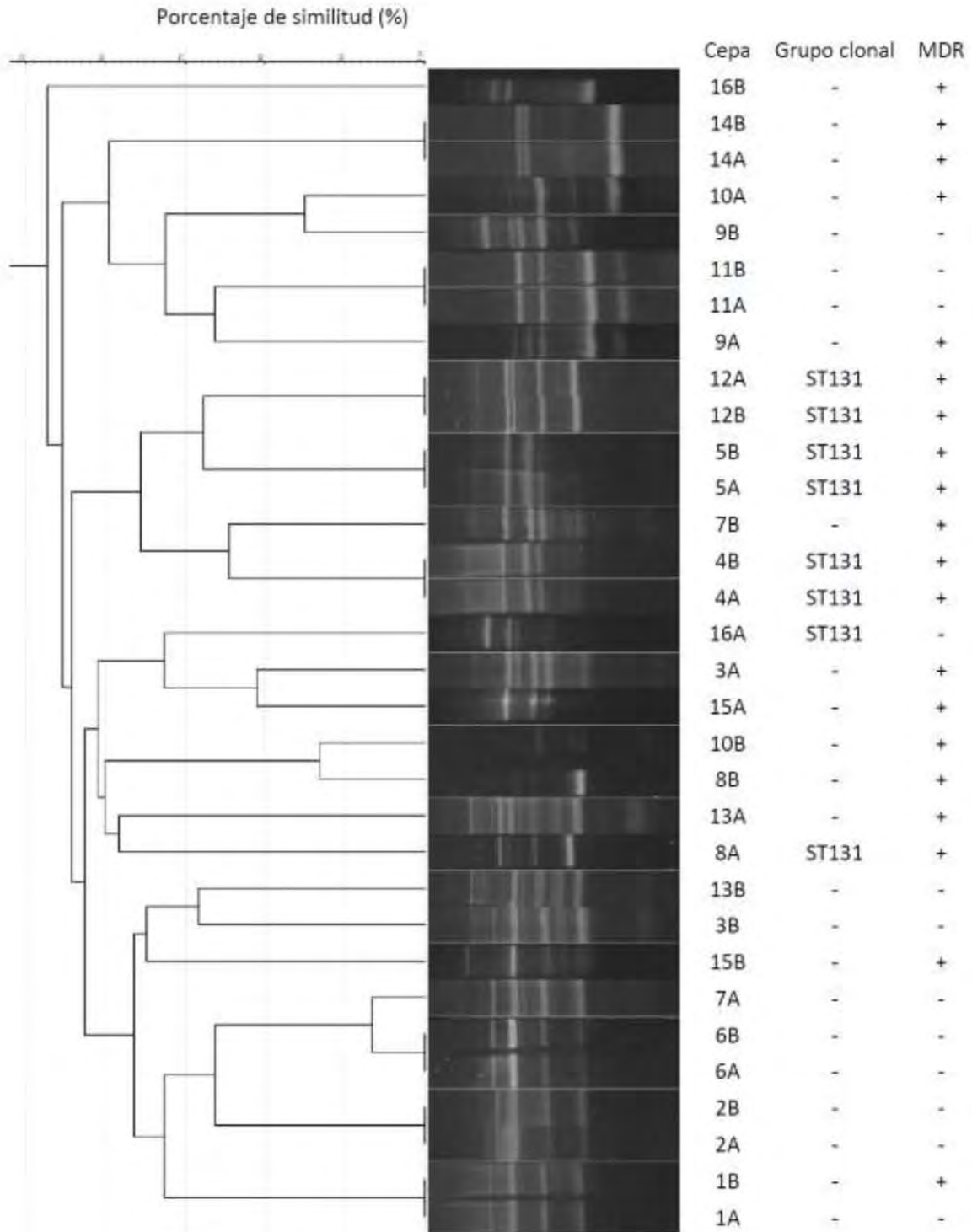


Figura 10. Dendrograma generado a partir de las comparaciones entre cepas aisladas de un mismo paciente

DISCUSIÓN

En este trabajo se estudiaron cepas de UPEC aisladas de infecciones recurrentes para conocer las características que puedan ser exclusivas de cepas causantes de IrTU. De acuerdo con nuestra hipótesis las cepas causantes de infecciones recurrentes deben tener algunas características particulares que favorezcan su permanencia en el tracto urinario. Hasta ahora no se han identificado genes individuales o en conjunto, que estén claramente asociados a las IrTU (Donnenberg, 2013; Luo, et al. 2012). También se determinó en los aislados la susceptibilidad a los antimicrobianos y se comparó con las cepas aisladas de infecciones no-recurrentes. En este estudio se identificaron cepas pertenecientes a los grupos clonales ST131 y ST69 (CgA) y finalmente se determinó la relación genética entre todos los aislados de IrTU.

