



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

PLÁSMIDOS EN CEPAS MULTIRESISTENTES DE *ESCHERICHIA  
COLI* UROPATÓGENA Y EN CEPAS DE BIVALVOS MARINOS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

VÍCTOR SAMUEL LÓPEZ COLDIVAR

DIRECTOR DE TESIS:

DR. HIPÓLITO ÁNGEL MANJARREZ HERNÁNDEZ

2013





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



Universidad Nacional  
Autónoma de México

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.

## Jurado asignado



FACULTAD DE CIENCIAS  
Secretaría General  
División de Estudios Profesionales

Votos Aprobatorios

**DR. ISIDRO ÁVILA MARTÍNEZ**  
Director General  
Dirección General de Administración Escolar  
**Presente**

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:

**Plásmidos en cepas multiresistentes de Escherichia coli uropatógena y en cepas de bivalvos marinos**

realizado por **López Coldivar Víctor Samuel** con número de cuenta **3-0102007-7** quien ha decidido titularse mediante la opción de tesis en la licenciatura en **Biología**. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Propietario	M. en C. Sandra Rosa del Pilar Gavilanes Parra	
Propietario	M. en C. Brian Urbano Alonso	
Propietario Tutor	Dr. Hipólito Ángel Manjarrez Hernández	
Suplente	M. en C. Jorge Luis Garcés Salazar	
Suplente	Biól. César Ramiro Martínez González	

**Sitio donde se desarrollo el tema:** Laboratorio de Patogénesis Bacteriana. Departamento de Salud Pública. Facultad de Medicina, UNAM.

## Agradecimientos

**Dr. H. Ángel Manjarrez Hernández:** gracias por permitirme formar parte de su laboratorio, por brindarme la oportunidad de realizar este trabajo, por sus enseñanzas, por brindarme su confianza y amistad.

**M. en C. Sandra Gavilanes Parra:** gracias por sus enseñanzas durante toda mi estancia en su laboratorio y por sus consejos para ayudarme a ser un mejor profesionalista.

**M. en C. Brian Urbano Alonso:** gracias amigo por toda tu ayuda a lo largo de esta investigación durante los viajes y colectas de los bivalvos, por tus consejos, y ayuda para realizar este trabajo.

**M. en C. Jorge Luis Garcés Salazar:** gracias por tu ayuda en las colectas de los bivalvos, por tus consejos y por el tiempo dedicado a revisar este trabajo.

**Biol. César Ramiro Martínez González:** gracias por tus indicaciones para mejorar este trabajo y por tu amistad a lo largo mi carrera.

**Biol. María Elena Chávez Berrocal:** gracias por tus consejos y enseñanzas durante mi estancia en el laboratorio.

Gracias a **La Facultad de Ciencias**, a **La Facultad de Medicina**, y a la **UNAM** por brindarme los conocimientos para poder formarme como profesionalista.

## Dedicatorias

**Mi Tesis está dedicada a Dios, a toda mi familia, a todos mis amigos,  
y a la comunidad científica de la UNAM.**

A mis padres Ramón López Pérez y Clementina Coldivar Ruiz que me dieron la vida y han estado conmigo en todo momento, por haberme iniciado en el camino de la educación, por sus consejos, y cuidados a lo largo de toda mi vida. A mi hermana: Sara Beatriz López Coldivar por su gran ayuda y apoyo durante toda mi vida. Mil gracias.

A toda mi familia en general, porque me han brindado su apoyo incondicional y por compartir conmigo buenos y malos momentos. Por mencionar a algunos de ustedes a mis hermanas: Cristina Coldivar y María Coldivar. A mis tías: Isabel López, Estela López, Silvia López, María López, Rosa Coldivar, Cata Coldivar, Paz Coldivar. A mis tíos: Enrique López, David López, Ramón Coldivar. A todos mis primos y sobrinos, quisiera nombrar a cada uno de ustedes pero nuestra familia es muy grande, eso no significa que no me acuerde de ustedes, a cada uno muchas gracias por estar conmigo.

A la memoria de mis abuelos: Ramón López Ortega, Celedonio Coldivar Navarro y mi abuela María Ruiz Olivares, gracias por sus enseñanzas, cuidados y consejos.

A todos mis amigos que he conocido en la Preparatoria 9, en la Facultad de Ciencias, en la UNAM y a lo largo de mi vida solo por mencionar a algunos: Alfredo Zamudio, Julio César Corrales, Abel Cornejo, Valeria Pasten, Gabriela Rosas, Grecia Martínez, Larisa Martínez, Jimena Pérez, Cecilia Rojas, Lizzete Mares, Mariana Castillo, Tania, Yuliette, Víctor Reyes, Edgar, Onasis, Roberto, Oscar, Carmen, Brenda, Samantha, Laura, Rigoberto, Omar, Jessica, Nancy, Karla, Gaby, Judith, Israel, Daniel, entre muchos otros. También incluyo a mis amigos del Club de Ajedrez Akiba Rubinstein, del Club de Ajedrez en Ciencias Z y de la comunidad Universitaria de Ajedrez. Gracias a todos ustedes por estar al pendiente de mí y por sus buenos deseos.

*Porque mejor es la sabiduría que las piedras preciosas; Y todas las cosas que se pueden desear, no son de compararse con ella.*

*Proverbios 8:11*

## Índice

Portada.....	pág. 1
Jurado asignado.....	pág. 2
Agradecimientos.....	pág. 3
Dedicatorias.....	pág. 4
Índice.....	pág. 6
Resumen.....	pág. 9
1. Introducción.....	pág. 10
1.1 Características generales de <i>Escherichia coli</i> ( <i>E. coli</i> ).....	pág. 10
1.1.1 Clasificación biológica.....	pág. 10
1.1.2 Tipos de <i>E. coli</i> patógenas.....	pág. 11
1.1.3 <i>E. coli</i> uropatógena (UPEC).....	pág. 12
1.2 Patogenia e Inmunidad de las Infecciones del Tracto Urinario (ITU).....	pág. 13
1.2.1 Factores de virulencia de UPEC.....	pág.14
1.2.1 Factores de virulencia de UPEC.....	pág. 14
1.3 Transferencia del material genético.....	pág. 14
1.3.1 Transformación.....	pág. 14
1.3.2 Transducción.....	pág. 15
1.3.3 Conjugación.....	pág. 15
1.4 Plásmidos características generales.....	pág. 15



1.4.1 Plásmidos.....	pág. 15
1.4.2 Estructura del plásmido.....	pág. 17
1.5 Antibióticos.....	pág. 17
1.5.1 Antibióticos y transcripción.....	pág. 19
1.5.2 Antibióticos y síntesis de proteínas.....	pág. 19
1.5.3 Antibióticos y mitocondrias.....	pág. 19
2. Objetivo general.....	pág. 20
2.1 Objetivo particular.....	pág. 20
3. Antecedentes.....	pág. 20
4. Hipótesis.....	pág. 21
5. Métodos.....	pág. 21
5.1 Cepas bacterianas.....	pág. 21
5.1.1 Colección de cepas UPEC.....	pág. 21
5.1.2 Colección de cepas de bivalvos.....	pág. 21
5.1.3 Aislamiento de cepas de <i>E. coli</i> a partir de intestino de moluscos (bivalvos) del mar.....	pág. 22
5.2 Identificación de la cepa bacteriana aislada del bivalvo mediante secuenciación del gene que codifica el rRNA 16S.....	pág. 23
5.2.1 Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR).....	pág. 23
5.2.2 Preparación del gel de agarosa 1.5%.....	pág. 23
5.2.3 Purificación del DNA.....	pág. 24
5.3 Obtención de plásmidos de cepas UPEC.....	pág. 25

5.3.1 Obtención de plásmidos por el método de lisis alcalina.....	pág. 25
5.3.2 Geles de agarosa 0.4%.....	pág. 25
5.4 Antibiograma por método de difusión en agar (Kirby-Bauer).....	pág. 25
5.4.1 Preparación del agar Mueller Hinton.....	pág. 25
5.4.2 Preparación de la solución bacteriana estándar de 0.5 del Nefelometro de Mc Farland.....	pág. 26
5.4.3 Método de Kirby-Bauer.....	pág. 26
6. Resultados.....	pág. 27
6.1 Prueba de susceptibilidad de los antimicrobianos.....	pág. 27
6.2 Comparación de plásmidos.....	pág. 29
6.3 Identificación de las especies bacterianas de los moluscos bivalvos.....	pág. 34
7. Discusión.....	pág. 38
8. Conclusión.....	pág. 42
9. Apéndice: composición de reactivos.....	pág. 43
10. Literatura citada.....	pág. 47

## Resumen

*Escherichia coli* (*E. coli*) es probablemente el organismo mejor conocido del mundo, ya que se ha utilizado como modelo para estudiar todo tipo de aspectos de genética y fisiología. El nicho ecológico de la *E. coli* comensal son las mucosas intestinales de los mamíferos, aves, reptiles de vida libre y de moluscos bivalvos. Los plásmidos son fragmentos extracromosómicos de ácidos nucleicos que se encuentran en el citoplasma de algunos procariotas. Cada bacteria puede tener uno o varios plásmidos, los cuales suelen brindar resistencia a los antibióticos. La resistencia de las cepas UPEC a varias clases de antibióticos sigue aumentando año con año. Las cepas UPEC del serogrupo O25 se caracterizan por su potencial de virulencia y por su resistencia a una amplia gama de antibióticos de amplio espectro, por esta razón son blanco de atención para su estudio, poco se sabe de las características que le confieren su éxito en la diseminación y prevalencia en la infecciones extraintestinales en humanos. El objetivo del presente trabajo es investigar la presencia de plásmidos en cepas UPEC del serogrupo O25, conocer su multiresistencia ante diferentes antimicrobianos y contrastarlas con cepas de *E. coli* silvestres (aisladas de intestinos de bivalvos) alejadas de la actividad humana. En este estudio se trabajó con dos grupos de bacterias; las primeras son 20 cepas de *E. coli* uropatogenas (UPEC) pertenecientes al serogrupo O25, las cuales fueron aisladas de orina de pacientes con infecciones en el tracto urinario, las segundas son cepas provenientes de los intestinos de bivalvos marinos del océano Pacífico y del Golfo de México. Las cepas de *E. coli* de los bivalvos, fueron aisladas e identificadas por pruebas bioquímicas (sistema VITEK) y por la secuenciación del amplificado de PCR del gen que codifica el rRNA 16S. La obtención de plásmidos de las bacterias fue por el método de lisis alcalina. La prueba del antibiograma se realizó por el método de difusión en agar. Como resultado se encontró que de las 20 cepas UPEC 18 presentaron al menos un plásmido mayor a 50 Kb, 4 cepas presentaron 2 plásmidos mayor a 50 kb y una cepa (1162) presentó 6 plásmidos. En las 19 cepas de los bivalvos (*Ostrea iridescens*) solo una presentó un plásmido. Todas las cepas UPEC presentaron multiresistencia a los antimicrobianos, con un rango de resistencia de 5 a 12 fármacos. En contraste, las cepas de *E. coli* aisladas de los bivalvos no presentaron resistencia a los antibióticos. En el presente trabajo, la mayoría de las cepas O25 estudiadas presentaron plásmidos, los cuales pueden ser determinantes para la virulencia y multiresistencia de dichas cepas. La multiresistencia a los antibióticos detectada en dichas cepas junto con la presencia de plásmidos sugiere que los plásmidos portan genes de resistencia. Podemos concluir que las cepas de *E. coli* de los bivalvos obtenidas en este trabajo forman parte de su flora intestinal, debido a que las muestras fueron tomadas directamente de los intestinos y porque dichas cepas no presentaron factores de virulencia, ni resistencia a los antibióticos. Aparentemente, estas cepas de intestino de moluscos han estado alejadas de la actividad antropogénica.

## 1. Introducción

### 1.1 Características generales de *Escherichia coli* (*E. coli*)

#### 1.1.1 Clasificación biológica

*Escherichia coli* es probablemente el organismo mejor conocido del mundo, ya que se ha utilizado como modelo para estudiar todo tipo de aspectos de genética y fisiología. Su genoma entero se conoce desde hace algunos años (Blattner *et. al.*, 1997) y su biología general está bien estudiada, como demuestran claramente las diferentes ediciones del trabajo clásico coordinado por Neidhardt *et. al.* 1987; 1996; Souza, *et. al.*, 2000.

El género *Escherichia* agrupa a cinco especies: *E. blattae*, *E. fergusonii*, *E. hermannii*, *E. vulneris* y *E. coli*, esta última es la más común y clínicamente la de mayor importancia para el humano, debido no sólo a que forma parte de la flora habitual del intestino, además, agrupa a diversas cepas que causan padecimientos extraintestinales y a otras cepas que destacan entre los principales agentes etiológicos del síndrome diarreico. Este organismo es causante de una gran variedad de enfermedades, incluyendo meningitis, gastroenteritis, infecciones del tracto urinario y sepsis. Sin embargo, no puede soslayarse el hecho de que *E. hermannii* y *E. vulneris* causen infecciones en heridas y de que *E. fergusonii* ha empezado a relacionarse con ciertas patologías entéricas, por lo que sólo *E. blattae* continúa considerándose como ajena al hombre (Murray *et. al.*, 1998).

*E. coli* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* típicamente es un microorganismo que coloniza el tracto gastrointestinal humano a pocas horas del nacimiento. Usualmente *E. coli* y los humanos coexisten en buena forma y con mutuos beneficios. Es un habitante normal del tubo intestinal de los animales y el hombre, coloniza el canal alimenticio durante el primer día de vida y posteriormente permanece como un miembro constante de la microbiota intestinal, por lo que se le considera un germen indicador de contaminación fecal cuando está presente en el ambiente, agua y alimentos (Smith y Crabb, 1961). Es un bacilo anaerobio facultativo, que se puede aislar e identificar tradicionalmente con base en sus características bioquímicas, siendo capaz de crecer en agar MacConkey y en medios simples con o sin agregado de NaCl, fermentadores y oxidativos en medios con glucosa u otros carbohidratos (Ewing, 1985). Las cepas de *E. coli* comensal raramente causan enfermedad excepto en hospederos inmunocomprometidos. El nicho ecológico de la *E. coli* comensal son las mucosas intestinales de los mamíferos, aves, reptiles de vida libre y posiblemente de invertebrados (Ewing, 1985), algunas cepas son de vida libre, o son patógenos de plantas (Logan, 1994; Souza *et. al.*, 2000).

La densidad de *E. coli* en el intestino grueso es de uno a diez millones de células por gramo de intestino (colon). Esto hace de *E. coli* un componente menor de la flora predominantemente anaerobia de esta parte del intestino, donde la densidad bacteriana total es de unas  $10^{11}$  células por gramo (Selander *et. al.*, 1987). Usualmente hay una cepa dominante de *E. coli* por hospedero, sin embargo la aparición de nuevos genotipos, ya sea por mutación o por ingestión, hace que esta dominancia sea sólo temporal y que la dinámica este dictada por procesos tanto aleatorios (derivación génica) como adaptativos (Levin, 1981; Caughant *et. al.*, 1981; Souza *et. al.*, 2001).

