



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

Aislamientos de *Escherichia coli* provenientes de coprocultivos de pacientes con infecciones en vías urinarias recurrentes y su asociación con filogenia y genes de virulencia de *Escherichia coli* uropatógena

TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGA

PRESENTA:

Marisol Cisneros Flores

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Ulises Hernández Chiñas



Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México 2021



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.

Cisneros Flores Marisol

Tutor: Dr. Hernández Chiñas Ulises

Índice

1. Resumen	
2. Antecedentes	8
3. Introducción	9
3.1. Epidemiología en México.....	10
3.2. Clasificación de las IVU.....	10
3.3. Etiología de las IVU.....	11
3.4. Escherichia coli uropatogena (UPEC).....	11
3.5. Factores de virulencia de UPEC.....	14
3.6. Mecanismos de patogenicidad.....	14
3.7. Resistencia antimicrobiana.....	16
3.8. Intestino, principal fuente de infección de IVU.....	17
4. Justificación	18
5. Objetivos	18
5.1. Objetivos particulares.....	18
6. Materiales y Métodos	19
6.1. Verificación de E. coli de coprocultivos.....	19
6.2. Extracción de DNA.....	21
6.3. Agrupación filogenética por PCR.....	22
6.4. Detección de genes de virulencia.....	24
6.5. Electroforesis de ADN en geles de Agarosa.....	27
6.6. Dendrograma	27
6.7. Estadístico.....	27
7. Resultados	28

7.1. Filogrupos de <i>E. coli</i>	28
7.2. Identificación de genes de virulencia en cepas de <i>E. coli</i>	29
7.3 Correlación entre genes de virulencia y filogrupos.....	30
7.4. Patrones de cepas presentes en <i>E. coli</i> con serotipos.....	31
7.5. Similitud entre los patrones de genes de virulencia en las cepas de <i>E. coli</i> ...	35
8. Discusión.....	37
9. Conclusiones.....	42
10. Referencias.....	43

Índice de tablas

Tabla 1. Genes asociados a la captación de hierro para UPEC y función desempeñada.....	15
Tabla 2. Características bioquímicas para <i>E. coli</i>	20
Tabla 3. Características de los iniciadores para identificar filogrupos.....	23
Tabla 4. Iniciadores utilizados para amplificar las secuencias de los genes de virulencia.....	25
Tabla 5. Condiciones de amplificación de cada uno de los genes utilizados en caracterización de las cepas clínicas de <i>E. coli</i>	26
Tabla 6. Correlación de los serogrupos clásicos y no clásicos de UPEC.....	32

Índice de Figuras

Figura 1. Crecimiento de <i>E. coli</i> en agar sangre.....	20
Figura 2. Hemolisis de <i>E. coli</i> en agar sangre.	20
Figura 3. Crecimiento de <i>E. coli</i> en agar MacConkey, lactosa positiva.....	20
Figura 4. Crecimiento de <i>E. coli</i> en agar MacConkey, lactosa negativa.....	20
Figura 5. Árbol dicotómico de filogrupos.....	23
Figura 6. Perfil de productos de PCR triple para designar grupos filogenéticos de <i>E. coli</i>	24
Figura 7. Perfil de productos de PCR punto final para detectar genes de virulencia relacionados con UPEC	25
Figura 8. Filogrupos de las cepas aisladas.....	28
Figura 9. Presencia y ausencia de los genes de virulencia asociados a UPEC.....	30
Figura 10. Cepas agrupadas en filogrupos, positivas a genes de virulencia.....	31
Figura 11. Patrones con serotipos.....	33
Figura 12. Serotipos con serogrupo no clásicos.....	34
Figura 13. Serotipos con serogrupo clásicos.....	35
Figura 14. Dendrograma de los perfiles genéticos de las cepas.....	37

1. Resumen

Las infecciones en vías urinarias (IVU) ocupan el tercer lugar dentro de las 20 principales causas de morbilidad en nuestro país, afectando principalmente a mujeres y ocasionando en un 25% infecciones recurrentes. *Escherichia coli* Uropatógena (UPEC) ocasiona entre 75% y 80% de las IVU, esta enterobacteria es un habitante natural del intestino y a través de contaminación fecal, asciende colonizar y persistir dentro de las vías urinarias, utilizando diversos factores: adhesinas, flagelos, sistemas de captación de hierro, toxinas y mecanismos de evasión de la respuesta inmune. *E. coli* se clasifica en cuatro filogrupos A, B1, B2 y D. Los primeros dos asociados a cepas comensales y los segundos a cepas extraintestinales que portan con mayor frecuencia genes asociados a factores de virulencia (FV). En esta investigación se identificó 8 genes de virulencia asociados a UPEC y su filogenia en 181 cepas aisladas de heces de 16 pacientes con infecciones recurrentes de vías urinarias, utilizando el método de PCR punto final. Los resultados muestran que el 50.8% de las cepas son del filogrupo A seguido de B2 (26.5%) y en menor proporción B1 (14.3%) y D (8.2%). En el 96% de las cepas se identificó alguno de los genes de virulencia, con la siguiente frecuencia: *feoB* (81%), *fimH* (69%), *irp2* (61%), *traT* (50%), *chuA* (40%), *sat* (31%), *papC* (29%), y *malX* (23%), con un score de virulencia alto (<5 genes) en el 57% de las cepas. La presencia de un captador de hierro *feoB* y la adhesina *fimH* fue la combinación más prevalente en el 13.3 % de las cepas. La correlación de la presencia de genes de virulencia con filogrupos y serogrupos mostró que los filogrupos A (43%) y B2 (38%) y los serogrupos clásicos O25, O7, O4 y O1; son los que presenta con mayor frecuencia genes de virulencia. Estos resultados sugieren a las heces como fuente de contaminación de las vías urinarias debido a la presencia de *E. coli* con serogrupos clásicos de UPEC, la presencia sobresaliente del filogrupo B2 y la presencia de factores de virulencia en todas las cepas.

2. Antecedentes

El intestino es una fuente común de bacterias que causan IVU, estas bacterias pueden sobrevivir y persistir en el intestino desde unos pocos días hasta muchos años (Stecher & Hardt, 2008). Las cepas intestinales de *E. coli* que causan IVU normalmente portan genes de virulencia necesarias para la colonización del TU y pertenecen principalmente al grupo filogenético B2 (Zhang & Marrs, 2002). La forma en que estas cepas llegan a habitar el intestino no está bien establecida y la ingestión de aves de corral contaminadas se propone como fuente de cepas de UPEC, además, se han sugerido aves como reservorios de UPEC, aunque es probable que existan reservorios adicionales (Ron, 2006; Rodriguez-Siek *et al*, 2005). Sin embargo, diversos autores han investigado la relación de la microbiota intestinal y el desarrollo de las IVUs y bacteriuria, como Magruder y colaboradores en el 2019 que identificaron esta relación, por medio de perfiles microbianos utilizando una profunda secuenciación 16 S ARNr en 510 muestras fecales y secuenciación metagenómica en un subconjunto de muestras fecales y muestras de sobrenadante de orina. Sus resultados arrojaron que una abundancia intestinal del 1% de *E. coli* es un factor de riesgo para una IVU, Aunado a esto, Paalanne y colaboradores en el 2018, compararon los microbiotas intestinales de 37 niños con IVU febril contra 69 niños sanos. Se secuenciaron las regiones del gen ARNr 16s bacteriano se midió concentración por PCR. La abundancia relativa de *E. coli* fue 1,9% en pacientes con UTI y 0,5% en controles, lo que puede implicar que el entorno intestinal está vinculado con riesgo de infección urinaria en niños.

Por último, Moreno y colaboradores en el 2018 evaluaron la relación de las cepas causantes de cistitis contra cepas fecales de *E. coli* en 42 mujeres con cistitis aguda no complicada. Se evaluaron mediante PCR y análisis de macrorrestricción. De igual forma se encontró que la población fecal B2 está estrechamente entrelazada con las cepas que provocan una IVU.

3. Introducción

Las infecciones en las vías urinarias (IVU) se definen como una afección que se presenta en el tracto urinario y son causadas principalmente por la invasión, colonización y multiplicación de patógenos como bacterias, virus, parásitos y hongos que ingresan al aparato urinario (riñones, uréteres, vejiga y uretra) por vía hematógena y por vía ascendente, sobrepasando la capacidad de los mecanismos de defensa del huésped (Orrego-Marín *et al*, 2014; Luna *et al*, 2018). Por otro lado existen diferentes grupos de riesgo que contribuyen a la adquisición de IVUs como las personas con diabetes y ancianos, debido a que su vejiga no se vacía por completo y presentan reflujo urinario ya sea por enfermedades de la vejiga y la próstata, en los niños las IVU tienen un mayor predominio en los hombres frente a las mujeres, debido a la presencia de fimosis que favorece la colonización del meato urinario y la uretra. A esto se suman algunas anomalías anatómicas congénitas (Orrego-Marín *et al*, 2014). Por otro lado, las mujeres adultas las desarrollan con más frecuencia debido a que su uretra es más corta y está más cerca del ano. Además, se puede presentar en la gestación dado que durante el embarazo hay cambios fisiológicos como variación del pH y el influjo de la progesterona aumentando la probabilidad de una IVU.

En el ámbito hospitalario, después de las infecciones respiratorias las IVUs son las más frecuentes y son ocasionados en su mayoría por bacterias y afectan a 150 millones de personas cada año en todo el mundo. En el 2007, solo en los Estados Unidos, se estimó que hubo 10.5 millones de visitas al consultorio por síntomas de infección urinaria y 2 a 3 millones de visitas al departamento de emergencias (Flores-Mireles *et al*, 2015). En Europa, cada año 4 millones de personas contraen una infección “evitable” como consecuencia de procedimientos médicos, siendo las IVU el grupo más numeroso (19.6%) representando hasta el 40% de las infecciones nosocomiales, y son el reservorio institucional más importante de patógenos resistentes (Delgado, 2019).

3.1 Epidemiología en México

En México desde el año 2003 hasta el año 2018 las IVU han ocupado el tercer lugar dentro de las 20 principales causas de morbilidad (Secretaría de Salud, 2009). Cada año se registran aproximadamente cuatro millones de casos, en el año 2016 se reportaron 3,149,091 de casos de IVU en mujeres de los cuales 1,392,235 fueron en mujeres entre 20 y 44 años. En el sexo masculino, las IVU fueron la tercera causa de morbilidad con 957,875 casos por año. La distribución está asociada con la edad; sin embargo, esta infección disminuye en los adultos mayores de 44 años. Las IVU en la pubertad (15 a 19 años) representan la tercera causa de morbilidad con 297,831 casos; mientras que en la edad pediátrica (< 15 años) causan 360,220 casos. La prevalencia de las IVU en menores de un año es de 20,300 casos por año (Luna *et al*, 2018).

3.2 Clasificación de las IVU

Las IVUs se pueden clasificar de diversas formas dependiendo de diversos factores, por ejemplo (Echevarría-Zarate *et al*, 2006).

- IVU baja: Colonización bacteriana nivel de uretra y vejiga que normalmente se asocia a la presencia de síntomas y signos urinarios.
- IVU alta: Presencia de signos y síntomas de IVU baja, asociada a colonización bacteriana a nivel uretral y del parénquima renal, con signos y síntomas sistémicos como: escalofríos, fiebre, dolor lumbar, náuseas y vómitos.

La distinción entre IVU baja y alta sigue siendo clásicamente aceptada. Sin embargo, también es de utilidad clasificarla como; (Echevarría-Zarate *et al*, 2006):

- IVU no complicada: La que ocurre en pacientes que tienen un tracto urinario normal, sin alteraciones funcionales o anatómicas, sin una historia reciente de instrumentación (sondaje, uretrocistoscopia) y cuyos síntomas están confinados a la uretra y vejiga.

- IVU complicada: Ocurre debido a factores anatómicos, funcionales o farmacológicos que predisponen al paciente a una infección persistente o recurrente o a fracaso del tratamiento.
- IVU o bacteriuria asintomática: Muchos pacientes pueden tener una bacteriuria significativa ($\geq 10^5$ UFC/mL de orina) sin presentar síntomas.
- IVU recurrente: Más de tres episodios de IVU demostrados por cultivo en un periodo de un año.
- IVU nosocomial: Aparición de infección urinaria a partir de las 48 horas de la hospitalización de un paciente sin evidencia de infección, asociada a algún procedimiento invasivo, en especial, colocación de un catéter urinario.

3.3 Etiología de las IVU

Las IVUs son causadas mayormente por microorganismos bacilos Gram negativos y en más del 95% de los casos, un único microorganismo es el responsable del proceso infeccioso. El agente etiológico más frecuente invariablemente del género es la bacteria *Escherichia coli*, responsable del 75% a 80% de los casos; el 20% a 25% restante incluye microorganismos como: *Staphylococcus saprophyticus*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella sp.*, *Streptococcus faecalis* y *Pseudomonas aeruginosa* (Martínez, 2016).

3.4 *Escherichia coli* uropatogena (UPEC)

E. coli es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo de la familia enterobacteriaceae, esta bacteria coloniza el tracto del humano poco después de haber nacido y se le considera microorganismo de biota normal, pero hay cepas que pueden ser patógenas. Para determinar las diferencias entre cepas se estableció un esquema de serotipificación, la cual actualmente tiene 176 antígenos somáticos (O), 112 flagelares (H) y 60 capsulares (K), el antígeno O es el responsable del serogrupo y el antígeno somático y flagelar (O: H) el serotipo (Morales *et al.*, 2017) Con base en su mecanismo de patogenicidad y cuadro clínico las cepas de *E. coli* se clasifican en los siguientes grupos; enterotoxigénica (ETEC), enterohemorrágica (EHEC), entero invasiva (EIEC), enteropatogena (EPEC), enteroagregativa (EAEC), adherencia difusa (DAEC) y las extraintestinales (EXPEC) (Rodríguez, 2002). Para

estas cepas potencialmente patógenas es difícil su identificación debido a la enorme diversidad dentro de la especie que existe, pero Bailey (2010) menciona que estas están integradas en los grupos filogenéticos; A, B1, B2 y D (aunque se han descritos el C, E, F y G), en el grupo A y B1 predominan cepas comensales y en el B2 y D cepas virulentas (Clermont *et al*, 2000; Clermont *et al*, 2019).

