



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Caracterización fenotípica y molecular de cepas clínicas de *Escherichia coli* uropatogénica productoras de β -lactamasas de espectro extendido.

TESIS

PRESENTA

Viviana Quiroz Luna

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

Tutor:

Dr. Juan Xicohtencatl Cortes



Ciudad Universitaria, CD. MX.

2022



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:

PRESIDENTE: **Profesor:** GARZA VELASCO RAÚL

VOCAL: **Profesor:** CRUCES MARTÍNEZ ANA LILIA

SECRETARIO: **Profesor:** XICOHTENCATL CORTES JUAN

1er. SUPLENTE: **Profesor:** CAMACHO CRUZ ALEJANDRO

2° SUPLENTE: **Profesor:** PLASENCIA DE LA PARRA FRANCISCO JAVIER

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO
FEDERICO GÓMEZ**

ASESOR DEL TEMA: DR. JUAN XICOHTENCATL CORTES

Dr. Juan Xicohtencatl Cortes



SUPERVISOR TÉCNICO (Si lo hay): DRA. SARA ARIADNA OCHOA PEREZ

Dra. Sara Ariadna Ochoa Perez



SUSTENTANTE: VIVIANA QUIROZ LUNA

Viviana Quiroz Luna



Agradecimientos

Agradezco a todos mis seres queridos que estuvieron conmigo en todo momento apoyándome, en especial mi más profundo agradecimiento a mi familia.

Es para mí una gran satisfacción poder dedicar mi tesis a mi familia, mis padres Gonzalo Quiroz Santillán y Alejandra Luna Torres, mis hermanos David Quiroz Luna y Nancy Quiroz Luna, que son un pilar en mi vida y no lo habría logrado sin ustedes, les agradezco infinitamente por su amor, por creer en mí y confiar en que lo lograría, pero sobre todo gracias por su esfuerzo y muchas veces sacrificios que han hecho cada uno de ustedes para hacer posible este sueño.

Le agradezco a mis tutores el Dr. Juan y la Dra. Sarita, la oportunidad de trabajar con ustedes en esta investigación; Dra. Sarita gracias por su paciencia, tiempo, guía, dedicación y enseñanzas que me han ayudado a crecer como persona y profesionalmente. Al profesor Raúl Garza y la profesora Ana Lilia Cruces por su atención en la revisión de esta tesis.

A todo el equipo del Laboratorio de Investigación en Bacteriología Intestinal en el HIMFG por sus aportes en esta investigación. Asimismo, al Hospital Infantil de México Federico Gómez por permitirme realizar este proyecto, espero que los resultados de esta tesis puedan ser de utilidad en la generación de nuevos conocimientos que ayuden en el tratamiento de los niños.

A mis mejores amigos Maggie, Diana, Luis, Miriam, Laura y Alejandro, por acompañarme en este proceso, brindarme su cariño y apoyo.

Finalmente, toda mi gratitud a la Universidad Autónoma de México (UNAM) y la Facultad de Química por la oportunidad de estudiar, por todo el aprendizaje adquirido en sus aulas, y a todos mis profesores de la carrera, cada uno influyo en mí de diferentes maneras para mi formación profesional.

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Investigación en Bacteriología Intestinal del Hospital Infantil de México “Federico Gómez; bajo la dirección de.

Dr. Juan Xicohtencatl Cortes y Dra. Sara Ariadna Ochoa Perez

Formó parte de:

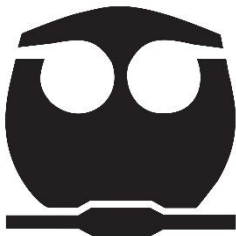
Proyecto de investigación aceptado para su financiamiento por Fondos Federales de la Secretaria de Salud

“Antigenicidad de las proteínas de fusión FimH+CsgA+PapG, CsgA+PapG+FimH, PapG+FimH+CsgA de *Escherichia coli* uropatogénica.”

HIM/2019/038 SSA. 1592

“Análisis del resistoma de cepas de UPEC O25b: una alternativa para entender la multidrogorresistencia en cepas hospitalarias del HIMFG.”

Clave HIM/2021/030FF SSA. 1730.



Índice General

Lista de abreviaturas	i
Índice de figuras	iii
Índice de tablas	v
I. Introducción	1
II. Objetivo general	3
Objetivos particulares	3
III. Resumen	4
IV. Antecedentes	6
1. Infecciones del tracto urinario	6
2. <i>Escherichia coli</i> uropatogénica	7
3. Grupos filogenéticos	9
4. Genética bacteriana	10
4.1 Integrones	11
4.2 Secuencias de inserción (SI)	11
5. Resistencia bacteriana	12
6. Antibióticos β -lactámicos	12
6.1 Mecanismo de acción de los antibióticos β -lactámicos	13
6.2 Mecanismos de resistencia a β -lactámicos	15
7. β -lactamasas	16
7.1 Nomenclatura	17
7.2 Clasificación de las β -lactamasas	17
8. β -lactamasas de espectro extendido (BLEE)	18
9. Estudios de diversidad con ERIC-PCR en cepas de <i>E. coli</i> productoras de BLEE	20

V. Procedimiento experimental	22
a) Cepas bacterianas	22
b) Resiembra, verificación y conservación a largo plazo (-70°C) de cepas clínicas de UPEC de pacientes hospitalizados	22
c) Perfil de susceptibilidad/resistencia a antibióticos	23
d) Detección fenotípica de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE)	24
e) Extracción, purificación y cuantificación de DNA genómico por Kit comercial (Wizard® Genomic DNA Purification Kit Promega)	25
f) Identificación de grupos y subgrupos filogenéticos	31
g) Identificación de la clona O25b en cepas clínicas de <i>E. coli</i> y UPEC productoras de BLEE	32
h) Identificación de genes de virulencia, genes de integrasa clase 1, 2 y 3, así como la región variable en clase 1 y 2 en cepas de UPEC productoras de BLEE	33
i) Tipificación molecular de cepas de <i>E. coli</i> y UPEC productoras de BLEE por el método ERIC-PCR	34
VI. Resultados	35
Origen de las cepas clínicas de <i>E. coli</i> productoras de BLEE	35
Perfil de susceptibilidad de cepas de <i>E. coli</i> y UPEC productoras de BLEE	36
Presencia de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE)	38
Grupos y subgrupos filogenéticos de UPEC	39
Presencia de la clona O25b/ST131 en cepas clínicas de <i>E. coli</i> y UPEC productoras de BLEE	41
Identificación de genes de virulencia en cepas de UPEC y <i>E. coli</i> productoras de BLEE por PCR múltiple	43
Genes asociados a la resistencia (<i>int1</i> , <i>int2</i> e <i>int3</i>) y región variable de los integrones clase 1 y 2.	48

Tipificación molecular de cepas de UPEC y <i>E. coli</i> productoras de BLEE por ERIC-PCR	50
VII. Discusión	54
VIII. Conclusiones	64
IX. Referencias bibliográficas	65

Lista de abreviaturas

AM Ampicilina

Amc Amoxicilina-Ácido Clavulánico

AN Amikacina

ARNt ARN de Transferencia

AZT Aztreonam

BLEE β -Lactamasas de Espectro Extendido

CBI Comunidades Bacterianas Intracelulares

CF Cefalotina

CIP Ciprofloxacina

CLED Medio Cisteína-Lactosa-Electrolito-Deficiente

CNF1 Factor Citotóxico Necrotizante tipo 1

CTX Cefotaxima

EGM Elementos Genéticos Móviles

ERIC Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus

ExPEC *E. coli* Extraintestinal

F/M Nitrofurantoína

GM Gentamicina

HIMFG Hospital Infantil de México Federico Gómez

HlyA α -Hemolisina

IAAS Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud

IPM Imipenem

ITUs Infecciones del Tracto Urinario

LB Caldo de Cultivo Luria-Bertani

LPS Lipopolisacárido

MDR Multidrogorresistente

MEM Meropenem

MHA Agar Mueller Hinton

NAG N-Acetilglucosamina

NAM Ácido N-Acilmurámico

OFX Ofloxacina

OMP Proteínas de la Membrana Externa
OMS Organización Mundial de la Salud
PAI Islas de Patogenicidad
PBP Protein Binding Penicillin Proteína de Unión a Penicilina
PCR Reacción en Cadena de la Polimerasa
PDR Pandrogorresistentes
PFGE Electroforesis en Gel de Campos Pulsados
RIQ Reservorios Intracelulares Quiescentes
Sat Toxina Secretada Autotransportadora
SI Secuencias de Inserción
SXT Trimetoprim-Sulfametoxazol
TE Tetraciclina
THG Transferencia Horizontal de Genes
TosA Toxina de Secreción A tipo 1
TSA Agar Tripticasa Soya
TU Tracto Urinario
TZP Piperacilina-Tazobactam
UCIN Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales
UPEC *Escherichia coli* Uropatógena
UTIP Unidad de Terapia Intensiva Pediátrica
XDR Extremodrogorresistente

Índice de figuras

Figura 1. Estructura, características y mecanismo de patogenicidad de UPEC en el epitelio urinario.	8
Figura 2. Estructura general de los β -lactámicos más importantes en la medicina clínica.	13
Figura 3. Similitud estructural entre antibióticos β -lactámicos, como la penicilina y el residuo terminal D-Ala-D-Ala.	14
Figura 4. Síntesis de la pared celular y mecanismo de acción de los antibióticos β -lactámicos.	14
Figura 5. Mecanismos de resistencia a los antibióticos en <i>E. coli</i>	16
Figura 6. Relación entre la clasificación molecular y funcional de las β -lactamasas.	18
Figura 7. Frecuencia y relación entre el área de aislamiento de las cepas y el tipo de muestra.	35
Figura 8. Frecuencia de la multidrogorresistencia a 9 categorías de antibióticos.	36
Figura 9. Prueba fenotípica de BLEE por ensayo de sinergia entre dos discos.	38
Figura 10. Prueba confirmatoria fenotípica de BLEE por ensayo de Hodge.	39
Figura 11. Electroferograma de DNA´s genómicos de cepas clínicas de UPEC.	39
Figura 12. Electroferograma de PCR múltiple para los genes <i>chuA</i> , <i>yjaA</i> y <i>tspE4</i> para la identificación de los grupos filogenéticos de cepas clínicas de <i>E. coli</i> y UPEC productoras de BLEE.	40
Figura 13. Distribución de las cepas de UPEC y <i>E. coli</i> , en relación con los grupos filogenéticos	41
Figura 14 Distribución de los grupos, subgrupos filogenéticos de cepas de UPEC, y la presencia de la clona O25b.	42
Figura 15. Electroferograma de PCR múltiple para los genes <i>trpA</i> y <i>pabB</i> (alelo específico O25b/ST131) de cepas clínicas de UPEC.	42
Figura 16. Electroferograma de PCR Múltiple para factores de virulencia de cepas clínicas de UPEC y <i>E. coli</i> Diversas.	44
Figura 17. Electroferograma de PCR punto final para factores de virulencia de cepas clínicas de UPEC y <i>E. coli</i> Diversas.	45

Figura 18. Mapa de calor de genes asociados a la patogénesis de <i>E. coli</i> y su relación con los grupos y subgrupos filogenéticos de cepas de UPEC.....	46
Figura 19. Electroferograma de PCR Múltiple de los genes <i>int1</i> e <i>int2</i> en cepas clínicas de UPEC.	50
Figura 20. Electroferograma de ERIC-PCR de cepas clínicas de UPEC.	51
Figura 21. Dendrograma de cepas clínicas de UPEC productoras de BLEE	53

Índice de tablas

Tabla 1. Iniciadores y condiciones de amplificación para la determinación de ERIC-PCR, clona O25b, grupo y subgrupo filogenético, factores de virulencia asociados a la patogénesis e Integrones de cepas clínicas de <i>E. coli</i> productoras de BLEE. ...	28
Tabla 2. Volúmenes utilizados en cada mezcla de PCR, para la determinación de ERIC-PCR, clona O25b/ST131, grupo y subgrupo filogenético, factores de virulencia asociados a la patogénesis e Integrones, de cepas clínicas de <i>E. coli</i> productoras de BLEE.	31
Tabla 3. Esquema de identificación del grupo filogenético.....	31
Tabla 4. Perfil de resistencia a 10 categorías de antibióticos, de acuerdo con los grupos filogenéticos de cepas clínicas de <i>E. coli</i> productoras de BLEE.	37
Tabla 5. Frecuencia de los genes asociados a la patogénesis de UPEC en relación con los grupos filogenéticos.	47
Tabla 6. Frecuencia de los genes asociados a la resistencia a antibióticos mediada por integrones en cepas clínicas de <i>E. coli</i> productoras de BLEE en relación con los grupos filogenéticos.	49

I. Introducción

Los antibióticos son medicamentos utilizados para prevenir y tratar las infecciones bacterianas. La resistencia intrínseca es una propiedad natural de cada grupo, género y especie bacteriana; mientras, la resistencia adquirida a los antibióticos se produce cuando las bacterias obtienen mecanismos de resistencia. Las infecciones causadas por bacterias resistentes a los antibióticos provocan que se incrementen los costos médicos, que se prolonguen las estancias hospitalarias y que aumente la mortalidad. La resistencia bacteriana a los antibióticos es por este motivo, es un problema mundial de salud pública.

Las infecciones del tracto urinario (ITUs) representan un problema de salud pública en México y son la tercera causa de morbilidad, principalmente, en la población infantil, en mujeres en edad reproductiva y en adultos mayores. *Escherichia coli* uropatógena (UPEC) es el principal agente causal del 80-90% de las ITUs adquiridas en la comunidad y del 50-60% en las de origen nosocomial. El mecanismo de patogenicidad de UPEC en el tracto urinario (TU), involucra factores de virulencia que le permiten resistir el flujo de la micción, diseminarse, colonizar y causar daño a los tejidos a través de los procesos de adherencia e invasión.

La hidrólisis enzimática es el mecanismo de resistencia a los antibióticos β -lactámicos, más frecuente utilizado por bacterias Gram negativas, que implica la inactivación de los β -lactámicos por acción de enzimas denominadas β -lactamasas. Las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) son enzimas capaces de conferir resistencia a las penicilinas, cefalosporinas de 1^a, 2^a, y 3^{er} generación y al aztreonam (pero no cefamicinas y carbapenémicos), además, son inhibidas por inhibidores de β -lactamasas como el ácido clavulánico. En la actualidad, las bacterias productoras de BLEE, principalmente *E. coli*, son causas comunes de infecciones comunitario y nosocomiales.

El grupo filogenético, los factores de virulencia y la susceptibilidad a antibióticos en cepas de UPEC y de *E. coli*, varían entre poblaciones y regiones geográficas de México y el mundo.

Aproximadamente el 50% de las ITUs por UPEC en México, son multidrogorresistentes (MDRs), con perfiles de resistencia asociados a la producción de BLEE.

En el Laboratorio de Investigación en Bacteriología Intestinal del Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIMFG), se ha identificado una alta frecuencia de genes que codifican factores de virulencia, con un amplio perfil de resistencia asociada a la presencia de integrones clase 1 y 2, y un fenotipo productor de BLEE⁺, principalmente relacionados con los grupos filogenéticos B2 y D, en cepas clínicas de UPEC MDR y extremodrogorresistente (XDR).

La virulencia y la capacidad de resistencia en cepas bacterianas, se debe a la adquisición de nuevos genes por transferencia horizontal de genes (THG), mediada por elementos genéticos móviles (EGM). Los EGM más importantes incluyen: secuencias de inserción (SI), casetes de genes, integrones y transposones; estos elementos juegan un papel crucial en el desarrollo y diseminación de la resistencia antimicrobiana entre microorganismos de importancia clínica.

Recientemente, una clona de *E. coli*, O25b/ST131, productora de BLEE, multidrogorresistente y con alta virulencia, ha emergido a nivel mundial como una causa importante de ITUs adquiridas en la comunidad.

II. Objetivo general

Caracterizar genotípicamente un conjunto de cepas clínicas de UPEC productoras de BLEE y determinar su diversidad genética.

Objetivos particulares

- Determinar el perfil fenotípico de resistencia a una colección de cepas clínicas de *E. coli* productoras de BLEE.
- Determinar fenotípicamente la producción de β -lactamasas del tipo espectro-extendido.
- Determinar el grupo filogenético por PCR múltiple con los genes *chuA*, *yjaA* y *tspE.C4*, y el genotipo O25b por PCR dúplex.
- Identificar la presencia de 17 genes de virulencia de UPEC por PCR múltiple.
- Tipificar la multidrogorresistencia asociada a elementos móviles del tipo integrones clase 1 y 2.
- Analizar la diversidad genética de las cepas clínicas mediante la técnica de ERIC-PCR.
- Analizar y correlacionar los resultados.

III. Resumen

Se caracterizó la susceptibilidad antibiótica por el método de Kirby-Bauer, también se determinó la expresión fenotípica de BLEE por las pruebas de sinergismo con doble disco, disco individual c/s ácido clavulánico y ensayo de Hodge (CLSI, 2020). Además, se tipificó la presencia de 17 genes virulencia, el grupo filogenético, genotipo O25b, la presencia de integrones clase 1 y 2, por PCR múltiple y se estudió la diversidad genética mediante ERIC-PCR, a un conjunto de cepas clínicas de UPEC y *E. coli* diversas, recuperadas de pacientes pediátricos con en el HIMFG. Se incluyeron 39 cepas clínicas de *E. coli*, la mayoría aislada del área de Nefrología (20%) y de ITUs (75%). El perfil de susceptibilidad antimicrobiana mostró resistencia a ampicilina, cefalotina y ciprofloxacina en 100%. Las cepas fueron sensibles en 100% a amikacina e imipenem y 84.62% a nitrofurantoina; el 46.1% de las cepas, mostró un perfil general de MDR a 7 categorías de antibióticos. El filogrupo D₂ de Clermont, fue el más prevalente en 40%, mientras, el 58% de las cepas se identificaron con el serogrupo O25b. Los genes con alta frecuencia fueron, *fimH* en 90%, *csgA*, *ecpA*, *motA* y *motB* en 100%, *int1* en 97.44% y *RV-int1* en 41.1%. El análisis de los patrones por ERIC-PCR, confirmó una alta diversidad genética entre las cepas de *E. coli* y UPEC productoras de BLEE, con ≥ 80 % de similitud.

Además, se demostró que existía una alta similitud entre las cepas 855U-051219, 937U-051219, 833U1-051219 y 833U2-051219, estas cepas provenían de diferentes áreas del HIMFG, incluyendo: adolescentes, oncología y reumatología. Esto sugiere una probable diseminación de estas cepas. Sin embargo, considerando los criterios de Tenover *et al.*, 1995, solo están estrechamente relacionadas, es decir, no son cepas clonales. Además, mostraron diferencia en su grupo filogenético, genes asociados a la variante de la variante II de *papG*, toxinas *cnf1* y *hlyA*. Las cepas 833U1-051219 y 833U2-051219 provenían de un mismo paciente del área de reumatología, sin embargo, se relacionaron con filogrupos diferentes B₂ y D₂, con mismo perfil de resistencia, esto sugieren que, si bien son cepas diferentes, la cercanía entre ellas, favoreció una posible transferencia horizontal de genes. Las cepas de *E. coli* y UPEC productoras de BLEE presentan

atributos patogénicos y de resistencia que les permiten infectar a los pacientes y persistir en el ambiente hospitalario.

IV. Antecedentes

Los antibióticos son medicamentos utilizados para prevenir y tratar las infecciones bacterianas. La resistencia a los antibióticos se produce cuando las bacterias adquieren mecanismos de resistencia. Estas bacterias resistentes pueden causar infecciones en el ser humano y en los animales, y esas infecciones son más difíciles de tratar, comparado con las infecciones por bacterias sensibles. Además, la presencia de cepas resistentes a los antibióticos origina que se incrementen los costos médicos, que se prolonguen las estancias hospitalarias y que aumente la mortalidad; en este contexto, la resistencia bacteriana a los antimicrobianos es una amenaza mundial para la salud pública. A través de los años han surgido microorganismos resistentes a múltiples fármacos no solo en el ambiente clínico, sino también en ambientes comunitarios. La resistencia a los antimicrobianos se debe al uso inadecuado de los medicamentos, por ejemplo, al tomar antibióticos para tratar infecciones víricas como el resfriado o la gripe, o al compartir el tratamiento utilizado con otros pacientes. Los medicamentos de mala calidad, las prescripciones erróneas y las deficiencias de la prevención y el control de las infecciones, son otros factores que facilitan la aparición y la propagación de la resistencia antibiótica (Organización Mundial de la Salud, 2018).

1. Infecciones del tracto urinario

Las infecciones del tracto urinario (ITUs) ocurren cuando el patógeno puede ingresar al sistema del tracto urinario y alcanzar más de 10^5 colonias/mL en la orina. Las ITUs son la segunda causa de enfermedades infecciosas en entornos comunitarios y hospitalarios, representan aproximadamente el 40% de todas las infecciones adquiridas en los hospitales (Asadi *et al.*, 2019).

Las ITUs son un problema de salud pública en México y son la tercera causa de morbilidad en la población infantil, mujeres en edad reproductiva y adultos mayores (Secretaría de Salud, 2019). La prevalencia e incidencia de ITUs en población infantil varía según la edad, la raza/grupo étnico, el sexo y el estado de circuncisión.

Sin embargo, aproximadamente 2% de los niños y del 7-8% en las niñas, han padecido una ITU, en los primeros 6-7 años de vida. Aproximadamente, hasta el 30% de los niños, desarrollará una segunda infección urinaria durante la infancia. La mayor prevalencia de las ITUs en niños se observa principalmente en recién nacidos, bebés pequeños, niños no circuncidados menores de 1 año. Las poblaciones pediátricas con condiciones especiales de comorbilidades presentan un mayor riesgo de ITUs, incluyendo anomalías estructurales y funcionales del tracto urinario (Schmidt *et al.*, 2015; Millner and Becknell, 2019).

Las ITUs se han asociado a bacteriuria asintomática, cistitis aguda y clínica, pielonefritis e infección recurrente. El estudio de las ITUs las ha clasificado en dos categorías: ITUs inferiores (cistitis) e ITUs superiores (pielonefritis). También, las ITUs pueden clasificarse clínicamente en dos tipos: ITUs complicadas e ITUs no complicadas (Asadi *et al.*, 2019).

2. *Escherichia coli* uropatogénica

Escherichia coli uropatógena (UPEC) es el principal agente causal, en virtud de que provoca el 80-90% de las infecciones urinarias adquiridas en la comunidad. El mecanismo de patogenicidad de UPEC en el tracto urinario (TU), involucra factores de virulencia que le permiten resistir el flujo de la micción, diseminarse, colonizar y causar daño a los tejidos a través de los procesos de adherencia e invasión. El proceso de infección ascendente inicia con un foco primario en la uretra, pasando a la vejiga y pudiendo llegar a los riñones; además, UPEC es capaz de formar biopelículas que le ayudan a persistir y provocar infecciones persistentes (Miranda-Estrada *et al.*, 2017; Ochoa *et al.*, 2016).