Cepas de *E. coli* aisladas de humanos han mostrado un incremento a la resistencia de algunos antibióticos. (Winokur *et. al.*, 2001; Miranda *et. al.*, 2004). Se ha observado que la susceptibilidad a los antibióticos de las bacterias aisladas no es constante, varía con respecto al tiempo y al ambiente (Hassan, 1995). Numerosos estudios epidemiológicos han demostrado que *E. coli* es un causante común de infecciones del tracto urinario principalmente en mujeres (Manges *et. al.*, 2008; Nasreen *et. al.*, 2009).

*E. coli* se utiliza frecuentemente como modelo para la replicación procariota del DNA, ya que tiene un único cromosoma el cual se divide aproximadamente cada 20 minutos a 37°C en medios favorables como el Luria Bertani. Posee un único sitio de replicación llamado OriC, que es un segmento de 245 pares de bases. La unión de una proteína con una secuencia específica alrededor del origen hace que el DNA se desnaturalice (disociación de las cadenas) y se desenrolle. Esto produce un complejo pre-iniciador que facilita el desenrollado adicional y la entrada de un cebador, una primasa y de una RNA polimerasa, para producir la síntesis (Jones y Morris, 1999).

### **1.1.2 Tipos de *E. coli* patógenas**

Las variantes patógenas de *E. coli* están representadas por cepas con serogrupos específicos que poseen un conjunto particular de factores de virulencia, los cuales son responsables de las diferentes manifestaciones clínicas que caracterizan las infecciones de *E. coli*. Las *E. coli* que infectan a los seres humanos, se dividen en dos clases: 1) las intestinales causantes de varios tipos de diarrea y 2) las extraintestinales responsables de las infecciones del tracto urinario (ITU) y de causar meningitis neonatal y septicemia. Las cepas de *E. coli* que causan diarrea humana de gravedad variable se han dividido en seis categorías (patotipos) principales: *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteropatógenas (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) y *E. coli* de adherencia difusa (DAEC). Las cepas de *E. coli* causantes de infecciones del tracto urinario son conocidas como *E. coli* uropatógenas (UPEC), mientras que las *E. coli* responsables de los casos de meningitis o sepsis (MNEC) (Groisman, 2001).

### 1.1.3 *E. coli* uropatógena (UPEC)

UPEC tiene una gama de factores de virulencia que le permiten evadir las defensas del hospedero y establecer una infección en este nicho único. Estos factores de virulencia están usualmente codificados en el cromosoma bacteriano y frecuentemente son parte de regiones cromosomales largas e inestables conocidas como islas de patogenicidad. En general, el genoma de las cepas UPEC es particularmente rico en genes que codifican para adhesinas fimbriales y múltiples sistemas de adquisición de hierro (Tay *et. al.*, 2012). Los principales factores de virulencia de las cepas UPEC son:

- I) Los apéndices, fimbrias o pilis (tipo 1, P, S y F1C); que poseen moléculas adhesivas llamadas adhesinas.
- II) Los sistemas de adquisición de hierro (sideróforos, aerobactina, ironN).
- III) La producción de toxinas ( $\alpha$ -hemolisina, factor necrotizante citotóxico tipo 1 [CNF-1] y una proteína autotransportadora conocida como Sat).
- IV) Mecanismos de evasión de defensas del hospedero (cápsulas, antígenos específicos o proteínas de membrana externa).

Estos factores de virulencia tienen su efecto cuando la bacteria se adhiere a las células del hospedero, participan en la inflamación y dañan el tejido además inducen la producción de citosinas. Dichos factores de virulencia se encuentran en diferentes porcentajes entre los subgrupos de cepas UPEC, y sus genes generalmente no son encontrados con la misma frecuencia en cepas fecales (Tay *et. al.*, 2012).

Las cepas UPEC son responsables del 80% aproximadamente de las infecciones del tracto urinario y 30% de las infecciones adquiridas en nosocomios. El tracto urinario generalmente es estéril, gracias a una serie de mecanismos de defensa como son el flujo de orina, la afluencia de células inmunes efectoras y el desprendimiento de las células epiteliales. Las bacterias UPEC normalmente residen en el colon y se introducen al tracto urinario vía uretral. Las ITU son el resultado de la colonización ascendente del tracto urinario por estas cepas. Las infecciones pueden ocurrir en la uretra (uretritis), la vejiga (cistitis), y los riñones (pielonefritis), y bajo algunas condiciones, los microorganismos entran en el torrente sanguíneo (bacteriemia). Las interrupciones de la flora normal (tal como es el uso de espermicidas vaginales) o por inoculación directa (por ejemplo, durante el coito) pueden causar infecciones. Los síntomas clínicos de las infecciones urinarias varían dependiendo de la región del tracto urinario que está colonizado (Groisman, 2001).

Las infecciones del tracto urinario generalmente comienzan con la colonización de la uretra por cepas de *E. coli* provenientes del colon. A menos que las cepas uropatógenas se eliminen del tracto vaginal y del colon, así como del tracto urinario, la misma cepa puede reinfectar el tracto urinario. La colonización de la vagina, especialmente en el área alrededor de la abertura de la uretra, también aumenta la posibilidad de que las bacterias entren en el orificio uretral. En el tracto vaginal, la mayoría de los nichos disponibles son ocupados por la microflora residente, sobre todo los lactobacilos. Cualquier alteración de la microflora residente abre el camino para la colonización del tracto vaginal por *E. coli* u otros patógenos potenciales. La asociación entre el uso de espermicidas y mayor incidencia de las infecciones del tracto urinario puede explicarse por el hecho de que el nonoxinol-9, es el ingrediente activo en los espermicidas, inhibe el crecimiento de los lactobacilos (un componente importante de la microflora residente) y por lo tanto ayuda a crear un entorno favorable para la colonización de la vagina por cepas de *E. coli* uropatógenas (Salyers, 1994).

Las cepas UPEC corresponden a un número limitado de serogrupos O, entre los que se encuentran: O1, O2, O4, O6, O7, O8, O16, O25, y O75; en donde cada uno de los factores de virulencia se asocian de manera significativa con estos serogrupos (Blanco *et. al.*, 1995; Johnson *et. al.*, 1994; Kurazono *et. al.*, 2003). Sin embargo, también se pueden aislar otros serogrupos de *E. coli* en casos de ITU.

## **1.2 Patogenia e Inmunidad de las Infecciones del Tracto Urinario (ITU)**

El tracto gastrointestinal es el reservorio de UPEC a partir del cual la bacteria origina una infección ascendente en el tracto urinario, a través de la uretra las bacterias llegan a la vejiga, y la infección puede ascender vía los uréteres hacia los riñones (Brumfitt *et. al.*, 1987) y en la última instancia, puede resultar en insuficiencia renal y ser la puerta de entrada de bacterias al torrente sanguíneo.

Las cepas uropatógenas de *E. coli* son genéticamente distintas a las cepas comensales/fecales de *E. coli*, debido a que poseen genes que codifican para factores de virulencia específicos (Brzuszkiewics *et. al.*, 2006; Chen *et. al.*, 2006; Dobrindt, *et. al.*, 2002 y 2003; Johonson, 1991), localizados en fragmentos de DNA denominados Islas de Patogenicidad (PAIs por sus siglas en inglés) (Hacker, 1999), que le permiten a UPEC colonizar la vejiga, sobrevivir en el tracto urinario y causar daño en el tejido (Mulvey, 2002).

Existen tres fases en la patogénesis de una típica ITU: colonización, crecimiento y generación de daño, las cuales son contiguas y se traslapan (Sussman y Gally, 1999). Para poder desarrollar dichas fases, UPEC posee factores de virulencia dentro de los que se encuentran principalmente: adhesinas, mecanismos de adquisición de hierro, toxinas, cápsula y proteasas (Zhang *et. al.*, 2000).

### 1.2.1 Factores de virulencia de UPEC

Las cepas de *E. coli* uropatógena suelen producir múltiples adhesinas, o bien combinaciones de diferentes tipos de pilus o combinaciones de serotipos diferentes de los mismos pilus (Salyers, 1994). A pesar de que las adhesinas, lipopolisacáridos (LPS) y exotoxinas han recibido la mayor atención, hay otras características de las cepas de *E. coli* uropatógenas que parecen contribuir a la virulencia. La adquisición de hierro es un importante factor de virulencia. Las cepas de *E. coli* uropatógenas tienen varios sistemas de captación de hierro, incluyendo los sistemas basados en sideróforos. Muchas cepas uropatógenas tienen cápsulas y son resistentes al suero, especialmente aquellas que causan infecciones en los riñones e infecciones sistémicas del tracto urinario. Los mecanismos antifagocíticos también puede ser importantes para resistir el influjo de polimorfos-nucleares (PMN's) al lumen de la vejiga que se produce en respuesta a la infección. Las bacterias adheridas a la mucosa de la vejiga y especialmente las bacterias que han infectado el riñón probablemente serán expuestas para activar componentes del complemento. El riñón es un área protegida con respecto a la respuesta inmune ya que los niveles elevados de urea pueden reducir la actividad de los fagocitos y la migración (Salyers, 1994).

### 1.3 Transferencia del material genético

Los datos de la genómica comparativa son para apoyar el papel fundamental desempeñado por la transferencia horizontal (HGT) que conduce a la presencia de islas genómicas distintas y variables (GIS) con la conservación del esqueleto cromosómico en varios linajes bacterianos de *E. coli*. Este ADN recién adquirido si es beneficioso puede ser integrado de forma estable en el genoma a través del proceso de selección natural, lo que conduce a la evolución bacteriana. Este DNA adicional con frecuencia se encuentra dentro de inserciones conocidos como puntos calientes, es decir, RNAt y RNAm (Kaper *et. al.*, 2004; Brzuszkiewicz *et. al.*, 2009).

El genoma bacteriano es haploide: sólo hay un conjunto completo de material genético que puede transferirse entre bacterias para producir cigotos parciales y los tres mecanismos de transporte genético entre bacterias son:

- **1.3.1 Transformación:** algunas bacterias liberan DNA a su entorno; puede ser captado por otras bacterias, a través de un mecanismo de captación por receptor. Si el DNA es compatible, se incorpora al genoma bacteriano; en caso contrario, es degradado por las exonucleasas (Jones y Morris, 1999).



- **1.3.2 Transducción:** un fragmento del DNA bacteriano se incorpora a un bacteriófago durante el empalme (los bacteriófagos son lo virus que infectan a las bacterias). Uno de cada  $10^6$  bacteriófagos contiene DNA bacteriano y cuando infecta a la próxima bacteria, el genoma vírico y el DNA bacteriano se introducen en la nueva célula hospedadora. Al igual que en el caso de las transformación, si el DNA bacteriano es compatible puede integrarse en el genoma del huésped (Jones y Morris, 1999).
- **1.3.3 Conjugación:** es la forma de reproducción sexual. Existen dos tipos de cepas bacterianas: F positivas ( $F^+$ ) y F negativas (F). Las células F positivas poseen un plásmido (porción de material genético extracromosómico) denominado factor F. Las células  $F^+$  poseen un pilus (una proyección citoplasmática) que les confiere la capacidad de adherirse a otras células bacterianas por medio de puentes citoplásmicos a través de los que puede transferirse el material genético (Jones y Morris, 1999).

Tenemos una cepa receptora junto con material genético que aporta otra célula, de forma que a partir de ahí, puede producirse la conjugación, que es la transferencia de material genético; aunque para que sea viable, debe darse la recombinación gracias al proceso del entrecruzamiento (Bingle y Thomas, 2001; Llosa, *et. al.*, 2002; Phornphisutthimas, *et. al.*, 2007).

Para que la recombinación de un cromosoma viable (que podrá ser circular), debe producirse un número par de entrecruzamientos, puesto que si no, no obtendrá ningún producto viable, sino un cromosoma largo lineal y extraño, parcialmente diploide. Si se da este número par de entrecruzamientos, se obtendrán dos productos, uno que se perderá durante el crecimiento celular y otro que será viable (Bingle y Thomas, 2001; Llosa, *et. al.*, 2002; Phornphisutthimas, *et. al.*, 2007).

## 1.4 Plásmidos características generales

### 1.4.1 Plásmidos

Los plásmidos son fragmentos extracromosómicos de ácidos nucleicos (DNA o RNA) que se encuentran en el citoplasma de algunos procariontes. Son de tamaño variable aunque menor que el cromosoma principal. Cada bacteria puede tener uno o varios plásmidos a la vez. Los plásmidos tienen una conformación variable que puede ser lineal, circular o con estructura superenrollada. El control de la replicación del plásmido depende del tipo de plásmido, existiendo plásmidos cuya replicación está acoplada con la replicación del cromosoma bacteriano y plásmidos cuya replicación no está relacionada con la del cromosoma. El tipo de genes que portan los plásmidos es variable, tratándose generalmente de genes que aportan ventajas adaptativas a la bacteria que los porta: genes de resistencia a antibióticos, genes de producción de sustancias tóxicas para otras bacterias o genes que codifican enzimas útiles para degradar sustancias químicas (Snyder y Champens, 2007).

Los plásmidos, varían ampliamente en tamaño desde unos pocos miles a cientos de miles de pares de bases (un tamaño comparable con el del cromosoma bacteriano), son a menudo moléculas circulares de DNA de doble cadena. Sin embargo, algunas bacterias tienen plásmidos lineales y algunos plásmidos circulares, con mayor frecuencia los de las bacterias gram-positivas, se pueden acumular en una sola cadena de DNA, debido al mecanismo aberrante del círculo rodante en la replicación. El número de copias también varía entre plásmidos, y las células bacterianas pueden albergar a más de un tipo. Así, una célula puede albergar dos o más tipos diferentes de plásmidos, con cientos de copias de algunos tipos de plásmidos y sólo una o unas pocas copias de otros tipos (Snyder y Champens, 2007).

Dependiendo de su tamaño, los plásmidos pueden codificar unos pocos o cientos de proteínas diferentes. Sin embargo, los plásmidos no codifican productos que sean esenciales para el crecimiento, tales como la RNA polimerasa, subunidades ribosomales, o enzimas del ciclo del ácido tricarboxílico. En su lugar, los genes del plásmido bacteriano suelen dar una ventaja selectiva en sólo algunas condiciones (Snyder y Champens, 2007).

