



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**“Identificación de genes diarreogénicos en cepas uropatógenas de
Escherichia coli”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

LILIANA MARTÍNEZ FRANCO

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ERIC MONROY PÉREZ
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM
COMITÉ TUTOR: DRA. GLORIA LUZ PANIAGUA CONTRERAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM
DRA. IRMA ROMERO ÁLVAREZ
FACULTAD DE MÉDICINA, UNAM

LOS REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA, ESTADO DE MÉXICO, FEBRERO 2024



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

“Identificación de genes diarreogénicos en cepas uropatógenas de

***Escherichia coli*”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

LILIANA MARTÍNEZ FRANCO

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ERIC MONROY PÉREZ

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. GLORIA LUZ PANIAGUA CONTRERAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

DRA. IRMA ROMERO ÁLVAREZ

FACULTAD DE MÉDICINA, UNAM

LOS REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA, ESTADO DE MÉXICO, FEBRERO 2024

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

OFICIO CPCB/422/2022

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **27 de marzo de 2023** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **(Biología Experimental)** de la estudiante **MARTÍNEZ FRANCO LILIANA**, con número de cuenta **312040293** con la tesis titulada **"Identificación de genes diarreogénicos en cepas uropatógenas de *Escherichia coli*."**, realizada bajo la dirección del **DR. ERIC MONROY PÉREZ**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. JUAN XICOHTENCATL CORTÉS
Vocal: DRA. ARIADNNA DEL CARMEN CRUZ CÓRDOVA
Vocal: DR. PEDRO RAMÍREZ GARCÍA
Vocal: DR. ERASMO NEGRETE ABASCAL
Secretario: DRA. IRMA ROMERO ÁLVAREZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 18 de mayo de 2023

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Unidad de Posgrado, Edificio D, 1º Piso, Circuito de Posgrados, Ciudad Universitaria
Alcaldía Coyoacán, C. P. 04510 CDMX Tel. (+5255)5623 7002 <http://pbiol.posgrado.unam.mx/>

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

- **Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM**
- **A la Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT)**
por otorgarme la beca durante los estudios de Posgrado.
- **A mi tutor principal, el Doctor Eric Monroy Pérez.**
- **Al comité tutor, las Doctoras Gloria Luz Paniagua Contreras e Irma Romero Álvarez.**

DEDICATORIA

“Yo, Nezahualcóyotl, lo pregunto:
¿Acaso de veras se vive con raíz en la Tierra?
No para siempre en la Tierra:
sólo un poco aquí.
Aunque sea de jade se quiebra,
aunque sea de oro se rompe,
aunque sea plumaje de quetzal se desgarrar.
No para siempre en la Tierra:
solo un poco aquí”.

Nezahualcóyotl. Yo lo pregunto

A mis padres:

Por creer en mí en cada momento, por ayudarme y motivarme a seguir adelante en mi carrera. No habría logrado nada sin ustedes. Los amo.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. Características de <i>Escherichia coli</i>	3-4
1.2. <i>E. coli</i> patógena intestinal y extraintestinal	4
1.3. Factores de virulencia de <i>E. coli</i> diarreogénica (DEC)	5
1.3.1. Gen <i>eaeA</i>	7
1.3.2. Gen <i>vt1</i>	7
1.3.3. Gen <i>lpfA</i>	8
1.3.4. Gen <i>bfpA</i>	8-9
1.3.5. Gen <i>stbA</i>	9
1.3.6. Gen <i>pet</i>	9
1.3.7. Gen <i>aggA</i>	10
1.3.8. Gen <i>aggC</i>	10
1.3.9. Gen <i>aggR</i>	10-11
1.3.10. Gen <i>shf</i>	11
1.3.11. Gen <i>pilS</i>	11-12
1.3.12. Gen <i>aatA</i>	12
1.3.13. Gen <i>aafC</i>	12
1.3.14. Gen <i>agg3C</i>	13
1.3.15. Gen <i>aap</i>	13
1.3.16. Gen <i>toxB</i>	14
1.4. Infecciones del tracto urinario por <i>E. coli</i> uropatógena (UPEC)	14-17

1.4.1. Factores de virulencia de <i>E. coli</i> uropatógena (UPEC).....	17
a) Adhesinas.....	17-20
b) Toxinas.....	20-21
c) Sistemas de adquisición de hierro.....	22-23
d) Protectinas.....	23-26
1.5. Resistencia a los antimicrobianos.....	26-30
2. OBJETIVOS.....	31
2.1. Objetivo general.....	31
2.2. Objetivos particulares.....	31
3. ANTECEDENTES.....	32-34
4. METODOLOGÍA.....	35
4.1. Obtención y siembra de las muestras.....	35
4.2. Identificación bioquímica de <i>Escherichia coli</i>	35-36
4.3. Extracción de DNA bacteriano.....	36
4.4. Identificación molecular por PCR.....	36-37
4.5. Prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos.....	37-38
4.6. Identificación de los genes diarreogénicos en las cepas uropatógenas de <i>Escherichia coli</i> (UPEC).....	38-39
4.7. Electroforesis.....	39
4.8. Preparación e infección del cultivo de la línea celular A431 para la transcripción de los genes diarreogénicos en las cepas UPEC.....	39-41
4.9. Cosecha de <i>E. coli</i> del cultivo celular.....	41
4.10. Extracción y purificación de RNA.....	42-43
4.11. Reversotranscripción.....	44-45

4.12.	Transcripción de los marcadores de virulencia por PCR en tiempo real.....	45-46
4.13.	Análisis estadístico.....	46
5.	RESULTADOS.....	47
5.1.	Pacientes estudiados.....	47-48
5.2.	Resistencia bacteriana a los antimicrobianos.....	48-49
5.3.	Detección de los genes diarreogénicos en las cepas de <i>E. coli</i> uropatógenas....	49-51
5.4.	Asociación de la detección de los genes DEC con la multirresistencia a los antimicrobianos.....	51-52
5.5.	Transcripción de los genes diarreogénicos en las cepas uropatógenas de <i>E. coli</i>	52-53
5.6.	Patrones de expresión de los genes DEC asociados con la resistencia a los antibióticos en las cepas UPEC.....	53-55
6.	DISCUSIÓN.....	56
6.1.	Pacientes estudiados.....	56-57
6.2.	Resistencia bacteriana a los antimicrobianos.....	57-60
6.3.	Detección de los genes diarreogénicos en las cepas de <i>E. coli</i>	60-62
6.4.	Expresión de los genes diarreogénicos en las cepas uropatógenas de <i>E. coli</i>	62-63
6.5.	Patrones de expresión de los genes diarreogénicos asociados con la resistencia a los antibióticos en las cepas UPEC.....	63-64
7.	CONCLUSIONES.....	65
8.	PROSPECTIVAS.....	66
9.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67-83
10.	ANEXO.....	84-114

