



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

## FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

Filogenia de cepas Uropatógenas de *Escherichia coli*  
Aisladas de Pacientes con Infección Crónica del Tracto  
Urinario y su Asociación con Genes de Virulencia y  
Resistencia a los Antimicrobianos.

# TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

## BIÓLOGA

P R E S E N T A:

Mejía Paz Mary Paula

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Carlos A. Eslava Campos



Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México 2019



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.

## AGRADECIMIENTOS

A mi director de Tesis Dr Carlos A. Eslava Campos y al Dr. Ulises Hernández Chiñas. Por la aportación de sus conocimientos, su asesoría, enseñanzas, apoyo y sobre todo su amistad brindada en los momentos más importantes de mi carrera universitaria.

A mis revisores de tesis: Dr. Pedro Ramírez García, Dra. Gloria Luz Paniagua Contreras y al Dr. Eric Monroy Pérez. Por su apoyo, sus observaciones y correcciones para la culminación de este trabajo.

Me van a faltar páginas para agradecer a las personas que se han involucrado en la realización de esta tesis, sin embargo merecen reconocimiento especial mi mamá, mi papá y mi hermana por su amor incondicional, por esforzarse en darme lo mejor, por enseñarme a ser perseverante, por apoyarme incondicionalmente y no dejarme rendir cuando todo parecía complicado e imposible.

A José ♥ con quien coincidí desde tercer semestre, siempre encuentra la manera de hacerme reír, me motiva a seguir adelante en todos mis proyectos. Tu ayuda, compañía y amor han sido fundamentales, no solo para la tesis, sino también para mi vida; eres mi inspiración y mi motivación.

Por último, pero no por eso menos importante a todas las personas del Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana del HIM, primordialmente por brindarme su amistad, por motivarme y ayudarme en todo momento, muchas gracias: Lulú, Yola, Male, Edgar, Ulises, Sarahí y Ricardo.

## ÍNDICE

•	<b>RESUMEN</b> .....	4
•	<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	5
❖	Etiología.....	8
❖	<i>Escherichia coli</i> uropatógena (UPEC).....	10
❖	Patogénesis de las cepas UPEC.....	11
❖	Factores de virulencia.....	12
❖	Filogenia.....	16
❖	Tratamiento.....	16
•	<b>ANTECEDENTES</b> .....	20
•	<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	22
•	<b>OBJETIVOS</b> .....	23
❖	Objetivo General.....	23
❖	Objetivos Particulares.....	23
•	<b>METODOLOGÍA</b> .....	24
❖	Material Biológico.....	24
❖	Caracterización Fenotípica.....	24
❖	Obtención del antígeno somático(O).....	24
❖	Identificación del antígeno somático.....	25
❖	Obtención del antígeno flagelar (H).....	25
❖	Identificación del antígeno flagelar.....	25
❖	Obtención del ADN bacteriano.....	26
❖	Identificación de grupo filogenético.....	26
❖	Detección de genes de virulencia.....	27
❖	Ensayo de susceptibilidad a antimicrobianos.....	29
❖	Prueba estadística.....	31
•	<b>RESULTADOS</b> .....	32
❖	Tipificación por serología.....	32
❖	Filogrupos.....	32
❖	Genes de virulencia.....	34
❖	Susceptibilidad a antimicrobianos.....	36
•	<b>DISCUSIÓN</b> .....	39
•	<b>CONCLUSIONES</b> .....	47
•	<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	48

- **RESUMEN**

*Escherichia coli* Uropatógena (UPEC) es el principal agente etiológico de las infecciones del tracto urinario (IsTU). La capacidad de las cepas UPEC para causar enfermedad se debe a la expresión de múltiples factores de virulencia incluida la capacidad para adherirse y colonizar, utilizar sistemas para captación de hierro, evasión del sistema inmune y la resistencia a los antimicrobianos entre otros. El objetivo del presente trabajo consistió en realizar la caracterización fenotípica con sueros específicos (serotipificación) y la resistencia a diferentes agentes antimicrobianos de la bacteria, así como el análisis genotípico mediante ensayos de PCR para identificar la presencia de genes asociados con la virulencia y su ubicación filogenética.

Se analizaron 164 aislados de *E. coli*, de 18 pacientes con infección crónica del tracto urinario (ICTU). Los resultados mostraron que el serotipo O25:H4 fue el más común en 43 (26%) aislados y con menor frecuencia los serogrupos O75 (12.8 %), O1 (6%) y O8 (4%). En el ensayo de susceptibilidad se identificaron cepas resistentes a la familia de los Carbapenem (Meropenem) y Anfencoles (Cloranfenicol) en 53% y 52% respectivamente, Quinolonas (Ácido Nalidixico) 31%, Fluoroquinolonas (Ciprofloxacina) 29% y Penicilinas (Ampicilina) 22%. Con relación a los genes asociados con la virulencia se observó que *iutA* (83%), *fyuA* (75%), *feoB* (73%), *fimH* (73%) y *sitA* (70%) fueron los que se identificaron con mayor frecuencia, *ibeA* (8%) e *ireA* (9%) se observaron en un menor número de cepas. En el análisis de grupo filogenético se observó que 95 cepas (58%) corresponden al grupo de extraintestinales, 26 (16%) al grupo D y 69 (42%) al B2. Se identificaron 68 (42%) cepas comensales 52 (32%) de ellas fueron del filogrupo A y 16 (10%) de B1. El análisis de correlación entre genes de virulencia y grupo filogenético mostró que todos los genes evaluados se identificaron en un mayor porcentaje en los filogrupos B2 y D, con relación a las cepas agrupadas en el filogrupo A. No se identificaron en las cepas los genes *sat*, *malX\_PAI*, *papA* e *ireA*. Los resultados obtenidos muestran que las cepas de *E. coli* aisladas de muestras de pacientes con ICTU pertenecen tanto a serotipos UPEC clásicos como a otros que pueden ser definidos como autóctonos. La mayoría de las cepas son multirresistentes y pertenecen tanto a los filogrupos extraintestinales (D y B2), como al grupo de cepas comensales (A y B1). Todas las cepas presentan genes relacionados con la virulencia de la bacteria.

**Palabras clave:** UPEC, infección del tracto urinario, genes de virulencia, filogrupos, resistencia a los antimicrobianos.

- **INTRODUCCIÓN**

Las Infecciones del tracto urinario (IsTU) son motivo frecuente de consulta médica en el primer nivel de atención, se describen como la presencia, invasión, colonización y multiplicación de uno o más patógenos en el tracto urinario, sin embargo, para que la invasión resulte exitosa es importante el tamaño del inóculo, las características de la bacteria, y la ineficiencia de los mecanismos de defensa del hospedero. Durante el proceso infeccioso en el hospedero se genera una respuesta inflamatoria que puede o no ocasionar síntomas que manifiesten el problema (Moreno *et al.*, 2006).

Las IsTU plantean un problema sanitario grave, esencialmente debido a la frecuencia con la que se manifiestan y por los índices morbilidad tan altos que presenta. Se sabe, que un tercio de las visitas a las consultas de atención primaria son por procesos infecciosos y de estos, aproximadamente el 10% son por IsTU (Moreno *et al.*, 2006). La incidencia del proceso se incrementa por dos situaciones principales una de ellas es el hecho de que un número elevado de individuos con IsTU se automedican, y la otra porque en los casos de pacientes que acuden a las urgencias hospitalarias o al médico privado no siempre se hace el reporte epidemiológico.

Los datos de la Dirección General de Epidemiología (DGEPI, 2016), refieren que en los últimos 10 años las IsTU ocupan el tercer lugar dentro de las 20 principales causas de morbilidad en nuestro país y muestran a éstas como una de las causas de enfermedades infecciosas con incidencia anual superior a los 4000,000 de casos con predominio en las mujeres (70%). En México los datos al respecto son acotados, sin embargo, a nivel mundial se estima que se presentan alrededor de 150 millones de casos de IsTU al año. Ante tal situación se puede identificar que las IsTU representan un alto costo al sector salud y sus repercusiones incrementan el gasto que se tiene que hacer para atender las complicaciones secundarias a una IsTU.

Por sus características las infecciones en el tracto urinario se clasifican en complicadas y no complicadas, las primeras se presentan en pacientes con

anormalidades funcionales o estructurales en el tracto genitourinario o en individuos que presentan la infección secundaria a una enfermedad previa o en aquellos con compromiso inmunológico. Los factores del hospedero que predisponen a su desarrollo son el género (más frecuentes en mujeres), la edad, enfermedades como la diabetes mellitus, cateterización, comorbilidades y lesiones en la médula espinal (Moura *et al.*, 2009). Las no complicadas son infecciones esporádicas que se presentan ocasionalmente y que responden bien al tratamiento por lo que remiten en poco tiempo.

Con respecto a su localización se definen como de vías bajas que se caracterizan por la colonización bacteriana a nivel de uretra y vejiga. Normalmente se relacionan con la presencia de síntomas y signos urinarios, como es la urgencia para orinar, disuria, poliuriuria, turbidez y olor fétido de la orina. Las infecciones de este tipo por su localización incluyen a la cistitis y la uretritis (Anderson *et al.*, 2004).

Por otro lado, las que afectan el tracto urinario superior además de presentar signos y síntomas de ISTU baja, presentan un cuadro sistémico con síntomas que incluyen escalofríos, fiebre, dolor lumbar, náusea y vómito. En general se deben a la colonización bacteriana a nivel uretral y del parénquima renal, en este grupo el cuadro típico es la pielonefritis (Anderson *et al.*, 2004).

Con respecto a la evolución del cuadro clínico las infecciones se describen como agudas y crónicas, a su vez estas últimas se definen como recurrentes y persistentes. Las infecciones agudas son aquellas que se presentan como un evento aislado y el asentamiento de la infección es rápido. Las infecciones crónicas (ICTU), son aquellas que por múltiples factores se presentan en forma repetida observándose tres o más cuadros en el transcurso de un año. Para considerar que una infección es persistente, la etiología de la misma se relaciona con la participación del microorganismo que provocó la primera infección. Por otro lado, la etiología de las infecciones recurrentes se asocia con un microorganismo diferente en cada episodio que se presenta.

Las ISTU se pueden observar en cualquier edad, aunque, con una mayor prevalencia en adolescentes y adultos jóvenes entre 15 y 45 años, también son las infecciones bacterianas más comunes en la población adulta (Mellata *et al.*, 2010). Su importancia además se magnifica debido a que se constituyen como la tercera causa más frecuente entre las enfermedades infecciosas.

En las primeras etapas de la vida en los recién nacidos y lactantes la frecuencia es más alta en los varones, sin embargo, conforme pasa la edad por la naturaleza anatómica de la mujer el problema es más común en este grupo. Aspectos como la relación anatómica entre el ano y la abertura uretral, alteraciones hormonales o por los cambios en la microbiota genital, son elementos que hacen más susceptibles a las mujeres. De ahí que las ISTU pueden considerarse como un problema de género ya que afecta a casi el 70% de las mujeres (Mobley, 2007; Moura *et al.*, 2009).

Los factores de riesgo asociados a la infección no complicada del tracto urinario son cambiantes y dependen fundamentalmente de la edad, de los hábitos de higiene, de las condiciones fisiológicas y anatómicas del tracto urinario. Se calcula que el 60% de las mujeres adultas tendrá al menos un episodio de ISTU en su vida (Alós *et al.*, 2005).

Considerando todas las ISTU, las que afectan a las vías bajas son las de mayor incidencia (80%), la cistitis es la más frecuente en la mujer y la prostatitis en el hombre. Se calcula que una de cada tres mujeres padecerá como mínimo un episodio de ISTU baja en el curso de su vida y con mayor probabilidad entre los 25 y 44 años (Chung, 2010). Además de su alta incidencia estas infecciones son importantes por su prevalencia, puesto que la infección urinaria persiste por fallas en el diagnóstico y de manera consecuente en su tratamiento lo que complica su buena evolución y a su vez puede conducir a la aparición de pielonefritis e incluso a una insuficiencia renal crónica.



### ❖ Etiología

La etiología de los casos de IsTU ambulatorias e intrahospitalarias es de origen bacteriano en 95-98%, las restantes se relacionan con hongos, las de etiología micótica se incrementan en pacientes instrumentados, trasplantados o con intenso tratamiento antibacteriano (Castro, 2014). Los microorganismos asociados con estos procesos infecciosos son en su mayoría bacilos gramnegativos, y de estos *Escherichia coli* es el patógeno más común con una frecuencia de 70% al 95% de los casos.

*E. coli* es una bacteria con la habilidad de colonizar y persistir en el tracto gastrointestinal del humano a partir de las primeras horas después del nacimiento, posteriormente se puede adquirir por agua, alimentos o por otros vehículos transmisores como fómites o animales incluido el humano. Esta bacteria forma parte importante de la microbiota del intestino ya que establece una relación de mutuo beneficio con su hospedero, proporcionando las vitaminas necesarias (como las del complejo K y B), promoviendo la homeostasis gastrointestinal y protegiendo el intestino de patógenos (Travis, 2008, Bien, 2012). Se adhiere al moco que recubre el intestino grueso y una vez establecida puede persistir indefinidamente, sin embargo y no obstante ser una bacteria importante en la microbiota, solo constituye aproximadamente el 0.1 % de la población total de la microbiota intestinal (Rodríguez-Ángeles, 2002). Las cepas de UPEC que al parecer no causan problemas en el intestino, son responsables de causar enfermedad cuando se les da acceso a nichos alternativos como el tracto urinario o el torrente sanguíneo. Las cepas de UPEC que se originan en el intestino son probablemente la causa principal de las infecciones urinarias de tránsito, pero los factores que promueven la aptitud de UPEC dentro del tracto intestinal apenas comienzan a salir a la luz (Russell y Mulvey, 2015).