La virulencia es el resultado de diversos eventos genéticos, relacionados con la adquisición de factores de virulencia, a través de islas de patogenicidad, plásmidos y fagos por medio de mecanismos de transferencia horizontal de genes (THG). Algunos factores de virulencia son componentes estructurales de superficie, como el lipopolisacárido (LPS), cápsula de polisacárido, flagelos, vesículas de membrana

externa, *pili*, fimbrias, adhesinas no fimbriales, proteínas de la membrana externa (OMP), así como toxinas secretadas, sistemas de secreción, sistemas de captación de hierro dependientes de TonB y sideróforos.

La representación gráfica de la estructura, características y mecanismo de patogenicidad de UPEC en el epitelio urinario, se muestra en la figura 1. Además de UPEC, las ITUs pueden ser causadas por *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* y *P. aeruginosa*, *E. faecalis*, *E. cloacae*, *S. bovis* y *C. albicans* (Luna-Pineda *et al.*, 2018; Terlizzi *et al.*, 2017).

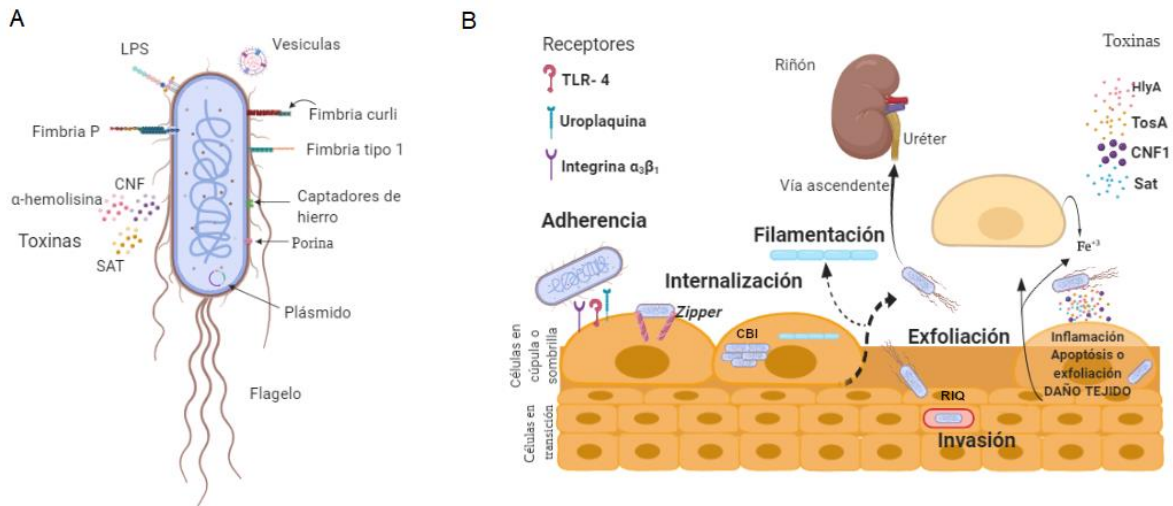


Figura 1. Estructura, características y mecanismo de patogenicidad de UPEC en el epitelio urinario. **A) *Escherichia coli* adhesinas y estructura.** Se observan diversos factores de virulencia de UPEC, incluyendo: estructuras de adhesión a las células del tracto urinario como la fimbria tipo 1, fimbria curli, fimbria P, estructuras de reconocimiento no fimbrial como el LPS (lipopolisacárido), estructuras involucradas en el metabolismo como los captadores de hierro, porinas (estructuras que permiten la expulsión de moléculas como los antibióticos); flagelo (estructuras de motilidad). Presencia de plásmidos, vesículas y la producción de toxinas como: la α -hemolisina (HlyA), factor citotóxico necrotizante tipo 1 (CNF1), toxina secretada autotransportadora (Sat) y la toxina de secreción A tipo 1 (TosA). **B) Mecanismo de patogenicidad de UPEC en el epitelio de vejiga.** Las células en sombrilla presentan en la superficie receptores de uroplaquina y la integrina $\alpha\beta_1$ que reconocen a la fimbria tipo 1, la fimbria curli es reconocida por la fibronectina, laminina, y el complejo principal de histocompatibilidad tipo 1 de células presentadoras de antígenos. Las estructuras no fimbriales de UPEC como el LPS y glucano de superficie son reconocidos por receptores TLR-4. Mediante un rearrreglo en los filamentos de actina, UPEC es internalizada en las células superficiales o de sombrilla por medio de un mecanismo tipo zipper, una vez dentro de la célula, puede formar comunidades bacterianas intracelulares (CBI), que por exfoliación pueden diseminarse a diversas partes del uroepitelio, o facilitar su salida al exterior

por un proceso llamado filamentación. En la filamentación se mantiene el crecimiento bacteriano en forma de filamentos, provocando que haya mayor superficie de contacto con las células en sombrilla y pueden iniciar un nuevo ciclo de infección. La exfoliación es provocada por señales externas de UPEC, relacionadas con la liberación de toxinas como las proteínas Sat, CNF y HlyA que provocan daño en la célula, llevando a la apoptosis y/o exfoliación excesiva. Finalmente, UPEC puede formar reservorios intracelulares quiescentes (RIQ), para lograr la infección de células del epitelio transicional, posterior al proceso de exfoliación; en esta fase también puede evadirse la respuesta inmune del hospedero, así como la acción de antimicrobianos, además, se relaciona con infecciones recurrentes y/o persistentes. Obtenido de Contreras-Alvarado *et al.*, 2021.

3. Grupos filogenéticos

Los grupos filogenéticos o filogrupos, son grupos de organismos que pertenecen a una gran entidad filogenia dentro de una especie. Los grupos filogenéticos dentro de *Escherichia coli* son: A, B1, B2 y D (Clermont *et al.*, 2000) y subgrupos filogenéticos: A₀, A₁, B1, B2₁, B2₂, D₁ y D₂. Además, por pruebas adicionales de biología molecular se han identificado los filogrupos; A, B1, B2, C, D, E, F y G (Denamur *et al.*, 2021).

Los estudios epidemiológicos basados en PCR son métodos sencillos y rápidos, que permiten determinar los filogrupos de *E. coli*. Los análisis filogenéticos han demostrado que las cepas de UPEC con un alto grado de patogenicidad están asociadas al filogrupo B2 y con menor prevalencia al filogrupo D. Además, las cepas comensales pertenecen a los filogrupos A y B1 (Clermont *et al.*, 2000; Clermont *et al.*, 2009). La clasificación de cepas de *E. coli* en subgrupos filogenéticos A₀, A₁, B2₁, B2₂, D₁ y D₂, se puede evidenciar con base en la presencia o ausencia de alguno de los tres genes *chuA*, *yjaA* y *TspE4* (Clermont *et al.*, 2000).

El grupo filogenético, los factores de virulencia y la susceptibilidad a antibióticos de *E. coli* causante de ITU, varían significativamente entre poblaciones y regiones geográficas de México y el mundo. El grupo filogenético A, asociado a cepas comensales no patogénicas, puede ser multidrogorresistente (MDR) y tiene la capacidad de producir infecciones urinarias (Ochoa *et al.*, 2016; Luna-Pineda *et al.*, 2018). La multidrogorresistencia está presente en cepas de todos los grupos filogenéticos, lo que complica y disminuye las opciones terapéuticas en pacientes con ITU de la comunidad (Miranda-Estrada *et al.*, 2017).

En un estudio realizado en el Laboratorio de Investigación en Bacteriología Intestinal del Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIMFG), encontraron una alta frecuencia de genes que codifican factores de virulencia, un amplio perfil de resistencias asociado a la presencia de integrones clase 1 y 2, y el fenotipo BLEE⁺, principalmente relacionados con los grupos filogenéticos B2 y D, en cepas clínicas de UPEC MDR y XDR (Ochoa *et al.*, 2016).

4. Genética bacteriana

Las bacterias tienen una plasticidad genética que les permite responder a una amplia gama de amenazas ambientales, incluyendo la presencia de moléculas de antibióticos. Al compartir el mismo nicho ecológico con los organismos productores de antimicrobianos, las bacterias han desarrollado mecanismos para resistir el efecto de las moléculas antibióticas que les resultan dañinas y, en consecuencia, su resistencia intrínseca les permite prosperar aún en su presencia (Munita *et al.*, 2016).

La virulencia y la capacidad de resistencia en cepas bacterianas, se debe a la adquisición de nuevos genes por THG, mediada por elementos genéticos móviles (EGM). Los EGM más importantes incluyen: secuencias de inserción (SI), casetes de genes, integrones y transposones; estos elementos juegan un papel crucial en el desarrollo y diseminación de la resistencia antimicrobiana entre microorganismos de importancia clínica (Peleg and Hooper, 2010; Munita *et al.*, 2016).

Las islas de patogenicidad (PAI, por sus siglas en inglés), son grandes elementos genéticos cromosómicos, implicados en la virulencia; están compuestos por un subconjunto de islas genómicas adquiridas mediante THG y frecuentemente asociadas a genes de ARN de transferencia (ARNt). Otro mecanismo involucrado en la evolución de la virulencia es la inactivación de genes cuya expresión es incompatible con la virulencia (genes antivirulencia). En este caso, un gen cuya expresión fue ventajosa en un entorno no patógeno es perjudicial en el entorno

patógeno, una compensación conocida como pleiotropía antagonista; este fenómeno ocurre especialmente en las vías metabólicas. Finalmente, la presencia de mutaciones puntuales que conducen a un cambio de función y fenotipo de resistencia (Denamur *et al.*, 2021).

4.1 Integrones

Los integrones son los mecanismos más eficientes para acumular genes de resistencia a los antimicrobianos; son sistemas de recombinación de sitio específicos, capaces de reclutar marcos de lectura abiertos en forma de casetes de genes móviles. Su capacidad para capturar diversos casetes de genes significa que pueden conferir plasticidad genómica a su anfitrión y facilitar respuestas rápidas a diversas presiones de selección. Además, son un mecanismo eficiente y simple para la adición de nuevos genes en los cromosomas bacterianos, y presentan la maquinaria necesaria para asegurar su expresión. Los integrones representan una sólida estrategia de intercambio genético y uno de los principales impulsores de la evolución bacteriana (Munita *et al.*, 2016; Ghaly *et al.*, 2020). Un integrón está compuesto por un gen de integrasa (*intl*) en el extremo 5' y un sitio de recombinación primaria proximal (*attI*). Las secuencias de aminoácidos de las integrasas Intl se han utilizado como base para clasificar a los integrones en 'clases'; las que llevan *intl1* son definidas como 'clase 1', *intl2* como 'clase 2', *intl3* como 'clase 3', etc. (Deng *et al.*, 2015). Se han identificado cinco clases (clase 1, 2, 3, 4 y 5) de integrones, y se ha documentado que las clases 1 a 3 desempeñan un papel en la diseminación de la resistencia a los antibióticos entre los géneros de la Familia *Enterobacteriaceae* (Chen *et al.*, 2019).

4.2 Secuencias de inserción (SI)

Los elementos transponibles más simples son los elementos de secuencia de inserción (SI), con un tamaño de 600–700 bp. Generalmente codifican sólo 1-2 genes necesarios para la transposición, e incluyen los sitios de acción *cis* sobre los que actúa la transposasa. Los sitios *cis* consisten en secuencias repetidas

terminales invertidas, de unas pocas docenas de pares de bases, también conocidas como secuencias palindrómicas (Thomas and Nielsen, 2005; Lee *et al.*, 2016).

La presencia de varias SI estrechamente relacionados en un genoma bacteriano, permite la recombinación homóloga entre elementos no relacionados, siempre que cada uno de los elementos lleve una copia de la SI. Un ejemplo claro es el mecanismo por el cual el factor sexual F de *E. coli* se integra en el cromosoma por recombinación entre copias de SI2 o SI3, de modo que la unión entre F y el cromosoma, está definida por la presencia del elemento SI. La recombinación posterior entre otras copias de ese elemento puede dar lugar a lo que se denominan elementos F', que ahora contienen la mayor parte del plásmido, y una sección del cromosoma (Thomas and Nielsen, 2005).

5. Resistencia bacteriana

La resistencia bacteriana se clasifica de acuerdo con el número de categorías de antibióticos, al que es resistente una cepa bacteriana. Una cepa multidrogorresistente (MDR) se define como la no susceptible a al menos un agente, en tres o más categorías de antibióticos. Una cepa extremodrogorresistente (XDR) se define como la no susceptible a al menos un agente, en todas menos dos o menos categorías de antibióticos (es decir, los aislamientos bacterianos son susceptibles a solo una o dos categorías de antibióticos). Mientras, las cepas pandrogorresistentes (PDR) son aquellas no susceptibles a todos los agentes en todas las categorías de antibióticos (es decir, ningún agente probado es susceptible para ese microorganismo) (Magiorakos *et al.*, 2012).

6. Antibióticos β -lactámicos

Los β -lactámicos son una amplia familia de antibióticos bactericidas y uno de los grupos más numerosos y de mayor utilización en la clínica. Los antibióticos que contienen el anillo β -lactámico pertenecen a cuatro clases químicas principales:

penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos y monobactámicos (Figura 2). También se utiliza la combinación de penicilinas con algún inhibidor de las β -lactamasas, por ejemplo, amoxicilina-ácido clavulánico y piperacilina-tazobactam (Bush and Bradford, 2020; Merino, 2018).

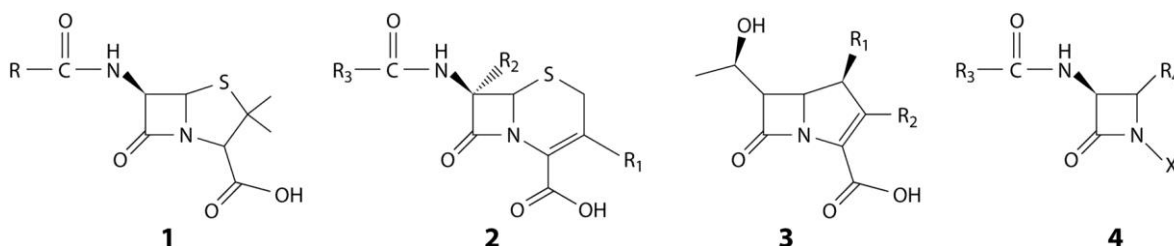


Figura 2. Estructura general de los β -lactámicos más importantes en la medicina clínica. Las estructuras incluyen penicilina (1), cefalosporina (2), carbapenema (3) y monobactámico (4). Tomado de: Bush and Bradford, 2020.

6.1 Mecanismo de acción de los antibióticos β -lactámicos

Los antibióticos β -lactámicos inhiben la biosíntesis de la pared celular bacteriana, lo que conduce a la lisis y muerte celular. Se unen covalentemente al sitio activo de la proteína de unión a penicilina (PBP: Protein Binding Penicillin), una enzima esencial en la etapa final de la biosíntesis del peptidoglucano en la pared celular de las bacterias. Todos los antibióticos β -lactámicos comparten un núcleo común que contiene un anillo betalactámico de cuatro carbonos. Este anillo, tiene similitud estructural con el dipéptido terminal D-Ala-D-Ala (Figura 3), del peptidoglucano naciente en la célula bacteriana en división (Figura 4). Esta similitud estructural, facilita la unión una serina en el sitio activo que se encuentra en todas las PBP funcionales. Los antibióticos β -lactámicos (ej. la penicilina) actúan como un sustrato análogo y se unen al sitio activo de las transpeptidasas para inhibir la síntesis del peptidoglucano (Figura 4) (Zeng and Lin, 2013; Bush and Bradford, 2016).

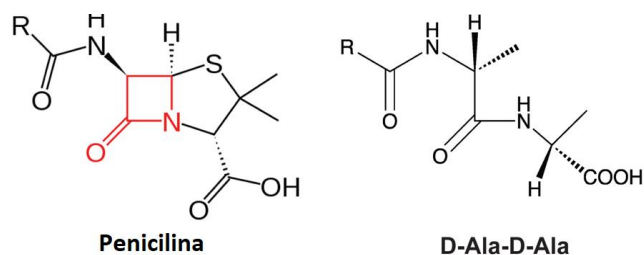


Figura 3. Similitud estructural entre antibióticos β -lactámicos, como la penicilina y el residuo terminal D-Ala-D-Ala. Modificado de: Zeng and Lin, 2013.

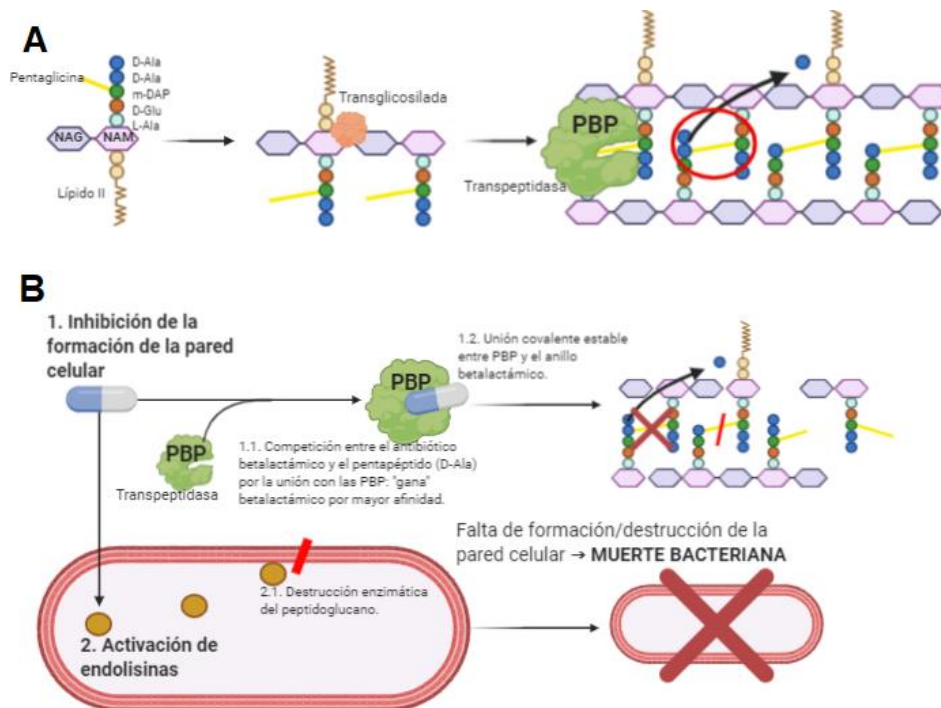


Figura 4. Síntesis de la pared celular y mecanismo de acción de los antibióticos β -lactámicos. A) Síntesis de la pared celular (peptidoglucano). El peptidoglucano está compuesto por cadenas de glicanos compuestas por residuos de N-acetilglucosamina (NAG) y el ácido N-acetilmurámico (NAM); NAM está vinculado a tallos de pentapéptidos o tetrapéptidos. La composición de aminoácidos del pentapéptido muestra variaciones específicas de especie. En *E. coli*, el pentapéptido en peptidoglucano naciente consiste en l-Ala- d -iGlu-mDAP- d -Ala- d -Ala (mDAP: ácido meso- diaminopimérico). Los diferentes componentes del peptidoglucano se sintetizan en el citoplasma y son transportados a través de la membrana citoplásmica al espacio periplásmico, donde se van ensamblando. La formación de la pared celular inicia con la polimerización de residuos de NAG y NAM, por glicosiltransferasas y los enlaces entre las cadenas laterales del péptido con la expulsión de una D-Ala terminal de una de las cadenas laterales del péptido por transpeptidasas denominadas proteínas de unión a penicilina (PBP: Protein Binding Penicillin). (Suárez and Gudíol, 2009; Pazos and Peters, 2019). B) Mecanismo de acción de los antibióticos β -lactámicos. Los antibióticos betalactámicos son agentes bactericidas que producen su efecto principalmente a través de 2 mecanismos: 1) Inhibición de la síntesis de la pared bacteriana. El antibiótico β -lactámico compite con el pentapéptido D-Ala, por la unión con las PBP. El antibiótico β -lactámico gana por afinidad y se une con la PBP, por lo tanto, no hay biosíntesis de la pared celular.

2) Inducción de la autólisis bacteriana. Los betalactámicos también actúan activando una autolisina bacteriana endógena que destruye el peptidoglucano (Suárez and Gudiol, 2009; Pazos and Peters, 2019). Realizado con BioRender.com para este trabajo.

6.2 Mecanismos de resistencia a β -lactámicos

Existen cuatro tipos de mecanismos generales de resistencia a los antibióticos: (1) Disminución de la entrada del antibiótico por modificación de la permeabilidad, (2) Aumento de la salida del antibiótico por bombas de expulsión o eflujo activos, (3) Alteración del sitio blanco de acción (PBP), (4) Hidrólisis enzimática por acción de β -lactamasas en el espacio periplásmico. En la figura 5. se puede observar un esquema de los mecanismos de resistencia a β -lactámicos en *E. coli*. Además, se indica, la importancia de la transferencia de la resistencia por elementos móviles como los plásmidos. La hidrólisis enzimática es el mecanismo más común en bacterias Gram negativas clínicamente importantes, que implica la inactivación de los β -lactámicos como consecuencia de la acción de enzimas denominadas β -lactamasas (Petchiappan and Chatterji, 2017).

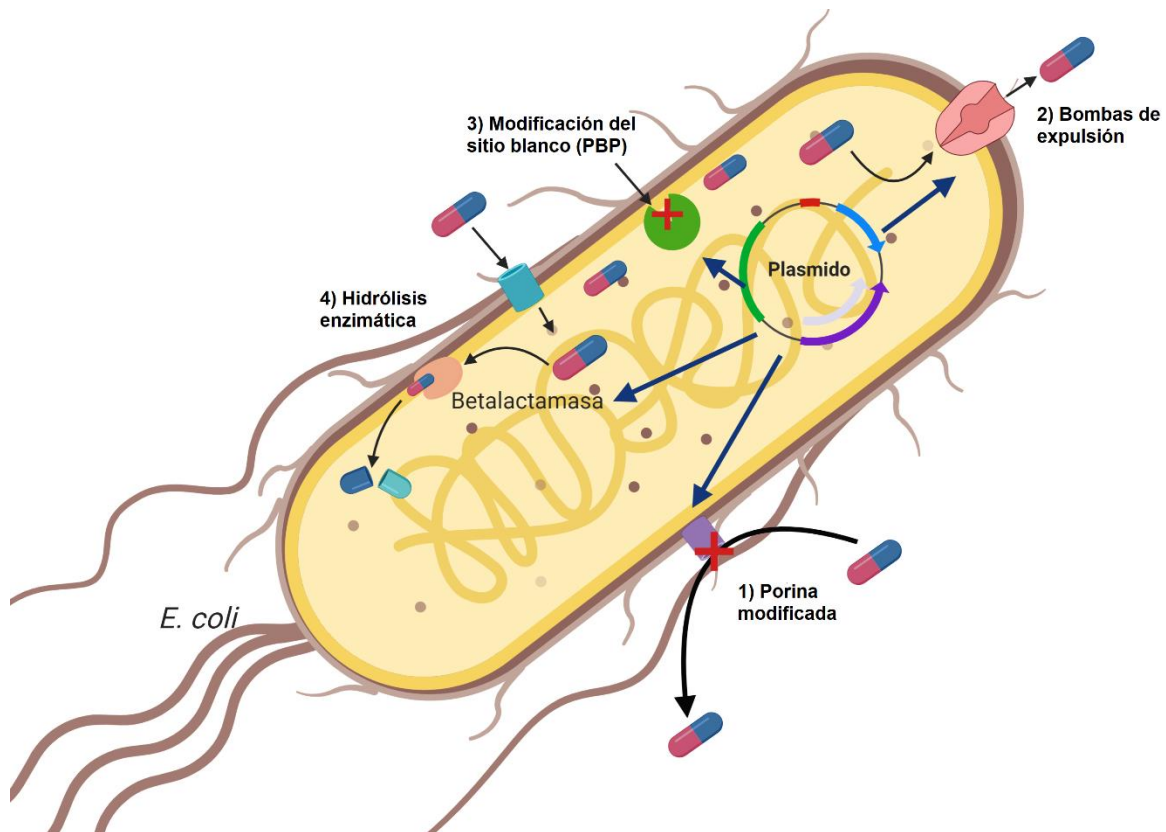


Figura 5. Mecanismos de resistencia a los antibióticos en *E. coli*. (1) Disminución de la entrada del antibiótico por modificación de la permeabilidad, cambios en el diámetro y/o número de porinas, pueden bloquear el ingreso del antimicrobiano a la bacteria. (2) Aumento de la salida del antibiótico por bombas de expulsión o eflujo activos, transporta al antimicrobiano hacia el exterior de la célula sin modificaciones, pero sin acción antimicrobiana. (3) Alteración del sitio blanco de acción (PBP). La modificación de un aminoácido genera un blanco diferente y así disminuye la afinidad de unión por el antimicrobiano. (4) Hidrólisis enzimática por acción de β -lactamasas en el espacio periplásmico. Las enzimas destruyen los antimicrobianos por lo que pierden su acción, sin tener posibilidad de actuar sobre el microorganismo (Moreno *et al.*, 2009).