En general los resultados muestran que las cepas aisladas de infecciones recurrentes tienen porcentajes elevados de resistencia a los antimicrobianos. Esto incluye los antimicrobianos de primera elección en México y en otras partes del mundo (Al-Mayahie y Al-Kuriashy 2016; Arredondo-García, *et al.* 2007; Flores-Mireles, *et al.* 2015; Hisano, *et al.* 2015; Molina, *et al.* 2011). Se encontró un incremento de hasta 30% de resistencia en las cepas de *E. coli* aisladas de infecciones recurrentes respecto a las cepas no-recurrentes. Podemos hacer esta comparación porque ambos estudios de susceptibilidad microbiana se realizaron con cepas aisladas de la misma población de la Ciudad de México y con los mismos criterios en la recolección de las muestras (Arredondo-García y Amabile-Cuevas, 2008; Molina, *et al.* 2011).

También se encontró en las cepas de IrTU un aumento en el porcentaje de cepas que presentaron multirresistencia a los antimicrobianos; el 62.5% de las cepas de IrTU resultaron multirresistentes superando a las cepas aisladas de infecciones no-recurrentes con 30.2% (Derakhshandeh, *et al.* 2015; Molina, *et al.* 2011; Ochoa, *et al.* 2016; Totsika, *et al.* 2011). En 2009, en cepas recolectadas de diversas partes del mundo, Schito y colaboradores describieron que solo el 10% de las cepas de UPEC aisladas de ITU mostraron multirresistencia a antibióticos (Schito, *et al.* 2009). De acuerdo a nuestra hipótesis, la multirresistencia a los antibióticos podría ser una característica distintiva de entre cepas aisladas de infecciones recurrentes, ya que la eliminación parcial de las bacterias durante las infecciones favorece la selección de las bacterias resistentes, y con esto la adaptación de las bacterias al tracto urinario. Por lo tanto, es probable que las cepas que sobreviven a la administración de los antimicrobianos se transmiten a otras bacterias los genes de resistencia y de esta manera formar una comunidad bacteriana resistente a los antimicrobianos a los que han sido expuestos.

La resistencia a nitrofurantoina mostrada por nuestras cepas causantes de recurrencia es notable ya que fue 10% superior a lo reportado en cepas aisladas de ITU (Molina, *et al.* 2011). Los porcentajes de cepas resistentes a nitrofurantoina en estudios realizados en la Ciudad de México y en otros países varían entre 2 y 9%, las cepas aisladas de recurrencias han desarrollado mecanismos para resistir a los antimicrobianos, incluyendo a la nitrofurantoina, que en algunos estudios ha demostrado las tasas más bajas de resistencia en cepas aisladas de ITU (Alcantar-Curiel, *et al.* 2015; Arredondo-García, *et al.*, 2007; Hisano, *et al.* 2015; Momtaz, *et*

al. 2013). Existen pocos estudios realizados con cepas aisladas de IrTU dirigidos a evaluar la susceptibilidad antimicrobiana; Luo y colaboradores, no encontraron diferencias significativas de susceptibilidad antimicrobiana entre los dos grupos de aislados de UPEC (Luo, *et al.* 2012). Nuestros resultados sugieren que la resistencia a antimicrobianos de los aislados de UPEC favorece el desarrollo y progresión de las IrTU. Es posible que la resistencia a los antimicrobianos pueda aumentar la prevalencia de cepas UPEC y los antibióticos puedan facilitar la formación de cepas UPEC persistentes, más estudios sobre las características de resistencia de las cepas UPEC proporcionarán una mejor comprensión molecular de las ITU (Luo, *et al.* 2012).

El aumento de la resistencia a antibióticos podría estar asociado a la transferencia horizontal de genes entre los que destaca la presencia de plásmidos (Akingbade, *et al.* 2014; Brolund, *et al.* 2013; Cusumano, *et al.* 2010; Nüesch-Inderbinen, *et al.* 2017). Al respecto sabemos, por estudios de este mismo grupo de trabajo, que 85% de estas cepas aisladas de IrTU portan plásmidos de alto peso molecular (mayores a 45 kb), y demostraron que la pérdida de algunos de estos plásmidos ocasionó la pérdida de resistencia a trimetoprim-sulfametoxazol, ampicilina, amoxicilina-ácido clavulánico y disminuyó la resistencia a gentamicina (Datos de una tesis elaborada en nuestro laboratorio con algunas de nuestras cepas).

Una de las interrogantes iniciales del presente estudio era conocer si cepas pertenecientes al grupo clonal de *E. coli* O25-ST131 eran causantes de IrTU. Al

respecto se encontró que más del 30% de las cepas aisladas de IrTU pertenecieron a esta secuencia tipo. El 80% de estas cepas mostraron resistencia a ciprofloxacino, lo cual concuerda con el linaje clonal ST131 que es responsable del incremento global en la resistencia a las fluoroquinolonas (Nicolas-Chanoine, *et al.* 2014; Oelesen, *et al.* 2013; Rogers, *et al.* 2010). La presencia de cepas pertenecientes a este grupo clonal aumentó casi 3 veces en comparación con aislados de infecciones urinarias no-recurrentes: en las muestras de pacientes ambulatorios de la Ciudad de México se encontró que 10.9% eran ST131 (Molina, *et al.* 2011).

