



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y
DE LA SALUD ANIMAL**

**“IDENTIFICACIÓN DE GRUPOS FILOGENÉTICOS, SEROTIPOS Y
FACTORES DE VIRULENCIA EN CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI*
UROPATÓGENA Y *E. COLI* PATÓGENA AVIAR”**

TESIS

**PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS**

PRESENTA

ELIZABETH ÁLVAREZ VERONA

TUTOR

Dr. Rigoberto Hernández Castro

COMITÉ TUTORAL

Dr. Francisco Suárez Güemes

Dr. Ángel H. Manjarrez Hernández



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.

DECLARACIÓN

La autora de consentimiento a la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, para que la tesis esté disponible para cualquier tipo de reproducción e intercambio bibliotecario.

MVZ Elizabeth Álvarez Verona

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mis papás María y Sergio, hermanas Mayita, Giselle y Carolina por apoyarme incondicionalmente en los momentos más felices y complejos de lo que implicaron empezar y terminar esta parte de mi vida.

A mis mejores amigas: Vinni, Elisa, Erika, Maribel y Marisol por reuniones y momentos inolvidables y entender lo que implica hacer una maestría. Profesionistas admirables que me inspira a crecer con ustedes. Las quiero con todo mi pequeño corazón.

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores de tesis: Dr. Rigoberto Hernández Castro, Dr. Ángel H. Manjarrez Hernández y Dr. Suárez Güemes.

Al laboratorio de Salud Pública a la Bióloga Ma. Elena Chávez Berrocal, Dra. Sandra Gailanes Parra y Dr. José Molina López por ayudarme en la primera parte de serología y al laboratorio de Bacteriología, especialmente al Dr. Armando Navarro Ocaña por su tiempo y excelente disposición al permitirme estar en su laboratorio, a Delia Licona Moreno, Gabriel Pérez Soto y Luis Antonio León Alamilla por su asesoría en la serotipificación de mis aislamientos.

A los investigadores del Hospital General “Dr. Manuel Gea González” por su ayuda, apoyo, amistad y estar al tanto de esta parte de mi vida. Especialmente a la Dra. Mirza Romero, Dr. Pablo Maravilla, Dr. Fernando Martínez, Dra. Angélica A. Olivo, Dra. Lizeth Fuentes, Margarita Leyva y Erika Carrillo.

En especial al Dr. Alfonso Fernando Galván Montaña por su maravillosa e incondicional amistad.

También a la Dra. Cecilia Rosario por involucrarse con tanta paciencia y cariño en mi formación.

A mis amigos de laboratorio: Zaydy, Luis Enrique, Viridiana, Arony, Daniela, Nayeli, MariCarmen, Mario y Luis Alberto.

Este trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de bacteriología del Hospital General “Dr. Manuel Gea González”, laboratorio de salud pública de la facultad de medicina de la UNAM, laboratorio de Bacteriología de la facultad de medicina de la UNAM. Este proyecto fue financiado por CONACYT: SALUD-87586, con el título "Caracterización de cepas de *E. coli* uropatógenas de mujeres embarazadas con infección urinaria crónica: bases moleculares de resistencia antimicrobiana".

CONTENIDO

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
Clasificación de <i>Escherichia coli</i>	3
<i>E. coli</i> comensal	3
<i>E. coli</i> intestinal	4
<i>E. coli</i> extraintestinal (ExPEC)	5
<i>E. coli</i> patógena aviar (APEC).....	6
<i>E. coli</i> uropatógena (UPEC).....	8
Relación genética en aislamientos de APEC y UPEC	10
Métodos para el estudio de <i>E. coli</i> patógena	13
Determinación de serotipos en aislamientos de <i>E. coli</i>	13
Determinación de grupo filogenético en aislamientos de <i>E. coli</i>	13
Determinación de factores de virulencia en aislamientos de <i>E. coli</i>	14
Adhesinas fimbriales	15
FimH	15
SfaS, FocG y SfaS/FocDE	16
PapC	17
Sideróforos	18
IutA	18
FyuA	19
Toxinas	19

HlyA y CNF1	19
Identificación de cepas resistentes a antimicrobianos en aislamientos de <i>E. coli</i> .	20
JUSTIFICACIÓN	23
HIPÓTESIS	23
OBJETIVO GENERAL	24
OBJETIVOS PARTICULARES	24
MATERIAL Y MÉTODOS	24
Cepas, cultivos e identificación de <i>E. coli</i>	24
Serotipos	25
Extracción de ADN, determinación de grupos filogenéticos y factores de virulencia	26
Resistencia a antimicrobianos	28
RESULTADOS	30
Serotipos	30
Determinación de grupo filogenético y factores de virulencia	30
Resistencia a antimicrobianos	32
DISCUSIÓN	37
CONCLUSIONES	47
REFERENCIAS	48

ABREVIATURAS

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
TGI	Tracto gastrointestinal
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatógena
EHEC	<i>Escherichiacoli</i> enterohemorrágica
ETEC	<i>Escherichiacoli</i> enterotoxigénica
EAEC	<i>Escherichiacoli</i> enteroagregativa
EIEC	<i>Escherichiacoli</i> enteroinvasiva
DAEC	<i>Escherichiacoli</i> de adherencia difusa
ExPEC	<i>Escherichiacoli</i> extraintestinal
UPEC	<i>Escherichiacoli</i> uropatógena
APEC	<i>Escherichiacoli</i> patógena aviar
MNEC	<i>Escherichiacoli</i> asociada a meningitis
IVU	Infección de vías urinarias
UFC	Unidades formadoras de colonias
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
AMC	Amoxicilina/ ácido clavulánico
SAM	Ampicilina/sulbactam
AMP	Ampicilina
ATM	Aztreonam
IPM	Imipenem
TZP	Piperacilina/ tazobactam
PRL	Piperacilina
SXT	Trimetoprim/ sulfametoxazol
TIM	Tircacilina/ ácido clavulánico
KZ	Cefazolina
KF	Cefalotina
FEP	Cefepime
CTX	Cefotaxima
CTT	Cefotetán
FOX	Cefoxitin
CAZ	Ceftazidima
CRO	Ceftriaxona
CXM	Cefuroxime
CIP	Ciprofloxacina
GAT	Gatifloxacina
LEV	Levofloxacina
AK	Amikacina
CN	Gentamicina
TOB	Tobramicina

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Iniciadores para la determinación de grupos filogenéticos

Cuadro 2. Iniciadores para la detección de factores de virulencia

Cuadro 3. Condiciones de PCR para amplificación de FV en APEC y UPEC

Cuadro 4. Grupo filogenético, FV y serotipos en aislamientos de APEC y UPEC

Cuadro 5. Resistencia a antimicrobianos y presencia de betalactamasas en aislamientos de APEC y UPEC

Cuadro 6. Patrones de resistencia en aislamientos de APEC

Cuadro 7. Patrones de resistencia en aislamientos de UPEC

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Relación en la contaminación de aislamientos de *E. coli* patógena aviar y *E. coli* uropatógena

Figura 2. Esquema de los genes involucrados en la biogénesis del pili tipo P y tipo 1

Figura 3. Emergencia de resistencia a antimicrobianos.

Figura 4. Aislamiento, identificación y almacenamientos de APEC y UPEC

Figura 5. Extracción de ADN genómico con técnica de tiocinato de guanidina

Figura 6. Determinación de grupo filogenético en aislamientos de *E. coli* con la amplificación de los genes *chuaA*, *yjaA* y fragmento de ADN TspE4.C2

RESUMEN

Las cepas de *Escherichia coli* patógena extraintestinal (ExPEC) son causantes de diversas infecciones tanto en el humano como en animales; dentro de ExPEC se encuentran *E. coli* patógena aviar (APEC) y *E. coli* uropatógena (UPEC), ambos patotipos parecen tener relación filogenética así como en factores de virulencia y perfiles de resistencia, por lo que se considera que las cepas APEC poseen potencial zoonótico. En este estudio se incluyeron 25 aislamientos de *E. coli* de casos clínicos de aves con colibacilosis y 37 aislamientos clínicos de *E. coli* en pacientes con infección de vías urinarias (IVU) con el objetivo de determinar filogrupos, factores de virulencia, serotipos y resistencia a antimicrobianos. Se identificó que la mayoría de los aislamientos de colibacilosis aviar pertenecieron a los serotipos O25, O88, O8 y O20, mientras que los aislamientos de IVU a los serotipos O128, O25, O2, O86, O12 y O100. Los aislamientos de colibacilosis aviar pertenecieron al grupo filogenético A (56%) y D (44%), mientras que los aislamientos de IVU principalmente al grupo D (54%), seguido del grupo A (35%) y B2 (11%). Los factores de virulencia de colibacilosis aviar que se encontraron con mayor frecuencia fueron *fimH*, *focG*, *iutA*, *sfa/focDE* y en IVU *fimH*, *iutA*, *fyuA*, *focG*, considerando a *fimH*, *iutA* y *focG* como los más frecuentes en ambos grupos. La resistencia más elevada en los aislamientos aviares fue en la combinación de trimetoprim/sulfametoxazol, ciprofloxacina, ampicilina, piperacilina, cefuroxima, levofloxacina, ampicilina/sulbactam, gatifloxacina, en los aislamientos de IVU fueron resistentes a ampicilina, piperacilina y trimetoprim/sulfametoxazol y en ambos tipos de aislamientos mostraron mayor resistencia a fluoroquinolonas. Todos los aislamientos mostraron pertenecer principalmente a los grupos filogenéticos de las cepas comensales, con bajo perfil de factores de virulencia y elevada resistencia.

Palabras clave: *Escherichia coli* uropatógena, *Escherichia coli* patógena aviar, serotipo, grupos filogenéticos, factores de virulencia, resistencia a antimicrobianos

ABSTRACT

Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) strains are cause of many infections in human and animals like avian pathogenic *E. coli* (APEC) and uropathogenic *E. coli* (UPEC) and both seems to share similar phylogenetic groups, virulence factors and resistance profiles considering a potential zoonotic risk. This study included 25 isolates of *E. coli* from clinical cases of avian colibacillosis and 37 isolates of *E. coli* from clinical urinary tract infection (UTI) in order to determine phylogenetic groups, virulence factors, serotypes and antimicrobial drug susceptibility. We identified that many of the isolates of avian colibacillosis belonged to O25, O88, O8 and O20 serotypes and isolates of urinary tract infection belonged to O128, O25, O2, O86, O12 and O100 serotypes. Avian colibacillosis isolates belonged to A (56%) phylogenetic group and D (44%) whereas in UTI isolates, main phylogenetic groups were D (54%), A (35%) and B2 (11%). Virulence factors of avian colibacillosis genes was *fimH*, *focG*, *iutA*, *sfa/focDE* and in urinary tract infection was *fimH*, *iutA*, *fyuA*, *focG*, considering *fimH*, *iutA* y *focG* the most prevalent on both isolates groups. Resistance was higher on trimetoprim/sulfametoxazole, ciprofloxacin, ampicillin, piperacilina, cefuroxima, levofloxacin, ampicilina/sulbactam, gatifloxacin on avian isolates, urinary tract infection isolates were resistant to ampicilina, piperacilina and trimetoprim/sulfametoxazole (68%) and both groups showed higher fluoroquinolone resistance. Our isolates mainly belonged to commensal phylogenetic groups with low virulence factors profile and high resistance on both, avian and human *E. coli* isolates.

Key words: Uropathogenic *Escherichia coli*, avian pathogenic *Escherichia coli*, serotype, phylogenetic group, virulence factor, resistance

INTRODUCCIÓN

Clasificación de *Escherichia coli*

Escherichia coli es un bacilo Gram-negativo, facultativo, fermentativo y pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* (Gyles *et al.*, 2004). Es la bacteria más estudiada a nivel mundial y para su comprensión se ha clasificado en tres grupos de importancia biológica para el humano: cepas comensales, cepas intestinales y cepas extraintestinales (Croxen y Finlay, 2010).

***E. coli* comensal**

El establecimiento de la microbiota del tracto gastrointestinal (TGI) en el humano y animales comienza al nacimiento, en ese momento se establece una combinación de hongos, virus, protozoarios, y en mayor abundancia (90%), bacterias anaerobias facultativas Gram-negativas no formadoras de esporas (Yegani y Kaver, 2008). El primer sitio de colonización del TGI, es el colon (Yan y Polo, 2004), en donde se conoce que *E. coli* es una de las primeras bacterias que inicia este proceso (Hooton, 2000). El origen de los primeros microorganismos colonizadores proviene de la madre y del ambiente (Bettelheim *et al.*, 1974). Actualmente se conocen 30 géneros como *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Peptostreptococcus* y *Fusobacterium* y 500 especies (Neish, 2002). Estos últimos microorganismos, mantienen una relación comensal con el hospedero obtiene beneficios sin causar ningún tipo de enfermedad y a cambio producen nutrientes como vitamina K, riboflavina y vitamina B₁₂ (Carter y Darla, 2004). La microbiota del TGI tiene un papel de protección, evitando o

disminuyendo el crecimiento de patógenos y su composición puede modificarse de acuerdo a la edad, pH, temperatura, clima, disponibilidad de agua y nutrientes, secreción de inmunoglobulinas, área geográfica, así como a administración prolongada de antibióticos (Bengmark, 1998). Las cepas comensales de *E. coli* que habitan el TGI carecen de la mayoría de los factores de virulencia, sin embargo, pueden estar relacionados a infecciones extraintestinales en condiciones específicas como presencia de un cuerpo extraño (catéter urinario), por alguna anomalía anatómica local o funcional (obstrucción urinaria, biliar o inmunocomprometido) o cambio en la localización de especies bacterianas (contaminación fecal de la cavidad peritoneal) (Rasko *et al.*, 2008).

***E. coli* intestinal**

Dentro de la microbiota del TGI existe un número de microorganismos oportunistas, en los que se considera a *E. coli*, la cual puede ocasionar una gran variedad de enfermedades intestinales como enteritis, enterocolitis y colitis (Russo y Johnson, 2003). Actualmente, *E. coli* intestinal se clasifica en seis patotipos: *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) y *E. coli* de adherencia difusa (DAEC) (Croxen y Finlay, 2010). Sumada a esta clasificación y en proceso de estudio, se ha considerado incluir a *E. coli* diarreogénica en conejos (RDEC), la cual produce lesiones de adherencia y esfacelamiento (A/E) en las células M de las placas de Peyer (Cantey y Blake, 1977; Inman y Cantey, 1983).

***E. coli* extraintestinal (ExPEC)**

De la misma manera que *E. coli* comensal, las cepas ExPEC se encuentran en la microbiota y no ocasionan enfermedad, difieren de las cepas comensales por la presencia de cierto grupo de genes de virulencia (Bonnet *et al.*, 2009) y genéticamente se consideran diferentes tanto a las cepas comensales como a las cepas intestinales. Un requisito para presentar una infección por ExPEC, es su adquisición y posterior colonización en sitios estériles del hospedero (vejiga, riñones, cavidad peritoneal, pulmones) (Rasko *et al.*, 2008). Dichas infecciones pueden presentarse en personas y animales de cualquier edad e involucra casi cualquier órgano o sitio anatómico ocasionando diversas infecciones en las que se incluyen, infecciones de tracto urinario (ITU), meningitis, infecciones intrabdominales, neumonía, infección intravascular, osteomielitis y colibacilosis. Los patotipos de origen extraintestinal se clasifican en cuatro grupos, *E. coli* asociada a meningitis (NMEC), *E. coli* asociada a septicemia (SEPEC), *E. coli* patógena aviar (APEC) y *E. coli* uropatógena (UPEC) (Johnson y Russo, 2002; Russo y Johnson, 2000). La patogenicidad de la mayoría de las enfermedades causadas por *E. coli*, se atribuye a los genes de virulencia específicos, que le confieren mayor capacidad de adaptación a nuevos nichos ocasionando un amplio espectro de enfermedades intestinales y extraintestinales (Johnson, 1991). Los factores de (FV) se encuentran codificados en elementos móviles como, plásmidos, transposones, bacteriófagos o islas de patogenicidad (PAI), elementos relacionados a la continua evolución y mayor diversidad de su genoma (Croxen y Finlay, 2010; Groisman, 2001, (Russo y Johnson, 2003). En este escenario, se cree que las cepas patógenas de *E. coli* parecen haber evolucionado de cepas no patógenas adquiriendo nuevos FV por transferencia horizontal (Hooton, 2000).