RESUMEN

Las infecciones del tracto urinario (IsTU) ocasionadas por *Escherichia coli* uropatógena (UPEC) se encuentran entre las enfermedades más frecuentes en la población mundial. La patogenicidad de UPEC se debe a que es portadora de numerosos genes de virulencia. Es frecuente que las cepas UPEC compartan características de virulencia con los patotipos de *E. coli* diarreogénicos (DEC). Debido a que la participación de los genes diarreogénicos de las cepas UPEC durante las infecciones del tracto urinario ha sido poco estudiado, el objetivo de este trabajo fue establecer los diferentes patrones de expresión de los genes diarreogénicos característicos de los patotipos intestinales de *E. coli*, y su relación con el fenotipo de multiresistencia a los antimicrobianos en cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con IsTU. Se analizaron microbiológicamente 321 muestras de orina de pacientes con IsTU del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS). Las cepas de *E. coli* fueron identificadas por pruebas bioquímicas y por PCR, mediante amplificación del gen 16S de la subunidad ribosomal de *E. coli*. El fenotipo de resistencia a 12 antibióticos en las cepas UPEC se determinó por el método de Kirby-Bauer y la detección de 16 genes diarreogénicos se realizó por PCR de punto final. Después de la infección en la línea celular vaginal A431 con las cepas UPEC, se determinó la transcripción de los genes diarreogénicos por PCR en Tiempo Real. A partir de las muestras de orina de los pacientes con IsTU (n=321) se identificaron 194 cepas de *E. coli*. El 98% (n=191) de las cepas UPEC fue multidrogo-resistente a los antibióticos, principalmente a los betalactámicos ampicilina (92%), cefalotina (92%) y carbenicilina (91%), a la quinolona pefloxacina (73%), a la ceftriaxona (68%) y al trimetoprim-sulfametoxazol (63%). Los genes característicos del patotipo de *E. coli* enteroagregativa (EAEC) identificados con más frecuencia en las cepas UPEC fueron los de adhesión; *stbA* (87/194), y *shf* (69/194), de toxinas; *pet* (38/194) y de colonización; *aap* (32/194), mientras que los genes del patotipo de *E. coli* enteropatógeno (EPEC) más comunes en las cepas UPEC fueron de adhesión; *lpfA* (43/194), *eaeA* (18/194) y *bfpA* (8/194). Los genes diarreogénicos que se transcribieron con mayor frecuencia en las cepas UPEC, fueron los de adhesión; *stbA* (EAEC; 36/99), y *shf* (EAEC; 24/99), de colonización; *aap* (20/99) y de toxinas; *pet* (EAEC; 13/99). Se identificaron 12 distintos patrones de transcripción de los genes diarreogénicos relacionados con el fenotipo de resistencia a los antibióticos en las cepas UPEC. La presencia de diferentes patrones de expresión de los genes diarreogénicos en las cepas UPEC, relacionado a la multidrogo-resistencia, podría coadyuvar al establecimiento, cronicidad y/o agudeza de las infecciones del tracto urinario.

ABSTRACT

Urinary tract infections (UTIs) which are caused by uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) are among of the most frequent major diseases in the population worldwide. The pathogenicity of UPEC is due to the fact that it carries numerous virulence genes. It is common for UPEC strains to share virulence characteristics with diarrheagenic *E. coli* (DEC) pathotypes. Because the involvement of diarrheagenic genes of UPEC strains during urinary tract infections has been little studied, the aim of this work was to establish the different expression patterns of diarrheagenic genes which are characteristic of intestinal *E. coli* pathotypes, and their relationship with the antimicrobial multidrug-resistance phenotype in *E. coli* strains isolated from patients with UTIs. A total of 321 urine samples from patients with UTIs who were being attended at Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) were analyzed microbiologically. The *E. coli* strains were identified by biochemical and PCR tests, by amplification of the 16S gene of the ribosomal subunit of *E. coli*. The phenotype of resistance to 12 antibiotics in UPEC strains was determined by the Kirby-Bauer method and the detection of 16 diarrheagenic genes was performed by end-point PCR. Subsequent to infection of the A431 vaginal cell line with UPEC strains, the transcription of diarrheagenic genes was determined by real-time PCR. One hundred ninety-four *E. coli* strains were identified from urine samples of patients suffering from UTI (n=321). Ninety-eight percent (n=191) of the UPEC strains were multidrug-resistant to antibiotics, mainly to the beta-lactams ampicillin (92%), cephalothin (92%) and carbenicillin (91%), the quinolone pefloxacin (73%), to ceftriaxone (68%) and trimethoprim-sulfamethoxazole (63%). The characteristic genes of the enteroaggregative *E. coli* (EAEC) pathotype, most frequently identified in UPEC strains, were adhesin; *stbA* (87/194), and *shf* (69/194), toxins; *pet* (38/194) and colonization; *aap* (32/194), whereas the most common enteropathogenic *E. coli* (EPEC) pathotype genes in UPEC strains were adhesin; *lpfA* (43/194), *eaeA* (18/194) and *bfpA* (8/194). *E. coli* enteropathogenic (EPEC) pathotype genes most common in UPEC strains were adhesin; *lpfA* (43/194), *eaeA* (18/194), and *bfpA* (8/194). The most frequently transcribed diarrheagenic genes in UPEC strains were adhesin; *stbA* (EAEC; 36/99), and *shf* (EAEC; 24/99), colonization; *aap* (20/99) and toxin; *pet* (EAEC; 13/99). Twelve distinct transcription patterns of diarrheagenic genes related to antibiotic resistance phenotype were identified in UPEC strains. The presence of different expression patterns of diarrheagenic genes in UPEC strains, related to multidrug resistance, could contribute to the establishment, chronicity and/or acuteness of urinary tract infections.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Características generales de *Escherichia coli*

E. coli es un bacilo Gram negativo, mide de 2-3 μm , es anaerobio facultativo capaz de fermentar glucosa y otros azúcares, reduce nitrato a nitrito y produce catalasa, pero no oxidasa y no forma esporas. Fermenta la lactosa, su morfología colonial, se caracteriza por formar colonias redondas de borde liso, con una tonalidad en color rosa en el agar McConkey por la utilización de lactosa y en el agar Eosina Azul de Metileno (EMB) las colonias redondas producen un brillo verde metálico por la rápida fermentación de la lactosa. *E. coli* produce α -hemolisina en el agar sangre (Croxen *et al.*, 2013). *E. coli* forma parte de la microbiota del intestino, regula procesos clave en el hospedero, como el desarrollo de la respuesta inmune y la obtención de nutrientes (Yan & Polk, 2004). En la membrana externa de *E. coli* se encuentra el Lipopolisacárido (LPS), que tiene tres regiones estructurales, un ancla hidrofóbica o lípido A, un oligosacárido central, y la cadena larga de polisacárido llamado antígeno O. Algunas cepas de *E. coli* también producen otro polisacárido capsular que provee un antígeno de superficie llamado antígeno K. Existen más de 80 antígenos K en *E. coli*, que junto con los lipopolisacáridos representan los principales factores de virulencia (Donnenberg, 2013).