Este grupo clonal ha sido reportado en muestras de ITU no recurrentes en países como Australia (13%), Hong Kong (8.5%) y Turquía (12%); los porcentajes sugieren que estas cepas tienen diferentes niveles de penetración en la población mundial (Ismail, *et al.* 2018; Nicolas-Chanoine, *et al.* 2014). La asociación entre el grupo clonal ST131 con las infecciones recurrentes del tracto urinario no ha sido reportada claramente. Johnson y colaboradores aislaron una cepa de *E. coli* de un paciente con IrTU, la cual fue secuenciada e identificada como ST131, la cepa porta dos plásmidos grandes de 107 kb y 130 kb y en dichos plásmidos se encontraron genes de resistencia a las cefalosporinas (expresión de beta lactamasas), fluoroquinolonas, trimetoprim-sulfametoxazol y aminoglucósidos. Esta cepa de *E. coli* llamada JJ1887 tiene características similares a nuestras cepas aisladas de recurrencias (Johnson, *et al.* 2016).

Las *E. coli* ST131 tienen información genética que las hace potencialmente patógenas, con ventajas que les permiten invadir nichos que tradicionalmente no

ocupan y así favorecen la persistencia (Johnson, *et al.* 2010; Hannan, *et al.* 2012). Estas cepas pueden ser productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y actualmente representan uno de los grupos dominantes de las cepas multirresistentes a antibióticos a nivel internacional (Banerjee, *et al.* 2013; Nicolas-Chanoine, *et al.* 2014; Totsika, *et al.* 2013).

En cepas pertenecientes al linaje clonal ST131 se identificaron las subclonas H30, H30-R y H30-Rx las cuales han sido poco estudiadas. La subclona H30-R muestra hasta 100% de resistencia a ciprofloxacino y menos del 10% para ceftriaxona, mientras que H30-Rx, que es productora de BLEE, muestra resistencia superior al 98% para ampicilina, amoxicilina-ácido clavulánico y más del 75% para ceftriaxona (Banerjee y Johnson, 2014). En nuestro trabajo se encontró que las cepas identificadas como ST131 mostraron alta resistencia a ampicilina, trimetoprim-sulfametoxazol, las cefalosporinas y ciprofloxacino, lo que podría indicar la presencia de las subclonas más representativas de este grupo clonal: H30, H30-R y H30-Rx. Estas subclonas varían en sus perfiles de resistencia que ejemplifican la importancia de la transferencia horizontal de genes y las mutaciones en la expansión clonal de la secuencia tipo.

En el presente estudio solo el 4.5% del total de cepas aisladas de infecciones recurrentes pertenecieron al grupo clonal A (CgA) de *E. coli*, el cual es un ST69, seguido en importancia por su distribución después del ST131. En principio, se pensó que este grupo clonal tendría mayor presencia; dado que, el 55% de los aislados son resistentes a trimetoprim-sulfametoxazol y esta resistencia está

asociada a CgA (Johnson, et al. 2002; Manges, et al. 2001; Platell, et al. 2010). Podemos concluir que el grupo clonal CgA no está involucrado con las infecciones recurrentes. Algunos estudios reportan que entre el 6 y el 11% de cepas UPEC colectadas de infecciones agudas pertenecen al grupo CgA (Johnson, et al. 2005; Manges, et al. 2006; Manjarrez-Hernández, et al. 2016). En un estudio realizado en Dinamarca con cepas UPEC causante de ITU agudas, del 10 al 17% pertenecieron a este grupo clonal, el 38% y el 81% de ellas presentaron resistencia a trimetoprim-sulfametoxazol (Jakobsen, et al. 2010; Platell, et al. 2010; Skjøt-Rasmussen, et al. 2012).

Con respecto a la relación genética que hay entre nuestros aislados de IrTU se encontró en general una alta diversidad genética entre las cepas (Figura 8). No obstante, el análisis de los perfiles de RAPD y formación de dendogramas muestra que todos los aislados formaron tres grandes clados (I a III).

En el *cluster* I se agruparon la mayoría de las cepas pertenecientes al linaje clonal ST131 (25 de las 28 cepas que resultaron ST131). La agrupación de la mayoría de las cepas ST131 en un solo *cluster* indica, por un lado, que el ensayo de RAPD facilitó la identificación de las cepas, ya que los perfiles de bandas similares se agruparon en un *cluster* y las cepas identificadas como ST131 son efectivamente un grupo clonal. En el *cluster* I también se observa claramente la presencia de dos subclados, esto ya ha sido reportado por Petty y colaboradores, quienes encontraron que a pesar de ser un grupo clonal hay gran diversidad genética entre cada cepa. Se conoce que la diversidad genética entre diversos

aislados pertenecientes a ST131 es amplia debido a la rápida adaptación y diseminación de las cepas a lo largo del planeta (Petty, et al. 2014).