Si el genoma de *E. coli* es dinámico, sus elementos extracromosomales (plásmidos) son aún más dinámicos. *E. coli* puede sobrevivir sin ningún plásmido o tener un buen porcentaje de su genoma total en plásmidos (Hopwood y Chater, 1989). Se han descrito cerca de 300 plásmidos diferentes en *E. coli* (Boyd *et. al.*, 1996). El número y tipo de plásmidos dentro de una célula está regulado por dos fuerzas: el número de réplicas de un mismo plásmido dentro una bacteria (fenómeno controlado en parte por el mismo plásmido) y la entrada de nuevos plásmidos por conjugación o transformación. Se ha reportado que los plásmidos pueden transferirse entre células de diferentes orígenes filogenético (géneros e inclusive familias diferentes comparten plásmidos), dándole capacidades nuevas e instantáneas a su receptor (Lewin, 1998). Sin embargo, es interesante señalar que existe incompatibilidad entre plásmidos de un mismo grupo, por lo que no pueden ingresar a una bacteria dada plásmidos nuevos pertenecientes a un grupo ya existente (Madigan *et. al.*, 2000). La información contenida en estos elementos extra-cromosomales es variable, ya que en ellos se puede encontrar información para asimilar azúcares raros, para producir colicinas (substancias alelopáticas que matan a posibles competidores de la misma especie) resistencias a antibióticos y a metales pesados, inmunidad contra fagos y colicinas, genes que codifican para intercambio genético y fimbrias relacionadas con la patogenicidad y toxinas, entre otros (Lewin, 1998).

### 1.4.2 Estructura del plásmido

Los plásmidos son fragmentos extracromosómicos circulares de DNA que se replican autónomamente en una célula huésped, están presentes en casi todas las especies bacterianas y varían en tamaño desde unos pocos hasta varios centenares de pares de kilobases (kb) (Waters, 1999). El plásmido incrementa la diversidad genética bacteriana y puede ser intercambiado horizontalmente entre las poblaciones bacterianas por conjugación o movilización (Francia *et. al.*, 2004). Los plásmidos contienen genes para la iniciación y el control de replicación y accesorios que pueden ser útiles a su huésped bacteriano, tales como resistencia a los antimicrobianos o de genes de virulencia (Amabile-Cuevas y Chicurel, 1992; Bergstrom *et. al.*, 2000; Thomas, 1973).

En la mayoría de las bacterias, los plásmidos conjugativos pueden incluso ser transferidos a los microorganismos lejanamente relacionados, incluso, por esta razón, la resistencia a los antibióticos puede extenderse entre las bacterias patógenas, y el DNA bacteriano también se puede transferir a la célula huésped eucariota (Bingle y Thomas, 2001; Llosa *et. al.*, 2002). La transferencia conyugal de plásmidos en bacterias gram-negativas y gram-positivas requiere de un estrecho contacto físico entre las células de apareamiento y por lo general mediada por plásmidos que codifican las proteínas que proporcionan la transferencias (TRA) (Errington *et. al.*, 2001; Zechner *et. al.*, 2000; Anderson *et. al.*, 2004; Phornphisutthimas *et. al.*, 2007).

Los patrones de digestión de las endonucleasas de restricción pueden proporcionar un método rápido y reproducible de clasificación de los plásmidos, que podría contribuir a los sistemas de vigilancia en los países tropicales con una alta prevalencia de la resistencia a los antimicrobianos (Shears *et. al.*, 1989).

## 1.5 Antibióticos

En los últimos años, la resistencia de las cepas UPEC a varias clases de antibióticos sigue aumentando cada año y se ha convertido en una preocupación importante tanto en hospitales como en la comunidad (Gupta *et. al.*, 1999 y 2001; Saham *et. al.*, 2001). En consecuencia, estas complicaciones representan un desafío enorme para el tratamiento de las ITU y sugieren que una vacuna podría prevenirlas, reduciendo significativamente la fuente de morbilidad y la carga económica (Alteri *et. al.*, 2009; Durant, 2007).

La comprensión de la epidemiología molecular de los plásmidos de resistencia ha sido un tema importante ya que los investigadores y científicos se dieron cuenta de su papel en la propagación de la resistencia a los medicamentos. Sin embargo, la comprensión de esta epidemiología ha sido compleja debido a la diversidad de la naturaleza y la dinámica de estos elementos. El sistema de replicación de los plásmidos determina el rango de hospederos y el número de copias, es la principal función de un plásmido desde el punto de vista biológico, pero también se utiliza para su clasificación e identificación. Sin embargo, la cantidad de copias de un plásmido también desempeña un papel crítico en la comunicación de diversas características para el patógeno, tales como la resistencia a los diferentes antibióticos (Nasreen *et. al.*, 2009).

Los pasos de la terapéutica durante el tratamiento de las infecciones del tracto urinario, involucran la administración de antimicrobianos, y algunos antibióticos como: ampicilina, chrolamfenicol, sulphonatometano, colisina, kanamicina, ácido nalidíxico, nitrofurantoína, trimetroprim-sulfametoxazol, entre otros. Los estudios de la resistencia a los antibióticos utilizan *E. coli* aislada del tracto urinario provenientes de pacientes de diferentes clínicas que han mostrado un reporte en el incremento a la resistencia de ciertos antibióticos, por ejemplo a la ampicilina (Zhanel *et. al.*, 2000) y la ciprofloxacina (Karlowsky *et. al.*, 2004; Nasreen *et. al.*, 2009).

Las bacterias adquieren resistencia a través de diferentes vías, como la resistencia natural o intrínseca (inaccesibilidad al sitio blanco del antibiótico, múltiples sistemas de eflujo e inactivación de drogas), la resistencia natural es un carácter constante de todas las cepas de una misma especie bacteriana. El conocimiento de las resistencias naturales permite prever la inactividad de la molécula frente a bacterias identificadas (después del crecimiento) o sospechosas (en caso de antibioterapia empírica). En ocasiones, constituye una ayuda para la identificación, puesto que ciertas especies se caracterizan por sus resistencias naturales. La resistencia mutacional (modificación en el sitio blanco de los antibióticos, reducción de la permeabilidad o absorción, y desrepresión metabólica de eflujo multifármaco). Esta resistencia adquirida es una característica propia de ciertas cepas, dentro de una especie bacteriana naturalmente sensible, cuyo acervo genético ha sido modificado por mutación o adquisición de genes. Contrariamente a las resistencias naturales, las resistencias adquiridas dependen a menudo de la utilización de los antibióticos. En el caso de numerosas especies bacterianas, y teniendo en cuenta la evolución de las resistencias adquiridas, el espectro natural de actividad no es ya suficiente para guiar la elección de un tratamiento antibiótico. En ese caso, se hace indispensable el antibiograma (Nasreen, *et. al.*, 2009).

### 1.5.1 Antibióticos y transcripción

La actinomicina inhibe ambas polimerasas, de DNA y RNA, al intercalarse entre los pares G-C en el dúplex de DNA e inhibe la síntesis del ácido nucleíco. La rifampicina inhibe de forma específica las ARN polimerasas de los procariotas. Al permanecer unida al promotor, bloquea la elongación de la cadena evitando que se formen nuevos complejos de iniciación. No bloquea las DNA polimerasas de los eucariotas, por lo que es un útil agente bactericida frente a bacterias gram-positivas y de la tuberculosis (Jones y Morris, 1999).

### 1.5.2 Antibióticos y síntesis de proteínas

Muchos antibióticos bloquean la síntesis de proteínas, bien por bloqueo de traslación, o bien por otros mecanismos. Algunos son muy útiles en terapéutica porque están dirigidas específicamente a la traducción o síntesis de proteínas de los procariotas (Jones y Morris, 1999).

### 1.5.3 Antibióticos y mitocondrias

El proceso de traducción de los eucariotas es muy parecido al de los procariotas. Los antibióticos que inhiben la síntesis de proteínas en los procariotas pueden afectar también la síntesis proteica en las mitocondrias (Jones y Morris, 1999).

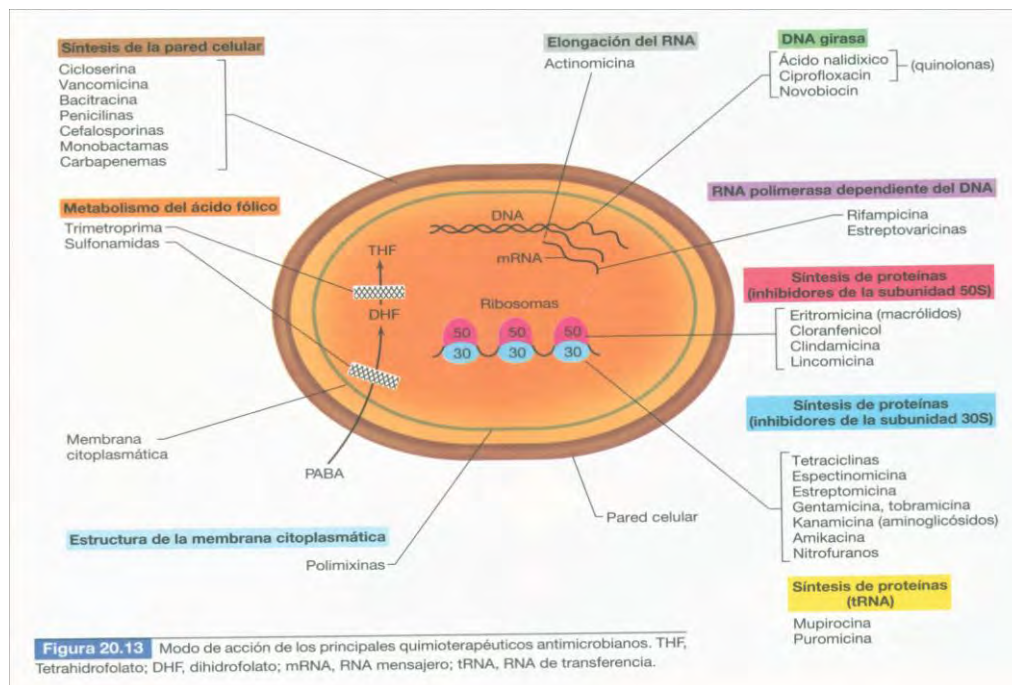


Figura 1. Muestra el sitio de acción dentro de la célula procarionte de algunos de los antibióticos.

## 2. Objetivo general

Investigar la presencia de plásmidos en cepas UPEC del serogrupo O25, conocer su multiresistencia ante diferentes antimicrobianos y contrastarlas con cepas de *E. coli* silvestres (aisladas de intestinos de bivalvos) alejadas de la actividad humana.

### 2.1 Objetivos particulares

Con el propósito de continuar con la investigación de las cepas de *E. coli* en los moluscos, se realizaron aislamientos de los intestinos de las siguientes especies de bivalvos: *Ostrea iridescens*, *Modiolus capax*, *Pinctada mazatlanica*, *Rangia cuneata*, *Ostrea megodon*, *Anadara floridana*, *Crassostrea rhizophorae* y *Donax variabilis*.

## 3. Antecedentes

La capacidad de las cepas patógenas de *E. coli* para causar los distintos tipos enfermedades intestinales y extraintestinales procede de la expresión de múltiples factores de virulencia incluyendo adhesinas, toxinas, sideróforos, sistemas de secreción, y plásmidos (Blanco *et. al.*, 2002; Johnson, 2002).

Los distintos patotipos de *E. coli* tienden a ser grupos clonales que son caracterizados por compartir determinados tipos de antígenos. Se define como serogrupo a el conjunto de cepas que comparten una variedad antigénica teniendo en cuenta solo los antígenos O (lipopolisacáridos); por otro lado los serotipos son definidos por la combinación de los antígenos O y H (flagelar) y a veces del antígeno capsular o K (Kaper *et. al.*, 2004).

Las cepas de *E. coli* uropatógenas (UPEC) son las causantes de infecciones extraintestinales más comunes. Solo seis serogrupos (O6, O7, O8, O16, O25, y O75) causan el 75% de las infecciones urinarias (Kaper *et. al.*, 2004). Los plásmidos son muy frecuentes en cepas de *E. coli*, se han descrito más de 300 plásmidos diferentes (Boyd *et. al.*, 1996).

La prevalencia de las cepas de *E. coli* UPEC y el incremento de la resistencia a múltiples antibióticos complica el tratamiento de las infecciones del tracto urinario. El serogrupo predominante de *E. coli* asociado con esta multiresistencia y con un alto potencial de virulencia es el O25 (Molina-López *et. al.*, 2011).

El género *Escherichia* ha sido reportado en los invertebrados, la especie *Escherichia blattae* fue aislada de los intestinos de la cucaracha oriental (Brener, 1983; Bergan, 1983 y 1984). Algunos investigadores han aislado cepas fecales humanas de *E. coli* en moluscos bivalvos crudos y cocidos, junto con los condimentos y vegetales que acompañan su preparación (Martínez y Villalobos, 2005) producto de una clara contaminación. Sin embargo la especie *E. coli* no ha sido reportada hasta ahora como un habitante normal de la flora intestinal de ningún invertebrado sin verse asociada con la contaminación.

#### 4. Hipótesis

- Debido a la multiresistencia a los antimicrobianos y factores de virulencia de las cepas de *E. coli* O25, pensamos que estas bacterias deben portar plásmidos con genes que les confieren resistencia a los antimicrobianos.
- Pensamos que existen cepas de *E. coli* que forman parte de la flora intestinal de los bivalvos sin que sean producto de la contaminación humana del nicho ecológico de los moluscos.

#### 5. Métodos

##### 5.1 Cepas bacterianas

**5.1.1 Colección de cepas UPEC:** Las cepas UPEC fueron aisladas de orina de pacientes ambulatorios con infecciones en el tracto urinario, las muestras se obtuvieron de tres diferentes hospitales: Hospital General de México SSA, Hospital General Dr. Manuel Gea González SSA y Hospital General Dr. Gonzalo Castañeda Escobar del ISSSTE de la Ciudad de México. Las cepas son parte de la colección del Dr. Ángel Manjarrez Hernández; Laboratorio de Patogénesis Bacteriana, Departamento de Salud Pública, Facultad de Medicina, UNAM.

Las cepas utilizadas fueron las siguientes: A8-7, A8-18, A8-15, 75, 14672, 92, A8-1, 053, A8-24, 14609, 80, 96, 1162, A8-30, 14073, A8-28, A8-35, A8-42, 14044, 14030, de *E. coli* uropatógena (UPEC), todas con serogrupo O25.

**5.1.2 Colección de cepas de bivalvos:** Las cepas de *E. coli* se aislaron de los moluscos de la clase de los bivalvos de cuatro especies diferentes, estos se colectaron del mar de las regiones de la Isla "Las Gatas" de Ixtapa, Zihuatanejo, Guerrero, del Parque Nacional Lagunas de Chacahua, Oaxaca, del Océano Pacífico Mexicano, y del Golfo de México de la región de Veracruz, respectivamente.

### 5.1.3 Aislamiento de cepas de *E. coli* a partir de intestino de moluscos (bivalvos) del mar

Los bivalvos se colectaron a 25 metros de la playa a una profundidad aproximada de 3-4 metros por la técnica de buceo libre, las especies fueron identificadas mediante claves taxonómicas (Keen, 1971), se colectaron de cuatro a doce ejemplares de las siguientes especies: *Ostrea iridescens*, *Ostrea iridescens*, *Modiolus capax*, *Pinctada mazatlanica*, *Rangia cuneata*, *Ostrea megodon*, *Anadara floridana*, *Crassostrea rhizophorae* y *Donax variabilis*.