La serotipificación es uno de los métodos tradicionales utilizados con mayor frecuencia para la clasificación de *E. coli*; la cual, se basa en el uso de antisueros para identificar antígenos somáticos O y antígenos flagelares H (Ingle *et al.*, 2016). Hasta el momento se han reportado aproximadamente 187 antígenos O y 53 antígenos H en *E. coli* (Hernández-Chiñas *et al.*, 2019).

Las cepas de *E. coli* también son clasificadas de acuerdo a los análisis filogenéticos en ocho filogrupos principales, tales como: A, B1, B2, C, D, E, F y el Clado críptico I (Clermont *et al.*, 2013).

1.2 *E. coli* patógena intestinal y extraintestinal.

Las cepas patógenas de *E. coli* se clasifican como *E. coli* diarreogénicas (DEC, por sus siglas en ingles) y *E. coli* patógenas extraintestinales (ExPEC, por sus siglas en ingles). Las cepas patógenas diarreogénicas se dividen en seis patotipos principales; *E. coli* enterotoxigénica (ETEC, por sus siglas en ingles), *E. coli* enteropatógena (EPEC, por sus siglas en ingles), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC, por sus siglas en ingles), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC, por sus siglas en ingles), *E. coli* enteroagregativa (EAEC, por sus siglas en ingles), y *E. coli* difusa adherente (DAEC, por sus siglas en ingles). Esta clasificación se basa en los síntomas clínicos presentes, el tipo de diarrea provocada, los síndromes relacionados, el tipo de interacción de la bacteria con las células epiteliales del intestino y los determinantes moleculares asociados a la virulencia y patogenicidad (Desvaux *et al.*, 2020).

Las cepas de *E. coli* extraintestinales pueden infectar el epitelio cérvico-vaginal, el tracto urinario, ocasionando cistitis o pielonefritis, causar bacteremia e infectar el cerebro. *E. coli* extraintestinal se divide en 4 principales grupos de acuerdo al tipo de infección que ocasiona: *E. coli* asociada a meningitis neonatal (NMEC, por sus siglas en ingles), *E. coli* causante de sepsis (SEPEC, por sus siglas en ingles), *E. coli* cérvico-vaginal (CVEC, por sus siglas en ingles) y *E. coli* uropatógena (UPEC, por sus siglas en ingles) (Dale & Woodford, 2015; Russo & Johnson, 2000).

1.3 Factores de virulencia de DEC

El proceso de infección de las cepas DEC ocurre mediante 4 etapas principales; a) Colonización de la mucosa intestinal, b) Evasión de las defensas del hospedero, c) Multiplicación y, d) Daño al hospedero. Las cepas de *E. coli* diarreogénicas poseen fimbrias superficiales que les permiten adherirse a la mucosa del intestino delgado. Una vez que ha colonizado el intestino, cada patotipo puede atacar al hospedero de forma diferente (Figura 1); ya sea produciendo toxinas como lo hace ETEC y EAEC, invadiendo como la EIEC o mediante la adhesión íntima de la membrana como EPEC y EHEC (Nataro & Kaper, 1998). A continuación, se describen los diferentes factores de virulencia DEC.

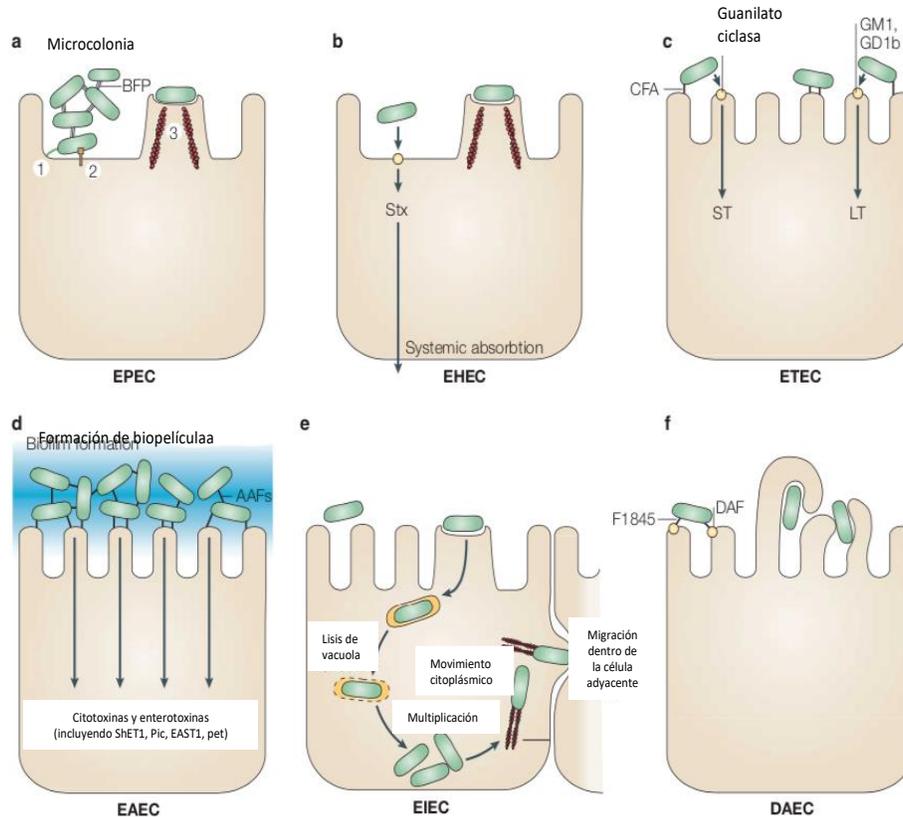


Figura 1. Esquema patogénico de DEC. Los seis patotipos de DEC tienen características únicas para su interacción con las células eucariotas. a) EPEC se adhiere a los enterocitos del intestino delgado, destruye la arquitectura microvillar, e induce la característica de adherencia y borramiento. El trastorno citoesquelético es acompañado por una respuesta inflamatoria y de diarrea. b) La característica distintiva de EHEC es la producción de la toxina Shiga (Sxt), cuya absorción sistémica conduce a complicaciones potencialmente mortales. c) ETEC se adhiere a los enterocitos del intestino delgado e inducen diarrea acuosa por la secreción de enterotoxinas termolábiles (LT) y/o termoestables (ST). d) EAEC se adhiere al epitelio del intestino delgado y grueso en una gruesa biopelícula y elabora enterotoxinas y citotoxinas secretoras. e) EIEC invade la célula epitelial colónica, lisa el fagosoma y se mueve a través de la célula mediante la nucleación de microfilamentos de actina. f) DAEC provoca un efecto de transducción de señal característico en los enterocitos del intestino delgado que se manifiesta como el crecimiento de proyecciones celulares similares a dedos largos. AAF, fimbrias de adherencia agregada; BFP, pilus formadores de haces; CFA, antígeno del factor de colonización; DAF, factor acelerado del decaimiento; EAST, *E. coli* ST1 enteroagregativa; LT, enterotoxina termolábil; ShET1, enterotoxina 1 de Shigella; ST, enterotoxina termoestable (Tomada y modificada de Kaper *et al.*, 2004).