***E. coli* patógena aviar (APEC)**

El término colibacilosis denota una infección extraintestinal causada por *E. coli* patógena como agente primario (Goren, 1978) o secundario (Carter y Darla, 2004). Es una de las enfermedades más importantes en la producción aviar, dado que ocasiona disminución en el consumo de alimentación, retardo en el crecimiento, menor ganancia de peso, lo que representa grandes pérdidas económicas anuales en la industria debido a la elevada mortalidad y disminución de la producción (Ask *et al.*, 2006; Ewers *et al.*, 2009; Porter, 1998; Rodriguez-Siek, 2005b). Comúnmente en aves, la ruta de infección por *E. coli* patógena es por vía oral (Goren, 1978) y posteriormente afecta el tracto respiratorio pasa a través de la mucosa y entra a torrente sanguíneo causando colisepticemia (Whittam y Wilson, 1988), infección en el saco vitelino, aerosaculitis, perihepatitis, pericarditis, salpingitis, peritonitis, sinovitis, osteomielitis, celulitis y coligranuloma entérico (Gross, 1994). Los factores que predisponen a las aves a una infección por *E. coli* son genotipo del ave, enfermedad respiratoria por virus, ruta, dosis de infección y serogrupo de *E. coli* (Goren, 1978), así como estrés en las aves por cambios ambientales (Siegel y Gross, 1973). *E. coli* es conocida por su gran potencial para causar enfermedades extraintestinales, dado que puede ser eliminada en heces y logra persistir durante largos periodos fuera del hospedero, como en: suelo, arena, aguas residuales, fosas sépticas y plantas (Barnes *et al.*, 2003; Shanon, 2005; Whittam y Nevers, 2003). El humano puede adquirir cepas provenientes del intestino de las aves por contacto directo o contaminación de los subproductos (Vandemaele *et al.*, 2003). El patotipo de APEC, cuenta con genes específicos esenciales para su patogenicidad y virulencia, genes conservados involucrados en su metabolismo, fisiología, adaptación a cambios en el ambiente y resistencia a las defensas del hospedero (Dozois *et al.*, 2003).

Los serogrupos que reportan en trabajos previos de APEC son O1, O2, O9, O14, O78 y O85 (Allan *et al.*, 1993; Johnson *et al.*, 2007), en México se han identificado los serogrupos O19, O84, O8 y O78 como los más frecuentes (Rosario *et al.*, 2004). Los FV pueden variar de acuerdo a los diferentes serogrupos (Vandekerchove *et al.* 2004). Respecto al grupo filogenético, algunos estudios han encontrado que los aislamientos de APEC pertenecen principalmente al grupo A y B2 los cuales contienen mayor número de factores de virulencia (Sokurenko *et al.*, 2004; Rodríguez-Siek *et al.*, 2005a). Actualmente, se sugiere que la identificación de FV es la mejor forma para diferenciar a APEC de las *E. coli* aisladas de heces en pollos sanos, su potencial para provocar lesiones en órganos internos, así como el criterio y valoración del grado de virulencia de una cepa y finalmente la capacidad de la bacteria para persistir sistémicamente (Ewers *et al.*, 2009). Los genes que suelen encontrarse en cepas de APEC comparadas con *E. coli* de animales sanos son: *fimH*, *papC*, *papG*, *hra*, *tsh*, *fyuA*, *chuA*, *iroN*, *iucD*, *iutA*, *sitA*, *cvi/cva*, *iss*, *vat*, *ibeA*, *gimB*, *neuC* y *ompT*. Debido a estas características, entonces el patotipo típico de APEC debe contener genes involucrados en la adherencia como la fimbria tipo-1, expresada en tráquea, varios genes involucrados en la captación de hierro (*iroN*, *iutA*, *sitA*, *fyuA* e *irp2*) para la persistencia y lesión en órganos internos y tracto respiratorio, síntesis de LPS, resistencia al complemento y células fagocíticas y algunos de ellos codificados en plásmidos. Los factores de virulencia pueden variar de acuerdo a la enfermedad que cause *E. coli* (Ewers *et al.*, 2009; Rodríguez-Siek *et al.*, 2005a; Vidotto *et al.*, 1997). El aumento en la resistencia a antimicrobianos en aves se ha atribuido al uso indiscriminado y mal uso en el tratamiento, como promotores de crecimiento y mala higiene en la cadena productiva del alimento de estos animales. En general se ha podido ver un aumento en la resistencia a diversos antimicrobianos como,

kanamicina y estreptomina (97%), tetraciclinas (86%), ampicilina (30%), cloranfenicol (10%) y cefalosporinas (menor a 10%). Generalmente se ha observado que los aislamientos poseen resistencia a cinco o más antibióticos (Bass *et al.*, 1999). En la década pasada, se dio a conocer el primer reporte de resistencia a enrofloxacin y ácido nalidíxico en aislamientos de aves en EUA (White *et al.*, 2000). En la industria de las aves, se ha adjudicado la resistencia a antimicrobianos al uso de promotores de crecimiento, sin embargo, es una relación que no se ha podido demostrar en trabajos que consideran aislamientos de APEC (Bonnet *et al.*, 2009). Por otro lado, el uso de diversos grupos de antimicrobianos en veterinaria que son idénticos a los de uso humano han aumentado y esto representa un riesgo potencial para la salud humana, debido a la resistencia observada en diversas bacterias como *Salmonella* spp, y *Campylobacter* spp y cepas zoonóticas de *E. coli* (Casewell *et al.*, 2003).

***E. coli* uropatógena (UPEC)**

De la misma manera que APEC, los aislamientos de UPEC tienen la capacidad de causar infecciones extraintestinales, específicamente infecciones del tracto urinario (ITU). Las ITU son unas de las infecciones extraintestinales más comunes en humanos y UPEC es el responsable de al menos 80%. Afectan a mujeres y hombres de cualquier edad, sin embargo, en mujeres (1.2%) las visitas al médico representan el doble comparada con los hombres (0.6%). Las ITU tiene una importante morbilidad e impacto en la calidad de vida y los costos son muy elevados por su considerable incidencia incluyendo visitas al médico, prescripciones de medicamentos y hospitalizaciones (Foxman, 2002; Franz y Hörl, 1999; Justice *et al.*, 2004; Stamm, 2002). La orina en

todos los individuos sanos es estéril, frecuentemente es contaminada por comensales de la uretra anterior (Greenwood y Slack, 1982). La corta longitud de la uretra en la mujer permite que los uropatógenos que forman parte normal de la microbiota intestinal colonicen la región anal y asciendan al introito vaginal, área periuretral, uretra, vejiga y finalmente a los riñones (Franz y Hörl, 1999; Hooton, 2002). La defensa principal del hospedero contra la infección por bacterias es el flujo de orina a través de la uretra (Norris y Young, 2008). El tracto urinario también cuenta con otros mecanismos para prevenir la colonización, como respuesta inmune al antígeno fimbrial y el moco que actúa como una barrera a la adherencia (Kaper *et al.*, 2004). El patotipo de UPEC tienen factores específicos que le permiten colonizar sitios que no habita normalmente y le confieren mayor capacidad de adherencia por el potencial metabólico de producción de fimbrias, sistemas de secreción, sideróforos, adhesinas y evasión de la respuesta inmune del hospedero, lo que le permite persistir en el tracto urinario (Kaper *et al.*, 2004). Los serogrupos más representativos son, O1, O2, O4, O6, O7, O8, O16, O18, O25 y O75 (Lloyd *et al.*, 2007). Este patotipo pertenece principalmente al grupo B2 y en menor medida al grupo D, mientras que la mayoría de las cepas de *E. coli* comensales pertenecen al grupo A (Ewers *et al.*, 2009). Los FV que caracterizan a este patotipo, son *afa/dr*, *fimH*, *papC*, *sat*, *picU*, *tsh*, *iha*, *iroN*, *sitABCD*, *fyuA*, *iucABCD/iutA*, *chuA*, *hlyA*, *cnfI* y *usp* (Bower *et al.*, 2005). También se ha propuesto que algunas cepas de UPEC pueden contener FV de *E. coli* diarreogénicas (DEC), la mayoría asociados al patotipos EAEC. Hallazgos que sustentan la posibilidad de que al menos algunas cepas de EAEC son potenciales uropatógenos (Abe *et al.*, 2008). La adquisición de hierro también es un proceso básico para la sobrevivencia de cepas de UPEC, las cuales cuentan con diversos genes altamente conservados para su captación como, *iutA*, *fyuA*, *iroN*, *ireA* y *chuaA*,

entre otros (Clarke *et al.*, 2001; Hagan y Mobley, 2007). La resistencia en cepas de UPEC se visto principalmente a ampicilina, trimetoprim/sulfametoxazol, ampicilina/sulbactam, amoxicilina/ácido clavulánico, fluoroquinolonas y con menor frecuencia a cefuroxima, ceftriaxona y gentamicina (Aypak *et al.*, 2009).

Relación genética en aislamientos de APEC y UPEC

Una posible vía de transmisión para cualquier bacteria que colonice el intestino, es por vía fecal-oral. Esta vía implicaría que las cepas de APEC colonicen el intestino del humano proveniente de un alimento contaminado que pueden emerger como cepas virulentas si hay un cambio en el ambiente o inmunidad del hospedero causando posterior infección extraintestinal en el humano (ITU) y mamíferos dando como resultado un riesgo potencial zoonótico (Figura 1) (Ewers *et al.*, 2009; Rofriguez-Siek *et al.*, 2005a). El pollo puede ser fácilmente contaminado por *E. coli* en tres principales rubros: en el proceso de producción, tiendas de servicio (carne y huevo) y establecimientos de comida rápida. Esta contaminación se debe a poca higiene por parte del personal u otros productos crudos de pollo con otras bacterias patógenas (Ali *et al.*, 2009; Weiss y McMichael, 2004), hipótesis propuesta dada la similitud genética de los aislamientos de EXPEC, incluyendo aislamientos de humano y subproductos de pollos (Drugdová *et al.*, 2010; Ewers *et al.*, 2009; Mora *et al.*, 2009).

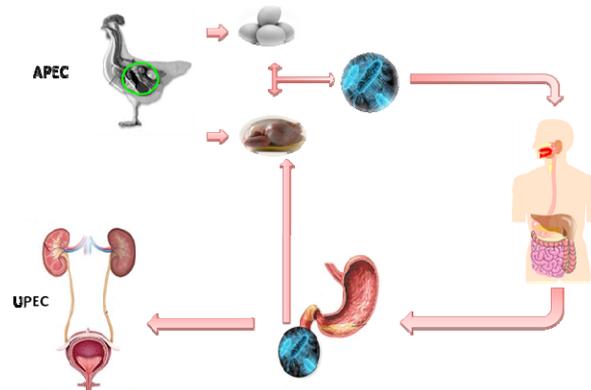


Figura 1. Relación en la contaminación de aislamientos de *E. coli* patógena aviar y *E. coli* uropatógena.

Los serogrupos más frecuentes en los que coinciden los patotipos de UPEC y APEC son, O1, O2, O4, O6, O8, O11, O15, O18, O19, O21, O23, O25, O36, O75, O77, O82, O83, O86, O109, O112 y O117 y en ambos, el serogrupo O2 es el más común (Johnson *et al.*, 2007; Rodríguez-Siek *et al.*, 2005b). El grupo filogenético que se ha encontrado con mayor frecuencia en ambos patotipos es el grupo D (Rodríguez-Siek *et al.*, 2005a). Al clasificar los aislamientos por grupo filogenético y posteriormente por serogrupos, los resultados difieren dado que en los estudios se encuentran diversos serogrupos, lo que dificulta tener una colección homogénea que considere un número de muestra con el mismo serogrupo y respectivo perfil de factores de virulencia. Mora *et al.*, (2009), realizaron los primeros trabajos de aislamientos de ExPEC (NMEC, ITU, septicemia y colibacilosis aviar) con un grupo más homogéneo de serotipos y observaron que uno de los más frecuentes, es 01:K1:H7/NM. Se ha descrito la similitud en ciertos FV entre UPEC y APEC, como la adhesina P y fimbria tipo 1 y *sitA*, *tratT*, *ompT*, *sfa/foc*, *fyuA*, *iutA* (Johnson *et al.*, 2006; Johnson *et al.*, 2007; Rodríguez-Siek *et al.*, 2005a). Por otro lado, se ha reportado que la cantidad de FV es un parámetro importante para conocer el

potencial de virulencia en ExPEC y que éstas tienden a contener menor número de genes de resistencia (Bonnet *et al.*, 2009). APEC y UPEC comparten 20 de 37 genes de virulencia comparado con EHEC (seis genes) o K-12 (cinco genes) (Zhao *et al.*, 2009). La relación en la resistencia y ambos patotipos se ha demostrado en trabajos que incluyen aislamientos de *E. coli* de humanos y aves encontrando un elevado porcentaje (40%) de aislamientos con integrones ampliamente diseminados en ambos grupos (Aryal, 2001; Connell, 1996). La manera en que el uso de antimicrobianos en animales puede contribuir a la resistencia en el humano aún está en debate. Se ha documentado que las bacterias resistentes a antibióticos como *E. coli*, *Salmonella* spp., y *Campylobacter* spp presentes en animales; pueden colonizar o infectar al humano por contacto directo (exposición directa con los animales) o por alimentos y que los genes de resistencia pueden ser transferidos de las bacterias de los animales a los patógenos del humano en el TGI (Van den Bogaard y Stobberinh, 1999).

Asimismo se han realizado diversos estudios con aislamientos de origen aviar y humano, en los cuales se ha demostrado que los subproductos de pollo pueden ser una fuente de *E. coli* resistente a fluoroquinolonas, bacteria que puede colonizar y causar bacteremia en humanos, además proponen que la resistencia de estas cepas se deba al uso de fluoroquinolonas en las aves (Johnson *et al.*, 2006). También han logrado demostrar que la resistencia en aislamientos de *E. coli* de heces y sangre de humanos, tienden a tener parecidas a la resistencia y susceptibilidad de *E. coli* de carne de pollo (Johnson *et al.*, 2007).

Métodos para el estudio de *E. coli* patógena

Determinación de serotipos en aislamientos *E. coli*

La serotipificación es una herramienta útil para la diferenciación de cepas patógenas y no patógenas, así como el desarrollo de investigaciones epidemiológicas. A partir de 1947, Kauffmann propone clasificar las cepas de *E. coli* de acuerdo a los antígenos superficiales, somático (O), capsular (K) y flagelar (H) (Hooton, 2000). El antígeno “O” determina el serogrupo y su combinación con el flagelar (O:H) se denomina serotipo; que en ocasiones coincide con un cuadro clínico en particular (Ewers *et al.*, 2009). De acuerdo al origen de los aislamientos, los serotipos pueden dividirse en dos grupos, (i) serotipos asociados a enfermedades diarreogénicas y (ii) serotipos de enfermedades extraintestinales (Orskov y Orskov, 1992).

Determinación de grupo filogenético en aislamientos de *E. coli*

Para el estudio de *E. coli* comensal y patógena, se ha utilizado un criterio de clasificación en cuatro grupos (A, D, B1 y B2), considerando la presencia o ausencia de los genes *chuA*, *yjaA* y TSPE4.C2. El gen *chuA*, es un gen que codifica para una proteína de membrana externa requerida para el transporte del grupo hemo en *E. coli* enterohemorrágica O157:H7, *yjaA*, gen identificado del genoma completo de *E. coli* K-12 que codifica para una proteína de la membrana externa no caracterizada y con función desconocida y TSPE4.C2 es un fragmento de ADN que codifica para una lipasa esterasa, donde los aislamientos clasificados en los grupos A y B1 son catalogados como comensales y los grupos B2 y D como patógenas (Arredondo-García *et al.*, 2004; Clermont *et al.*, 2000).

Determinación de factores de virulencia en aislamientos de *E. coli*

La virulencia de cepas ExPEC está determinada en gran medida por la presencia de genes que le permite adherirse, colonizar, tomar nutrientes esenciales, multiplicarse, evadir la respuesta inmune (local o sistémica) y promover una respuesta inflamatoria en diversos tejidos del hospedero (Johnson *et al.*, 2005). Los FV que predominan en ExPEC le han permitido causar infecciones fuera del TGI, tales como adhesinas (P y pili tipo 1), factores que evaden o revierten los mecanismos de defensa del hospedero (cápsula, lipopolisacáridos), mecanismos de captación de hierro (sideróforos) y toxinas (hemolisinas, factor necrotizante citotóxico1) (Russo y Johnson, 2003). La ganancia o pérdida de estos genes se debe a elementos genéticos móviles que modifican los genomas de las bacterias patógenas por transferencia genética horizontal. Este mecanismo, le permite a la bacteria receptora colonizar nuevos nichos (Croxen y Finlay, 2010). La adquisición, retención y expresión de FV en una población bacteriana es el resultado de la interacción entre el origen genético de la bacteria y la adquisición de nuevos genes. En este punto, es interesante considerar que no hay evidencia que la ganancia de un FV aumente la probabilidad de retención de otro FV (Escobar-Péramo *et al.*, 2004). La expresión de los genes que codifican FV generalmente está modulada en respuesta a cambios de temperatura, osmolaridad, pH, disponibilidad de carbono, niveles de oxígeno o fase de crecimiento de la bacteria (Groisman, 2001; Wu y Fives-Taylor, 2001).