7. β -lactamasas

Las β -lactamasas son enzimas que inactivan el anillo β -lactámico, uniéndose y rompiendo el enlace amida del anillo de azetidionona de cuatro carbonos, presente en cada β -lactámico (Figura 3). Posterior a la ruptura, una molécula de agua es adicionada al anillo abierto, para formar el ácido penicilóico que no tiene actividad antimicrobiana. El ácido penicilóico es una molécula idéntica al antibiótico original, pero microbiológicamente inactiva, que es incapaz de formar un complejo

enzimáticamente productivo con una PBP, resultando en la supervivencia continua de la célula bacteriana (Bush and Bradford, 2020).

7.1 Nomenclatura

Los genes que codifican las β -lactamasas generalmente se denominan *bla*, seguidos del nombre de la enzima específica (p. Ej., *bla_{KPC}*) y se han encontrado en el cromosoma bacteriano o localizados en EGM como parte del genoma accesorio. Estos genes también se pueden encontrar formando parte de integrones, situación que facilita su diseminación. En cuanto a su expresión, la transcripción de estos genes puede ser constitutiva o puede requerir una señal externa para inducir su producción (Munita and Arias, 2016).

7.2 Clasificación de las β -lactamasas

Un intento por agrupar al gran número de enzimas β -lactamasas, ha mostrado dos esquemas principales de clasificación. La clasificación de Ambler se basa en la identidad de la secuencia de aminoácidos y separa las β -lactamasas en 4 grupos (A, B, C y D). La clase A, C y D incluye enzimas que hidrolizan su sustrato por formación de un acil enzima a través de un sitio activo serina. Mientras, las β -lactamasas de clase B son metaloenzimas que utilizan en su sitio activo, un ion de Zinc⁺² para facilitar la hidrólisis de los β -lactámicos. Por otro lado, la clasificación de Bush-Jacoby divide las β -lactamasas en 4 grupos (cada una con varios subgrupos) según su función bioquímica, principalmente en función de la especificidad del sustrato (Bush and Jacoby, 2010; Munita and Arias, 2016) Un resumen de la clasificación más actual de las β -lactamasas y de las enzimas de mayor relevancia clínica, se presenta en la figura 6.

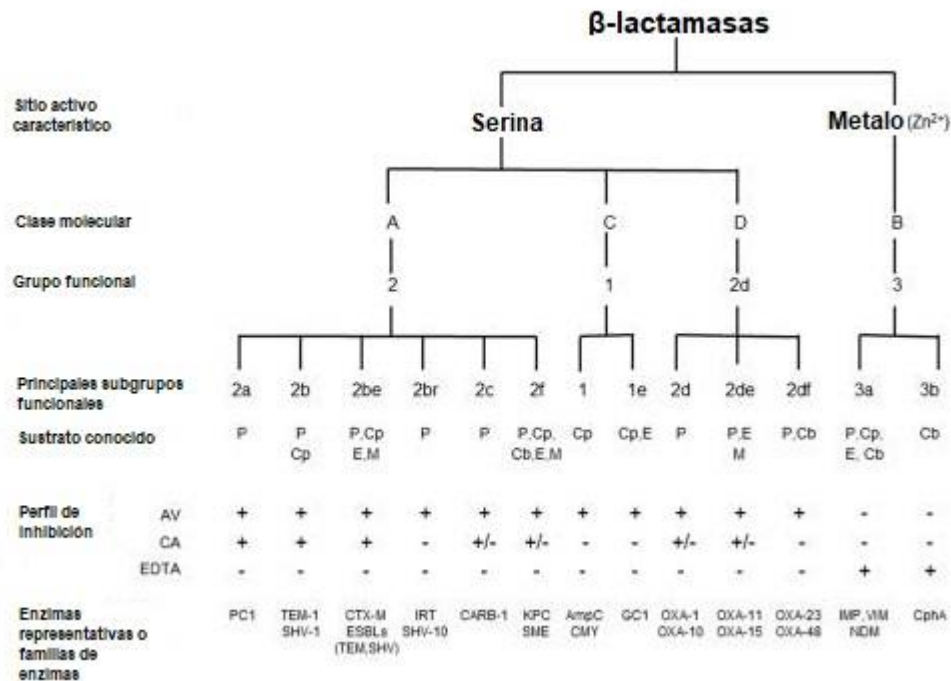


Figura 6. Relación entre la clasificación molecular y funcional de las β-lactamasas.

AV, avibactam; CA, ácido clavulánico; Cb, carbapenémico; Cp, cefalosporina; E, cefalosporina de espectro expandido; M, monobactámico; P, penicilina. Modificado de: Bush, 2010.

8. β-lactamasas de espectro extendido (BLEE)

Las enterobacterias productoras de β-lactamasas de espectro extendido (BLEE) pueden incluir enzimas de clase A, C, D, o pueden clasificarse como grupos 1e, 2be, 2de y 2e (Bush and Bradford, 2020). Las BLEE son enzimas capaces de conferir resistencia a las penicilinas, cefalosporinas de 1^a, 2^a, y 3^{er} generación y al aztreonam (pero no cefamicinas y carbapenémicos), además, son inhibidas por inhibidores de β-lactamasas como el ácido clavulánico. Las BLEE se originaron a partir de las β-lactamasas de amplio espectro del grupo 2e (TEM-1 y SHV-1) al grupo 2be que denota el espectro extendido y difieren de su progenitor por pocos cambios en su secuencia de aminoácido (Paterson and Bonomo, 2005).

Las enterobacterias productoras de BLEE surgieron durante la década de 1990s y 2000s como un importante problema de salud pública mundial. En la actualidad, las

bacterias productoras de BLEE, principalmente *E. coli*, son causas comunes de infecciones comunitario y nosocomiales (Peirano and Pitout, 2019).

En los niños, ITUs se encuentran entre las infecciones más frecuentes causadas por bacterias productoras de BLEE y constituyen un grupo de alto riesgo. Los aislamientos de bacterias productoras de BLEE más comunes son: *Escherichia coli* (64.4%) y *Klebsiella* spp. (31.9%), mientras que los aislamientos restantes incluyen *Morganella* spp., *Proteus* spp., *Serratia* spp., *Citrobacter* spp. y *Enterobacter* spp. (Flokas *et al*, 2016).

Actualmente el linaje clonal de *E. coli* extraintestinal (ExPEC), relacionado con UPEC del serogrupo O25, más prevalente aislado en condiciones patógenas, está relacionado con la secuencia tipo (ST) 131 (UPEC O25b/ST131). Esta clona de UPEC, se ha identificado como parte de la microbiota comensal de humanos, animales de compañía como perros y gatos, y alimentos. Además, se ha reportado la transmisión de una sola cepa ST131 entre humanos y mascotas dentro de los hogares (Johnson *et al.*, 2016; Denamur *et al.*, 2021). Las cepas de UPEC O25b/ST131, se han caracterizado por presentar resistencia a múltiples fármacos de administración humana y veterinaria como: quinolonas, fluoroquinolonas, cefalosporinas de tercera generación, carbapenémicos y colistina). Las cepas asociadas a ST131 tienen una buena aptitud para su supervivencia *in vivo* en la orina humana, en las ITUs pueden formar biopelículas, además, colonizan de manera eficiente el intestino de los mamíferos y persiste a largo plazo (Denamur *et al.*, 2021). Recientemente, una clona de *E. coli*, O25b/ST131, productora de β -lactamasas de espectro extendido, multidrogorresistente y con alta virulencia, ha emergido a nivel mundial como una causa importante de ITUs adquiridas en la comunidad (Miranda-Estrada *et al.*, 2017).

9. Estudios de diversidad con ERIC-PCR en cepas de *E. coli* productoras de BLEE

Los patrones fenotípicos de resistencia antimicrobiana, en cepas provenientes de niños con ITU, pueden ser similares o diferentes entre pacientes diferentes y en ocasiones pueden sugerir que varios aislamientos provienen de una misma cepa. La diversidad genética en cepas de UPEC ha mostrado ser elevado. Bajo esta premisa, es necesario realizar una caracterización molecular o genotipificación de las cepas, con herramientas poderosas que aborden la diversidad poblacional. La electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE) ha sido el estándar de oro para la tipificación de la mayoría de los microorganismos de importancia clínica. Sin embargo, es una técnica muy costosa y requiere de tiempo para la obtención de resultados, en la actualidad existen otras técnicas moleculares más sencillas, rápidas y de menor costo, basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que permiten analizar con precisión y reproducibilidad la relación clonal existente entre aislamientos bacterianos (Castro-Alarcón *et al.*, 2009).

El genoma de las enterobacterias contiene secuencias cortas, repetidas y esparcidas, llamadas ERIC (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*), estas secuencias son usadas en tipificación, análisis genético y en la identificación de brotes infecciosos bacterianos intrahospitalarios. Además, el uso del ERIC-PCR se ha aplicado en la detección del origen, las rutas y el alcance de la transmisión de infecciones; y el uso de esta información puede servir para el control de estos brotes (Bailón *et al.*, 2013). La técnica de ERIC-PCR amplifica las regiones que separan las secuencias repetidas, por lo que el polimorfismo resulta de la variabilidad en la repetición de dichas secuencias y de la distancia entre copias contiguas causadas por inserciones o deleciones de ADN (Castro-Alarcón *et al.*, 2009). La confiabilidad de los datos y la reproducibilidad de las observaciones son cruciales para un sólido estudio de patrón de clonalidad. El poder de discriminación (definición: probabilidad promedio de que el marcador utilizado clasifique en 2 tipos distintos a 2 cepas no relacionadas escogidas al azar de la población de un determinado taxón) máximo es 1.0, mientras, el poder de discriminación es de 0.98 para la PFGE (Castro-

Alarcón *et al.*, 2009). Según estudios recientes en cepas clínicas de UPEC productoras de BLEE, el poder de discriminación de la técnica de ERIC-PCR fue de 0.91, esto revela que esta herramienta de tipificación es muy discriminativa, por lo tanto, permite reconocer a los aislamientos no relacionados como distintos. (López-Ramírez *et al.*, 2018).

V. Procedimiento experimental

a) Cepas bacterianas

Se incluyeron 39 cepas clínicas de *E. coli* extraintestinales (ExPEC) caracterizadas como productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y recuperadas de diferentes orígenes: 30 cepas aisladas de niños con ITU complicado (UPEC), tres cepas recuperadas de líquido peritoneal, una cepa proveniente de linfagioma, una cepa de broncoaspirado, una cepa proveniente de esputo y tres cepas obtenidas de fuentes diversas como puntas de catéter, heridas, sondas. Las cepas fueron recuperadas de niños hospitalizados en áreas del HIMFG como: Medicina interna, Nefrología, Ortopedia, Urgencia, Adolescentes, Gastroenterología, Unidad de cuidados Intensivos neonatales (UCIN), Cirugía, Oncología, Reumatología, Neumología y Unidad de Terapia Intensiva pediátrica (UTIP). Las muestras fueron obtenidas por distintas técnicas de acuerdo con el tipo de muestra. Las cepas fueron seleccionadas considerando un cultivo axénico, con una cuenta bacteriana de $>100\ 000$ UFC/mL según el criterio de Kass-Sandford para urocultivos (Kass, 1956). La identificación de *E. coli* BLEE positiva se determinó por MALDI-TOF VITEK MS Microbial Identification System (bioMérieux, 376 Chemin de l'Orme, 69280 Marcy-l'Étoile, France). El procesamiento de la muestra y la identificación se realizó en el Laboratorio Clínico Central del HIMFG como parte del trabajo de rutina de la detección de patógenos causantes de infección en los pacientes hospitalizados por lo que no se requirió el consentimiento informado de los padres o tutores legales de los niños.

b) Resiembra, verificación y conservación a largo plazo (-70°C) de cepas clínicas de UPEC de pacientes hospitalizados

El cultivo de la muestra de orina fue realizado en el área de Bacteriología, del Laboratorio Clínico Central, las placas de cultivo primario en medio cisteína-lactosa-electrolito-deficiente (CLED), fueron recibidas en el Laboratorio de Investigación en Bacteriología Intestinal y se realizó una resiembra en agar MacConkey (MC; Difco-Becton, Dickinson, NJ, USA), para verificar si el cultivo se encontraba puro,

observando la morfología colonial después de la incubación. El agar MacConkey es un medio selectivo para bacilos Gram negativos no exigentes, debido a la incorporación de sales biliares y cristal violeta. Además, contiene lactosa y rojo neutro, lo que permite diferenciar colonias fermentadoras de lactosa. La morfología colonial característica que mostraron las cepas fue: colonias de forma circular, planas o ligeramente convexa, con borde liso, opacas, color rosa intenso (lactosa positiva) y/o colonias de color transparentes (lactosa negativa), algunas presentaban una consistencia mucoide.

Las cepas en cultivo puro se conservaron como un “pool” de células bacterianas, mientras, las cepas que presentaron más de una morfología colonial se conservaron por separado. La identificación de las cepas en congelación se realizó con la clave de la cepa agregando la letra “U” (urinario) y “D” (diversas) y el sufijo 1, 2, 3 dependiendo de las morfologías coloniales congeladas (ej. 720U1 y 720U2). Las cepas puras se sembraron masivamente en agar tripticasa soya (TSA), en forma masiva para generar biomasa, de este medio se realizó la recolección de las cepas al medio de conservación. El medio de conservación se preparó utilizando caldo de cultivo Luria-Bertani (LB: Difco-Becton, Dickinson, NJ, USA) suplementado con suero fetal bovino al 1%. Las cepas se conservaron a largo plazo en ultracongelación a una temperatura de -70°C.

c) Perfil de susceptibilidad/resistencia a antibióticos

La determinación del perfil de resistencia se realizó con el método de Kirby-Bauer a 10 categorías de antibióticos según los lineamientos de la CLSI, 2021. Los antibióticos utilizados fueron: Penicilinas (ampicilina, AM); β -lactámicos/inhibidor de β -lactamasas (amoxicilina-ácido clavulánico, AmC y piperacilina-tazobactam, TZP); Cefalosporinas de 2^a generación (cefalotina, CF) y de 3^a generación (cefotaxima, CTX); Fluoroquinolonas (ofloxacina, OFX y ciprofloxacina, CIP); Carbapenémicos (meropenem, MEM e imipenem, IPM); Aminoglucósidos (gentamicina, GM y amikacina AN); Inhibidores de folatos (trimetoprim-sulfametoxazol, SXT); Nitrofuranos (nitrofurantoína, F/M); Tetraciclinas (tetraciclina, TE); Monobactámicos

(aztreonam, AZT) (CLSI, 2021). La cepa de referencia de *E. coli* ATCC (American Type Culture Collection) 25922 fue utilizada como control, durante todo el ensayo de susceptibilidad. Los criterios utilizados para determinar el estatus de resistencia a los antibióticos, fue el propuesto por Magiorakos et al. (2012), el cual se describe a continuación: las cepas que mostraron resistencia a al menos un antibiótico en 3 o más categorías de antibióticos fueron consideradas multidrogorresistentes (MDR), mientras, una cepa que presentó susceptibilidad a un antibiótico en una, máximo dos categorías de antibióticos se consideró extremodrogoresistentes (XDR) (Magiorakos *et al.*, 2012).

Las cepas de UPEC se recuperaron de ultracongelación a -70°C en agar MacConkey (MC; Difco-Becton, Dickinson, NJ, USA), a 37°C / 24 h. Posteriormente se inoculó 5 mL de caldo Luria-Bertani (LB: Difco-Becton, Dickinson, NJ, USA) con una colonia aislada de gelosa MacConkey y se incubó a 37°C en agitación constante a 200 rpm por ~ 2 h, hasta obtener la turbiedad equivalente al tubo 0.5 del nefelómetro de McFarland, conteniendo 1.5×10^8 UFC/mL. Se sembró de forma masiva en agar Mueller Hinton (MHA; Difco-Becton Dickinson, NJ, USA) con un hisopo impregnado, en 3 direcciones. Finalmente se colocaron los discos de antibióticos a un máximo de 6 sensi discos, para observar por completo el halo de inhibición de cada antibiótico.

d) Detección fenotípica de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE)

Se confirmó la producción fenotípica de las BLEE en la colección de cepas de *E. coli* ExPEC, utilizando dos tipos de pruebas fenotípicas, el ensayo de sinergia con doble disco y el ensayo de Hodge (CLSI, 2019). El ensayo de sinergia de doble disco consiste en el efecto sinérgico entre el ácido clavulánico (inhibidor de BLEE) y los antibióticos β -lactámicos (cefotaxima y ceftazidima), cada cepa problema fue sembrada de forma masiva con un hisopo, a partir de una suspensión bacteriana al 0.5 del nefelómetro de MacFarland, en una placa de gelosa MHA, posteriormente sobre esta se colocaron sensi discos de amoxicilina / ácido clavulánico (Amc 30 μg /10 μg ; Becton Dickinson, BBLTM, USA), y a una distancia de 15 mm, a cada lado

del disco central de Amc, se colocaron discos de cefotaxima (CTX 30 µg; Becton Dickinson, BBLTM, USA) y ceftazidima (CAZ 30 µg; Becton Dickinson, BBLTM, USA). Las pruebas se incubaron a 37°C /18-24 h y se evaluó el resultado. Un resultado positivo fue la evidencia de la sinergia (aumento en el halo de inhibición) entre los halos formados por el disco de Amc (antibiótico combinado con inhibidor de β-lactamasas) y los discos de CTX y CAZ (cefalosporinas de 3ª generación). Una prueba negativa no mostro un efecto sinérgico entre los discos, observándose halos de inhibición completamente circulares para cada antibiótico.

La prueba fenotípica confirmatoria de la producción de BLEE, fue el ensayo de Hodge, que muestra el efecto de crecimiento de una cepa de referencia (*E. coli* ATCC 25922) sensible, ante la inactivación del antibiótico por acción de la BLEE (CLSI, 2019). Este ensayo consistió en sembrar masivamente la cepa de *E. coli* ATCC 25922 en una placa de agar Mueller Hinton y en el centro de esta se colocó un disco de CTX 30 µg (Becton Dickinson, BBLTM, USA) o CAZ 30 µg (Becton Dickinson, BBLTM, USA), de manera perpendicular al disco se sembraron las cepas problema (4 por placa) estriando en línea recta, desde el borde del disco (sin tocarlo) hacia afuera (CLSI, 2016). Un resultado positivo fue el crecimiento abundante de la cepa de referencia (sensible a cefalosporinas) alrededor de la línea de crecimiento de la cepa problema, indicativo de la hidrolisis del antibiótico por acción de una BLEE. El resultado negativo fue falta de crecimiento abundante de la cepa de referencia de *E. coli* ATCC 25922, por acción del antibiótico ante la presencia de una BLEE negativas (CLSI, 2016). Las cepas de referencia de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 (BLEE positiva) y *E. coli* ATCC 25922 (BLEE negativa) fueron utilizadas como controles (CLSI, 2016).

- e) Extracción, purificación y cuantificación de DNA genómico por Kit comercial (Wizard® Genomic DNA Purification Kit Promega)

La extracción de DNA genómico se realizó en 39 cepas de UPEC caracterizadas como BLEE positivas. El protocolo de extracción fue el sugerido por el fabricante. Previamente, las cepas (2-3 colonias) se inocularon en 35 mL de medio LB en tubos

tipo Falcón y se incubaron a 37°C / 24 h. Pasado este tiempo, los tubos se centrifugaron a 3500 rpm / 10 min. Se decantó el sobrenadante y el pellet se resuspendió con 1 mL de agua inyectable estéril. La suspensión resultante se pasó a un tubo tipo eppendorf, después se centrifugaron los tubos y se decantó el sobrenadante. Los botones bacterianos fueron resuspendidos con el sobrenadante restante, utilizando un vortex (Benchmark®, Taiwan) a velocidad mediana, y se procedió a la extracción de DNA genómico. Las instrucciones del Wizard® Genomic DNA Purification kit (Promega®), se siguieron como se indica a continuación: se agregaron 600 µL de “Nuclei Lysis Solution” a cada botón bacteriano, pipeteando gentilmente, posteriormente se incubó a 80°C / 5 min. Pasado este tiempo, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se añadieron 3 µL de “RNAsa solution”, se mezcló por inversión y la mezcla se incubó a 37°C / 15-60 min. Finalizado el tiempo de incubación, la mezcla de extracción se dejó enfriar a temperatura ambiente y se añadieron 200 µL de “Protein Precipitation Solution”, y se incubó a -20°C / 5 min. Posteriormente, se realizaron tres lavados, con 500 µL de cloroformo / alcohol isoamílico (24:1), centrifugando en cada ocasión a 14000 rpm / 2 min, para recuperar la fase acuosa superior en un tubo eppendorf nuevo. Una vez recuperado el último lavado se añadieron 600 µL de isopropanol en frío y se dejó precipitar el DNA a -20°C / 24 h. Posteriormente, se centrifugó a 14000 rpm/ 10 min y se decantó el sobrenadante. Se realizaron tres lavados con 600 µL de etanol al 70 % y se centrifugó a la misma velocidad en cada ocasión. Finalmente, se retiró todo el sobrenadante y se dejaron secar los DNAs aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente.