1.3.1 Gen *eaeA*

EPEC y EHEC provocan lesiones de adherencia y esfascelamiento/destrucción (A/E), que están mediadas por muchos genes bacterianos presentes en la isla de patogenicidad denominada locus de borrado del enterocito (LEE, por sus siglas en ingles) (Badea *et al.*, 2003). El gen *eaeA* se localiza en la isla LEE y codifica para la proteína intimina (EaeA), una proteína de membrana externa de 94-97kDa, que facilita la adherencia entre la bacteria y el enterocito en la mucosa intestinal (Ochoa, 2011; Yilmaz *et al.*, 2006).

1.3.2 Gen *vt1*

El gen *vt1* está asociado al patotipo de EHEC y codifica para la verotoxina 1 (VT1). La función de las verotoxinas, es la de inactivar el RNA ribosomal, inhibiendo la síntesis de proteínas y causando la muerte de la célula del hospedero; además, están asociadas a enfermedades humanas. EHEC contiene diferentes factores de virulencia que incluyen las verotoxinas (VT1 y VT2) y están asociadas con el síndrome urémico hemolítico (HUS), la púrpura trombocitopénica trombótica (PTT) y la colitis hemorrágica (Yilmaz *et al.*, 2006). La producción de verotoxinas, es la principal característica de virulencia de EHEC (European Food Safety Authority, 2011).

1.3.3 Gen *lpfA*

El gen *lpfA* codifica para la proteína fimbrial polar larga (Lpf) y es ensamblada exclusivamente por EHEC. Esta fimbria tiene una función importante en la persistencia y la colonización del intestino, uniéndose a las proteínas de la matriz extracelular y participa en la adherencia a las células intestinales (Farfan *et al.*, 2011; Torres *et al.*, 2008). El locus *lpf*, es regulado por señales ambientales (fase de crecimiento, temperatura y pH) y por los reguladores transcripcionales H-NS y Ler (locus del regulador codificado por el borramiento de los enterocitos) codificados en la isla de patogenicidad LEE (Farfan *et al.*, 2011; Torres *et al.*, 2008). El regulador H-NS previene la transcripción descontrolada de genes en las islas de patogenicidad, para asegurar que la actividad celular de la bacteria se mantenga y participar en la adquisición y mantenimiento de ADN extraño (Desvaux *et al.*, 2020).

1.3.4 Gen *bfpA*

El gen *bfpA* codifica para el pili formador de penachos (BFP) ensamblados por EPEC. Los BFP son fimbrias o pili tipo 4 (T4P), cuya biogénesis requiere 14 genes codificados en el plásmido de virulencia denominado factor de adherencia de EPEC (pEAF). EPEC se pueden categorizar en EPEC típicas (tEPEC) y EPEC atípicas (aEPEC). Las típicas (tEPEC) se caracterizan por formar microcolonias y por colonizar el intestino delgado en la fase temprana de la infección gracias a la expresión del patrón de adherencia localizada (LA) en la superficie de las células epiteliales intestinales. Las atípicas (aEPEC) presentan un patrón de adherencia agregativa (AA) que forman agrupaciones bacterianas que involucran otros factores de adhesión como filamentos EspA (proteína secretada de EPEC o proteína de

señalización A) y LifA (factor inhibidor de linfocitos) o ECP (pili común de *E. coli*, por sus siglas en inglés) (Desvaux *et al.*, 2020;; Vidal, Canizález-Román, Gutiérrez-Jiménez, & Navarro-García, 2007).

1.3.5 Gen *stbA*

El gen *stbA* (proteína A de herencia estable del plásmido) está asociado al patotipo EAEC, está localizada en el plásmido de adherencia agregativa (pAA) y produce una proteína que es necesaria para que un bajo número de copias del plásmido se transfiera a las células hijas. Por lo tanto, se presume que el gen *stbA* es necesario para la herencia del plásmido a las células hijas (Min, Tabuchi, Fan, Womble, & Rownd, 1988; Nazemi *et al.*, 2011).

1.3.6 Gen *pet*

El gen *pet* (plásmido que codifica para la enterotoxina, por sus siglas en inglés) se localiza en el plásmido AA de EAEC. Pet pertenece a la familia de proteínas autotransportadoras de serin-proteasa de Enterobacteriaceae (SPATE, por sus siglas en inglés) con actividad enterotóxica y citotóxica por lo que puede ser un factor crítico de virulencia en las EAEC (Czeczulin, Whittam, Henderson, Navarro-Garcia, & Nataro, 1999; Eslava *et al.*, 1998; European Food Safety Authority, 2011). La actividad citotóxica de Pet modifica el citoesqueleto de los enterocitos por la degradación de la α -fodrina que conduce al redondeo de las células y el desprendimiento celular (Gomes *et al.*, 2016). Además, su actividad enterotóxica es consistente con la diarrea secretora que se observa en la mayoría de los pacientes con enteritis por EAEC (Eslava *et al.*, 1998).

1.3.7 Gen *aggA*

El gen *aggA* codifica para la subunidad principal de la fimbria de adherencia agregativa I (AAF/I), descrita para el patotipo EAEC. Las fimbrias (AAF/I y AAF/II) median la expresión del patrón AA a las células epiteliales. Los genes que codifican AAF/I se localizan en dos regiones no unidas en un plásmido de virulencia de 60 KDa (Elias, Czeczulin, Henderson, Trabulsi, & Nataro, 1999).

1.3.8 Gen *aggC*

El gen *aggC* (gen del operón de la fimbria AAF/I) es un marco de lectura abierto de 252 nucleótidos, y codifica para una proteína (Mr) de peso molecular de 90 900 la cual presenta homología significativa con el gen que codifica para la proteína ujier de la membrana externa de *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pestis* y *Bordetella pertussis*. También tiene homología con la proteína PapC, una proteína ujier de membrana externa relacionada a la biogénesis de la fimbria P de *E. coli* (Ochoa, 2011; Savarino, Fox, Yikang, & Nataro, 1994).

1.3.9 Gen *aggR*

El gen *aggR* (gen regulador maestro de los genes del plásmido Vir) se asocia al patotipo EAEC (European Food Safety Authority, 2011). Este gen codifica para el activador transcripcional AggR de la familia AraC/XylS, una familia de proteínas de unión a ADN, que presentan un mayor nivel de identidad de aminoácidos con los reguladores de ETEC (Elias *et al.*, 1999). AggR regula a los genes que codifican para las fimbrias de adherencia agregativa (AAF/I y AAF/II) que incluye cinco tipos (AAF/I-AAF/V), el gen *aap* (proteína

dispersina), *aat* (sistema de secreción Aat) y AggR (Huang, Mohanty, DuPont, Okhuysen, & Chiang, 2006; Nazemi *et al.*, 2011; Nishi *et al.*, 2003). Las AAF median el patrón AA y la formación de biopelículas (Gomes *et al.*, 2016). Estudios epidemiológicos sugieren que las cepas que expresan AggR tienen más probabilidad de causar diarrea, por lo que se ha sugerido llamarlas EAEC típicas (Morin *et al.*, 2013).