Los bivalvos se mantuvieron con vida en agua de mar durante 3-4 horas hasta el momento de tomar las muestras bacterianas. Las muestras se tomaron en condiciones de esterilidad de los intestinos de los bivalvos, se realizó un pequeño corte transversal de los intestinos con un bisturí, posteriormente se tomó la muestra intestinal con el asa de siembra bacteriológica. Se sembraron en el medio Mac Conkey y gelosa especial. Posteriormente se aislaron las colonias bacterianas que crecieron en los medios antes mencionados, por medio de la técnica de siembra en estrías en cajas con agar Mac Conkey hasta lograr el crecimiento de colonias aisladas. Este medio se recomienda para el cultivo y aislamiento de bacterias gram-negativas y para aislar y diferenciar bacilos entéricos fermentadores y no fermentadores de lactosa.

Para seleccionar las cepas de *E. coli*, éstas se sembraron en medio Chromogenic UTI (solo las *E. coli* crecen de color guinda). Las colonias que resultaron positivas a la prueba se aislaron y resembraron en el medio de cultivo de gelosa especial, posteriormente se confirmó la identidad de las bacterias como *E. coli* mediante pruebas bioquímicas realizadas por el sistema automatizado (VITEK) y por pruebas genéticas (PCR). Posteriormente, se verificó la identidad de las cepas al obtener la secuenciación parcial del gene de RNA ribosomal 16S. Para esto, se usaron los productos amplificados de PCR de dicho gene (16S).

Las cepas bacterianas UPEC y la cepa de *E. coli* aislada del bivalvo se sembraron en los medios de cultivo bacterianos Mac Conkey y gelosa especial. Para su conservación dichas cepas se conservaron congeladas a -20°C en el medio glicerol-Luria (60%-40%).



## **5.2 Identificación de la cepa bacteriana aislada del bivalvo mediante secuenciación del gene que codifica el rRNA 16S**

### **5.2.1. Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR)**

Se realizó el método de PCR de colonia, que consiste en tomar de una colonia una pequeña porción de masa bacteriana y diluirla directamente en la mezcla de reacción de PCR. La mezcla de reacción se realizó de la siguiente manera: Cada iniciador (primer) se resuspendió en agua bidestilada a una concentración final de 200 ng/ $\mu$ l y se conservaron en congelación (-20°C). Las soluciones de trabajo se llevan a una concentración teórica de 20 mg. Se amplificó el gen 16S rRNA usando los iniciadores 8F/1492R, de acuerdo al protocolo de Sasoh *et. al.* (2006), que amplifica un fragmento aproximado de 1500 bp, se realizó en un volumen total de 30  $\mu$ L, se añadieron 3 $\mu$  del buffer + (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>-MgCl<sub>2</sub>, 2.4  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> 25mM Fermentas, 3 $\mu$  de dNTP's, 1.5 $\mu$  del primer A (27F), 1.5 $\mu$  del primer B (1492r), 1 $\mu$  Taq Polimerasa, 3 $\mu$  ADN, 14.6 $\mu$  H<sub>2</sub>O. Concentraciones: [10X Taq Buffer with (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>, pH 8.8, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 200 uM dNTP's, 25 pmol de cada iniciador, 0.05U/ $\mu$ l Taq polimerasa]. Las amplificaciones del 16S rRNA se realizaron con un ciclo inicial de desnaturalización a 95 °C por 5 minutos; 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, alineamiento a 50 °C por 30 segundos, y una extensión a 72 °C por 2 minutos; finalmente un ciclo de extensión final a 72 °C por 10 min. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador PTC-200 (BIORAD, México). Los fragmentos amplificados fueron verificados por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%.

### **5.2.2 Preparación de gel de agarosa 1.5%**

Los amplificados de DNA de la PCR se corrieron en un gel de agarosa al 1.5%, que contenía bromuro de etidio [0.5  $\mu$ g/ml]. El gel se colocó en una cámara horizontal para electroforesis; se procedió a depositar cada muestra amplificada en cada pozo del gel previamente homogenizada con 7  $\mu$ l de LD (Loading Dye). Se colocó la fuente de poder en 80 Volts y se corrió la electroforesis por 40 minutos. Se observó un producto de DNA de 1500 pb en el transiluminador de luz ultravioleta (ver figura 4). Las bandas obtenidas del amplificado (1500 pb) se cortaron del gel de 1.5% de agarosa y se purificaron por el método del DNA Purification Kit QIAGEN.

### 5.2.3 Purificación del DNA

Los productos de PCR se limpiaron utilizando el kit de purificación QIAGEN. Protocolo del DNA Purification Kit QIAGEN: Se pesaron 100 mg de cada muestra. Se añadieron 400 µl de la solución AP1, 4 µl de RNasa A (100 mg/ml) y 20 µl de proteinasa K. Se mezcló vigorosamente. Se incubó la mezcla a 65°C durante 2 horas. Se añadieron 130µl de la solución AP2, se mezcló bien e incubo 5 minutos en hielo. Se centrifugaron durante 5 minutos a 13000 rpm. Se recogió el sobrenadante y se pasó a un tubo-columna QIAshredder y se centrifugó durante 2 minutos a velocidad máxima. Se transfirió el líquido filtrado al tubo a un tubo *ependorf* nuevo, sin arrastrar ningún resto de precipitado. Se añadieron 1.5 volúmenes de la solución AP3/E y se mezcló inmediatamente. Se recogieron 650 µl de esa mezcla, incluyendo cualquier precipitado que pueda haberse formado en la columna DNeasy mini spin. Se centrifugo durante 1 minuto a una velocidad de 10,000 rpm y se desechó el líquido filtrado. Se repitió el paso anterior con la muestra restante. Desechando el filtrado y el tubo colector. Se colocó la columna DNeasy en un tubo nuevo, se añadieron 500 µl de la solución AW y se centrifugo durante 1 minuto a 10,000 rpm. Se desecho el filtrado. Se añadieron 500 µl de la solución AW a la columna DNeasy y se centrifugó durante 2 minutos a 13,000 rpm para secar bien la membrana. Se transfirió la columna DNeasy a un microtubo de 2 ml y se añadieron 100 µl de la solución AE precalentada a 65°C directamente en la membrana DNeasy. Se incubo 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugo durante 1 minuto a 10,000 rpm. Se repitió el paso anterior. Se guardaron las muestras obtenidas en congelación. Posteriormente, el amplificado de DNA se envió a secuenciar, y la identidad de las cepas se obtuvo al comparar, en la base de datos, las secuencias de nucleótidos obtenidas.

Los productos de PCR se secuenciaron utilizando los primers mencionados anteriormente en un AppliedBiosystems modelo 3130XL (AppliedBioSystems, USA). Las secuencias se editaron con el programa BioEdit versión 7.0.5 (Hall, 1999), con el cual se creó una secuencia consenso. Esta secuencia, se comparó con las secuencias depositadas en el Gen Bank del National Center for Biotechnology Information (NCBI), mediante la opción BLASTN 2.2.19 (Zhang *et. al.*, 2000).

### **5.3 Obtención de plásmidos de cepas UPEC**

#### **5.3.1 Obtención de plásmidos por el método de lisis alcalina**

Se tomó una azada de una colonia de la cepa bacteriana y se sembró en 10 ml de caldo Luria estéril. Se incubó a 37°C en agitación de 100 rpm durante 14-16 horas. Se centrifugó el cultivo a 2,000 g por 15 minutos. Se descartó el sobrenadante y al botón bacteriano se le añadió 1 ml de la solución I y se disgregó en el vortex. Se transfirió a un tubo eppendorf y se centrifugó a 2,000 g durante 3 minutos a 4°C, se desechó el sobrenadante. Se conservó el botón bacteriano. El botón bacteriano se resuspendió en 200 µl de la solución I fría (sol. de lisis alcalina). Se agregaron 400 µl de la solución II recién preparada, se agitó, invirtiendo 5 veces el tubo de manera rápida, (no vortex). Se mantuvo el tubo en hielo. Posteriormente, se agregaron 300 µl de la solución III, se mezcló el tubo con algunos movimientos de inversión (se torna viscoso). Se dejó en hielo de 3 a 5 minutos. Se centrifugó a una velocidad de 14,000 rpm (microcentrifuga) durante 10 minutos a 4°C, posteriormente se transfirió 600 µl del sobrenadante a un tubo nuevo. Se le agregó un volumen igual (600 µl) de fenol:cloroformo (1:1), se mezclaron las fases orgánica y acuosa en el vortex y se centrifugó la emulsión a 14,000 rpm por 5 minutos a 4°C en la microcentrifuga. Se transfirió la fase acuosa (capa superior) a un tubo nuevo. Se precipitó el DNA agregando 600 µl de isopropanol. Se mezcló la solución en el vortex, y se dejó reposar la mezcla 2 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se colectó el precipitado mediante centrifugación (14,000) por 5 minutos a temperatura ambiente en la microcentrifuga. Se descartó el sobrenadante y se volteó el tubo sobre una toalla de papel para permitir que seque por unos minutos. Se agregó 1 ml de etanol al 70% y se centrifugó a una velocidad de 14,000 rpm por 3 minutos a temperatura ambiente. Se removió el sobrenadante y se dejó de 5-10 minutos a que el etanol se evapore. Se disolvieron los ácidos nucleicos agregando 100 µl de buffer TE pH 8.0 que contiene 20 µg/ml de RNasa. Se resuspendió brevemente la solución y se guardó a -20°C.

#### **5.3.2 Geles de Agarosa 0.4%**

Los plásmidos obtenidos por el método de la lisis alcalina, se corrieron en un gel de agarosa al 0.4%, a un voltaje de 55 volts durante una hora y de 75 volts por la siguiente hora.

### **5.4 Antibiograma por método de difusión en agar (Kirby-Bauer)**

#### **5.4.1 Preparación del agar Mueller Hinton**

Se preparó a partir del reactivo comercial BD Difco deshidratado y de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Después de su esterilización en la autoclave (121°C por 15 minutos) se dejó enfriar a baño María a 50°C, se vació en cajas Petri sobre una superficie plana con 4mm de espesor. Se dejaron enfriar a temperatura ambiente.

#### **5.4.2 Preparación de la solución bacteriana estándar de 0.5 del Nefelometro de Mc Farland**

Se preparó la solución estándar a 0.5 de la escala de McFarland de BaSO<sub>4</sub>: a una alícuota de 0.5 ml de 0.048 mol/l (1.175% p/v BaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O) se le agregó 99.5 ml de 0.18 mol/l (0.36 N) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1% p/v) con agitación constante para mantener la suspensión. Para controlar la densidad se utilizó un espectrofotómetro a una absorbancia de 625 nm el cual se debe leer entre 0.081 - 0.1 para la solución 0.5 de McFarland. Y se preparó una suspensión de cada cepa utilizada en este trabajo (a partir de una colonia del medio Mueller Hinton) en solución salina fisiológica equivalente al 0,5 en la escala de McFarland.

#### **5.4.3 Método de Kirby- Bauer**

Se tomó una colonia pura de cada cepa y se resembro en agar Mueller Hinton por 18 h. Luego se tomó una azada de este crecimiento y cada cepa se resuspendió en un tubo que contenía solución salina al 0.9%, hasta obtener 0.5 de la escala de McFarland. Se tomó la solución con un hisopo estéril y se plaqueó toda la superficie de las cajas de agar Mueller Hinton de manera homogénea en tres direcciones en ángulos de 60°. Con la ayuda de unas pinzas estériles, se colocaron los sensibilizadores impregnados con los antibióticos y se incubaron a 37°C por 18h. Todo el procedimiento se realizó en condiciones de esterilidad. Después de la incubación, cada placa fue examinada. Se leyó el halo de inhibición y se clasificó su susceptibilidad según la Tabla 2A Enterobacteria M2-Disk Diffusion (Zone Diameter Interpretative and Standards and Equivalent Inhibitory Concentration (MIC) Breakpoints for *Enterobacteriaceae*. Clinical and Laboratory Standards Institute, Vol. 25, No. 1, January 2005).

## 6. Resultados

### 6.1 Prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos

Se utilizaron 20 cepas de *E. coli* uropatógena (UPEC) con serogrupo O25, se ha reportado que cepas con este serogrupo tienen considerable potencial de virulencia y han demostrado ser difíciles de tratar clínicamente. Por lo tanto, se decidió continuar caracterizando dichas cepas particularmente en la resistencia a los antimicrobianos y su posible relación con plásmidos.

Para detectar la susceptibilidad de las cepas bacterianas se utilizó la prueba del antibiograma por el método de difusión en agar (Kirby-Bauer), se probaron 20 diferentes antimicrobianos de diferentes familias. Al realizar las pruebas se encontró que la mayoría de las cepas mostraron un alto nivel de resistencia a los 20 antimicrobianos probados.

El cuadro 1 muestra la prevalencia de resistencia entre las 20 cepas UPEC, se encontró que todas las cepas presentaron un alto grado de resistencia a los antibióticos de la familia de las penicilinas, el 100% de las cepas presentó resistencia a la ampicilina y a la carbenicilina. La familia de las quinolonas fue la segunda familia en presentar un alto grado de resistencia con 90% para el ácido nadilíxico y 70% de las cepas para las fluoroquinolonas (orfloxacina, norfloxacina y la ciprofloxacina). El trimetoprim-sulfametoxazol (SXT) que es un inhibidor de síntesis del ácido fólico presentó una resistencia del 65% de las cepas. Los inhibidores de las betalactamasas presentaron una resistencia de 50% para la piperacilina y la ticarcilina + ácido clavulánico, la resistencia a la tobramicina fue de 45% y a la amoxicilina + ácido clavulánico de 20% de las cepas.

Las familias de las cefalosporinas (cefazolin, ceftazidime, cefepime, ceftriaxona, y cefuroxima) los aminoglucósidos (gentamicina y amikacina), los carbapenems (meropenem) y la nitrofurantoína presentaron una baja resistencia. En el caso de las cefalosporinas, presentaron una resistencia con un rango del 5% al 20% de las cepas. La nitrofurantoína presentó una resistencia de solo el 5% las cepas. Cabe resaltar que solo dos antibióticos: meropenem y amikacina presentaron una eficacia del 100% ya que ninguna de las cepas de *E. coli* uropatógenas presentaron resistencia alguna (ver cuadro 1).

La resistencia promedio de todos los antibióticos suministrados fue de 40.5%, lo cual nos indica que en general las 20 cepas de *E. coli* uropatógenas tienen una considerable resistencia a los antibióticos de amplio espectro de diferentes familias. Todas las cepas UPEC (serogrupo O25) presentaron multiresistencia a los antimicrobianos, con un rango de resistencia de 5 a 12 fármacos.