Adhesinas fimbriales

Para asegurar la sobrevivencia y crecimiento en un nuevo nicho, las bacterias han desarrollado diversas estrategias de colonización y persistencia; adhiriéndose o invadiendo células superficiales del hospedero (Isberg, 1991). La adherencia a células eucariotas, es un paso esencial en el inicio de la patogénesis bacteriana, cuya actividad está mediada por estructuras llamadas adhesinas, las cuales se unen a receptores específicos de la célula eucariota. Las adhesinas se pueden localizar en algunas proteínas de membrana externa (ME) o al final de estructuras denominadas fimbrias; polímeros de proteínas compuestas por subunidades idénticas (1,000); apéndices muy delgados con un diámetro de 2 a 7 nm y 0.2 a 20 μm de largo. Cada bacteria puede contener de 100 a 1,000 de estos apéndices bacterianos (Krogfelt, 1991). La adherencia puede estar mediada por más de cuatro tipos de fimbrias y los genes que codifican para estas estructuras están localizados en el cromosoma bacteriano u otros elementos móviles (Klem, 1985). ExPEC cuenta con una gran variedad de adhesinas que le confieren ventajas para adaptarse a nuevos nichos (Antão *et al.*, 2009), explotando receptores específicos lo que determina el sitio específico de infección (Morschäuser *et al.*, 1990). Las fimbrias contribuyen a la virulencia de UPEC, sin embargo, no son el único factor asociado a la infección y enfermedad del hospedero (Smyth *et al.*, 1996). A continuación se describen algunas adhesinas relevantes para el presente trabajo.

FimH

Está compuesta por una subunidad mayor (FimA) y tres subunidades pequeñas (FimF, FimG y FimH); ésta última subunidad contiene el sitio de unión a manosa y es

responsable de mediar la adhesión a los receptores de mano-oligosacáridos (Figura 2a). Para la expresión de la fimbria tipo 1, se requieren por lo menos nueve genes (Madison *et al.*, 1994).

SfaS, FocG y SfaS/FocDE

La fimbria S la componen ocho proteínas (SfaC, B, A, D, E, F, G, H), *sfaS*, es el gen que codifica para la adhesina; proteína de 14 kilodaltones (kDa), que se une al ácido siálico, en unas glucoproteínas terminales de NeuNAc α -(2-3)-Gal (Morschäuser *et al.*, 1990). La fimbria S y FC1 pertenecen a la misma familia de adhesinas y están genética, inmunológica y funcionalmente relacionadas (Marre *et al.*, 1990).

El gen *sfa* codifica para la fimbria S y el gen *foc* codifica para la fimbria FC1, estos dos genes comparten una similitud del 73% en la composición de su ADN y epitopes de sus respectivas proteínas fimbriales. Por otro lado, difieren en regiones que codifican para las porciones hidrofílicas, las cuales son responsables de la especificidad serológica. Otro aspecto que las hace diferentes, son sus receptores, la fimbria S se une a α -ácido siálico- β -D-galactosa (residuos de la pared de células eucariotas) y la fimbria FC1 se une a una secuencia de disacáridos (GalNAcb1-4Galb) del asiol-GM₂ a las células del uroepitelio. Los estudios se han dirigido a la búsqueda de ambas por su relación funcional y por que las moléculas de la fimbria S están coexpresadas junto con la fimbria F1C en un mismo conjunto de genes (Ott *et al.*, 1988).

PapC

La estructura encargada de mediar la adhesión en el riñón (túbulos distales y proximales, glomérulo, tubos colectores) es el pili tipo P, la mayor parte está formado por subunidades repetidas de PapA y PapE, PapF y PapG localizadas en la punta del pili (Figura 2b). PapG tiene propiedades de adhesión a galabiosa, PapE une a la porción de la adhesina al filamento del pili y PapF es necesario para la unión de la bacteria a los receptores de galabiosa de PapG. PapK, finaliza la formación de la punta y envoltura de la fimbria. PapH es una proteína de anclaje en la base del pili, crecimiento y mantenimiento estable entre la asociación del pili y la célula. Los genes involucrados en la expresión del pili tipo P están contenidos en un operón. En el operón *pap*, los genes accesorios requieren para su ensamblaje de las subunidades PapC y PapD. PapC es un canal de membrana externa y PapD es una proteína periplásmica que estabiliza cuatro proteínas antes del ensamblaje del pili (Hultgren *et al.*, 1989).

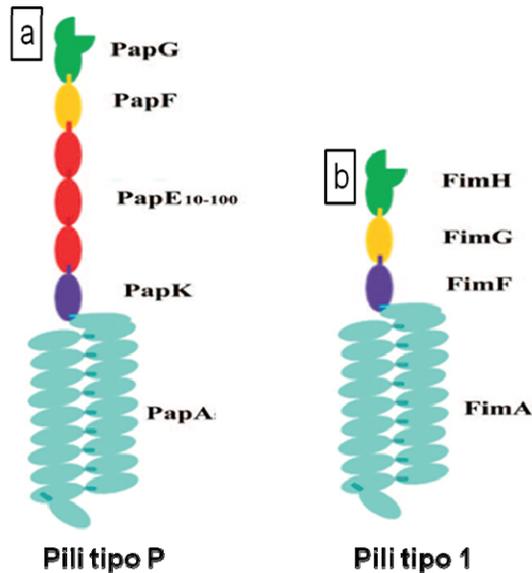


Figura 2. Esquema de los genes involucrados en la biogénesis del pili tipo P (a) y tipo 1 (b).

Sideróforos

El hierro es un elemento fundamental para procesos biológicos como la respiración y división celular, a las bacterias patógenas les permite colonizar y establecerse en el hospedero. En mamíferos, el hierro se encuentra principalmente dentro de las células; su modulación y mantenimiento se lleva a cabo a partir de la absorción intestinal, posteriormente es transportado a diversos órganos para su absorción y utilización celular o puede ser almacenado en tres proteínas, transferrina (sangre), lactoferrina (fluidos secretores) y ferritina (dentro de las células) (Eisenstein y Blemings, 1998; Braun y Killmann, 1999). Un desbalance en la homeostasis del hierro en el hospedero se debe a la patogénesis de alguna enfermedad infecciosa. En el proceso de inflamación, el hospedero reduce el hierro disponible, no obstante, las bacterias han desarrollado mecanismos para su adquisición a partir de las proteínas del hospedero transferrina, ferritina y grupo hemo por dos sistemas (Doherty, 1996). Estos dos sistemas consisten en: aquellos que se unen directamente al hierro o proteínas que lo contienen y aquellos sistemas que dependen de la excreción de sideróforos (ligandos de hierro de bajo peso molecular) y sus receptores. El hierro es reconocido y unido por receptores específicos de la superficie bacteriana y transportado activamente contra el gradiente de concentración al periplasma (White *et al.*, 2000).

IutA

Es un receptor de membrana de la aerobactina presente en *E. coli* con un peso de 74 kDa. Está contenido en un operón con cinco genes *iucABCD* (*iuc*, quelante de hierro) involucrados en la biosíntesis del sideróforo y *iutA* (*iut*, transportador de hierro) sirve

como unión inicial entre el complejo sideróforo-hierro y a la proteína de membrana interna TonB (Dozois *et al.*, 2003).

FyuA

Es un gen involucrado en la captación de hierro de la yersiniabactina (*Yersinia enterocolitica*) y pesticina (*Morgenella morganii*) (Carniel, 1999), expresado como una proteína de la membrana externa con un peso de 71 KDa (Hancock *et al.*, 2008). Teóricamente la proteína FyuA puede contribuir a la formación del biofilm alterando las características de adhesión de la célula. Se expresa en mayor número en la formación del biofilm, sobre todo en la primera fase, dado que la concentración de hierro en orina es muy baja (Hancock *et al.*, 2008).

Toxinas

El éxito de las bacterias para poder establecerse en el tejido está dado por la capacidad de adherirse, multiplicarse y causar daño al tejido, ésta última es otra característica importante en la virulencia de UPEC, por la capacidad de expresar diversas toxinas (Finlay y Stanley, 1989).

HlyA y CNF1

La α -hemolisina (HlyA) es una proteína citolítica (110 kDa) codificada por cuatro genes estructurales (*hlyC*, *hlyA*, *hlyB*, *hlyD*) contenidos en un operón (Ludwig *et al.*,

1996). El gen *hlyA* forma poros en la membrana, afectando a los eritrocitos, leucocitos y células de túbulos renales, por ello, se encuentra principalmente en cepas de *E. coli* provenientes de pacientes con pielonefritis (Kerényi *et al.*, 2005; Ludwig *et al.*, 1996) y ocasiona descamación del uroepitelio y hemorragia en la vejiga (Smith *et al.*, 2008). CNF1 (factor necrotizante citotóxico 1), es una proteína citoplasmática de 115 kDa, miembro de la familia de las toxinas que modifican la función de las proteínas de unión a GTP en células de mamíferos. La activación de Rho-A ocasiona modificaciones del citoesqueleto, anormalidades del ciclo celular y alteraciones en las vías de señalización de las células del hospedero que involucra a ciertos factores de transcripción (Davis *et al.*, 2005). Las cepas positivas a *cnf1* evaden con mayor facilidad la respuesta inflamatoria y se encuentran en mayor proporción en cepas EPEC y UPEC. En UPEC, modula la función de los polimorfonucleares lo cual facilita su sobrevivencia durante la respuesta inflamatoria aguda en tracto urinario y disminuye la actividad antimicrobiana de los leucocitos polimorfonucleares e induce inflamación en la vejiga (Davis *et al.*, 2005). Se ha propuesto que HlyA y CNF1 pueden ser responsables de los síntomas de cistitis en humanos y fuga de líquido vascular (Goren, 1978; Shanon, 2005).

Identificación de cepas resistentes a antimicrobianos en aislamientos de *E. coli*

La importancia de la resistencia a antimicrobianos se consideró a partir de 1990, y después de esta década es cuando se ha puesto mayor énfasis en el uso de antibacterianos en cultivos y producción animal concentrándose en: (1) menor uso de antibacterianos; (2) uso adecuado de antimicrobianos; (3) prevención en la infección cruzada y (4) desarrollo de nuevos antibacterianos (Livermore, 2003).

Las consecuencias que implica la resistencia a antimicrobianos son, costos elevados por falla en el tratamiento, estancias hospitalarias prolongadas, visitas en repetidas ocasiones por los mismos pacientes, producción de nuevos antimicrobianos así como una elevada mortalidad y morbilidad (Livermore, 2003). Las enfermedades ocasionadas por *E. coli*, han sido tratadas con antibióticos y han sido efectivos por varios años, sin embargo, muchas bacterias han adquirido resistencia a uno o más antibióticos aún con la rotación de éstos. La resistencia puede persistir debido a la presencia de genes de resistencia y perpetuación por cambios en la presión de selección (Bass *et al.*, 1999). Estas bacterias se han vuelto resistentes porque cuentan con diferentes estrategias para evitar la acción de los antibióticos y posteriormente las heredan a su progenie (Livermore, 2003). La transferencia horizontal (Figura 3), es la principal forma de adquirir resistencia; fenómeno dado por elementos genéticos como plásmidos, islas de patogenicidad, integrones y bombas de eflujo (Bonnet *et al.*, 2009).

La entrada de microorganismos a nuevos nichos, es un proceso biológico fundamental que representa el primer paso en la formación de nuevas cepas de microorganismos patógenos y una transición en la que algunos genes no logran adaptarse y se eliminan, mientras que para otros se seleccionan mutaciones benéficas permitiendo su perpetuación o expresión (Sokurenko *et al.*, 2004).

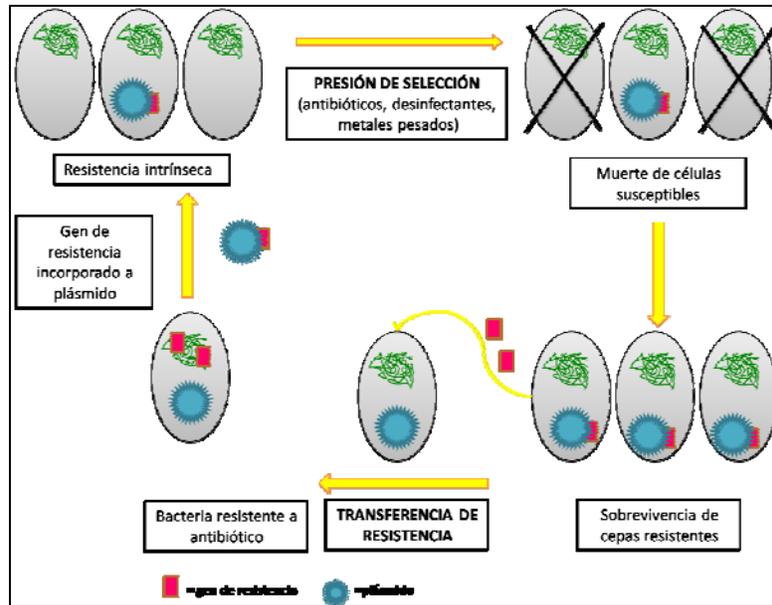


Figura 3. Imagen modificada de McDermott, 2002. Emergencia de resistencia a antimicrobianos.

Existen cuatro mecanismos por los cuales la resistencia de antimicrobianos perjudica la salud de animales y el humano dado que se puede presentar mayor número de enfermedades, más severas o difíciles de tratar. 1) Tratamientos sin terminar o por consumo de antibióticos antes de ser expuestos a un patógeno. 2) Relación genética entre la resistencia y factores de virulencia, dando como resultado el aumento de cepas resistentes. 3) Tratamiento empírico con previa resistencia del patógeno. 4) Aumento en el número de patógenos (número o variedad de organismos) en animales. El aumento en el número de patógenos en animales para consumo humano puede aumentar la carga de patógenos en el ambiente y en la cadena de alimentación hasta los consumidores (humano). 5) Las bacterias resistentes de origen alimentario pueden incluir patógenos y no patógenos como *E. coli*, la cual puede ser reservorio de genes de resistencia que puedan colonizar al humano vía alimento o ambiente (Aryal, 2001; Barza, 2002).

JUSTIFICACIÓN

E. coli es la principal causa de diarrea por alimentos de origen animal, debido a su diversidad, frecuencia e impacto económico en infecciones extraintestinales comparada con cualquier patógeno (Thorsteinsdottiret *al.*, 2010). Las ITU en países desarrollados es un problema de salud pública que se le ha dado gran importancia por las consecuencias tanto económicas como de salud, que pueden presentarse en la población de todas las edades pero principalmente en niños y mujeres. Estos países cuentan con datos que se aproximan a la situación real y les permite tener mayor atención en las infecciones de esta naturaleza y evitar mayor daño en los pacientes. Por otro lado, APEC es responsable de una elevada mortalidad y morbilidad en aves ocasionando grandes pérdidas económicas. Por ello, tanto UPEC como APEC se les da gran relevancia por los daños que ocasionan y la relación que existe entre estas. A nivel mundial existen pocos reportes sobre la posible relación entre las cepas de UPEC y APEC considerando antígenos de superficie (somáticos, flagelares, fimbriales y capsulares), resistencia, relación filogenética y la presencia de factores de virulencia. En nuestro país la relación de trabajos que involucren cepas de UPEC o APEC son pocos, por lo que es de gran importancia caracterizar cepas de UPEC y APEC para la detección de factores de virulencia, grupos filogenéticos, resistencia a antimicrobianos y serotipos.

HIPÓTESIS

Si las cepas de APEC y UPEC muestran similitud en sus patrones de resistencia, grupos filogenéticos, serotipos y factores de virulencia, entonces puede existir una relación entre ambos tipos de aislamientos.