Dentro de las ExPEC, se encuentran las *E. coli* uropatogena (UPEC) y la *E. coli* meningitis (MDEC), UPEC es la causante más común de IVU y se caracteriza por pertenecer a ciertos serogrupos llamados “serogrupos clásicos”, estos son; O1, O2, O4, O6, O7, O8, O15, O16, O18, O21, O22, O25 y O75, O83 y los serotipos comunes en estas cepas son O1:H4, O1:H6, O1:H7, O1:H-, O2:H1, O2:H4, O4:H5, O6:H1, O7:H4, O7:H6, O7:H-, O18ac:H7, O18ac:H-, O22:H1, O25:H1, O25:H4, O75:H5 y O75:H7. Las cepas UPEC frecuentemente son agrupados en los fulogrupos B2 y D. Exhiben una amplia gama de factores de virulencia (FV) que permiten que las cepas colonicen al huésped, evitan o cambian los mecanismos de defensa locales y sistémicos, recolectan nutrientes esenciales como el hierro, dañan o invaden y estimulan una respuesta inflamatoria nociva. Los FV característicos EXPEC incluyen diversas adhesinas, revestimientos de polisacáridos (p. ej. lipopolisacáridos y cápsulas), toxinas, sideróforos, proteasas invasivas y proteínas de resistencia sérica, muchas están codificadas en islas de patogenicidad (PAI). Las PAI son bloques de genes de virulencia contiguos, contienen elementos de movilidad como secuencias de inserción (consistentes con recombinación y transposición), y se insertan en el genoma en los loci de tRNA. UPEC coloniza el tracto urinario (TU) usando fimbrias, flagelo, cápsula, proteínas autotransportadoras, toxinas y captadores de hierro (Luna *et al*, 2018).

3.5 Factores de virulencia de UPEC

La virulencia en *E. coli* se determina por la presencia y expresión de genes que codifican para FV (Kausar *et al*, 2009) que permiten su crecimiento y persistencia dentro del TU, características que sirven para distinguir los patógenos potenciales de las cepas intestinales comensales. Los principales FV están asociados a la adhesión (adhesina fimbrial tipo 1, pili P, Fimbria S, AFA y Dr), despliegue de

toxinas (hemolisina y necrosante citotóxico) que dañan los tejidos, en la adquisición de nutrientes (aerobactina) y en la evasión de la respuesta inmune (cápsula y lipolisacaridos) (Basu *et al* 2013; Ibarra, 2015). Además, las toxinas pueden interferir en la señalización de leucocitos polimorfonucleares (PMN) en inhibir producción de especies reactivas de oxígeno que son usados por los PMN como bacteriostático y con esto UPEC logra sobrevivir en los tejidos, para continuar con su multiplicación y colonizar el sitio de infección (Loughman *et al.*, 2011). FV como la “hemolisina” causa desprendimiento del uropitelio y hemorragias en vejiga, después la aerobactina en conjunto con el receptor proteínico iutA actúan como los principales sideróforos que participa en el secuestro de hierro libre del hospedero para promover su crecimiento (Basu *et al.*, 2013). Los genes que codifican para los FV pueden ser parte de transposones, plásmidos o bacteriófagos y a su vez pueden encontrarse en zonas determinadas del genoma como PAI que suelen únicamente estar en cepas patógenas y la convierten en la principal causante de IVU (Oelschlaeger *et al*, 2002; Murray *et al* 2007; Tiba *et al.*, 2008).

A continuación, se describirán los principales factores de virulencia de UPEC:

Flagelo: El flagelo bacteriano es un apéndice de superficie helicoidal, compuesto de diversas subunidades de flagelina codificada por el gen *flic*. Está relacionado con la movilidad de UPEC, facilita el establecimiento y la propagación de la infección por patógenos y favorecen la ascendencia a la vejiga y posteriormente al tracto urinario superior o uréteres y riñones, agravando la IVU (Lane *et al.*, 2007).

Adhesinas: Las adhesinas son estructuras bacterianas que apoyan el proceso de adherencia formando enlaces mediados por proteínas fimbriales denominados pilis o fimbrias. Una fimbria se constituye por una secuencia de subunidades proteicas de pilina que forman una estructura cilíndrica (Ávalos González *et al*, 2000). Los asociados con UPEC incluyen fimbrias de tipo 1, P y S/F1C y la familia de adhesinas Dr, estas adhesinas están mediados por chaperonas periplasmáticas conservadas y proteínas acomodadoras de la membrana externa, también se relacionan adhesinas no fimbriales como *Afa 1*, *Afa 3* e *Iha* confiriéndole a UPEC la capacidad

de adherirse al uroepitelio y así evitar ser eliminada o ser arrastradas por la orina (Mulvey *et al.*, 2002).

La fimbria tipo 1 (Fim) y la fimbria P (Pap), reconocer y se unen a glucoproteínas manosiladas receptores del uroepitelio para iniciar la colonización. La interacción de la adhesina FimH con el receptor celular provoca el inicio de una cascada de fósforilación que causa apoptosis y un aumento en los niveles de Ca⁺ intracelular, también reconoce a receptores α_3 , β_1 -integrinas que promueven la invasión bacteriana. Estos eventos traen consigo el desarrollo de inflamación, muerte celular intrínseca y extrínseca, que puede deberse al efecto inflamatorio de los receptores tipo Toll del uroepitelio o a la descamación vesical y la posible colonización por parte de *E. coli*, e incluso preparan el escenario para la formación de biopelícula (Bien *et al.*, 2012; Ulett *et al.*, 2013).

Por otro lado, la fimbria P es un heteropolímero compuesto de proteínas expresadas por el operon *papA-K* (Hull *et al.*, 1981). Posee 3 tipos de adhesinas (I a III) en sus 11 extremos, las cuales les permiten unirse a receptores α -D-galactopiranosil1-(1-4)- β -D-galactopiranosido expresados en la superficie del epitelio urinario. Esta unión provoca la liberación de citocinas y la activación del Receptor tipo Toll 4 (TLR4), desencadenando con ello toda una serie de procesos bioquímicos que conducen la inflamación característica de las IVUs (Lane *et al.*, 2007). *PapC* es una proteína de membrana externa que forma un poro a través del cual el pili es trasladado al exterior (Miranda, 2014; Tarr *et al.*, 2000).

Captadores de hierro. El hierro es esencial para la supervivencia de los microorganismos, pero suele estar secuestrado por el hospedador y los sideróforos son parte de los mecanismos que emplea la bacteria para tener un suministro de hierro. Los complejos hierro-sideróforo son reconocidos por receptores de la membrana externa de la bacteria e internalizados mediante distintos sistemas. Las cepas UPEC pueden ser capaces de producir hasta cuatro tipos de sideróforos distintos: enterobactina, salmoquelina, aerobactina y yersiniobactina. Cada sideróforo tiene unas características específicas que confieren a las cepas ExPEC

una gran capacidad de adaptación (Robledo, 2018). En la **Tabla 1** se explica las funciones de genes asociados a la captación de hierro.

Tabla 1. Genes asociados a la captación de hierro para UPEC y función desempeñada.

Gen	Función	Referencia
<i>chuA</i>	Captación de hierro a partir del grupo hemo	(Naggy, 2001).
<i>feoB</i>	Genera la energía para el transporte activo de Fe ²⁺	(Drago-Serrano, 2009).
<i>irp 2;</i>	Codifica la síntesis del sideróforo	(Carranza <i>et al.</i> , 2012)

Sat: Toxina autotransportadora secretada (Sat). Es una serín proteasa de alto peso molecular miembro de la familia SPATE (Serine Proteases Autotransporter from Enterobacteriaceae) asociada a UPEC causante de pielonefritis, tiene actividad citopática en vejiga y riñón mediante la formación de vacuolas en el citoplasma de las células epiteliales del tracto urinario. Su actividad proteasa tiene efecto en el citoesqueleto de las células de la vejiga causando así alteraciones morfológicas (Guyer *et al.*, 2000), es parte de los genes localizados en PAIs (Parham *et al.*, 2005).

Islas de patogenicidad: En *E. coli* se han descrito y estudiado las 9 PAI, cada PAI codifica distintos factores, aunque algunos pueden coincidir en más de una PAI, la más común en cepas aisladas de heces de pacientes con IVU es Malx (PAI) (Andreu, 2005), PAI (malX) es un marcador de islas de patogenicidad. El gen malX codifica para un sistema de enzimas fosfotransferasas que reconocen maltosa y glucosa y que son más frecuentes en cepas ExPEC (Merino, 2018).

TraT: El gen *traT* codifica una proteína importante de la membrana externa, como una lipoproteína, asociada no covalentemente con peptidoglicano y parece estar expuesta en la superficie celular. Además, tiene la capacidad para conferir resistencia de las bacterias (Montenegro *et al.*, 1985).

3.6 Mecanismo de patogenicidad

La interacción de UPEC con la célula promueve un estado de oxidación intracelular, promoviendo la filamentación de la bacteria y su posterior eflujo por la lisis de la célula. La interacción célula-bacteria estimula un proceso de apoptosis y el desprendimiento de las células protectoras del TU, como un mecanismo de defensa en el TU. El epitelio intermedio del TU permanece expuesto y UPEC coloniza nuevamente para un nuevo ciclo de infección. Después de la reinfección, UPEC puede permanecer intracelularmente en estado quiescente hasta por varios meses (Luna *et al*, 2018).

3.7 Resistencia a antimicrobianos

La resistencia a antimicrobianos es un proceso adaptativo iniciado desde los orígenes de la presencia de bacterias en la tierra como una estrategia de defensa a los antibióticos naturales presentes en el medio ambiente (Durán, 2018). El manejo clínico de la IVU se complica por el aumento de las infecciones causadas por *E. coli* que son resistentes (1 o 2 antibióticos) o multi-resistentes (3 antibióticos) (Robledo, 2017), dentro de los antibióticos más frecuentes empleados en el tratamiento de las infecciones por cepas de *E. coli*, son la amoxicilina, amoxicilina/ácido clavulónico, cefalosporinas, aminoglucósidos, cotrimaxol y quinolonas (Robledo, 2017). Los antimicrobianos con resistencia menor al 10% son nitrofurantoína, amikacina y carbapémicos, así como el 60% de los aislamientos son resistentes a ciprofloxacino (Ponce de León *et al*, 2018). El tratamiento contra las IVUs generalmente incluye antibióticos β -lactámicos, fluoroquinolonas o trimetoprima/sulfametoxazol, pero puede variar en función de la edad del paciente, sexo, patógenos involucrados, curso de la enfermedad, y el área anatómica del tracto urinario.

Sin embargo, bacterias como UPEC han adquirido mecanismos de resistencia a la mayoría de estos antibióticos lo que puede estar relacionado con los cambios en el genoma bacteriano por mutación o adquisición por transferencia horizontal de un material extracromosómico o cromosómico (López-Banda *et al.*, 2014). Por lo tanto la capacidad de *E. coli* para adquirir genes de resistencia hace impredecible su sensibilidad, por lo que debe determinarse mediante un antibiograma antes de prescribir un tratamiento (Faleiro-Naves, 2010). Ya que las bacterias emplean

mecanismos que contribuyen a la resistencia contra antibióticos, como la inactivación enzimática, modificación del sitio blanco, la sobreexpresión, el secuestro, la localización intracelular, aumento de flujo de salida y disminución del afluente y del bloqueo físico a través de la formación de biopelículas. Además, estos mecanismos traen como consecuencia la recurrencia y/o persistencia de la infección en vías urinarias (Robledo, 2017).

3.8 Intestino, principal reservorio de infección de IVU

Como se ha mencionado *E. coli* es un miembro normal de la biota intestinal, normalmente encontrado como simbiote en la participación de la digestión y síntesis de ciertas vitaminas (Sarowska *et al*, 2019), pero puede encontrarse de forma patógena. Dentro del intestino existen las cepas transitorias y residentes que pueden persistir en la biota intestinal de un individuo durante meses y años, mientras que las cepas transitorias desaparecen en unas pocas semanas y en un sentido estricto, probablemente no colonizar. Como en el caso de las cepas comensales, ya que su capacidad de mantener una población alta en el mismo no está relacionado con la capacidad de persistir y se ha catalogado como cepa transitoria (Nowrouzian, *et al*, 2005). De lo contrario a una cepa que causa infecciones extraintestinales tales como agrupadas en el grupo B2 y D que contiene a las bacterias con más factores de virulencia, como las adhesinas que pueden contribuir a la persistencia de cepas de *E. coli* en el intestino del humano. Además, las cepas de *E. coli* residentes expresan fimbrias P y tienen genes para fimbrias P y fimbrias tipo 1 con más frecuencia que las cepas transitorias, así como genes codificantes de hemolisina aerobactina y los antígenos capsulares K1 y K5, lo cual sugiere que la uropatogenicidad puede ser un efecto secundario de la *E. coli* adaptándose al medio intestinal y mantienen una población fecal, de hecho, las cepas B2 mostraron una aptitud tan pronunciada para el intestino en el que casi siempre eran residentes (Nowrouzian, *et al*, 2005) por lo anterior, se considera que las bacterias transmitidas por vía fecal - oral o contacto sexual son una fuente potencial de UPEC (Sarowska *et al.*, 2019).

4. Justificación

Las infecciones de las vías urinarias (IVU) son una de las enfermedades más comunes a nivel mundial, tienen una importancia clínica y epidemiológica. Se estima que el 90% de las IVUs es causada por un solo agente infeccioso y *E. coli* es causante del 75-80% de IVUs. Esta bacteria forma parte de la biota intestinal, por lo tanto forma parte del grupo de las bacterias fecales y siendo las mujeres un grupo de alto riesgo de contraer una IVU recurrente, principalmente por su anatomía, por lo que es importante conocer las características genotípicas (genes de virulencia), fenotípica (serotipo) y la ubicación filogenética de cepas de *E. coli* aisladas de heces de pacientes con IVUs recurrentes, para determinar su posible participación en las infecciones recurrentes de estos pacientes.

5. Objetivos

Identificar genes de virulencia asociadas a UPEC y su filogenia en cepas de *E. coli* aisladas de heces de pacientes con infecciones recurrentes vías urinarias.