Las cepas UPEC pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*, tribu *Escherichia*, es un bacilo gramnegativo, móvil (debido a la presencia de flagelos peritricos), de 1-3  $\mu\text{m}$  de largo por 1-1.5 $\mu\text{m}$  de ancho. Es una bacteria anaerobia facultativa, frecuentemente presenta una cápsula, por lo que algunas cepas forman colonias mucoides, no forma esporas (Rodríguez-Ángeles, 2002). La bacteria se cultiva con

facilidad a partir de muestras biológicas, en medios como el Agar MacConkey en el que forma colonias de 2-3 mm de diámetro, de color rosa suave, redondas, lisas y con bordes regulares.

Para su identificación, se analizan sus características metabólicas mediante el empleo de diferentes sustratos que se conocen como pruebas bioquímicas. Algunas de estas pruebas que permiten diferenciar a *E. coli* de otras enterobacterias son el Indol (+), Citrato de Simmons (-) y Ureasa (-).

Esta bacteria se utiliza como indicador de contaminación fecal ya que puede sobrevivir algunos días en el agua y los alimentos, y de ahí ser adquirido por el hombre y o animales sus principales reservorios. Es un microorganismo que ha adquirido importancia científica, económica y médica; *E. coli* se utiliza como microorganismo vector de diferentes genes lo que ha permitido conocer la actividad biológica de otros microorganismos. En el ámbito médico, tiene gran relevancia como patógeno asociado a diferentes padecimientos como es el caso de las IsTU (Rodríguez-Ángeles, 2002).

*Escherichia coli* es un microorganismo que, en su proceso evolutivo, ha dado lugar a la emergencia de diferentes grupos clónales que en la actualidad se clasifican en comensales (aquellos que forman parte de la microbiota intestinal) y los que causan enfermedad.

Con el propósito de ubicar a las variedades patógenas de *E. coli*, éstas se han incluido en ocho grupos patógenos o patotipos (Cuadro 1), que pueden colonizar estructuras fuera del intestino por lo que se han denominado *E. coli* extraintestinales (ExPEC) e incluye las cepas de UPEC y las que producen meningitis neonatal (NMEC). Con relación a las variedades que afectan el tracto digestivo, se han reportado seis variedades que se conocen como *E. coli* productoras de diarrea (DEC por sus siglas en inglés). Las cepas DEC se clasifican de acuerdo con su mecanismo de patogenicidad y al cuadro clínico que

producen integrando los patotipos: *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) y *E. coli* de adherencia difusa (DAEC) (Kaper *et al.*, 2004).

<b>Cuadro 1. Grupos patógenos de <i>Escherichia coli</i></b>	
<b><i>Escherichia coli</i> que causa diarrea (DEC)</b>	<b><i>Escherichia coli</i> que produce infecciones extraintestinales (ExPEC)</b>
<i>Escherichia coli</i> enteropatógena (EPEC)	<i>Escherichia coli</i> Uropatógena (UPEC)
<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica (ETEC)	
<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (EHEC)	<i>Escherichia coli</i> que causa meningitis (NMEC)
<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva (EIEC)	
<i>Escherichia coli</i> con adherencia difusa (DAEC)	
<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa (EAEC)	
<i>Escherichia coli</i> enteroagregativohemorrágica (EAHEC)	

#### ❖ ***Escherichia coli* uropatógena (UPEC)**

La invasión del aparato urinario sano está restringida a un grupo de microorganismos, conocidos como "uropatógenos" que son capaces de sobrepasar o minimizar los mecanismos de defensa del huésped. Un procedimiento que permitió identificar los grupos patógenos de *E. coli* fue el empleo de la tipificación por sueros. Para dicho propósito se analiza la presencia de los antígenos de superficie, somáticos (O), capsulares (K) y flagelares (H). En 1940 Kauffman desarrolló un esquema de serotipificación en el que inicialmente analizaba el antígeno somático, de este en la actualidad se han reportado 186 variedades. Con relación al antígeno K se han descrito 60 diferentes y del flagelar 75 (Orskov y Orskov, 1984). El antígeno O se caracteriza por ser termoestable,

además de que es con éste que se define el serogrupo de la bacteria, el antígeno flagelar constituido por la flagelina es de composición proteica y por ende son termolábiles. La identificación de los antígenos somático y flagelar permite definir el serotipo (formula O:H) de una cepa, el cual en ocasiones se asocia con un cuadro clínico en particular. Los serogrupos O más comunes que se asocian a las cepas UPEC son O1, O2, O4, O6, O7, O8, O16, O18, O22, O25 y O75 (Orskov y Orskov, 1984).

#### ❖ **Patogénesis de las cepas UPEC**

Se ha identificado en las cepas UPEC alta preferencia y potencial de adherencia a las células constitutivas del epitelio vaginal y urinario (Duplessis, 2011).

La infección en una ISTU comienza con la contaminación de la uretra con cepas UPEC, una vez en el interior del tracto urinario, la bacteria coloniza la vejiga causando cistitis, pero también puede ascender a través de los uréteres hasta los riñones y ocasionar pielonefritis.

Se cree que el sesgo de género observado en la epidemiología de las ISTU es en gran parte atribuible a las diferencias anatómicas en los tractos genitourinarios masculino y femenino (Dielubanza y Schaeffer 2011). Específicamente, las mujeres poseen una uretra significativamente más corta que los hombres, lo que reduce considerablemente la distancia que los microorganismos deben viajar desde la abertura de la uretra para establecer una infección dentro de la vejiga. Además, las mujeres pueden albergar UPEC dentro de la vagina, que puede contaminarse con uropatógenos a través del contacto con materia fecal o, en algunos casos, a través de interacciones sexuales.

Al transcurrir de 4 a 24 horas después de iniciar la infección en la vejiga se induce la expresión de fimbrias tipo 1 que reconoce la manosa de los receptores de la uroplaquina que cubre el epitelio de transición. Se conoce que en las cepas de UPEC la adherencia a células uroepiteliales es un paso fundamental para el desarrollo de las ISTU.

Al colonizar el epitelio las cepas UPEC pueden resistir el vaciado de la orina y promueven la invasión de las células uroteliales, también conduce a la inducción

de apoptosis y exfoliación celular. Por otro lado, dependiendo de la presencia o ausencia de este tipo de adhesinas será la capacidad que tendrá la cepa para colonizar los diferentes sitios del tracto urinario. Además, algunas cepas son capaces de colonizar el epitelio formando biofilm, este consiste en agrupamientos de bacterias encerradas dentro de una matriz extracelular compleja que puede incluir proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos que actúa como un reservorio que se relaciona con las infecciones recurrentes.

Luego del ingreso de la bacteria a las células de la vejiga del huésped, estas enfrentan uno de los tres destinos: (1) pueden devolverse rápidamente al entorno extracelular, (2) pueden entrar en un estado de reposo no replicante, o (3) pueden multiplicarse, formando grandes comunidades bacterianas intracelulares (IBC) (Mulvey *et al.*, 2001; Anderson *et al.*, 2003). Las células paraguas superficiales de la vejiga son los objetivos iniciales de la invasión de las células huésped por parte de la UPEC, pero la exfoliación de estas células y la afluencia de neutrófilos durante el curso de las ISTU pueden proporcionar a la UPEC acceso a capas más profundas de células huésped inmaduras dentro del urotelio (Mulvey *et al.*, 2001; Anderson *et al.*, 2003).

#### ❖ Factores de virulencia

Los factores llamados de virulencia permiten al microorganismo atacar, invadir, encontrar nutrientes e inclusive eludir al sistema inmune (Duplessis, 2011). Un establecimiento exitoso de la infección bacteriana necesita de la adhesión a las células huésped, la colonización de los tejidos y en ciertos casos, la invasión celular, seguida de la multiplicación intracelular, la difusión a otros tejidos, y/o la persistencia bacteriana lo que conduce a síntomas secundarios y a la respuesta inflamatoria (Chung, 2010; Bien, 2012).

Los genes responsables de la expresión de los factores de virulencia que caracterizan a UPEC no se encuentran aislados en el cromosoma bacteriano, sino agrupados en fragmentos de ADN muy particulares denominados “Islas de Patogenicidad” o PAIs (Andreu-Domingo, 2005), normalmente estas regiones de

ADN exhiben un alto grado de diversidad genética, debido a que poseen genes especializados (Bauer, 2002).

Las PAIs son grandes bloques (mayores a 0.30 kb) de ADN insertados dentro o cerca de los genes del ARNt, contienen repeticiones directas y secuencias de inserción, por lo que tienen un gran porcentaje de GC que difiere del resto del genoma, codifican y definen los determinantes de virulencia, razón por la que tales secuencias están muy extendidas entre las cepas uropatógenas. Se conoce que las PAIs se forman de los mecanismos de transferencia horizontal de genes que se da por elementos móviles como transposones, plásmidos y fagos, todos estos elementos contribuyen a la creación de nuevos patotipos mucho más eficientes para provocar infecciones (Oelschlaeger, 2002).

Entre los factores específicos de virulencia de UPEC se ha reportado su capacidad para adherirse a las células del epitelio uretral por medio de fimbrias (de tipo 1), y proteínas de membrana externa (*omp*). Los factores de virulencia de superficie incluyen un número de diferentes tipos de organelos de adhesión, principalmente de naturaleza fimbrial (Bartková, 1994).

Estas fimbrias, también llamadas Pili son estructuras en forma de varilla de 5-10 nm de diámetro que son distintos de los flagelos (Kaper *et al.*, 2004), se unen a glicoproteínas en el uroepitelio a través de sitios conocidos como adhesinas, que promueven la unión bacteriana a los tejidos del huésped en el tracto urinario. Esta unión permite a las UPEC evitar ser arrastradas por la orina mientras ésta pasa por el sistema urinario. La fimbria tipo 1 consiste en subunidades repetidas de *fimA*, junto con una estructura fimbrial que contiene la adhesina *fimH* y dos proteínas adaptadoras *fimF* y *fimG*. El receptáculo de unión a carbohidratos localizados en la parte final del dominio de la adhesina interviene en las interacciones de la bacteria con una variante que tiene receptores para la glicoproteína que contiene manosa expresada por un gran número de células del hospedero.

Alrededor del 70% de los aislamientos de UPEC tiene variantes con mutaciones que mejoran la afinidad por residuos de monomanosa, además de los receptores

de trimanosa (Emody *et al.*, 2003). El fenotipo de unión a manosa prevalente en los aislamientos de UPEC confiere un gran tropismo para receptores de glicoproteínas (Antao *et al.*, 2009) expresados por células uroepiteliales y mejoran la colonización bacteriana al tracto urinario. La interacción bacteriana mediada por *fimH* hacia las células epiteliales es crítica para la habilidad de UPEC de colonizar la vejiga y causar enfermedad (Bower *et al.*, 2005).

La fimbria P es el segundo factor de virulencia más común que cumple un papel importante en las ISTU ascendentes y la pielonefritis y son responsables de la adhesión en la mucosa. De las fimbrias P se sabe que contribuyen a la patogénesis fomentando la colonización bacteriana de los tejidos uroepiteliales y a la estimulación de una respuesta inflamatoria perjudicial para el huésped (Ribeiro, 2008).

La fimbria P está formada de fibras héteropoliméricas compuesta por diferentes subunidades proteicas. El contacto molecular entre la superficie de la mucosa y el lipopolisacárido (LPS) induce la señalización transmembrana independiente y la activación de las células epiteliales (Emödy, 2003). Las fimbrias P se expresan in vivo dentro del tracto urinario durante la infección.

Yun *et al.*, (2012), reportaron que los genes relacionados con la adherencia (*iha* y *papG*) y los relacionados con la captación de hierro (*fyuA*, *irp-2*, *iucC*, e *iutA*), mostraron prevalencia significativa en las cepas persistentes. Estos datos son también de gran importancia, ya que confirman que las cepas responsables de las infecciones persistentes y las respectivas asociadas con reinfecciones, son clones diferentes, pero con genes relacionados con la virulencia.

En estas cepas además se ha identificado que elaboran toxinas como la alfa-hemolisina y las serina proteasas Pic y Sat. Además, presentan sistemas para captación de hierro (aerobactinas) y enzimas para su metabolismo, todos ellos componentes que contribuyen para que la bacteria pueda colonizar áreas estériles del hospedero (Ejrnæs, 2011).

Uno de los factores más importantes relacionados con la virulencia de UPEC después de las adhesinas es la  $\alpha$ -hemolisina una toxina formadora de poros. El espectro de células susceptibles a esta toxina es muy amplio, incluye no solo a los eritrocitos, también leucocitos, células renales epiteliales y endoteliales, lo que confirma la nefropatogenicidad de la  $\alpha$ -hemolisina.

El crecimiento bacteriano requiere de una concentración citoplasmática de hierro de  $\sim 10^{-6}$  M, por tal motivo la obtención de hierro es necesaria para la colonización del tracto urinario.

UPEC tiene distintas estrategias para la obtención de hierro mediante sistemas de adquisición de hierro del ambiente (sideróforos), que no son sintetizados por la mayoría de las cepas (Rowe *et al.*, 2010). Los sideróforos son secretados como moléculas de bajo peso molecular de alta afinidad por el hierro ( $\text{Fe}^{+3}$ ). Este elemento es insoluble como catión libre y se encuentra limitado en el tracto urinario siendo el factor limitante para el crecimiento de la mayoría de los microorganismos, por tal motivo UPEC necesita contar con un mecanismo eficiente de adquisición de hierro para su supervivencia, uno de estos mecanismos es el sistema yersiniabactina, donde el gen *fyuA* es uno de los genes reguladores de la producción del biofilm (Hancock *et al.*, 2008). Se ha encontrado que *fyuA* tiene una gran importancia en la producción del biofilm en ambientes pobres de hierro. El gen *iutA* codifica para un receptor de hierro de la membrana externa o aerobactina (Rowe *et al.*, 2010).

Otro componente importante para la virulencia de UPEC son las toxinas Sat y Pic, que utilizan el sistema de secreción tipo V para salir del espacio periplásmico de la bacteria, se ha reportado que las cepas UPEC que expresan estas toxinas se asocian con cuadros de pielonefritis ya que tienen una actividad tóxica agresiva frente a las células de la vejiga y el riñón (Clarke *et al.*, 2001).