El ensayo de identificación por PCR realizado en este trabajo fue diseñado para identificar solo a las cepas O25-ST131, por lo que cabe la posibilidad de que dentro de las cepas de estudio se encuentren más cepas de este grupo clonal con un serotipo O distinto (Matsumura, et al, 2017, Olesen, et al. 2013); la realización de más pruebas de identificación para ST131 complementaría la información y enriquecería el análisis de las cepas. Los clados II y III se mostraron bien delimitados, sin embargo, con las características que se evaluaron en este trabajo no permiten observar alguna otra relación entre ellas.

Al determinar si las recurrencias en las ITU se deben a la misma cepa que causó la primera infección (recaída) o a nuevas cepas que están infectando el tracto urinario (reinfección), se encontró que el 50% de los pacientes mostraron 100% de similitud entre las cepas causantes de los dos eventos infecciosos, lo cual indica que al menos el 50% de las recurrencias se deben a cepas de *E. coli* persistentes, las cuales no han sido erradicadas del tracto urinario, a pesar de numerosos tratamientos con los antimicrobianos apropiados. Esto se debe en parte a que estas cepas son invasivas, y cuando están dentro de las células están protegidas de los antimicrobianos y de la respuesta inmunitaria. Este resultado se acerca a lo reportado por Ejrnaes y colaboradores, donde indican que el 77% de las cepas de UPEC aisladas de una ITU son causantes de un segundo evento (Ejrnaes, et al. 2006).

Para complementar este resultado se agregaron las características evaluadas sobre multirresistencia y pertenencia a grupos clonales y con ello favorecer los criterios de agrupamiento de las cepas causantes de IrTU. Con estos datos se observó que 5 cepas persistentes presentan multirresistencia, 3 de ellas pertenecen al grupo clonal ST131. Estas características no han sido reportadas anteriormente en cepas aisladas de IrTU. En el dendograma correspondiente se observa un clado que agrupa las cepas pertenecientes a ST131 y multirresistentes, lo cual podría indicar que la pertenencia a este grupo clonal y la multirresistencia a antibióticos podrían estar involucradas en el establecimiento de IrTU.

CONCLUSIONES

Los resultados de nuestro trabajo permitieron identificar un aumento en el porcentaje de cepas de UPEC que presentan resistencia a los antibióticos más utilizados para el tratamiento de las ITU y el aumento del porcentaje de cepas multirresistentes respecto a las aisladas de cepas de ITU. Se encontró la presencia de los grupos clonales ST131 y CgA en las cepas aisladas de IrTU. Se observó diversidad genética entre las cepas de UPEC causantes de IrTU.

LITERATURA CITADA

- Ahmad, W. Jamshed, F. Ahmad, W. 2015. Frequency of *Escherichia coli* in patients with community acquired urinary tract infection and their resistance pattern against some commonly used antibacterials. Journal of Ayub Medical College Abbottabad. 27 (2) 333-337.
- Akingbade, O., Balogun, S., Ojo, D., Akinduti, P., Okerentugba, P.O., Nwanze, J.C., Okonko, I.O. 2014. Resistant plasmid profile analysis of multidrug resistant *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections in Abeokuta, Nigeria. African Health Sciences. 14(4): 821-828.
- Alcantara-Curiel, M.D., Alpuche-Aranda, C.M., Varona-Bobadilla, H.J., Gayosso-Vázquez, C., Jarillo-Quijada, M.D., Frías-Mendivil, M., Sanjuan-Padrón, L., Santos-Preciado, J.I., 2015. Risk factors for extended-spectrum β -lactamases-producing *Escherichia coli* urinary tract infections in a tertiary hospital. Salud Publica de México. 57(5): 412-418.
- Al-Mayahie, S., Al-Kuriashy, J. JH. 2016. Distribution of ESBLs among *Escherichia coli* isolates from outpatients with recurrent UTIs and their antimicrobial resistance. Journal of Infection in Developing Countries. 10(6): 575-583.
- Arredondo-Garcia, J. Amabile-Cuevas C. 2008. High Resistance prevalence towards ampicilin, co-trimoxazole and ciprofloxacin, among uropathogenic *Escherichia coli* isolates in Mexico City. 2 (5) 350-353.
- Arredondo-García, J.L., Soriano-Becerril, D., Solórzano-Santos, F., Arbo-Sosa, A., Coria-Jiménez, R., Arzate-Barbosa, P. 2007. Resistance of Uropathogenic Bacteria to First-Line Antibiotics in Mexico City: A Multicenter Susceptibility Analysis. Current Therapeutic Research. 68(2): 120-126.
- Barber, A.E., Norton, J.P., Spivak, M.A., Mulvey, A., 2013. Urinary Tract Infections: Current and Emerging Management Strategies. Clinical Infectious Diseases. 57(5):719-724.
-