OBJETIVO GENERAL

Determinar los grupos filogenéticos de aislamientos de *E. coli* uropatógena y *E. coli* patógena aviar, serotipificación, resistencia antimicrobiana y factores de virulencia.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Identificar los grupos filogenéticos mediante la detección de los genes *chuA*, *yjaA* y el fragmento TSPE4.C2.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC).
- Identificación de factores de virulencia (*fimH*, *sfaS*, *sfa/focDE*, *focG*, *papC*, *iutA*, *fyuA*, *cnfI*, *hlyA*).
- Determinar los antígenos O y H.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas, cultivos e identificación de *E. coli*

Se obtuvieron 37 cultivos de *E. coli* a partir de muestras de orina de mujeres con síntomas clínicos de cistitis obtenidos en los años 2008 y 2009, provenientes del servicio de laboratorio clínico del Hospital General Dr. Manuel Gea González. El grupo de APEC, se obtuvo un total de 25 aislamientos de aves con colibacilosis, aislamientos de: huevo picado (3), pollo de una semana (1) y de 2 semanas (1) así como pollo de engorda de 2 semanas (14) y 5 semanas (6), de saco vitelino, médula ósea, hígado y pulmón, proporcionadas por el Departamento de Medicina y Zootecnia de Aves de la

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Los aislamientos se sembraron en medio MacConkey e incubadas a 37°C por 16 horas. Cada cepa se sembró en tres placas, el cultivo de una placa se cosechó para hacer extracción de ADN, la segunda placa para ser almacenada a -80°C en una suspensión de caldo infusión cerebro (BHI) corazón-glicerol al 50% y la tercera para ser identificados en el servicio de laboratorio clínico utilizando el sistema automatizado MicroScan (DADE BEHRING) (Figura 4).

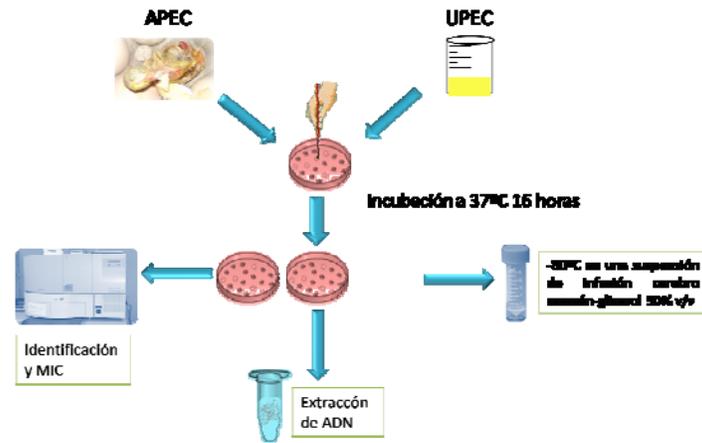


Figura 4. Aislamiento, identificación y almacenamientos de APEC y UPEC

Serotipos

La metodología empleada para la tipificación serológica fue la descrita previamente por Orskov y Orskov (1984). En relación a la tipificación serológica del antígeno somático (O) se utilizaron 186 sueros anti-O del esquema antigénico actualizado de *E. coli* obtenidos de conejo y 56 contra el antígeno flagelar (H). El esquema antigénico fue actualizado por el Dr. Flemming Scheutz del International *Escherichia* and *Klebsiella*

Centre (WHO) en Copenhage. En la tipificación serológica se incluyeron 45 sueros anti-O de *Shigella* spp (*S. dysenteriae* O1-O15; *S. boydii* O1-O20; *S. flexneri* O1-O6, con sus subtipos a y b de O1, O2, O3, O4 y O5 además las variedades X e Y; *S. sonnei* I y II). Adicionalmente se incluyeron dos sueros anti-O del nuevo serogrupo recientemente propuesto por el laboratorio de Bacteriología de la Facultad de Medicina (Navarro *et al.*, 2010).

Extracción de ADN, determinación de grupos filogenéticos y factores de virulencia

La extracción de ADN se realizó con la técnica de tiocianato de guanidina descrita por Pitcher *et al.*, (1989) basada en la lisis de las células bacterianas y precipitación del ADN para la determinación de grupos filogenéticos y factores de virulencia. Se coloca una porción de colonia más 200µl de solución inyectable, homogeneizar, centrifugar y eliminar el sobrenadante y se conserva la pastilla bacteriana. Paso 1. Agregar 550 µl solución de lisis, mezclar. Paso2. Agregar 250µl de acetato de amonio, colocar en hielo por 10 min. Paso3. Adicionar 500 µl de cloroformo-isoamilalcohol y mezclar por 5 min. Paso4. Tomar el sobrenadante y repetir el paso 3. Paso 5. Tomar sobrenadante y precipitar con isopropanol o alcohol al 100%, centrifugar por 10 min, decantar sobrenadante. Paso 6. Lavar con 1ml de etanol al 70% (tres veces), centrifugar y decantar sobrenadante y dejar secar por 12 h (Figura 5). La cantidad y calidad se analizó en geles de agarosa al 1.5% teñido con 4 µl de bromuro de etidio a una concentración de 0.5µg/mL. El ADN total se utilizó para la determinación de grupos filogenéticos y factores de virulencia.

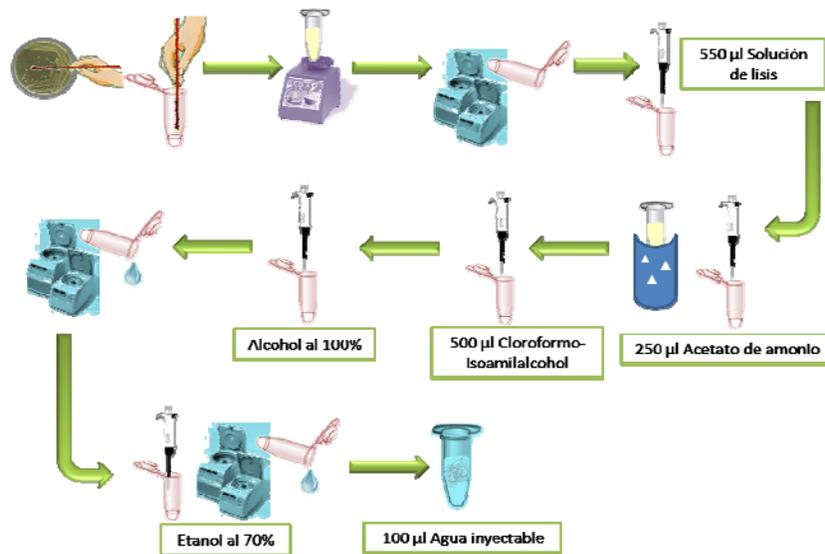


Figura 5. Extracción de ADN genómico con técnica de tiocianato de guanidina.

La determinación de los grupos filogenéticos se realizó con PCR múltiple. Los iniciadores utilizados fueron descritos por Clermont *et al.*, (2000) para detectar los genes *chuA*, *yjaA* y TSPE4.C2 (Cuadro 1). Las condiciones de PCR consistieron en 5 min a 94°C de desnaturalización inicial seguido de 30 ciclos por 30 s a 94°C, 30 s a 59°C y 30 s a 72°C y una extensión final de 5 min a 72°C. La amplificación de *chuA* +, *yjaA* +, corresponde al grupo filogenético B2; *chuA* +, *yjaA* -, corresponde al grupo D; *chuA* -, TspE4.C2 +, al grupo B1 y *chuA* -, TspE4.C2 -, grupo A (Figura 6).

Cuadro 1. Iniciadores para la determinación de grupos filogenéticos

Gen	Secuencia de iniciadores 5'-3'	Nombre	Tm	Tamaño del producto (pb)
<i>chuA</i>	gacgaaccaacggtcaggat	ChuA.1	62°C	279
	tgcccagtagtaaaagaca	ChuA.2	62°C	
<i>yjaA</i>	tgaagtgtcaggagacgct	YjaA.1	62°C	211
	atggagaatgcgttcctcaac	YjaA.2	62°C	
TSPE4.C2	gagtaatgtcggggcattca	TspE4C2.1	62°C	152
	cgcccaacaaagtattacg	TspE4C2.2	62°C	

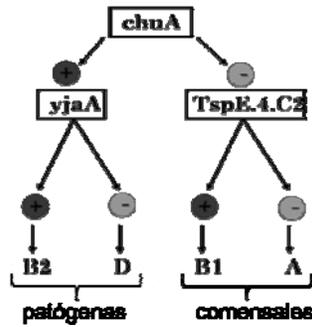


Figura 6. Determinación de grupo filogenético en aislamientos de *E. coli* con la amplificación de los genes *chuA*, *yjaA* y fragmento de ADN TspE4.C2.

La identificación de los factores de virulencia se realizó de acuerdo a lo descrito por Johnson *et al.*, (2000) modificando los genes integrados en cada uno de las reacciones (Cuadro 2). El total de genes a identificar fueron nueve (*fimH*, *sfaS*, *sfa/focD*, *focG*, *papC*, *iutA*, *fyuA*, *cnf1*, *hlyA*), realizados en cuatro reacciones diferentes de PCR múltiple y convencional (Cuadro 3). Los productos amplificados se observaron en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.

Resistencia a antimicrobianos

Se determinó la concentración mínima inhibitoria (MIC) y quimioteráuticos resistentes asociados a la presencia de beta-lactamasas mediante el sistema automatizado MicroScan (DADE BEHRING) de 25 antimicrobianos: amikacina, amoxicilina/ácido clavulánico, ampicilina/sulbactam, ampicilina, aztreonam, cefazolina, cefalotina, cefepime, cefotaxima, cefotetán, cefoxitin, ceftazidima, ceftriaxona, cefuroxima, ciprofloxacina, gatifloxacina, gentamicina, imipenem, levofloxacina, piperacilina/tazobactam, piperacilina, tircacilina/ácido clavulánico, tobramicina y trimetoprim/sulfametoxazol.

Cuadro 2. Iniciadores para la detección de factores de virulencia

Gen	Secuencia de iniciadores 5'-3'	Nombre	Tm	Tamaño del producto (pb)
<i>fyuA</i>	tgattaacccccgcgacgggaa	FyuA f	64.5°C	880
	cgcagtaggcacgatgttga	FyuA r	62.6°C	
<i>iutA</i>	ggctggacatcatgggaactgg	AerJ f	66.4°C	300
	cgctgggaacgggtagaatcg	AerJ r	66.5°C	
<i>fimH</i>	tgcagaacggataagccgtgg	FimH f	64.5°C	508
	gcagtcacctgcctccggta	FimH r	68.4°C	
<i>sfa/focDE</i>	ctccggagaactgggtgcatttac	Sfa1	67.9°C	410
	cggaggagtaattacaacctggca	Sfa2	64.6°C	
<i>focG</i>	cagcacaggcagtgatacga	FocG f	64.5°C	360
	gaatgtcgcctgccattgct	FocG r	64.5°C	
<i>sfaS</i>	gtggatacgacgattactgtg	SfaS f	60.6°C	240
	ccgccagcattccctgtattc	SfaS r	64.5°C	
<i>papC</i>	gtggcagtatgagtaatgaccgta	PapC f	62.9°C	200
	atatcctttctgcaggatgcaata	PapC r	61.3°C	
<i>hlyA</i>	aacaaggataagcactgttctggct	hly f	62.9°C	1177
	Accatataagcggcattcccgta	hly r	64.6°C	
<i>cnfI</i>	aagatggagttcctatgcaggag	cnf1	62.9°C	498
	cattcagagtcctgcctcattatt	cnf2	62.9°C	

Cuadro 3. Condiciones de PCR para amplificación de FV en APEC y UPEC

Reacción	Genes	Desnaturalización	Alineación	Extensión
Reacción 1	<i>fimH, fyuA y iutA</i>	30 s 94 °C	30 s 65.5°C 30 ciclos	30 s 68 °C
Reacción 2	<i>sfa/focDE, cnfI, sfaS, focG</i>	30 s 94 °C	30 s 65.5 °C 30 ciclos	30 s 68°C
Reacción 3	<i>hlyA</i>	30 s 94 °C	30 s 63°C 30 ciclos	10 min 68°C
Reacción 4	<i>papC</i>	30 s 94 °C	30 s 58.2 °C 40 ciclos	40 s 72 °C

RESULTADOS

Serotipos

De los 25 aislamientos de APEC se identificaron 11 diferentes serogrupos (Cuadro 4), los más frecuentes fueron O25 con cinco aislamientos, O88 con cuatro aislamientos, O8 y O20 con tres aislamientos cada uno, y O128 con dos aislamientos, el resto de los serogrupos con un aislamiento. Sólo dos aislamientos no fueron tipificables. De acuerdo al antígeno “H”, 17 aislamientos fueron móviles y ocho no móviles y el serotipo más frecuente fue O25:H1 (cinco aislamientos).

En los 37 aislamientos de UPEC, se encontraron 13 diferentes serogrupos. Los serogrupos más frecuentes fueron O25 (seis aislamientos), O2 y O86 (cuatro aislamientos cada uno), O12 y O100 (tres aislamientos cada uno), mientras que siete aislamientos resultaron no tipificables. Los resultados del antígeno H, indican que 21 aislamientos son móviles y 16 no móviles. El serotipo más frecuente fue O86:H18 (Anexo 1 y 2).

Determinación del grupo filogenético y factores de virulencia

En los aislamientos de APEC se determinó que 14 (56%) aislamientos pertenecieron al grupo A y 11 (44%) al grupo D y en UPEC, 4 (11%) aislamientos pertenecieron al grupo B2, 20 (54%) al grupo D y 13 (35%) al grupo A (Cuadros 4 y 5).

En APEC, los genes que se encontraron con mayor frecuencia fueron *fimH* con un 96%, seguido de *focG* con un 84%, *iutA* con 80% y *sfa/focDE* con 68%. Con menor frecuencia *sfaS* con un 28%, *cnfI* con 24%, *hly* con 12% y *fyuA* con 8%. En UPEC, los genes que se detectaron con mayor frecuencia fueron, *fimH* con 89%, seguido de *iutA*

con 84%, *fyuA* con 68%, *focG* con 59% y con menor frecuencia *sfa/focG* con el 32%, *sfaS* con 27%, *cnfI* con un 24%, *papC* con el 3%, *hlyA* con 3%. Los genes con mayor frecuencia en ambos grupos de APEC y UPEC, fueron *fimH*, *iutA* y *focG* (Cuadros 4).

Cuadro 4. Grupo filogenético, FV y serotipos en aislamientos de APEC y UPEC

Categoría	Frecuencia de UPEC y APEC No. (%) de aislamientos	
	APEC	UPEC
Grupo filogenético		
Grupo A	14 (56)	13 (35)
Grupo B1	0	0
Grupo B2	0	4 (11)
Grupo D	11 (44)	20 (54)
Adhesinas		
<i>fimH</i>	24 (96)	32 (66)
<i>sfaS</i>	7 (28)	10 (27)
<i>sfa/focDE</i>	17 (68)	12 (52)
<i>focG</i>	21 (84)	22 (59)
<i>papC</i>	0	1 (27)
Sideróforos		
<i>fyuA</i>	2 (8)	30 (61)
<i>iutA</i>	20 (80)	24 (64)
Toxinas		
<i>hlyA</i>	3 (12)	9 (24)
<i>cnfI</i>	6 (24)	1 (27)

Resistencia a antimicrobianos

En los 25 aislamientos de APEC se observó una elevada resistencia a los antimicrobianos probados. La combinación trimetoprim/sulfametoxazol (88%), ciprofloxacina (76%), ampicilina y piperacilina (72%), cefuroxima (64%), levofloxacina (60%) ampicilina/sulbactam (52%) y gatifloxacina (52%). De acuerdo a los grupos de antimicrobianos, observamos con mayor frecuencia a las fluoroquinolonas (52-76%). Todos los aislamientos mostraron ser sensibles a imipenem, piperacilina/tazobactam, tircacilina/ácido clavulánico y amikacina (Cuadro 5).

La resistencia asociada a beta-lactamasas está relacionada en 4 aislamientos principalmente ligados al grupo de cefalosporinas (Cuadro 5). Los patrones de resistencia más frecuentes fueron cuatro: (SXT), (AMP, PRL, SXT), (AMC, SAM, AMP, ATM, KZ, KF, FEP, CAZ, CRO, CXM, CIP, GAT, LEV, PRL, SXT) y (AMC, SAM, AMP, ATM, KZ, KF, FEP, CTX, FOX, CAZ, CRO, CXM, CIP, GAT, LEV, PRL, SXT) con dos aislamientos cada uno. Once aislamientos fueron resistentes a más de 12 antimicrobianos (Cuadro 6).