### ❖ Filogenia

La filogenia y la virulencia de un microorganismo condicionan en gran medida su potencial para establecer una infección. No todas las cepas de *E. coli* poseen la misma capacidad para infectar el aparato urinario. El origen filogenético y sus atributos de virulencia son las características que diferencian las cepas de *E. coli* extraintestinales patógenas de las comensales.

Las cepas de *E. coli* se dividen en 4 principales grupos filogenéticos; A, B1, B2 y D, UPEC es una bacteria del grupo de extraintestinales que se ubica en los grupos filogenéticos B2 y en menor medida al grupo D, mientras que las cepas comensales están dentro de los grupos filogenéticos A y B1 (Clermont, 2000; Mulvey, 2001; Johnson y Stell, 2000; Moreno *et al.*, 2006; Moreno *et al.*, 2008). Clermont diseñó un procedimiento de PCR multiplex que permite identificar el grupo filogenético en el que se integran las cepas de *E. coli*. El método se basa en la detección de *chuA*, *yjaA* y un fragmento de ADN designado TSPE4. C2 (Cuadro 2).

<i>chuA</i>	<i>yjaA</i>	TSPE4. C2	Grupo Filogenético
+	+	+/-	B2
+	-	+/-	D
-	+/-	+	B1
-	+/-	-	A

+ Presencia; - Ausencia; +/- Puede o no presentarlo

### ❖ Tratamiento

A pesar de que los síntomas clínicos de las infecciones urinarias se han mejorado con numerosos antibióticos, la eficiencia del tratamiento de las IsTU depende de la identificación y el patrón de resistencia antimicrobiana de los patógenos responsables (Blango y Mulvey, 2010).

El tratamiento de las IsTU varía de acuerdo a la edad del paciente, sexo, patógeno responsable, curso de la enfermedad y el área anatómica del tracto urinario

involucrada. Debido a un tratamiento inadecuado de las ISTU se promueve la selección de cepas resistentes a los antibióticos, por lo que en México y en otras partes del mundo se ha complicado el manejo del padecimiento (Johnson y Stell, 2000). En la actualidad para controlar la infección, se considera que lo que más benéfico para los pacientes es indicar un antibiótico potente durante el período más breve de tiempo. Es por ello, que para emplear un antibiótico como tratamiento, se debe definir que el punto de corte de resistencia de una cepa sea igual o menor a 20% con base en las guías de tratamiento de la IDSA (Infectious Diseases Society of America) (Gupta *et al.*, 2010).

Los tratamientos que generalmente se utilizan incluyen antibióticos  $\beta$ -lactámicos, como la Amoxicilina/Ácido clavulánico, Cefalosporinas de segunda y tercera generación, además de los inhibidores de los folatos como Trimetoprim/sulfametoxazol (Johnson *et al.*, 2000). Sin embargo, cada vez es más común enfrentarse a una mayor cantidad de aislamientos resistentes a este y otro tipo de antimicrobianos.

En los niños, no se recomiendan tratamientos de corta duración y este debe mantenerse entre 7 y 10 días. Para el caso de *E. coli* por su alta resistencia a antibióticos como Ampicilina y Trimetoprim, se recomienda Cefitibuten (a dosis de 9 mg por kg de peso por día) o Cefixime (a dosis de 10 mg por kg de peso por día), durante 7 días en pacientes menores de 2 años con ISTU.

En la población adulta, la elección del antibiótico se basa, sobre todo, en las tasas de resistencia que se reportan de los aislamientos en la comunidad. En los últimos años se ha observado un incremento importante en la resistencia de *E. coli* para Ampicilina, Amoxicilina, Trimetoprim/sulfametoxazol y Quinolonas (en las que se incluye el Ácido nalidíxico). Por esto, se sugiere el manejo con Nitrofurantoína o Cefalosporinas de segunda y tercera generación, ya que son seguras y bien toleradas (Guajardo-Lara *et al.*, 2009; Chávez-Valencia *et al.*, 2010).

La Organización Mundial de la Salud (OMS), considera que el uso abusivo de los antimicrobianos es una de las principales causas relacionadas con el incremento

de la resistencia bacteriana, lo que a su vez se ha constituido como un importante problema de salud pública (Mulvey, 2001).

La resistencia bacteriana puede deberse a cambios en el genoma bacteriano producido por una mutación o por resistencia adquirida por transferencia horizontal de un plásmido o de una isla genómica (Moura *et al.*, 2009).

Los mecanismos de resistencia de las bacterias a los antimicrobianos son diversos, algunos de ellos incluyen la producción de enzimas como las  $\beta$ -lactamasas que inhiben la síntesis de la pared bacteriana. Por otro lado, las proteínas de unión de penicilinas (PBP por sus siglas en inglés) contribuyen a la inactivación de la enzima, pero también actúan activando la autolisina bacteriana endógena que destruye el peptidoglicano.

Las bacterias gramnegativas son resistentes a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos mediante el desarrollo de barreras de permeabilidad, esto inducido por porinas alteradas en la membrana externa lo que dificulta la entrada y el tránsito de las moléculas del antibiótico al interior de la bacteria.

La frecuencia de resistencia a los antimicrobianos de uso común en los microorganismos causantes de IsTU varía de país en país. Por ejemplo, la resistencia a Ampicilina entre uropatógenos en todo el mundo varía desde un mínimo del 33% en Quebec, Canadá hasta casi 80% en México. (Alós *et al.*, 2005). Sucede algo similar con otros antimicrobianos, como el Trimetoprim la frecuencia de cepas resistentes va del 9% en Quebec al 61% en México; con la Ciprofloxacina es de 0% en Canadá de 5% a 10% en los Estados Unidos y de 72% en México (Zhanel *et al.*, 2005). Estas diferencias dependen del país en el uso de los antimicrobianos, tanto para tratamiento, como en su empleo en animales, sin embargo, el problema de multi-resistencia sigue creciendo por lo que deben implementarse estrategias que sean más efectivas.

Se han tratado de buscar alternativas que ayuden a controlar la expansión del problema de resistencia a los antimicrobianos, una de estas es dejar de utilizar los antimicrobianos para promover la disminución de las mutantes resistentes. En este

sentido en un estudio en Suecia se restringió en un hospital, el uso de inhibidores de folatos (Trimetoprim/sulfametoxazol) durante 24 meses. El resultado mostró que las cepas de *E. coli* aisladas de pacientes que anteriormente eran resistentes a dicho antimicrobiano, fueron nuevamente sensibles. Sin embargo, la implementación del tratamiento de ISTU con los inhibidores de folatos, dio lugar a la reemergencia de cepas resistentes.

En el sentido más estricto, se define a los organismos multidrogo resistentes (MDR) a aquellos que no son susceptibles a al menos un integrante de tres o más categorías de antimicrobianos, después de haber evaluado la resistencia *in vitro* a más de un agente antimicrobiano. Organismos extremadamente-drogo resistentes (XDR), se define como la resistencia a múltiples antimicrobianos, o la susceptibilidad de los aislamientos bacterianos a sólo una o dos categorías de antimicrobianos. Por su parte los organismos pandrogo resistentes (PDR) están definidos como no susceptibles a cualquier agente en todas las categorías de antimicrobianos (es decir, ningún agente probado como susceptible para ese organismo). Un par de ejemplos de definiciones actuales son: "Resistentes a casi todos los antimicrobianos disponibles comercialmente", "Resistente a todos los antimicrobianos probados rutinariamente" (Magiorakos *et al.*, 2012).

- **ANTECEDENTES**

Las infecciones del tracto urinario (IsTU) son un importante problema de salud pública que afecta preferentemente a las mujeres, ocupa el tercer lugar entre las 20 principales causas de enfermedad en nuestro país. Aunque, en México no existen datos al respecto, en países como los Estados Unidos se considera como uno de los problemas de salud de alto costo (Fronzes, 2008).

*E. coli* es el principal agente patógeno relacionado con las IsTU y las cepas involucradas con el padecimiento se les ha denominado Uropatógena (UPEC). Las cepas UPEC se incluyen dentro de ciertos tipos antigénicos (serogrupos) y en éstas se ha identificado que presentan diferentes propiedades que se relacionan con su virulencia (Johnson y Stell, 2000).

Paniagua *et al.*, (2015) realizaron un estudio con 321 muestras de orina, de las cuales 194 fueron identificadas como *E.coli*. Los serogrupos O25, O15, O8 y O75 estuvieron presentes en el 20.6%, 17%, 6.1% y 4.6% respectivamente. En estas cepas *kpsMT* (92.2%) e *irp-2* (79.3%) fueron los genes que se identificaron con mayor frecuencia.

Resultados similares fueron observados por Abe *et al.*, (2008), quienes en un estudio en Brasil con 225 cepas UPEC aisladas de pacientes con IsTU identificaron *irp-2* en 69.9% de los cultivos analizados.

Existen diferentes estudios que refieren el impacto clínico, epidemiológico y económico de las IsTU. Al respecto Santana Mera (2010), realizó un trabajo dirigido a conocer los perfiles de resistencia bacteriana en pacientes embarazadas y hospitalizadas con infecciones del tracto urinario, en el mismo encontró que *Escherichia coli* era la bacteria más común en las IsTU y que un aspecto relevante consistía en la presencia de una alta tasa de resistencia a diferentes antimicrobianos (Ampicilina, Fosfomicina, Gentamicina, Amoxicilina, Cefotaxima, Amoxicilina/ácido clavulánico, Trimetoprim/sulfametoxazol, etc.), hecho que indiscutiblemente contribuye a que este tipo de padecimientos adquiera mayor relevancia.

En un estudio con 1,685 pacientes ambulatorios de la Ciudad de México se identificó en 257 (15.3%) muestras (215 mujeres y 42 hombres), la presencia de *Escherichia coli* en 203 (79%) aislamientos. El estudio sobre la sensibilidad a los antimicrobianos mostró resistencia a Ampicilina (68.4%), Amoxicilina/ácido clavulánico (19.5%), Ciprofloxacina (36.3%), Cefalotina (64.7%), Ceftriaxona (12.2%) Cefuroxima (18.7%), Nitrofurantoína (19%), Trimetoprim/sulfametoxazol (53.4%), Gentamicina (18.9%) y Fosfomicina/trometamina, 0.8% (Arreguín *et al.*, 2007).

Posteriormente un reporte de Moura *et al.*, (2009) en individuos con diagnóstico de IsTU en un periodo de tres meses (Noviembre y Diciembre del 2007 y Enero del 2008), identificaron *E. coli* (24.7%) como el patógeno más frecuente con resistencia a Ciprofloxacino (26%), Amikacina (85%) y Nitrofurantoina (80%).

- **JUSTIFICACIÓN**

Las infecciones del tracto urinario (IsTU) se ubican entre las 20 principales causas de enfermedad y ocupan el tercer lugar entre las de tipo infeccioso, solo un poco después de las infecciones respiratorias. *Escherichia coli* es uno de los microorganismos integrantes de la biota del intestino, sin embargo, en su proceso evolutivo se ha diversificado y han surgido diferentes clonas virulentas que pueden producir infecciones extraintestinales (ExIEC) incluidas las IsTU.

*E. coli* es el principal agente patógeno asociado con las IsTU, el padecimiento se puede considerar como un problema de género ya que las mujeres son la población más afectada. La mayoría de los estudios sobre IsTU analizan muestras aisladas y son pocos los trabajos que realizan un seguimiento de los pacientes, lo anterior principalmente por el costo. Sin embargo, es importante conocer si las IsTU son un problema de recurrencia o de persistencia ya que esto permitirá hacer un mejor manejo del problema.

De tal forma que resulta de gran relevancia realizar un estudio sobre infección crónica del tracto urinario (ICTU), en el cual se haga el seguimiento de los pacientes con el que se logre definir las características del padecimiento, es decir si es un problema de recurrencia o persistencia, lo cual se podrá identificar con la caracterización de cada aislado del paciente identificando los elementos involucrados en la virulencia (genes) y la resistencia a los antimicrobianos entre otros.

Por lo ya expuesto es que consideramos importante conocer las características antigénicas, de virulencia y la resistencia a los antimicrobianos de las cepas de *E. coli* asociadas con ICTU, para conocer su distribución y entender si las infecciones son recurrentes (reinfección) o persistentes.

- **OBJETIVOS**

- ❖ **Objetivo General**

- Realizar la caracterización de cepas UPEC aisladas de pacientes con ICTU por procedimientos fenotípicos de tipificación con sueros y resistencia a los antimicrobianos y genotípica por métodos moleculares con respecto a la presencia de genes de virulencia y ubicación filogenética.

- ❖ **Objetivos Particulares**

- ✚ Recuperar del cepario de la Unidad de Investigación Básica Clínica en Enfermedades Infecciosas (UIBCEI) cepas aisladas de pacientes con ICTU.
    - ✚ Identificar el serotipo de los aislamientos de *E. coli*.
    - ✚ Conocer los grupos filogenéticos a los que pertenecen las cepas de *E. coli* en estudio.
    - ✚ Identificar en las cepas en estudio los genes de virulencia más frecuentes en cepas UPEC.
    - ✚ Evaluar la sensibilidad a diferentes antimicrobianos de los aislamientos de *E. coli*.
    - ✚ Realizar la correlación entre serología, presencia de genes de virulencia, resistencia a antimicrobianos y la ubicación filogenética de las cepas UPEC incluidas en el estudio.



- **METODOLOGÍA**

- ❖ **Material Biológico**

Se analizaron 164 cepas de *Escherichia coli* aisladas de muestras de 13 niños y 5 adultos (1-3 cepas por paciente) con ICTU del Hospital Infantil de México “Federico Gómez”. Los pacientes forman parte del proyecto HIM/2014/022 SSA 1122 “Desarrollo de Autovacunas para el Tratamiento y Control de Infecciones Persistentes de Vías Urinarias”. Las cepas aisladas se mantuvieron en conservación en tubos de Gelosa, y por siembra en Agar Sangre se recuperaron para verificar su pureza, posteriormente se utilizaron para realizar los ensayos de caracterización.