**Cuadro 1.** Prevalencia de resistencia a los antimicrobianos entre 20 cepas UPEC serogrupo O25.

Antibiótico	Resistencia UPEC	
	No. De cepas resistentes	Porcentaje
1. Ampicilina (AMP10)	20	100%
2. Carbenicilina (CAR100)	20	100%
3. Ácido nalidíxico (NA30)	18	90%
4. Ofloxacina (OFX5)	14	70%
5. Norfloxacin (NOR10)	14	70%
6. Ciprofloxacina (CIP5)	14	70%
7. Trimetroprim-sulfametoxazol (SXT25)	13	65%
8. Piperacilina (PRL100)	10	50%
9. Ticarcilina + Ácido clavulánico (TIM85)	10	50%
10. Tobramicina (TOB10)	9	45%
11. Amoxicilina + ácido clavulánico (AMC30)	4	20%
12. Cephazolin (KZ30)	4	20%
13. Gentamicina (CN10)	4	20%
14. Ceftazidime (CAZ30)	3	15%
15. Cefepime (FEP30)	2	10%
16. Ceftriaxona (CTR30)	1	5%
17. Cefuroxima (CXM30)	1	5%
18. Nitrofurantoína (F300)	1	5%
19. Amikacina (AK30)	0	0%
20. Meropenem (MEM10)	0	0%

## 6.2 Comparación de plásmidos

Se aislaron los plásmidos de cada una de las 20 cepas uropatógenas y se comparó el perfil plasmídico de estas, el cuadro 2 muestra los resultados de la presencia de plásmidos, particularmente los que son mayores de 50 kb. Plásmidos de tal magnitud han sido reportados en cepas UPEC, no obstante, también consideramos los plásmidos o bandas menores a 50 kb. De las 20 cepas uropatógenas de *E. coli*, 18 cepas presentaron al menos un plásmido mayor a 50 Kb, 4 cepas presentaron 2 plásmidos mayor a 50 kb (ver figura 3) y una cepa presentó 6 plásmidos (ver figura 2). Solo dos cepas no presentaron plásmidos mayores a 50 kb. También se detectaron bandas de ADN plasmídico con masa molecular menor a 50 kb en 16 de las 20 cepas de *E. coli*, en este se tuvo certeza de que cada banda corresponda a un plásmido, ya que podrían ser productos de degradación de DNA. El porcentaje de agarosa que se uso en este trabajo, favorece la separación de plásmidos muy grandes (más de 50 kb) durante la electroforesis. Cuatro de las cepas no presentaron plásmidos menores de 50 kb (cepas 14672 14069, 80, y 1162). Al analizar el cuadro 2 encontramos que la mayoría de las cepas tuvieron plásmidos ya sea mayores o menores a 50 kb y todas resultaron multiresistentes, cada cepa fue resistente al menos a 5 antimicrobianos (cepa 14672), las cepas A8-18 y la 14030 fueron resistentes a 11 antimicrobianos. La efectividad del método de lisis alcalina en la obtención de plásmidos se comprobó al emplear las cepas control con y sin plásmidos (cepa de *E. coli* E2348/69 con plásmido grande y cepa CFT073 sin plásmido). El cuadro 3 muestra el perfil de plásmidos de las cepas de *E. coli* aisladas de los bivalvos, el cual reporta que solo una de las cepas presentó un plásmido y en la prueba de sensibilidad a los antimicrobianos todas resultaron ser sensibles a los antibióticos probados. Todas las cepas bacterianas UPEC de este estudio presentaron por lo menos un plásmido, también la cepa POst del bivalvo *Ostrea iridescens* reportó la presencia de un plásmido.

**Cuadro 2.** Presencia de plásmidos en las 20 cepas uropatógenas de *E. coli* y su perfil de multiresistencia a los antimicrobianos.

Perfil de Plásmidos			
Cepas	Número de Plásmidos mayores de 50 Kb	Número de plásmidos menores de 50 kb	Resistencia antimicrobiana
A8-7	1	2	AMP, CAR, TIM, CIP, NA, NOR, OFX, TOB
A8-18	2	2	AMP, CAR, PRL, KZ, CAZ, CXM, FEP, TIM, F, SXT, NA
A8-15	1	1	AMP, CAR, PRL, CTR, KZ, CAZ, FEP, TIM, NA
75	2	1	AMP, CAR, CN, TOB, NA, OFX, NOR, CIP, SXT
14672	2	Ausente	AMP, CAR, KZ, SXT, TIM
92	1	1	AMP, PRL, NA, OFX, NOR, STX, CIP, CAR, CN
A8-1	1	1	AMP, CAR, PRL, CAZ, TIM, CIP, NA, NOR, OFZ, TOB
053	1	3	AMP, CAR, PRL, NA, OFX NOR, CIP, SXT
A8-24	1	4	AMP, CAR, PRL, CAZ, TIM, SXT
14069	1	Ausente	AMP, CAR, PRL, NA, CIP, NOR, OFX
80	1	Ausente	AMP, CAR, CN, TOB, NA, OFX, NOR, CIP, SXT
96	Ausente	1	AMP, CAR, PRL, NA, OFX, NOR, SXT
1162	6	Ausente	AMP, CAR, TOB, NA, OFX, PRL, NOR, CIP, AMC, CN, SXT, F,
A8-30	1	2	AMP, CAR, PRL, TIM, AMC, CIP, NA, NOR, OFX, TOB
14073	1	4	AMP, CAR, TOB, NA, OFX, NOR, CIP, AMC, SXT
A8-35	1	2	AMP, CAR, CIP, NA, NOR, OFX
A8-42	1	1	AMP, CAR, TIM, SXT, CIP, NA, NOR, OFX, TOB
14044	2	1	AMP, CAR, TOB, NA, OFX, NOR, CIP, F, STX
A8-28	1	2	AMP, CAR, NA, SXT, TIM
14030	Ausente	1	AMP, CAR, PRL, NA, OFX, NOR, CIP, KZ, AMC, TIM, SXT
<i>E. coli</i> (control) de ostra POst	1	Ausente	Sensible a todos los anteriores



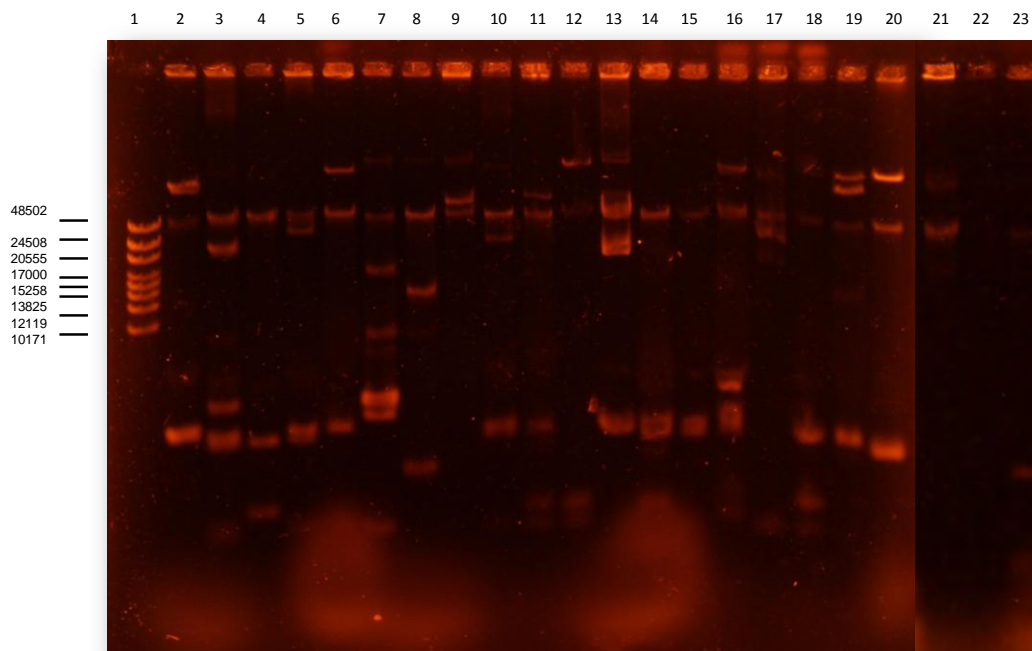
**Cuadro 3.** Muestra el perfil de plásmidos de *E. coli* aisladas de bivalvos.

Perfil de Plásmidos de <i>E. coli</i> Aisladas de Bivalvos			
Clave de la cepas	Número de bandas ≥ 50 Kb	Número de bandas ≤ 50 kb	Resistencia antimicrobiana
M1CE	Ausente	Ausente	Sensible a todos los anteriores
M1CE2	Ausente	Ausente	Sensible a todos los anteriores
P2A	Ausente	Ausente	Sensible a todos los anteriores
P9C	Ausente	Ausente	Sensible a todos los anteriores
P3A	Ausente	Ausente	Sensible a todos los anteriores
P3B	Ausente	Ausente	Sensible a todos los anteriores
P4A	Ausente	Ausente	Sensible a todos los anteriores
P7B	Ausente	Ausente	Sensible a todos los anteriores
P8A	Ausente	Ausente	Sensible a todos los anteriores
P9C	Ausente	Ausente	Sensible a todos los anteriores
P10A	Ausente	Ausente	Sensible a todos los anteriores
PM1A	Ausente	Ausente	Sensible a todos los anteriores
PM8B	Ausente	Ausente	Sensible a todos los anteriores

PM9A	Ausente	Ausente	Sensible a todos los anteriores
PM9B	Ausente	Ausente	Sensible a todos los anteriores
PM9C	Ausente	Ausente	Sensible a todos los anteriores
PM9D	Ausente	Ausente	Sensible a todos los anteriores
PM9E	Ausente	Ausente	Sensible a todos los anteriores
PM10A	Ausente	Ausente	Sensible a todos los anteriores
POst	1	Ausente	Sensible a todos los anteriores



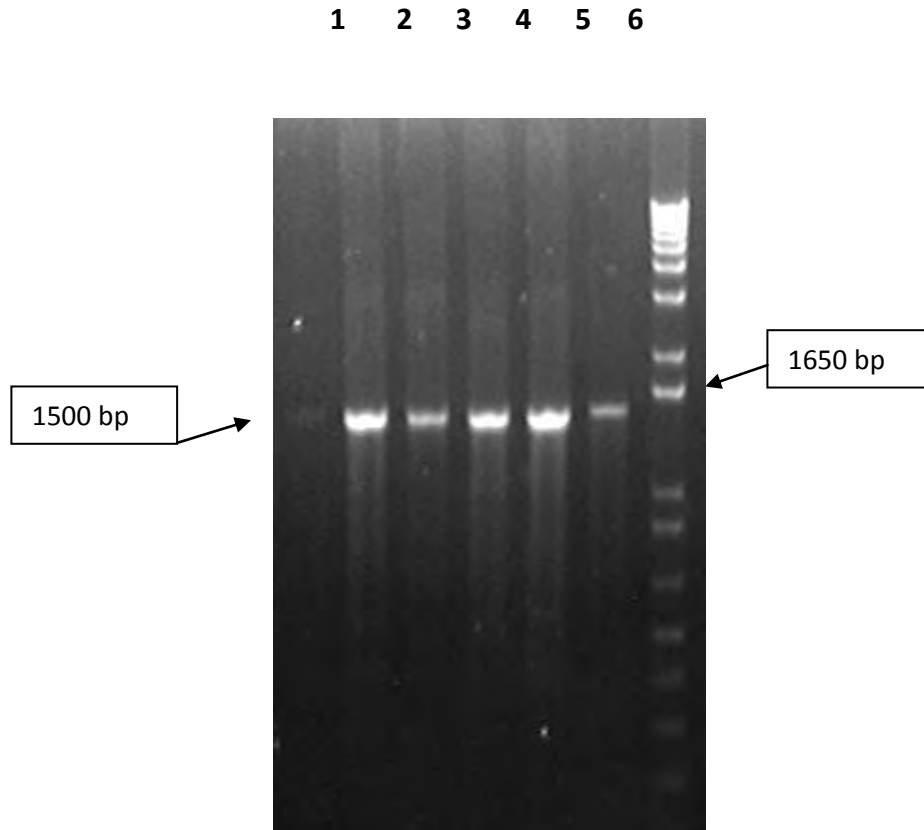
**Figura 2.** Perfil de plásmidos de la cepa 1162 UPEC. Donde se observa con claridad sus 6 plásmidos



**Figura 3.** Perfil de plásmidos obtenidos de 21 cepas de *E. coli* uropatógenas. Gel de Agarosa 0.4% cargado con las siguientes muestras: 1) DNA regla, 2) E2348/69, 3) 053, 4) 75, 5) 96, 6) A8-1, 7) A8-24, 8) A8-15, 9) 14672, 10) A8-30, 11) 14073, 12) 14609, 13) A8-28, 14) A8-42, 15) 14030, 16) A8-7, 17) A8-18, 18) A8-35, 19) 14044, 20) POst (bivalvo), 21) 1162, 22) 80, 23) 92.

### 6.3 Identificación de las cepas bacterianas aisladas de los moluscos bivalvos

La figura 4 muestra el resultado del amplificado de PCR de 1500 pb. La identificación se muestra en el cuadro 4, una de las bacterias aisladas resulto ser *Escherichia coli*, las otras cepas fueron *Pseudomonas stutzeri* y *Basillus cereus* respectivamente (ver cuadro 4). Las cepas BMC, POst, IO2, IO4 e IO7 fueron identificadas genéticamente, el resto de las cepas fueron identificadas mediante pruebas bioquímicas con el sistema automatizado VITEK.



**Figura 4.** Electroforesis en gel de agarosa muestra la amplificación del PCR de los genes de rRNA 16S, carril 1, cepa BMC; carril 2, POst; carril 3, IO2; carril 4, IO4; carril 5, IO7; carril 6 marcador de peso molecular ( 100 pb – 12,000 pb).

**Cuadro 4.** Muestra cinco cepas tomadas de intestino de bivalvos de mar, los cuales se identificaron al comparar sus secuencias de nucleótidos en la base de datos depositadas en el Gen Bank del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Identificación de Muestras por la secuencia de rRNA 16S		
Número de Muestra	Clave	Microorganismo
1	BMC	<i>Bacillus cereus</i>
2	POst	<i>Escherichia coli</i>
3	IO2	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
4	IO4	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
5	IO7	<i>Bacillus cereus</i>

Resumiendo los resultados, encontramos 19 cepas de *E. coli* (POst, P2A, M1CE, M1CE2, P3A, P3B, P4A, P7B, P8A, P9C, P10A, PM1A, PM8B, PM9A, PM9B, PM9C, PM9D, PM9E, y PM10A) en los intestinos de cuatro diferentes especies de bivalvos (*Ostrea iridescens*, *Rangia cuneata*, *Moveotus capax*, y *Anadara floridana*) (ver cuadro 5).