El pellet de DNA se rehidrató con 100 µL de “Rehydration Solution” y se incubó a 55°C/ 15 min en un baño metabólico, agitando varias veces hasta la completa disolución de la pastilla. Se cuantificó la concentración del DNA genómico extraído (µg / mL), en el espectrofotómetro NANODROP 2000c (Thermo Scientific™), y se verificó su integridad por corrimiento electroforético en gel de agarosa al 1% en una cámara de electroforesis (Biorad®) y se visualizó con un documentador (Biomedical®). Se ajustó la concentración de cada uno de los DNAs a 200 ng/µL,

para las reacciones de PCR de punto final y múltiple. El DNA genómico se mantuvo en congelación a -20°C hasta su uso.

La identificación de los genes de interés que se mencionan a continuación se realizaron diferentes variantes de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en un termociclador Veriti 96 well Thermal Cycler (Applied Biosystems®, Singapore), las secuencias de los primers forward y reverse utilizados, así como las condiciones de temperatura, tiempo y número de ciclos, programadas en el equipo, se encuentran descritas en la Tabla 1. para cada paso de la PCR, estandarizados previamente en el laboratorio y los volúmenes de cada uno de los reactivos utilizados en cada una de las PCR se encuentran en la tabla 2.

Tabla 1. Iniciadores y condiciones de amplificación para la determinación de ERIC-PCR, clona O25b, grupo y subgrupo filogenético, factores de virulencia asociados a la patogénesis e Integrones de cepas clínicas de *E. coli* productoras de BLEE.

Gen	Primers	Secuencia del iniciador 5' – 3'	Producto (pb)	Condiciones de PCR	Referencia
ERIC-PCR	ERIC-F ERIC-R	ATCTAAGCTCCTGGGGATTACAC AAGTAAGTGAAGTGGGGTGAGCG	Producto variable	1 ciclo a 94°C/ 2 min 30 ciclos a 94°C/ 1 min 52°C/ 1 min 72°C/ 4 min 72°C/ 5 min 4°C/ ∞ min	Ardakani and Ranjbar, 2016; Luna-Pineda <i>et al.</i> , 2018
<i>chuA</i>	<i>chuA</i> -F <i>chuA</i> -R	GACGAACCAACGGTCAGGAT TGCCGCCAGTACCAAAGACA	279	1 ciclo a 95°C/ 5 min	Clermont <i>et al.</i> , 2000; Ochoa <i>et al.</i> 2016
<i>yjaA</i>	<i>yjaA</i> -F <i>yjaA</i> -R	TGAAGTGTGTCAGGAGACGCTG TGGAGAATGCGTTCCTCAAC	211	25 ciclos a 95°C/1 min 55°C/ 1 min 72°C/ 2 min 72°C/ 5 min 4°C/ ∞ min	
<i>tspE4.C2</i>	<i>TspE4.C2</i> -F <i>TspE4.C2</i> -R	GAGTAATGTCGGGGCATTCA CGCGCCAACAAAGTATTACG	152	1 ciclo a 95°C/ 5 min	
<i>hlyA</i>	<i>hlyA</i> -F <i>hlyA</i> -R	CGTGGACACAGCTGCCAGCA TGCAGCGGTGGCGGCATCAT	789	1 ciclo a 95°C/ 5 min	Tiba <i>et al.</i> 2008; Ochoa <i>et al.</i> 2016
<i>iutD</i>	<i>iutD</i> -F <i>iutD</i> -R	TACCGGATTGTCATATGCAGACCGT AATATCTTCTCCAGTCCGGAGAAG	602	25 ciclos a 95°C/1 min 56°C/1 min 72°C/1 min 72°C/5 min 4°C/∞ min	
<i>fimH</i>	<i>fimH</i> -F <i>fimH</i> -R	TGCAGAACGGATAAGCCGTGG GCAGTCACCTGCCCTCCGGTA	508	1 ciclo a 95°C/5 min	
<i>csgA</i>	<i>csgA</i> -F <i>csgA</i> -R	GCCAGTATTTTCGCAAGGTGC GGTGTACATATCCCCTTGCTGG	750	1 ciclo a 95°C/5 min	Tiba <i>et al.</i> 2008; Luna <i>et al.</i> 2016; Ochoa <i>et al.</i> 2016
<i>satA</i>	<i>satA</i> -F <i>satA</i> -R	GTTGTCTCTGGCTGTTGC AATGATGTTCTCCAGAGC	501	30 ciclos a 95°C/1 min 56°C/30 seg 72°C/1 min 72°C/5 min 4°C/∞ min	
<i>fyuA</i>	<i>fyuA</i> -F <i>fyuA</i> -R	GCGCATTGCTGATACTGTTG CATCAGACGATAAGCATGAGCA	272	1 ciclo a 95°C/2 min	
<i>motB</i>	<i>motB</i> -F <i>motB</i> -R	GCGGATTTTTACCGCACGC GGATCTGCTGGCTCTGC	864	1 ciclo a 95°C/2 min	

Gen	Primers	Secuencia del iniciador 5' – 3'	Producto (pb)	Condiciones de PCR	Referencia
tosA	<i>tosA-F</i> <i>tosA-R</i>	GCACAGCATAACGGGAAAAT CCAGCATGTTACCACGAATG	589	30 ciclos 94°C/30 seg 49°C/1 min 72°C/3 min 72°C/5 min 4°C/∞ min	Ochoa <i>et al.</i> 2016; Luna <i>et al.</i> 2016
fliC	<i>fliC-F</i> <i>fliC-R</i>	CCAGTCTGCGCTGTGCGAG CACGTTACGCGCGTTGAAC	349		
papGI	<i>papGI-F</i> <i>papGI-R</i>	CAACCTGCTCTCAATCTTTACTG CATGGCTGGTTGTTCTAAACAT	692	1 ciclo a 94°C/5 min 30 ciclos 94°C/1 min 53°C/1 min 72°C/1 min 72°C/5 min 4°C/∞ min	Tiba <i>et al.</i> , 2008
papGII	<i>papGII-F</i> <i>papGII-R</i>	GGAATGTGGTGATTACTCAAAGG TCCAGAGACTGTTCAAGAAGGAC	562		
papGIII	<i>papGIII-F</i> <i>papGIII-R</i>	CATGGCTGGTTGTTCTAAACAT TCCAGAGACTGTGCAGAAGGAC	421		
intI3	<i>Int3-F</i> <i>Int3-R</i>	GCCTCCGGCAGCGACTTTTCAG ACGGATCTGCCAAACCTGACT	979	1 ciclo a 94 °C/5 min 30 ciclos a 94 °C/1 min 53 °C/1 min 72 °C/1 min 72 °C/5 min 4 °C/∞ min	Gundogdu <i>et al.</i> , 2011
intI2	<i>Int2-F</i> <i>Int2-R</i>	CACGGATATGCGACAAAAGGT GATGACAACGAGTGACGAAATG	788		
intI1	<i>Int1-F</i> <i>Int1-R</i>	CAGTGGACATAAGCCTGTTC CCCGAGGCATAGACTGTA	160		
RV-int1	<i>Hep58-F</i> <i>Hep59-R</i>	GTAGGGCTTATTATGCACGC CGGGATCCCGGACGGCATGCA	Producto variable	1 ciclo a 94 °C/5 min 30 ciclos a 94 °C/30 s 55 °C/ 1 min s 72 °C/4 min 72 °C/10 min 4 °C/∞ min	Dillon <i>et al.</i> , 2005
RV-int2	<i>Hep74-F</i> <i>Hep51-R</i>	CGGGATCCCGGACGGCATGCACGATTTGTA GATGCCATCGCAAGTACGAG	Producto variable		
O25b	<i>papB-F</i> <i>papB-R</i>	TCCAGCAGGTGCTGGATCGT GCGAAATTTTTGCGCGTACTGT	347	1 ciclo a 95°C/ 5 min 35 ciclos a 95°C/ 1 min 65°C/ 1 min 72°C/ 1.30 min 72°C/ 5 min 4°C/ ∞ min	Clermont <i>et al.</i> , 2009
	<i>trpA-F</i> <i>trpA-R</i>	GCTACGAATCTCTGTTTGCC GCAACGCGGCCTGGCGGAAG	427		
bcsA	<i>bcsA-F</i> <i>bcsA-R</i>	GAAGAATTCCTGACGCTGGCTAA TGAAAGCTTGGAACGCACTCATC	2,767	1 ciclo a 94 °C/5 min	Saldaña <i>et al.</i> ,

Gen	Primers	Secuencia del iniciador 5' – 3'	Producto (pb)	Condiciones de PCR	Referencia
				30 ciclos a 94 °C/1 min 56 °C/1 min 72 °C/2 min 72 °C/5 min 4 °C/∞ min	2009
<i>ecpA</i>	<i>ecpA</i> -F <i>ecpA</i> -R	TGAAAAAAAAAGGTTCTGGCAATAGC CGCTGATGAGGAGAAAGTGAA	510	1 ciclo a 94 °C/5 min 30 ciclos a 94 °C/1 min 56 °C/1 min 72 °C/2 min 72 °C/5 min 4 °C/∞ min	Saldaña <i>et al.</i> , 2014
<i>cnf1</i>	<i>cnf1</i> -F <i>cnf1</i> -R	GAACTTATTAAGGATAGT CATTATTTATAACGCTG		1 ciclo a 94 °C/5 min 30 ciclos a 94 °C/1 min 39.5 °C/1 min 72 °C/2 min 72 °C/5 min 4 °C/∞ min	Tiba <i>et al.</i> , 2008
<i>motA</i>	<i>motA</i> -F <i>motA</i> -R	GCGGATTTTTACCGCACGC GGATCTGCTGGCTCTGC	632	1 ciclo 94 °C/5 min 25 ciclos a 94°C/1min 62 °C/1 min 72 °C/1 min 72 °C/5 min	Luna <i>et al.</i> ,2018

Genes asociados con fimbria (*fimH*, *csgA*, *ecpA*, *papGI*, *papGII* y *papGIII*), movilidad (*motA*, *motB* y *fliC*), captadores de hierro (*iutD*, *fyuA* y *chuA*), celulosa (*bcsA*), toxinas (*cnf1*, *hlyA*, *tosA* y *satA*), genes asociados a la resistencia (integrasa clase 1, 2, 3 y región variable de los integrones).

Tabla 2. Volúmenes utilizados en cada mezcla de PCR, para la determinación de ERIC-PCR, clona O25b/ST131, grupo y subgrupo filogenético, factores de virulencia asociados a la patogénesis e Integrones, de cepas clínicas de *E. coli* productoras de BLEE.

Gen	Master Mix® (µL)	Iniciadores F / R [1 µM] (µL)	MgCl ₂ [50mM] (µL)	H ₂ O libre de nucleasas (µL)	DNA molde [200 ng/µL] (µL)	Volumen final (µL)
ERIC-PCR	6.25	0.5 / 0.5	0.7	3.55	1.0	12.5
<i>trpA</i> <i>papB</i>	6.25	0.8 / 0.8	2.975	0.675	1.0	12.5
<i>chuA</i> <i>yjaA</i> <i>tspE</i>	6.25	0.7 / 0.7	0.0	1.05	1.0	12.5
<i>hlyA</i> <i>iutD</i> <i>fimH</i>	6.25	0.7 / 0.7	0.0	1.05	1.0	12.5
<i>csgA</i> <i>satA</i> <i>fyuA</i>	7.5	0.7 / 0.7	0.8	1.5	1.0	15.0
<i>motB</i> <i>tosA</i> <i>fliC</i>	5.0	0.8 / 0.8	1.2	2.2	1.0	14.2
<i>papGI</i> <i>papGII</i> <i>papGIII</i>	6.25	0.7 / 0.7	0.0	1.05	1.0	12.5
<i>bcsA</i>	6.25	1.0 / 1.0	0.0	3.25	1.0	12.5
<i>ecpA</i>						
<i>cnf1</i>						
<i>motA</i>						
<i>int1</i> <i>int2</i> <i>int3</i>	6.25	0.7 / 0.7	0.0	1.05	1.0	12.5
<i>RV-int1</i>						
<i>RV-int2</i>						

f) Identificación de grupos y subgrupos filogenéticos

Se determinó el grupo filogenético de cada una de las cepas clínicas de UPEC mediante la presencia y ausencia de los genes *chuA*, *yjaA* y *tspE4.C2*, por PCR múltiple, utilizando primers específicos (Clermont *et al.* 2000; Ochoa *et al.*, 2016), En la tabla podemos observar un esquema de identificación de los grupos filogenéticos mediante la presencia/ausencia de los genes *chuA*, *yjaA* y *tspE4.C2*.

Tabla 3. Esquema de identificación del grupo filogenético.

Grupo	Subgrupo	<i>chuA</i>	<i>yjaA</i>	<i>tspE4</i>
-------	----------	-------------	-------------	--------------

A	A ₀	Ausente	Ausente	Ausente
	A ₁		Presente	
B1	B ₁		Ausente	Presente
B2	B ₂₁	Presente	Presente	Ausente
	B ₂₂			Presente
D	D ₁		Ausente	Ausente
	D ₂			Presente

La presencia de los genes en los recuadros de color azul y la ausencia en color blanco. El fenotipo para el subgrupo A₀ es la ausencia de los 3 genes, el subgrupo A₁ presenta solo el gen *yjaA* (+), el subgrupo B1 presenta solo el gen *tspE4* (+), en el subgrupo B₂₁ se encuentra ausente el gen *tspE4* (-) y presentes los genes *chuA* (+) e *yjaA* (+), el subgrupo B₂₂ presenta los tres genes *chuA* (+), *yjaA* (+) y *tspE4* (+), el filogrupa D₁ presenta el gen *chuA* (+) y la ausencia de *yjaA* (+) y *tspE4* (-), finalmente el subgrupo D₂ presenta el gen *chuA* (+) y *tspE4* (+) con la ausencia del gen *yjaA* (-) (Clermont *et al.*, 2000).

Las reacciones de amplificación se realizaron siguiendo las indicaciones sugeridas por el kit PCR Master Mix (Promega®), a un volumen final de 12.5 µL. Todas las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador Veriti 96 well Thermal Cycler (Applied Biosystems®, Singapore). Los iniciadores, condiciones de amplificación y de reacción se muestran en las tablas 1 y 2. Los productos amplificados se separaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.8 % usando un marcador de peso molecular de 100 pb, una vez cargadas las muestras en el gel en una cámara de electroforesis (Biorad®), este se corrió a 95 V por 45 min utilizando una fuente de poder (Biorad®). Posteriormente los geles fueron teñidos por 15 min en una solución de bromuro de etidio y digitalizados en un fotodocumentador (Biomedical®), para la identificación de bandas.

g) Identificación de la clona O25b en cepas clínicas de *E. coli* y UPEC productoras de BLEE

Se determinó la presencia de la clona O25/ST131 mediante la utilización del ensayo basado en PCR múltiple, para el gen *papB* (347 pb), específico para los aislados pertenecientes al grupo clonal O25b/ST131 y *trpA* (427 pb) que está presente en todas las cepas de *E. coli* y por lo tanto sirve como control de PCR (Clermont *et al.*,

2009). Los iniciadores, condiciones de amplificación y de reacción se muestran en las tablas 1 y 2. Los productos amplificados se separaron electroforéticamente en un gel de agarosa al 1.8 % usando un marcador de peso molecular de 100 pb (Promega®), y se corrieron como previamente se indicó. Luego, los geles fueron teñidos por 15 min en una solución de bromuro de etidio, se digitalizaron y visualizaron para determinar las bandas.

- h) Identificación de genes de virulencia, genes de integrasa clase 1, 2 y 3, así como la región variable en clase 1 y 2 en cepas de UPEC productoras de BLEE

La identificación de genes asociados a factores de virulencia (*fimH*, *csgA*, *ecpA*, *papG* y sus variantes I, II y III, *motA*, *motB*, *fliC*, *iutD*, *fyuA*, *chuA*, *bcsA*, *cnf1*, *hlyA*, *tosA* y *satA*) en las cepas de UPEC productoras de BLEE (Ochoa *et al.*, 2016; Xicohtencatl-Cortes *et al.*, 2018), se llevó a cabo a través de PCR punto final y PCR múltiple, utilizando como controles *E. coli* CFT073 y *E. coli* clínica 94U-090113. Además, la identificación de los genes de integrasa clase 1 y 2, se realizó por PCR múltiple (*int1*, *int2* e *int3*); las cepas clínicas de UPEC 674U1-0612 (integrasa clase 2) y 440U1 (integrasa clase 1) se utilizaron como controles positivos (Ochoa *et al.*, 2016). La región variable (entre *attC* y *attD*) de ambos integrones fue amplificada por PCR de punto final. En los ensayos de la región variable del integrón clase 1 (RV-*int1*) y 2 (RV-*int2*) se utilizaron como controles positivos las cepas clínicas 440U1 y 674U1-0612 respectivamente, previamente reportadas (Ochoa *et al.*, 2016). Los iniciadores, condiciones de amplificación y de reacción se muestran en las tablas 1 y 2. Los productos amplificados se separaron electroforéticamente como se indicó previamente utilizando un marcador de talla molecular de 100 pb para los genes *fimH*, *csgA*, *ecpA*, *papG* y sus variantes I, II y III, *motA*, *motB*, *fliC*, *iutD*, *fyuA*, *chuA*, *cnf1*, *hlyA*, *tosA*, *satA*, *int1*, *int2* e *int3*, y un marcador de talla molecular de 1kb para los genes *bcsA*, RV-*int1* y RV-*int2*.

i) Tipificación molecular de cepas de *E. coli* y UPEC productoras de BLEE por el método ERIC-PCR

La tipificación molecular de los aislados de UPEC se realizó mediante la reacción de ERIC-PCR (Ardakani and Ranjbar, 2016), modificada en el Laboratorio de Investigación en Bacteriología Intestinal, HIMFG (Luna-Pineda *et al.*, 2018). Los iniciadores, condiciones de amplificación y de reacción se muestran en las tablas 1 y 3. Los productos amplificados se separaron electroforéticamente en un gel de agarosa al 1.5 % usando un marcador de talla molecular de 1 kb, una vez cargadas las muestras en el gel, este se corrió a 95 V por 90 min. Luego los geles fueron teñidos por 15 minutos en una solución de bromuro de etidio. La cuantificación de bandas se expresó en una matriz de datos de presencia (1) / ausencia (0) de la banda identificada. La matriz de datos generada en Excel se ingresó en el sitio: http://insilico.ehu.es/dice_upgma/, y se dibujaron los dendrogramas (Ardakani and Ranjbar, 2016)

VI. Resultados

Origen de las cepas clínicas de *E. coli* productoras de BLEE

Las 39 cepas clínicas de *E. coli* productoras de BLEE, incluidas en este estudio, fueron aisladas principalmente de orina 76.92% (30 / 39) de niños hospitalizados con ITU complicado, estas cepas fueron consideradas como UPEC. Además, se incluyeron: 3 cepas (7.69%) recuperadas de líquido peritoneal, una cepa (2.56%) proveniente de linfangioma, una cepa (2.56%) de broncoaspirado, una cepa (2.56%) proveniente de esputo y tres cepas (7.69%) obtenidas de fuentes diversas como puntas de catéter, heridas, sondas. Todas las cepas fueron recuperadas de niños hospitalizados en áreas del HIMFG. Las cepas fueron aisladas de diversos servicios de atención en el HIMFG, como se indica a continuación: Nefrología en 17.95% (7 / 39), Urgencias y Unidad de Cuidados Intensivos Neonatal (UCIN) con el 12.85% (5 / 39) respectivamente, Oncología en 10.26% (4 / 39), Cirugía y Reumatología en 7.69% (3 / 39) respectivamente, Medicina Interna y Gastroenterología con 5.13% (2 / 39) respectivamente, Ortopedia, servicio de Adolescentes, Neumología y Unidad de Terapia Intensiva Pediátrica (UTIP), con 2.56% (1 / 39) cada una y otras áreas 10.26% (4 / 39). En la figura 7, se puede observar la distribución del tipo de muestra con relación al área del HIMFG donde fue aislada.

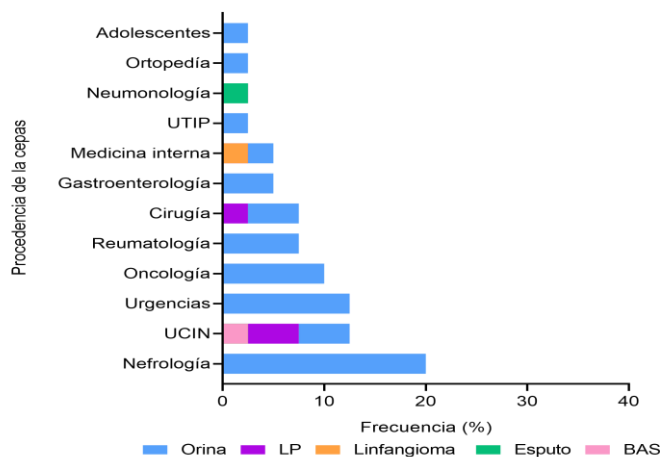


Figura 7. Frecuencia y relación entre el área de aislamiento de las cepas y el tipo de muestra. UTIP: Unidad de Terapia Intensiva, UCIN: Unidad de Cuidados Intensivos, LP: líquido peritoneal, BAS: broncoaspirado.

Perfil de susceptibilidad de cepas de *E. coli* y UPEC productoras de BLEE

El perfil de susceptibilidad a 17 antibióticos, incluidos en diez familias diferentes, que mostraron las cepas de UPEC y *E. coli* productoras de BLEE fue principalmente MDR en 74.36% (29 / 39) y XDR en 25.64% (10 / 39). Cepas clínicas de *E. coli* PDR no fueron identificadas. Teniendo un perfil general de MDR-7 (multidrogosresistentes a 7 familias de antibióticos) en 46.15% (18 / 39). La distribución de la resistencia en base al número de categorías de antibióticos a las que fueron resistentes se presenta en la figura 8.

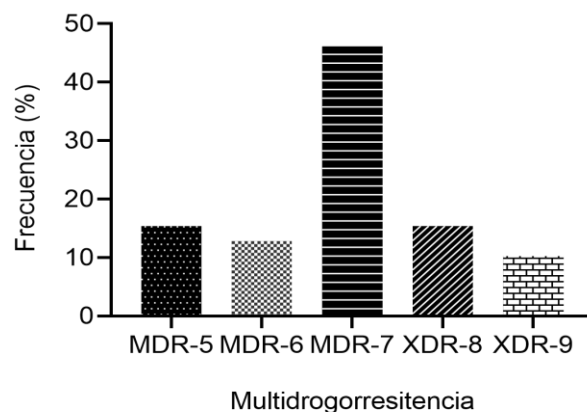


Figura 8. Frecuencia de la multidrogosresistencia a 9 categorías de antibióticos. MDR-5 (multidrogosresistencia a 5 categorías de antibióticos), MDR-6 (multidrogosresistencia a 6 categorías de antibióticos), MDR-7 (multidrogosresistencia a 7 categorías de antibióticos), XDR-8 (extremodrogosresistencia a 8 categorías de antibióticos), XDR-9 (extremodrogosresistencia a 9 categorías de antibióticos).

El mayor porcentaje de resistencia a los antibióticos se menciona a continuación: penicilinas, AM en un 100% (39 / 39), cefalosporinas de 2^a y 3^a generación: CF, CTX, CRO, y CAZ en general mayor a 87%, monobactámicos como: ATM en un 97.43% (38 / 39) y a fluoroquinolonas como: CIP y OFX mayor a 80%.