- ❖ **Caracterización Fenotípica**

- Tipificación Antigénica**

La tipificación se realizó empleando sueros (**SERUNAM**) preparados en conejo, contra 187 antígenos somáticos de *E. coli* y 56 flagelares reportados hasta el momento, mediante el procedimiento de aglutinación por dilución en microplacas de 96 pozos.

- ❖ **Obtención del antígeno somático(O).**

Las cepas se resembraron en medio de agar soya tripticaseína (TSA) inclinado, se incubó a 37 °C por 24 h., el cultivo se recuperó adicionando solución salina al 9% hasta cubrir todo el pico de flauta dejando reposar por al menos 30 min. El sobrenadante de cada cepa se colocó en forma individual en tubos de ensaye de 16x150 y se llevó a la autoclave a 110°C por 1 hora (vapor fluente), posteriormente se les agregó formalina (9mL al 10%) para inactivar el cultivo y conservar la antigenicidad somática, después de ello se dejaron reposar 1 h.

❖ **Identificación del antígeno somático.**

En microplacas (3 por cepa) de 96 pozos con fondo en U se colocaron 50 µL de cada uno de los 187 (O1-O187) sueros anti-O de *E. coli* diluidos 1:100 y adicionalmente se incluyeron 46 sueros contra los antígenos de *Shigella* (15 de *S. disentería*, 13 de *S. flexneri*, 20 de *S. boydii* y 2 de *S. sonnei*), para ello se utilizó un dispensador automático. Posteriormente con pipeta multicanal (8 puntas), se agregaron a cada pozo 50 µL del antígeno previamente obtenido, las microplacas se sellaron e incubaron a 50°C por 18-24 h, al finalizar la incubación se registraron los resultados de aglutinación.

❖ **Obtención del antígeno flagelar (H).**

Las cepas se inocularon en tubos de 16x150 con tubos Craigies con medio semisólido y se dejaron incubar a 30°C con un intervalo de 1 a 14 días. Cuando en el medio semisólido se observó el crecimiento bacteriano, se procedió a inocular cada cultivo en Caldo biotriptasa y se incubó a 30°C durante 24 h. A cada tubo se le agregó formalina (9mL al 10%), para inactivar el cultivo y conservar la antigenicidad del flagelo, después de ello se dejaron reposar 1 h y se conservaron a 4°C hasta su empleo.

❖ **Identificación del antígeno flagelar.**

En 1 microplaca de 96 pozos y fondo en U se colocaron 50 µL de cada uno de los 56 sueros anti-antígeno H y 50 µL del antígeno, las placas se sellaron e incubaron a 50°C durante 2 h. Al final de la incubación se registraron las reacciones de aglutinación.

### ❖ Obtención del ADN bacteriano

El ADN de cada cepa en estudio se obtuvo por el método descrito en el manual de BIO-RAD InstaGene™ Matrix Catalogo # 732-6030, el material se conservó a -20°C hasta su utilización.

### ❖ Identificación de grupo filogenético

Para la identificación de los grupos filogenéticos se utilizó la cepa de referencia *E. coli* uropatógena CFT073 de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, por sus siglas en inglés). Se realizó la técnica de PCR múltiple de acuerdo a Clermont *et al.*, (2000) con los iniciadores reportados (Cuadro 3). La mezcla de amplificación se realizó en un volumen final de 30µl, compuesta por 12.5µl de Master Mix (2X) (ThermoScientific), 1µl de cada iniciador (30 pmol/µl), 3.5µl de agua inyectable y 8µl del ADN bacteriano. Las condiciones para la amplificación de fragmentos de PCR se muestran en la figura 1. Los resultados se interpretaron de acuerdo a la ausencia (-) o presencia (+) de los siguientes elementos: Filogrupogrupos A: *chuA* - y *TSPE4*. C2 -; B1: *chuA* - y *TSPE4*. C2 +; B2: *chuA* + y *yjaA* + y el filogrupos D: *chuA* + y *yjaA* -.

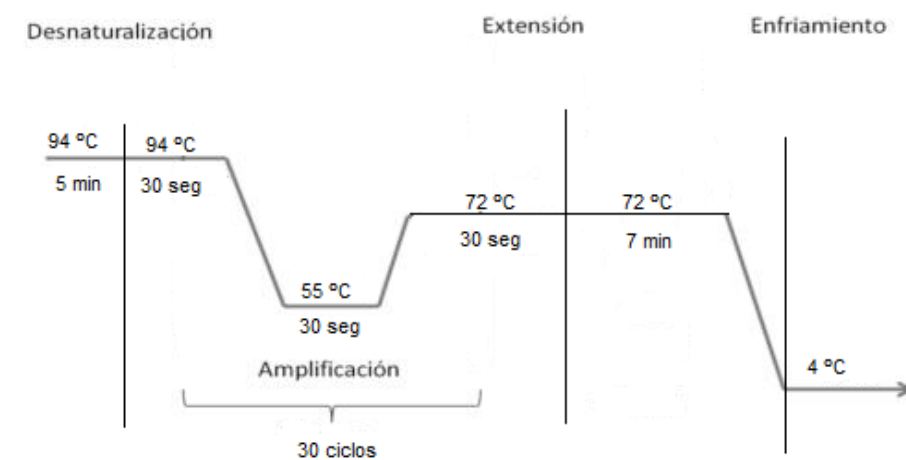


Figura 1. Condiciones para la amplificación de los genes *chuA*, *yjaA*, y *TSPE4*. C2.

### ❖ **Detección de genes de virulencia**

La detección de los genes se llevó a cabo por el método de PCR punto final descrito por Rodríguez-Siek *et al.*, (2005), utilizando diferentes iniciadores (Cuadro 3). La mezcla de amplificación se realizó en un volumen final de 10µl para cada uno de los genes (*papA*, *papC*, *fyuA*, *iroN*, *iutA* *ompT*, *sat*, *malX\_PA1*, e *ibeA*) y estuvo compuesta por 5µl de Master Mix (2X) (ThermoScientific), 0.4µl de cada iniciador (10 pmol/µl), 3.2µl de agua inyectable y 1µl del ADN bacteriano.

La detección de los genes *feoB*, *sitA*, *irp-2*, *kpsMT*, *fimH* e *ireA* se realizó en tres diferentes PCR multiplex con las siguientes mezclas de iniciadores: Mezcla 1 (*feoB* - *sitA*), Mezcla 2 (*fimH* - *ireA*) y Mezcla 3 (*irp-2* - *kpsMT*). La mezcla de amplificación se realizó en un volumen final de 20µl y estuvo compuesta por 10µl de Master Mix (2X) (ThermoScientific), 0.4µl de cada iniciador (10 pmol/µl), 6.4µl de agua inyectable y 2µl del ADN bacteriano.

La amplificación se realizó en un termociclador marca TECHNE modelo <sup>3</sup>Prime (U.K) de acuerdo a las condiciones de amplificación de cada fragmento (Cuadro 4). La cepa control *E. coli* uropatógena CFT073 se utilizó para los genes *fimH*, *papA*, *papC*, *fyuA*, *iroN*, *ireA*, *iutA*, *feoB*, *malX\_PA1* y *sat*. La cepa control APEC 1331 se utilizó para el gen *ibeA*. La cepa control APEC 1336 se utilizó para los genes *sitA*, *irp-2*, *kpsMT* y *ompT*.

Los amplicones obtenidos se separaron por electroforesis utilizando geles de agarosa al 1.5% (1.125 g de agarosa en 75 mL de tampón S.B [Sodio Borato] 1X), en el gel se utilizó un marcador de peso molecular de 100pb (Clever Scientific Ltd, CSL-MDNA-100BP, U.K). Para cada muestra se utilizaron 5 µL del producto amplificado más 1µL del buffer de carga (cyan/Orange Loading buffer, Invitrogene®) colocados en un pozo del gel. El gel se sometió a un campo eléctrico a 100 Volts durante 50 minutos, posteriormente para su observación se tiñó con Bromuro de Etidio (0.001%) y la visualización de los productos amplificados se realizó con un transiluminador de luz ultravioleta marca Cleaver Scientific TTD modelo OmniDoc Gel Documentation System (U.K).

En cada reacción de PCR se incluyeron los controles positivo y negativo para verificar la amplificación de los productos.

<b>Cuadro 3. Oligonucleótidos utilizados para la identificación de genes de <i>E. coli</i></b>			
<b>Genes</b>	<b>Secuencia de nucleótidos (5'-3')</b>	<b>Tamaño (pb)</b>	<b>Referencia</b>
<i>chuA</i>	F - GACGAACCAACGGTCAGGAT R - TGCCGCCAGTACCAAAGACA	279	Clermont <i>et al.</i> , 2000
<i>yjaA</i>	F - TGAAGTGTCAGGAGACGCTG R - ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC	211	
<i>TSPE4. C2</i>	F - GAGTAA TGTCGGGGCATTCA R - CGCGCCAACAAAGTATTACG	152	
<i>fimH</i>	F - TCGAGAACGGATAAGCCGTGG R - GCAGTCACCTGCCCTCCGGTA	508	Rodríguez-Siek <i>et al.</i> , 2005
<i>papA</i>	F - ATGGCAGTGGTGTGTTTGGTG R - CGTCCCACCATACGTGCTCTTC	717	
<i>papC</i>	F - GTGGCAGTATGAGTAATGACCGTTA R - ATATCCTTTCTGACGGGATGCAATA	205	
<i>fyuA</i>	F - TGATTAACCCCGCGACGGGAA R - CGCAGTAGGCACGATGTTGTA	787	
<i>iroN</i>	F - AAGTCAAAGCAGGGGTTGCCCG R - GACGCCGACATTAAGACGCAG	667	
<i>ireA</i>	F - AGGCAGGTGTGCCCGCGTAC R - CCAGGACTCACCTCACGAAT	254	
<i>iutA</i>	F - GGCTGGACATCATGGAACTGG R - CGTCGGGAACGGGTAGAATCG	302	
<i>feoB</i>	F - AATTGGCGTGCATGAAGATAACTG R - AGCTGGCGACCTGATAGAACAATG	470	
<i>sitA</i>	F - AGGGGGCACAACCTGATTCTCG R - TACCGGGCCGTTTTCTGTGC	608	
<i>irp-2</i>	F - AAGGATTCGCTGTTACCGGAC R - TCGTCGGGCAGCGTTTCTTCT	287	
<i>sat</i>	F- ACAGGATCCGCAAATATTGATATATCAAATGTATGG R - ACAGAATTCGTTGACCTCAGCAAGGAAG	387	
<i>kpsMT(K1)</i>	F - TAGCAAACGTTCTATTGGTGC	153	
<i>kpsMT II</i>	R - CATCCAGACGATAAGCATGAGCA	275	
<i>ompT</i>	F - ATCTAGCCGAAGAAGGAGGC R - CCCGGGTCATAGTGTTCATC	559	
<i>ibeA</i>	F - AGGCAGGTGTGCCCGCGTAC R - TGGTGCTCCGGCAAACCATGC	171	
<i>malX_PA1</i>	F - GGACATCCTGTTACAGCGCGCA R - TCGCCACCAATCACAGCCGAAC	925	

Cuadro 4. Temperaturas y tiempos de los PCR realizados						
Genes	Desnaturalización inicial (°C/min)	Desnaturalización (°C/s)	Alineación (°C/s)	Extensión (°C/s)	Extensión final (°C/min)	Ciclos*
<i>fimH – ireA</i>	96	96	63	72	72/8	30
<i>papA</i>	96	96	52	72	72/8	30
<i>papC</i>	96	96	52	72	72/8	30
<i>fyuA</i>	96	96	52	72	72/8	30
<i>iroN</i>	96	96	53	72	72/8	30
<i>iutA</i>	96	96	57	72	72/8	30
<i>feoB – sitA</i>	94	94	59	72	72/5	30
<i>irp-2 - kpsMT</i>	96	96	63	72	72/8	30
<i>sat</i>	95	95	55	72	72/7	25
<i>ompT</i>	96	96	51.6	72	72/8	30
<i>ibeA</i>	96	96	57	72	72/8	30
<i>malX_PA1</i>	96	96	57	72	72/8	30

\*Se refiere al número de ciclos de la PCR que incluye los segmentos de desnaturalización, alineación y extensión

#### ❖ Ensayo de susceptibilidad a antimicrobianos

La susceptibilidad a los antimicrobianos se evaluó por la prueba descrita por Kirby & Bauer, para ello se preparó una suspensión bacteriana en un tubo de ensayo con 3mL de caldo luria para cada cepa, el inóculo se ajustó al tubo 0.5 del nefelómetro en la escala de Mc Farland ( $1.5 \times 10^8$  UFC/mL). Se inocularon ocho cajas de agar Müller Hinton por cepa con el cultivo previamente ajustado utilizando un hisopo estéril. Por caja se colocaron 4 discos de antibióticos con al menos 22 mm de distancia entre ellos y 12 mm de distancia del borde de la caja. Se incubaron a 37°C por 24 h. Se evaluaron 33 antibióticos (Oxoid, U.K) de 14 familias (Cuadro 5), los resultados se interpretaron considerando el diámetro del halo de inhibición según los criterios del manual del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Edición 27 del año 2017, catalogándose como Susceptible (S), Intermedio (I) o Resistente(R).