5.1 Objetivos particulares

- Realizar la identificación de *E. coli* en coprocultivos provenientes del cepario del HIMFG aislados de pacientes con IVU recurrentes.
- Identificar la presencia de los genes *chuA*, *yjaA*, *TSPE4 C2* y clasificarlos en los grupos filogenéticos correspondientes.
- Identificar genes de virulencia de UPEC en las cepas de *E. coli* aisladas de heces de pacientes con IVU.
- Realizar un análisis de los serotipos de las cepas de *E. coli* aisladas de heces respecto a los genes de virulencia.

6. Materiales y Métodos

Se seleccionaron del cepario del laboratorio de patogenicidad bacteriana ubicado en el Hospital infantil de México Federico Gómez, 188 cepas de *E. coli* aisladas de las heces de 16 pacientes con IVU recurrente que forman parte del proyecto HIM/2014/022 SSA. 1122 “Desarrollo de Autovacunas para el Tratamiento y Control de Infecciones Persistentes de Vías Urinarias” y PAPII-IN221318-UNAM “Estudio

prospectivo de seguimiento de pacientes con infección de vías urinarias, caracterización fenotípica, genotípica y ensayo de actividad antimicrobiana de compuestos naturales y sintéticos en las cepas de *Escherichia coli* uropatogena aislada”. A estos pacientes además de solicitarles una muestra de orina, se le solicitó una muestra de heces al inicio y tres meses después de iniciar el tratamiento con la autovacuna. De cada coprocultivo se seleccionaron al azar 10 colonias, para este estudio solo se analizaron las identificadas como *E. coli* por bioquímicas convencionales y se mantuvieron en gelosa especial para su conservación.

6.1 Recuperación y verificación de pureza de las cepas de *E. coli* aisladas de coprocultivos

De cada cultivo conservado en gelosa especial se sembró en agar MacConkey y sangre para su pureza e identificación de organismos alfa-hemolíticos. Los cultivos se incubaron a 37°C durante 24 hrs. Se observó que la morfología colonial correspondiera a una *E. coli*; en agar sangre, colonias circulares, de 2mm a 4mm de diámetro, de color grisáceo y elevación convexa, algunas cepas pueden producir hemólisis, que se desarrolla como una zona clara alrededor de la colonia en agar sangre, hemolíticas (con halo) y sin hemólisis (sin halo) (**Figura 1 y 2**) (González, 2013). En agar MacConkey se documentó las siguientes características coloniales: tamaño, brillo, elevación de colonias y la capacidad de las bacterias para fermentar lactosa. Si es positiva se observa colonias rosas, (**Figura 3**), si son negativa las colonias blancas (**Figura 4**). Después de que se consideró que las cepas estaban puras, se sometieron a identificación bioquímica usando Citrato de Simmons, prueba de Ureasa, Rojo de metilo-Vogues-Proskauer, MIO y Kligger, se incubaron a 37°C durante 24 hrs para confirmación de especie. En la **Tabla 2** se muestran las características bioquímicas para *E coli* (Koneman, 2008).



Figura 1. Crecimiento de *E. coli* en agar sangre. Se observa el crecimiento de la bacteria sin provocar hemolisis en agar sangre.



Figura 2. Hemolisis de *E. coli* en agar sangre. Se muestra el crecimiento de la bacteria provocando una hemolisis en agar sangre.



Figura 3. Crecimiento de *E. coli* en agar MacConkey, lactosa positiva. Se observa el crecimiento de *E. coli* al degradar lactosa en agar MacConkey.



Figura 4. Crecimiento de *E. coli* en agar MacConkey, lactosa negativa. Se observa el crecimiento de *E. coli* al no poder degradar lactosa en agar MacConkey.

Tabla 2. Características bioquímicas para *E. coli*.

Prueba bioquímica	Resultado
Indol	+
Rojo de metilo	+
Voges Proskauer	-
Citrato de Simmons	-
Producción de gas H ₂ S	-

Urea	-
Movilidad	+/-
Gas a partir de glucosa	+
Kligger	A/A K/A

6.2 Extracción de DNA

Los aislamientos que confirmaron ser *E. coli* se les realizó una extracción de DNA; por el método de tiocianato de guanidina descrito por Pitcher et al 1989, con algunas modificaciones de acuerdo con lo reportado por Navas Valbuena y Acevedo (2019). *E. coli* fue sembrado en 30 ml de caldo LB, incubadas a 37°C con agitación constante a 200 rpm por 24 hrs. Posteriormente los cultivos se centrifugaron a 3500 rpm durante 35 min. Transcurrido este tiempo, se desechó el sobrenadante y a la pastilla se le agregó 550 µL de solución de lisis (tiocianato de guanidina al 2M, N-laurylsarcosil al 0.16 % y EDTA al 0.1 M con un PH de 8.0) y se sometió a una agitación vigorosa en Vortex (LabNet) hasta destruir la pastilla y el homogenizado se transfirió a tubos de 1.5 ml y se les agregó 250µL de acetato de amonio al 7.4 M frío, para después agitarlos, invirtiendo los tubos por diez ocasiones. Después se incubó 10 minutos en hielo, una vez concluido el tiempo se agregó un volumen de 500 µL de cloroformo-Alcohol isoamilico (Proporción 24:1) y se agitó vigorosamente durante 5 segundos procurando que todo el contenido estuviera homogeneizado. Posteriormente se centrifugó a 13,000 rpm durante 5 min en centrífuga refrigerada (LabNet/Eppendorf), cuando terminó el ciclo de centrifugación se tomó el sobrenadante de cada tubo y se transfirió a un tubo nuevo. Al sobrenadante transferido se le agregó nuevamente 500 µL de cloroformo-alcohol isoamílico y se agitó vigorosamente durante 5 seg en vortex, después se centrifugaron los tubos a 13,000 rpm durante 5 min. Transcurrido este tiempo se tomó el sobrenadante y se transfirió a tubos nuevos, al sobrenadante transferido se le agregarón 0.7 volúmenes de isopropanol frío, los tubos se agitaron invirtiéndolos por diez ocasiones y se dejaron incubar mínimo 40 min en hielo. Después de este tiempo, se centrifugaron a 13,000 rpm por 10 min, al terminar la centrifugación el sobrenadante de cada tubo fue desechado y a la pastilla de ADN se le agregó 1mL

de etanol al 70% frío y nuevamente se centrifugaron a 13,000 rpm por 10 minutos, al terminar se desechó el sobrenadante y se secó la pastilla de ADN en baño seco 85°C a 15 minutos, la pastilla bacteriana se reconstituyó con 50 µL de agua MiliQ (Milipore®) y se almacenó a -20°C hasta su uso. Para comprobar la integridad y pureza del ADN obtenido se realizó una electroforesis del ADN y se cuantificara en un espectrofotómetro NanoDrop®. A partir del valor obtenido respecto a la concentración del ADN extraído se realizó una dilución del ADN a 100 ng/µL, con la cual se realizaron los ensayos de PCR empleando los iniciadores enlistados en la tabla 4.

6.3 Agrupación filogenética por PCR.

Se desarrolló una PCR multiplex para la búsqueda de grupo filogenético de acuerdo con lo reportado por Clermont *et al.* (2000), basándose en una decisión dicotómica utilizándose los genes; *chuA*, *yjaA* y un fragmento de ADN llamado TspE4.C2 (**Tabla 3 y Figura 6**). La mezcla de reacción consistió en 25 µl totales ajustando el volumen a 12 µl de Master Mix (Thermo Scientific), 1 µl de cada primer (20 pM) (Sigma-Aldrich®), 5.5 µl de agua y se 1 µl del DNA correspondiente. La PCR se llevó a cabo en un Termociclador de la marca thermo Techne y MiniAmp Thermocycler con las siguientes condiciones: 5 minutos a 94 °C; 30 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 55 °C; 30 segundos a 72 °C y una extensión final de 7 minutos a 72 °C. En la **Figura 5** se observa el árbol dicotómico sobre la determinación del filogrupo de cada cepa de *E. coli* y en la **Figura 6** se muestran los productos de la PCR multiplex en gel de agarosa teñida con Bromuro de etidio, visualizando los filogrupos.

Tabla 3. Características de los iniciadores para identificar filogrupos.

Gen	Secuencia 5'→3'	Amplicón
<i>chuA</i>	F→GACGAACCAACGCTCAGGAT R→TGCCGCCAGTACCAAAGACA	279 pb
<i>yjaA</i>	F→TGAAGTGTCAGGAGACGCTG R→ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC	211pb
TspE4C2	F→GAGTAATGTCTGGGGCATTCA R→CGCGCCAACAAAGTATTACG	152 pb

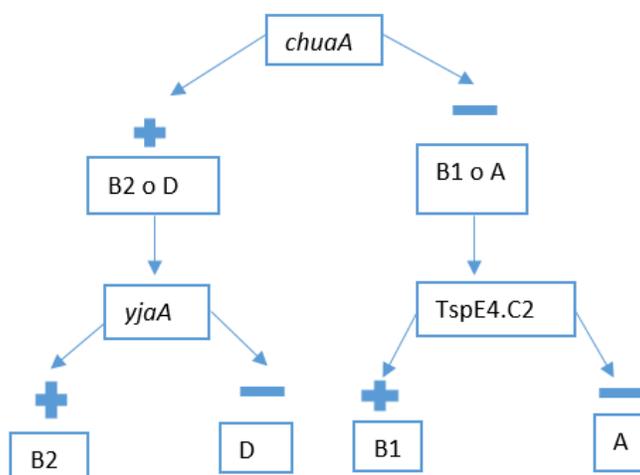


Figura 5. Árbol dicotómico de filogrupos. Se muestra el árbol dicotómico para agrupar las cepas de *E. coli* en filogrupos, mediante el uso de los resultados de los productos de PCR de los genes de *chuA*, *yjaA* y un fragmento de ADN TSPE4.C2.

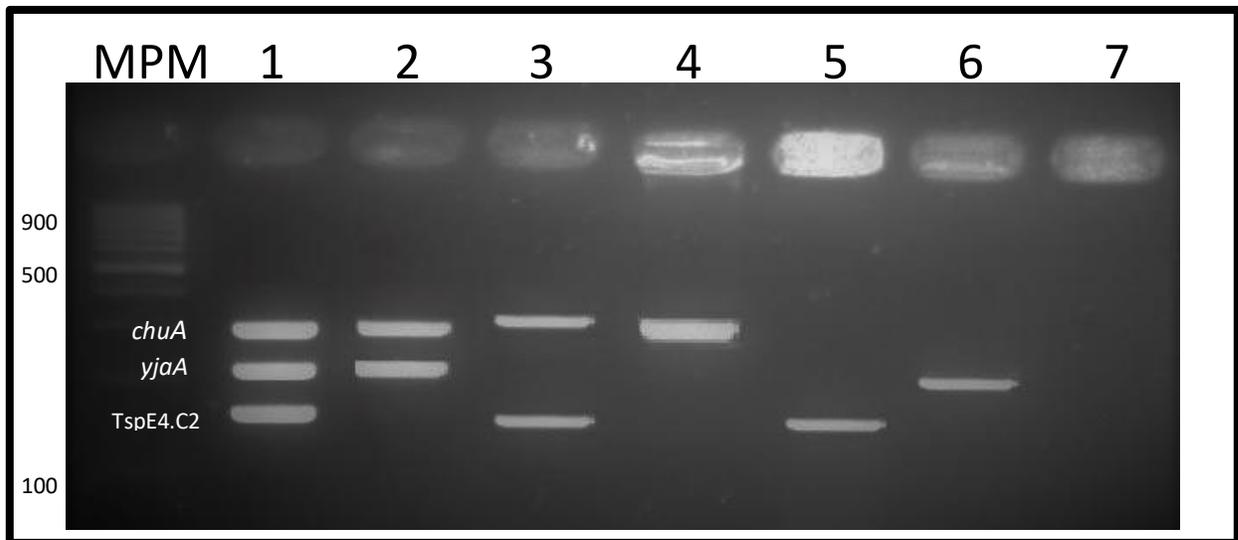


Figura 6. Perfil de productos de PCR triple para designar grupos filogenéticos de *E. coli*. El método se basa en la presencia o ausencia de los genes *chuaA* y *yjaA* y el fragmento de DNA TSPE4.C2 según lo reportado por Clermont *et al.* (2000). Carril MPM: marcador de peso molecular; carril 1 y 2: filogrupo B2; carril 3 y 4: filogrupo D; carril 5: filogrupo B1; y carril 6 y 7: filogrupo A.

6.4 Detección de genes de virulencia

Se buscaron genes agrupados en factores de virulencia de UPEC como adhesina (*papC* y *fimH*), captadores de hierro (*feoB*, *irp2* y *chuaA*), toxinas (*sat*), genes que aportan resistencia sérica (*traT*) e islas de patogenicidad PAI (*malX*) en las cepas de *E.coli*, mediante el método de PCR punto final, se preparó una mezcla de reacción conteniendo: 12.5 µl de PCR Master Mix (Thermo Scientific), 1.0 µl de cada iniciador (10 mM), 2µl de DNA correspondiente ajustando con agua un volumen final de 24.5 µl. La mezcla de reacción se llevó al termociclador (Thermo Techne ®y MiniAmp Thermocycler®) (Pedrozo, 2019). Las secuencias de los iniciadores utilizados en cada gen y el producto esperado se muestra en la **Tabla 4** y las condiciones de amplificación utilizadas en el termociclador se muestra la **Tabla 5**. y en la **Figura 7** se muestran los productos de las PCRs para cada gen en gel de agarosa.