1.3.10 Gen *shf*

El gen *shf* está asociado al patotipo de EHEC y codifica para las proteínas Shf. Hasta ahora no se conoce la función de estas proteínas, pero su homólogo mejor caracterizado es la proteína de membrana externa IcaB (25% similitud de aminoácidos) de *Staphylococcus epidermidis*, una proteína implicada en la modificación de la adhesina intercelular de polisacáridos (PIA, por sus siglas en inglés) a través de la desacetilación de la poli-N-acetilglucosamina durante de formación de la biopelícula bacteriana. La transcripción de este gen es dependiente de AggR (Czeczulin *et al.*, 1999; Fujiyama *et al.*, 2008).

1.3.11 Gen *pilS*

El gen *pilS* está asociado al patotipo de EAEC y EPEC. Este gen es necesario para la formación de la fimbria tipo IV que está compuesta de homopolímeros de proteínas estructurales de bajo peso molecular llamadas pilinas. Se dividen en dos grupos, las tipo A y las tipo B. Las fimbrias tipo IVB (Pil) que se codifican en el plásmido conjugativo R64 (pR64) que a su vez pertenece al grupo de plásmidos y acarreadores de genes Inc11, codifican la síntesis de dos fimbrias, una gruesa y una delgada. La fimbria delgada contiene la fimbria Pil y asiste en la conjugación en medios líquidos. El locus de la fimbria delgada está

organizado en un operón de 14 genes (*pilI* a *pilV*), de los cuales *pilS* codifica para los pre-pili que formarán un polímero de subunidades de pilina. Además, la fimbria Pil también se ha descrito que participa en el fenotipo de adherencia agregativa (AA) en las *E. coli* enteroagregativas EAEC (García *et al.*, 2019).

1.3.12 Gen *aatA*

El gen *aatA* está asociado al patotipo de EAEC y está localizado en el plásmido (55 989 pb) de adherencia agregativa (pAA). Este gen codifica una proteína de membrana que es parte del sistema de transporte dependiente de ATP (transportadores ABC). El gen *aatA* está dentro de un locus de cinco genes (*aat*-PABCE) que es necesario para la translocación de proteínas patogénicas como la proteína de antiagregación que es codificada por el gen *aap*, que media la dispersión de *E. coli* enteroagregativa a través de la mucosa intestinal (Nazemi *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2006).

1.3.13 Gen *aafC*

El gen *aafC* es relativo al patotipo de EAEC. Este gen está implicado en la biogénesis de la fimbria de adherencia agregativa II (AAF/II) (Elias *et al.*, 1999).

1.3.14 Gen *agg3C*

El gen *agg3C* (subunidad ujier AAF/III) está asociado al patotipo de EAEC. La región que contiene a *agg-3* se conforma de 3 partes: el operón que codifica para la proteína de adhesión, seguido del gen de la toxina y, por último, el gen regulador. Este sistema genético codifica para AAF/III y para una adhesina fimbrial involucrada en la agregación de la bacteria y en su adhesión a las células. Agg-3 es un plásmido naciente y está genéticamente vinculado al gen *astA*, que codifica para la toxina EAST1. La identificación de este gen (*agg3C*) funciona para identificar cepas portadoras de operones que codifican para fimbrias de adherencia agregativa (AAF) (Bernier, Gounon & Le Bouguéneq, 2002).

1.3.15 Gen *aap*

El gen *aap* (proteína de antiagregación), formalmente conocido como *aspU*, se asocia al patotipo de *E. coli* enteroagregativa (EAEC) y se localiza en el plásmido AA (Cerna, Nataro & Estrada-Garcia, 2003). Este gen codifica para una proteína de antiagregación de 10 kDa denominada dispersina. Esta proteína se secreta al medio extracelular donde permanece unida de forma no covalente a los lipopolisacáridos (LPS) formando una cápsula que neutraliza la carga negativa de la superficie bacteriana. La cápsula contrarresta la agregación mediada por las fimbrias de adherencia agregativa (AAF), por lo que previene la acumulación bacteriana y promueve su dispersión a lo largo de la mucosa intestinal (Dudley *et al.*, 2006; Gomes *et al.*, 2016; Nazemi *et al.*, 2011; Sheikh *et al.*, 2002).

1.3.16 Gen *toxB*

El gen *toxB* está asociado al patotipo de EHEC. La proteína ToxB es esencial para la adherencia de las EHEC (Badea *et al.*, 2003). Tatsuno *et al.*, (2000) demostraron que el producto del gen *toxB* contribuye a la adherencia de EHEC O157 a las células Caco-2 a través de la producción y/o secreción de proteínas secretadas de tipo III. Además, la proteína ToxB comparte una homología considerable (28% de aminoácidos idénticos y 47% de aminoácidos similares) con el producto de *efa-1/lifA*, otro gen de virulencia que se encuentra frecuentemente en los aislados de EAEC (Morabito *et al.*, 2003)

1.4 Infecciones del tracto urinario por *E. coli* uropatógena (UPEC)

Las infecciones bacterianas del tracto urinario (IsTU) se encuentran entre las afecciones más comunes en el ser humano, tienen un índice de morbilidad significativo en niños, adultos mayores y mujeres de todas las edades, éstas infecciones a menudo pueden resultar en recurrencias o infecciones crónicas que requieren tratamientos frecuentes o uso a largo plazo de antimicrobianos (Flores-Mireles, 2015; Kostakioti *et al.*, 2012). Las IsTU se dividen en complicadas y no complicadas. Las complicadas están asociadas con factores que comprometen el tracto urinario o las defensas inmunológicas del hospedero, como la obstrucción urinaria, la retención urinaria causada por una enfermedad neurológica, inmunosupresión, falla renal, trasplante renal, embarazo, cálculos renales, o el uso de dispositivos médicos de drenaje. Las no complicadas afectan a personas que no presentan anomalías estructurales o neurológicas (Flores-Mireles *et al.*, 2015). Se ha descrito que la familia Enterobacteriaceae es la principal causa de las IsTU, una de las infecciones