<b>Cuadro 5. Patrones interpretativos del diámetro de la zona de inhibición para <i>Enterobacteriaceae</i>.</b>					
Antibiótico	Código	Concentración del disco	Diámetro interpretativo (mm)		
<b>PENICILINAS</b>			Resistente	Intermedio	Susceptible
Ampicilina	AMP	10 µg	≤13	14-16	17≥
Piperacilina	PRL	100 µg	≤17	18-20	21≥
Carbenicilina	CAR	100 µg	≤19	20-22	23≥
Mecilanam	MEL	10 µg	≤11	12-14	15≥
<b>Combinación de B-lactámicos/Inhibidores de B-lactamasas</b>					
Amox-ácido clavulanico	AMC	20-10 µg	≤13	14-17	18≥
Piperacilina-tazobactam	TZP	100-10 µg	≤17	18-20	21≥
<b>CEFALOSPORINAS</b>					
Cefozolina	KZ	30 µg	≤14	15-17	18≥
Cefalotin	KF	30 µg	≤14	15-17	18≥
Cefamandol	MA	30 µg	≤14	15-17	18≥
Cefepime	FEP	30 µg	≤14	15-17	18≥
Cefoperazona	CFP	75 µg	≤15	16-20	21≥
Cefoxitin	FOX	30 µg	≤14	15-17	18≥
Ceftriaxona	CRO	30 µg	≤13	14-20	21≥
Ceftazidime	CAZ	30 µg	≤14	15-17	18≥
Furoxime	CXM	30 µg	≤14	15-22	23≥
<b>CARBAPENEM</b>					
Meropenem	MEM	10 µg	≤13	14-15	16≥
<b>NITROFURANOS</b>					
Nitrofurantoina	F	300 µg	≤14	15-16	17≥
<b>MONOBACTÁMICOS</b>					
Aztreonam	ATM	30 µg	≤15	16-21	22≥
<b>AMINOGLUCOSIDOS</b>					
Gentamicina	CM	10 µg	≤12	13-14	15≥
Amikacina	KA	30 µg	≤14	15-16	17≥
Kanamicina	K	30 µg	≤13	14-17	18≥
Trobramicina	TOB	10 µg	≤12	13-14	15≥
Estreptomina	S	10 µg	≤11	12-14	15≥
<b>TETRACICLINAS</b>					
Tetraciclina	TE	30 µg	≤14	15-18	19≥
<b>FLUOROQUINOLONAS</b>					
Ciprofloxacina	CIP	5 µg	≤15	16-20	21≥
Norfloxacina	NOR	10 µg	≤12	13-16	17≥
<b>QUINOLONAS</b>					
Ácido nalidixico	NA	30 µg	≤13	14-18	19≥
<b>INHIBIDORES VIA DE FOLATOS</b>					
Trimetoprim-sulfametoxazol	STX	1.5/23.75 µg	≤10	11-15	16≥
Trimetoprim	W	5 µg	≤10	11-15	16≥
<b>SULFAS</b>					
Sulfonamidas	S3	250/300 µg	≤12	13-16	17≥
<b>ANFENICOL</b>					
Cloramfenicol	C	30 µg	≤12	13-17	18≥
<b>FOSFOMICINAS</b>					
Fosfomicina	FOS	200 µg	≤12	13-15	16≥
Fosfomicina trometamol	FOT	200 µg	≤12	13-15	16≥

Las cepas se clasificaron en MDR, XDR o PDR de acuerdo a los criterios de Magiorakos *et al.*, 2012

❖ **Prueba estadística**

Se utilizó una prueba exacta de Fisher para determinar la significancia estadística entre las asociaciones, un valor de  $p < 0.05$  se considera significativo. Todos los análisis estadísticos se calcularon utilizando el programa GraphPad Prism V.6.00 para Windows (<https://www.graphpad.com/quickcalcs/>).



- **RESULTADOS**

- ❖ **Tipificación por serología**

La caracterización antigénica de las cepas de *E. coli* reportó la presencia de 24 serogrupos y 36 serotipos (Cuadro 6). El serotipo O25:H4 fue el más común y se identificó en 43 (26%) de las 164 cepas estudiadas, otros serogrupos de las llamadas UPEC clásicas como O75 (12.8 %), O1 (6%) y O8 (4%) se identificaron con menor frecuencia.

<b>Cepas aisladas</b>	<b>Serogrupos</b>	<b>%</b>
48	O25	29.2
21	O75	12.8
21	OND	12.8
12	OR	7.3
10	O1	6
6	O8	3.6
4	O178	2.4
3	O73, O45, O164, O124, O170, O96, O12, O154, O4, O28ab, O9	1.8
2	O152, O17, O?	1.2
1	O18ac, O11, O102	0.6

- ❖ **Filogrupos**

El ensayo de PCR (Figura 2), para la identificación del grupo filogenético en el cual se incluyeron las 164 cepas analizadas, se observó que 95 (58%) se incluyeron en el grupo de extraintestinales 26 (16%) de ellas pertenecientes al grupo D y 69 (42%) al B2. Con relación a las cepas comensales se identificaron 68 (42%) de las cuales 16 (10%) fueron del filogrupo B1 y 52 (32%) del A (Figura 3). El análisis estadístico para conocer cuál de los dos grupos (Comensales v.s. Extraintestinales) era el más frecuente, mostró una mayor frecuencia de las extraintestinales con diferencia significativa de  $p = 0.028$ .

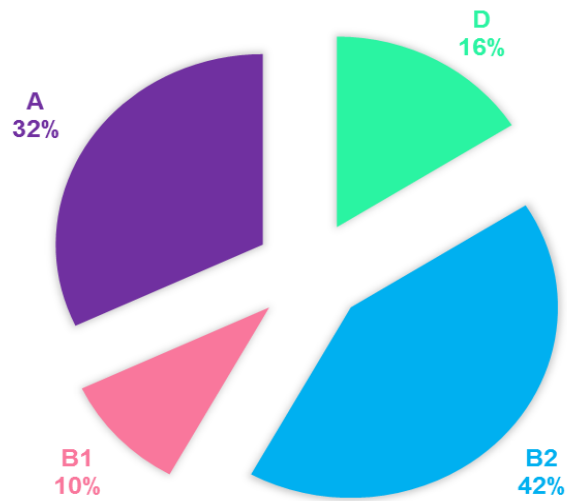


Figura 3. Grupos filogenéticos de cepas UPEC

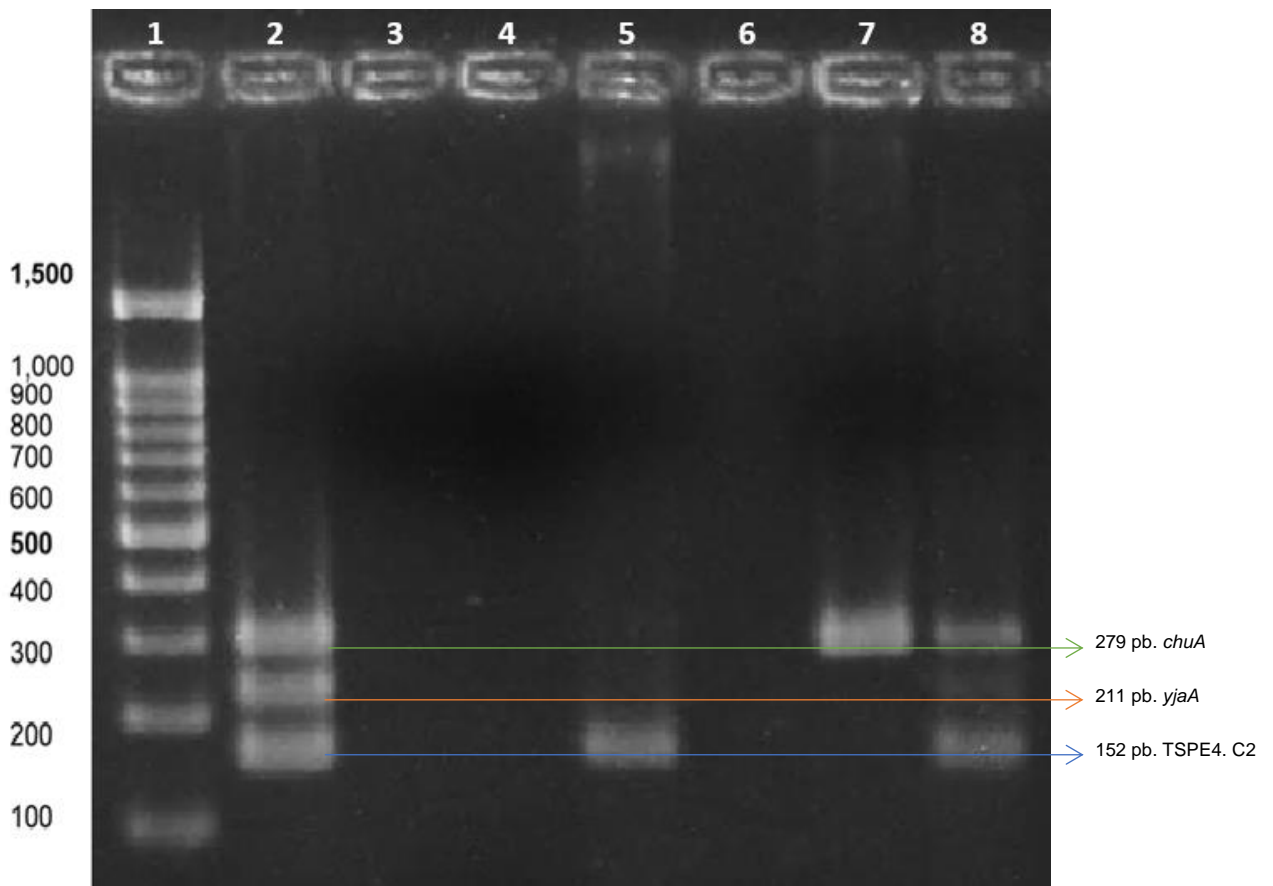


Figura 2. Amplificación de genes para filogenia de *E. coli*. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con Bromuro de Etidio (0.001%). 1 marcador de peso molecular. 2 control positivo de genes *chuA* 279 pb, *yjaA* 211 pb, y TSPE4. C2 152 pb. 3 control negativo. 4 grupo filogenético A. 5 grupo filogenético B1 152 pb. 6 control negativo. 7 grupo filogenético D 279 pb. 8 grupo filogenético B2 amplifica los 3 genes *chuA* 279 pb, *yjaA* 211 pb, y TSPE4. C2 152 pb.

❖ **Genes de virulencia**

Con relación a los genes asociados con la virulencia de las cepas de *E. coli* evaluados por ensayo de PCR con diferentes iniciadores (Figura 4), se observó que *iutA*, *fyuA*, *feoB*, *fimH* y *sitA* fueron los genes que amplificaron con mayor frecuencia, por su parte *ibeA* e *ireA* se observaron en un menor número de cepas (Cuadro 7).

<b>Cuadro 7. Factores de virulencia asociados a cepas de <i>E. coli</i> aislada de pacientes con ICTU</b>		
<b>GEN</b>	<b>No de cepas que amplificaron (n=164)</b>	<b>% Positivas</b>
<i>fimH</i>	119	73
<i>papA</i>	61	37
<i>papC</i>	70	43
<i>fyuA</i>	123	75
<i>iroN</i>	29	18
<i>ireA</i>	15	9
<i>iutA</i>	136	83
<i>feoB</i>	120	73
<i>sitA</i>	114	70
<i>irp-2</i>	90	55
<i>sat</i>	56	34
<i>kpsMT</i>	31	19
<i>ompT</i>	73	45
<i>ibeA</i>	13	8
<i>malX_PA1</i>	58	35

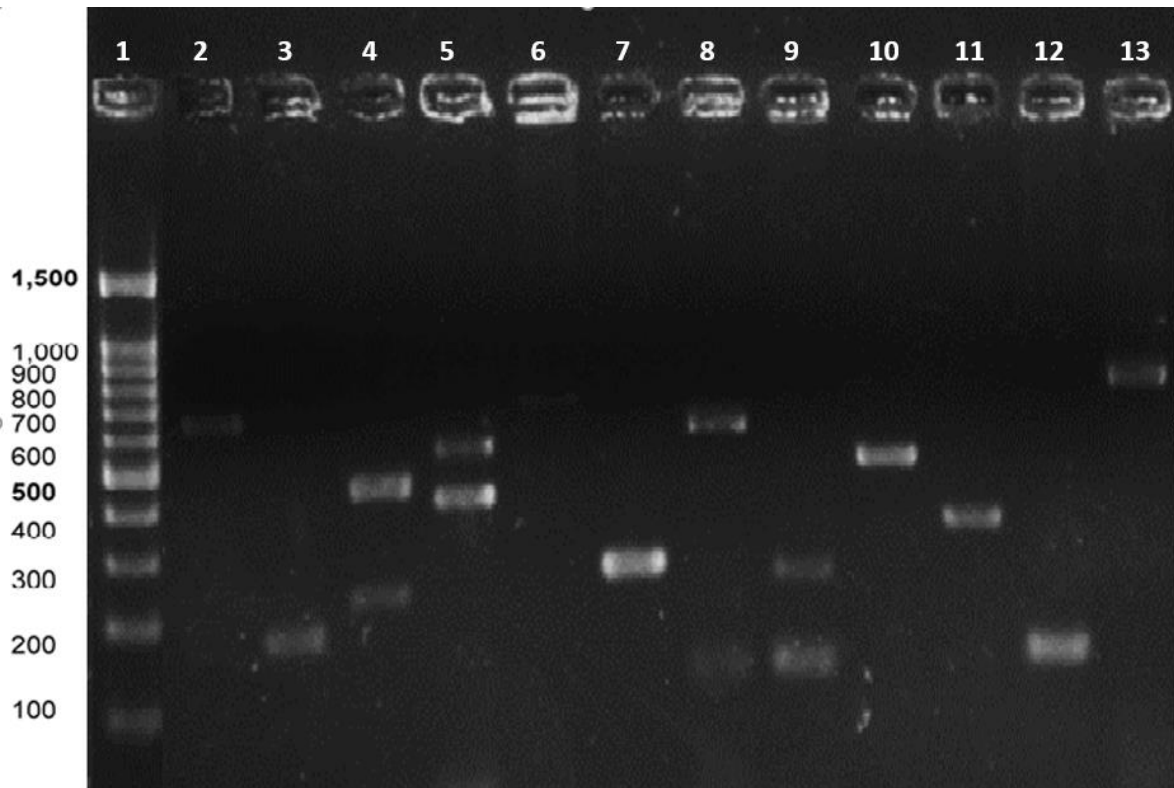


Figura 4. Amplificación de genes de virulencia de *E. coli*. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con Bromuro de Etidio (0.001%). 1 marcador de peso molecular. 2 *papA*. 3 *papC*. 4 *fimH – ireA*. 5 *feoB - sitA*. 6 *fyuA*. 7 *iutA*. 8 *iroN* 9 *irp-2 – kpsMT*. 10 *ompT*. 11 *sat*. 12 *ibeA*. 13 *malX\_PAI*.