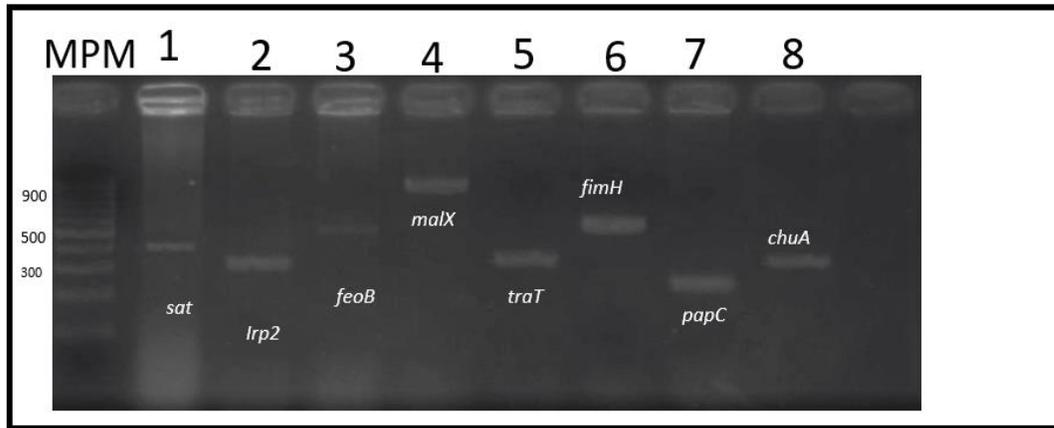


Figura 7. Perfil de productos de PCR punto final para detectar genes de virulencia relacionados con UPEC. Carril MPM: marcador de peso molecular, carril 1: *Sat*, carril 2. *lrp 2*, carril 3: *FeoB*, carril 4: *malX*, carril 5: *traT*, carril 6: *fimH*, carril 7: *papC*, carril 8: *ChuaA*

Tabla 4. Iniciadores utilizados para amplificar las secuencias de los genes de virulencia.

Gen	Secuencia (5´-3´)	Tm	Producto esperado (pb)	Referencia
Adhesinas				
<i>papC</i>	F gtggcagtatgagtaatgaccgtta R atacccttctgcagggatgcaata	54 °C	205	Johnson y Stell (2000)
<i>fimH</i>	F tcgagaacggataagccgtgg R gcagtcacctgccctccggta	63 °C	508	
Captadores de hierro				
<i>feoB</i>	F aattggcgtgcatgaagataactg R agctggcgacctgatagaacaatg	52.5°C	470	Runyen-Janecky <i>et al.</i> (2003)
<i>irp 2</i>	F aaggattcgctgttaccggac R tcgtcgggcagcgtttctct	53°C	280	Janben <i>et al.</i> (2001)

<i>chuaA</i>	F gacgaaccaacgctcaggat R tgccgccagtagcaagaca	55°C	279	
Toxinas				
<i>sat</i>	F actggcggactcatgctgt R aaccctgtaagaagactgagc	55°C	387	Ruiz J. <i>et al.</i> (2002)
Islas de patogenicidad				
PAI (<i>malX</i>)	F ggacatcctgttacagcgcgca R tcgccaccaatcacagccgaac	59.5°C	925	Johnson y Stell (2000)
Resistencia				
<i>traT</i>	F ggtgtggtgcatgagcacag R cacggttcagccatccctgag	57.5°C	290	

Tabla 5. Condiciones de amplificación de cada uno de los genes utilizados en caracterización de las cepas clínicas de *E. coli*.

Marcador	Desnaturalización inicial (°C/min)	Desnaturalización (°C/seg)	Alineación (°C/seg)	Extensión (°C/seg)	Extensión final (°C/min)	Ciclos
<i>Pap C</i>	95/3	95/30	54/30	68/30	72/10	30
<i>fimH</i>	96/2	96/30	63/60	72/60	72/8	30
<i>feoB</i>	90/2	94/30	52.5/30	72/30	72/10	30
<i>Irp2</i>	95/2	94/30	53/30	72/30	72/10	30

<i>chuaA</i>	95/5	94/30	55/30	72/30	72/7	30
<i>Sat</i>	95/1	95/60	55/60	72/60	72/7	25
<i>malX-PAI</i>	95/2	94/30	57.5/30	72/60	72/10	30
<i>traT</i>	95/2	95/30	57,5/30	72/30	72/20	30

6.5 Electroforesis de ADN en geles de Agarosa

Para la visualización de los amplicones, por PCR se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% y se utilizará SB 1x (Hidroxido de sodio, ácido bórico pH 8,5). La separación del ADN se realizó en una cámara de electroforesis horizontal (Labnet), con un voltaje constante de 60-70 V, por 60 min. Las bandas de ADN se visualizarán teñidas en una solución de bromuro de Etidio al 0.5 g/mL bajo luz ultravioleta (UV) con ayuda de un fotodocumentador (Cleaver, Scientific lab). El tamaño de las bandas de ADN se estimó comparándolas con un marcador 100 pb Thermo Scintific® (marcador peso molecular 1000pb, amortiguador 6x, tris trell y agua). Se utilizó como control positivo la cepa UPEC CFT 073 (Pedrozo, 2019; Guerrero, 2016) y para *traT*, la cepa *E. coli* 1331.

6.6 Dendrograma

Para la identificación de patrones se realizó un dendrograma utilizando el programa past4.04 (Microsoft, Noruega), obteniendo un modelo multivariado de agrupamiento (clustering) clásico, utilizando el algoritmo de UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic), con un índice de Similitud de Dice.

6.7 Estadístico

Para el análisis estadístico se realizó la prueba de Chi cuadrada con una tabla de contingencia de dos colas, aquellos valores de P menor o igual a 0.05 se consideraron estadísticamente significativos.

7. Resultados

7.1 Filogrupos de *E. coli*

Para del desarrollo del objetivo de este trabajo se analizaron 181 cepas de *E. coli* aisladas de heces de pacientes con IVU recurrente, cuyo genero fueron confirmadas mediante pruebas bioquímicas (Apartado 5. 1 de la sección de materiales y métodos). Generalmente la agrupación por filogrupos de las cepas de *E. coli* se realiza por el método de Clermont *et al.* (2000); es por ello por lo que se decidió aplicar esta metodología a las 181 cepas caracterizadas previamente. El fundamento de esta técnica se basa en la identificación de los genes *chuA*, *yjA* y un fragmento de DNA TspE4.C2 para asignar a las cepas de *E. coli* como pertenecientes a los filogrupos A, B1, B2 o D. (Apartado 5.3 de la sección de materiales y métodos). Al analizar los amplicones se identificó que la frecuencia de los filogrupos de las cepas de *E. coli* fue: 50.8% (n=92), 26.5% (n=48), (14.3%, n=26) y (8.2%, n=15), para el grupo A, B2, B1 y D respectivamente (**Figura 8**). Notablemente se observó que el 65% (n=118) de las cepas pertenecen a los grupos comensales (A y B1).

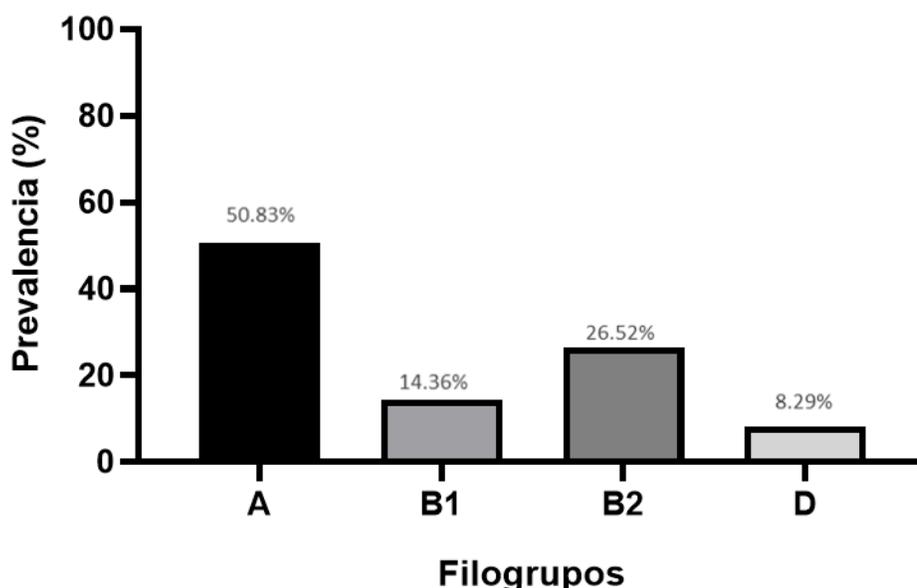


Figura 8. Filogrupos de las cepas aisladas. Se muestran los diferentes filogrupos a los que pertenecen las cepas de *E. coli* (n=181) aisladas de heces de pacientes con IVU recurrente utilizando el método de Clermont *et al.* (2000).

7.2 Identificación de genes de virulencia en cepas de *E. coli*

UPEC es responsable del 80% de las IVUs, principalmente por su habilidad de colonizar el tracto urinario mediante la coordinación de diferentes factores de virulencia y junto con las condiciones inmunológicas del hospedero, facilitan este proceso infeccioso (Ibarra, 2015). Aunado a esto, las cepas UPEC se presume que provienen del tracto intestinal (Chen *et al*, 2013). Por eso se buscaron genes asociados a UPEC en cepas aisladas de heces; adhesinas (*papC*, *fimH*), captadores de hierro (*feoB*, *irp2*, *chuA*), toxinas (*sat*), PAI (*malX*) y factores que dan resistencia a la bacteria dentro de las células (*traT*). Los resultados muestran que el gen más frecuente fue, *feoB* encontrándose en el 81% (n=147). Posteriormente estuvieron los genes, *fimH*, *irp2*, *traT*, *chuA* y *sat* con un 69% (n=125), 61% (n=111), 50% (n=92), 31% (n=57) y 40% (n=74) respectivamente. Por el contrario, *malX* de la isla de patogenicidad. PAI y la adhesina *papC* se encontraron en menor porcentaje, presentes en un 24% (n=43) y 29% (n=53), respectivamente.

Se calculó un score de virulencia basándose en la presencia de los 8 genes de virulencia previamente mencionados, al puntaje más alto en este score se le asignó el valor de 10, es decir las cepas con 8 genes y los demás valores se asignaron con relación a este valor de 10. Se observó que las cepas con un score de 2.5 predominaron con un 19.3% (n=35) y las cepas con un score de 10 fueron las menos prevalentes con un 3.31% (n=6). Además, se agruparon las cepas en dos categorías; score alto (Presencia de 5 o más genes) y score bajo (presencia de 4 genes o menos). Resaltando que el 57% (n=103) de las cepas tienen un score alto, y el 71% (n=129) se mantenían distribuidas entre el score 2.5 y el score de 6.2 (**Figura 9**). Finalmente se considera que estas cepas tienen una alta carga de genes de virulencia, pero no con la presencia de todos los genes.

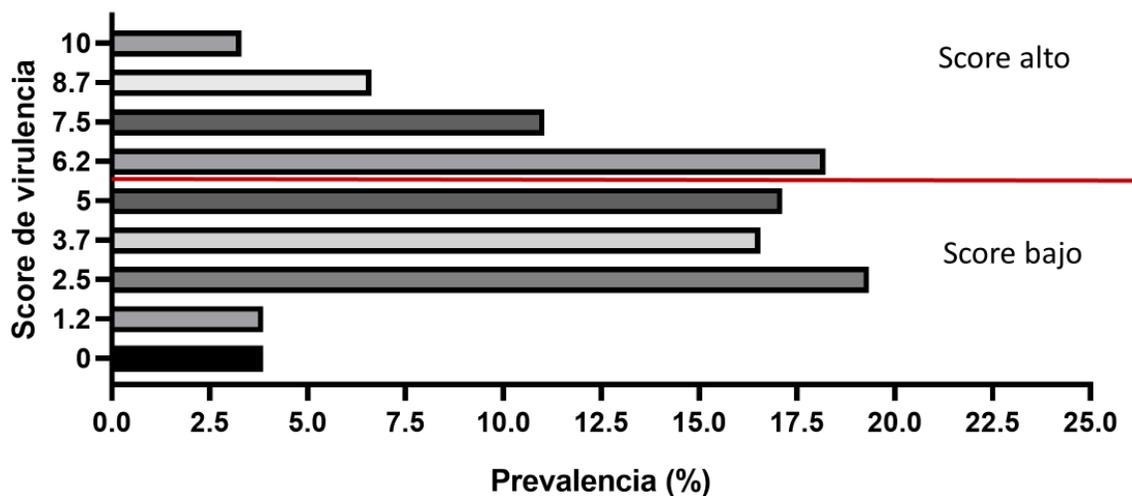


Figura 9. Presencia y ausencia de los genes de virulencia asociados a UPEC. La figura muestra los scores de virulencia asignados a las cepas, así como el porcentaje de cepas para cada score. La línea representa la división de las dos categorías en score alto (mayor a >4 genes) y bajo (menor o igual a ≤ 4 genes)

Los scores de virulencia nos indican el número de genes que tiene cada cepa de *E. coli* estudiada, no obstante, este score no permite la diferenciación entre los genes ya que para el score cada gen tiene el mismo valor, es por ello por lo que se precisó la presencia y ausencia de cada gen para establecer patrones. La diferente presencia de genes dio un total de 66 patrones, el más representativo fue el patrón con el gen *fimH* y el gen *feoB* con un total del 13.3% (n= 24) de cepas que tienen este patrón. Sin embargo, los patrones que se repiten dos veces y los patrones únicos tuvieron un porcentaje de 14.3% (n=26) y 16.5% (n= 30) respectivamente. Notablemente la mayoría de las cepas presentan patrones únicos.

7.3 Correlación entre genes de virulencia y filogrupos

Analizando por filogrupos se identificó que todos mostraban la presencia de los genes relacionados con la virulencia, a excepción de *chuA* ausente en los filogrupos A y B1. Además, se observó que el 71% de las cepas que mostraron la presencia de los genes buscados pertenecían a los filogrupos A y B2 (**Figura. 10**). Al

compararse estadísticamente la presencia de cada gen entre cepas con filogrupo comensal (A y B1) y filogrupo extraintestinal (B2 y D) se calculó que la presencia de los genes *papC*, *chuA*, *malX* y *traT* es mayor en las cepas con filogrupo extraintestinal ($p \leq 0.05$). En cuanto a la presencia de los genes *fimH* e *irp2* fue mayor ($p \leq 0.05$) en los filogrupos comensales y para los genes *feoB* y *sat* no hubo una diferencia significativa entre ambos grupos de cepas comensales y extraintestinales. Encontrando que los filogrupos A y B2 son los que representan un porcentaje alto con un 43% (280/649) y 38% (252/649) del total de los genes.