nosocomiales más comunes, y *E. coli* es el principal agente causal (Foxman 2010; Nazemi, Mirinargasi, Merikhi, & Sharifi, 2011; Salvador *et al.*, 2012). Es probable que las IsTU comiencen con la colonización del intestino con una cepa uropatógena además de la microbiota comensal. Así, esta cepa es capaz de infectar a una persona inmunocomprometida, ya que coloniza la zona periuretral y asciende por la uretra hasta la vejiga causando infecciones bajas (cistitis; Figura 2). Se ha descrito que el tiempo en el que la bacteria expresa en su superficie la fimbria tipo I durante la infección de la vejiga es de 4-24 horas (Gunther *et al.*, 2001). Durante el proceso de la adhesión, la fimbria de tipo 1 de *E. coli* se une a los restos de manosa de los receptores de uroplaquina que recubren las células epiteliales de transición (Mulvey *et al.*, 1998). Este proceso inicia la apoptosis y la exfoliación; de esta manera la invasión del epitelio de la vejiga se acompaña de la formación de protuberancias en forma de vaina en la superficie de la vejiga que contienen bacterias encerradas en una matriz rica en polisacáridos rodeada por una capa de uroplaquina. Se ha descrito que las células epiteliales invadidas que contienen una “biopelícula” bacteriana compacta podrían actuar como un reservorio para la infección recurrente (Mulvey *et al.*, 1998; Anderson *et al.*, 2003). La adquisición de hierro y la capacidad de crecer en la orina también son cruciales para la supervivencia. En las cepas que causan cistitis, las fimbrias tipo 1 se expresan continuamente y la infección se limita a la vejiga (Connell *et al.*, 1996). En las cepas causantes de pielonefritis, el elemento invertible que controla la expresión de las fimbrias tipo 1 cambia a la posición de "apagado" y las fimbrias tipo 1 se expresan menos (Gunther *et al.*, 2001). Probablemente esto desune a la cepa de *E. coli* de los receptores de las células epiteliales de la vejiga y permite que la bacteria ascienda a través de los uréteres hasta los riñones, causando infecciones altas (pielonefritis), donde la bacteria puede unirse mediante fimbrias P a los receptores de digalactósidos que se expresan en el epitelio renal (Edén &

Hansson, 1978). En esta etapa, la hemolisina junto con otros productos bacterianos, incluido el LPS y una respuesta inflamatoria aguda ocasionada por los leucocitos polimorfonucleares (PMN) pueden dañar el epitelio renal (Trifillis *et al.*, 1994). También se ha demostrado que la hemolisina induce oscilaciones de Ca^{2+} en las células epiteliales renales, lo que da como resultado una mayor producción de IL-6 e IL-8 (Uhlén *et al.*, 2000). Otro ejemplo de productos bacterianos es Sat (toxina autotransportadora secretada), una citotoxina vacuolizante que daña los glomérulos y es citopática para el epitelio circundante (Guyer *et al.*, 2000).

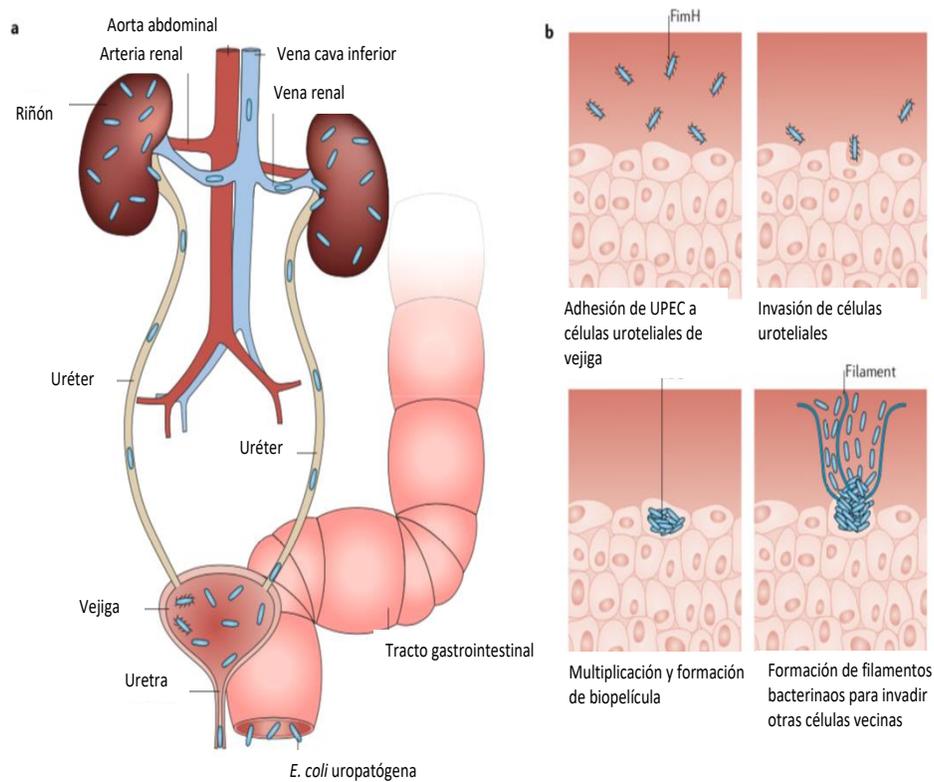


Figura 2. **a)** UPEC coloniza el tracto gastrointestinal, el perineo o la vagina, infecta la uretra y asciende a la vejiga. Las bacterias también pueden ascender por lo uréteres hasta los riñones. **b)** En la vejiga, las bacterias se adhieren mediante FimH e invaden las células uroteliales. Forman comunidades bacterianas intracelulares (IBC) similares a biopelículas, luego, las bacterias forman filamentos que salen de las células (Tomada de Klein & Hultgren, 2020).

1.4.1 Factores de virulencia de *E. coli* uropatógena (UPEC)

a) Adhesinas

La patogenicidad de UPEC, se debe a los numerosos factores de virulencia, tales como: adhesinas, toxinas, sistemas de adquisición de hierro y sistemas de evasión inmune (protectinas) (Momtaz *et al.*, 2013). Los genes que codifican para estos factores de virulencia

ubicados generalmente en islas de patogenicidad (PAI, por sus siglas en ingles), les permiten invadir, evadir las defensas y colonizar sitios específicos del hospedero (Gal-Mor & Finlay, 2006; Russo & Johnson, 2000).

En la membrana externa de las bacterias Gram-negativas se localizan los apéndices extracelulares proteicos llamados pili de la vía CUP (por sus siglas en inglés; chaperone-usher pathway pili). El pangenoma de *E. coli* codifica para 38 pili CUP distintos, y los genomas individuales de *E. coli* codifican un promedio de 12 operones CUP, cada uno de los cuales, probablemente media la unión a un receptor molecular específico en superficies bióticas o abióticas (Wurpel *et al.*, 2013). Cada tipo de pilus le confiere a la bacteria una adhesina de dos dominios ubicada en su punta distal, la cual, comprende cientos de subunidades estructurales proteicas (Figura 3). Entre los tipos de pili CUP se encuentra el pilus P, codificado por el operón *pap* (pili asociado a pielonefritis) y el pilus tipo 1 codificado por el operón *fim*. Estos dos pili tienen funciones bien establecidas en la patogénesis de las ITUs. La adhesina PapG localizada en la punta del pilus P, se une a un núcleo Gal α 1–4Gal en glicolípidos globosidos en el riñón y contribuye a la pielonefritis; mientras, que la adhesina FimH en la punta del pilus tipo 1, se une a glicoproteínas manosiladas en células epiteliales superficiales con especificidad estereoquímica (Figura 3) (Mulvey *et al.*, 1998; Dodson *et al.*, 2001; Hung *et al.*, 2002). Esta adhesión mediada por el pilus tipo 1 interviene en la colonización y la invasión del epitelio de la vejiga y facilita la formación de comunidades bacterianas intracelulares (IBC) similares a biopelículas (discutido anteriormente). También se ha demostrado que la expresión de la proteína FmIH del pilus similar a Fim (Fml), reconoce los receptores que contienen N-acetilgalactosamina (GalNAc) expresados en el tejido inflamado de la vejiga (Conover *et al.*, 2016), mientras que la adhesina similar a F17

UclD se une a los O-glicanos en las células epiteliales en las criptas inferiores del colon (Spaulding *et al.*, 2017).