Los antibióticos con mayor sensibilidad en las cepas de UPEC y *E. coli* productoras de BLEE, fueron: carbapenémicos como: IMP y MEM mayor a un 76%, aminoglucósidos: AN y GM mayor a un 50% y nitrofuranos: FM en un 84.62% (33 / 39). En la tabla 4, podemos observar la frecuencia del perfil de resistencia a 10

categorías de antibióticos de las cepas clínicas utilizadas de acuerdo con los filogrupos previamente identificados.

Tabla 4. Perfil de resistencia a 10 categorías de antibióticos, de acuerdo con los grupos filogenéticos de cepas clínicas de *E. coli* productoras de BLEE.

Antibiótico	Frecuencia de los grupos filogenéticos				Resistencia total
	A ₁ % (n=4)	B ₂ % (n=9)	D ₁ % (n=10)	D ₂ % (n=16)	
Penicilinas					
AM 10 µg	100 (4)	100 (9)	100 (10)	100 (16)	100 (39)
β-lactámico / combinación de agentes inhibidores					
AmC 20/10 µg	50 (2)	44.44 (4)	60 (6)*	18.75 (3)*	38.46 (15)
TZP 100/10 µg	75 (3)	77.78 (7)	80 (8)	62.5 (10)	71.79 (28)
Cefalosporinas 2 ^a y 3 ^a generación					
CF 30 µg	100 (4)	100 (9)	100 (10)	100 (16)	100 (39)
CTX 30 µg	100 (4)	100 (9)	100 (10)	87.5 (14)	94.87 (37)
CRO 30 µg	100 (4)	100 (9)	100 (10)	93.75 (15)	97.44 (38)
CAZ 30 µg	100 (4)	100 (9)	90 (9)	75 (12)	87.18 (34)
Monobactámicos					
ATM 30 µg	100 (4)	100 (9)	100 (10)	93.75 (15)	97.44 (38)
Carbapenémicos					
IPM 10 µg	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
MEM 10 µg	75 (3)***	22.22 (2)*	10 (1)*	18.75 (3)*	23.08 (9)
Aminoglucósidos					
GM 10 µg	50 (2)	66.67 (6)*	20 (2)*	50 (8)	46.15 (18)
AN 10 µg	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Tetraciclinas					
Te 30 µg	100 (4)	66.67 (6)	90 (9)	68.75 (11)	76.92 (30)

Frecuencia de los grupos filogenéticos					
Antibiótico	A ₁ % (n=4)	B ₂ % (n=9)	D ₁ % (n=10)	D ₂ % (n=16)	Resistencia total
Fluoroquinolonas					
OFX 5 µg	100 (4)*	100 (9)*	50 (5)***	87.5 (14)*	82.05 (32)
CIP 5 µg	100 (4)	100 (9)	100 (10)	100 (16)	100 (39)
Inhibidores de Folatos					
SXT 1.25/23.7 µg	75 (3)*	11.11 (1)***	100 (10)**	56.25 (9)**	58.97 (23)
Nitrofuranos					
FM 300 µg	50 (2)**	0 (0)**	40 (4)**	0 (0)**	15.38 (6)

AM 10 µg (ampicilina), Amc 20/10 µg (amoxicilina-clavulanato), TZP 100/10 µg (piperacilina-tazobactam), CF 30 µg (cefalotina), CTX 30 µg (cefotaxima), CRO 30 µg (ceftriaxona), CAZ 30 µg (ceftazidima), ATM 30 µg (aztreonam), IPM 10 µg (imipenem), MEM 10 µg (meropenem), GM 10 µg (gentamicina), AN 10 µg (amikacina), Te 30 µg (tetraciclina), OFX 5 µg (ofloxacina), CIP 5 µg (ciprofloxacino), SXT 1.25/23.7 µg (trimetoprim-sulfametoxazol), FM 300 µg (nitrofurantoina). El número dentro del paréntesis corresponde al número de cepas que presentaron resistencia al antibiótico y el número que antecede al paréntesis es la frecuencia en % de la resistencia por grupo filogenético. *Estadísticamente significativo (p<0.05), Amc (p= 0.0401*) MEM (p=0.0355*) (p=0.097*) (p=0.0170*) GM (p=0.0480*), OFX (p= 0.0206*) (p=0.0036*) (p=0.0114*) STX (p=0.0116*) (p<0.0001*) (p=0.0102*) (p=0.0101*), FM (p=0.0114*) (p=0.0069*) (p=0.0084*) (p=0.0030*).

Presencia de β-lactamasas de espectro extendido (BLEE)

Las pruebas fenotípicas (figuras 9 y 10) para la detección y confirmación de la producción de β-lactamasas de espectro extendido (BLEE) de la colección de cepas, mostraron que el 100% (39 / 39) de las cepas eran productoras de BLEE.

En las figuras 9 y 10 se observan las pruebas fenotípicas realizadas, el ensayo de sinergia entre dos discos y el ensayo de Hodge, respectivamente.

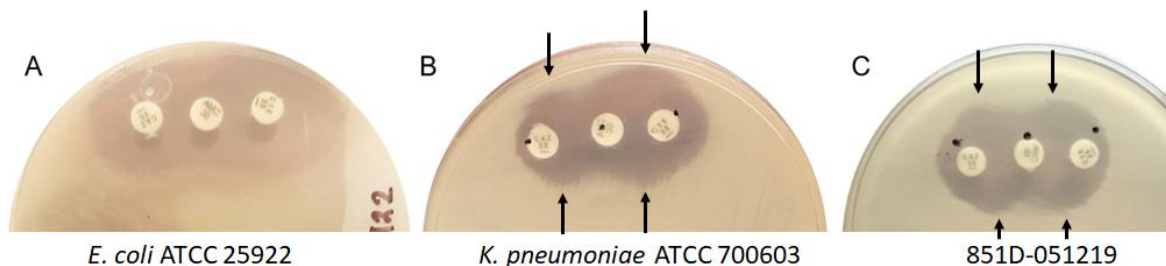


Figura 9. Prueba fenotípica de BLEE por ensayo de sinergia entre dos discos. A) Cepa control negativo *E. coli* ATCC 25922, BLEE negativo. B) Cepa control *K. pneumoniae* ATCC 700603, BLEE

positiva. C) Cepa clínica *E. coli* 851D-220819, BLEE positiva. Antibióticos ceftazidima (CAZ 30 µg), amoxicilina / ácido clavulánico (Amc 20 / 10 µg) y cefotaxima (CTX 30 µg). Una prueba positiva de la producción de BLEE se observa como un aumento en el halo de inhibición de la zona intermedia entre el disco de Amc con inhibidor de BLEE y los discos de CAZ y CTX.

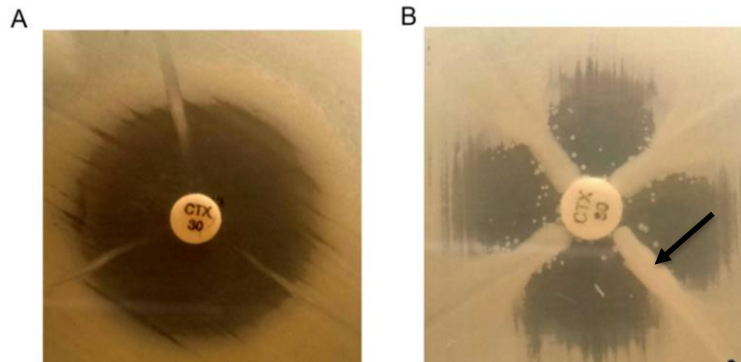


Figura 10. Prueba confirmatoria fenotípica de BLEE por ensayo de Hodge. A) Prueba negativa, cepa control negativo *E. coli* ATCC25922. B) Prueba positiva, cepa control positivo *K. pneumoniae* ATCC 700603. Una prueba positiva de la producción de BLEE se observa crecimiento de la cepa de referencia *K. pneumoniae* ATCC 700603 resistente a CTX, alrededor del crecimiento de la cepa problema. La flecha indica el crecimiento de una prueba positiva a BLEE.

Grupos y subgrupos filogenéticos de UPEC

Previo a los ensayos de PCR, se verificó la integridad del DNA genómico por medio de electroforesis en un gel de agarosa 1 % (100 V / 30 min), teñido con bromuro de etidio (concentración final 0.05 µg/ µL). En la figura 11 se observa el electroferograma del gel de integridad.

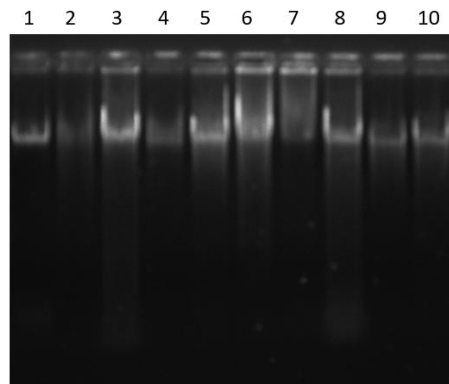


Figura 11. Electroferograma de DNA's genómicos de cepas clínicas de UPEC. Corrimiento electroforético de cepas clínicas de UPEC en gel de agarosa al 1 % (100v/30min), teñido con

bromuro de etidio [0.05 µg / µL]. Carril 1, cepa 42U-051219. Carril 2, cepa 583U2-051219. Carril 3, cepa 915U1-051218. Carril 4, cepa 852U-051219. Carril 5, cepa 855U-051219. Carril 6, cepa 937U-051219. Carril 7, cepa 833U2-051219. Carril 8, cepa 530U-051219. Carril 9, cepa 833U1-051218. Carril 10, cepa 879U-051219.

Las cepas de UPEC pertenecieron a los siguientes grupos filogenéticos: A₁ en 10.26% (4 / 39), B₂ en 23.08 % (9 / 39), D₁ en 25.64% (10 / 39) y D₂ en 41.03% (16 / 39). El filogrupo con mayor frecuencia fue el D₂ mientras que el filogrupo en menor frecuencia fue el A₁. La figura 12 se muestra la electroforesis de algunos productos de PCR.

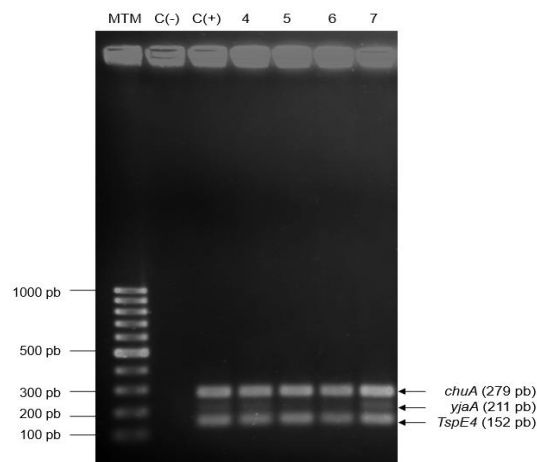


Figura 12. Electroferograma de PCR múltiple para los genes *chuA*, *yjaA* y *tspE4* para la identificación de los grupos filogenéticos de cepas clínicas de *E. coli* y UPEC productoras de BLEE. Corrimiento electroforético en gel de agarosa 1.8% (90v / 45min), teñido con bromuro de etidio [0.05µg/ µL], se corrieron 5 µL de los productos de PCR. Carril 1, MTM: Marcador de talla molecular Ladder 100 pb (Promega®). Carril 2, C(-): Control negativo. Carril 3, C(+): Control positivo (CFT073) para los genes (*chuA*, *yjaA* y *TspE4*). Carril 4, cepa 895U-051219 Carril 5, cepa 583U2-051219 Carril 6, cepa 855U-051219 Carril 7, cepa 937U-051219. Todas las cepas en el gel fueron positivas a *chuA*, *yjaA* y *tspE4*.

De acuerdo con el tipo de muestra, de donde se obtuvieron las cepas, estas se categorizaron como UPEC y *E. coli* extraintestinales de origen diverso, y se realizó un análisis de relación entre los grupos filogenéticos y el tipo de cepa. Los resultados mostraron que el 100% de las cepas de filogrupo A y B₂ fueron UPEC, en el grupo D₁, el 60% eran UPEC y el 40% restante eran diversas, en el filogrupo D₂ se encontraron 62.5% UPEC y 37.5% diversas. En la figura 13 se observa la

distribución por grupo filogenético de las cepas identificadas como UPEC y *E. coli* de origen diverso.

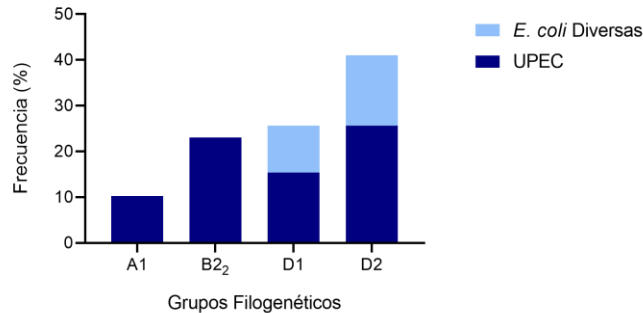


Figura 13. Distribución de las cepas de UPEC y *E. coli*, en relación con los grupos filogenéticos.

Presencia de la clona O25b/ST131 en cepas clínicas de *E. coli* y UPEC productoras de BLEE

El gen *trpA* (427pb) que codifica para la enzima triptófano sintasa, se encontró presente en el 100% (39 / 39) de las cepas BLEE positivas (BLEE⁺), y el gen *pabB* (347pb) específico en la clona epidémica O25b/ST131 se encontró en el 53.85% (21 / 39) de las cepas de UPEC y *E. coli* BLEE⁺. La frecuencia de la clona O25b/ST131 en relación con los grupos filogenéticos, en la colección de cepas clínicas, fue de 23.08% (9 / 39) pertenecen al filogrupo B2₂, 25.64 % (10 /39) para el D₂, y en el mismo porcentaje 2.56% (1 / 39) para el A₁ y D₁, respectivamente, esta distribución se muestra en la figura 14. La imagen del gel de electroforesis de algunos productos de la PCR doble para el gen *pabB* y *trpA* se muestra en la figura 15.

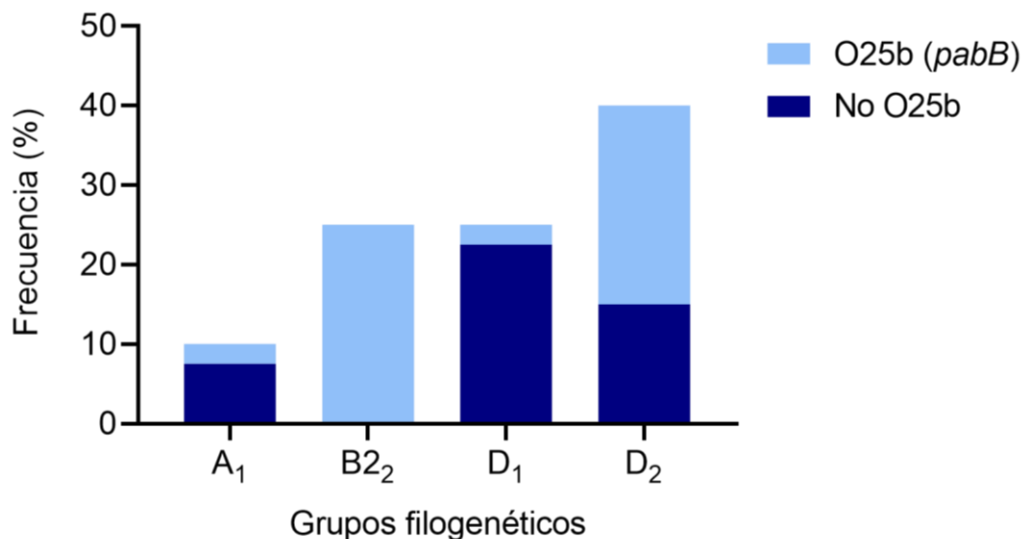


Figura 14 Distribución de los grupos, subgrupos filogenéticos de cepas de UPEC, y la presencia de la clona O25b. Según el grupo filogenético, se observa con mayor frecuencia el filogrupo D₂ (25.64 %), seguido del filogrupo B₂₂ (23.08%), en la misma frecuencia el filogrupo D₁ y A₁ (2.56%).

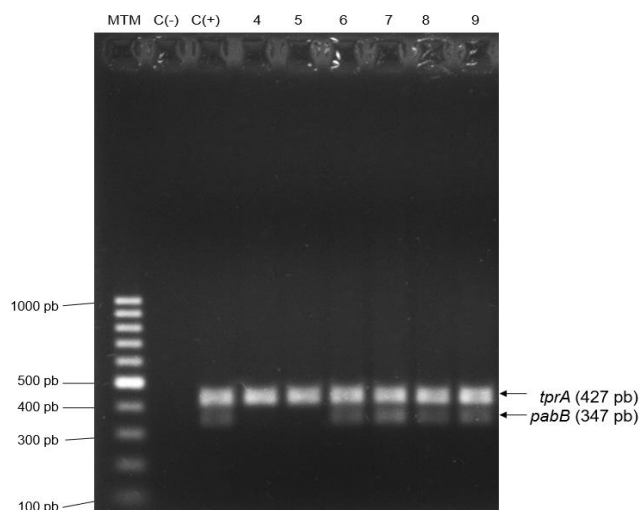


Figura 15. Electroferograma de PCR múltiple para los genes *trpA* y *pabB* (alelo específico O25b/ST131) de cepas clínicas de UPEC. Carril 1, MTM: Marcador de talla molecular Ladder 100 pb (Promega®). Corrimiento electroforético de 5 µL de producto de PCR, en gel de agarosa 1.8% (90v/45min), teñido con bromuro de etidio [0.05µg/ µL]. Carril 2, C(-): Control negativo. Carril 3, C(+): Control positivo (42U-0612) para los genes (*trpA* y *pabB*). Carril 4, cepa 915U1-051218 negativo *pabB*. Carril 5, cepa 852U-051219 negativo *pabB*. Carril 6, cepa 855U-051219 positivo *pabB*. Carril 7, cepa 937U-051219 positivo *pabB*. Carril 8, cepa 833U2-051219 positivo *pabB*. Carril 9, cepa 530U-051219 positivo *pabB*.

Los resultados mostraron la presencia de la clona O25b/ST131 solo en el 46.15% (18 / 39) de las cepas de UPEC y en el 7.69% (3 / 39) de las cepas de *E. coli*.

Identificación de genes de virulencia en cepas de UPEC y *E. coli* productoras de BLEE por PCR múltiple

Se tipificaron un total de 17 genes que codifican para factores de virulencia. Los genes asociados a la adherencia y colonización de UPEC se encontraron con la siguiente frecuencia: 89.74% (35 / 39) para la fimbria tipo 1 (*fimH*), 100% (39 / 39) para la fimbria curli (*csgA*), 100% (39 / 39) para el Pili común de *E. coli* (*ecpA*), la variante I y III del gen *papG* que codifica para la fimbria P se encontró ausente en todas las cepas, solo el 35.90% (14 / 39) de la variante II de *papG* fue identificada. Los genes asociados a la motilidad *motA*, *motB*, se encontraron en 100% (39 / 39) respectivamente y 38.46% (15 / 39) en el gen *fliC*. Los genes que codifican para sideróforos: *iutD*, *fyuA* y genes para proteínas captadoras de grupo Hemo: *chuA* se identificaron en 87.18% (34 / 39), 15.38% (6 / 39) y 89.74% (35 / 39), respectivamente. El gen *bcsA* que codifica para el glucano de superficie 17.95% (7 / 39). Los genes que codifican para las toxinas mostraron la siguiente frecuencia: el factor citotóxico necrotizante tipo 1 (*cnf1*) en 71.79% (28 / 39), α -Hemolisina (*hlyA*) 17.95% (7 / 39), y la toxina secretada autotransportadora (*satA*) 51.28% (20 / 39). El gen de la proteína de secreción tipo 1, *tosA* que funciona como una adhesina no fimbrial, no fue identificado en las cepas clínicas de *E. coli* BLEE⁺ utilizadas en este trabajo. Los ejemplos de imágenes de los geles de electroforesis se presentan en las figuras 16 y 17. El mapa de calor con distribución de la presencia o ausencia de los genes de virulencia, genes asociados a la clona O25b y su relación con los grupos y subgrupos filogenéticos en cepas de UPEC, se muestran en la figura 18.