El análisis de correlación entre genes de virulencia y grupo filogenético comensales (A y B1) y los extraintestinales (B2 y D) (Cuadro 8), mostró que todos los genes evaluados están presentes en los filogrupos A, B2 y D y solo en el filogrupo A no amplificaron *sat*, *malX\_PAI* *papA* e *ireA*. Al realizar el análisis de significancia estadística se observó que no hubo diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en la presencia de *iroN*, *iutA*, *feoB*, e *ireA* entre los dos grupos de cepas (comensales y extraintestinales). Con excepción de *ibeA* que fue más común en los grupos comensales A y B1 ( $p = 0.0424$ ), el resto de los genes analizados mostró  $p < 0.05$  en el grupo de cepas de los filogrupos D y B2 (extraintestinales).

Cuadro 8. Genes de virulencia y su relación con el grupo filogenético N (%)						
Genes	TOTAL N=164	A N= 52	B1 N= 16	B2 N=70	D N=26	*P
<i>fimH</i>	119 (72)	25 (48)	8 (50)	62 (89)	24 (92)	0.0001
<i>papA</i>	61 (37)	6 (12)	0 (0)	43 (61)	12 (46)	0.0001
<i>papC</i>	70 (43)	8 (15)	5 (31)	47 (67)	10 (38)	0.0001
<i>fyuA</i>	123 (75)	31 (60)	11 (69)	61 (87)	20 (77)	0.0017
<i>iroN</i>	29 (18)	7 (13)	6 (38)	9 (13)	7 (27)	<b>0.6840</b>
<i>ireA</i>	15 (9)	5 (10)	0 (0)	7 (10)	3 (12)	<b>0.5902</b>
<i>iutA</i>	136 (83)	41 (79)	14 (88)	64 (91)	17 (65)	<b>0.6742</b>
<i>feoB</i>	120 (73)	34 (65)	12 (75)	54 (77)	20 (77)	<b>0.2117</b>
<i>sitA</i>	114 (69)	26 (50)	11 (69)	57 (81)	20 (77)	0.0005
<i>irp-2</i>	90 (55)	21 (40)	7 (44)	43 (61)	19 (73)	0.0041
<i>sat</i>	56 (34)	3 (6)	0 (0)	41 (59)	12 (46)	0.0001
<i>kpsMT</i>	31 (19)	3 (6)	4 (25)	16 (23)	8 (30)	0.0250
<i>ompT</i>	73 (44)	11 (21)	10 (63)	34 (49)	18 (69)	0.0040
<i>ibeA</i>	13 (8)	7 (13)	2 (13)	1 (1)	3 (12)	0.0424
<i>malX_PA1</i>	58 (35)	10 (12)	0 (0)	36 (51)	12 (46)	0.0001

\*De acuerdo a los datos se encontraron diferencias significativas entre los diferentes patrones asociados de los genes de virulencia, el nivel de confianza utilizado fue del 95% con una  $P < 0.05$ .

#### ❖ Susceptibilidad a antimicrobianos

Se evaluó la sensibilidad de las cepas de *E. coli* a 33 antibióticos de 14 familias de antimicrobianos (Figura 5), los resultados en las 98 cepas aisladas de 13 niño(a)s mostraron cepas resistentes a la familia de los Carbapenem (Meropenem) y Anfenicoles (Cloranfenicol) en 53% y 52% respectivamente. El mismo ensayo en 66 cepas aisladas de 5 pacientes adultos mostró que las Quinolonas (Ácido Nalidixico) 31%, Fluoroquinolonas (Ciprofloxacina) 29% y Penicilinas (Ampicilinas) 22%, fueron los antimicrobianos a los que mostraron mayor resistencia.

Los antibióticos que presentaron una resistencia igual o menor a 20% con respecto a los criterios de la IDSA (Infectious Diseases Society of America) (Gupta *et al.*, 2010), fueron Sulfas (Sulfonamida) 7% y Fosfomicinas (Fosfomicina y Fosfomicina/trometamol) 4%.

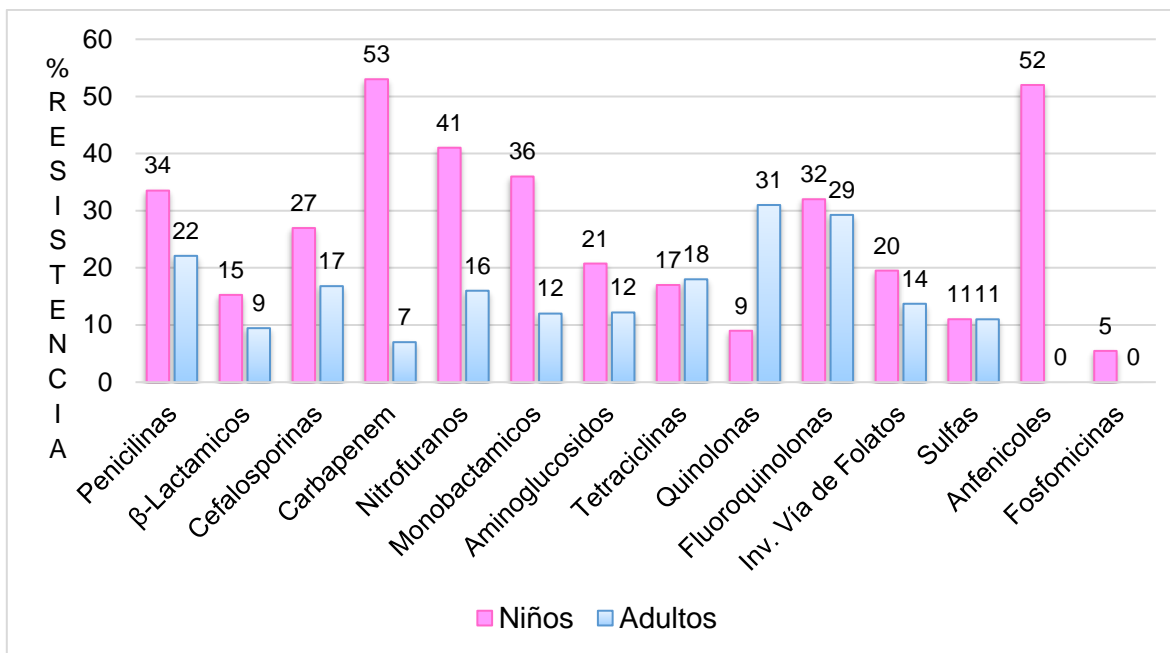


Figura 5. Porcentaje de resistencia bacteriana a las diferentes familias de antibióticos.

De las 164 cepas analizadas se observó que 17 de ellas (10%) fueron resistentes a las Fluoroquinolonas, Quinolonas, Cefalosporina, Penicilina y Nitrofuranos, 144 (88%) se incluyeron en el grupo MDR y 3 (2%) se definieron como XDR

Se realizó la correlación entre MDR y XDR v. s. serogrupos (Cuadro 9), el resultado mostró que entre los serogrupos clásicos y no clásicos se observó que solo en el grupo de las MDR ( $p= 0.0250$ ) hubo diferencia significativa al comparar entre los grupos de las R ( $p= 0.1694$ ) y las XDR ( $p= 0.1000$ ).

	<b>*R</b> N= 17 (10%)	<b>**MDR</b> N= 144 (88%)	<b>***XDR</b> N= 3 (2%)	<b>Total de cepas</b> <b>164</b>
<b>Serogrupos Clásicos UPEC</b>	6	82	0	88
<b>Serogrupos No clásicos</b>	11	62	3	76

\*R = Resistentes a 1 o más antibióticos de 1 familia.

\*\* MDR = Multidrogo resistentes Las cepas no son susceptibles a al menos 1 agente antimicrobiano en 3 o más familias.

\*\*\* XDR = Extensivamente resistentes a los medicamentos. Las cepas no son susceptibles a al menos 1 agente antimicrobiano en todos, pero 2 o menos familias de antimicrobianos.

Se realizó la correlación entre patrones de resistencia y grupos filogenéticos (Cuadro 10), el resultado mostró que tanto en el grupo de cepas comensales (A y B1), como en el de las extraintestinales (B2 y D) las cepas fueron del grupo MDR (88%). Al realizar el análisis estadístico se observó significancia estadística en las cepas resistentes y Multidrogo resistentes ( $p < 0.05$ ).

<b>Cuadro 10. Correlación entre patrones de resistencia y filogrupos de <i>E. coli</i> aisladas de pacientes con ICTU</b>				
	<b>*R</b> N= 17 (10%)	<b>**MDR</b> N= 144 (88%)	<b>***XDR</b> N= 3 (2%)	<b>Total de cepas</b> <b>164</b>
<b>Filogrupos A y B1</b>	12	53	3	68
<b>Filogrupos B2 y D</b>	5	91	0	96

\*R = Resistentes a 1 o más antibióticos de 1 familia.

\*\* MDR = Multidrogo resistentes Las cepas no son susceptibles a al menos 1 agente antimicrobiano en 3 o más familias.

\*\*\* XDR = Extensivamente resistentes a los medicamentos. Las cepas no son susceptibles a al menos 1 agente antimicrobiano en todos, pero 2 o menos familias de antimicrobianos.

- **DISCUSIÓN**

Las infecciones de vías urinarias son una de las principales causas de morbilidad de enfermedades infecciosas, se ubican en el tercer lugar en nuestro país y representan un problema de salud pública con gran impacto económico (Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, 2017). En el presente estudio se analizaron 164 cepas de *Escherichia coli* aisladas de urocultivos de 13 niños y 5 adultos con infección crónica de vías urinarias. La caracterización con sueros de las cepas analizadas mostro una gran diversidad de serogrupos y serotipos (24 y 36 respectivamente). Entre los serogrupos se identificaron algunos que corresponden a los reportados para cepas UPEC (O1, O2, O4, O6, O7, O8, O16, O18, O22, O25, y O75), sin embargo, se identificaron otros no incluidos en este patotipo, lo anterior sugiere que existen cepas de distribución generalizada y otras específicas de distribución localizada. Al respecto es importante señalar que al realizar el análisis filogenético de las diferentes cepas un número importante de ellas eran de los filogrupos pertenecientes a las cepas comensales (Clermont *et al.*, 2000). Es interesante señalar que el serotipo O25:H4 fue el que se identificó con mayor frecuencia (26%), sin embargo, las cepas pertenecían a solo tres pacientes lo que confirma la participación de estas en los cuadros de IsTU persistente.

Los serotipos O75:H- (11%) OND:H- (7%) y O8:H- (4%) se identificaron con menor frecuencia, en otros estudios realizados en la ciudad de México se reportó que el serogrupo O25 es el más frecuente identificado en los aislados de IsTU seguido por el O8 (Ibarra-López, 2007). Estos resultados indican que la prevalencia de ciertos serogrupos en las cepas causantes de IsTU en pacientes de la Ciudad de México, son diferentes a los reportado en otros países (España, Inglaterra, China, Canadá, Estados Unidos y Brasil), donde se refiere que los serogrupos encontrados con mayor frecuencia son O6 seguido de O2 (Rodríguez-Siek *et al.*, 2005; Abe *et al.*, 2008).

El análisis de los grupos filogenéticos mostró en conjunto que el 58 % pertenecen al grupo de cepas virulentas (B2 y D), con B2 (42%) en mayor proporción que D



(16%), estos resultados concuerdan con el hecho de que el grupo está asociado con cepas patógenas, al compararlos con estudios previos Hilbert *et al.*, 2008 (Estados Unidos), muestran porcentajes muy similares a los encontrados en este trabajo, lo mismo que para el filogrupo D que también está asociada con cepas patógenas, pero se presenta en menor porcentaje (Moreno *et al.*, 2006; Moreno *et al.*, 2008; Hilbert *et al.*, 2008)

Estos resultados pudieran estar relacionados con el hecho de que el estudio es prospectivo y que se seleccionaron cada mes muestras del mismo paciente. Para confirmar estas observaciones será necesario contar con los resultados de los aislados del total de los pacientes incluidos en el estudio integral.

Por otra parte, los resultados mostraron que el 42 % pertenecen al grupo de las comensales (A y B1) con el filogrupo A (32%) en un alto porcentaje comparado con otros estudios. Este hecho podría indicar que el tracto gastrointestinal es el principal reservorio de cepas que pueden ser capaces de colonizar el tracto urinario, como se ha reportado en otros trabajos (Moreno *et al.*, 2006 Moreno *et al.*, 2008).

El filogrupo B1 se encontró en el (10%) de las cepas, el hecho de encontrarlas en casos con infección urinaria se podría deber a que las cepas de *E. coli* tienen una alta plasticidad en su genoma por lo que a pesar de pertenecer al grupo B1 cuentan con genes que codifican para factores de virulencia.

Los genes de adhesinas *fimH*, *papA* y *papC*, son algunos de los factores más estudiados en la adherencia de cepas UPEC (Miyasaki *et al.*, 2002). El análisis entre genes de virulencia y grupo filogenético mostro que *fimH* y *papC* se identificaron en todos los grupos filogenéticos, pero *fimH* fue más común en el filogrupo B2 y D.

El pili tipo 1, con su adhesina llamada fimbria H, es un organelo muy importante en la sobrevivencia de *E.coli* en los hospederos, ya sean patógenas o comensales, por tal motivo, no es considerado estrictamente un factor de virulencia sino un

requisito para que las bacterias puedan colonizar las mucosas. Se ha descrito que las interacciones bacterianas mediadas por *fimH* con las células uroepiteliales son críticas en la colonización de la vejiga (Mulvey, 2001).