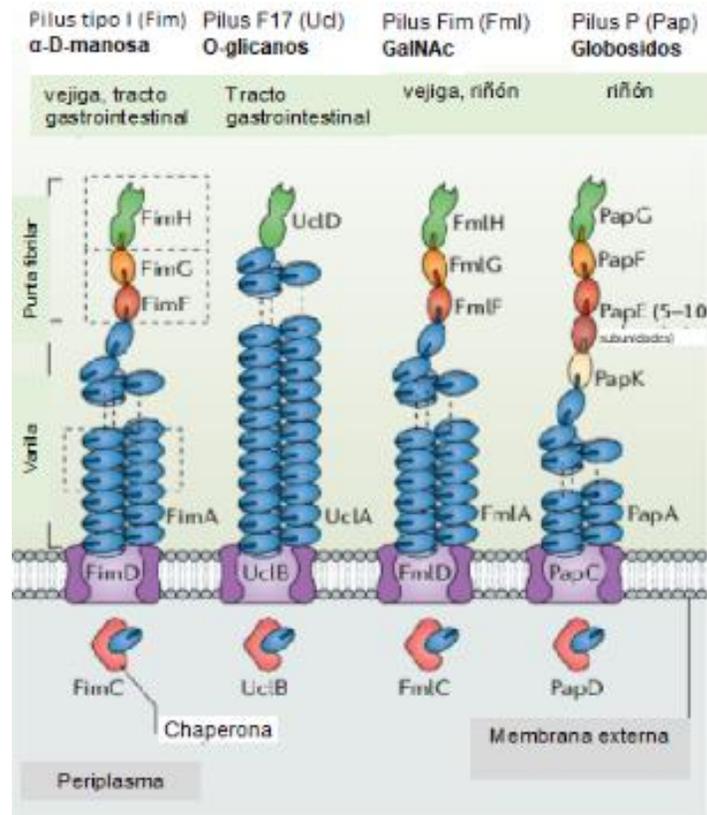


Figura 3. Diferentes tipos de pili (chaperone-usher pathway pili) en *E. coli* uropatógena (Tomada y modificada de Klein & Hultgren, 2020).

Otra familia de adhesinas es la familia Afa/Dr, que consta de adhesinas que incluyen a la adhesina fimbrial asociada a uropatógenos Dr, junto con otras adhesinas no fimbriales, incluidas Afa-1, Afa-2, Afa-3, Afa 4, NFu1 y Dr. -11. Estas adhesinas tienen una estructura diferente de otras adhesinas fimbriales de *E. coli*, en donde se observan como una malla fina, una estructura similar a una espiral o como una cápsula filamentosa que recubre la superficie celular (Stapleton *et al.*, 1998; Hung *et al.*, 2002; Bäckhed *et al.*, 2002). Los estudios epidemiológicos muestran que las cepas de *E. coli* que expresan adhesinas de la familia

Afa/Dr, están implicadas en el 25-50% de los casos de cistitis en niños y en el 30% de los casos de pielonefritis en mujeres embarazadas (Luterbach *et al.*, 2018).

Toxinas

Las toxinas producidas por UPEC no solo causan daño tisular, sino que también están involucradas en la interacción hospedador-patógeno. Se ha descrito que UPEC, es capaz de producir el factor necrosante citotóxico-1 (CNF-1, por sus siglas en ingles), la α -hemolisina, la toxina autotransportadora secretada (Sat, por sus siglas en ingles) y la proteasa involucrada en la colonización (Pic) (Davis *et al.*, 2005; Nagy *et al.*, 2006; Guyer *et al.*, 2002; Heimer *et al.*, 2004). CNF-1, es producida por algunas UPEC y desamida pequeñas Rho guanosa trifosfatasa (GTPasas), incluidas RhoA y Rac1, lo que resulta en la activación constitutiva de estas proteínas. Las Rho GTPasas son fundamentales para varios procesos celulares, incluida la fagocitosis y el estallido oxidativo en los neutrófilos (Davis *et al.*, 2005). Se ha demostrado que una cepa mutante que carece de factor necrosante citotóxico 1 (CNF-1), induce una inflamación menos grave durante una infección en un modelo murino, en comparación con una cepa silvestre (Rosen *et al.*, 2007). La hemolisina A (HlyA), es una de las toxinas formadoras de poros mejor caracterizadas y es el miembro fundador de la familia de toxinas con repetidos en la toxina (RTX). HlyA (hemolisina A), contiene las repeticiones de nonapéptido ricas en glicina características en el dominio C-terminal. El operón hlyCABD, codifica las proteínas involucradas en la producción, activación y exportación de HlyA. Los genes *hlyA* y *hlyC*, codifican para la proteína estructural y para una acil transferasa necesaria para la activación de la toxina, respectivamente. La hemolisina A (HlyA), se secreta a través del sistema de secreción de tipo 1. HlyB y HlyD, actúan en concierto con TolC, una

proteína de la membrana externa, para la secreción dependiente de energía de HlyA. HlyA no es solo una hemolisina, sino que también presenta toxicidad para otros tipos de células, incluidos los leucocitos. Se ha demostrado que *hlyA* se encuentra entre los genes altamente expresados durante el crecimiento de UPEC dentro de las células de la vejiga (Reigstad *et al.*, 2007).

Por otro lado, las toxinas como Pic, Sat, y la hemaglutinina sensible a la temperatura (Tsh, por sus siglas en inglés), son miembros de la familia de proteínas SPATE, son elaboradas por UPEC y EAEC. Las proteínas SPATE pueden clasificarse en dos clases: citotóxica (clase 1) y no citotóxica (clase 2). Sat induce la vacuolización en las células del túbulo renal proximal e induce efectos citopáticos (Guyer *et al.*, 2002; Maroncle *et al.*, 2006). Pic, pertenece a la clase no citotóxica de las proteínas SPATEs, puede tener diversos efectos en la respuesta inmune a través de la ecisión y sustitución de las glicoproteínas de membrana de casi todos los linajes de células hematopoyéticas por carbohidratos estructuralmente similares, algunos de los efectos son el tráfico y apoptosis de leucocitos, migración, inflamación y señalización (Ruiz-Perez *et al.*, 2011; Navarro *et al.* 2010; Heimer *et al.*, 2004).