Los resultados de los aislamientos de UPEC en humanos, se observó que los antimicrobianos con mayor resistencia fueron: ampicilina (76%), piperacilina (73%) y la combinación de trimetoprim/sulfametoxazol (68%). En el mismo ejercicio para los grupos de antimicrobianos, observamos con mayor frecuencia en el grupo de las fluoroquinolonas (32-38%). Todos los aislamientos mostraron ser sensibles a imipenem, meropenem, cefotetán y amikacina. La resistencia asociada a beta-lactamasas estuvo relacionada en 11 aislamientos principalmente ligado al grupo de cefalosporinas (Cuadro 5). El patrón de resistencia más frecuente fue, AMC, AMP,

PRL, SXT en un total de con ocho aislamientos. Ocho aislamientos fueron resistentes a más de 12 antimicrobianos (Cuadro 7).

Al comparar ambos grupos de aislamientos (APEC-UPEC), la resistencia es mayor en los aislamientos de APEC, y respecto a la susceptibilidad resultaron similares en solo tres antimicrobianos, imipenem, piperacilina/tazobactam y amikacina. Los antimicrobianos que coinciden con elevada resistencia son, ampicilina/sulbactam, ampicilina, piperacilina, piperacilina/tazobactam, trimetoprim/sulfametoxazol, ciprofloxacina, gatifloxacina y levofloxacina (Cuadro 5).

Los aislamientos de APEC pertenecientes al serotipo O25:H1, no estuvieron asociados a algún grupo filogenético en particular, pero en altos porcentajes los genes de virulencia *fimH* y *iutA*. Los aislamientos clasificados en el grupo filogenético A, contiene principalmente los genes *fimH*, *focG* y *iutA*, mientras que en los aislamientos con el grupo D, los genes *fimH*, *sfa/focDE*, *focG* y *iutA* fueron los más frecuentemente.

Los aislamientos de UPEC con el serotipo O25:NM correspondieron en su mayoría al grupo filogenético D, asimismo contienen en mayor proporción los genes *fimH* y *iutA*. El total de los aislamientos del grupo filogenético A contiene principalmente los genes *fimH*, *focG*, *iutA* y *fyuA* y del total de los aislamientos del grupo D, los genes *fimH*, *iutA* y *fyuA* fueron los más frecuentemente encontrados, mientras que el gen *focG* estuvo mas asociado al grupo B2. Dada la gran diversidad en la combinación del total de quimioterapéuticos utilizados en este estudio, no se observó alguna relación en ambos tipos de aislamientos APEC y UPEC con respecto a la resistencia a antimicrobianos, serotipos, grupos filogenéticos y factores de virulencia.

Cuadro 5. **Resistencia a antimicrobianos y presencia de betalactamasas en aislamientos de APEC y UPEC

Antimicrobiano	No. (%) de aislamientos resistentes a cada antimicrobiano			
	APEC		UPEC	
	R	*ESBL	R	*ESBL
Amoxicilina/ácido clavulánico	10 (40)	0	2 (5)	0
Ampicilina/sulbactam	13 (52)	0	16 (43)	0
Ampicilina	18 (72)	0	28 (76)	9
Aztreonam	11 (44)	1	9 (24)	8
Imipenem	0	0	0	0
piperacilina/tazobactam	0	0	0	0
piperacilina	18 (72)	0	27 (73)	7
trimetoprim/sulfametoxazol	22 (88)	0	25 (68)	0
tircacilina/ácido clavulánico	0	0	1 (3)	0
cefazolina	11 (44)	0	9 (24)	9
cefalotina	11 (44)	0	2 (5)	2
Cefepime	11 (44)	0	9 (24)	9
ceftriaxona	11 (44)	3	6 (16)	6
cefotetán	5 (20)	0	0 (0)	6
Cefoxitin	10 (40)	0	0	0
ceftazidima	10 (40)	9	8 (22)	7
cefalotina	11 (44)	0	9 (24)	8
ceftriaxona	11 (44)	11	7 (19)	7
cefuroxima	16 (64)	0	14 (38)	7
ciprofloxacina	19 (76)	0	12 (32)	0
gatafloxacina	13 (52)	0	13 (35)	0
levofloxacina	15 (60)	0	2 (5)	0
amikacina	0	0	0	0
Gentamicina	3 (12)	0	8 (22)	0
Tobramicina	3 (12)	0	9 (24)	0

R= resistente; *ESBL= betalactamasa de amplio espectro ** Para este cuadro, sólo se consideraron los aislamientos resistentes y se omitieron los resultados de aislamientos susceptibles e intermedios.

Cuadro 6. Patrones de resistencia en aislamientos de APEC

Patrón de resistencia en aislamientos de APEC	No. aislamientos resistentes
SXT	2
AMP, PRL, SXT	2
CIP, GAT, LEV,	1
CXM, CIP, GAT, LEV, SXT	1
CIP, GAT, CN, LEV, TOB, SXT	1
AMP, CIP, GAT, LEV, PRL, SXT	1
SAM, AMP, CN, PRL, TOB, SXT	1
SAM, CIP, GAT, LEV, PRL, SXT	1
AMP, CIP, GAT, LEV, PRL, TOB, SXT	1
SAM, AMP, CXM, CIP, GAT, LEV, PRL, SXT	1
AMC, SAM, AMP, ATM, KZ, KF, FEP, CAZ, CRO, CUX, PRL, SXT	1
AMC, AMP, ATM, KZ, KF, FEP, CTX, CTT, FOX, CAZ, CRO, CXM, CIP, PRL	1
AMC, SAM, AMP, ATM, KZ, KF, FEP, CTX, FOX, CRO, CXM, CIP, PRL, SXT	1
AMC, SAM, AMP, ATM, KZ, KF, FEP, CAZ, CRO, CXM, CIP, LEV, PRL, SXT	1
AMC, SAM, AMP, ATM, KZ, KF, FEP, CTX, CRO, CXM, CIP, GAT, LEV, PRL, SXT	1
AMC, SAM, AMP, ATM, KZ, KF, FEP, CAZ, CRO, CXM, CIP, GAT, LEV, PRL, SXT	2
AMC, SAM, AMP, ATM, KZ, KF, FEP, CTX, FOX, CAZ, CRO, CXM, CIP, LEV, PRL	1
SAM, AMP, ATM, KZ, KF, FEP, CAZ, CRO, CTX, CXM, CIP, GAT, CN, LEV, PRL, SXT	1
AMC, SAM, AMP, ATM, KZ, KF, FEP, CTX, FOX, CAZ, CRO, CXM, CIP, GAT, LEV, PRL, SXT	2
R > 5	7
R > 10	4
R > 15	7

R>4= número de aislamientos resistentes a más de 4 antimicrobianos; R>8= a más de 8 antimicrobianos; R>12= a más de 12 antimicrobianos; AMC=amoxicilina/ácido clavulánico; SAM=ampicilina/sulbactam; AMP=ampicilina; ATM=aztreonam; IPM=imipenem; TZP=piperacilina/tazobactam; PRL=piperacilina; SXT=trimetoprim/sulfametoxazol; TIM=tircacilina/ácido clavulánico KZ=cefazolina; KF=cefalotina; FEP=cefepime; CTX=cefotaxima; CTT=cefotetán; FOX=cefoxitin; CAZ=ceftazidima; CRO=ceftriaxona; CXM=cefuroxima; CIP=ciprofloxacina; GAT=gatifloxacina; LEV=levofloxacina; AK=amikacina; CN=gentamicina; TOB= tobramicina.

Cuadro 7. Patrones de resistencia en aislamientos de UPEC

Patrón de resistencia	No. aislamientos resistentes
AMP, SXT	1
AMP, PRL	1
AMP, PRL, SXT	3
AMP, TIM, SXT	1
GAT, PRL, SXT	1
AMP, CIP, PRL, SXT	1
SAM, AMP, PRL, SXT	8
AMC, AMP, PRL, SXT	1
CIP, GAT, CN, LEV, TOB	1
SAM, AMP, CIP, GAT, CN, LEV, PRL, SXT	1
SAM, AMP, CIP, GAT, CN, LEV, PRL, TOB, SXT	1
SAM, AMP, CAZ, CIP, GAT, LEV, PRL, TOB, SXT	1
AMP, ATM, KZ, FEP, CTX, CAZ, CRO, CXM, CIP, LEV, SXT	1
SAM, AMP, ATM, KZ, FEP, CAZ, CRO, CXM, LEV, PRL, SXT	1
SAM, AMP, ATM, KZ, FEP, CTX, CRO, CIP, GAT, LEV, PRL, SXT	1
AMP, ATM, KZ, FEP, CTX, CAZ, CRO, CIP, GAT, LEV, PRL, TOB	1
AMC, AMP, ATM, KZ, KF, FEP, CAZ, CRO, CXM, CIP, GAT, CN, LEV, PRL, SXT	2
SAM, AMP, ATM, KZ, FEP, CTX, CAZ, CRO, CXM, CIP, GAT, CN, LEV, PRL, TOB,	2
SAM, AMP, ATM, KZ, FEP, CTX, CAZ, CRO, CXM, CIP, GAT, CN, LEV, PRL, TOB, SXT	1
R > 5	4
R > 10	4
R > 15	5

R>4= número de aislamientos resistentes a más de 4 antimicrobianos; R>8= a más de 8 antimicrobianos; R>12= a más de 12 antimicrobianos; AMC=amoxicilina/ácido clavulánico; SAM=ampicilina/sulbactam; AMP=ampicilina; ATM=aztreonam; IPM=imipenem; TZP=piperacilina/tazobactam; PRL=piperacilina; SXT=trimetoprim/sulfametoxazol; TIM=tircacilina/ácido clavulánico KZ=cefazolina; KF=cefalotina; FEP=cefepime; CTX=cefotaxima; CTT=cefotetán; FOX=cefoxitin; CAZ=ceftazidima; CRO=ceftriaxona; CXM=cefuroxima; CIP=ciprofloxacina; GAT=gatifloxacina; LEV=levofloxacina; AK=amikacina; CN=gentamicina; TOB= tobramicina.

DISCUSIÓN

El análisis de grupos filogenéticos es una herramienta que es utilizada para diferenciar cepas comensales (B1 y A) de cepas patógenas (B2 y D) (Clermont *et al.*, 2000). Las cepas comensales de *E. coli* que habitan el TGI se caracterizan por no presentar un gran número de factores de virulencia (Ask *et al.*, 2006). Éstas necesitan una combinación de elementos genéticos móviles o señales que afecten la expresión de ciertos genes de virulencia, para convertirse en un patógeno altamente adaptable capaz de causar enfermedad fuera del TGI tanto en aves como en humanos (Croxen y Finlay, 2010; Drugdová *et al.*, 2010; Johnson *et al.*, 2008). Nuestros aislamientos mostraron pertenecer principalmente al filogrupo de comensales con bajo perfil de factores de virulencia y elevada resistencia. Fenómeno que ha sido explicado por Moreno *et al.* (2006), quienes proponen que las cepas que han adquirido una gran diversidad de factores de virulencia, generalmente cuentan con poca resistencia y viceversa.

El estudio serológico sigue siendo un método de clasificación muy útil para el estudio de cepas de *E. coli* y otros microorganismos. La importancia del estudio serológico radica en varios puntos, ya que permite determinar la prevalencia de una serovariedad en distintas áreas geográficas, realizar estudios de brotes, conocer la fuente de infección, así como las vías de transmisión (Terragno *et al.*, 2001). En este estudio, en los aislamientos de pollos se identificó un total de 11 diferentes serogrupos y dentro de ellos, los más frecuentes fueron O25, O88, O8, O20, seguido de O128 y en UPEC se encontraron 13 diferentes serogrupos y los más frecuentes fueron O25, O2, O86, O12, O100. Los serotipos más frecuentes como O2 y O78 y la diversidad de serotipos en pollos con colibacilosis, son comunes en estudios de diversos órganos (Rodríguez-Siek, 2005a). De la misma manera sucede en UPEC, existen serogrupos frecuentes y una gran

diversidad de ellos en pacientes con ITU: O1, O2, O4, O6, O7, O8, O15, O16, O18, O25, O26, O75 (Lloyd *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2009). En ambos tipos de aislamientos coincidió el serogrupo O25, el cual ha sido reportado en pollos con colibacilosis, aunque es considerado entre los menos frecuentes (Zhao *et al.*, 2005), caso contrario a UPEC, dado que es uno de los serotipo más frecuente (Lloyd *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2009). Respecto al número de aislamientos no tipificables, dos (8%) correspondieron a los aislamientos de pollo y siete (18.9%) a los aislamientos de infección urinaria, fenómeno que ha sido reportado en otros estudios con el mismo tipo de aislamientos. El número de cepas no tipificables en UPEC ha sido reportado hasta un 17.41% del total de los aislamientos (Jadhav *et al.*, 2011), mientras que en APEC llega a cubrir el 1.3% (Ewers *et al.*, 2004).

Actualmente se sabe que existe una desventaja por el traslape en los serogrupos de APEC, *E. coli* aislada de heces en pollos sanos y también en otros aislamientos de ExPEC (Ewers *et al.*, 2009). Por ello la importancia de trabajar serotipos de acuerdo a las manifestaciones clínicas, dado que frecuentemente el serotipo está relacionado con el lugar de infección y a esto se suma la variable de encontrar serogrupos no tipificables, lo que es común en todos los patotipos de *E. coli* (Ali *et al.*, 2009). En general, los serogrupos encontrados en este estudio, no coinciden con los reportados tanto en APEC y UPEC. En nuestro país y en trabajos reportados en otros países, esta situación podría radicar en la medidas sanitarias y previa exposición de *E. coli*, situación que difiere en países desarrollados y en vías de desarrollo (Terragno *et al.*, 2001; Weiss y McMichael, 2004).

En lo que refiere a los grupos filogenéticos, se encontró que en los aislamientos de pollos con colibacilosis el 56% correspondieron al grupo filogenético A y 44% al grupo

D. De acuerdo al estudio reportado por Zhao *et al.* (2009) determinaron que los aislamientos de pollos con colibacilosis corresponden al grupo A y B2 y con menor frecuencia D y B1, lo que difiere con lo reportado por Johnson *et al.* (2008) y Rodríguez, (2005b) quienes lo asocian principalmente al grupo A y D. En los aislamientos de pacientes con IVU de nuestro estudio, pertenecieron principalmente al grupo A, B2 y D, no encontrando aislamientos correspondientes al grupo B1. Rodríguez *et al.* (2005b) y Zhao *et al.* (2009) en aislamientos de *E. coli* en pacientes con IVU encontraron que principalmente pertenecen al grupo B2 y D. Se ha propuesto que tal variedad en la distribución de los grupos filogenéticos puede cambiar de acuerdo al área geográfica, condiciones climáticas, alimentación, uso de antibióticos o factores genéticos del hospedero. También es importante considerar que aún cuando las cepas del grupo B2 son escasas, son potencialmente virulentas, lo que explica que sean aisladas de infecciones extraintestinales (Duriez *et al.*, 2001).

Con respecto a los factores de virulencia, en este estudio, *fimH* se observó en el 96% y 89% de los aislamientos de APEC y UPEC, respectivamente; frecuencia que coincide con lo reportado por Zhao *et al.* (2009), quienes observaron que en ambos patotipos *fimH* se encuentra en el 90% de los aislamientos. La presencia de *fimH* en éste y otros estudios, se debe a que *E. coli* ha evolucionado complejos mecanismos para regular la expresión de diferentes adhesinas en etapas tempranas de infección (Graham *et al.*, 2001; Justice *et al.*, 2004). En UPEC, este fenómeno se desarrolla en la superficie luminal del epitelio vesical conocida como uroplaquinas, las cuales contienen receptores que promueven la persistencia de la bacteria y aumentan la respuesta inflamatoria en ITU (Connell, 1996; Zhao *et al.*, 2001). En APEC, la *fimH* está involucrada en la

primera etapa de la infección permitiéndole persistir en vías respiratorias altas (Rodríguez-Siek, 2005a), específicamente en tráquea (Connell, 1996).

Otra adhesina de interés en APEC y UPEC es la que está codificada por el gen *sfaS*, el cual estuvo presente en el 28% de los aislamientos de APEC, este resultado es elevado en comparación con lo reportado por otros autores, dado que el porcentaje se mantiene en una frecuencia baja y homogénea, incluso en aislamientos de aves con celulitis (2.9%) o lesiones sistémicas (3.6%) (Rodríguez-Siek, 2005a; Rodríguez-Siek, 2005b). Respecto a UPEC, en este estudio la frecuencia fue de 27% en pacientes con cistitis. Aunque la presencia del gen *sfaS* se ha asociado a pacientes con pielonefritis, se ha encontrado que su frecuencia (71%) también puede ser elevada en pacientes con cistitis (Yamamoto *et al.*, 1995), además en un estudio comparativo, los resultados no varían en pacientes con cistitis (19%) o pielonefritis (21%). Aparentemente, se espera mayor número de aislamientos positivos a este gen en pacientes con pielonefritis, dado que es una adhesina que está involucrada específicamente en la adhesión a células tubulares renales (Marre *et al.*, 1990).