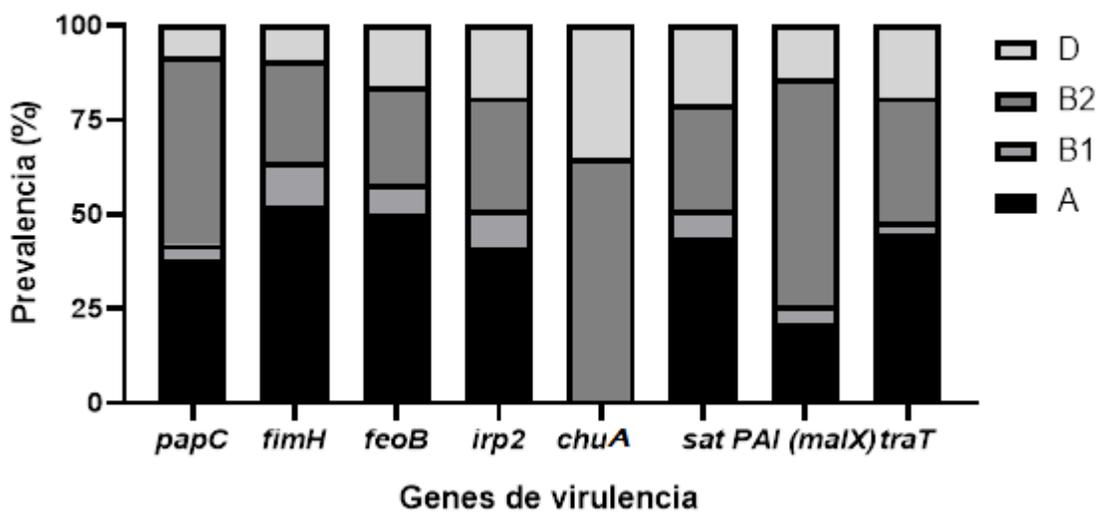


Figura 10. Cepas agrupadas en filogrupos, positivas a genes de virulencia. Se observan diferentes genes de virulencia en las cepas de *E. coli* (n=181) aisladas de heces de pacientes con IVU recurrentes, y la agrupación de las cepas en los diferentes filogrupos del método de Clermont *et al*, (2000).

7.3 Correlación y Patrones de virulencia asociados al serotipo de *E. coli*

Para esta investigación se contó con datos de serotipificación de las cepas de *E. coli*, clasificadas por antígenos presentes en la superficie celular de la bacteria. Estos antígenos dan el serogrupo a las bacterias y algunos en específico están relacionados a la presencia y frecuencia de una IVU. De 181 cepas, se lograron serotipificar 142 cepas, mostrando 57 diferentes serotipos, de estos el 19% (n=11) son serogrupos clásicos y el 81% (n=46) son serogrupos no clásicos de UPEC. Al realizar una correlación entre los genes de los serogrupos clásicos y no clásicos se

observó la presencia de 6/8 genes *papC*, *irp-2*, *chuA*, *malX*, *sat*, *traT* entre las cepas con serogrupo clásico ($P < 0.05$) (Tabla 6)

. Tabla 6. Correlación de los serogrupos clásicos y no clásicos de UPEC.

Factor de virulencia	Genes de virulencia	Serogrupos Clásicos: (n=49) n (%)		Serogrupos no clásicos: (n=93n) (%)		Valor de P
		n	(%)	n	(%)	
Adhesinas	<i>papC</i>	21	42.86	16	17.20	0.0001
	<i>fimH</i>	31	63.27	75	80.65	0.8004
Captadores de hierro	<i>feoB</i>	42	85.71	67	72.04	0.166
	<i>irp2</i>	37	75.51	49	52.69	0.0157
	<i>chuA</i>	34	69.39	24	25.81	0.0023
PAI	<i>malX</i>	23	46.94	18	19.35	0.0016
Toxinas	<i>sat</i>	23	46.94	24	25.81	0.0231
Resistencia	<i>traT</i>	39	79.59	43	46.24	0.0002

Analizando los 53 patrones de virulencia de las cepas serotipificadas, denominados con números romanos (**Figura 11**). El patrón dominante es el patrón I; conformado por los genes *fimH* y *feoB*, con un 13.3% y de manera concreta se observa que las cepas con patrones únicos destacan con respecto a las demás y parece no haber una distribución frecuente de los serotipos con serogrupo clásicos o no clásicos con respecto a los patrones.

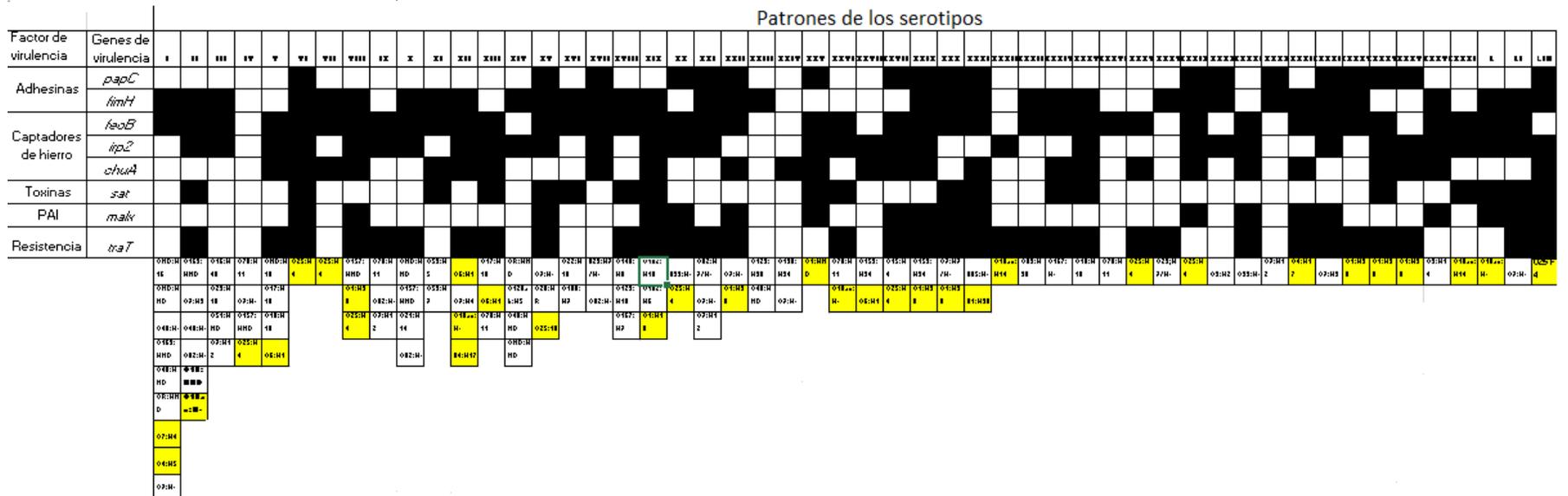
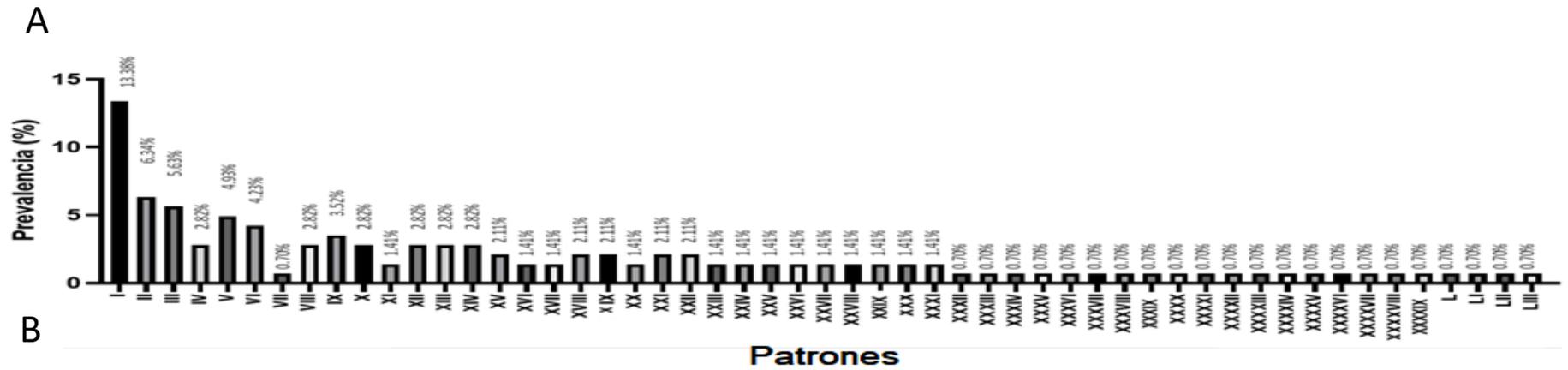


Figura 11. Patrones con serotipos. Para visualizar los patrones encontrados, así como la frecuencia de ellos se construyeron estos dos paneles; A) Se muestran los porcentajes con respecto a los patrones designados con números romanos. B) En este panel se encuentra la composición de cada patrón y por debajo el serotipo correspondiente, resaltando en color amarillo los serotipos con serogrupo clásico.

Las cepas de UPEC pertenecen a un limitado número de serogrupos y se pueden dividir en serogrupo clásicos y no clásicos, las cepas de *E. coli* que producen una IVU se relacionan principalmente con los clásicos. En la **Figura 11** se encuentran en color amarillo los serotipos con serogrupo clásico identificados en las 142 cepas, ya que cada serotipo no tiene una distribución en un solo patrón se les asignó un score de virulencia y se contabilizó el número total de patrones para cada serotipo (**Figura 12 y 13**). El serotipo con serogrupo clásico más frecuente fue O25:H4, ubicándose en nueve patrones y un score promedio de 6.2, mientras los menos frecuentes, pero con un score alto son O25:H10, O1:HND, O1:H18, que fueron cepas que presentaron un patrón único. De forma similar, las cepas serotipificadas que tienen serogrupo no clásico muestran que las cepas con un score alto presentan patrones únicos. Mientras que cepas no tipificables (O?:H-) estuvo presente en 7 patrones con un promedio score de 5. Destacando que los promedios de scores más altos pertenecen a las cepas con patrones únicos, sin importar el serogrupo.

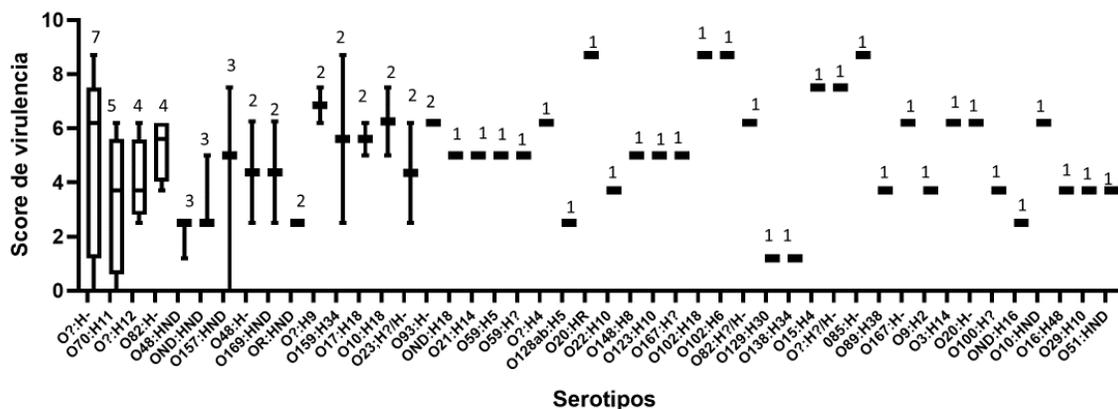


Figura 12. Serotipos con serogrupo no clásicos. Se muestra los serotipos con serogrupo no clásicos con respecto a su promedio de score de virulencia. Sobre cada caja del serotipo está el número de patrones correspondiente. La caja agrupa el 50% de los valores y la línea que la divide es la mediana de las muestras. Las barras marcan los valores máximos y mínimos.

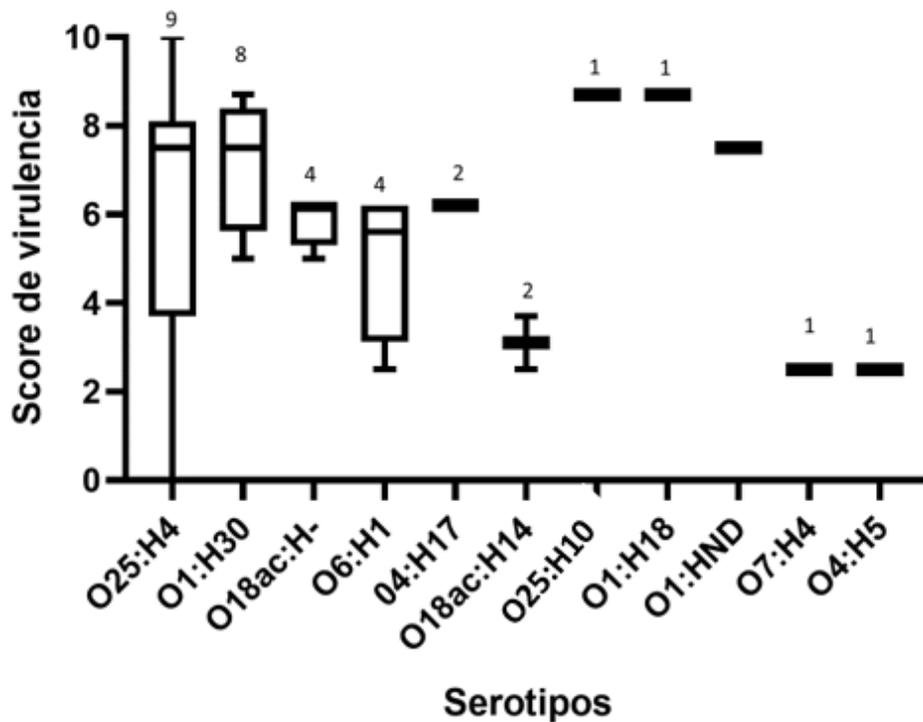


Figura 13. Serotipos con serogrupo clásicos. Se muestra los serotipos con serogrupo clásicos con respecto a su promedio de score de virulencia. Sobre cada caja del serotipo está el número de patrones correspondiente. La caja agrupa el 50% de los valores y la línea que la divide es la mediana de las muestras. Las barras marcan los valores máximos y mínimos.