- Banerjee, R., Johnson, J.R. 2014. A New Clone Sweeps Clean: the Enigmatic Emergence of *Escherichia coli* Sequence Type 131. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 58(9):4997-5004.
- Banerjee, R. Johnston, B. Lohse, C. Porter, S. Clabots, C. Johnson, J. 2013. *Escherichia coli* Sequence Type 131 Is a Dominant, Antimicrobial-Resistant Clonal Group Associated with Healthcare and Elderly Hosts. *Infection Control & Hospital Epidemiology*. 34 (4) 361-369.
- Bart, A. Schuurman, I.G.A., Achtman, M., Caugant, D.A., Dankert, J., Van der Ende, A., 1998. Randomly Amplified Polymorphic DNA Genotyping of Serogroup A Meningococci Yields Results Similar to Those Obtained by Multilocus Enzyme Electrophoresis and Reveals New Genotypes. *Journal of Clinical Microbiology*. 1746-1749.
- Bauer, A., Kirby, W., Sherris, J., Turck, M., 1966. Antibiotic sensitivity testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*. 45:493-496.
- Bien, J., Sokova, O., Bozko, P., 2011. Role of Uropathogenic *Escherichia coli* Virulence Factors in Development of Urinary Tract Infection and Kidney damage. *International Journal of Nephrology*. 2012:1-15.
- Blango, M. Mulvey, M. 2010. Persistence of Uropathogenic *Escherichia coli* in the Face of Multiple antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 54 (5) 1855-1863.
- Brodlund, A., Franzen, O., Melefors, O., Tegmark-Wisell, K., Sandegren, L. 2013. Plasmidome-analysis of ESBL-producing *Escherichia coli* using conventional typing and high-throughput sequencing. *PLoS ONE*. 8:e65793. 10.1371/journal.pone.0065793.
- Calderón-Jaimes, E., Casanova-Román, G., Galindo-Fraga, A., Gutiérrez-Escoto, P., Landa-Juárez, S., Moreno-Espinosa, S., Rodríguez-Covarrubias, F., Simón-Pereira, L., Valdez-Vázquez, R., 2013. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*. 70(1):3-10.
- Clermont, O. Dhanji, H. Upton, M. Gibreel, T. Fox, A. Boyd, D. Mulvey, M. Nordmann, P. Ruppe, E. Sarthou, J. L. Frank, T. Vimont, S. Arlet, G. Branger, C.

Woodford, N. Denamur, E. 2009. Rapid detection of the O25b-ST131 clone of *Escherichia coli* encompassing the CTX-M-15 producing strains. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 64. 274-277.

- Cusumano, C.K., Hung, C.S., Chen, S.L., Hultgren, S.J., 2010. Virulence Plasmid Harbored by Uropathogenic *Escherichia coli* Functions in Acute Stages of Pathogenesis. *Infection and Immunity*. 78(4):1457-1467.

- Daza Perez, R, M. 1998. Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. *Información terapéutica del Sistema Nacional de Salud*. 22 (3) 57-67.

- Derakhshandeh, A. Firouzi, R. Motamedifar, M. Arabshahi, S. Novinrooz, A. Motamedi Boroojeni, A. Bahadori, M. Heidari, S. 2015. Virulence characteristics and antibiotic resistance patterns among different phylogenetic groups of uropathogenic *Escherichia coli* isolates. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. DOI: 10.7883/yoken.JJID.2014.327

- Donnenberg, M.S. 2013. *Escherichia coli*. Patotypes and Principles of Pathogenesis. 2nd Edition. Oxford, UK. Elsevier.

- Erjnaes, K. Recurrent Urinary Tract Infections Caused by *Escherichia coli*. *Danish Medical Bulletin*. 2011. 58(4):1-22.

- Erjnaes, K., Stegger, M., Reisner, A., Ferry, S., Monsen, T., Holm, S.E., Lundgren, B., Frimodt-Moller, N., 2011. Characteristics of *Escherichia coli* causing persistence or relapse of urinary tract infections. Phylogenetic groups, virulence factors and biofilm formation. *Virulence*. 2(6):528-537

- Flores-Mireles, A.L., Walker, J.N., Caparon, M., Hultgren, S.J., 2015. Urinary tract infections: Epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nature Reviews of Microbiology*. 13:269-284.

- Foxman, B, Brown, P. 2003. Epidemiology of urinary tract infections. Transmission and risk factors, incidence, and cost. *Infectious Disease Clinics of North America*. 17:227-241.