**Cuadro 5.** Muestra las especies de bivalvos y las especies de bacterias aisladas

Identificación de Especies Bacterianas de Bivalvos			
Especie de Bivalvo	Región	Cepa Bacteriana Aislada	Clave
<i>Ostrea iridescens</i>	Ixtapa, Zihuatanejo	<i>Escherichia coli</i>	POst
<i>Moveotus capax</i>	Ixtapa, Zihuatanejo	<i>Bacillus cereus</i>	BMC
<i>Moveotus capax</i>	Chacahua, Oaxaca	<i>Escherichia coli</i>	M1CE
		<i>Escherichia coli</i>	M1CE2
<i>Pinctada mazatlanica</i>	Ixtapa, Zihuatanejo	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	IO2

<i>Pinctada mazatlanica</i>	Ixtapa, Zihuatanejo	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	I04
<i>Pinctada mazatlanica</i>	Ixtapa, Zihuatanejo	<i>Bacillus cereus</i>	I07
<i>Pinctada mazatlanica</i>	Chacahua, Oaxaca	<i>Enterobacter agglomerans</i>	P13
<i>Pinctada mazatlanica</i>	Chacahua, Oaxaca	<i>Salmonella</i> spp.	P15B
<i>Rangia cuneata</i>	Veracruz	<i>Enterobacter agglomerans</i>	P1B
<i>Rangia cuneata</i>	Veracruz	<i>Escherichia coli</i>	P2A
<i>Rangia cuneata</i>	Veracruz	<i>Escherichia coli</i>	P3A
		<i>Escherichia coli</i>	P3B
<i>Rangia cuneata</i>	Veracruz	<i>Escherichia coli</i>	P4A
<i>Rangia cuneata</i>	Veracruz	<i>Enterobacter agglomerans</i>	P5A
<i>Rangia cuneata</i>	Veracruz	<i>Aeromonas</i>	P7A
		<i>Escherichia coli</i>	P7B
<i>Rangia cuneata</i>	Veracruz	<i>Escherichia coli</i>	P8A
<i>Rangia cuneata</i>	Veracruz	<i>Escherichia coli</i>	P9C

<i>Rangia cuneata</i>	Veracruz	<i>Escherichia coli</i>	P10A
<i>Rangia cuneata</i>	Veracruz	<i>Enterobacter agglomerans</i>	P11B
<i>Anadara floridana</i>	Veracruz	<i>Escherichia coli</i>	PM1A
<i>Anadara floridana</i>	Veracruz	<i>Escherichia coli</i>	PM8B
<i>Anadara floridana</i>	Veracruz	<i>Escherichia coli</i>	PM9A
		<i>Escherichia coli</i>	PM9B
		<i>Escherichia coli</i>	PM9C
		<i>Escherichia coli</i>	PM9D
		<i>Escherichia coli</i>	PM9E
<i>Anadara floridana</i>	Veracruz	<i>Escherichia coli</i>	PM10A
<i>Crassostrea rhizophorae</i>	Veracruz	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	O1A
<i>Ostrea megodon</i>	Chacahua, Oaxaca	<i>Aeromonas</i>	O1B
<i>Donax variabilis</i>	Chacahua Oaxaca	Sin crecimiento bacteriano	

## 7. Discusión

En mi trabajo se demuestra que las cepas UPEC del serogrupo O25 se caracterizan por su potencial de virulencia y por su resistencia a una amplia gama de antibióticos de amplio espectro, por esta razón son blancos de atención para su estudio en varios países, sin embargo poco se sabe de las características que le confieren su éxito en la diseminación y prevalencia en las infecciones extraintestinales en humanos. Mis resultados reportan que las cepas O25 presentaron un alto grado de resistencia a los antibióticos de la familia de las penicilinas (95-100%), lo cual nos podría indicar la elevada frecuencia de la utilización de esta familia de antibióticos en la población de la Ciudad de México.

En la Ciudad de Nagpur, India se ha reportado que las cepas aisladas de *E. coli* tienen un elevado potencial de desarrollo de resistencia (Karlowsky *et. al.*, 2004). Además entre los agentes patógenos entéricos, se observó que la resistencia de *E. coli* aumentó, sobre todo contra la primera línea de antibióticos de amplio espectro. Estos resultados son congruentes con los resultados reportados por (Nasreen *et. al.*, 2009), en los que se encuentra 100% de resistencia de *E. coli* contra la ampicilina. Lo mismo ocurre en mi investigación, las cepas O25 aisladas en la Ciudad de México también muestran un alto grado de resistencia a los antibióticos más utilizados, posiblemente debido a la automedicación.

Los resultados en Nagpur revelan que más del 50% de cepas aisladas de *E. coli* presentan multiresistencia a los antibióticos, y de las 76 cepas aisladas en este estudio se encontró que 40 (52.6%) de ellas reportaron la presencia de plásmidos. La situación indica la probabilidad de que *E. coli* podría haberse convertido en resistente a muchos más antibióticos que los reportados anteriormente en otros estudios (Nasreen *et. al.*, 2009). En mi estudio el 100% de las cepas reportaron multiresistencia y por lo menos un plásmido, lo cual podría indicar que las cepas de la Ciudad de México podrían ser más multiresistentes que las reportadas en la ciudad de Nagpur.

Varios estudios en países tropicales han demostrado un alta prevalencia de la resistencia bacteriana a los antimicrobianos de uso común (Farar., 1985; Levy *et. al.*, 1985; Shahid *et. al.*, 1985; Shears *et. al.*, 1987; Shears *et. al.*, 1988). Las investigaciones genéticas durante los brotes de las enfermedades entéricas bacterianas demostraron que la resistencia antimicrobiana es transferible (Frost *et. al.*, 1981; Datta *et. al.*, 1974; Crosa *et. al.*, 1977). Las medidas para reducir la propagación de la resistencia, y predecir posibles problemas de resistencia en futuros brotes, requiere de métodos eficaces para la vigilancia y clasificación de los métodos de resistencia (World Health Organization., 1983). México también es un país con un índice elevado de resistencia bacteriana.



Un estudio con cepas UPEC de la Ciudad de México, se determinó que existe una alta incidencia en los índices de resistencia a los antibióticos, de hecho es la mayor prevalencia de resistencia descrita en la literatura (Amabilie-Cuevas, 2010; Karlowsky, *et. al.*, 2002; Gordon, *et. al.*, 2003). Se determinó que el 83.7% de las cepas estudiadas fueron resistentes a la ampicilina, y el 63.2% resistentes a la carbencilina. Estos fueron seguidos por la familia de las quinolonas / fluoroquinolonas 50.5-60.6% de las cepas fueron resistentes. Por último la resistencia a STX25 de 56.4%. Estos resultados muestran que las cepas UPEC en la Ciudad de México se han convertido suficientemente resistentes a las fluoroquinolonas y STX25, como para que su uso este contraindicado. Las cepas UPEC han causado una creciente preocupación por que los tres fármacos de primera elección mostraron una alta resistencia, 74% de las cepas fueron resistentes a la ampicilina, 60.1% al cotrimoxazol, y el 32.6% al ciprofloxacino (Molina J., *et. al.*, 2011). Comparando nuestros resultados con los de Molina *et. al.*, 2011, encuentro que mis cepas O25 UPEC presentaron mayores índices de resistencia en comparación con los mismos antibióticos suministrados en ambos estudios. La diferencia entre estos dos estudios es el serogrupo de las cepas UPEC estudiadas, ellos incluyen cepas con muchos serogrupos y nosotros solo O25. Nosotros reportamos 16.3% mayor resistencia contra la ampicilina, y 36.8% mayor para la carbencilina. En la familia de las fluoroquinolonas encontramos un porcentaje de resistencia de 70% contra un rango de 50.5-60.6% en el otro estudio, y en el caso del STX25 reporto 65% de resistencia contra 56.4%. Lo cual nos indica que las cepas del serogrupo O25 requieren de un tratamiento médico específico, ya que sus índices de resistencia son muy elevados, principalmente contra las familias de antibióticos más comúnmente usados, solo 7 de los antibióticos utilizados en este estudio presentaron baja o nula resistencia (CAZ, FEP, CTR, CXM, F, AK, y MEM) con índices de resistencia del 15% al 0% respectivamente, los cuales serian los más recomendables para el tratamiento de una infección UPEC.

El meropenem es un excelente antibiótico de la familia de los carbapenems, con un amplio espectro antibacteriano. Clínicamente ha demostrado su utilidad para el tratamiento de diversos cuadros infecciosos: neumonías, infecciones del tracto urinario, infecciones intraabdominales, ginecológicas, dermatológicas, meningitis y en uso como monoterapia o en combinación con agentes antivirales o antifúngicos (Farm. Hosp., 1995). La eficacia de este antibiótico se comprueba con mis resultados, el 100% de las cepas UPEC son sensibles al meropenem, incluso la cepa con mayor multiresistencia, la cepa 1162, debido a que este antibiótico suele ser utilizado en los hospitales como la última línea de defensa, y a su uso poco común, lo cual demuestra su gran efectividad.

La cepa de 1162 presento aparentemente 6 plásmidos, con una masa molecular mayor a 50 Kb, el mayor número de plásmidos registrados en una *Escherichia coli* UPEC. Es posible que dichos plásmidos contribuyan a la amplia resistencia mostrada por esta cepa (12 antibióticos; AMP, CAR, TOB, NA, OFX, PRL, NOR, CIP, AMC, CN, SXT, y F). Sin embargo la cepa 80 presenta un solo plásmido y reporta resistencia a 9 antibióticos (AMP, CAR, CN, TOB, NA, OFX, NOR, CIP, SXT), una resistencia a los antibióticos muy similar a la cepa 1162. Cabe mencionar que ambas cepas tuvieron la misma resistencia a 9 de los antibióticos probados (AMP, CAR, TOB, CIP, NA, OFX, NOR, CN, y STX), la 1162 presentó resistencia a 3 antibióticos más (AMC, F, y PRL). Lo cual nos indica que los plásmidos no son los únicos mecanismos de resistencia a los antibióticos de las bacterias, por lo que el cromosoma bacteriano también porta genes que desempeñan funciones de resistencia contra los antimicrobianos, y que la presencia de un gran número de plásmidos en la cepa 1162 debe desempeñar otras funciones genéticas como codificar para factores de virulencia que le permitan a la bacteria invadir, infectar e inducir enfermedad en su hospedero. Hasta ahora se desconoce la contribución de dichos plásmidos a la virulencia de estas cepas O25 uropatógenas.

En el perfil de plásmidos se reportó una presencia del 90% de plásmidos mayores de 50 Kb en todas las bacterias de este estudio, con un rango de uno a seis plásmidos en cada cepa. El rango de resistencia a los antibióticos fue de 5 a 12, en el caso de las cepas UPEC. El número promedio de plásmidos por cepa fue de 3. Por lo que se puede decir que en términos generales que cada cepa UPEC del serogrupo O25 es resistente por lo menos a 5 antibióticos y presenta alrededor de 3 plásmidos. Hasta este momento no sabemos exactamente el aporte de los plásmidos en la resistencia antimicrobiana presentada por dichas bacterias. Para saber esto sería necesario curar las cepas bacterianas y realizar conjugación, y con ello podríamos saber si los plásmidos contienen genes de virulencia.

Diecinueve de las cepas aisladas de los bivalvos resultaron ser de la especie *E. coli*, esto es muy interesante porque hasta donde sabemos no se ha reportado que los bivalvos sean huéspedes de *E. coli*, porque generalmente se considera que el hábitat "normal" es el colon de aves y mamíferos (Souza *et. al.*, 1999), y que aunque se pueden localizar estas bacterias en el medio externo, tradicionalmente se consideraba que su presencia representaba contaminación fecal, ya que se sospechaba que no se podían reproducir en el medio exterior (Atlas, 1990). Sin embargo, resultados recientes indican que esto es falso. Existen cepas de *E. coli* que viven en otras partes del tracto digestivo, como las *E. coli* patógenas que pueden habitar en la sangre y en el tracto urogenital. Adicionalmente, es posible encontrar poblaciones de *E. coli* en reptiles. Por otro lado, también se han encontrado cepas particulares en ambientes acuáticos, especialmente los que son ricos en compuestos orgánicos como en el desagüe (Cerritos, 1999; Parveen *et. al.*, 1999; Cruz, 2000). En estudios que utilizan marcadores genéticos, como aloenzimas y ribotipos, se ha descrito que la diversidad genética es mayor en estos cuerpos de agua y que las cepas encontradas en el ambiente exterior no siempre son las mismas que existen en el colon de los posibles hospederos (Puppo y Richarson, 1995; Cerritos, 1999; Parveen *et. al.*, 1999). También se ha demostrado que estas poblaciones ambientales pueden incrementar de densidad poblacional en el tiempo, indicando que crecen y sobreviven en estos ambientes externos. Además, existen datos que sugieren que existen cepas de *E. coli* que sobreviven y se replican en el suelo.

Un resultado inesperado fue encontrar que una de las cepas de *E. coli* aislada del intestino de bivalvo, posee un plásmido grande (80-90 kb), y de una masa parecida al de las cepas uropatógenas. En las cepas UPEC los plásmidos frecuentemente brindan resistencia a diversos antibióticos, pero en el caso de la *E. coli* del bivalvo el plásmido identificado no cumple esta función debido a que esta cepa fue sensible a todos los antibióticos probados. Lo cual podría indicar que dichos plásmidos desempeñan otras funciones, posiblemente sirvan como mecanismos para eliminar las altas concentraciones de sal (cloruro de sodio) del ambiente marino en el que habita, y la producción de algunas proteínas que le permiten adaptarse mejor a su huésped marino.

Este es el primer estudio en el que se aíslan cepas de *E. coli* de los intestinos de bivalvos, en otros estudios se han aislados cepas de *E. coli* pero no del interior de estos organismos sino de la parte externa. Creemos que es posible que *E. coli* sea parte de la microbiota de algunas especies de bivalvos, ya sea en forma de microorganismos permanentes o como microorganismos de paso que entran al tubo digestivo del organismo y posteriormente salen de este. Su función o efecto en los bivalvos estaría por estudiarse. Hace falta continuar caracterizando estas cepas de *E. coli* para determinar si efectivamente son parte de la microbiota de los bivalvos o si solo son una contaminación. Por ejemplo sería importante conocer si dichas cepas de *E. coli* pertenecen a un grupo filogenético determinado y si poseen los genes o factores de virulencia de las cepas de *E. coli* patógenas de humanos, también sería útil conocer su serogrupo. Al respecto creemos que deben pertenecer a un filogrupo de *E. coli* comensal (A o B1) y que deben carecer de determinantes de virulencia (Groisman, 2001). También es importante conocer la relación filogenética de estas cepas de bivalvos con otros grupos de *E. coli* tanto comensales como patógenas de humanos y otras cepas silvestres para entender mejor la adaptación de las *E. coli* a los diferentes ambientes y su proceso evolutivo.

*Escherichia* es uno de los géneros bacterianos más estudiados, sin embargo se desconoce respecto a su presencia como microbiota en animales invertebrados, sobre todo en organismos de gran importancia comercial y alimenticia para el hombre, como en este caso los bivalvos. Es claro que aún hay mucho por investigar y para poder comprender el tipo de relación que existe entre estos invertebrados marinos y sus bacterias.