7.4 Similitud entre los patrones de genes de virulencia en las cepas de *E. coli*

Con la identificación de los diferentes genes en las cepas de *E. coli* se buscaron las combinaciones de estos, por medio de los patrones de presencia y ausencia, excluyendo a las cepas que no estaban serotipificadas y se construyó un dendrograma (**Figura 14**). Se identificaron 9 grupos indicados utilizando las letras que van de la A hasta la I. Cada uno de estos grupos contiene diferentes características y posibles genes que relacionaban las cepas entre sí y se calculó el promedio de score para cada grupo. Para el grupo A, las cepas comparten la presencia del gen *feoB*, *traT* y la ausencia de *malX*. El grupo B, a su vez se divide en subgrupos (B1, B2, B3, B4, B5 y B6), en el subgrupo B1 todas las cepas tienen la presencia de los genes que se encargan de la captación de hierro (*feoB*, *irp2* y

chuA) más la presencia del gen *papC*, gen relacionado con la adherencia. Para B2, parece que todas las cepas que conforman este grupo tienen la ausencia de los genes *fimH* y *sat* y la presencia de los genes *feoB* e *irp2*. Para B3 los patrones tienen la presencia de los genes *fimH*, *feoB*, *chuA*, *traT*. En el subgrupo B4 se comparte la presencia de los genes *papC*, *fimH*, *sat*, *malX* y *traT*. Con respecto al subgrupo B5 comparte la presencia de los genes *fimH* y *feoB*. Por último, en el subgrupo B6 comparten la presencia de *fimH*, *feoB* e *irp2*, parecido al grupo C que comparten la presencia de los genes *fimH*, *feoB*, pero este grupo mantiene una ausencia de los genes *irp2* y *malX*.

Los grupos E y H, junto con los subgrupos F2 y F3, agruparon dos perfiles cada uno con las siguientes características: presencia de *irp2* y *traT* y la ausencia de los genes *fimH*, *feoB*, *sat* y *malX*, mientras que para H solo estuvo presente el gen *chuA* y la ausencia de todos los genes a excepción de *irp2* que se estuvo en una cepa de los dos patrones que estaban en el grupo H. Para los subgrupos sus características fueron: la presencia de los genes *fimH* e *irp2* para F2 y para F3 la presencia de *fimH*. Finalmente, los grupos D, G e I más el subgrupo F1 fueron compuestos por un único patrón; con la presencia de los genes *feoB*, *irp2* y *sat* para el grupo D, el grupo G solo mantuvo la presencia de *feoB*, para I todos los genes permanecieron ausentes y finalmente en F1 estuvieron presentes los genes *fimH* y *traT*. Al calcular los promedios de score de virulencia, se encontró que el score más alto fue del grupo B4 con un 8.72. No obstante se observó un score alto en los grupos y subgrupos B1, B2, B3, B4 y B6, ya que sus cepas tenían un score ≥ 6 ; mientras que los grupos A, B5, C, D, E, F1, F2, F3, G, H e I obtuvieron un score bajo, es decir <5 o la menor presencia de genes (≤ 4 genes).

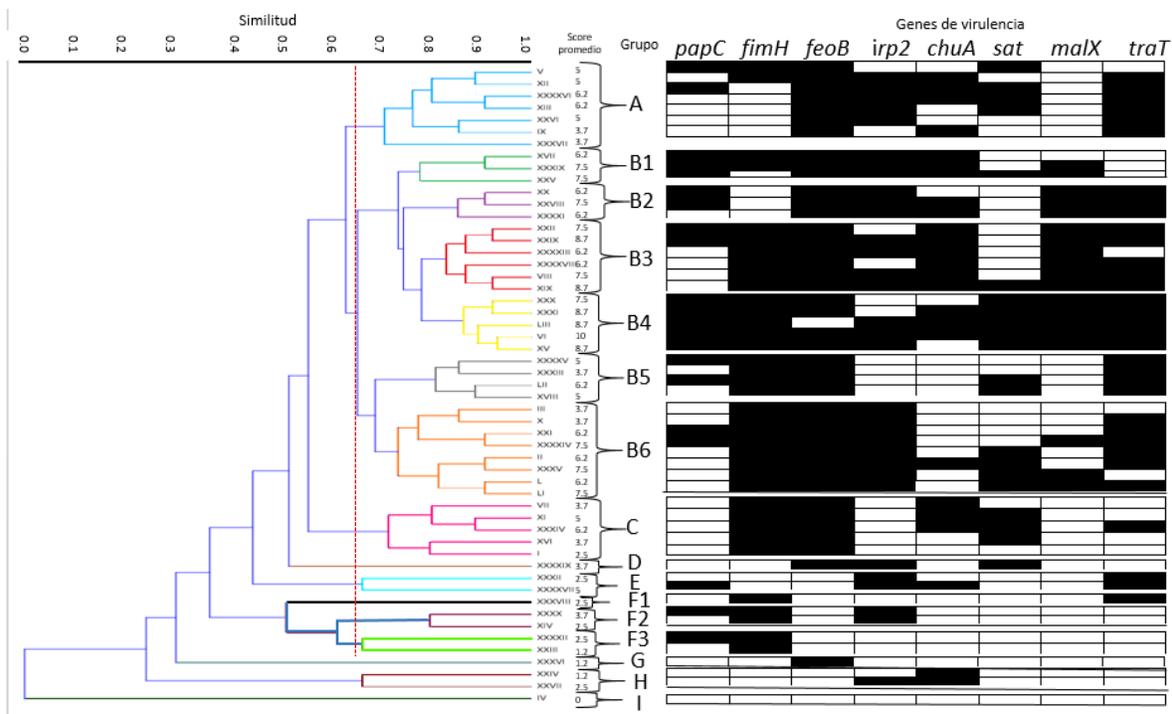


Figura 14. Dendrograma de los perfiles genéticos de las cepas. En la figura se muestra un dendrograma construido por los patrones de presencia y ausencia de los genes, ubicando 9 grupos I (color azul), IIa (color verde), IIb (color morado), IIc (color rojo), IId (color amarillo), IIe (color gris), IIf (color naranja), III (color naranja) IIII (color café), V (color azul fosforescente), VIa (color negro), VIb (color morado fuerte), VIc (color verde fosforescente), VII (color azul claro), VIII (color vino), XIX (color verde pino).

8. Discusión

Las cepas de *E. coli* son parte de la biota normal intestinal de los mamíferos donde se pueden encontrar cepas comensales (filogrupo A y B1) y cepas patógenas (filogrupo B2 y D) (Clermont *et al*, 2000). Por eso las heces son una fuente inmediata de contaminación y podrían tener potencial para provocar procesos infecciosos (Moreno *et al*. 2006) como las IVUs, infecciones asociadas principalmente a *E. coli*, principal especie aeróbica de la microbiota intestinal (Flores-Mireles *et al.*, 2015) y que es una de las principales causas de morbilidad a nivel internacional (WHO, 2014).

Los resultados obtenidos en esta tesis muestran que el grupo de cepas de *E. coli* definidas como comensales (filogrupos A y B1) fue más frecuente con un 65%

(118/181). Esto es similar a lo publicado por diversos autores que también trabajaron con cepas de *E. coli* aisladas de heces de pacientes con IVU; Moreno *et al.* (2008), Navidina *et al.* (2014) y Lee *et al.* (2010) reportaron una prevalencia de filogrupos comensales de *E. coli* en un 73% (9/67), 58% (58/100) y 56% (115/205), respectivamente. En contraste Nowrouzian *et al.* (2005), Nowrouzian *et al.* (2019) y Zhang *et al.* (2002) reportaron prevalencias menores de 40% (59/149), 37% (57/155) y 33% (29/88) para este grupo, respectivamente. Se presume que la prevalencia de los grupos comensales en las heces es debido a la naturaleza de las muestras, puesto que forman parte de la biota intestinal (Conway *et al.*, 2004). Además, estas cepas se consideran transitorias, es decir que su capacidad de persistencia en el intestino humano es deficiente y esto puede deberse a la menor cantidad de factores de virulencia que poseen (Norouzian *et al.*, 2005). Por otra parte, en los estudios donde el grupo de cepas comensales es menor, esto podría deberse a factores regionales (ej. hábitos alimenticios), diferencias en las características de la población estudiada (edad, género, estado de salud), diferencias en los métodos de muestreo (toma por hisopo anal, colecta de copro) (Norouzian *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2002).

En este estudio, de los filogrupos patógenos, B2 fue el más frecuente (27%), similar a lo reportado con Lee *et al.* (2010) que ubicó al 23% (47/205) de sus cepas en el filogrupo B2. A diferencia de diversos autores que reportaron una mayor frecuencia de cepas del grupo D; Navidina *et al.*, (2014) y Moreno *et al.* (2008), con un 26% (26/100) y 16% (11/67), respectivamente. Estos resultados indican que las cepas de la biota intestinal podría ser una fuente o reservorio para provocar una IVU (Navidina *et al.*, 2014), específicamente las cepas del grupo D serían las principales responsables de las IVUs agudas y de las reinfecciones de estas; mientras que el filogrupo B2 está involucrado en la persistencia de las infecciones urinarias (IVUs recurrentes) (Luo *et al.*, 2012).

Las cepas comensales pueden adquirir genes de virulencia en el tracto gastrointestinal por transferencia horizontal y así ser capaces de colonizar el tracto urinario (Moreno *et al.*, 2006; López-Banda *et al.*, 2014); es por ello por lo que en

este trabajo se buscaron genes asociados a diferentes factores de virulencia, como las adhesinas indispensables para el primer paso en la infección bacteriana (Bien *et al.*, 2012). En este estudio los genes relacionados con la adherencia se identificó con los genes *papC* y *fimH*, el factor estuvo presente en un 79% (143/181), en contraste con Abdi *et al.* (2014), Johnson & Stell (2000) y Moreno *et al.*, (2008) que encontraron este factor con la presencia del gen *fimH* en el 100% (77/77), 97% (64/67) y 96% (65/65) respectivamente. El alto porcentaje de esta adhesina en diferentes estudios, se considera como un factor de virulencia común en *E. coli* tanto intestinal como extraintestinal; FimH permite a *E. coli* adherirse al epitelio intestinal y urinario ya que las células de ambos contienen los receptores de manosa (Bien *et al.* 2012; Hagan *et al.*, 2010). La presencia de las adhesinas podría estar relacionadas al aumento de la virulencia de *E. coli* (Ibarra, 2015) y algunas están adaptadas para colonizar un nicho específico como la adhesina *papC*, esta se detecta frecuentemente en los aislamientos de pacientes con IVU (Sarakowa *et al.*, 2019) Que contraste en tus cepas con relación al gen *papC*.

En este trabajo solo se buscó la presencia de una de las 3 toxinas (HlyA, CNF1 y Sat) reportadas en cepas UPEC, la toxina autotransportadora Sat, el gen de esta se identificó en el 31% (57/181) de las cepas, similar a lo reportado por Sainz *et al.*, (2008) con un 38% (30/80). Este factor inicia con los síntomas de una IVU, pueden causar inflamación, tiene actividad proteasa en el citoesqueleto de las células de la vejiga y tiene una actividad tóxica contra líneas celulares de vejiga o riñón (Guyer *et al.*, 2002). En este estudio la prevalencia de la toxina se podría considerar como baja y fue similar a otros estudios lo que sugiere que *sat* no juega un papel especial en el desarrollo de las IVU, pero posiblemente sí en su sintomatología (Ruiz *et al.*, 2002).

Para la supervivencia de *E. coli* dentro de las células epiteliales de la vejiga es necesaria la utilización de hierro, cofactor enzimático importante en la síntesis de DNA y transporte de electrones (Terlizzi *et al.*, 2017). Nosotros identificamos la presencia de *feoB*, *irp2* y *chuA* sideróforos necesarios para la colonización del tracto urinario en un entorno limitado de hierro libre. Estos factores estuvieron presente en

el 92% (167/181) de las cepas, en contraste con Vollmerhausen *et al.*, (2010) y Jhonson & Stell (2000) que identificaron este factor, pero ellos utilizaron los genes *iroN* e *iutA* con el 78% (52/67) y 68% (43/63) respectivamente. La diferencia entre los resultados obtenidos podría deberse a la “n” y al número de genes que se consideran como el factor. UPEC producen sideróforos que no son sintetizados por la mayoría de las cepas de *E. coli* fecales no patógenas (Hagan *et al.*, 2010).

La resistencia sérica (*traT*) se presentó en el 50% (92/181) de las cepas, similar a lo identificado por Jhonson & Stell, Moreno *et al.*, (2009) y Lee *et al.*, (2010) que encontraron 78% (52/67), 68% (27/40) y 57% (117/205) respectivamente. Este factor le permite a *E. coli* extraintestinal ingresar en los sitios de infección primaria y le confiere resistencia.

Por último, en las PAI nosotros identificamos al gen *malX* en el 21% (43/181) de las cepas, similar a Moreno *et al.*, (2008) que encontró este gen en el 19% de sus cepas (13/67), en contraste con Bagger-Skjot *et al.*, (2007) y Moreno *et al.*, (2009) que identificaron esta PAI en el 59% (73/223) y 40% (16/40) de sus cepas. La diferencia puede deberse a la mayor frecuencia de cepas comensales de este estudio ya que *malX*, está asociada a genes que codifican para un sistema de enzimas fosfotransferasas que reconocen maltosa y glucosa y que son más frecuentes en cepas patógenas (Merino, 2018).

Como se ha mencionado anteriormente las cepas provenientes de heces están relacionadas con una IVU recurrente, lo cual podría explicar la presencia de serogrupos clásicos de UPEC en estas cepas. Nosotros encontramos que el 35% (49/ 142) de cepas aisladas de heces presentaron serogrupo clásico, resultado similar a Sainz *et al.*, (2008) que identificó el 45% (36/80). Sin embargo, varios estudios no encontraron estos serogrupos en las cepas provenientes de heces; Kozub *et al.* (2008) y Osman *et al.* (2012) buscaron estos serogrupos en heces de pacientes con alteraciones gastrointestinales y reportaron la ausencia de estos. En el presente estudio el serotipo más frecuente, con un 6% (9/142) en estas cepas, fue O25:H4, perteneciente a los serogrupos clásicos de UPEC y asociado a IVU (Molina-López *et al.*, 2011). A pesar de que los serogrupos clásicos estuvieron

menos presentes en nuestro estudio que los no clásicos, se podría considerar un valor alto ya que son cepas provenientes de heces. Estas cepas posiblemente estén asociadas a UPEC y eventualmente podrían causar IVU recurrentes en los pacientes.