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

- Hannan, T.J., Totsika, M., Mansfield, K.J., Moore, K.H., Schembri, M.A., Hultgreen, S.J. 2012. Host-pathogen checkpoints and population bottlenecks in persistent and intracellular uropathogenic *Escherichia coli* bladder infection. *FEMS Microbiology Reviews*. (36) 616-648.
- Heras, J. Domínguez, C. Mata, E. Pascual, V. Lozano, C. Torres, C. Zarazaga, M. 2015. GelJ – a tool for analyzing DNA fingerprints gel images. *BMC Bioinformatics*. 16 (270).
- Hisano, M., Bruschini, H., Nicodemo, A.C., Mendes, C., Lucon, M., Srougi, M. 2015. The bacterial spectrum and antimicrobial susceptibility in female recurrent urinary tract infection: how different they are from sporadic single episodes? *Urology*. doi: 10.1016/j.urology.2015.05.033.
- Ismail, M.D., Ali, I., Hatt, S., Salzman, E.A., Cronenwett, A.W., Marrs, C.F., Rickard, A.H., Foxman, B. 2018. Association of *Escherichia coli* ST131 lineage with risk of urinary tract infection recurrence among young women. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 13:81-84.
- Jakobsen, L. Hammerum, AM. Frimodt-Moller, N. 2010. Detection of clonal group A *Escherichia coli* isolates from broiler chickens, broiler chicken meat, community-dwelling humans, and urinary tract infection (UTI) patients and their virulence in a mouse UTI model. *Applied and Environmental Microbiology*. 76: 8281–8284.
- Johnson, T.J., Aziz. M., Liu, C.M., Sokurenko, E., Kisiela, D.I., Paul, S., Andersen, P., Johnson, J.R., Price, L.B. 2016. Complete Genome Sequence of a CTX-M-15-Producing *Escherichia coli* Strain from the H30Rx Subclone of Sequence Type 131 from a Patient with Recurrent Urinary Tract Infections, Closely Related to a Lethal Urosepsis Isolate from the Patient's Sister. *Genome Announcements*. 4 (3), e00334-16.
- Johnson, J. R. 2005. *Escherichia coli* Clonal Group A. *Clinical Infectious Diseases*. 41:568.
- Johnson, J, R. Johnston, B. Clabots, C. Kuskowski, M. A. Castanheira, M. 2010. *Escherichia coli* Sequence Type ST131 as the major Cause of Serious

Multidrug-Resistant *E. coli* Infections in the United States. *Clinical Infectious Diseases*. 51 (3) 286-294.

- Johnson, J, R., Menard, M., Johnston, B., Kuskowski, M. A., Nichol, K., Zhanel, G. G. 2009. Epidemic clonal groups of *Escherichia coli* as a cause of antimicrobial-resistant urinary tract infections in Canada, 2002 to 2004. *Antimicrobial Agents of Chemotherapy*. 53(7):2733-2739.
- Johnson, J, R. Owens, K. Manges, A, R. Riley, L, W. 2004. Rapid and specific Detection of *Escherichia coli* Clonal Group A by Gene-Specific PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 46 (6) 2618-2622.
- Kaper, J.B., Nataro, J.P., Mobley, H.L.T., 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews of Microbiology*. 2:123-140.
- Kothari, A. Sagar, V. 2008. Antibiotic resistance in pathogens causing community-acquired urinary tract infections in India: a multicenter study. *Journal of Infection in Developing Countries*. 2 (5) 354-358.
- Luo, Y., Ma, Y., Zhao, Q., Wang, L., Guo, L., Ye, L., Zhang, Y., Yang, J. 2012. Similarity and Divergence of Phylogenies, Antimicrobial Susceptibilities, and Virulence Factor Profiles of *Escherichia coli* Isolates Causing Recurrent Urinary Tract Infections That Persist or Result from Reinfection. *Journal of Clinical Microbiology*. 50(12):4002-4007.
- Manges, A, R. Johnson, R, R. Foxman, B. O'Bryan, T, T. Fullerton, K, E. Riley, L, W. 2001. Widespread distribution of urinary tract infections caused by a multidrug-resistant *Escherichia coli* clonal group. *The New England Journal of Medicine*. 345 (14) 1007-1013.
- Manjarrez-Hernandez, A., Molina-Lopez, J., Gavilanes-Parra, S., Hernandez-Castro, R. 2016. *Escherichia coli* clonal group A among uropathogenic infections in Mexico City. *Journal of Medical Microbiology*. 65:1438-1444.
- Marrs, C.F., Zang, L., Foxman, B. 2005, *Escherichia coli* mediated urinary tract infections: Are there distinct uropathogenic *E. coli* (UPEC) pathotypes? *FEMS Microbiology Letters*. 252:183-190.