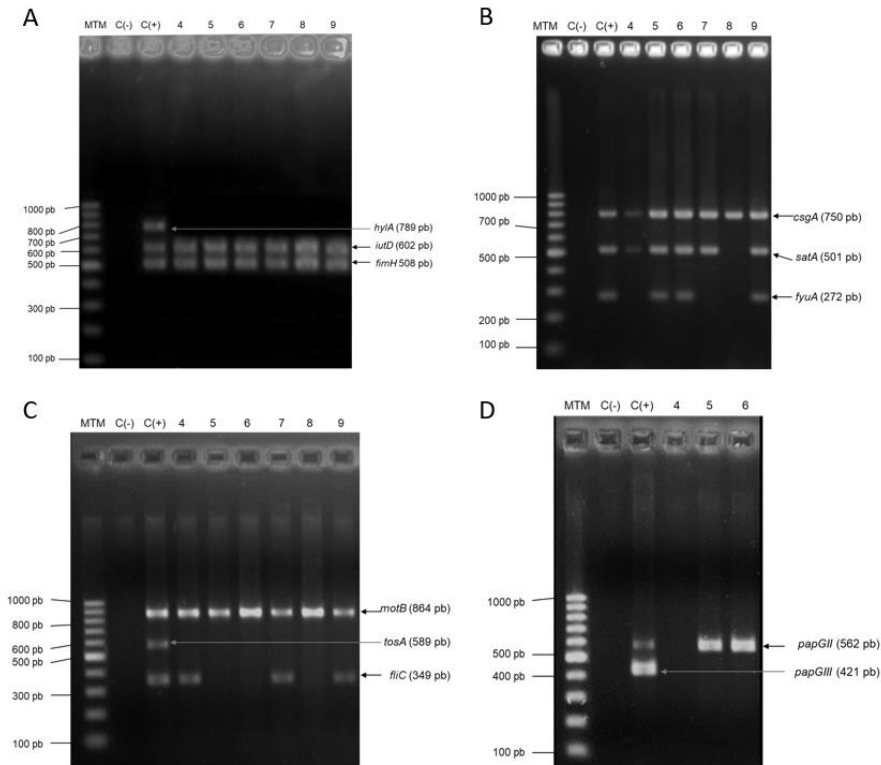


Figura 16. Electroferograma de PCR Múltiple para factores de virulencia de cepas clínicas de UPEC y *E. coli* Diversas. **A) Electroferograma de PCR múltiple de los genes *hlyA*, *iutD* y *fimH*.** Corrimiento electroforético en gel de agarosa 1.8% (90v/45min), teñido con bromuro de etidio [0.05µg/ µL]. Carril 1, MTM: Marcador de talla molecular Ladder 100 pb (Promega®). Carril 2, C(-): Control negativo. Carril 3, C(+): Control positivo (CFT073) para los genes *hlyA*, *iutD* y *fimH*. Carril 4, cepa 917U2-051220 positivo *iutD* y *fimH*. 5, cepa 895U-051219 positivo *iutD* y *fimH*. Carril 6, cepa 800D-051219 positivo *iutD* y *fimH*. Carril 7, cepa 915U2-051219 positivo *iutD* y *fimH*. Carril 8, cepa 583U1-051218 positivo *iutD* y *fimH*. Carril 9, cepa 917U1-051219 positivo *iutD* y *fimH*. **B) Electroferograma de PCR múltiple de los genes *csgA*, *satA* y *fyuA* en cepas clínicas.** Corrimiento electroforético en gel de agarosa 1.8% (90v/45min), teñido con bromuro de etidio [0.05µg/ µL]. Carril 1, MTM: Marcador de talla molecular Ladder 100 pb (Promega®). Carril 2, C(-): Control negativo. Carril 3, C(+): Control positivo (94U-90113) para los genes (*csgA*, *satA* y *fyuA*). Carril 4, cepa 583U1-051218 positivo *csgA* y *satA*. Carril 5, cepa 833U2-051219 positivo *csgA*, *satA* y *fyuA*. Carril 6, cepa positivo *csgA*, *satA* y *fyuA*. Carril 7, cepa 27U-051219 positivo *csgA* y *satA*. Carril 8, cepa 722U-051219 positivo *csgA*. Carril 9, cepa 755U-051219 positivo *csgA*, *satA* y *fyuA*. **C) Electroferograma de PCR Múltiple de los genes *motB*, *tosA* y *fliC* en cepas clínicas.** Carril 1, MTM: Marcador de talla molecular Ladder 100 pb (Promega®). Carril 2, C(-): Control negativo. Carril 3, C(+): Control positivo (CFT073) para los genes (*motB*, *tosA* y *fliC*). Carril 4, cepa 917U2-051220 positivo *motB* y *fliC*. Carril 5, cepa 895U-051219 positivo *motB*. Carril 6, cepa 800D-051219 positivo *motB*. Carril 7, cepa 915U2-051219 positivo *motB* y *fliC*. Carril 8, cepa 583U1-051218 positivo *motB*. Carril 9, cepa 917U1-051219 positivo *motB* y *fliC*. Corrimiento electroforético en gel de agarosa 1.8% (90v/45min), teñido con bromuro de etidio [0.05µg/ µL]. **D) Electroferograma de PCR Múltiple de los genes de *papG* y sus variantes de I y II en cepas clínicas.** Corrimiento electroforético en gel de agarosa 1.8% (90v/45min), teñido con bromuro de etidio [0.05µg/ µL]. Carril 1, MTM: Marcador de talla molecular

Ladder 100 pb (Promega®). Carril 2, C(-): Control negativo. Carril 3, C(+): Control positivo (43-lau) para los genes (*papGII* y *papGIII*). Carril 4, cepa 917U2-051220 negativo *papGII* y *papGIII*. Carril 5, cepa 895U-051219 positivo *papGII*. Carril 6, cepa 800D-051219 positivo *papGII*.

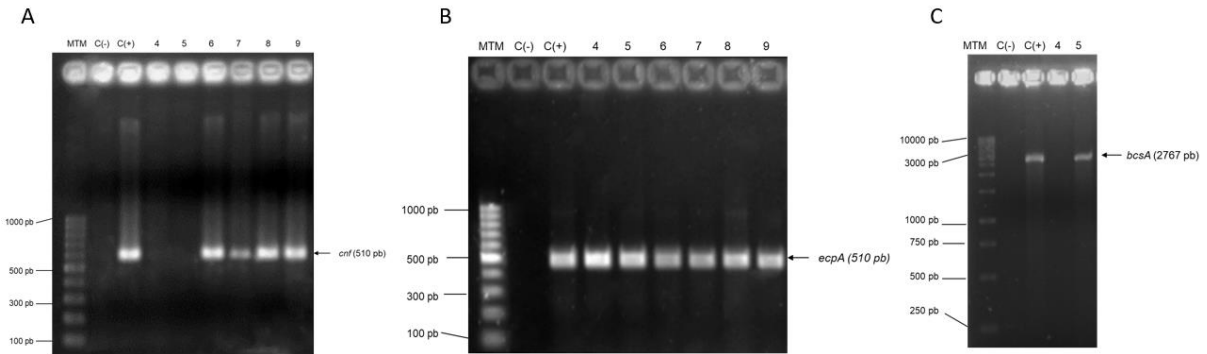


Figura 17. Electroferograma de PCR punto final para factores de virulencia de cepas clínicas de UPEC y *E. coli* Diversas.

A) Electroferograma del gen *cnf1* en cepas clínicas. Corrimiento electroforético en gel de agarosa 1.8% (90v/45min), teñido con bromuro de etidio [0.05µg/ µL]. Carril 1, MTM: Marcador de talla molecular Ladder 100 pb (Promega). Carril 2, C (-): Control negativo. Carril 3, C(+): Control positivo (95 lau) para el gen *cnf1*. Carril 4, cepa 937U-051219 negativo *cnf1*. Carril 5, cepa 833U2-051219 negativo *cnf1*. Carril 6, cepa 530U-051219 positivo *cnf1*. Carril 7, cepa 833U1-051218 positivo *cnf1*. Carril 8, cepa 879U-051219 positivo *cnf1*. Carril 9, cepa 925U-051219 positivo *cnf1*. B) Electroferograma de PCR punto final del gen *ecpA* en cepas clínicas de UPEC. Carril 1, MTM: Marcador de talla molecular Ladder 100 pb (Promega). Carril 2, C(-): Control negativo. Carril 3, C (+): Control positivo (CFT073) para el gen *ecpA*. Carril 4, cepa 917U2-051220 positivo *ecpA*. Carril 5, cepa 895U-051219 positivo *ecpA*. Carril 6, cepa 800D-051219 positivo *ecpA*. Carril 7, cepa 915U2-051219 positivo *ecpA*. Carril 8, cepa 583U1-051218 positivo *ecpA*. Carril 9, cepa 917U1-051219 positivo *ecpA*. Corrimiento electroforético en gel de agarosa 1.8% (90v/45min), teñido con bromuro de etidio [0.05µg/ µL]. C) Electroferograma del gen *bcsA*. Corrimiento electroforético en gel de agarosa 1.8% (90v/45min), teñido con bromuro de etidio [0.05µg/ µL]. Carril 1, MTM: Marcador de talla molecular Ladder 1 Kb (Promega). Carril 2, C(-): Control negativo. Carril 3, C (+): Control positivo (CFT073) para el gen *bcsA*. Carril 4, cepa 937U-051219 negativo *bcsA*. Carril 5, cepa 833U2-051219 negativo *bcsA*.

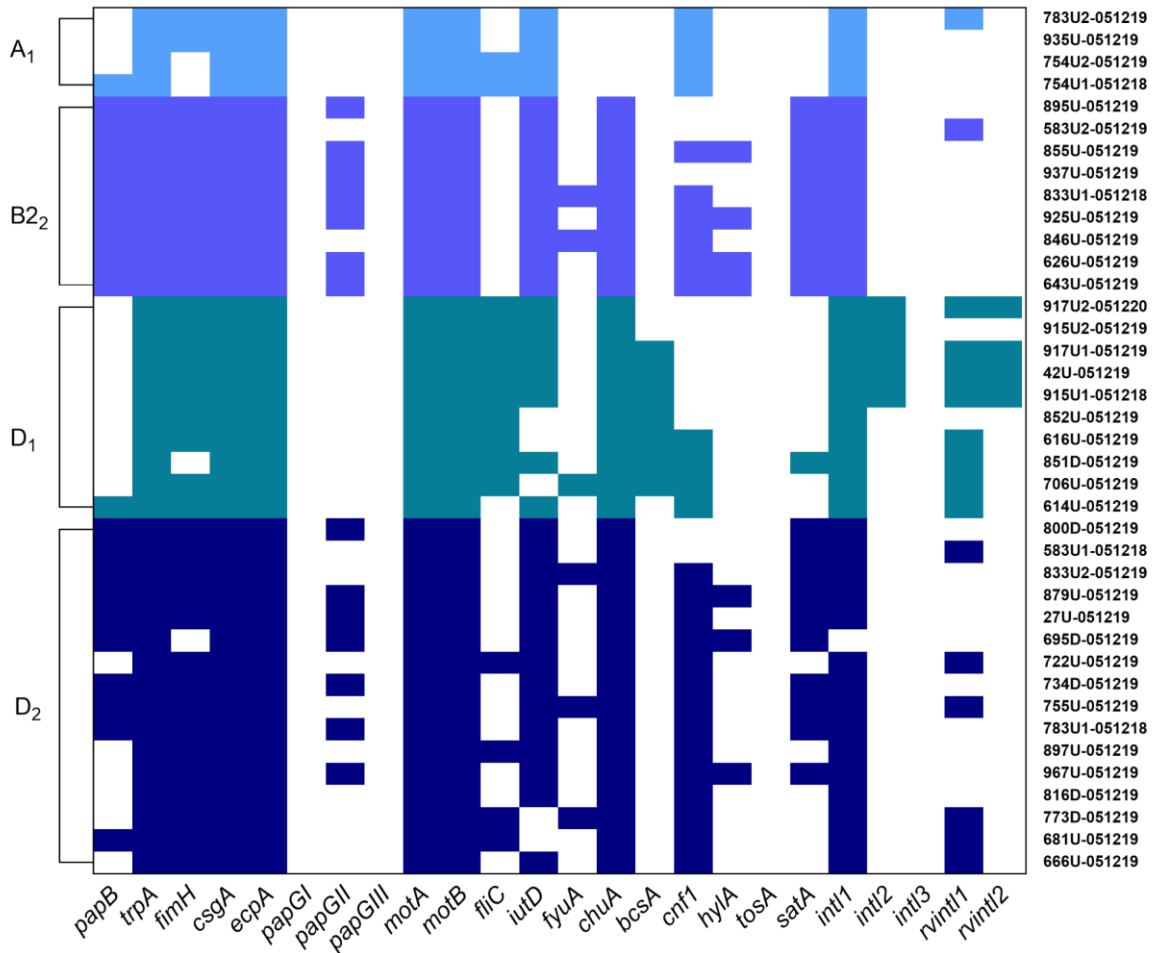


Figura 18. Mapa de calor de genes asociados a la patogénesis de *E. coli* y su relación con los grupos y subgrupos filogenéticos de cepas de UPEC. En color azul se muestra la presencia del gen y en blanco la ausencia de éste. En el eje de las abscisas se encuentran los genes identificados a través de PCR, y el eje de las ordenadas las cepas que se utilizaron en este trabajo en orden a los grupos filogenéticos identificados previamente, y en base en esto las diferentes tonalidades del color azul, para diferenciar fácilmente cada filogruppo.

El análisis de los genes asociados a la patogénesis de las cepas clínicas utilizadas en este trabajo con respecto a los grupos filogenéticos se muestra en la tabla 5. Los genes de virulencia que se encontraron en mayor frecuencia (> 80%) fueron *trpA*, *fimH*, *csgA*, *ecpA*, *motA*, *motB*, *iutD* y *chuA*. Los genes *papB*, *hlyA*, *iutD*, *satA*, *bcsA*, *fliC*, *papGII* y *cnf1* mostraron significancia estadística. Los genes identificados que mostraron importancia estadística con respecto a los grupos filogenéticos fueron: *papB* se identificó principalmente en los filogrupos B2₂ en un 100% (9 / 9) y D₂ en

un 62.5% (10 / 16), el gen *papGII* solo se encontró en el filogrupos B2₂ en un 77.78% (7 / 9) y en el D₂ en un 43.75% (7 / 16), *fliC* se encontró en una frecuencia baja 38.46% (15 / 39) con significancia estadística para los filogrupos D₁ en un 90% (9 / 10) y en el D₂ en un 25% (4 / 16).

Los genes encontrados con mayor frecuencia fueron *fimH*, *csgA* y *ecpA* sin importar el grupo filogenético, los genes asociados a captadores de hierro (*iutD*, *fyuA* y *chuA*), el gen *fyuA* fue el que se encontró en menor frecuencia 15.38% (6 / 39) y de los genes asociados a toxinas (*cnf1*, *hlyA*, *tosA* y *satA*), los que se identificaron en mayor frecuencia fueron *cnf1* en un 74.36% (29 / 39) y *satA* en un 51.28% (20 / 39), en comparación con *hlyA* en un 17.94% (7 / 39).

Tabla 5. Frecuencia de los genes asociados a la patogénesis de UPEC en relación con los grupos filogenéticos.

Frecuencia de los grupos filogenéticos					
Gen	A ₁ % (n=4)	B2 ₂ % (n=9)	D ₁ % (n=10)	D ₂ % (n=16)	Total % (n=39)
Genes asociados O25b					
<i>trpA</i>	100 (4)	100 (9)	100 (10)	100 (16)	100 (39)
<i>papB</i>	25 (1)*	100 (9)***	10 (1)**	62.5 (10)**	57.89 (22)
Genes asociados a fimbrias y adhesinas					
<i>fimH</i>	50 (2)***	100 (9)*	90 (9)*	93.75 (15)*	90 (36)
<i>csgA</i>	100 (4)	100 (9)	100 (10)	100 (16)	100 (39)
<i>ecpA</i>	100 (4)	100 (9)	100 (10)	100 (16)	100 (39)
<i>papGI</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0.00 (0)
<i>papGII</i>	0 (0)	77.78 (7)*	0 (0)	43.75 (7)*	37.89 (14)
<i>papGIII</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0.00 (0)
Genes asociados a flagelo					
<i>motA</i>	100 (4)	100 (9)	100 (10)	100 (16)	100 (39)
<i>motB</i>	100 (4)	100 (9)	100 (10)	100 (16)	100 (39)
<i>fliC</i>	50 (2)	0 (0)	90 (9)*	25 (4)*	38.46 (15)

Frecuencia de los grupos filogenéticos					
Gen	A ₁ % (n=4)	B ₂ % (n=9)	D ₁ % (n=10)	D ₂ % (n=16)	Total % (n=39)
Captadores de hierro					
<i>iutD</i>	100 (4)	100 (9)	70 (7)	87.5 (14)	87.18 (34)
<i>fyuA</i>	0.00 (0)	20 (2)	10 (1)	18.75 (3)	15.38 (6)
<i>chuA</i>	0.00 (0)	100 (9)	100 (10)	100 (16)	89.74 (36)
Glucano de superficie					
<i>bcsA</i>	0.00 (0)	0.00 (0)	70 (7)*	0.00 (0)	17.50 (7)
Toxinas					
<i>cnf1</i>	100 (4)*	66.67 (6)	40 (4)**	87.5 (14)*	74.36 (29)
<i>hlyA</i>	0 (0)	44.44 (4)	0 (0)	18.75 (3)	17.94 (7)
<i>tosA</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0.00 (0)
<i>satA</i>	0.00 (0)	100 (9)**	10 (1)**	62.5 (10)**	51.28 (20)

Fimbria tipo 1 (*fimH*), fimbria curli (*csgA*), pili común de *E. coli* (*ecpA*), Fimbria P, *PapG* variante I (*papGI*), *PapG* variante II (*papGII*), *PapG* variante III (*papGIII*), flagelo (*fliC*), motilidad (*motA-motB*), aerobactina (*iutD*), yersiniabactina (*fyuA*), receptor de hierro (*chuA*), glucano de superficie (*bcsA*), factor necrotizante citotóxico (*cnf1*), α -hemolisina (*hlyA*), secreción A tipo 1 (*tosA*), toxina autotransportadora secretora (*satA*). El número dentro del paréntesis corresponde al número de cepas que presentaron amplificación del gen y el número que antecede al paréntesis es la frecuencia en porcentaje (%) del gen por grupo filogenético. *Estadísticamente significativo ($p < 0.05$), *papB* ($p = 0.0031^*$) ($p < 0.001^*$) ($p = 0.0281^*$) ($p = 0.0021^*$), *fimH* ($p = 0.0061^*$) ($p = 0.0232^*$) ($p = 0.0094^*$), *hlyA* ($p = 0.0120^*$), *satA* ($p < 0.0001^*$) ($p = 0.0186^*$) ($p = 0.0011^*$), *bcsA* ($p < 0.0001^*$), *fliC* ($p = 0.0001^*$), *papGII* ($p = 0.0467^*$) ($p = 0.0089^*$), *cnf1* ($p = 0.0209^*$) ($p = 0.0080^*$).

Genes asociados a la resistencia (*int1*, *int2* e *int3*) y región variable de los integrones clase 1 y 2.

El 97.5% (39 / 39) de las cepas de UPEC fueron positivas para la amplificación del gen *int1*, que codifica para la región conservada de la integrasa clase 1, sólo el 12.5% (5 / 39) de las cepas amplificó el gen que codifica para el integrón clase 2. En este estudio no se observó la presencia del gen *int3*, el electroferograma de la identificación de los genes *int1*, *int2* e *int3* se encuentran en la figura 19. La frecuencia y significancia estadística de los genes asociados a la resistencia (*int1*,

int2 e *int3*) y región variable de los integrones clase 1 y 2, con respecto a los grupos filogenéticos se muestran en la Tabla 6. La frecuencia del gen *int1* respecto a filogrupo fue la siguiente, el A₁ presentó el 10% (4 / 39), el B₂ el 25% (10 / 39), el D₁ 25% (10 / 39) y el D₂ 37.5% (15 / 39) y el gen *int2* se encontró en un 12.82% (5 / 39) perteneciente al filogrupo D₁. La región variable del *int1* solo se presentó en el 41.03% (16 / 39) de las cepas y solo el 10% (4 / 39) presentó la región variable del *int2*.

Tabla 6. Frecuencia de los genes asociados a la resistencia a antibióticos mediada por integrones en cepas clínicas de *E. coli* productoras de BLEE en relación con los grupos filogenéticos.

Frecuencia de los grupos filogenéticos					
Gen	A ₁ % (n=4)	B ₂ % (n=9)	D ₁ % (n=10)	D ₂ % (n=16)	Total % (n=39)
Genes de integrasa					
<i>int1</i>	10.26 (4)	23.08 (9)	25.64 (10)	38.46 (15)	97.44 (38)
<i>int2</i>	0	0	12.82 (5)	0	12.82 (5)
<i>int3</i>	0	0	0	0	0
Genes de cassette					
RV- <i>int1</i>	2.56 (1)*	2.56 (1)*	20.51 (8)***	15.38 (6)*	41.03 (16)
RV- <i>int2</i>	0	0	10.26 (4)	0	10.26 (4)

Integrasa de clase 1 (*int1*), integrasa de clase 2 (*int2*), integrasa de clase 3 (*int3*), región variable de la integrasa de clase 1 (RV-*int1*) y región variable de la integrasa de clase 2 (RV-*int2*). RV-*int1* (p<0.0420*) (p=0.0011*) (p=0.0222*)

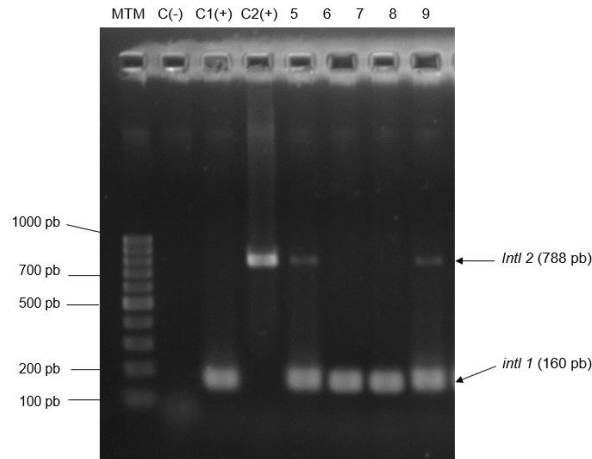


Figura 19. Electroferograma de PCR Múltiple de los genes *int1* e *int2* en cepas clínicas de UPEC. Corrimiento electroforético en gel de agarosa 1.8% (90v/45min), teñido con bromuro de etidio [0.05µg/ µL]. Carril 1, MTM: Marcador de talla molecular Ladder 100 pb (Promega). Carril 2, C(-): Control negativo. Carril 3, C1(+): Control positivo 1 (440U1) para el gen *int1*. Carril 4, C2(+): Control positivo 2 (674U1-0612) para el gen *int2*. Carril 5, cepa 917U2-051220 positivo *int1* e *int2*. Carril 6, cepa 895U-051219 positivo *int1*. Carril 7, cepa 800D-051219 positivo *int1*. Carril 8, cepa 915U2-051219 positivo *int1* e *int2*.

Tipificación molecular de cepas de UPEC y *E. coli* productoras de BLEE por ERIC-PCR

La macrorrestricción del genoma de las cepas clínicas de UPEC y *E. coli* productoras de BLEE por ERIC-PCR, mostró un total de 39 patrones de bandeo constituidos por un total de 40 bandas con fragmentos de talla molecular de 100 pb a 5 Kb (figura 20).

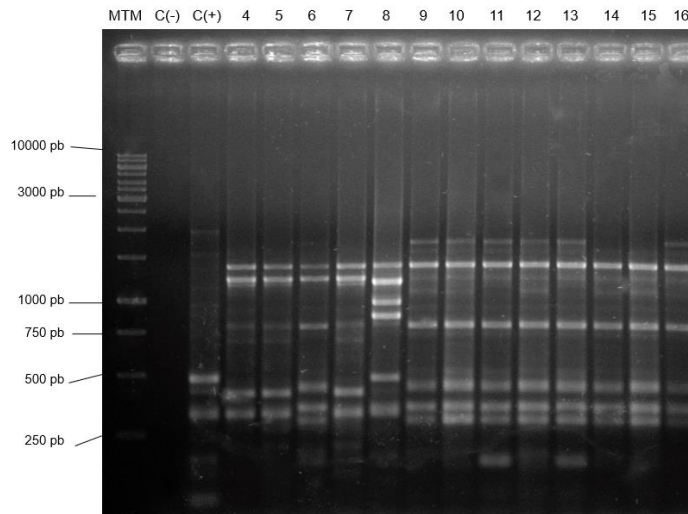


Figura 20. Electroferograma de ERIC-PCR de cepas clínicas de UPEC. Carril 1, MTM: Marcador de talla molecular Ladder 1 kb (Promega). Carril 2, C (-): Control negativo. Carril 3, C (+): Control de reacción (CFT073) para los genes. Carril 4, cepa 917U1-051219. Carril 5, cepa 42U-051219. Carril 6, cepa 583U2-051219. Carril 7, cepa 915U1-051218. Carril 8, cepa 852U-051219. Carril 9, cepa 855U-051219. Carril 10, cepa 937U-051219. Carril 11, cepa 833U2-051219. Carril 12, cepa 530U-051219. Carril 13, cepa 833U1-051218. Carril 14, cepa 879U-051219. Carril 15, cepa 925U-051219. Carril 16, cepa 27U-051219.