Los factores de virulencia de UPEC están asociados con la colonización y supervivencia en el tracto urinario, al analizar las diversas combinaciones de genes de virulencia encontramos los factores más frecuentes. Estos fueron los genes *feoB* y *fimH* con un 13.38% (19/142), esta combinación pertenece a una adhesina y a un captador de hierro, diversos estudios encuentran estos dos genes como prevalentes en sus cepas de UPEC; Zhao *et al*, (2009) y Wook *et al* (2013) identificaron 94% (122/130) y 67.2% (43/64), respectivamente, para el gen *feoB*, mientras que para *fimH* encontraron un 91% (118/130) y 97% (62/64), respectivamente.

Por su parte Ibarra (2015) encontró esta combinación de adhesinas y captadores de hierro en un 23.16% (41/177), genes *fimH* e *iucD*, como la más prevalente; hay que destacar que nuestra tercera combinación más frecuente, estaba conformada por los genes; *feoB*, *irp2* y *fimH* con un 5.63% (8/142) que pertenecen a los mismos factores. Se sabe que las cepas de UPEC utilizan estas proteínas para adherirse al urotelio, permitiendo el desarrollo de la IVU y persisten a pesar del flujo de orina y la activación de vías de señalización del huésped. Para su supervivencia, muchas bacterias incluidas UPEC tienen formas de obtener hierro que se encuentra en concentraciones bajas, a través de sistemas de captación de hierro (Wook *et al*, 2013).

La segunda combinación más frecuente fue la conformada por los genes *fimH*, *feoB*, *irp2*, *sat* y *traT*, similar a lo encontrado por Ibarra (2015) que identificó los genes *fimH*, *satA* e *iucD* con un 14.68% (26/177), presencia de una adhesina, un captador de hierro y una toxina. Al tener esta combinación las bacterias tendrían la capacidad de adherirse al urotelio, causar daño al epitelio renal y adquirir el hierro necesario para mantenerse y en el caso de nuestra combinación estaría aportando una resistencia contra el huésped (Ibarra, 2015).

De acuerdo con los resultados obtenidos, la mayoría de las cepas investigadas estuvieron cargadas con tres factores de virulencia de los cuales era frecuente la presencia de adhesión y captación de hierro, las cuales contribuirían a la recurrencia de la IVU (Millán *et al*, 2014). Por otra parte, 2.82% (4/142) de cepas no mostraron ningún gen de virulencia, pero es probable que otros genes de virulencia, diferentes a los estudiados, pudieran estar presentes en estas cepas.

9 Conclusiones

Las bacterias de *E. coli* aisladas de las heces de pacientes con IVU recurrentes:

- El 77% de las cepas son agrupadas en los filogrupos A y B2.
- Los genes *feoB* y *chuA* fueron los más prevalentes y las cepas con la combinación de *feoB* y *fimH* lo que sugiere la sobrevivencia en el tracto urinario y generar una IVU.
- En las cepas provenientes de heces, se encontraron serogrupos clásicos de UPEC, aunado a esto se notó la presencia sobresaliente del filogrupo B2 y la presencia de distintos FV en todas las cepas. Esto sugiere a las heces como posible fuente de contaminación de las vías urinarias.

10. Referencias

- Abdi, H. A., y A. Rashki. (2016). Comparison of Virulence Factors Distribution in Uropathogenic *E. coli* Isolates from Phylogenetic Groups B2 and D. *Int J Enteric Pathog.* 2:6–21725. doi:10.17795/ijep21725.
- Andreu, A. (2005). Patogenia de las infecciones del tracto urinario. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 23, 15-21.
- Ávalos González, J., López López, M., García Velasco, R., y Ugalde Matehuala, S. M. (2000). Principales factores bacterianos que promueven la colonización e invasión de los tejidos humanos. *Educación Química*, 11(2), 274-283.
- Ávalos González, J., M. López López, R. García Velasco, y S. M. Ugalde Matehuala. (2018). Principales factores bacterianos que promueven la colonización e invasión de los tejidos humanos. *Educación Química*. 11:274–283. doi:http://dx.doi.org/10.22201/fq.18708404e.2000.2.66465.
- Bailey, J. K., Pinyon, J. L., Anantham, S., y Hall, R. M. (2010). Distribution of human commensal *Escherichia coli* phylogenetic groups. *Journal of clinical microbiology*, 48(9), 3455-3456.
- Basu, S., S. K. Mukherjee, A. Hazra, y M. Mukherjee. (2013). Molecular Characterization of Uropathogenic *Escherichia coli*: Nalidixic Acid and Ciprofloxacin Resistance, Virulent Factors and Phylogenetic Background. *J Clin Diagn Res.* 7:2727–2731. doi:10.7860/JCDR/2013/6613.3744.
- Bien J., Sokolova O. y Bozko P. (2012). Role of Uropathogenic *Escherichia coli* Virulence Factors in Development of Urinary Tract Infection and Kidney Damage. *Int. Jour. Nep.* doi:10.1155/2012/681473
- Carranza, C., León, R., Falcón, N., Neumann, A., y Kromm, C. (2012). Caracterización y distribución de cepas de *Escherichia coli* potencialmente patógenas aisladas de pollos broiler de explotaciones avícolas en el Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 23(2), 209-219.
- Chen, S. L., Wu, M., Henderson, J. P., Hooton, T. M., Hibbing, M. E., Hultgren, S. J., y Gordon, J. I. (2013). Genomic diversity and fitness of *E. coli* strains

recovered from the intestinal and urinary tracts of women with recurrent urinary tract infection. *Science translational medicine*, 5(184), 184ra60-184ra60.

- Clermont, O., Bonacorsi, S., y Bingen, E. (2000). Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Applied and environmental microbiology*, 66(10), 4555-4558.
- Clermont, O., O. V. A. Dixit, B. Vangchhia, B. Condamine, S. Dion, A. Bridier-Nahmias, E. Denamur, y D. Gordon. (2019). Characterization and rapid identification of phylogroup G in *Escherichia coli*, a lineage with high virulence and antibiotic resistance potential. *Environ Microbiol.* 21:3107–3117. doi:10.1111/1462-2920.14713.
- Conway, T., K. A. Krogfelt, y P. S. Cohen. (2004). The Life of Commensal *Escherichia coli* in the Mammalian Intestine. *Eco Sal Plus.* 1. doi:10.1128/ecosalplus.8.3.1.2.
- Delgado P. M., (2019) Infecciones Urinarias. *Nefrología al día.* 23-24
- Drago-Serrano, M. E. (2009). Sistemas de adquisición de hierro en *Salmonella enterica*. *Revista Biomédica*, 20(1), 41-54.
- Durán, L. (2018). Resistencia antimicrobiana e implicancias para el manejo de infecciones del tracto urinario. *Rev Med Clin Condes.* 29:213–221. doi:10.1016/j.rmclc.2018.01.002.
- Echevarría-Zarate, J., Sarmiento Aguilar, E., y Osoreo-Plenge, F. (2006). Infección del tracto urinario y manejo antibiótico. *Acta médica peruana*, 23(1), 26-31.
- Estrada, L. I. M., M. R. Rosas, J. M. López, I. P. Rojas, E. G. Villalobos, y N. C. Alarcón. (2017). Relación entre factores de virulencia, resistencia a antibióticos y los grupos filogenéticos de *Escherichia coli* uropatógena en dos localidades de México. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica.* 35:426–433.
- Faleiro-Naves, P.L. (2010). *Escherichia coli* y su correlación con factores de virulencia: prevención y actividad de antimicrobianos frente a organismos planctónicos y asociados a biopelículas. Tesis que para obtener el Grado de Doctor. Universidad Complutense de Madrid. 1-163

- Flores-Mireles, A. L., J. N. Walker, M. Caparon, y S. J. Hultgren. (2015). Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nat Rev Microbiol.* 13:269–284. doi:10.1038/nrmicro3432.
- Flores-Mireles, A. L., Walker, J. N., Caparon, M., y Hultgren, S. J. (2015). Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nature reviews microbiology*, 13(5), 269-284.
- González Mora, Román David. (2020). Hemolisina: características, tipos, mecanismos de acción. Lifeder. Recuperado de <https://www.lifeder.com/hemolisina/>.
- González, M. J., (2013), Caracterización fenotípica de cepas de *Escherichia coli* uropatogena (UPEC) en pacientes pediátricos y sus perfiles de resistencia a aminoglucósidos, quínoles y betalactámicos. Tesina para optar por el grado de licenciado en ciencias biológicas. 1-28
- Guerrero, R. I., (2016), Genes de virulencia e identidad filogenética de *Escherichia coli* aislada de heces de pacientes con infección crónica de vías urinarias (ICVU), Instituto Politécnico Nacional, Para obtener título de Químico bacteriólogo parasitólogo.
- Guyer M., Henderson I., Nataro J. y Mobley H. (2000). Identification of Sat, an autotransporter toxin produced by uropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 38: 53-66.
- Hagan, E. C., A. L. Lloyd, D. A. Rasko, G. J. Faerber, y H. L. T. Mobley. (2010). *Escherichia coli* global gene expression in urine from women with urinary tract infection. *PLoS Pathog.* 6:e1001187. doi:10.1371/journal.ppat.1001187.
- Hull R., Gill R., Hsu P., Minshew B. y Falkow S. (1981). Construction and expression of recombinant plasmids encoding type 1 or Dmannose- resistant pili from a urinary tract infection *Escherichia coli* isolate. *Infect. Immun.* 33(3):933-938.
- Ibarra Valencia, M. A. (2015). Análisis de determinantes de patogenicidad de cepas de *Escherichia coli* aisladas de infecciones de tracto urinario, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Para obtener grado de Licenciado de biomedicina. 1-103

- Infecciones Urinarias | Nefrología al día. Disponible en: <http://www.nefrologiaaldia.org/es-articulo-infecciones-urinarias-255>
- Johnson, J. R., y A. L. Stell. (2000). Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *J Infect Dis.* 181:261–272. doi:10.1086/315217.
- Karimian, A., Momtaz, H., y Madani, M. (2012). Detection of uropathogenic *Escherichia coli* virulence factors in patients with urinary tract infections in Iran. *African Journal of Microbiology Research*, 6(39), 6811-6816.
- Kausar, Y., Chunchanur, S. K., Nadagir, S. D., Halesh, L. H., y Chandrasekhar, M. R. (2009). Virulence factors, serotypes and antimicrobial susceptibility pattern of *Escherichia coli* in urinary tract infections. *Al Ameen J Med Sci*, 2(1), 47-51.
- Kausar, Y., S. K. Chunchanur, S. D. Nadagir, L. H. Halesh, y M. R. Chandrasekhar. (2009). Virulence factors, serotypes and antimicrobial susceptibility pattern of *Escherichia coli* in urinary tract infections. *Al Ameen Journal of Medical Sciences*. 2:47–51.
- Koneman, E. W., y Allen, S. (2008). Koneman. *Diagnostico Microbiologico/Microbiological diagnosis: Texto Y Atlas En Color/Text and Color Atlas*. Ed. médica panamericana.
- Kozub-Witkowski, E., G. Krause, G. Frankel, D. Kramer, B. Appel, y L. Beutin. (2008). Serotypes and virutypes of enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* strains from stool samples of children with diarrhoea in Germany. *J Appl Microbiol.* 104:403–410. doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03545.x.
- Lane, M. C., C. J. Alteri, S. N. Smith, y H. L. T. Mobley. (2007). Expression of flagella is coincident with uropathogenic *Escherichia coli* ascension to the upper urinary tract. *PNAS*. 104:16669–16674. doi:10.1073/pnas.0607898104.
- Lee, S., J. K. Yu, K. Park, E.-J. Oh, S.-Y. Kim, y Y.-J. Park. (2010). Phylogenetic groups and virulence factors in pathogenic and commensal strains of *Escherichia coli* and their association with blaCTX-M. *Ann Clin Lab Sci*. 40:361–367.

- López-Banda, D. A., E. M. Carrillo-Casas, M. Leyva-Leyva, G. Orozco-Hoyuela, Á. H. Manjarrez-Hernández, S. Arroyo-Escalante, D. Moncada-Barrón, S. Villanueva-Recillas, J. Xicohtencatl-Cortes, y R. Hernández-Castro. (2014). Identification of virulence factors genes in *Escherichia coli* isolates from women with urinary tract infection in Mexico. *Biomed Res Int*. 2014:959206. doi:10.1155/2014/959206.
- López-Banda, D.A., Carrillo-Casas, E.M., Leyva-Leyva, M., Orozco-Hoyuela, G., Manjarrez-Hernández, A.H., Arroyo-Escalante, S., Moncada-Barrón, D., Villanueva-Rencillas, S., Xicohtencatl-Cortes, J., y Hernández-Castro, R. (2014). Identification of virulence factors genes in *Escherichia coli* isolates from women with urinary trtact infection in Mexico. *BioMed Research International*. 1-10.
- Loughman, J. A., y D. A. Hunstad. (2011). Attenuation of human neutrophil migration and function by uropathogenic bacteria. *Microbes Infect*. 13:555–565. doi:10.1016/j.micinf.2011.01.017.
- Luna-Pineda, V. M., Ochoa, S., Cruz-Córdova, A., Cázares-Domínguez, V., Vélez-González, F., Hernández-Castro, R., y Xicohtencatl-Cortes, J. (2018). Infecciones del tracto urinario, inmunidad y vacunación. *Boletín médico del Hospital Infantil de México*, 75(2), 67-78.
- Luo, Y., Y. Ma, Q. Zhao, L. Wang, L. Guo, L. Ye, Y. Zhang, y J. Yang. (2012). Similarity and divergence of phylogenies, antimicrobial susceptibilities, and virulence factor profiles of *Escherichia coli* isolates causing recurrent urinary tract infections that persist or result from reinfection. *J Clin Microbiol*. 50:4002–4007. doi:10.1128/JCM.02086-12.
- Magruder, M., Sholi, A. N., Gong, C., Zhang, L., Edusei, E., Huang, J., y Lee, J. R. (2019). Gut uropathogen abundance is a risk factor for development of bacteriuria and urinary tract infection. *Nature communications*, 10(1), 1-9.
- Martínez, M.G. (2016). *Suplemento Infecciones en las vías urinarias*, Nieto editores, 1(1), 4-12
- Martinez-Medina, M., A. Mora, M. Blanco, C. López, M. P. Alonso, S. Bonacorsi, M.-H. Nicolas-Chanoine, A. Darfeuille-Michaud, J. Garcia-Gil, y J. Blanco.