- Matsumura, Y., Pitout, J.D.D., Peirano, G., DeVinney, R., Noguchi, T., Yamamoto, M., Gomi, R., Matsuda, T., Nakano, S., Nagao, M., Tanaka, M., Ichiyama, S. 2017. 62(5): pii: e00179-17.
- Molina-López, J., Aparicio-Ozores, G., Ribas-Aparicio, R., Gavilanes-Parra, S., Chávez-Berrocal, M.E., Hernández-Castro, R., Manjarrez-Hernandez, H.A. 2011. Drug resistance, serotypes, and phylogenetic groups among uropathogenic *Escherichia coli* including O25-ST131 in Mexico City. *Journal of Infection in Developing Countries*. 5(12):840-849.
- Momtaz, H., Karimian, A., Madani, M., Dehkordi, F.S., Ranjbar, R., Sarshar, M., Souod, N. 2013. Uropathogenic *Escherichia coli* in Iran: Serogroup distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 12:8 <https://doi.org/10.1186/1476-0711-12-8>.
- Neamati, F. Firoozeh, F. Saffari, M. Zibaei, M. 2015. Virulence Genes and Antimicrobial Resistance Pattern in Uropathogenic *Escherichia coli* Isolated From Hospitalized Patients in Kashan, Iran. *Jundishapur Journal of Microbiology*. 8(2): e17514.
- Nielsen, K.L. Dynesen, P., Larsen, P., Frimodt-Moller, N., 2014. Faecal *Escherichia coli* from patients with *E. coli* urinary tract infection and healthy controls who never had a urinary tract infection. *Journal of Medical Microbiology*. 63:582-589.
- Nicolas-Chanoine, M, H. Bertrand, X. Madec, J. 2014. *Escherichia coli* ST131, an Intriguing Clonal Group. *Clinical Microbiology Reviews*. 27 (3) 543-574.
- Nicolas-Chanoine, M. Blanco, J. Leflon-Guibot, V. Demarty, R. Alonso. M. Canica, M. Park, Y. Lavigne, J. Pitout, J. Johnson, J. 2008. Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 61 273-281.
- Nüesch-Inderbilen, M.T., Baschera, M., Zurfluh, K., Hächler, H., Nüesch, H., Stephan, R. 2017. Clonal Diversity, Virulence Potential and Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli* Causing Community Acquired Urinary Tract

Infection in Switzerland. *Frontiers in Microbiology*. 1;8:2334. doi: 10.3389/fmicb.2017.02334

- Ochoa, S.A., Cruz-Córdova, A., Luna-Pineda, V.M., Reyes-Grajeda, J.P., Cázares-Domínguez, V., Escalona, G., Sepúlveda-González, M.E., López-Montiel, F., Arellano-Galindo, J., López-Martínez, B., Parra-Ortega, I., Giono-Cerezo, S., Hernández-Castro, R., De la Rosa-Zamboni, D., Xicohtencatl-Cortés, J. 2016. Multidrug- and Extensively Drug-Resistant Uropathogenic *Escherichia coli* Clinical Strains: Phylogenetic Groups Widely Associated with Integrons Maintain High Genetic Diversity. *Frontiers in Microbiology*. Vol. 7 Art. 2042.
- Oelesen, B., Hansen, D.S., Nilsson, F., Frimidt-Møller, J., Leihof, R.F., Struve, F., Scheutz, F., Johnston, B., Krogfelt, K.A., Johnson, J.R. 2013. Prevalence and characteristics of the epidemic multiresistant *Escherichia coli* ST131 clonal group among extended-spectrum beta-lactamase-producing *E. coli* isolates in Copenhagen, Denmark. *Journal of Clinical Microbiology*. 51(6):1779-1785.
- Oelschlaeger, T.A., Dobrindt, U., Hacker, J., 2002. Virulence factors of uropathogens. *Current Opinion in Urology*. 12:33-38.
- Petty, N.K., Ben Zakour, N.L., Stanton-Cook, M., Skippington, E., Totsika, M., Forde, B.M., Phan, M-D., Gomes Moriel, D., Peters, K.M., Davies, M., Rogers, B.A., Dougan, G., Rodríguez-Baño, J., Pascual, A., Pitout, J.D.D., Upton, M., Paterson, D.L., Walsh, T.R., Schembri, M.A., Beatson, S.A. 2014. *PNAS*. 111(15):5694-5699
- Pitout, J.D.D., 2012. Extraintestinal, pathogenic *Escherichia coli*: a combination of virulence with antibiotic resistance. *Frontiers in Microbiology*. 3(9): 1-7.
- Platell, J.L., Cobbold, R.N., Johnson, J.R., Trott, D.J. 2010. Clonal group distribution of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* among humans and companion animals in Australia. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 65:1936-1938.
- Rasko, D.A., Rosovitz, M.J., Myers, G.S.A., Mongondin, E.F., Fricke, W.F., Gajer, P., Crabtree, J., Sebaihia, M., Thompson, N.R., Chaudhuri, R., Henderson, I.R., Sperandio, V., Ravel, J., 2008. The Pangenome Structure of

Escherichia coli: Comparative Genomic Analysis of *E. coli* Commensal and Pathogenic isolates. *Journal of Bacteriology*. 190(20):6881-6893.