El análisis del dendrograma (Figura 21) indicó que las cepas de UPEC y *E. coli* productoras de BLEE de diversos orígenes, mostraron un 35% de similitud total entre ellas y se agruparon con base en la presencia/ausencia del número de fragmentos de restricción, grupo filogenético, 20 genes (*intl1*, *intl2*, *RV-intl1*, *RV-intl2*, *fimH*, *csgA*, *ecpA*, *papGII*, *papGIII*, *motA*, *motB*, *fliC*, *iutD*, *fyuA*, *chuA*, *bcsA*, *cnf1*, *hlyA*, *tosA*, *sata*)

Las cepas se agruparon en dos clados principales A y B, además, de cada clado se obtuvieron subclados indicados como BI, BII, BIII, BIV y BV. La distribución de los clados fue el siguiente: el 10.26% (4 / 39) de las cepas se agruparon en el clado A, se caracterizaron por pertenecer principalmente al filogrupo A1, tener un perfil de XDR y baja presencia del serogrupo O25b/ST131. Además, se identificó un menor número de genes de virulencia, comparado con los otros clados. En el clado A, se encontró frecuencias altas de los genes asociados a fimbrias de adherencia (*csgA* y *ecpA*), a flagelo (*motA*, *motB* y *fliC*), a captadores de hierro (*iutD*), a toxinas (*cnf1*) y genes de integrasa 1 (*intl1*), así como la región variable (*RV-intl1*) (Figura 21).

El 89.74% (35 / 39) de las cepas pertenecían al clado B. Caracterizado estar asociados, principalmente a los filogrupos D y B2₂, y un perfil de MDR. El 23.08% (9/39) de las cepas se agruparon en el clado BI, el cual se identificó por pertenecer al filogrupo D, tener un perfil de MDR-7 y XDR-8, ausencia del serogrupo O25b/ST131, frecuencias altas de los genes asociados a fimbrias de adherencia (*fimH*, *csgA* y *ecpA*), a flagelo (*motA*, *motB* y *fliC*), frecuencias variables 15.38-89.74% para los genes asociados a captadores de hierro (*iutD*, *fyuA* y *chuA*), a glucano de superficie (*bcsA*), a toxinas (*cnf1*) y solo en este clado se identificaron genes de integrasa (*intI1* y *intI2*), así como la región variables (RV-*intI1* y RV-*intI2*); el 10.26% (4/39) de las cepas se encontraron en el clado BII, en el predominio el filogrupo B2₂, perfiles de MDR y XDR-8, presencia del serogrupo O25b/ST131, frecuencias altas de los genes asociados a fimbrias de adherencia (*fimH*, *csgA*, *ecpA* y *papGII*), a flagelo (*motA* y *motB*), a captadores de hierro (*iutD* y *chuA*), a toxinas (*cnf1*, *hlyA* y *satA*) y se identificaron genes de integrasa (*intI1*); el 28.21% (11 /39) de las cepas se encontraron en el clado BIII, en el predominio el filogrupo D y B2₂, con un perfil de MDR 5-7, presencia del serogrupo O25b/ST131, frecuencias altas de los genes asociados a adhesinas fimbriales (*fimH*, *csgA*, *ecpA* y *papGII*), a flagelo (*motA* y *motB*), a captadores de hierro (*iutD* y *chuA*), a toxinas (*cnf1* y *satA*) y se identificaron genes de integrasa (*intI1*); el 10.26% (4 /39) de las cepas se encontraron en el clado BIV, en el predominio el filogrupo D y B2₂, con un perfil de MDR 7, presencia del serogrupo O25b/ST131, frecuencias altas de los genes asociados a fimbrias y adhesinas(*fimH*, *csgA*, *ecpA* y *papGII*), a flagelo (*motA* y *motB*), a captadores de hierro (*iutD* y *chuA*), a toxinas (*satA*), genes de integrasa (*intI1*) y su región variable (RV-*intI1*) (Figura 21).

Finalmente, el 17.95% (7 /39) de las cepas se encontraron en el clado BV, en el predominio el filogrupo D, con un perfil de MDR 5-7, presencia baja del serogrupo O25b/ST131, frecuencias altas de los genes asociados a motilidad (*fimH*, *csgA*, y *ecpA*), a flagelo (*motA*, *motB* y *fliC*), a captadores de hierro (*iutD* y *chuA*), a toxinas (*cnf1*) y se identificaron genes de integrasa (*intI1*) y su región variable (RV-*intI1*) (Figura 21).

Las cepas que tuvieron un porcentaje de similitud > 80% fueron 14 / 39: 895U-051219, 800D-051219, 855U-051219, 833U1-051218, 937U-051219, 27U-051219, 833U2-051219, 879U-051219, 925U-051219, 734D-051219, 783U1-051219, 917U1-051219, 42U-051219 y 915U1-051219, estas se encontraron en diferentes clados (Figura 21).

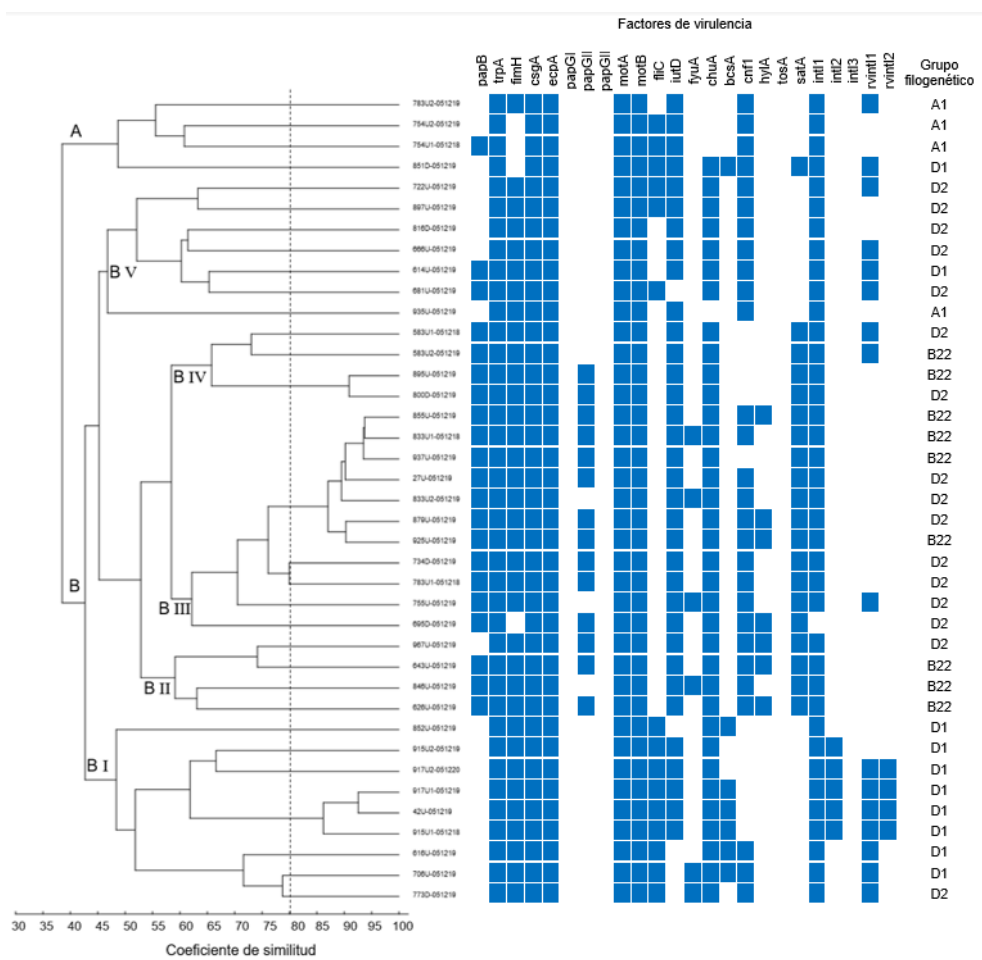


Figura 21. Dendrograma de cepas clínicas de UPEC productoras de BLEE. El dendrograma se generó con una matriz de ausencia/presencia de la banda identificada en el ERIC-PCR y los 7 genes de virulencia. La matriz de datos fue analizada con el coeficiente de similitud de Jaccard y agrupada con el algoritmo UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic). El dendrograma fue evaluado utilizando el coeficiente de correlación cofenética con la prueba de Mantel (valor de $r=0.8785$), que indica la robustez de los datos.

VII. Discusión

El Hospital Infantil de México Federico Gómez es un hospital de tercer nivel en la Ciudad de México enfocado en la atención de pacientes pediátricos con neoplasias como leucemia, linfoma y enfermedades en múltiples órganos, los pacientes que reciben quimioterapia suelen presentar neutropenia e infecciones asociadas a la inmunodeficiencia. *E. coli* es la segunda bacteria más común aislada, de pacientes pediátricos en el HIMFG (Luna-Pineda *et al.*, 2018). El 76.92% de los aislamientos, en este estudio, fueron recuperados de muestras de orina de pacientes con ITUs y el 23.08% fue de origen diverso. Todas las cepas fueron productoras fenotípicas de BLEE. Los perfiles de susceptibilidad a antibióticos indicaron que el 74.36% de los aislamientos incluidos en este estudio mostraron un perfil de MDR, mientras, el 25.64% un perfil de XDR. Recientemente en México, Contreras-Alvarado *et al.* (2021) reportaron cifras similares de perfiles de resistencia, entre cepas de UPEC clasificadas como O25b de niños, el 81.74% eran MDR y el 18.25% eran XDR.

Además, en nuestro estudio se encontraron frecuencias altas de cepas resistentes a categorías de antibióticos como: penicilinas en un 100%, cefalosporinas mayores a 85%, monobactámicos en un 97.43% y a fluoroquinolonas mayor a 80%. Las cepas productoras de BLEE son microorganismos principalmente multirresistentes, aunque muestran menos susceptibilidad a las quinolonas (Shariff *et al.*, 2013). En nuestro estudio encontramos resistencia de 100% a ciprofloxacino y de 82.05% a ofloxacino, estos resultados son más altos con lo reportado por otros autores, que indican una resistencia a ciprofloxacino del 75.96% en México y 79.9% en India (Contreras-Alvarado *et al.*, 2021; Shariff *et al.*, 2013). La prevalencia mundial de UPEC resistentes a fluoroquinolonas está dominada en gran medida por la clona ST131, que es una de las principales causas de infecciones urinarias e infecciones del torrente sanguíneo (Silva *et al.*, 2021).

Sedighi *et al.* (2015), encontraron una asociación significativa entre la resistencia a las quinolonas en los aislados productores de BLEE, por lo que no recomiendan el uso de fluoroquinolonas en niños con infecciones complicadas del tracto urinario.

Basu and Mukherjee (2018) en India, encontraron que los genes de resistencia a quinolonas mediados por plásmidos y genes de β -lactamasas están estrechamente relacionados y tenían el potencial de ser transferidos, favoreciendo la diseminación de la resistencia entre los aislados de UPEC MDR. Un plásmido o un transposón pueden portar varios genes de resistencia a varios agentes antimicrobianos y pueden adquirirse simultáneamente, resultando en microorganismos resistentes a múltiples fármacos (Shariff *et al.*, 2013). Las bacterias que tienen genes de resistencia a quinolonas mediados por plásmidos a menudo tienen genes de BLEE. La presencia de integrones, que se encuentran como parte de elementos genéticos móviles como los plásmidos, facilita aún más el mecanismo de transferencia horizontal de genes (Basu and Mukherjee, 2018).

En este trabajo, el 58.97% de los aislamientos mostraron resistencia a trimetoprima-sulfametoxazol (SXT). Estudios previos en población de México, han reportado resultados similares (Contreras-Alvarado *et al.*, 2021; Ramírez-Castillo *et al.*, 2018; Paniagua-Contreras *et al.*, 2017). Debido al aumento de la resistencia al SXT, en algunos países no recomiendan este agente como primera opción para el tratamiento de la cistitis aguda no complicada; principalmente porque existen reportes que la resistencia a SXT está asociada con el desarrollo de resistencia concomitante a otros antibióticos, así, el uso limitado de SXT puede, indirectamente, ayudar a mantener su eficacia a largo plazo (Ali *et al.*, 2016). En México el SXT es uno de los principales agentes terapéuticos utilizados en el sistema de salud de la seguridad social mexicana para tratar ITUs en niños (Paniagua-Contreras *et al.*, 2017).

La resistencia a la nitrofurantoína tuvo una prevalencia baja (15.38%), lo que concuerda con otros estudios en México donde, también se informan bajas tasas de resistencia a la nitrofurantoína (Contreras-Alvarado *et al.*, 2021; Ramírez-Castillo *et al.*, 2018). Lee *et al.* (2018) mencionan, que existe una sensibilidad del 90% a la nitrofurantoína en cepas de *E. coli* asociadas a infecciones urinarias adquiridas en la comunidad, en la mayoría de los países del mundo (Lee *et al.*, 2018). La

Asociación Europea de Urología (EAU) y la Sociedad Estadounidense de Enfermedades Infecciosas (IDSA) han recomendado el uso de nitrofurantoína como tratamiento de primera línea para las ITUs, únicamente sí, la prevalencia regional de resistencia a este fármaco es inferior al 20% (Lee *et al.*, 2018). Además, la nitrofurantoina ha surgido como la opción de tratamiento de primera línea para las infecciones urinarias en como Irán, Mongolia y Bolivia (Naziri, *et al.*, 2020). Sin embargo, Paniagua-Contreras *et al.* (2017) realizaron un estudio en México donde encontraron una resistencia a la nitrofurantoína del 44.8%, este alto porcentaje de resistencia probablemente esté asociado al uso indiscriminado del antibiótico en el tratamiento de las ITUs, considerando que es uno de los principales agentes terapéuticos utilizados en el sistema de salud de México. La variación en los resultados sugiere que la resistencia a la nitrofurantoína puede depender de la región geográfica donde se prescribe.

Más del 80% de las ITUs son ocasionadas por UPEC. El trasfondo genético juega un papel importante en cuanto a la virulencia de las cepas. Los grupos filogenéticos más relacionados con infecciones extraintestinales de *E. coli* (ExPEC) son B2, D, C y F, mientras que el filogrupo A es de tipo comensal. Las cepas de los filogrupos B2 y D se aíslan con mayor frecuencia de infecciones extra-intestinales, y se caracterizan por poseer una variedad de factores de virulencia, que pueden provocar sepsis en un modelo murino, contrariamente, la mayoría de las cepas de los filogrupos A y B1 no son virulentas en este modelo (Denamur *et al.*, 2021).

El 100% de las cepas de *E. coli* productoras de BLEE, en este estudio, se asociaron principalmente al filogrupo D (D2 y D1), continuando con el filogrupo B2₂ y en menor proporción A1; como se ha descrito en otros estudios (Ochoa *et al.*, 2016). En otras poblaciones de cepas clínicas en México, el filogrupo principal fue el B2₂ (Contreras-Alvarado *et al.*, 2021). Las cepas de UPEC productoras de BLEE, con un fenotipo MDR se asociaron principalmente con los grupos filogenéticos D2, D1, B2₂ y A1, mientras, las cepas de *E. coli* XDR productoras de BLEE se asociaron con B2₂ y D2 en igual proporción, y en menor porcentaje con D1, lo cual concuerda con estudios

recientes en México (Ochoa *et al.*, 2016). Las cepas del grupo filogenético B2 poseen características que las hacen de especial interés, porque han emergido como el grupo filogenético predominante entre las cepas de *E. coli* que colonizan individuos en los países occidentales (Nowrouzian *et al.*, 2019).

Las ITUs suelen ser causadas por cepas de *E. coli* que se originan en la microbiota intestinal, las cuales pueden partir de cepas no patógenas y adquirir factores de virulencia mediante la transferencia horizontal de genes. Nowrouzian *et al.* (2019), demostraron que las cepas del filogrupo B2 persisten bien en la microbiota intestinal de los lactantes, así mismo, los subgrupos B2₁ y B2₂ con características uropatógenas predominaron en la microbiota intestinal de bebés suecos, lo que sugiere la frecuente acumulación de genes de virulencia e islas de patogenicidad (PAI) en las cepas B2, obtenidas muy probablemente por transferencia horizontal de genes (Denamur *et al.*, 2021; Nowrouzian *et al.*, 2019). También se ha reportado que cepas de UPEC del filogrupo B2 muestran una relación con un elevado número de genes de virulencia y con la presencia de integrones clase 1 y fenotipo de BLEE (Xicohtencatl-Cortes *et al.*, 2019).

La clona epidémica O25b/ST131 está asociado al grupo filogenético B2. La frecuencia de *E. coli* O25-ST131 ha sido reportada en varios estudios en México con una frecuencia del 36% (Molina-Lopez *et al.*, 2011), 25% (Reyna-Flores *et al.*, 2013) y 20.2% (en población pediátrica por Luna-Pineda *et al.*, 2018). En este trabajo 57.89% de las cepas fueron positivas a la identificación de la clona O25b/ST131, por PCR alelo específico para el gen *papB* (Clermont *et al.*, 2009) y se asociaron principalmente a los filogrupos B2₂ y D2, con perfil fenotípico MDR. Los genes que codifican los sistemas de adhesinas fimbriales, son los factores de virulencia que se encuentran con más frecuencia en UPEC y cepas de *E. coli* extraintestinales. Los factores de adherencia promueven la colonización, invasión y replicación dentro de las células uroepiteliales y preceden a la expresión de otros productos bacterianos como toxinas, sistemas de adquisición de hierro y mecanismos de evasión del sistema inmune, que pueden están codificados en islas

de patogenicidad (PAI). Los factores de virulencia relacionados con UPEC incluyeron genes que codifican adhesinas fimbriales [Adhesina de la fimbria P (*papG*), variante I de adhesina de la fimbria P (*papGI*), variante II (*papGII*), variante III (*papGIII*), *sfA* (codifica para fimbrias S), *afal* (codifica para adhesina fimbrial I), *fimH* (adhesina de la fimbria tipo 1), *ihA* (codifica para la adhesina no hemaglutinante), y *tsH* (codifica para hemaglutinina sensible a la temperatura)]; genes relacionados con los sistemas de adquisición de hierro y sideróforos como: *iutD*, *iroN* e *irp2*); protección de genes (*kpsMT* y *iss*); y genes que codifican toxinas (*set*, *astA CnF1*, *hlyA*, *IVA*, *usp*, y *CVA / CVI*) (Paniagua-Contreras *et al.*, 2017). Los principales genes de virulencia reportados en cepas de *E. coli* O25b/ST131 asociadas al filogrupo B2 son: *sat*, *fimH*, *fyuA*, *kpsMIII*, *USP*, *mALX*, *HIA*, *opmT*, *iucD*, *iutA* y *tratT* (Nicolas-Chanoine *et al.*, 2014). En nuestro estudio los genes localizados en el núcleo del genoma *fimH*, *csgA*, *ecpA*, *motA* y *motB* se identificaron con alta frecuencia (90-100%) en todas las cepas. Estos resultados concuerdan con estudios recientes (Luna-Pineda *et al.*, 2018).

Los genes localizados en la isla de patogenicidad (PAI) (*papGII*, *hlyA*, *fyuA*, *satA* e *iutD*) se identificaron con frecuencias variables en los aislados de *E. coli* y UPEC productores de BLEE en este estudio. Se identificó el gen *papGII* en un 37.89%, no se detectaron genes *papGI* ni *papGIII* en todas las cepas, estos resultados son similares a un estudio realizado en Irán (Malekzadegan *et al.*, 2018). Estudios previos han demostrado que el gen *papGII* se asocia con pielonefritis y bacteriemia (Malekzadegan *et al.*, 2018).

Los genes asociados con la motilidad *motA* y *motB*, que codifican para las proteínas estructurales del sistema flagelar, se encontraron en todas las cepas, contrariamente, el gen *fliC*, se identificó con una frecuencia variable de 38.46% entre las cepas de *E. coli* y UPEC productoras de BLEE en nuestro trabajo. La transferencia horizontal de genes y la recombinación intragénica promueve variaciones entre las secuencias del gen *fliC*; lo que podría generar falsos negativos

cuando se utilicen métodos de análisis convencionales como PCR (Luna-Pineda *et al.*, 2018).

Los genes (*iutD*, *fyuA* y *chuA*) relacionados con captadores de hierro y sideróforos, se encontraron en frecuencias variables del 15.38 a 89.74%%, siendo los genes *iutD* y *chuA* encontrados con mayor frecuencia, en comparación con el gen *fyuA*. Resultados similares a los hallazgos reportados por Contreras-Alvarado *et al.* (2021) en México. El gen más ampliamente distribuido entre todos los grupos filogrupos identificados fue el *iutD*. Mientras que *fyuA* y *chuA* se identificaron solo en los filogrupos B2₂, D2 y D1, con perfiles MDR y XDR. El gen *fyuA* está muy relacionado con cepas provenientes de ITUs, en comparación con cepas comensales (Rezatofighi *et al.*, 2021) lo que explica porque no se encontró en cepas del filogrupo A₁, en algunos estudios si han identificado la presencia de este gen en el filogrupo A₁, sin embargo, se encuentra en baja frecuencia 33% (Contreras-Alvarado *et al.*, 2021). De manera similar el gen *chuA* está asociado a los grupos filogenéticos D y B2 (Ochoa *et al.*, 2016).

El gen *bcsA* codifica para la biosíntesis de celulosa, la cual es un componente de la matriz extracelular bacteriana en las cepas UPEC, y su expresión está asociada con el operón *csg* que codifica la fimbria curli (Saldaña *et al.*, 2009), en nuestro estudio encontramos el gen *bcsA* en un 17.5% asociado al filogrupo D1 y a las cepas MDR. El gen *csgA* se encontró en todas las cepas. Nuestros resultados son similares a los obtenidos en otros estudios realizados en México (Ochoa *et al.*, 2016).

Las toxinas son importantes factores de virulencia que median la invasión, diseminación y persistencia de bacterias en las células huésped. Las toxinas producidas por UPEC no solo infligen daño tisular, sino que también participan en la comunicación entre el patógeno y el huésped. Las toxinas α -hemolisina A (*hlyA*) y CNF1 (*cnf1*), actúan liberando el hierro de los glóbulos rojos, provocan disfunción de las células fagocíticas y citotoxicidad directa a los tejidos. La hemolisina A (HlyA) es una de las toxinas formadoras de poros mejor caracterizadas, es necesaria para

la invasión inicial de bacterias a través de la barrera epitelial, mientras que el CNF1 es necesario para la diseminación y persistencia de las cepas de *E. coli* (Pourzare *et al.*, 2017; Subashchandrabose and Mobley, 2017). El gen *hlyA* estuvo presente en 17.94%, en los filogrupos B2₂ y D2 de las cepas productoras de BLEE. La distribución del gen *hlyA* entre los aislamientos estudiados fue similar a estudios recientes en México (Ramírez-Castillo *et al.*, 2018; Paniagua-Contreras *et al.*, 2017). El gene *cnf1* se identificó en un 74.36%, con una mayor prevalencia en los filogrupos A1, D2, B2₂ y en menor porcentaje en el filogrupo D1, de las cepas productoras de BLEE estudiadas, la prevalencia de *cnf1* fue similar a lo reportado por Stephenson & Brown (2017).