El gen *papC* codifica para una proteína de membrana externa fundamental para la regulación de la biogénesis de la fimbria P, la presencia de genes *pap* está asociada con pielonefritis por lo que al tener porcentajes del 60% en el filogrupo B2 da lugar a pensar que la mayoría de las cepas de la población de este estudio tienen la capacidad de colonizar los riñones, por lo que se debe de tener especial atención a esta enfermedad para no llegar a una condición tan grave como lo es la pielonefritis (Miyasaki *et al.*, 2002; Lane y Mobley, 2007).

El gen *papA* no se encontró en cepas del filogrupo B1, pero tuvo mayor relevancia en los filogrupos B2 y D, esto podría deberse a que las fimbrias P se expresan *in vivo* dentro del tracto urinario durante la infección y parecen ser inmunógenos fisiológicamente relevantes.

En este estudio se analizaron los genes involucrados en la captación de hierro: *feoB*, *fyuA*, *ireA*, *irp-2*, *sitA*, *iutA* e *iroN*. Al respecto se ha reportado que la orina y las vías urinarias son ambientes limitados de hierro.

Al ser el hierro uno de los factores limitantes para el crecimiento, las cepas patógenas necesitan contar con un sistema para su obtención (Hancock *et al.*, 2008; Clarke *et al.*, 2001). La bacteria al tener estas proteínas de membrana externa pueda censar su ambiente, detectando la falta de hierro para regular la transcripción de genes que codifican para captar hierro. La frecuencia de los genes *iutA* y *fyuA* fue del 85% y 75% respectivamente y mostraron mayor prevalencia en el filogrupo B2. Esta observación se relaciona con la persistencia del microorganismo al conferir ventajas para la supervivencia, capacidad de formación de biofilms y evadir la respuesta innata del hospedero (Mulvey *et al.*, 2008; Hancock *et al.*, 2008).

La frecuencia para *irp-2* fue de 43% y se encontró con mayor prevalencia en el filogrupo B2, estos resultados son parecidos a los descritos por Paniagua *et al.*, (2016) quienes reportaron una prevalencia de 48.4% de un total de 194 cepas UPEC. Pero comparando con los resultados descritos por Khasheii *et al.*, (2016), los resultados obtenidos en ambos estudios son menores, ya que ellos reportaron una prevalencia de 68,2% de un total de 170 cepas UPEC. Ewer *et al.*, (2007) realizaron un estudio con 65 cepas UPEC aisladas de pacientes en un hospital de Alemania, reportando la prevalencia de 81% de este gen. Los datos referidos sugieren que *irp2* probablemente juega un papel importante en la patogénesis de las cepas UPEC, sin embargo, su presencia difiere con relación al sitio de aislamiento de las cepas UPEC.

Para el caso de *iroN* la frecuencia con la que se identificó fue de 18% y se encontró con mayor prevalencia en el filogrupo B2, estos resultados son cercanos a lo reportado por Paniagua *et al.*, (2016) quienes refieren una frecuencia del 10%. Nuevamente al comparar nuestros resultados con los descritos por Khasheii *et al.*, (2016), la frecuencia de este gene es menor a lo reportado por dichos autores quienes refieren prevalencia del 30,6% en un total de 170 cepas UPEC. La frecuencia de *ireA* fue de 9%, aunque, ambos genes han sido considerados como marcadores de evidencia epidemiología molecular en *E. coli* patógena (Okeke *et al.*, 2004).

La frecuencia para *feoB* fue de 73% y se encontró con mayor prevalencia en el filogrupo B2, estos resultados con una ligera diferencia son parecidos a los descritos por Zhao *et al.*, (2009), quienes reportaron una prevalencia de 95% en la Provincia de Jiangsu, China y a los referidos por Yung *et al.* (2012) en la Universidad Chung-Ang de Yongsan, Seúl, Corea, quienes reportaron la prevalencia de *feoB* en 67.2%.

Estas discrepancias pueden deberse a la diferencia en epidemiología de cepas, tamaño de la muestra en este estudio, aunque no está claro si *feoB* funciona de manera diferente o tiene un mecanismo en cepas de IsTU.

En el estudio además de los genes previamente referidos se identificó *sitA*, este inicialmente fue descrito en cepas de *Salmonella*. Además, se ha referido su presencia en un plásmido grande en cepas patógenas de *E. coli*. En nuestro estudio se observó en 70% de las cepas estudiadas principalmente de las que pertenecían al filogruppo B2, estos resultados son parecidos a lo descrito por Johnson *et al.*, (2008, 2009) quienes refieren la prevalencia de *sitA* en 83.4% de cepas UPEC y 89.6 % (2008) y 86.3% (2009) en cepas APEC.

Los sistemas de captación de hierro de las cepas UPEC son de suma importancia para persistir en el tracto urinario; la elevada presencia de este gen que codifica para este tipo de sistemas en cepas UPEC comparadas con cepas causantes de infecciones esporádicas es notable (Ejrnæs, 2011).

La identificación de ExPEC a partir de hospedadores aviares y humanos, que albergan rasgos asociados con múltiples subpatotipos, sugiere que algunas de las cepas ExPEC pueden tener potencial zoonótico. Al respecto se puede considerar que las cepas APEC de aves de corral pueden causar enfermedades en humanos, o que cepas UPEC de los humanos podrían causar enfermedades en los huéspedes aviares.

Durante mucho tiempo se ha especulado con respecto a la participación de los alimentos en la transmisión de cepas ExPEC. Al respecto en diferentes estudios se ha señalado que las cepas APEC no poseen potencial zoonótico (Rodríguez-Siek *et al.*, 2005, Ewers *et al.*, 2007), sin embargo, otros investigadores han demostrado que las cepas de APEC y sus plásmidos se pueden transmitir a huéspedes humanos. Al respecto recientemente el análisis comparativo de aislamientos de cepas APEC con el respectivo de aislamientos de ExPEC de IsTU y meningitis neonatal, revelaron que estos "subpatotipos" se superponen en serogrupos, grupos filogenéticos, genotipos de virulencia y capacidades para causar enfermedad en ciertos modelos animales (Johnson *et al.*, 2008, Johnson *et al.*, 2009). Realizar estudios para confirmar estas propuestas, resultan de gran

relevancia para entender mejor la epidemiología de algunos padecimientos infecciosos.

La expresión de toxinas en UPEC puede causar daño a los tejidos del huésped, facilitando la diseminación bacteriana, en este estudio la toxina *Sat* (toxina secretada autotransportada), se encontró con una frecuencia del 34% con mayor prevalencia en el filogrupo B2. Esta toxina es una serina proteasa que está asociada con las cepas de UPEC que producen pielonefritis, y tienen una actividad tóxica agresiva frente a las células de la vejiga y el riñón. Se propone que *saT* desempeña un papel importante en la virulencia de UPEC durante una ISTU, en la ruptura de la barrera protectora de las células epiteliales provocando que las bacterias invadan el torrente sanguíneo, causando bacteriemia en los individuos afectados (Maroncle *et al.*, 2006). La toxina puede contribuir a la exfoliación de las células uroteliales, un evento que comúnmente se observa en las ISTU de los modelos en animal (Guyer *et al.*, 2000).

La prevalencia obtenida para el gen *kpsMT* fue de 19%, se identificó con mayor prevalencia en el filogrupo B2, este porcentaje es menor a lo reportado por Abe *et al.*, (2008) quienes refieren una prevalencia de 51.1% en cepas UPEC de un hospital de Sao paulo, Brasil. Sin embargo, en un trabajo realizado por Paniagua-Contreras *et al.* (2015) reportaron una prevalencia del 92.2%, tales diferencias sugieren que la ubicación geográfica o el origen de las muestras de las cuales se aislaron las cepas UPEC, pueden ser un determinante importante en la distribución de los factores de virulencia. Lo anterior se corrobora en la frecuencia con la que se identificó *ompt* en este estudio (45%) y los resultados descritos por Karimian *et al.*, (2012) quienes reportaron una prevalencia de 4.8% y los descritos en un trabajo realizado en Alemania en los que reportaron la prevalencia para este gen en 92% de un total de 65 cepas UPEC.

El gen *ibeA*, se encontró en una frecuencia del 8% con mayor prevalencia en el filogrupo A, al respecto se ha descrito que este gen se encuentra con una alta prevalencia en los aislamientos de *E. coli* productores de meningitis (Gordon *et al.*, 2008), sin embargo, se considera que puede promover la invasión del torrente sanguíneo durante una urosepsis al promover la penetración de la barrera sanguínea durante la meningitis (Moura *et al.*, 2009). Sin embargo, el papel que juega en el proceso infeccioso aún es incierto, además ha demostrado tener relación con la formación de biofilm ya que se ha encontrado en cepas que se sabe son productoras de biofilm. (Gordon *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2011; Moura *et al.*, 2009).

El tratamiento para las IstU en primera instancia es empírico siendo las Fluoroquinolonas (Ciprofloxacina) y el Trimetroprim-sulfametoxazol los fármacos de primera elección seguidos por las Cefalosporinas y las Penicilinas (Ampicilina). Sin embargo, cuando existen tasas altas de resistencia, se vuelve difícil la selección de un antibiótico antes de contar con un resultado de cultivo y sensibilidad a los antibióticos.

En el presente estudio, se observó sensibilidad bacteriana a Carbapenems (Meropenem) del 53% y a Anfenicoles (Cloranfenicol) del 52%, resultados similares a los reportado previamente por (Gordon *et al.*, 2008).

Para las Quinolonas (Ácido Nalidixico) se encontró un porcentaje de resistencia del 31%, esto genera un gran problema ya que, como se mencionó anteriormente, son antimicrobianos de primera elección para tratar las IstU. La resistencia a Quinolonas se puede deber a mutaciones en los genes que codifican para las enzimas DNA girasa y DNA topoisomerasa (Moura *et al.*, 2009).

La baja resistencia a la Fosfomicina trometamina nos señala cómo un antibiótico que ha sido poco utilizado mantiene intacta su actividad *in vitro* y puede considerarse como de primera línea; de hecho, ya se ha recomendado como alternativa en el tratamiento de IstU en otros estudios. La Fosfomicina es una

alternativa para las IsTU no complicadas, reportaron en nuestro país una tasa de resistencia menor al 1%, por lo que resulta conveniente incluirla rutinariamente en los antibiogramas.

La resistencia a los antimicrobianos en la comunidad muestra un patrón relacionado con la geografía política mundial. Los niveles de resistencia son tan grandes que la mayoría de los autores lo consideran como un problema de salud pública, particularmente en países en vías de desarrollo (Gupta *et al.*, 2010; Johnson y Stell, 2000), sugieren que un punto crítico de la relación costo-beneficio en IsTU se alcanza cuando el porcentaje de *E. coli* resistente a Trimetoprim/sulfametoxazol (TMP/SMZ) supera 20%.

La Nitrofurantoína podría ser ideal para tratamiento empírico de la IsTU comunitaria no complicada: alcanza buenas concentraciones, tiene baja resistencia y se administra fácilmente durante 5-7 días (Moura *et al.*, 2009). Los betalactámicos orales, aunque tienen baja resistencia, no se consideran ideales para manejo empírico. Otros antibióticos de uso parenteral tienen baja o nula resistencia, pero se reservan para casos complicados.

La virulencia bacteriana dentro del tracto urinario es modulada por factores usualmente codificados en el cromosoma de UPEC y también con frecuencia presentes en regiones cromosomales inestables conocidas como islas de patogenicidad (Johnson y Stell, 2000; Mulvey, 2001). Algunos de dichos factores de virulencia facilitan la colonización del tracto urinario, por lo que les confieren potencial patógeno a las cepas portadoras (Johnson *et al.*, 2008). Sin embargo, a la fecha, ningún factor de virulencia ha demostrado ser específicamente único o definitivo de UPEC (Kaper *et al.*, 2004).

- **CONCLUSIONES**

- ♥ El empleo de la serología, es un procedimiento que contribuye en forma importante para conocer que variedades antigénicas de *E. coli* participan en la etiopatogenia de las ICTU.
- ♥ El análisis por grupo filogenético no mostró diferencias entre cepas extraintestinales (58%) que pertenecen a los filogrupos D y B2 y las cepas comensales (42%) A y B1.
- ♥ Se identificaron genes que codifican para diferentes factores de virulencia en cepas de *E. coli* de los diferentes filogrupos, estos resultados revelan que cepas de los filogrupos comensales no incluidos en el patotipo UPEC son responsables de un importante número de infecciones crónicas del tracto urinario.
- ♥ Todos los genes evaluados se identificaron en los filogrupos B2 y D, con relación al filogrupo A no amplificaron *sat*, *malX\_PAI*, *papA* e *ireA*
- ♥ La capacidad de las cepas comensales para portar genes asociados con la virulencia de UPEC y presentar resistencia a los antimicrobianos, confirma la transferencia de genes en el hospedero y explica la dificultad cada vez mayor para el control de las ICTU con el empleo de antimicrobianos.
- ♥ El ensayo de sensibilidad a los antimicrobianos mostró que 88% de los aislados evaluados se incluyen en el grupo MDR.