- (2009). Similarity and divergence among adherent-invasive *Escherichia coli* and extraintestinal pathogenic *E. coli* strains. *J Clin Microbiol.* 47:3968–3979. doi:10.1128/JCM.01484-09.
- Merino Velasco, I. (2018). Resistencia, virulencia y estructura poblacional de " *Escherichia coli*" uropatógeno. Universidad complutense de madrid
 - Microbiología médica - 9th Edition. Recuperado de: <https://www.elsevier.com/books/microbiologia-medica/murray/978-84-9113-808-2>
 - Millán, Y., E. Hernández, B. Millán, y M. Araque. (2014). Distribución de grupos filogenéticos y factores de virulencia en cepas de *Escherichia coli* uropatógena productora de β -lactamasa CTX-M-15 aisladas de pacientes de la comunidad en Mérida, Venezuela. *Revista Argentina de Microbiología.* 46:175–181. doi:10.1016/S0325-7541(14)70069-0.
 - Molina-López, J., G. Aparicio-Ozores, R. M. Ribas-Aparicio, S. Gavilanes-Parra, M. E. Chávez-Berrocal, R. Hernández-Castro, y H. Á. Manjarrez-Hernández. (2011). Drug resistance, serotypes, and phylogenetic groups among uropathogenic *Escherichia coli* including O25-ST131 in Mexico City. *The Journal of Infection in Developing Countries.* 5:840–849. doi:10.3855/jidc.1703.
 - Montenegro, M. A., Bitter-Suermann, D., Timmis, J. K., Agüero, M. E., Cabello, F. C., Sanyal, S. C., y Timmis, K. N. (1985). traT gene sequences, serum resistance and pathogenicity-related factors in clinical isolates of *Escherichia coli* and other gram-negative bacteria. *Microbiology,* 131(6), 1511-1521.
 - Montenegro, M. A., D. Bitter-Suermann, J. K. Timmis, M. E. Agüero, F. C. Cabello, S. C. Sanyal, y K. N. Timmis. (1985). traT gene sequences, serum resistance and pathogenicity-related factors in clinical isolates of *Escherichia coli* and other gram-negative bacteria. *J Gen Microbiol.* 131:1511–1521. doi:10.1099/00221287-131-6-1511.
 - Montgomerie J. Z., Bindereif A., Neilands J. B., Kalmanson G. M., y Guze L. B. (1984). Association of hydroxamate siderophore (aerobactin) with *Escherichia coli* isolated from patients with bacteremia. *Infect. Immun.* 46:835-838

- Moreno, E., Andreu, A., Pigrau, C., Kuskowski, M. A., Johnson, J. R., y Prats, G. (2008). Relationship between *Escherichia coli* strains causing acute cystitis in women and the fecal *E. coli* population of the host. *Journal of clinical microbiology*, 46(8), 2529-2534.
- Moreno, E., J. R. Johnson, T. Pérez, G. Prats, M. A. Kuskowski, y A. Andreu. (2009). Structure and urovirulence characteristics of the fecal *Escherichia coli* population among healthy women. *Microbes Infect.* 11:274–280. doi:10.1016/j.micinf.2008.12.002.
- Mulvey, M. A. (2002). Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol.* 4:257–271. doi:10.1046/j.1462-5822.2002.00193.x.
- Murray P., Rosenthal K., y Pfaller M. *Microbiología Médica*. 7a edición. Elsevier. ISBN:9788490224113
- Nagy, G., Dobrindt, U., Kupfer, M., Emödy, L., Karch, H., y Hacker, J. (2001). Expression of Hemin Receptor Molecule ChuA Is Influenced by RfaH in Uropathogenic *Escherichia coli* Strain 536. *Infection and immunity*, 69(3), 1924-1928.
- Navidinia, M., S. N. Peerayeh, F. Fallah, B. Bakhshi, y R. S. Sajadinia. (2014). Phylogenetic grouping and pathotypic comparison of urine and fecal *Escherichia coli* isolates from children with urinary tract infection. *Braz J Microbiol.* 45:509–514. doi:10.1590/s1517-83822014000200019.
- Norouzian, H., M. Katouli, N. Shahrokhi, S. Sabeti, M. Pooya, y S. Bouzari. (2019). The relationship between phylogenetic groups and antibiotic susceptibility patterns of *Escherichia coli* strains isolated from feces and urine of patients with acute or recurrent urinary tract infection. *Iran J Microbiol.* 11:478–487.
- Nowrouzian, F. L., A. E. Wold, and I. Adlerberth. (2005). *Escherichia coli* strains belonging to phylogenetic group B2 have superior capacity to persist in the intestinal microflora of infants. *J Infect Dis.* 191:1078–1083. doi:10.1086/427996.
- Nowrouzian, F. L., Wold, A. E., y Adlerberth, I. (2005). *Escherichia coli* strains belonging to phylogenetic group B2 have superior capacity to persist in the

- intestinal microflora of infants. *The Journal of infectious diseases*, 191(7), 1078-1083.
- Oelschlaeger TA1, Dobrindt U, Hacker J. (2002). Pathogenicity islands of uropathogenic *E. coli* and the evolution of virulence. *Int J Antimicrob Agents*. 19(6):517-21.
 - Oelschlaeger, T. A., U. Dobrindt, y J. Hacker. (2002). Pathogenicity islands of uropathogenic *E. coli* and the evolution of virulence. *Int J Antimicrob Agents*. 19:517–521. doi:10.1016/s0924-8579(02)00092-4.
 - Orrego-Marin, C. P., C. P. Henao-Mejia, y J. A. Cardona-Arias. (2014). Prevalencia de infección urinaria, uropatógenos y perfil de susceptibilidad antimicrobiana. *Acta Medica Colombiana*. 39:352–358.
 - Orrego-Marin, C. P., Henao-Mejia, C. P., y Cardona-Arias, J. A. (2014). Prevalencia de infección urinaria, uropatógenos y perfil de susceptibilidad antimicrobiana. *Acta Médica Colombiana*, 39(4), 352-358.
 - Osman, K. M., A. M. Mustafa, M. Elhariri, y G. S. Abdelhamed. 2012. Identification of serotypes and virulence markers of *Escherichia coli* isolated from human stool and urine samples in Egypt. *Indian J Med Microbiol*. 30:308–313. doi:10.4103/0255-0857.99492.
 - Paalanne, N., Husso, A., Salo, J., Pieviläinen, O., Tejesvi, M. V., Koivusaari, P., y Tapiainen, T. (2018). Intestinal microbiome as a risk factor for urinary tract infections in children. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 37(10), 1881-1891.
 - Parham N., Pollard S., Desvaux M., Scott A., Liu C., Fivian A. y Henderson I. (2005). Distribution of the serine protease autotransporters of the Enterobacteriaceae among extraintestinal clinical Isolates of *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol*. 43(8): 4076-4082
 - Pitcher, D. G., Saunders, N. A., y Owen, R. J. (1989). Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Letters in applied microbiology*, 8(4), 151-156.
 - Ponce de León, S. (2018). Programa Universitario de Investigación en Salud. Estado Actual de la Resistencia Antimicrobiana en México Reporte de los

Hospitales de la Red del PUCRA: Resistencia antimicrobiana y Consumo de antibióticos. Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México.

- Robledo M.G., (2017), Determinación de los principales factores de virulencia y resistencia de *Escherichia coli* uropatógena en la población del estado de aguascalientes y su asociación con la contaminación biológica del río san pedro. Para obtener el título de maestra en ciencias, Universidad Autónoma de Aguascalientes. 1-128
- Rodríguez-Angeles, G. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. Salud Pública de México. 44:464–475.
- Rodriguez-Siek, K. E., Giddings, C. W., Doetkott, C., Johnson, T. J., Fakhr, M. K., y Nolan, L. K. (2005). Comparison of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis. Microbiology, 151(6), 2097-2110.
- Ron, E. Z. (2006). Host specificity of septicemic *Escherichia coli*: human and avian pathogens. Current opinion in microbiology, 9(1), 28-32.
- Ruiz, J., K. Simon, J. P. Horcajada, M. Velasco, M. Barranco, G. Roig, A. Moreno-Martínez, J. A. Martínez, T. Jiménez de Anta, J. Mensa, y J. Vila. (2002). Differences in Virulence Factors among Clinical Isolates of *Escherichia coli* Causing Cystitis and Pyelonephritis in Women and Prostatitis in Men. J Clin Microbiol. 40:4445–4449. doi:10.1128/JCM.40.12.4445-4449.2002.
- Sarowska, J., B. Futoma-Koloch, A. Jama-Kmiecik, M. Frej-Madrzak, M. Ksiazczyk, G. Bugla-Ploskonska, y I. Choroszy-Krol. (2019). Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from different sources: recent reports. Gut Pathog. 11:10. doi:10.1186/s13099-019-0290-0.
- Sarowska, J., Futoma-Koloch, B., Jama-Kmiecik, A., Frej-Madrzak, M., Ksiazczyk, M., Bugla-Ploskonska, G., y Choroszy-Krol, I. (2019). Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from different sources: recent reports. Gut pathogens, 11(1), 1-16

- Secretaria de salud. (2009) Panorama epidemiológico de las infecciones de vías urinarias en México 2003-2008. *Epidemiología*, 26(51), 1-28
- Siever Morales, C., C. Eileen Siu, R. Pablo Ramírez, y O. Armando Navarro. (2017). Determinación de Serotipos de *Escherichia coli* aisladas de crías de alpacas (*Vicugna pacos*) con y sin diarrea en Huancavelica. *Revista Electronica de Veterinaria*. 18. recuperado de: <http://www.scopus.com/inward/record.url?scp=85040348756&partnerID=8YFLogxK>
- Snyder J., Haugen B., Lockett C., Maroncle N., Hagan E., Johnson D., Welch R. y Mobley H. (2005). Coordinate Expression of Fimbriae in Uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 73(11): 7588-7596.
- Snyder, J. A., B. J. Haugen, C. V. Lockett, N. Maroncle, E. C. Hagan, D. E. Johnson, R. A. Welch, y H. L. T. Mobley. (2005). Coordinate Expression of Fimbriae in Uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 73:7588–7596. doi:10.1128/IAI.73.11.7588-7596.2005.
- Sosa-Hernández, O., C. Vázquez-Zamora, V. H. Gutiérrez-Muñoz, G. E. Lugo-Zamudio, y M. A. Cureño-Díaz. (2020). Resultados del Programa de Uso Racional de Antimicrobianos en un hospital de México, 2013-2018. *Rev Panam Salud Publica*. 44:e45. doi:10.26633/RPSP.2020.45.
- Stecher, B., y Hardt, W. D. (2008). The role of microbiota in infectious disease. *Trends in Microbiology*, 16(3), 107-114.
- Tarr P., Bilge S., Vary J. Jr, Jelacic S., Habeeb R., Ward T., Baylor M. y Besser T. (2000) Iha: a novel *Escherichia coli* O157:H7 adherence-conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure. *Infect. Immun*; 68(3): 1400–1407
- Tarr, P. I., S. S. Bilge, J. C. Vary, S. Jelacic, R. L. Habeeb, T. R. Ward, M. R. Baylor, y T. E. Besser. (2000). Iha: a novel *Escherichia coli* O157:H7 adherence-conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure. *Infect Immun*. 68:1400–1407. doi:10.1128/IAI.68.3.1400-1407.2000.

- Terlizzi, M. E., G. Gribaudo, y M. E. Maffei. (2017). UroPathogenic *Escherichia coli* (UPEC) Infections: Virulence Factors, Bladder Responses, Antibiotic, and Non-antibiotic Antimicrobial Strategies. *Front Microbiol.* 8:1566. doi:10.3389/fmicb.2017.01566.
- Tiba M., Yano T. y Leite D. (2008). Genotypic characterization of virulence factors in *Escherichia coli* strains from patients with cystitis. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* 50(5):255-260.
- Tiba, M. R., T. Yano, y D. da S. Leite. (2008). Genotypic characterization of virulence factors in *Escherichia coli* strains from patients with cystitis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 50:255–260. doi:10.1590/s0036-46652008000500001.
- Ulett G., Totsika M., Schaale K., Carey A., Sweet M. y Schembri M. (2013). Uropathogenic *Escherichia coli* virulence and innate immune responses during urinary tract infection. *Curr Opin Microbiol.* 16: 100-107
- Ulett, G. C., M. Totsika, K. Schaale, A. J. Carey, M. J. Sweet, y M. A. Schembri. (2013). Uropathogenic *Escherichia coli* virulence and innate immune responses during urinary tract infection. *Curr Opin Microbiol.* 16:100–107. doi:10.1016/j.mib.2013.01.005.
- Velasco, I. M. (2017). Resistencia, virulencia y estructura poblacional de *Escherichia coli* uropatógeno [<http://purl.org/dc/dcmitype/Text>]. Universidad Complutense de Madrid. Available from: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=149138>
- Villarraga, J. D. A., Parra, J. D. I., Diaz, D. A., Cardenas, A. M., Chavarriaga, J., y Godoy, M. P. (2018). Guía de práctica clínica de infección de vías urinarias en el adulto. *Revista Urología Colombiana/Colombian Urology Journal*, 27(02), 126-131.
- Vollmerhausen, T. L., N. L. Ramos, A. Gündoğdu, W. Robinson, A. Brauner, y M. Katouli. (2011). Population structure and uropathogenic virulence-associated genes of faecal *Escherichia coli* from healthy young and elderly adults. *J Med Microbiol.* 60:574–581. doi:10.1099/jmm.0.027037-0.
- Yun, K. W., H. Y. Kim, H. K. Park, W. Kim, y I. S. Lim. (2014). Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* of urinary tract infections and asymptomatic

bacteriuria in children. J Microbiol Immunol Infect. 47:455–461.
doi:10.1016/j.jmii.2013.07.010.

- Zhang, L., B. Foxman, y C. Marrs. (2002). Both urinary and rectal *Escherichia coli* isolates are dominated by strains of phylogenetic group B2. J Clin Microbiol. 40:3951–3955. doi:10.1128/JCM.40.11.3951-3955.2002.