TosA, es toxina de proteínas de repeticiones, que funciona como una molécula antigénica, tiene características de adhesinas no fimbriales (Xicohtencatl-Cortes *et al.*, 2019). El gen *tosA* se considera un marcador genético de las cepas UPEC portadoras de varios genes de virulencia (Vigil *et al.*, 2012). Sin embargo, en este trabajo, no se identificó el gen *tosA* en ninguna de las cepas. En otros estudios encontraron que cepas de UPEC con presencia negativa de *tosA* tienen una baja distribución de genes de virulencia, en comparación con cepas positivas para el gen *tosA* y a su vez éstas muestran una disminución mayor en el número de genes de virulencia asociados a PAI, y un perfil de resistencia de tipo MDR y XDR (≥ 4 grupos de antibióticos) (Xicohtencatl-Cortes *et al.*, 2019). Cada una de las cepas de *E. coli* y UPEC productoras de BLEE estudiadas, mostraron un promedio de 11/19 genes estudiados.

La toxina autotransportadora secretada Sat, es una citotoxina vacuolizante, que exhibe actividad proteolítica y citopática para células de riñón, vejiga y epiteliales cultivadas. Además, se encuentra asociada principalmente al desarrollo de pielonefritis, se cree que la proteína SatA puede contribuir a la exfoliación de las células uroteliales (Welch, 2016; Guyer *et al.*, 2000; Guyer *et al.*, 2002). El gen *satA*, se encontró en el 51.28% de las cepas, similar a estudios recientes (Luna-Pineda *et al.*, 2018). Interesantemente, la presencia del gen *satA* se asoció principalmente

con los filogrupos B2₂, D2 y D1 y con un perfil XDR en las cepas productoras de BLEE. Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que las cepas de *E. coli* y UPEC que presentan producción de BLEE, están relacionadas principalmente a un perfil MDR-7 y al filogrupo D2. Además, presentan la mayor distribución en el serogrupo O25b/ST131, los filogrupos B2₂ y D2, estos filogrupos tienen características similares en cuanto a genes de virulencia, de los cuales destacan los siguientes genes: *papGII*, *fyuA* y *satA*.

Los integrones de clase 1, confieren resistencia a la mayoría de los β -lactámicos, aminoglucósidos, trimetoprima, rifampicina, cloranfenicol, quinolonas, eritromicina y compuestos de amonio cuaternario (Kaushik *et al.*, 2018). En este estudio encontramos una alta distribución del gen *intI1*, asociado con los grupos filogenéticos D₂, D₁ y B2₂ en las cepas con un perfil MDR y XDR, como en otros estudios (Ochoa *et al.*, 2016).

Los integrones de clase 2 generalmente se asocian con la resistencia a trimetoprima, estreptotricina y estreptomycin. A diferencia de los integrones de clase 1, los de clase 2 son menos prevalentes en las bacterias entéricas (Kaushik *et al.*, 2018). Nosotros encontramos una baja distribución del integrón clase 2 en nuestras cepas, sin embargo, cepas positivas se asociaron principalmente al filogrupo D1 con un perfil XDR y MDR. Los integrones de clase 3 son parte del grupo de proteobacterias del suelo / agua dulce, tienen una tasa de ocurrencia baja y no se identificaron en este estudio (Deng *et al.*, 2015).

En el análisis de la diversidad genética por ERIC-PCR de las cepas de *E. coli* y UPEC productoras de BLEE, encontramos que algunas cepas estaban estrechamente relacionadas, lo que sugiere una posible diseminación de estas cepas entre las diferentes áreas de servicio del HIMFG. Sin embargo, son necesarios estudios adicionales, utilizando herramientas de secuenciación como el MLST y WGS (Whole Genom Sequencing) para confirmar la distribución poblacional de las cepas productoras de BLEE en el HIMFG. Se identificaron 39 perfiles de

macrorrestricción por ERIC-PCR (35 bandas), además se incluyeron 20 genes asociados a la resistencia, genes asociados a la virulencia de UPEC (*int1*, *int2*, *RV-int1*, *RV-int2*, *fimH*, *csgA*, *ecpA*, *papGII*, *papGIII*, *motA*, *motB*, *fliC*, *iutD*, *fyuA*, *chuA*, *bcsA*, *cnf1*, *hlyA*, *tosA*, *satA*), producción de BLEE y grupo filogenético para la construcción del dendrograma. La resistencia fenotípica no se incluyó en la construcción del dendrograma, debido a que el coeficiente de correlación cofenética ($r=0.79199$) por la prueba de Mante mostró una mayor dispersión de los datos, lo que evidenció que la construcción no era confiable y que las agrupaciones se realizaron al azar.

En el clado BIII se encuentran la mayoría de las cepas que presentaron una similitud >85% y estaban estrechamente relacionadas (Tenover *et al.*,1995), las cuales fueron 855U-051219, 833U1-051218, 937U-051219, 27U-051219, 833U2-051219, 879U-051219 y 925U-051219; estas cepas se diferenciaron por su grupo filogenético y en tres bandas en el patrón de bandas de ERIC-PCR y en la presencia/ausencia de tres genes de virulencia (*papGII*, *fyuA*, *cnf1* y *hlyA*). Además, estas cepas provenían de diferentes áreas del hospital como: Gastroenterología, Cirugía, Reumatología, Oncología y UCIN. Interesantemente, las cepas 855U-051219, 833U1-051218 y 937U-051219 se encuentran estrechamente relacionadas según los criterios de Tenover et al. (1995), y compartieron una similitud en el grupo filogenético y patrón de bandeo de la técnica de ERIC-PCR, pero fueron diferentes en la presencia de algunos genes de virulencia (*fyuA*, *cnf1* y *hlyA*). Estas cepas provenían del área de reumatología y cirugía, estos datos sugieren que las cepas de *E. coli* extraintestinales pueden productoras de BLEE pueden presentar características de una elevada diseminación hospitalaria, asociada a la transferencia horizontal de genes, y por ello la diferencia en los genes de virulencia que se encuentran codificados en PAI.

En el clado BIV, también se identificó que las cepas 895U-051219 y 800D-051219 con un porcentaje de similitud >85%, y según los criterios de Tenover et al. (1995) se encuentran estrechamente relacionadas, en estas cepas se identificó un patrón de bandeo idéntico por ERIC-PCR, la misma presencia de genes de virulencia y

provenían de la misma área del HIMFG (UCIN), sin embargo, difirieron en el grupo filogenético y el tipo de muestra. La diseminación de cepas multirresistentes en áreas hospitalarias cerradas ha sido ampliamente estudiada con la finalidad de frenar la expansión de la resistencia en el nosocomio. Estrategias para parar esta diseminación incluyen la higiene de manos del personal de salud y el control en la aplicación de medicamentos (De la Rosa-Zamboni *et al.*, 2018). Las demás cepas que presentaron una similitud del 80%, no se encontraban relacionadas entre sí.

La microbiota intestinal es un reservorio de genes de resistencia a los antimicrobianos. Entre las enterobacterias, *E. coli* es un importante almacén de genes BLEE. *E. coli* productoras de BLEE puede surgir en el intestino humano o animal después del uso de antibióticos. *E. coli* generalmente se transmite a través de la ruta fecal-oral, el cual suele ser asintomático y persistente. Las cepas MDR de *E. coli* productoras de BLEE son transmisibles a través del contacto con humanos, animales, el medio ambiente, la ingestión de alimentos o agua contaminados (Bezabih *et al.*, 2021).

VIII. Conclusiones

Las cepas clínicas de *Escherichia coli* productoras de BLEE incluidas en este estudio pertenecen a los filogrupos D2, D1, B2₂ y A₁, con perfiles de resistencia de MDR y XDR.

La nitrofurantoína es una buena opción de tratamiento para ITUs provocadas por UPEC productoras de BLEE.

En los filogrupos D₂, D₁ y B2₂ existe un mayor número de genes de virulencia en comparación con el filogrupo A₁.

Entre nuestras cepas no hubo clonalidad, sin embargo, encontramos cepas estrechamente relacionadas entre sí, por lo que existe la posibilidad de que se encuentren diseminadas entre las diferentes áreas del HIMFG y, por ende, transferencia horizontal de genes que puedan contribuir al aumento de cepas multirresistentes y con perfiles de virulencia importantes.

IX. Referencias bibliográficas

- Ali, I., Rifaqat, Z., Ahmed, S., Malik, S., & Dasti, J. I. (2016). Prevalence of multi-drug resistant uropathogenic *Escherichia coli* in Potohar region of Pakistan. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(1), 60-66. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.09.022>
- Asadi Karam, M. R., Habibi, M., and Bouzari, S. (2019). Urinary tract infection: Pathogenicity, antibiotic resistance and development of effective vaccines against Uropathogenic *Escherichia coli*. *Molecular immunology*, 108, 56–67. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2019.02.007>
- Bailón, H., & Sacsquispe, R. (2013). Caracterización molecular de cepas de *Klebsiella pneumoniae* productoras de BLEE causantes de infección intrahospitalaria en el servicio de neonatología de un hospital de Lima, Perú. *Revista Medica Herediana*, 24(2), 101-108. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1018130X2013000200002&script=sci_arttext&tlng=en
- Basu, S., and Mukherjee, M. (2018). Incidence and risk of co-transmission of plasmid-mediated quinolone resistance and extended-spectrum β -lactamase genes in fluoroquinolone-resistant uropathogenic *Escherichia coli*: a first study from Kolkata, India. *Journal of global antimicrobial resistance*, 14, 217–223. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1016/j.jgar.2018.03.009>
- Bezabih, Y. M., Sabiiti, W., Alamneh, E., Bezabih, A., Peterson, G. M., Bezabhe, W. M., & Roujeinikova, A. (2021). The global prevalence and trend of human intestinal carriage of ESBL-producing *Escherichia coli* in the community. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 76(1), 22–29. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1093/jac/dkaa399>
- Bush, K. y Jacoby, GA (2010). Clasificación funcional actualizada de betalactamasas. *Agentes antimicrobianos y quimioterapia*, 54 (3), 969–976. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1128/AAC.01009-09> .

- Bush, K., & Bradford, P. A. (2016). β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 6(8), a025247. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1101/cshperspect.a025247>
- Bush, K., & Bradford, P. A. (2020). Epidemiology of β -Lactamase-Producing Pathogens. *Clinical microbiology reviews*, 33(2), e00047-19. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1128/CMR.00047-19>
- Castro-Alarcón, N., Alonso-Morales, A., Silva-Sánchez, J., & Armenta-Solís, A. (2009). Validación de dos variantes de la técnica rep-PCR para la tipificación molecular de aislados de *Enterobacter cloacae* productores de β -lactamasas de espectro extendido. *Bioquímica*, 34(4), 165-174. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=23887>
- Chen, M., Wu, Y., Yu, S., Liu, S., Wang, Y., Huang, D., Xu, X., & Lin, F. (2019). Drug Resistance and Integron Genes in *Escherichia coli* Isolated from Urinary Tract Infection. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 19(9), 5989–5993. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1166/jnn.2019.16501>
- Contreras-Alvarado, L. M., Zavala-Vega, S., Cruz-Córdova, A., Reyes-Grajeda, J. P., Escalona-Venegas, G., Flores, V., ... & Ochoa, S. A. (2021). Molecular Epidemiology of Multidrug-Resistant Uropathogenic *Escherichia coli* O25b Strains Associated with Complicated Urinary Tract Infection in Children. *Microorganisms*, 9(11), 2299. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9112299>
- da Silva, P., Lustri, B. C., Castilho, I. G., Ferreira, A. M., Hernandez, R. T., Schembri, M. A., and Moreira, C. G. (2021). Genome profiling of fluoroquinolone-resistant uropathogenic *Escherichia coli* isolates from Brazil. *Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 10.1007/s42770-021-00513-3. Advance online publication. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1007/s42770-021-00513-3>
- Denamur, E., Clermont, O., Bonacorsi, S., and Gordon, D. (2021). The population genetics of pathogenic *Escherichia coli*. *Nature reviews*.

Microbiology, 19(1), 37–54. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1038/s41579-020-0416-x>

- Deng, Y., Bao, X., Ji, L., Chen, L., Liu, J., Miao, J., Chen, D., Bian, H., Li, Y., and Yu, G. (2015). Resistance integrons: class 1, 2 and 3 integrons. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 14, 45. <https://doi.org/10.1186/s12941-015-0100-6>
- Flokas, M. E., Detsis, M., Alevizakos, M., and Mylonakis, E. (2016). Prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in paediatric urinary tract infections: A systematic review and meta-analysis. *The Journal of infection*, 73(6), 547–557. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2016.07.014>
- Ghaly, T. M., Geoghegan, J. L., Tetu, S. G., and Gillings, M. R. (2020). The Peril and Promise of Integrons: Beyond Antibiotic Resistance. *Trends in microbiology*, 28(6), 455–464. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1016/j.tim.2019.12.002>
- Guyer, D. M., Henderson, I. R., Nataro, J. P., and Mobley, H. L. (2000). Identification of sat, an autotransporter toxin produced by uropathogenic *Escherichia coli*. *Molecular microbiology*, 38(1), 53-66. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.02110.x>
- Guyer, D. M., Radulovic, S., Jones, F. E., and Mobley, H. L. (2002). Sat, the secreted autotransporter toxin of uropathogenic *Escherichia coli*, is a vacuolating cytotoxin for bladder and kidney epithelial cells. *Infection and immunity*, 70(8), 4539-4546. [:https://doi.org/10.1128/IAI.70.8.4539-4546.2002](https://doi.org/10.1128/IAI.70.8.4539-4546.2002)
- Johnson, J. R., Davis, G., Clabots, C., Johnston, B. D., Porter, S., DebRoy, C., Pomputius, W., Ender, P. T., Cooperstock, M., Slater, B. S., Banerjee, R., Miller, S., Kisiela, D., Sokurenko, E. V., Aziz, M., & Price, L. B. (2016). Household Clustering of *Escherichia coli* Sequence Type 131 Clinical and Fecal Isolates According to Whole Genome Sequence Analysis. *Open forum infectious diseases*, 3(3), ofw129. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1093/ofid/ofw129>

- Kaushik, M., Kumar, S., Kapoor, R. K., Viridi, J. S., and Gulati, P. (2018). Integrons in Enterobacteriaceae: diversity, distribution and epidemiology. *International journal of antimicrobial agents*, 51(2), 167–176. [https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1016/j.ijantimicag.2017.10.004](https://doi.org/pbidi.unam.mx:2443/10.1016/j.ijantimicag.2017.10.004)
- Lee, D. S., Lee, S. J., and Choe, H. S. (2018). Community-Acquired Urinary Tract Infection by *Escherichia coli* in the Era of Antibiotic Resistance. *BioMed research international*, 2018, 7656752. <https://doi.org/10.1155/2018/7656752>
- Lee, H., Doak, T. G., Popodi, E., Foster, P. L., and Tang, H. (2016). Insertion sequence-caused large-scale rearrangements in the genome of *Escherichia coli*. *Nucleic acids research*, 44(15), 7109–7119. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw647>
- López-Ramírez, Kelly Lelia, Díaz-Maldonado, Kevin Colbert, Vergara Espinoza, Martha Arminda, Santamaría-Veliz, Olivia, Serquén-López, Luis Miguel, Canelo Olinda, Bustamante, León-Jimenez, Franco Ernesto, & Aguilar-Gamboa, Franklin-Rómulo. (2018). Patrón de clonalidad mediante ERIC-PCR y REP-PCR de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productores de betalactamasas de espectro extendido, aisladas de pacientes con infección urinaria intrahospitalaria. Hospital Regional Lambayeque, Perú. *Horizonte Médico (Lima)*, 18(2), 11-18. <https://doi.org/10.24265/horizmed.2018.v18n2.03>
- Luna-Pineda, V. M., Ochoa, S. A., Cruz-Córdova, A., Cázares-Domínguez, V., Reyes-Grajeda, J. P., Flores-Oropeza, M. A., Arellano-Galindo, J., Hernández-Castro, R., Flores-Encarnación, M., Ramírez-Vargas, A., Flores-García, H. J., Moreno-Fierros, L., and Xicohtencatl-Cortes, J. (2018b). Features of urinary *Escherichia coli* isolated from children with complicated and uncomplicated urinary tract infections in Mexico. *PloS one*, 13(10), e0204934. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1371/journal.pone.0204934>
- Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D. L., Rice, L. B., Stelling, J., Struelens, M. J., Vatopoulos, A.,

Weber, J. T., and Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 18(3), 268–281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>

- Malekzadegan, Y., Khashei, R., Sedigh Ebrahim-Saraie, H., & Jahanabadi, Z. (2018). Distribution of virulence genes and their association with antimicrobial resistance among uropathogenic *Escherichia coli* isolates from Iranian patients. *BMC infectious diseases*, 18(1), 572. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1186/s12879-018-3467-0>
- Merino Velasco, I. (2018). *Resistencia, virulencia y estructura poblacional de "Escherichia coli" uropatógeno* (Doctoral dissertation, Universidad Complutense de Madrid). <https://eprints.ucm.es/id/eprint/46501/>
- Millner, R., and Becknell, B. (2019). Urinary Tract Infections. *Pediatric clinics of North America*, 66(1), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2018.08.002>
- Miranda-Estrada, L. I., Ruíz-Rosas, M., Molina-López, J., Parra-Rojas, I., González-Villalobos, E., & Castro-Alarcón, N. (2017). Relationship between virulence factors, resistance to antibiotics and phylogenetic groups of uropathogenic *Escherichia coli* in two locations in Mexico. 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(7), 426–433. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1016/j.eimc.2016.02.021>
- Munita, JM y Arias, CA (2016). Mecanismos de resistencia a los antibióticos. *Espectro de microbiología*, 4(2), 10.1128 / microbiolspec.VMBF-0016-2015. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015>
- Naziri, Z., Derakhshandeh, A., Soltani Borchaloe, A., Poormaleknia, M., & Azimzadeh, N. (2020). Treatment Failure in Urinary Tract Infections: A Warning Witness for Virulent Multi-Drug Resistant ESBL-

Producing *Escherichia coli*. *Infection and drug resistance*, 13, 1839–1850.
<https://doi.org/10.2147/IDR.S256131>

- Nowrouzian, F. L., Clermont, O., Edin, M., Östblom, A., Denamur, E., Wold, A. E., and Adlerberth, I. (2019). *Escherichia coli* B2 Phylogenetic Subgroups in the Infant Gut Microbiota: Predominance of Uropathogenic Lineages in Swedish Infants and Enteropathogenic Lineages in Pakistani Infants. *Applied and environmental microbiology*, 85(24), e01681-19. <https://doi.org.pbidi.unam.mx:2443/10.1128/AEM.01681-19>
- Ochoa, S. A., Cruz-Córdova, A., Luna-Pineda, V. M., Reyes-Grajeda, J. P., Cázares-Domínguez, V., Escalona, G., Sepúlveda-González, M. E., López-Montiel, F., Arellano-Galindo, J., López-Martínez, B., Parra-Ortega, I., Giono-Cerezo, S., Hernández-Castro, R., de la Rosa-Zamboni, D., & Xicohtencatl-Cortes, J. (2016). Multidrug- and Extensively Drug-Resistant Uropathogenic *Escherichia coli* Clinical Strains: Phylogenetic Groups Widely Associated with Integrons Maintain High Genetic Diversity. *Frontiers in microbiology*, 7, 2042. <https://doi.org.pbidi.unam.mx:2443/10.3389/fmicb.2016.02042>
- OMS (2018) Resistencia a antibióticos. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibi%C3%B3ticos> Fecha de consulta: 29/03/2019
- Paniagua-Contreras, G. L., Monroy-Pérez, E., Rodríguez-Moctezuma, J. R., Domínguez-Trejo, P., Vaca-Paniagua, F., and Vaca, S. (2017). Virulence factors, antibiotic resistance phenotypes and O-serogroups of *Escherichia coli* strains isolated from community-acquired urinary tract infection patients in Mexico. *Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi*, 50(4), 478–485. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2015.08.005>
- Paterson, D. L., and Bonomo, R. A. (2005). Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clinical microbiology reviews*, 18(4), 657–686. <https://doi.org/10.1128/CMR.18.4.657-686.2005>

- Pazos M., Peters K. (2019) Peptidoglicano. En: Kuhn A. (eds) Membranas y paredes de células bacterianas. Bioquímica subcelular, vol. 92. Springer, Cham. https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1007/978-3-030-18768-2_5
- Peleg, A. Y., and Hooper, D. C. (2010). Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. The New England journal of medicine, 362(19), 1804–1813. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0904124>
- Ramírez-Castillo, FY, Moreno-Flores, AC, Avelar-González, FJ, Márquez-Díaz, F., Harel, J. y Guerrero-Barrera, AL (2018). Una evaluación de aislamientos de *Escherichia coli* multirresistentes en infecciones del tracto urinario de Aguascalientes, México: estudio transversal. *Anales de microbiología clínica y antimicrobianos*, 17 (1), 34. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1186/s12941-018-0286-5>
- Rezatofighi, SE, Mirzarazi, M. y Salehi, M. (2021). Genes de virulencia y grupos filogenéticos de aislados de *Escherichia coli* uropatógenos de pacientes con infección del tracto urinario y sujetos de control no infectados: un estudio de casos y controles. *Enfermedades infecciosas de BMC*, 21 (1), 361. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1186/s12879-021-06036-4>
- Schmidt, B., and Copp, H. L. (2015). Work-up of Pediatric Urinary Tract Infection. The Urologic clinics of North America, 42(4), 519–526. <https://doi.org/10.1016/j.ucl.2015.05.011>
- Sedighi, I., Arabestani, M. R., Rahimbakhsh, A., Karimitabar, Z., and Alikhani, M. Y. (2015). Dissemination of Extended-Spectrum β -Lactamases and Quinolone Resistance Genes Among Clinical Isolates of Uropathogenic *Escherichia coli* in Children. *Jundishapur journal of microbiology*, 8(7), e19184. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.5812/jjm.19184v2>
- Shariff V A, A. R., Shenoy M, S., Yadav, T., and M, R. (2013). The antibiotic susceptibility patterns of uropathogenic *Escherichia coli*, with special reference to the fluoroquinolones. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR*, 7(6), 1027–1030. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.7860/JCDR/2013/4917.3038>

- Suárez, C., & Gudiol, F. (2009). Antibióticos betalactámicos [Beta-lactam antibiotics]. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 27(2), 116–129. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1016/j.eimc.2008.12.001>
- Subashchandrabose, S., and Mobley, H. L. (2017). Virulence and fitness determinants of uropathogenic *Escherichia coli*. *Urinary Tract Infections: Molecular Pathogenesis and Clinical Management*, 235-261. <https://doi.org/10.1128/9781555817404.ch12>
- Terlizzi, M. E., Gribaudo, G., and Maffei, M. E. (2017). UroPathogenic *Escherichia coli* (UPEC) Infections: Virulence Factors, Bladder Responses, Antibiotic, and Non-antibiotic Antimicrobial Strategies. *Frontiers in microbiology*, 8, 1566. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01566>
- Thomas, C. M., and Nielsen, K. M. (2005). Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nature reviews. Microbiology*, 3(9), 711–721. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1234>
- Welch, R. A. (2016). Uropathogenic *Escherichia coli*-associated exotoxins. *Microbiology spectrum*, 4(3), 4-3. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.UTI-0011-2012>
- Zeng, X., and Lin, J. (2013). Beta-lactamase induction and cell wall metabolism in Gram-negative bacteria. *Frontiers in microbiology*, 4, 128. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00128>