- **BIBLIOGRAFIA**

- ❖ Abe CM, Salvador FA, Falsetti IN, Vieira AM, Blanco J, Blanco JE, Blanco M, Machado AM, Elías WP, Hernandez RT, Gomez AT. Uropathogenic E. coli. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 52: 397-406 (2008).
- ❖ Alós JI, Serrano MG, Gómez-Garcés JL & Perianes J. Antibiotic resistance of *Escherichia coli* from community-acquired urinary tract infections in relation to demographic and clinical data. *Clin. Microbiol. Infect;* 11:199–203 (2005).
- ❖ Alteri CJ, Mobley HL. Quantitative profile of the uropathogenic *Escherichia coli* outer membrane proteome during growth in human urine. *Infection and Immunity* 75:2679-2688 (2007).
- ❖ Anderson GG, Dodson KW, Hooton TM, Hultgren SJ. Intracellular bacterial communities of Uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract pathogenesis. *Trends Microbiol;*12:424-430 (2004).
- ❖ Anderson GG, Palermo JJ, Schilling JD, Roth R, Heuser J, Hultgren SJ. Vainas intracelulares bacterianas similares a biofilm en infecciones del tracto urinario. *Science* 301: 105-107 (2003).
- ❖ Andreu-Domingo A. Patogenia de las infecciones del tracto urinario. *Enferm Infecc Microbiol Clin;* 15-21 (2005).
- ❖ Antao E-M, Wieler LH, Ewers C. Adhesive threads of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Pathogens;* 1:1-12 (2009).
- ❖ Arreguín V, Cebada M, Simón JI, Sifuentes-Osornio J, Bobadilla-del Valle M, Macías AE. Microbiología de las infecciones urinarias en pacientes ambulatorios. Opciones terapéuticas en tiempos de alta resistencia a los antibióticos. *Revista de Investigación Clínica.* Vol. 59, Núm. 4 pp 239-245. (2007).
- ❖ Bartková GCI. Characterization of Adhesion Associated Surface Properties of Uropathogenic *Escherichia coli*. *Folia Microbiol;* 373-377 (1994).

- ❖ Bauer RJZL. Molecular Epidemiology of 3 Putative Virulence Genes for Escherichia coli Urinary Tract Infection- usp, iha and iron E. coli. Journal of Infectious Diseases (2002).
- ❖ Bien Justyna SO. Role of Uropathogenic Escherichia coli Virulence Factors in Development of Urinary Tract Infection and Kidney Damage. Hindawi Publishing Corporation International Journal of Nephrology; 1-15 (2012).
- ❖ Blango MG, Mulvey MA. Persistencia de *Escherichia coli* uropatogénica frente a múltiples antibióticos. Antimicrobiano Agentes de quimioterapia. 54, 1855-1863 (2010).
- ❖ Bower JM, Eto DS, Muvey MA. Covert operations of uropathogenic Escherichia coli within the urinary tract. Traffic; 6:18-31 (2005).
- ❖ Castro Montiel AEI. Aparato urinario. En Bacteriología médica basada en problemas. Dra. Ana María Bacteriología medica basada en problemas, 2ª edición. México, D.F. Editorial El Manual Moderno; 169-175 (2014).
- ❖ Chávez-Valencia V, Gallegos-Nava S, Arce-Salinas CA. Patrones de resistencia antimicrobiana y etiología en infecciones urinarias no complicadas. Gac Med Mex;146: 269-273 (2010).
- ❖ Chung AAM. Bacterial cystitis in women. Australian Family Physician Vol. 39. (2010).
- ❖ Clarke TE, Tari LW, Vogel HJ, Structural biology of bacteria iron uptaken systems. Curr Top Med Chem; 1:7-30 (2001).
- ❖ Clermont O, S. Bonacorsi, and E. Bingen. Rapid and Simple Determination of the Escherichia coli Phylogenetic Group. Appl. Environ. Microbiol.; 66: 4555–4558 (2000).
- ❖ Dielubanza EJ, Schaeffer AJ. Infecciones del tracto urinario en mujeres. Med Clin North Am 95 : 27–41(2011).
- ❖ Duplessis CWT. Uropathogenic Escherichia coli. The Female Patient (2011).

- ❖ Ejrnaes K. Bacterial Characteristics of Importance for Recurrent Urinary Tract Infections Caused by *Escherichia coli*. Dan Med Bull; 58 (4);B4187 (2011).
- ❖ Emody L, Kerényi M, Nagy G. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli*. Int J Antimicrob Agents; 22:S29-S33 (2003).
- ❖ Ewer C, Li G, Wilking H, Kiebling S, Alt K, Antão EM, Laturus C, Dieh I, Glodde S, Homeier T, Bohnke U, Steinruck H Philipp HC, Wieler H. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: How closely related are they? Int J Med Microbiol. 297:163-176 (2007).
- ❖ Fronzes R, Remaut H, Waksman G, Architecture and biogenesis of nonflagellar protein appendages in Gram-negative bacteria. EMBO J; 27:2271-2280 (2008).
- ❖ Gordon DM, Clermont O, Tolley H, Denamur E. Assigning *Escherichia coli* strains to phylogenetic groups: multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method. Environ Microbiol; 10:2484-2496 (2008).
- ❖ Guajardo-Lara CE, González-Martínez PM, Ayala-Gaytán JJ. Resistencia antimicrobiana en la infección urinaria por *Escherichia coli* adquirida en la comunidad. ¿Cuál antibiótico voy a usar? Salud Pública Méx; 51:155-159 (2009).
- ❖ Gupta K, Hooton TM, Naber KG, Wullt B, Colgan R, Miller LG, *et al.* International clinical practice guidelines for the treatment of acute uncomplicated cystitis and pyelonephritis in women: a 2010 update by the Infectious Diseases Society of America and the European Society for Microbiology and Infectious Diseases. Clin Infect Dis; 52:e103-e120 (2011).
- ❖ Guyer DM, Henderson IR, Nataro JP, Mobley HL. Identificación de *sat*, una toxina autotransportadora producida por *Escherichia coli* uropatogénica. Mol Microbiol; 38: 53–66 (2000).
- ❖ Hancock V, Ferrières L, Klemm P. The ferric yersiniabactin uptake receptor FyuA is required for efficient biofilm formation by urinary tract

- infectious *Escherichia coli* in human urine. *Microbiology*; 154:167-175 (2008).
- ❖ Hilbert DW, Paulish TE, Mordechai E, Adelson ME, Trama JPO serogroups phylogeny, and virulence factors of cervicovaginal and rectal *Escherichia coli* isolates, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* ; 27:1265-1268 (2008).
  - ❖ Johnson R, Stell, A, Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise, *J. Infect. Dis.* 181:261 – 272, (2000).
  - ❖ Johnson TJ, Logue CM, Wannemuehler Y, Kariyawasam S, Doetkott C, DebRoy C, Nolan LK. Examen de la Fuente y Genotipos de Virulencia Extendida de *Escherichia coli* Contaminante Minorista Carne De Aves. *Patógenos y enfermedades transmitidas por los alimentos*, 6 (6), 657–667 (2009).
  - ❖ Johnson TJ, Wannemuehler Y, Johnson SJ, Stell AL, Doetkott C, Johnson, JR, Nolan LK. La comparación de cepas de *Escherichia coli* patógenas extraintestinales de fuentes humanas y aviares revela un subconjunto mixto que representa patógenos zoonóticos potenciales. *Microbiología aplicada y ambiental*, 74 (22), 7043–7050 (2008).
  - ❖ Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*; 2:123-140 (2004).
  - ❖ Karimian A, Momtaz H, Mahbobe M. Detection of uropathogenic *Escherichia coli* virulence factors in patients with urinary tract infections in Iran. *Afr J Microbiol Res*, 6: 6811-6816 (2012).
  - ❖ Khasheii B, Anvari S, y Jamalli A. Evaluación de la frecuencia de genes que codifican sideróforos y los efectos de diferentes concentraciones de iones Fe en la tasa de crecimiento de *Escherichia coli* uropatogénica. *Revista iraní de microbiología*, 8 (6), 359–365 (2016).
  - ❖ L. Emödy, MK. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 29-33 (2003).

- ❖ Lane MC and Mobley HLT. Role of P-fimbrial-mediated adherence in pyelonephritis and persistence of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) in the mammalian kidney. *Kidney Int* ; 72:19-25 (2007).
- ❖ Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Monnet DL. Bacterias multirresistentes, extensivamente resistentes a medicamentos y pandrug resistentes: una propuesta internacional de expertos para definiciones estándar provisionales para resistencia adquirida. *Microbiología clínica e infección*, 18 (3), 268-281 (2012).
- ❖ Maroncle NM, Sivick KE, Brady R, Stokes FE, Mobley HL. Actividad de proteasa, secreción, entrada de células, citotoxicidad y dianas celulares de la toxina autotransportadora secretada de *Escherichia coli* uropatogénica. *Infect Immun.*;74: 6124–6134 (2006).
- ❖ Mellata M, Ameiss K, Mo H, Curtis III R. Characterization of the Contribution to Virulence of Three Large Plasmids of Avian Pathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* Apr ; 78: 1528–1541 (2010).
- ❖ Miyasaki J, Ba-Thein W, Kumao T, Obata YM, Akaza H, Hayshi H, Type1, P and S fimbriae, and afimbrial adhesin I are not essential for uropathogenic *Escherichia coli* to adhere to and invade bladder epithelial cells. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 33:23 – 26, (2002).
- ❖ Mobley Harry LT. Defining Genomic Islands and Uropathogen-Specific Genes in Uropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol*; 189:3532-3546 (2007).
- ❖ Moreno E, Andreu A, Pigrau C, Kuskowski MA, Johnson JR, Prats G. Relationship between *Escherichia coli* strains causing acute cystitis in women and the fecal *E. coli* population of the host. *J Clin Microbiol*; 46:2529-2534 (2008).
- ❖ Moreno E, Andreu A, Pérez T, Sabaté M, Honhnsen JR, Prats G. Relationship between *Escherichia coli* strains causing urinary tract infection in women and the dominant faecal flora of the same hosts. *Epidemiol Infect*; 134:1015-1023 (2006).

- ❖ Moura A, Nicolau A, Hooton T, Azeredo J. Antibiotherapy and pathogenesis of uncomplicated UTI: difficult relationships. *J App Microbiol*; 106:1779-1791 (2009).
- ❖ Mulvey MA, Wiles TJ, Kulesus RR. Origins and Virulence Mechanisms of Uropathogenic *Escherichia coli*. *Exp Mol Pathol*; 85:11–19 (2008).
- ❖ Mulvey MA, Schilling JD, Hultgren SJ. Establecimiento de un reservorio persistente de *Escherichia coli* durante la fase aguda de una infección de vejiga. *Infect Immun* 69: 4572-4579 (2001).
- ❖ Oelschlaeger Tobias ADU. Virulence factors of uropathogenes. *Curr Opin Urol.*, 33-38 (2002).
- ❖ Okeke IN, Scaletsky ICA, Soars EH, Macfarlane LR, Torres AG. Molecular epidemiology of the iron utilization genes of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology* 42:36-44 (2004).
- ❖ Orskov F, and Orskov I. Serotyping of *Escherichia coli*. In T. Bergan (Ed). *Methods in Microbiology*. Academic Press Ltd, London; 14: 43-112 (1984).
- ❖ Paniagua-Contreras GL, *et al.*, Virulence factors, antibiotic resistance phenotypes and O-serogroups of *Escherichia coli* strains isolated from community-acquired urinary tract infection patients in Mexico, *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* (2015).
- ❖ Paniagua-Contreras GL, Hernández-Jaimes T, Monroy-Pérez E, Vaca-Paniagua F, Díaz- Velásquez C, Uribe-García A, Vaca S. Comprehensive expression analysis of pathogenicity genes in uropathogenic *Escherichia coli* strains, *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* (2016).
- ❖ Ribeiro TMTY. Genotypic characterization of virulence factors in *Escherichia coli* strains from patients with cystitis. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 255-260 (2008).
- ❖ Rodriguez-Angeles G. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud pública Mex*; 44:464-475 (2002).

- ❖ Rodríguez-Siek K, Gidding W, Doetkott, Johnson T, Fakhr M, Nolan L. Comparison of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis. *Microbiology* 151:2097-2110 (2005).
- ❖ Rowe MC, Withers HL, Swift S. Uropathogenic *Escherichia coli* forms biofilm aggregates under iron restriction that disperse upon the supply of iron. *FEM Microbiol Lett*; 307: 102-109 (2010).
- ❖ Russell CW, Mulvey MA. El factor patógeno extraintestinal de *Escherichia coli* RqII restringe los efectos genotóxicos de la helicasa de tipo RecQ RqIH (2015).
- ❖ Santana Mera, LJ. Perfil de Resistencia Bacteriana de Infecciones Urinarias en Pacientes Embarazadas Atendidas en el Servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital Provincial General Docente Riobamba Durante el Periodo Enero-Diciembre 2008 (2010).
- ❖ SUIVE/DGE/SALUD. Información epidemiológica de morbilidad. Anuario 2016, versión ejecutiva; 2016. México, Ciudad de México: Secretaria de Salud. P. 127. Disponible en: [http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/2016/morbilidad/grupo/vinte\\_principales\\_causas\\_enfermedad\\_nacional\\_grupo\\_edad.pdf](http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/2016/morbilidad/grupo/vinte_principales_causas_enfermedad_nacional_grupo_edad.pdf)
- ❖ Travis J. Wiles, RR. Origins and virulence mechanisms of Uropathogenic *Escherichia coli*. *Experimental and Molecular Pathology*. Elsevier Inc, 11-19 (2008).
- ❖ Wang S, Niu C, Shi Z, Yaqoob M, Dai J, Lu C, Effect of *ibeA* Deletion on Virulence and Biofilm Formation of Avian Pathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun*; 79:279-287 (2011).
- ❖ Yun, KW, Kim, HY, Park, HK, Kim, W., y Lim, IS. Factores de virulencia de *Escherichia coli* uropatogénica de infecciones del tracto urinario y bacteriuria asintomática en niños. *Revista de Microbiología, Inmunología e Infección*, 47 (6), 455–461 (2012).
- ❖ Zhanel, GG. *et al.* Antibiotic resistance in outpatient urinary isolates: final results from the North American Urinary Tract Infection Collaborative Alliance (NAUTICA). *Int. J. Antimicrob. Agents* 26, 380–388 (2005).

- ❖ Zhao L, Chen X, Zhu X, Yang W, Dong L, Xu X, Liu X. Prevalencia de factores de virulencia y resistencia antimicrobiana de *Escherichia coli* uropatógena en la provincia de Jiangsu (China). Urología, 74 (3), 702-707 (2009).