El gen *sfa/focDE* codifica para una adhesina que se ha reportado en cepas ExPEC. Dentro de éstas, principalmente en cepas de UPEC productoras de biofilm y definida su expresión en el riñón junto con el gen *cnfI* para que *E. coli* alcance el torrente sanguíneo causando bacteremia (Moreno *et al.*, 2005; Moolin-Schouleur *et al.*, 2007). En este trabajo, el operón *sfa/focDE* se presentó con mayor frecuencia en aislamientos de APEC (68%) que en los aislamientos de UPEC (32%). El alto porcentaje encontrado en APEC no puede ser comparado con otros trabajos dado que son pocos los autores que integran este operón en estudios de pollos con colibacilosis. Dentro de ellos, se encuentra el trabajo de Cortés *et al.* (2010), quienes encontraron en un 1.8% de los

aislamientos del suelo en granjas de pollos. En UPEC, Johnson *et al.* (2005) reportan una frecuencia del 76% en pacientes con cistitis y asociado principalmente al grupo B2 y Johnson *et al.* (2008) reportan una frecuencia del 26.4%. Pensamos que posiblemente este gen puede estar asociado a la primera etapa de infección tanto en APEC como en UPEC, sin embargo, aún no se ha descrito cuál es el papel de éste en la infección por *E. coli* en ninguno de los dos patotipos.

Otro gen encontrado con mayor frecuencia en APEC (84%) con relación a los valores en UPEC (59%) fue *focG*, gen que codifica para una adhesina presente en la fimbria F1C. Este gen ha sido reportado por Zhao *et al.* (2009), tanto en el patotipo de APEC (1%) como en UPEC (11%) y por Johnson *et al.* (2008), quienes no encontraron este gen en pollos de engorda, pavos y gallinas de postura y en UPEC, integrando pacientes con cistitis y pielonefritis sólo lo encontraron en el 14.3% de los aislamientos. Por otro lado, el trabajo de Johnson *et al.* (2005), reportan un valor más elevado (40%) en UPEC. Posiblemente la diversidad en los resultados de estos autores y nuestros resultados, se deba al origen de los aislamientos de APEC, dado que no se ha trabajado con aislamientos exclusivos de pollo de engorda. Respecto a UPEC, la adhesina FocG se ha reportado tanto en aislamientos de pacientes con cistitis como con pielonefritis, esto se debe a que la adhesina tiene receptores en células epiteliales en los túbulos renales distales y colectores, así como en células endoteliales del riñón y vejiga (Ott *et al.*, 1988).

El gen *papC* codifica para una proteína que en *E. coli* tiene gran importancia en el estado tardío de la infección denominada pielonefritis, específicamente en la fase de adhesión al riñón y en pollos con colibacilosis está relacionada con la presentación de poliserositis y septicemia (Hultgren *et al.*, 1989; Kariyawasam *et al.*, 2006). En

nuestro trabajo, la detección del gen *papC* fue muy baja, en APEC no se observó ningún aislamiento y en UPEC sólo se encontró un 3%. Respecto a APEC, el gen *papC* se ha reportado en aislamientos de heces de pollos sanos en 9.6% y en pollos con colibacilosis en el 40.4% de los aislamientos, valor que puede variar dependiendo del tipo de lesión ocasionada por *E. coli*, ya sean lesiones sistémicas (44.1%), celulitis (33.8%) u onfalitis (7.69%) dado que se encarga de mediar la adhesión en órganos internos (Rodríguez-Siek, 2005a; Rodríguez-Siek, 2005b; Zhao *et al.*, 2009). En cuanto a UPEC, *papC* estimula a una respuesta inflamatoria durante la colonización renal y daño renal en pacientes con pielonefritis aguda (Lane y Mobley, 2007), cuya frecuencia puede variar entre el 51.5 y 54% (Rodríguez-Siek, 2005b; Zhao *et al.*, 2009), y por ello consideramos que el bajo porcentaje encontrado en nuestros aislamientos puede radicar a que éstos son de pacientes con cistitis y en las aves al tipo de lesiones.

La presencia de genes relacionados con la captación de hierro es importante en ambos patotipos de *E. coli* dado que le permite sobrevivir en el hospedero. Dentro de los genes más importantes e involucrados en la captación de hierro en ambos patotipos se considera a *iutA* (Rodríguez-Siek, 2005a). En nuestro estudio, la frecuencia en APEC fue del 80%, lo que coincide con estudios de pollos con colibacilosis el cual se encuentra en el 70 a 80% y en UPEC encontramos una frecuencia del 84% (Drugdová *et al.*, 2010; Ons *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2009), lo que difiere con previos estudios realizados en pacientes con ITU adquiridas de la comunidad, los cuales reportan un valor del 36% (Hagan y Mobley, 2007). Otro gen involucrado en la captación de hierro es *fyuA*, el cual se detectó un 68% en los aislamientos de UPEC y solo un 8% en APEC en este trabajo. El gen *fyuA* se ha reportado en ambos patotipos encontrando valores del 58.6% en APEC y 80% en UPEC (Rodríguez-Siek, 2005a). En pollos con colibacilosis,

la frecuencia de este gen puede variar de acuerdo a la presencia de lesiones sistémicas (58.6%) o celulitis (41.2%) (Rodríguez-Siek, 2005b). La presencia de ambos genes en nuestros aislamientos y otros trabajos, se debe a que en ambos procesos de infección (colibacilosis e ITU) se desarrolla un proceso de inflamación del cual el hospedero invariablemente retira el hierro disponible evitando que sea captado por las bacterias. Éstas, han desarrollado diversos sistemas de captación de hierro para lograr crecer y permanecer en nuevos nichos (Doherty *et al.*, 1996), por lo que son frecuentes valores elevados en ambos patotipos.

Actualmente se reconoce la relevancia y relación entre las toxinas CNF1 y la α -hemolisina de *E. coli* en las ITU (predominantemente en ITU hemorrágica), sin embargo, la virulencia que le confiere a esta bacteria, aún no está clara (Real *et al.*, 2007). La frecuencia de *cnf1* en este trabajo fue similar en ambos patotipos (24%), no así en la toxina HlyA, en los aislamientos de pollos fue del 12% y 3% en los aislamientos de pacientes con ITU. Cortés *et al.* (2010), quienes trabajaron en pollos con colibacilosis encontraron que el gen *cnf1* sólo estaba presente en el 1.1% de los aislamientos, frecuencia similar a lo reportado por Rodríguez *et al.* (2005) quienes compararon en pollos con lesiones sistémicas (2.7%) y celulitis (1.5%). En el caso de UPEC, la frecuencia de *cnf1* varía aún en el mismo tipo de infección, por ejemplo, en pacientes con cistitis aguda no complicada, Mitsumori *et al.*, (1998) encontraron este gen en el 32% de los aislamientos y Yamamoto *et al.* (1995) en el mismo tipo de aislamientos, reportan que se encuentra en el 61% de ellos. Respecto a la toxina HlyA, Cortés *et al.* (2010) en su trabajo no lograron identificar éste gen en aislamientos del alojamiento de pollos, sin embargo, tampoco se ha encontrado en aislamientos de pollos con septicemia (Ewers *et al.*, 2009). Este escenario difiere en UPEC, en el que se

encuentra con mayor frecuencia. Por ejemplo, Yamamoto, (1995) reporta la presencia del gen *hlyA* en el 80% de los aislamientos y Kerényi *et al.* (2005) en 35%.

Con respecto a la resistencia a los antimicrobianos evaluados, se observó un mayor número de aislamientos resistentes en APEC y con menor frecuencia en UPEC, situación similar a la reportada en otros trabajos (Ali *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2009; Kolář *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2007; Thrsteinsdottir *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2005). En nuestro estudio, en los aislamientos de pollos encontramos mayor resistencia en la combinación trimetoprim/sulfametoxazol, ciprofloxacina, ampicilina, piperacilina, cefuroxima, levofloxacina, ampicilina/sulbactam y gatifloxacina, de mayor a menor resistencia de 88% a 52%. Se han reportado perfiles de resistencia similares en otros países (Ali *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2005), en donde la mayoría de los aislamientos son resistentes a ampicilina, ciprofloxacina, gatifloxacina, levofloxacina y trimetoprim/sulfametoxazol.

En los aislamientos de orina en pacientes con cistitis, encontramos mayor resistencia a ampicilina, piperacilina, trimetoprim/sulfametoxazol, ampicilina/ sulbactam, ciprofloxacina, gatifloxacina. El trabajo de Gupta *et al.* (1999) realizado en Estados Unidos en pacientes con cistitis no complicada reportaron resistencia a ampicilina (29%), cefalotina (11%) y trimetoprim/sulfametoxazol (11%) contrario a este trabajo, no encontraron resistencia a fluoroquinolonas. En otros países, la relación de UPEC y su resistencia a norfloxacino y ciprofloxacina aún es baja, en países como México empieza a emerger un problema de multirresistencia a ciprofloxacina, ampicilina, trimetoprim/sulfametoxazol, cloranfenicol y tetraciclina (Nivón-Bolán *et al.*, 1998), lo cual nos obliga a conocer la situación actual de la resistencia en aislamientos de UPEC.

Con relación al grupo de antimicrobianos, encontramos una alta resistencia a fluoroquinolonas (ciprofloxacina, levofloxacina y gatifloxacina) en los aislamientos de pollos (52-76%) comparado con los aislamientos de orina en humanos (32-38%). En pollos de engorda, la resistencia a quinolonas ha sido ampliamente descrita, incluso comparado con otras especies como, en porcinos (40.9%) y bovinos (20.7%) (Ruiauskas *et al.*, 2010), por ello se ha implicado al alimento como fuente de cepas resistentes (por el uso de antimicrobianos como promotores de crecimiento) y fuente de resistencia en *E. coli* de humanos (Thrsteinsdottir *et al.*, 2010). Se ha demostrado que el uso de antimicrobianos en la dieta de las aves puede fomentar la resistencia en APEC, cambiar la composición de los patotipos de *E. coli* y la distribución de de los FV (Bonnet *et al.*, 2009), factor que suma la complejidad de la caracterización en cada patotipo considerando previos factores como localización y tipo de infección y serotipos. En el caso de los aislamientos de UPEC, a nivel mundial, las fluoroquinolonas son los antimicrobianos más recetados por los clínicos (77.9%) seguido de la combinación de trimetoprim/sulfametoxazol, fosfomicina, (9.2%) y nitrofuranoína (2.1%) (Aypak *et al.*, 2009).

Por otro lado, la multiresistencia en nuestros resultados en los aislamientos de pollos y de orina de pacientes con cistitis a más de cinco antimicrobianos, no difiere de los resultados de otros autores que comparan este fenómeno en ambos patotipos de APEC y UPEC (Ali *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2005). La susceptibilidad en este trabajo en los aislamientos de *E. coli* en pollos fue a tircacilina/ácido clavulánico y amikacina y en los aislamientos de *E. coli* de orina fueron sensibles a cefotetán, cefoxitín y amikacina y en ambos tipos de aislamientos a imipenem y la combinación de piperacilina/tazobactam. El uso de imipenem y la combinación de piperacilina/tazobactam en pollos no es

frecuente su uso y en humanos son antimicrobianos que se dejan como última opción, dado que se utiliza para infecciones complicadas (Kolář *et al.*, 2002; Ena *et al.*, 2006), lo que explica su nula resistencia.

Existen consideraciones importantes tanto en UPEC como en APEC para la continua diseminación de cepas resistentes y factores de virulencia. Actualmente no se siguen las consideraciones clínicas para el manejo de ITU como urocultivo, antibiograma y pruebas de laboratorio, además, considerar no solo la cantidad de antibiótico administrado, también se debe contemplar al número de individuos que lo reciben (Levy, 2001). En el caso de los animales, la corta edad, el alojamiento en grupos grandes y frecuente movilidad, facilita la introducción y diseminación de enfermedades. También se considera que la mayoría de los antibióticos son administrados en el alimento y agua de los animales como profilaxis (Wegner, 2003). Además, una buena limpieza, vacunación y tratamiento terapéutico no provee suficiente protección contra la colibacilosis, el tratamiento terapéutico es caro y con frecuencia no se recuperan por completo previo al sacrificio (Ask *et al.*, 2006).

Los antibióticos son esenciales para el tratamiento de infecciones bacterianas en humanos y animales por lo que es prioritario preservar su eficacia (Allen *et al.*, 2010). La formación médica en humanos y veterinarios han concentrado su atención en la infección por patógenos de animales a humanos y se han realizado pocos estudios científicos que reporten lo contrario (Barber, 2001). Una vez que la resistencia de antibióticos alcanza una prevalencia elevada en hospitales (mayor al 15%) o en granjas, se vuelve endémica y extremadamente difícil de revertir (Morton, 2002). En este contexto parece poco probable anticipar un gran control sobre la resistencia y el esfuerzo debe concentrarse en el manejo de antibióticos de uso humano y veterinario,

más que en la eliminación con el objetivo de disminuir el desarrollo de nueva resistencia (Livermore, 2003) y entender la epidemiología de los patógenos resistentes y genes de resistencia (Casewell *et al.*, 2003) por las implicaciones en el futuro tratamiento y prevención de enfermedades infecciosas (McDermott *et al.*, 2002).

CONCLUSIONES

En este estudio se determinaron los serotipos, grupos filogenéticos, factores de virulencia y resistencia a 25 antimicrobianos comúnmente utilizados en el tratamiento de infecciones causadas por cepas APEC y UPEC.

Nuestros aislamientos mostraron pertenecer principalmente a los grupos filogenéticos A y D, con bajo perfil de factores de virulencia y elevada resistencia a los antimicrobianos.

Los datos obtenidos en este estudio sugieren que APEC y UPEC comparten características similares, tanto en el perfil de resistencia y susceptibilidad a antimicrobianos, como algunos factores de virulencia, lo que puede dar a APEC adaptaciones fuera del intestino y posiblemente sea la causa enfermedades extraintestinales en el humano o ser un contaminante durante el constante manejo que el humano hace de los productos y subproductos del pollo.

Para conocer el impacto epidemiológico que pueda tener este tipo de cepas de *E. coli*, se debe continuar con estudios que incluyan mayor número de muestras de origen clínico y muestreo del personal que está en contacto directo en la cadena de producción.

REFERENCIAS

1. Abe CM, Salvador FA, Falsetti, IN., Vieira, M.A., Blanco, J.E., Blanco, M. *et al.* 2008. Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) strains may carry virulence properties of diarrhoeagenic *E. coli*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 52(3):397-406.
2. Ali, A.M., Hassan, S.M.R., Alam, S., Shirin, M. 2009 Antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolated from poultry and poultry environment of Bangladesh. *Am J Environ Scienc.* 5(1): 47-52.
3. Allan, B.J., van den Hunk, J.V., Potter, A.A. 1993. Characterization of *Escherichia coli* isolated from cases of avian colibacillosis. *Can J Vet Res.* 57(3):146-151.
4. Allen, H.K., Donato, J., Wang, H.H., Cloud-Hansen, K.A., Davis, J. Handelsman, L. 2010. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nat Rev Microbiol.* 8(4): 251-259.
5. Antão, E.M., Wieler, L.H. y Ewers, C. 2009. Adhesive threads of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Pathog.* 10;1(1):22-33.
6. Arredondo-García, J.L., Figueroa-Damián, R., Rosas, A., Jáurequi, A., Corral, M., Merlos, R.M., Ríos-Fabra, A., Amábile-Cuevas, C.F., Hernández-Oliva, G.M., Cardeñosa-Guerra, O. 2004. Comparison of short-term treatment regimen of ciprofloxacin versus long- term treatment regimens of uncomplicated lower urinary tract infections: a randomized, multicentre, open-label, prospective study. *J Antimicrob Chemother.* 54(4):840-843.