## 8. Conclusión

- La multiresistencia a los antibióticos detectada en dichas cepas y la presencia de plásmidos sugiere que los plásmidos portan genes de resistencia.
- La familia de antibióticos de los carbapenems no presentó resistencia bacteriana, seguida por la familia aminoglucosidos con una baja resistencia, por el contrario la familia de las penicilinas reportó 100% de resistencia.
- Las cepas de *E. coli* de los bivalvos obtenidas en este trabajo forman parte de su flora intestinal, debido a que las muestras fueron tomadas directamente de los intestinos y porque dichas cepas no presentaron factores de virulencia, ni resistencia a los antibióticos. Aparentemente, estas cepas de intestino de moluscos han estado alejadas de la actividad antropogénica.

## 9. Apéndice: composición de reactivos

- TAE 10 X (solución Reguladora para Electroforesis de DNA):

Tris-base	48.40 g
Ácido acético glacial	11.42 ml
EDTA 0.5 M	20.00 ml
Agua destilada c.b.p.	1000 ml
pH = 8.0	

- Luria-Bertani (LB) Broth Luria:

Triptona	10 g
Extracto de Levadura	5 g
Cloruro de Sodio	5 g
Agua Destilada c.b.p.	1 L

Ajustara el pH a 7.0 con 1.0 M de NaOH, esterilizar con autoclave por 15 min a 121°C

- Medio para congelar bacterias (conservación de cepas)

Glicerol	60 %
Luria-Bertani	40 ml

- Luria agar:

Triptona	10 g
Extracto de Levadura	5 g
Cloruro de Sodio	5 g
Agar bacteriológico	15 g
Agua Destilada c.b.p.	1 L

Ajustara el pH a 7.0 con 1.0 M de NaOH, esterilizar con autoclave por 15 min a 121°C

- Medio Mueller-Hilton

Infusión deshidratada de carne de res	2.0 g
Peptona de casein ácida	17.5 g
Almidón	1.5 g
Agar	17.0 g
Agua destilada c.b.p.	1 L
pH = 7.3	

- Bromuro de Etilo 0.006%
- Medio Chromogenic UTI

Medio Chromogenic UTI	56.3 g
Agua Destilada c.b.p.	1000 ml

- Agar Mc Conkey:

Peptona de caseína	1.5 g
Peptona de gelatina	17.0 g
Peptona de carne	1.5 g
Lactosa	10.0 g
Sales biliares	1.5 g
Cloruro de Sodio	5.0 g
Agar	13.5 g
Rojo Neutro	0.03 g
Cristal Violeta	0.001 g
Agua Desionizada c.b.p.	1 L
pH = 7.1	

- Gelosa especial (conservación de cepas)

Base gelosa sangre	20 g
Agar bacteriológico	15 g
Extracto de carne	1.5 g
Agua destilada c.b.p.	1 L
pH = 7.4	

- Solución I Lisis Alcalina (Obtención de plásmidos):

25 mM Tris.HCl (pH 8.0)	1.25 ml
10 mM EDTA (pH 8.0)	2.0 ml
50 mM Glucosa	2.5 ml
Agua Destilada c.b.p.	50 ml

- Solución II Lisis Alcalina (Obtención de plásmidos):

0.2 N NaOH	40 $\mu$ l
SDS 1%	200 $\mu$ l
Agua Destilada c.b.p.	2000 $\mu$ l

- Solución III Lisis Alcalina (Obtención de plásmidos):

Acetato de Potasio	30 ml
Ácido Acético Glacial	5.75 ml
Agua Destilada c.b.p.	50 ml

- TAE 1 X Buffer Electroforético:

Tris-Base	4.84 g
0.5 M EDTA (pH 8.0)	2.0 ml
Ácido Acético Glacial	1.142 ml
Agua Destilada c.b.p.	1000 ml



## 10. Literatura citada

Alfaro-López. 2009. Investigación sobre la capacidad invasiva de *Escherichia coli* uropatógena a células epiteliales y alteraciones en proteínas del citoesqueleto inducidas por la internalización de la bacteria. Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias Biológicas, Facultad de Medicina. UNAM, México. 3-4, 9-12.

Alteri, C. J., Hagan, E.C., Sivick, K. E., Smith, S. N. y Mobley, H.L.T. 2009. Mucosal immunization with iron receptor antigens protects against urinary tract infection. *PloS. Pathogens*. **5**: 587-1031.

Amabilie-Cuevas, C. 2010. Antibiotic resistance in Mexico: a brief overview of the current status and its causes. *J. Infect. Dev. Ctries*. **4**: 126-131.

Amabilie-Cuevas, C. F., Chiruel, M. E. 1992. Bacterial plasmids and gene flux. *Cell*. **70**: 189-199.

Anderson, G. G., y Dodson, W.K. 2004. Intracellular bacterial communities of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract pathogenesis. *TRENDS in Microbiology*. **12**: 424-430.

Anderson, G.G., Martin, M.S. y Hultgren, J.S. 2001. Host subversion by formation of intracellular bacterial communities in the urinary tract. *Microbes and Infection*. **6**: 1094-1101.

Bachi, A. H., Sack, R. B., Black, R. E., Haider, K., Hossain, A., Alim, A. R., Yunus, M., Chowdhury, R. H. y Siddique, A. K. 1992. Enteropathogens associated with acute and persistent diarrhea in Bangladeshi children less than 5 years of age. *J. Infect. Dis*. **166**: 792-796.

Bahrani-Mougeot, F., Buckles, E., Lockatell, C., Hebel, J., Johnson, D., Tang, C. y Donnenberg, M. 2002. Type 1 fimbriae extracellular polysaccharides are preeminent uropathogenic *Escherichia coli* virulence determinants in the murine urinary tract. *Mol. Microbiol*. **45**: 1079-1093.

Baldwin, T. J. 1998. The 18<sup>th</sup> C. L. Oakley Lecture: Pathogenicity of enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Med. Microbiol*. **47**: 283-293.

Baldwin, T. J., Lee-Delaunay, M. B., Knotton, S. y Williams, P. H. 1993. Calcium-calmodulin dependence of actin accretion and lethality in cultured HEP-2 cells infected with enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immune*. **59**: 1599-1604.

Blanco, J., Blanco, M., Blanco, J. E., Mora, A., Alonso, M. P., González E. A. y Bernárdez M. I. 2004. Enterobacterias: características generales. Género *Escherichia* In: Manual de Microbiología Veterinaria, Vadillo S, Píriz S, Mateos E, Eds., McGraw-Hill Interamericana España. 301-325.

- Blanco, M., Blanco, J., Blanco, J. E., Alonso, M., Abalia, I., Rodríguez, E., Bilbao, J. y Umaran, A. 1995. Virulence factors and O serogroups of *Escherichia coli* as a cause of community-acquired urinary infections. *Infirm. Infecc. Microbiol. Clin.* **13**:236-241.
- Beckerle, M. C. 1998. Spatial control of actin filament assembly: Lessons from *Listeria*. *Cell.* **95**: 741-748.
- Bergan, T. 1984. Clasification of *Enterobacteriaceae*. *Methods in microbiology*, vol. 14. Academic Press, London. 1-41
- Bergstrom, C. T., Lipsitch, M. y Levin., B. R. 2000. Natural selection, infectious transfer and the exitance conditions for bacterial plasmids. *Genetics.* **155**: 1505-1519.
- Besser, R. E., Griffin, P. M. y Sluntsker, L. 1999. *Escherichia coli* O157:H7 gastroenteritis and the hemolytic uremic syndrome: An emerging infectious disease. *Annu. Rev. Med.* **50**: 355-367.
- Bettelheim, K. y Taylor, J. 1969. A study of *Escherichia coli* isolated from chronic urinary tract infection. *F. Med. Microbiol.* **2**: 225-236.
- Bingen-Bidois, M., Clermont, O., Bonacorsi, S., Terki, M., Brahimi, N. y Loukil, C. 2002. Phylogenetic analysis and prevalence of urosepsis strains of *Escherichia coli* bearing pathogenicity island-like domains. *Infect. Immun.* **70**: 3216-3226.
- Bingle, L. H. E. y Thomas, C. M. 2001. Regulatory circuits for plasmid survival, *Curr. Opin. Microbiol.* **4**: 194-200.
- Bhan, M. K., Raj, P., Levine, M. M., kaper, J. B., Bhandari, N., Srivastava, R., Kumar, R. y Sazawal, S. 1989. Enteraggregative *Escherichia coli* associated with persistent diarrhea in a cohort of rural children in India. *J. Infect. Dis.* **159**: 1061-1064.
- Blattner, F. R., Plunkett, I. G., Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K. y Mayhew, G. F. 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science.* **277**: 1453-1462.
- Braun, V. y Killmann, H. 1999. Bacterial solutions to the iron-supply problem. *TBS.* **24**: 104-109.
- Brenner, D. J. 1983. Impact of moderd taxonomy on clinical microbiology. *ASM. News* **49**: 58-60.

Brindle, N. P., Holt, M. R., Davies, J. E., Prince, C. J. y Critchley, D. R. 1996. The focal-adhesion vasodilatador-stimulated phosphoprotein (VASP) binds to the proline-rich domain in vinculin. *Biochem. J.* **318**: 753-757.

Boyd, E. F., Hill, C. W., Rich, S. M. y Hartl, D. L. 1996. Mosaic structure of plasmids from natural populations of *Escherichia coli*. *Genetics.* **143**: 1091-110

Brumfitt, W., Gargan, R. A. y Hamilton-Miller, J. M. 1989. Periurethral enterobacterial carriage preceding urinary infection. *Lancet.* **1**: 824-826.

Brzuszkiewicz, E., Brüggemann, H., Liesegang, H., Emmerth, M., Ölschläger, T., Nagy, G., Albermann, K., Wagner, C., Buchrieser, C. y Emödy, L. 2006. How to become a uropathogen: Comparative genomic analysis of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains. *PNAS.* **103**: 12897-12884.

Brzuszkiewicz, E., Gottschalk, G., Ron, E., Hacker, J. y Dobrindt, U. 2009. Adaptation of Pathogenomics. 6th ed. Basel, Karger: *Genome Dyn.* **34**: 12879-12884.

Carattolini, A., Bertini, A., Villa, L., Falbo, V., Hopkins, K. L. y Threlfall, E. C. 2005. Identification of plasmid by PCR-based replicon typing. *J. Microbiol.* **63**: 219-228.

Caugant, D. A., Levin, B. R. y Selander, R. K. 1981. Genetic diversity and temporal variation in the *E. coli* population of a human host. *Genetics.* **98**: 467-490.

Chen, S. L., Hung, C. S., Xu, J., Reigstad C. S., Magrini, V., Sabo, A., Blasiar, D., Bieri, T., Meyer, R. R. y Ozerky, P. 2006. Identification of genes subject to positive in uropathogenic strains of *Escherichia coli*: A comparative genomics approach. *PNAS.* **103**: 5977-5982.

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

Cravioto, A., Tello, A., Navaro, A., Ruiz, J., Villafan, H., Uribe, F. y Eslava, C. 1991. Association of *Escherichia coli* HEp-2 adherence patters with type and duration of diarrhea. *Lancet.* **337**: 262-264.

Crosa, J. H., Olarte, J., Mata, L. J., Luttropp, L. K. y Peneranda, M. E. 1997. Characterisation of an R-plasmid associated with ampicillin resistance in *Shigella dysenteriae* Type 1 isolated from epidemics. *Antimicrob Agents Chemother.* **11**: 553-558.

Datta, N. y Olarte, J. R. 1974. Factors in strains of *Salmonella typhi* and *Shigella dysenteriae* isolated in Mexico: classification by compatibility. *Antimicrob Agents Chemother.* **5**: 310-317.

Dobrindt U, Agerer F, Michaelis K, Janka A, Buchrieser C, Samuelson M, Svanborg C, Gottschalk G, Karch H, Hacker J. 2003. Analysis of genome plasticity in pathogenic and commensal *Escherichia coli* isolates by use of DNA arrays. *J. Bacteriol.* **185**:1831-40.

Dobrindt, U., Blum-Oehler, G., Nagy, G., Schneider, G., Johann, A., Gottschalk, G. y Hacker, J. 2002. Genetic structure and distribution of four pathogenicity islands (PAI I<sub>536</sub> to PAI IV<sub>536</sub>) of uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. *Infect. and Immun.* **70**: 6365-6372.

Errington, J., Bath, J. y Wu, L. J. 2001. DNA transport in bacteria, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**: 538-544.

Farar, W. E. 1985. Antibiotic resistance in developing countries. *J. Infect.* **152**: 1103-1106.

Finer, G., y Landau, D. 2004. Pathogenesis of urinary tract infections with normal female anatomy. *Lancet. Infect. Dis.* **4**: 631-635.

Foxman, B. 2002. Epidemiology of tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. *Am. J. Med.* **113**: 5-13.

Foxman, B. 2003. Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. *Dis. Mon.* **49**: 53-70.

Foxman, B., Barlow, R., D'Arcy, H., Gillespie, B. y Sobel, J. D. 2000. Urinary tract infection: self-reported incidence and associated costs. *Ann. Epidemiol.* **10**: 509-515.

Foxman, B. 1990. Recurring urinary tract infection: incidence and risk factors. *Am. J. Public. Health.* **80**: 331-333.

Francia, M. V., Varsaki, A., Garcillan-Barcia, M. P. Latorre, A., Drainas, C. y de la Cruz, F. A. 2004. Classification scheme for mobilization regions of bacterial plasmids. *FEMS. Microl. Rev.* **28**: 79-100.

Frost, J. A., Rowe, B., Vandepitte, J. y Threlfall, E. J. 1981. Plasmid characterization in the investigation of an epidemic caused by multiply resistant *Shigella dysenteriae* Type 1 in Central Africa. *Lancet.* **94**: 1074-1076.

Giron, J. A., Jones, T., Millan-Velasco, F., Castro-Muñoz, E., Zarate, L., Fry, J., Frankel., G., Moseley, S. L., Baudry, B. y Kaper, J. B. 1991. Diffuse-adhering *Escherichia coli* (DEAC) as putative cause of diarrhea in Mayan children in Mexico. *J. Infect. Dis.* **163**: 507-513.

González, A., Medina, L., Moreno, Y., Ortiz, C. y Dávila, R. 2004. Prevalencia de bacteriuria sintomática y asintomática en adultos mayores, y sensibilidad *in vitro* a antimicrobianos. Archivos en Medicina Familiar. **6**: 52-56.

Gordon, D. M., Clermont, O., Tolley, H. y Denature, E. 2008. Assigning *Escherichia coli* strains to phylogenetic groups: multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method. Environ. Microbiol. **10**: 1085-1094.

Gordon, K. A., Jones, R. N.; SENTRY Participant Groups (Europe, Latin America, North America) 2003. Susceptibility patterns of orally administered antimicrobials among urinary tract infection pathogens from hospitalized patients in North America: comparison report to Europe and Latin America. Results from the SENTRY. Antimicrobial Surveillance Program. 2000. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. **45**: 295-301.