- Rijavec, M. Erjavec, M. Avgustin, J. Reissbrodt, R. Fruth, A. Krizan-Hergouth, V. Zgur-Bertok, D. 2006. High Prevalence of Multidrug Resistance and Random Distribution of Mobile Genetic Elements Among Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) of the Four Major Phylogenetic Groups *Current Microbiology*. 53 158-162.
- Riley, L. W. 2014. Pandemic lineages of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology and Infection*. 20(5): 380-390.
- Rodriguez-Angeles, G. 2002. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pública de México*. Vol. 44. 5:464-475.
- Rogers, B. Sidjabat, H, E. Paterson, D. L. 2010. *Escherichia coli* O25b-ST131: a pandemic, multiresistant. Community-associated strain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. DOI: 10.1093/jac/dkq415.
- Rosen, D. Hooton, T. Stamm, W. Humphrey, P. Hultgren, S. 2007. Detection of Intracellular Bacterial Communities in Human Urinary Tract Infection. *PLoS Medicine*. Vol. 4, 12, e329.
- Russo, T.A., Johnson, J.R., 2000. A proposal for an inclusive designation for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* ExPEC. *Journal of Infectious Diseases*. 181:1753-1754.
- Schito, G.C., Naber, K.G., Botto, H., Palou, J., Mazzei, T., Gualco, L., Marchese, A. 2009. The ARESC study: an international survey on the antimicrobial resistance of pathogens involved in uncomplicated urinary tract infections. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 34: 407-413.
- Schmidt, H., Scheef, J., Huppertz, H.I., Frosch, M. Karch, H., 1999. *Escherichia coli* O157:H7 and O157:H2 Strains That Do Not Produce Shiga Toxin: Phenotypic and Genetic Characterization of Isolates Associated with Diarrhea and Hemolytic-Uremic Syndrome. *Journal of Clinical Microbiology*. 37(11): 3491-3496.

- Schwartz, D.J., Conover, M.S., Hannan, T.J., Hultgren, S.J. 2015. Uropathogenic *Escherichia coli* Superinfection Enhances the Severity of Mouse Bladder Infection. PloS Pathogen 11(1): e1004599.
- Shappert, S.M., Rechtsteiner, E.A., 2008. Ambulatory medical care utilization estimates for 2006. National Health Statistics Report. 8:1-29.
- Skjot-Rasmussen, L. Olsen, S. Jakobsen, L. Ejrnaes, K. Scheutz, F. Lundgren, B. Frimodt-Moller, N. Hammerum, A. 2012. *Escherichia coli* clonal group A causing bacteraemia of urinary tract origin. Clinical Microbiology and Infection. 19 656-661.
- Sokurenko, E., Johnson, J.R., 2011. Clonal identity of *Escherichia coli* as a predictive factor for recurrent cystitis. Virulence. 2(6):495-497.
- Soto, S.M., Jimenez de Anta, M.T., Vila, J. 2006. Quinolones Induce Partial or Total Loss of Pathogenicity Island in Uropathogenic *Escherichia coli* by SOS-Dependent or Independent Pathways, Respectively. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2(50):649-653.
- Soto, S.M., Smithson, A., Horcajada, J.P., Martinez, J.A., Mensa, J.P., Vila, J. 2006. Implication of biofilm formation in the persistence of urinary tract infection caused by uropathogenic *Escherichia coli*. Clinical Microbiology and Infection. 12(10):1034-1036.
- Talavera Rojas, M., Reyes Rodriguez, N. E., Lagunas Bernabé, S., Fernández Rosas, P., Morales Erasto, V., Soriano Vargas, E. 2011. Variabilidad genética de aislamientos de *Salmonella typhimurium* (grupo B) obtenidos de hígados de pollo destinados para consumo humano. Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias. 2(4):371-380.
- Totsika, M., Beatson, S.A., Sarkar, S., Phan, M., Petty, N.K., Bachmann, N., Szubert, M., Sidjabat, H.E., Paterson, D.L., Upton, M., Schembri, M.A. 2011. Insights into a Multidrug Resistant *Escherichia coli* Pathogen of the Globally Disseminated ST131 Lineage: Genome Analysis and Virulence Mechanisms. PLoS ONE 6(10): e26578. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026578>.

- Wang, X., Jordan, K., Mayer, L. W. 2015. A Phylogenetic Perspective on Molecular Epidemiology. *Molecular Medical Microbiology* (Second Edition). Vol. 1. Chapter 29: 517-536.
- Wiles, T.J., Kulesus, R.R., Mulvey, M.A., 2008. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Experimental and Molecular Pathology*. 85:11-19.
- Williams, J. Kubelik, A. Livak, K. Rafalski, J. Tingey, S. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*. 18 (22) 6531-6535.