7. Aryal, S. 2001. Antibiotic resistance: a concern to veterinary and human medicine. *Nepal Agric Res J.* 4&5:66-69.
8. Ask, B., van der Waaij, E.H., van Eck, J.H., van Arendonk, J.A. y Stegeman, J.A. 2006. Defining susceptibility of broiler chicks to colibacillosis. *Avian Pathology* 35(2):147-153.
9. Aypak, C., Altunsoy, A., Düzgün, N. 2009. Empiric antibiotic therapy in acute uncomplicated urinary tract infections and fluoroquinolone resistance: a prospective observational study. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 8:27.
10. Barber, D.A. 2001. New perspectives on transmission of foodborne pathogens and antimicrobial resistance. *JAVMA.* 218(10):1559-1561.
11. Barnes, H.J., Vaillancourt, J.P. and Gross W.B. 2003. Colibacillosis. Diseases in Poultry. pp. 138. Editado por Y.M. Saif. Ames, IA: Iowa State University Press.
12. Barza, M. 2002. Potential mechanisms of increased disease in humans from antimicrobial resistance in food animals. *Clin Infect Dis (Suppl 3)*:S123-125.
13. Bass, L., Liebert, C.A., Lee, M.D., Summers, A.O., White, D.G., Thayer, S.G y Maurer, J.J. 1999 Incidence and characterization of integrons, genetic elements mediating multiple-drug resistance, in avian *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 43(12):2925-2929.
14. Bengmark, S. 1998. Ecological control of the gastrointestinal tract. The role of probiotic flora. *Gut* 42(1): 2-7.
15. Bettelheim, K.A., Breadon, A., Faiers, M.C., O'Farrell, S.M. y Shooter, R.A. 1974. The origin of O serotypes of *Escherichia coli* in babies after normal delivery. *J. Hyg (Lon).* 72(1): 67-70.

16. Bonnet, C., Diarrassouba, F., Brousseau, R., Masson, L., Topp, E. Diarra, M.S. 2009. Pathotype and antibiotic resistance gene distribution of *Escherichia coli* isolates from broiler chickens raised on antimicrobial-supplemented diets. *Appl Environ Microbiol* 75(22):6955-6962.
17. Bower, J.M., Eto, D.S., Mulvey, M.A. 2005. Covert operations of uropathogenic *Escherichia coli* within the urinary tract. *Traffic*. 6(1): 18-31.
18. Braun, V. y Killmann. 1999. Bacterial solutions to the iron-supply problem. *Trends Biochem Sci*. 24(3):104-109.
19. Cantey, J.R. y Blake, R.K. 1977. Diarrhea due to *Escherichia coli* in the rabbit: a novel mechanism. *J. Infect. Dis*. 135:454-462.
20. Carniel, E. 1999. The Yersinia high-pathogenicity island. *Int Microbiol*. 2:161-167.
21. Carter, G.R. y Darla J.W. Veterinary Bacteriology and mycology. Sources and transmission of infectious agents. Pag 59, 129. Sexta edición. Iowa State Press. 2004.
22. Casewell, M., Friis, C., Marco, E., McMullin, P., Phillips, I. 2003. The European ban growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health. *J Antimicrob Chemother* 52:159-161.
23. Clarke, T.E., Tari, L.W., Vogel, H.J. 2001. Structural biology of bacterial iron uptake systems. *Curr Top Med Chem*. 1: 7-30.
24. Clermont, O., Bonacorsi, S. and Bingen, E. 2000. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol* 66:4555-4558.

25. Cocchi, S., Grasselli, E., Gutacker, M., Bengali, C., Convert, M., Piffaretti, J.C. 2007. Distribution and characterization of integrons in *Escherichia coli* strains of animal and human. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 50(1):126-132.
26. Connell, 1996. Type 1 fimbrial expression enhances *Escherichia coli* virulence for the urinary tract.
27. Cortés, P., Blanc, V., Mora, A., Dahbi, G., Blanco, JE., Blanco, M, López, C., Navarro, F., Alonso, M.P., Bou, G., Llagostera. 2010. Isolation and characterization of potentially pathogenic antimicrobial-resistant *Escherichia coli* strains from chicken and pig farms in Spain. *Appl Envir Microbiol.* 76: 2799-2805.
28. Croxen M.A. y Finlay, B.B. 2010. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat. Rev. Microbiol.* 8(1):36-38.
29. Davis, J.M., Rasmussen, S.B. O'Brien, A.D. 2005. Cytotoxic necrotizing factor type 1 production by uropathogenic *Escherichia coli* modulates polymorphonuclear leukocyte function. *Infect Immun.* 73(9): 5301-5310.
30. Doherty, C.P. 1996. Host-pathogen interactions: the role of iron. *Trends Microbiol.* 4(6):232-237.
31. Dozois, C.M. Daigle, F. y Curtiss, R. 3rd. 2003. Identification of pathogen-specific and conserved genes expressed *in vivo* by avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(1): 247-252.
32. Drugdová, Z., Vladimir, K. y Bujnakova, D. 2010. Virulence factors in *Escherichia coli* isolated from chicken meat in Slovakia. *J Food Nutr Res.* 49(1):10-13.

33. Duriez, P., Clermont, O., Bonacorsim S., Bingen, E., Chaventré, A., Elion, J. *et al.* 2001. Commensal *Escherichia coli* isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human populations. *Microbiol.* 147(Pt6): 1671-1676.
34. Ena, J., Arjona, F., Martínez-Peinado, C., López-Perezagua Mdel M., Amador, C. 2006. Epidemiology of urinary tract infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*. *Urology.* 68(6): 1169-1174.
35. Escobar- Páramo, P., Clermont, O., Blanc-Potard, A.B., Bui, H., Le Bouguéneq, C., Denamur, E. 2004. A specific genetic background is required for acquisition and expression of virulence factors in *Escherichia coli*. *Mol. Biol Evol.* 21(6): 1085-1094.
36. Ewers, C., Antão, E.M., Diehl, I., Philip, H.C., Wieler, L.H. 2009. Intestine and environment of the chicken as reservoirs for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains with zoonotic potential. *Appl Environ Microbiol* 75(1):184-192.
37. Ewers, C., Janssen, T., Kiesslinng, S.M., Philipp, H.C., Wieler, L.H. 2004. Molecular epidemiology of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from colisepticemia in poultry. *Vet Microbiol.* 104(1-2): 91-101.
38. Finlay, B.B. Stanley, F. 1989. Common themes in microbial pathogenicity. *Microbiol Rev.* 53(2):210-230.
39. Foxman, B. 2002. Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. *Am J Med* 113(Suppl.1A):5S-13S.

40. Franz, M. and Hörl, W.H. 1999. Common errors in diagnosis and management of urinary tract infection. I: Pathophysiology and diagnostic techniques. *Nephrol Dial Transplant* 14: 2746-2753.
41. Goren, E. 1978. Observations on experimental infection of chicks with *Escherichia coli*. *Avian Pathol* 7(2): 213-224.
42. Graham, J.C., Leathart, J.B.S., Keegan, S.J., Pearson, J., Bint, A. and Gally, D.L. 2001. Analysis of *Escherichia coli* strains causing bacteriuria during pregnancy: selection for strains that do not express type 1 fimbriae. *Infect Immun* 69(2): 794-799.
43. Greenwood, D. and Slack, R. 1982. Urinary infection. *Br. J. Clin Pharmacol* 13: 619-630.
44. Groisman, E.A. 2001. Principles of bacterial pathogenesis. Pathogenic *Escherichia coli*. 388, 390. Academic Press.
45. Gross W.G. 1994. Diseases due to *Escherichia coli* in poultry. In C, L. Gyles (ed.). *Escherichia coli* in domestic animals and humans. CAB Int' 1: Wallingford, UK, 237-259.
46. Gupta, K., Hooton, T.M., Wobbe, C.L. Stamm, W.E. 1999. The prevalence of antimicrobial resistance among uropathogens causing acute uncomplicated cystitis in young women. *Int J Antimicrob Agents*. 11(3): 305-308.
47. Gyles C.L., Prescott, J.F., Songer J.G., Thoen, C.O. *Escherichia coli*, en Gyles C.L., Fairbrother J.M. (Eds.), Pathogenesis of bacterial infections in animals, 3era ed., Iowa State University Press, Ames. 2004, pp. 1993-223.

48. Hagan, E.C. y Mobley, L.T. 2007. Uropathogenic *Escherichia coli* outer membrane antigens expressed during urinary tract infection. *Infect Immun.* 75(8): 3941-3949.
49. Hancock, V., Ferrières, L. Klemm, P. 2008. The ferric yersiniabactin uptake receptor FyuA is required for efficient biofilm formation by urinary tract infectious *Escherichia coli* in human urine. *Microbiol.* 154(Pt1):167-175.
50. Hooton, T.M. 2000. Pathogenesis of urinary tract infections: an update. *Antimicrob Chemother* 1:1-7.
51. Huang, T.M., Lin, T.L. y Wu, C.C. 2009. Antimicrobial susceptibility and resistance of chicken *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., and *Pasteurella multocida* isolates. *Avian Dis.* 53(1): 89-93.
52. Hultgren, S.J., Lindberg, F., Magnusson, G., Kihlberg, J., Tennent, J.M., Normark, S. 1989. The PapG adhesin of uropathogenic *Escherichia coli* contains separate regions for receptor binding and for the incorporation into the pilus. *Proc Natl Acad Sci.* 86(12):4357-4361.
53. Inman, I.R. y Cantey, J.R. 1983. Specific adherence of *Escherichia coli* (Strain RDEC-1) to membranous (M) cells of the Peyer's patch in *Escherichia coli* diarrhea in the rabbit. *J. Clin. Invest.* 71:1-8.
54. Isberg, R.R. 1991. Discrimination between intracellular uptake and surface adhesion of bacterial pathogens. *Science.* 252(5008): 934-938.
55. Jadhav, S., Hussain, A., Devi, S., Kumar, A., Parveen, S., Gandham, N., Wieler, L.H., Ewers, C. Ahmed, N. 2011. Virulence characteristics and genetic affinities of multiple drug resistant uropathogenic *Escherichia coli* from a semi urban locality in India. *PLoS One.* 6(3): e18063.

56. Johnson, J.R. 1991. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clin Microbiol Rev* 4(1): 80-128.
57. Johnson, J.R., Kuskowski, M.A., Menard, M., Gajewski, A., Xercavins, M. y Garau, J. 2006. Similarity between human and chicken *Escherichia coli* isolates in relation to ciprofloxacin resistance status. *J Infect Dis.* 194(1): 71-78.
58. Johnson, J.R., Kuskowski, M.A., Smith, K., O'Bryan, T.T., Tatni, S. 2005. Antimicrobial-resistant and extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in retail foods. *J Infect Dis.* 191(7): 1040-1049.
59. Johnson, J.R. y Russo, T.A. 2002. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: "The other bad *E. Coli*" *J Lab Clin Med* 139(3): 155-162.
60. Johnson, J.R. y Stell, A.L. 2000. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *J Infect Dis.* 181(1): 261-272.
61. Johnson, T.J., Kariyawasam, S., Wannemuehler, Y., Mangiamele, P., Jonson, S.J., Doetkott, C., Skyberg, J.A., Lynne, A.M., Jonson, J.R. and Nolan, L.K. 2007. The genome sequence of avian pathogenic *Escherichia coli* strain 01:K1:H7 shares strong similarities with human extraintestinal pathogenic *E. coli* genomes. *J Bacteriol* 189:3228-3236.
62. Johnson, T.J., Wannemuehler, Y., Johnson, S.J., Stell, A.L., Doetkott, C., Johnson, J.R., Kim, K.S., Spanjaard, L. y Nolan, L.K. 2008. Comparison of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains from human and avian sources reveals a mixed subset representing potential zoonotic pathogens. *Appl Environ Microbiol* 74(22):7043-7050.

63. Justice, S.S., Hung, C., Theriot, J.A., Fletcher, D.A., Anderson, G.G., Footer, M.J., and Hultgren, S.J. 2004. Differentiation and developmental pathways of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci* 101(5): 1333-1338.
64. Kaper, J.B., Nataro, J.P., and Mobley, H.L. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2(2):123-140.
65. Kariyawasam, S., Johnson, T.J. Nolan, L.K. 2006. The *pap* operon of avian pathogenic *Escherichia coli* strain O1:K1 is located on a novel pathogenicity island. *Infect Immun.* 74(1): 744-749.
66. Kerényi, M., Allison, H.E., Bártai, I., Sonnevend, A., Emödy, L., Plaveczy, N. Pál, T. 2005. Occurrence of *hlyA* and *sheA* genes in extraintestinal *Escherichia coli* strains. *J Clin Microbiol.* 43(6): 2965-2968.
67. Klem, P. 1985. Fimbrial adhesins of *Escherichia coli*. *Rev Infect Dis.* 7(3): 321-340.
68. Kolář, M., Pantůček, R., Bardoň, J., Vágnerová, I., Typovská, H., Válka, I., Doškař, J. 2002. Occurrence of antibiotic-resistant bacterial strains isolated in poultry. *Vet Med.* 2-3:52-59.
69. Krogfelt, K.A. 1991. Bacterial adhesion: genetics, biogenesis, and role in pathogenesis of fimbrial adhesins of *Escherichia coli*. *Rev Infect Dis.* 13(4): 721-735.
70. Lane, M.C. Mobley, H.L.T. 2007. Role of P-fimbrial –mediated adherence in pyelonephritis and persistence of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) in the mammalian kidney. *Kidney Int.* 72(1):19-25.

71. Levy, S.B. 2001. Antibiotic resistance: consequences of inaction. *Clin Infect Dis.* 33(Suppl 3): S124-129.
72. Li, D., Liu, B., Chen, M., Guo, X., Liu, F., Feng, L. Wang, L. 2010. A multiplex PCR method to detect 14 *Escherichia coli* serogroups associated with urinary tract infections. *J Microbiol Methods.* 82(1): 71-77.
73. Li, X.Z., Mehrotra, M., Ghimire, S. y Adewoye, L. 2007. β -Lactam resistance and β -Lactamases in bacteria of animal origin. *Vet Microbiol.* 121(3-4): 197-214.
74. Livermore, D.M. 2003. Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. *Clin Infect Dis.* 15;36(Suppl 1):S11-23.
75. Lloyd, A.L., Rasko, D.A., Mobley, H.L. 2007. Defining genomic islands and uropathogen-specific genes in uropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 189(9):3532-3546.
76. Ludwig, A., Garcia, F., Bauer, S., Jarchau, T., Benz, R., Hoppe, J. Goebel, W. 1996. Analysis of the in vivo activation of hemolysin (HlyA) from *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 178(18): 5422-5430.
77. Madison, B., Ofek, I. y Abraham, S.N. 1994. Type 1 fimbrial shafts of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumonia* influence sugar-binding specificities of their FimH adhesins. *Infect Immun.* 62(3):843-848.
78. Marre, R., Kreft, B. y Hacker, J. 1990. Genetically engineered S and F1C fimbriae differ in their contribution to adherence of *Escherichia coli* to cultured renal tubular cells. *Infect Immun.* 58(10):3434-3437.

79. McDermott, P.F., Zhao, S., Wagner, D.D., Simjee, S., Walker, R.D. White, D.G. 2002. The food safety perspective of antibiotic resistance. *Anim Biotechnol.* 13(1): 71-84.
80. Mitsumori, K., Terai, A., Yamamoto, S.M Yoshida, O. 1998. Identification of S, F1C and three PapG fimbrial adhesins in uropathogenic *Escherichia coli* by polymerase chain reaction. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 21(4): 261-268.
81. Mora, A López, C., Dabhi, G., Blanco, M., Blanco, J.E., Alonso, M.P., Herrera, A., Mamani, R., Bonacrosi, S., Moulin-Schouleur, M. y Blanco, J. 2009. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* O1:K1:H7/NM from human and avian origin: detection of clonal groups B2 ST95 and D ST59 with different host distribution. *BMC Microbiol.* 7(9):132-142.
82. Moreno, E., Planells, I., Prats, G., Planes, A.M., Moreno, G. Andreu, A. 2005. Comparative study of *Escherichia coli* virulence determinants in strains causing urinary tract bacteremia versus strains causing pyelonephritis and other sources of bacteremia. *Diagn Microbiol Infec Dis.* 53(2): 93-99.
83. Moreno, E., Prats, G., Sabaté, M., Pérez, T., Johnson, J.R., Andreu, A. 2006. Quinolone, fluoroquinolone and TMP/SXT resistance in relation to virulence determinants and phylogenetic background among uropathogenic *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother.* 57:204-211.
84. Morschhäuser, J., Hoschützky, H., Jann, K. y Hacker, J. 1990. Functional analysis of the sialic acid-binding adhesin SfaS of the pathogenic *Escherichia coli* by site-specific mutagenesis. *Infect Immun.* 58(7):2133-2138.
85. Morton, N.S. 2002. Human diseases caused by foodborne pathogens of animal origin. *Clin Infect Dis.* 34(Suppl 3):S111-112.