Groisman, A. E. 2010. Principles of Bacterial Pathogenesis. Academic Press. California, USA. 388-428.

Grüneberg, R. 1969. Relationship of infecting urinary organisms to the fecal flora in the patients with symptomatic urinary infections. Lancet. **2**: 766-768.

Hacker, J., Blum-Oehler, G., Janke, B. y Goebel, W. 1999. Pathogenicity island and other mobile virulence elements. En Kaper J.B., eds. Washington, ASM Press. **23**: 1089-197.

Hassan, S. H. 1995. Antimicrobial Susceptibility and Plasmid Profiles of *Escherichia coli* Isolates Obtained from Different Human Clinical Specimens in Lagos – Nigeria. J. Trop. Med. Hyg. **88**: 243-248.

Hecht, G., Koutsouris, A. 1999. Enteropathogenic *E. coli* attenuates secretagogue-induced net intestinal ion transport but not Cl<sup>-</sup> secretion. Am. J. Physiol. **270**: 7069–7078.

Hicks, S., Candy, D. C. y Phillips, A. D. 1996. Adhesion of enteroaggregative *Escherichia coli* to pediatric intestinal mucosa *in vitro*. Infect. Immun. **64**: 4751-4760.

Hopwood, D. A. y K. E., Chater. 1989. Genetics of Bacterial Diversity. Academic Press, Oxford. **69**: 293-303.

Jallat, C., Livrelli, V., Darfeuille-Michaud, A., Rich, C. y Joly, B. 1993. Survey of clinical isolates of diarrhoeogenic *Escherichia coli*: Diffusely adhering *E. coli* strains with multiple adhesive factors. Res. Microbiol. **145**: 621-632.

Johnson, J. R. 1991. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clinical. Microbiol. Rev.* **4**: 80-128.

Johnson, J. R., Delavari, P., Kuskowski, M. y Stell, A. L. 2001. Phylogenetic distribution of extraintestinal virulence associated traits in *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* **183**: 78-88.

Jones, E., Morris, A. 1999. Lo Esencial en Célula y Genética. Mosby International Ltd. España. 90-94, 103-104.

Kaper, J. B. 1998. Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Microbiol.* **1**: 103-108.

Kaper, J.B., Nataro, J. P. y Mobley, H. L. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**: 123-40.

Karlowsky, J. A., Kelly, L. J., Thonsberry, C., Jones, M. E. y Sahm, D.F. 2002. Trends in antimicrobial resistance among urinary tract infection isolates of *Escherichia coli* from female outpatients in the United States. *Antimicrob Chemother.* **46**: 2540-2545.

Karmali, M. A. 1989. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol.* **2**: 15-38.

Katouli, M. 2010. Population structure of gut *Escherichia coli* and its role in development of extra-intestinal infections. *Iranian J. Microbiol.* **2**: 59-72.

Keen, M. 1971. Sea Shells of Tropical West America. Marine Mollusks from Baja California to Peru. Stanford University Press. Stanford. 208-311.

Karlowsky, J. A., Jones, M. E., Draghi, D. C., Thornsbery, D. F., Sahm, G. A. y Volturo, G. A. 2004. Prevalence and antimicrobial susceptibilities of bacteria isolated from blood cultures of hospitalized patients in the United States in 2002. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* **3**:7

Kurazono, H., Nakano, M., Yamamoto, S., Ogama, O., Yuri, K., Nakata, K., Kimura, M., Makino, S. y Nair, G.B. 2003. Distribution of the *usp* gene in uropathogenic *Escherichia coli* isolated from companion animals and correlation with serotypes and size-variations of the pathogenicity island. *Microbiol. Immunol.* **47**: 797-802.

Levin, B. R. 1981. Periodic selection, infectious gene exchange and the genetic structure of *E. coli* populations. *Genetics.* **99**: 1-23.

Levine, M. M. y Edelman, R. 1984. Enteropathogenic *Escherichia coli* of classic serotypes associated with infant diarrhea: Epidemiology and pathogenesis. *Epidemiol. Rev.* **6**: 31-51.

Levine, M. M., Ferreccio, C., Prado, V., Cayazzo, M., Abrego, P., Martinez, J., Maggi, L., Baldini, M. M., Martin, W. y Maneval, D. 1993. Epidemiologic studies of *Escherichia coli* diarrheal infections in a low socioeconomic level peri-urban community in Santiago, Chile. *Am. J. Epidemiol.* **138**: 849-869.

Levy, S. B., Hedges, R. W., Sullivan, F., Medeiros, A. A. y Sosroseputro, H. 1985. Multiple antibiotic resistance plasmids in Enterobacteriaceae isolated from diarrheal specimens of hospitalized children in Indonesia. *J. Antimicrob. Chemother.* **16**: 7-16.

Lewin, B. 1998. *Genes V*. Oxford Cell press, Oxford. 298,383-387, 557.

Logan, N. A. 1994. *Bacterial systematics*. Blackwell scientific publications, Oxford. 2-44.

Llosa, M., Gomis-Rüth, F. X., Coll, M. y de la Cruz, F. 2002. Bacterial conjugation: A two-step mechanism for DNA transport, *Mol. Microbiol.* **45**: 1-8.

Lloyd, A. L., Henderson, T. A., Vigil, P. D. y Mobley, H. L. 2009. Genomic islands of uropathogenic *Escherichia coli* contribute to virulence. *J. Bacteriol.* **191**: 3469-3481.

Madigan, M. T., J. M. Martinko. y J. Parker. 2000. *Brock Biology of microorganisms*. Novena edición. Prentice Hall, USA. 453-544.

Manges, A. R., Tabor, H., Tellis, P., Vincent, C. y Tellier, P. P. 2008. *Emerg. Infec. Dis.* 4635-4640.

Martínez, R. E., y Villalobos, L. 2005. *Escherichia coli* enteropatógena en moluscos crudos y cocidos. *Rev. Cient. FCV-Luz* **2**: 163-167.

Miranda, S., Davide, M. G. y Peter, J. C. 2004. *Microbiology.* **150**: 1539-1546.

Molina, J., Aparicio, G., Ribas, R. M., Gavilanes, S., Chávez, M., Hernández, R. y Manajarrez, H. 2011. Drug resistance, serotypes, and phylogenetic groups among uropathogenic *Escherichia coli* including O25-ST131 in Mexico City. *J. Infectc. Dev. Ctries.* **5**: 840-849.

Mulvey, M. A. 2002. Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*. *Cellular microbiology, Microreview.* **4**: 257-271.

Murray, Patrick, R., Rosenthal, y Ken, S. 1998. *Medical Microbiology*. Mosby. Third edition. St Louis, Missouri, USA. 31, 38-39, 154, 157, 174, 234-237.

- Nasreen, J., Sudhir, U., Meshram, y Archana, K. 2009. Plasmid profile analysis of multidrug resistant *E. coli* isolated from UTI patients of Nagpur City, India. *Romanian Biotechnological Letters*. **5**: 4635-4640.
- Nataro, J. P., Hicks, S., Phillips, A. D., Vial, P. A. y Sears, C. L. 1996. T84 cells in culture as model for enteroaggregative *Escherichia coli* pathogenesis. *Infect. Immun.* **64**: 4761-4768.
- Nataro, J.P., Deng, Y., Cookson, S., Cravioto, A., Savario, S. J., Guers, L. D., Levine, M. M. y Tacket, C. O. 1995. Heterogeneity of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence demonstrated in volunteers. *J. Infect. Dis.* **171**: 465-468.
- Nataro, J. P. y Kaper, J. B. 1998. Diarrhogenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**: 142-201.
- Nataro, J. P., Kaper, J. B., Robins-Browne, R., Prado, V., Vial, P. y Levine, M. M. 1987. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *Pediatr. Infect. Immun.* **67**: 6292-2699.
- Neidhardt, F. C., Ingraham, J. L., Low, K. B., Magasanik, B., Schaechter, M. y Umberger, H. E. 1987. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology. American Society for Microbiology, Washington, D.C., EUA. 1615-1649.
- Paton, J. C. y Paton, A. W. 1998. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Trends Microbiol. Rev.* **11**: 450-479.
- Paul, M., Tsukamoto, T., Ghost, A. R., Bhattacharya, S. K., Manna, B., Chakrabarti, S., Nair, G. B., Sack, D. A., Sen, D. y Takeda, Y. 1994. The significance of enteroaggregative *Escherichia coli* in the etiology of hospitalized diarrhea in Calcutta, India and the demonstration of a new honey-combed pattern of aggregative. *FEMS Microbiol. Lett.* **177**: 319-325.
- Phornphisutthimas, S., Thamchaipenet A. y Panijpan. 2007. Conjugation in *Escherichia coli*. *Biochemistry and Molecular Biology Education*. **6**: 440-445.
- Plos, K., Connell, H., Jodal, U., Marklund, B., Marild, S., Wettergren, B. y Svanborg, C. 1995. Intestinal carriage of P fimbriated *Escherichia coli* and the susceptibility to urinary tract infection in young children. *F. Infect. Dis.* **171**: 625-702.
- Principal of Bacterial Pathogenesis. 1998. Academic Press. United States of America, 2001. **33**: 157-762.
- Reinhard, M., Rudiger, M., Jockush, B. M. y Walter, U. 1996. VASP interaction with vinculin: A recurring theme of interactions with proline-rich motifs. *FEBS Lett.* **399**: 103-107.



- Rijavec, M., Müller-Premru, M., Zakotnik, B. Y Zgur-Bertok, D. 2008. Virulence factors and biofilm production among *Escherichia coli* strains causing bacteremia of urinary tract origin. J. Med. Microbiol. **57**: 1329-1334.
- Rowe, B., y R. J. Gross. 1981. The genus *Shigella*. The prokaryotes. A handbook on habitats, isolation, and identification of bacteria. Springer-Verlang, Berlin. **2**: 1248-1259.
- Salyers, Abigail, A., Whitt, y Dixie D. 1994. Bacterial Pathogenesis a Molecular Approach. ASM Press. Washington, D.C., USA. 205-212.
- Scaletsky, I. C., Silvia, M. L. y Trabulsi, L. R. 1984. Distintive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. Infect. Immun. **45**: 534-536.
- Shahid, N. S., Rahaman, M. M., Haider, K., Bann, H. y Rahman, N. 1985. Changing pattern of resistant *Shiga bacillus* (*Shigella dysenteriae* Type 1) and *Shigella flexneri* in Bangladesh. J. Infect. Dis. **152**: 1114-1119.
- Seeliger, H. P. R. y Hohne, K. 1979. Serotyping of *Listeria monocytogenes* and related species. In Methods in Microbiology. Academic Press, London. **103**: 836-838.
- Selander, R. K., Caugant, D. A. y Whittam, T. S. 1987. Genetic structure and variation in natural populations of *Escherichia coli*. En: F. C. Neidhardt, J. L. Ingraham, K. B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter y H. E. Umbarger (eds.) *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology. American Society for Microbiology, Washington, D.C., EUA. 1625-1648.
- Shears P., Hart, C. A., Broadhead, R. L. y Coulter, J. B. S. 1987. A note on antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolated from children with diarrhea in the Sudan. Ann Trop Paediat. **7**: 38-41.
- Shears, P. y Suliman, G. 1988. A preliminary investigation of antibiotic resistance in Enterobacteriaceae isolated from children with diarrhea from four developing countries. Ann Trop Med Parasitol: **82**: 185-8.
- Shears, P., Suliman, G. y Hart, C. A. 1989. Restriction endonuclease characterization of resistant plasmid in Enterobacteriaceae isolated from children in the Sudan. Epidem. Inf. **103**: 487-496.
- Smith, H. R., Cheasty, T. y Rowe, B. 1997. Enteroaggregative *Escherichia coli* and outbreaks of gastroenteritis in the UK. Lancet. **350**: 814-815.

Souza, V., Rocha, M., Sander, L., y Eguiarte, L. E. 2000. Historia natural, ecología y evolución de la patogenicidad de *Escherichia coli*. Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México., México D.F. 1-27.

Sussman, M., y Gally, D. 1999. The biology of cystitis: host and bacterial factors. *Ann. Rev. Med.* **50**:149-158.

Svanborg, C., Orskov, F. y Orskov, I. 1994. Fimbriae and Disease. In P. Klemm (ed.), *Bacterial Fimbriae*. CRC Press, Boca Ranton.**30**: 239–254.

Svanborg-Edén, C. 1986. Bacterial adherence in urinary tract infection caused by *Escherichia coli*. *Scand F. Urol. Nephrol.* **20**: 81-88.

Tacket, C. O., Mosely, S. L., Kay, B., Losonky, G. y Levine, M. M. 1990. Challenge studies in volunteers using *Escherichia coli* strains with diffuse adherence to HEp-2 cells. *J. Infect. Dis.* **162**: 550-552.

Tay, J., Gutiérrez, M., López, R., Molina, J. y Manjarrez, M. E. 2012. *Microbiología y Parasitología Médicas de Tay*. Méndez Editores. México, D.F. 92-98.

Thomas, C. M. (1993). Paradigms of plasmid organization. *Mol. Microbial.***74**: 335-337.

Waters, V. L. (1999). Conjugative transfer in the dissemination of beta-lactam and aminoglycoside resistance. *Front. Biosci.* **4**: 416-439.

Winorkur, P. L., Vanstein, D. L., Hoffman, L. J., Unlentropp, E. K. y Doer, G. V. 2001. *Antimicrob. Agents.* **45**: 2716-2722.

World Health Organization. 1983. Control of antibiotic resistance bacteria. *Bull World Health Organ.* **61**: 423-33.

Yamamoto, T., Koyama, Y., Matsumoto, M., Sonoda, E., Nakayama, S., Uchimura, M., Paveenkittiporn, W., Tamura, K., Yokota, T. y Echeveria, P. 1992. Localized, aggregative, and diffuse adherence to HeLa cells, plastic, and human cells intestines by *Escherichia coli* isolated from patients with diarrhea. *J. Infect. Dis.* **166**: 1295-1310.

Zechner, E. L., de la Cruz, F., Eisenbrant, R., Grahn, A. M., Koraimann, G., Lanka, E., Muth, G., Pansegrau, W., Thomas, C. M., Wilkins, B. M. y Zatyca, M. C. 2000. In *The Horizontal Gene Pool* (C. M. Thomas, ed.) Harvard Academic Press, London. 87-173.

Zhanel, G. G., Karlowsky, J. A., Harding, G. K., Carrie, A., Mazzulli, T. y Low, D. E. 2000. Antimicrob. Agents.Chemother.**44**: 1089-1092.

Zhang, L., Foxman, B., Manning, S. D., Tallman, P. y Marrs, C. F. 2002. Molecular epidemiologic approaches to urinary tract infection gene discovery uropathogenic *Escherichia coli*. Infection and Immunity. **68**:2009-2015.

Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L. y Miller, W. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. J. Computational. Biol. **7**:203-214.