- 86.** Moulin-Schouleur, M., Répérant, M., Laurent, S., Brée, A., Mignon-Grasteau, S., Germon, P. *et al.* 2007. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains of avian and human origin: link between phylogenetic relationships and common virulence patterns. *J Clin Microbiol.* 45(10): 3366-3376.
- 87.** Navarro A, Eslava C, Perea L. M., Inzunza A., Delgado G, Morales M. R., Thomas Cheasty T and Cravioto A. 2010. A new enterovirulent *Escherichia coli* serogroup 64474 showing antigenic and genotypic relationships to *Shigella boydii* 16. *J. Med. Microbiol.* 59: 453-461.
- 88.** Neish, A.S. 2002. The gut microflora and intestinal epithelial cells: a continuing dialogue. *Microbes Infect.* 4(3): 309-317.
- 89.** Nivón-Bolán, I., García, X., Amábile-Cuevas, C. F., et al. (1998). Phenotypic resistance patterns associated to ciprofloxacin resistance in community uropathogenic strains from Mexico City, In Program and Abstracts of the 8th International Congress on Infectious Diseases, Boston, MA, 1998, p. 235. International Society for Infectious Diseases, Boston, MA, USA.
- 90.** Norris, D.L. 2nd and Young, J.D. 2008. Urinary tract infections: Diagnosis and management in the emergency department. *Emerg Med Clin North Am* 26(4):413-430.
- 91.** Nuccio, S.P. y Bäumler, A.J. 2007. Evolution of the chaperone/usher assembly pathway: fimbrial classification goes greek. *Microbiol Mol Biol Rev.* 71(4): 551-575.
- 92.** Ons, E., Bleyen, N., Tuntufye, H.N. Vandemaele, F., Goddeeris, B.M. 2007. High prevalence iron receptor genes of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Avian Pathol.* 36(5):411-414.

93. Ørskov, F. & Ørskov, I. 1984. Serotyping of *Escherichia coli*. In *Methods in Microbiology*, vol. 14, pp. 43–112. Edited by T. Bergan. London: Academic Press.
94. Orskov, F. Orskov, I. 1992. *Escherichia coli* serotyping and disease in man and animals. *Can J Microbiol.* 38(7): 699-704.
95. Ott, M., Hoschützky, H., Jann, K., Van Die, I. y Hacker, J. 1988. Gene clusters for S fimbrial adhesin (*sfa*) anf F1 fimbriae (*foc*) of *Escherichia coli*: comparative aspects of structure and function. *J Bacteriol.* 170 (9): 3983-3990.
96. Pitcher, D.G., Saunders, N.A. Owen, R.J. 1989. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Letters in applied microbiology.* 8(4): 151-156.
97. Porter, R.E. 1998. Bacterial enteritis of poultry. *Poultry Science* 77:1159-1165.
98. Rasko, D.A., Rosovitz, M.J., Myers, G.S., Mongodin, E.F., Fricke, W.F., Gajer, P., Crabtree, J., Sebaihia, M., Thomson, N.R., Chaudhuri, R., Henderson, I.R., Sperandio, V., Ravel, J. 2008. The pangenome structure of *Escherichia coli*: comparative genomic analysis of *E. coli* commensal and pathogenic isolates. *J. Bacteriol.* 190 (20): 6881-6893.
99. Real, JM, Munro, P, Buisson-Touati, C., Lemichez, E., Boquet, P., Landraud, L. 2007. Specificity of immunomodulador secretion in urinary samples in response to infection by alpha-hemolysin and CNF1 bearing uropathogenic *Eshcerichia coli*. *Cytikine.* 37(1): 22-25.
100. Rodríguez-Siek KE, Giddings CW, Doetkott C, Jonson TJ, Nolan LK. 2005. Characterizing the APEC pathotype. *Vet Res* 36(2)241-256.

- 101.** Rodríguez-Siek, K.E., Giddings, C.W., Doetkott, C., Jonson, T.J., Fakir, M.K., and Nolan, L.K. 2005. Comparison of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis. *Microbiology* 151:2097-2110.
- 102.** Rosario, C.C., López, A.C., Téllez, I.G., Navarro, O.A., Anderson, R.C., Eslava, C.C. 2004. Serotyping and virulence genes detection in *Escherichia coli* isolates from fertile and infertile eggs, dead-in-shell embryos, and chickens with yolk sac infection. *Avian Dis.* 48(4): 791-802.
- 103.** Russo, T.A. y Johnson, J.R. 2000. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *JID* 181 (5):1753-1754.
- 104.** Russo, T.A. y Johnson, J.R. 2003. Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes Infect.* 5(5): 449-456.
- 105.** Ruiauskas, M., Siugzdinienė, R., Seputienė, V., Suziedėlienė, E., Virgailis, M., Daugelavicius, R., Spakauskas, V., Zienius, D., Sengaut, J. Pavilionis, A. 2010. The situation of antimicrobial resistance of enteric bacteria isolated from animal origin to quinolones and fluoroquinolones. *Vet Zootec.* 50(72): 73-80.
- 106.** Shanon, D.M. 2005. *Escherichia coli* infections. Deadly diseases and epidemics. pp. 15.
- 107.** Siegel, P.B y Gross, W.B. 1973. Confinement, behavior and performance with examples from poultry. *J Anim Sci.* 37(2): 612-617.
- 108.** Smith, Y.C., Rasmussen, S.B., Grande, K.K., Conran, R.M., O'Brien, A.D. 2008. Hemolysin of uropathogenic *Escherichia coli* evokes extensive shedding

of the uroepithelium and hemorrhage in bladder tissue within the first 24 hours after intraurethral inoculation of mice. *Infect Immun* 76(7):2978-2990.

109. Smyth, C.J., Marron, M.B., Twohig, JM. y Smith, G.J. 1996. Fimbrial adhesins: similarities and variations in structure and biogenesis. *FEMS. Immunol Med Microbiol.* 16(2): 127-139.
110. Sokurenko, E.V., Feldgarde, M., Trintchina, E., Weissman, S.J. Avagyan, S., Chattopadhyay, S., Johnson, J.R. Dykhuizen, D.E. 2004. Selection footprint in the FimH adhesin shows pathoadaptative niche differentiation in *Escherichia coli*. *Mol Biol Evol.* 21(7): 1373-1383.
111. Stamm, W.E. 2002. Scientific and clinical challenges in the management of urinary tract infections. *Am J Med* 113 (Suppl 1A):1s-4s.
112. Terragno, R. Caffer, M., Bruna, S. y Binsztein, N. 2001. Manual de procedimientos para la caracterización de *Salmonella*. Parte I. Aislamiento, identificación y serotipificación. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, Global Salm- Surv y DCC. Buenos Aires Argentina.
113. Thorsteinsdottir, T.R., Haraldsson, G., Fridriksdottir, V., Kristinsson, K.G., Gunnarsson, E. 2010. Broiler chickens as source of human fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli*, Iceland. *Emerg Infect Dis.* 16(1):133-135.
114. Vandekerchove, D., De Herdt, H., Laevens y Pasmans. 2004. Colibacillosis in caged layer hens: characteristics of the disease and the aetiological agent. *Avian Pathol.* 33(2):117- 125.
115. Vandemaele, F., Vandekerchove, D., Vereecken, M., Derijcke, J., Dho-Moulin, M., Goddeeris, B.M. 2003. Sequence analysis demonstrates the conservation of

fimH and variability of *fimA* throughout Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Vet Res.* 34(2):153-163.

116. Van den Bogaard, A.E. y Stobberinh, E.E. 1999. Antibiotic usage in animals. Impact on bacterial resistance and public health. *Drugs.* 58(4):589-607.
117. Vidotto, M.C. Navarro, H.R. y Gaziri, L.C.J. 1997. Adherence pilli of pathogenic strains of avian *Escherichia coli*. *Vet Microbiol.* 59(1):79-87.
118. Wegner HC. 2003. Antibiotics in animal feed and their role in resistance development. *Curr Opin Microbiol* 6(5):439-445.
119. Weiss RA y McMichael AJ. 2004. Social and environmental risk factors in the emergence of infectious diseases. *Nat Med.* 10(Suppl 12) S70-76.
120. White DG, Piddock LJ, Maurer JJ, Zhao S, Ricci V, Thayer SG. 2000. Characterization of fluoroquinolone resistance among veterinary isolates of avian *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 44(10): 2897-2899.
121. Whittam, T.S y Wilson, R. 1988. Genetic relationships among pathogenic strains of avian *Escherichia coli*. *American Society Microbiol* 56(9):2458-2466.
122. Whittam, R.L. y Nevers, M.B. 2003. Foreshore sand as a source of *Escherichia coli* in Nearshore water of a lake Michigan beach. *Appl Environ Microbiol.* 69(9):5555-5562.
123. Wu, H. y Fives-Taylor, P.M. 2001. Molecular strategies for fimbrial expresion and assembly. *Crit Rev Oral Biol Med.* 12(2):101-115.
124. Yamamoto, S., T. Tsukamoto, A. Terai, H. Kurazono, Y. Takeda, and O. Yoshida. 1995. Distribution of virulence factors in *Escherichia coli* isolated from urine of cystitis patients. *Microbiol. Immunol.*39:401-404.

- 125.** Yan F y Polo D.B. 2004. Commensal bacteria in the gut: learning who our friends are. *Curr Opin Gastroenterol* 20(6):565-571.
- 126.** Yegani, M. y Korver, D.R. 2008. Factors affecting intestinal health in poultry. *Poultry Science*. 87(10):2052-2063.
- 127.** Zhao, S., Maurer, J.J., Humbert, S., De Villena, J.F., McDermott, P.F., Meng, J., Ayers, S., English, L. White, D.G. 2005. Antimicrobial susceptibility and molecular characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* isolates. *Vet Microbiol*. 107(3-4):215-224.
- 128.** Zhao, I., Gao, S., Huan, H., Xu, X., Zhu, X., Yang, W., Gao, O. y Liu, Xiufan. 2009. Comparison of virulence factors and expresión of specific genes between uropathogenic *Escherichi coli* and avian pathogenic *E. coli* in murine urinary tract infection model and chicken challenge. *Microbiology*. 155(Pt 5) 1634-1644.
- 129.** Zhou, G., Mo, W.J., Sebbel, P., Min, G., Neubert, T.A., Glocksnuber, R., Wu, X.R., Sun, T.T., Kong, X.P. 2001. Uroplakin Ia is the urothelial receptor for uropathogenic *Escherichia coli*: evidence from in vitro FimH binding. *J Cell Sci*. 114(Pt 22): 4095-4103.

Anexo 1. Grupos filogenéticos, FV y serotipos de aislados APEC

Clave de muestra	Genes									Grupo filogenético	Serotipo
	<i>fimH</i>	<i>sfaS</i>	<i>sfa/focDE</i>	<i>focG</i>	<i>papC</i>	<i>iutA</i>	<i>fyuA</i>	<i>cnf1</i>	<i>hlyA</i>		
APEC-1	+	-	+	+	-	+	-	+	+	D	O20:H31
APEC-2	+	-	+	+	-	+	-	+	-	D	O20:NM
APEC-3	+	-	+	+	-	+	+	+	-	D	O20:H 31
APEC-4	+	-	+	+	-	+	+	+	-	D	O8:H30
APEC-5	+	-	+	+	-	+	-	-	+	D	O8:NM
APEC-6	+	-	+	+	-	+	-	-	-	D	O25:H1
APEC-7	+	-	-	-	-	+	-	-	-	A	O25:H1
APEC-8	+	-	+	+	-	+	-	-	-	A	O25:H1
APEC-9	+	-	+	+	-	+	-	-	-	D	O25:H1
APEC-10	+	-	+	+	-	+	-	-	-	D	O128:H2
APEC-11	+	-	+	-	-	+	-	-	-	D	O88:NM
APEC-12	+	-	-	+	-	+	-	-	-	A	O25:H1
APEC-13	+	-	+	+	-	+	-	-	-	A	O88:NM
APEC-14	+	-	+	+	-	-	-	-	-	A	O128:H2
APEC-15	+	-	+	+	-	+	-	-	-	A	O34:NM
APEC-16	+	-	+	+	-	-	-	-	-	D	O155:H2
APEC-17	-	-	-	-	-	+	-	-	-	D	O?:H4
APEC-18	+	-	-	-	-	-	-	-	-	A	O?:H31
APEC-19	+	+	-	+	-	-	-	+	-	A	O88:NM
APEC-20	+	+	-	+	-	+	+	-	-	A	O88:NM
APEC-21	+	+	+	+	-	-	-	-	-	D	O44:H30
APEC-22	+	+	-	+	-	+	-	+	-	A	O8:H278
APEC-23	+	+	+	+	-	+	-	-	-	D	O7:H21
APEC-24	+	+	-	+	-	+	-	-	-	D	O84:H31
APEC-25	+	+	+	+	-	+	-	-	+	A	O100:NM
%	96	28	68	84	-----	80	8	24	12		

NM=no móvil; O?= no tipificable

Anexo 2. Grupos filogenéticos, FV y serotipos de aislados de UPEC

Clave de muestra	Genes									Grupo filogenético	Serotipo
	<i>fimH</i>	<i>sfaS</i>	<i>sfa/focDE</i>	<i>focG</i>	<i>papC</i>	<i>iutA</i>	<i>fyuA</i>	<i>cnf1</i>	<i>hlyA</i>		
UPEC-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	O86:H18
UPEC-2	+	-	-	+	+	+	+	-	-	D	O12:NM
UPEC-3	+	-	+	-	-	+	-	+	+	D	O2:NM
UPEC-4	+	-	-	+	-	+	+	-	-	D	O25NM
UPEC-5	+	-	+	-	-	-	+	-	-	D	O2 H4
UPEC-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	O25 NM
UPEC-7	+	-	-	+	-	+	-	-	-	D	O25 NM
UPEC-8	+	-	-	-	-	+	+	-	-	D	O100 H18
UPEC-9	+	-	+	+	-	+	+	-	-	D	O86 H18
UPEC-10	+	-	-	+	-	+	-	+	-	D	O? H5
UPEC-11	+	-	-	-	-	+	+	-	-	D	O25 NM
UPEC-12	+	-	-	-	-	+	+	-	-	D	O11 NM
UPEC-13	+	+	-	+	-	+	+	+	-	D	O153H18
UPEC-14	+	-	-	+	-	+	+	+	-	D	O11 NM
UPEC-15	+	-	-	+	-	+	+	+	-	A	O12 NM
UPEC-16	+	-	-	+	-	+	+	-	-	A	O12 H18
UPEC-17	+	-	-	+	-	+	+	+	-	A	O25 NM
UPEC-18	+	+	+	+	-	+	+	-	-	A	O? H2
UPEC-19	+	-	-	-	-	+	+	-	-	D	O25 H4
UPEC-20	+	-	+	+	-	+	+	-	-	A	O164 H4
UPEC-21	-	-	+	+	-	-	-	+	-	A	O12 NM
UPEC-22	+	+	+	+	-	+	+	+	-	A	O20H9
UPEC-23	+	+	+	+	-	+	+	-	-	D	O? NM
UPEC-24	-	-	-	+	-	-	-	-	-	B2	O?NM
UPEC-25	+	+	+	+	-	+	+	+	-	B2	O2 NM
UPEC-26	+	+	-	+	-	+	-	-	-	A	O100 H28
UPEC-27	+	+	-	+	-	+	+	-	-	A	O? H18
UPEC-28	+	+	-	-	-	+	+	-	-	A	O2 NM
UPEC-29	+	-	-	-	-	+	+	-	-	A	O? H2
UPEC-30	+	-	+	+	-	+	-	-	-	A	O86H18

UPEC-31	+	+	+	+	-	+	+	-	-	B2	O? H6
UPEC-32	+	+	+	+	-	+	+	-	-	B2	O1 NM
UPEC-33	+	-	-	-	-	+	-	-	-	D	O169 H9
UPEC-34	+	-	-	-	-	+	-	-	-	D	O86 H18
UPEC-35	+	-	-	-	-	+	-	-	-	D	Odys11 H4
UPEC-36	+	-	-	-	-	-	+	-	-	D	O171 H12
UPEC-37	+	-	-	-	-	+	+	-	-	D	O100 H12
%	89	27	32	59	3	84	68	24	3		

NM=no móvil; O?= no tipificable