c) Sistemas de adquisición de hierro

El hierro es un elemento necesario para las bacterias y de él depende llevar a cabo diferentes actividades metabólicas, como el transporte y almacenamiento de oxígeno, la síntesis de ADN, el transporte de electrones y el metabolismo de los peróxidos (Andrews *et al.*, 2003; Bagg & Neilands 1987). Las bacterias, incluida UPEC compiten con el hospedero por el hierro disponible, por lo que han codificado formas de acceder al hierro mediante la producción de sistemas de transporte de hierro mediados por sideróforos. UPEC posee múltiples mecanismos para extraer hierro del hospedero, principalmente sistemas de receptores de sideróforo-hierro. El grupo hemo, es la mayor fuente de hierro en mamíferos y su biosíntesis es crucial para el crecimiento intracelular de bacterias patógenas (Russo *et al.*, 2001; García *et al.*, 2011). Los sideróforos, son agentes quelantes de bajo peso molecular secretados, tienen una gran afinidad por el hierro férrico (Fe^{3+}), que tiene baja solubilidad a pH fisiológico por lo que requiere de mecanismos especializados para obtener suficientes cantidades de hierro para cumplir con las necesidades de las bacterias (Reigstad *et al.*, 2007). El hierro unido a los sideróforos es utilizado por UPEC mediante receptores que facilitan el transporte de los complejos de sideróforo-hierro a través de la membrana bacteriana hacia el citosol en donde es concentrado. Si bien todas las cepas de *E. coli* pueden producir el sideróforo enterobactina, se ha demostrado que la producción de sideróforos alternativos aumenta la virulencia de las cepas que causan bacteremia (Zhang & Foxman 2003).

Varias enterobacterias contienen secuencias de DNA llamadas islas de alta patogenicidad (HPI, por sus siglas en inglés), que se transfieren horizontalmente y codifican proteínas para la biosíntesis del sideróforo yersiniabactina y su sistema de absorción (Schubert *et al.*, 2004;

Hancock *et al.*, 2008). HPI, se encuentra ampliamente distribuida entre los miembros de la familia Enterobacteriaceae y es esencial para la virulencia en *Yersinia sp.* y ciertos patotipos de *E. coli* (Schubert *et al.*, 2004). Entre los genes importantes que residen en la HPI se encuentra *fyuA* (captación de sideróforo férrico) que codifica la proteína de membrana externa FyuA de 71 kDa, que actúa como un receptor para la captación de Fe-yersiniabactina. UPEC requiere el receptor férrico de yersiniabactina (FyuA) para la formación eficiente de biopelículas (Hancock & Klemm 2007).

En las bacterias, la aerobactina es otro importante sideróforo de hidroxamato sintetizado a partir de la condensación de dos moléculas de lisina y una de citrato. En UPEC, el sistema de aerobactina está codificado por un operón de cinco genes, cuatro genes codifican las enzimas necesarias para la síntesis de aerobactina y el quinto que codifica la proteína receptora de la membrana externa (Carbonetti *et al.*, 1986; Crosa 1989). Los genes de síntesis se denominan *iuc*, se utilizan para la captación y quelación del hierro, mientras, el gen del receptor es *iut*, se utiliza para la captación y transporte del hierro (de Lorenzo *et al.*, 1986).

d) Protectinas

UPEC posee la capacidad de expresar diferentes proteínas de membrana externa, incluidas traT (proteína de membrana externa especificada por el plásmido R) e Iss (increase serum survival; por sus siglas en inglés), que favorece la resistencia al suero al evitar la destrucción de las bacterias por el sistema del complemento (Johnson, 1991). Entre los componentes que incrementan la resistencia de *E. coli* al suero se encuentra el polisacárido capsular, las cadenas laterales del O-polisacárido y las proteínas de superficie (Montenegro *et al.*, 1985).

También se han descrito otras proteínas protectoras en *E. coli*, como la proteína T de membrana externa (OmpT), que es una serina proteasa de membrana externa y es el miembro prototípico de la familia ompTina de bacterias Gram-negativas (Mangel *et al.*, 1994). OmpT promueve la persistencia de *E. coli* en el tracto urinario al interferir con la actividad antimicrobiana de los péptidos catiónicos urinarios (Hui *et al.*, 2010). OmpT es una enzima que cataliza la activación del plasminógeno a plasmina (Leytus *et al.*, 1981), una función que es fisiológicamente relevante para la virulencia de *Yersinia pestis* y para cepas clínicas de *E. coli* (Lundrigan & Webb, 1992). OmpT participa en la escisión de protamina y otros péptidos catiónicos con actividad antibiótica (Guina *et al.*, 2000).

La proteína específica uropatógena (Usp, por sus siglas en inglés) de *E. coli* codificada por *usp* es más prevalente entre las cepas uropatógenas que las cepas fecales de *E. coli* de individuos sanos. Existe una fuerte asociación entre Usp y la bacteremia de origen urinario, sugiriendo que Usp es importante en la migración de UPEC desde el tracto urogenital al torrente sanguíneo (Rijavec *et al.*, 2008). Otros estudios han mostrado la prevalencia de Usp en cepas de cistitis, pielonefritis y prostatitis (Kanamaru *et al.*, 2006).

La mayoría de las cepas de *E. coli* patógenas extraintestinales, incluida la UPEC, producen cápsulas del tipo del grupo II (*kps* MT) (Lundrigan *et al.*, 1992). Las cápsulas se asemejan a varios glicoconjugados que se encuentran en vertebrados; este mimetismo molecular es parte de la estrategia de evasión inmune de la bacteria. Los tipos capsulares K1 y K4, imitan el ácido polisialílico y el esqueleto de condroitina sustituida, respectivamente. Los genes del tipo del grupo II (*kps*MT) clase I, II y III están implicados en la biosíntesis, la especificidad del serotipo y la exportación de las cápsulas de UPEC. La participación de la cápsula K2 en la

patogenia de la ITU (McCarter *et al.*, 2004), incrementa la protección contra la destrucción mediada por el complemento (Guina *et al.*, 2000). La cápsula K5, perteneciente a la familia del grupo II, previene o protege de la asociación de neutrófilos (Stumpe *et al.*, 1998).

Además de estos factores de virulencia, UPEC puede compartir genes de virulencia característicos de los patotipos de DEC (Abe *et al.*, 2008; Tabla 1); sin embargo, no queda claro si estos incrementan su patogenicidad durante las infecciones del tracto urinario.

Tabla 1. Genes de los patotipos DEC presentes en UPEC.

Gen	Patotipo	Función
<i>stbA</i> (estable A)	Enteroagregativa	Adhesión/Herencia del plásmido pAA
<i>pet</i> (plásmido que codifica para toxina)		Toxina codificada por el plásmido (Pet)
<i>aggA</i> (agregación A)		Adhesión/Subunidad fimbrial de AAF-I
<i>aggC</i> (agregación C)		Adhesión/Ujier AAF-I
<i>shf</i> (proteína críptica)		Miseláneo/Adhesión
<i>aggR</i> (regulador maestro de agregación)		Adhesión/Activador transcripcional de AAF-I y AAF-II
<i>pilS</i> (subunidad mayor de pilus)		Adhesión/EAEC subunidad mayor de pilus tupo IV
<i>aatA</i> (transportador de adherencia agregativa)		Adhesión
<i>aafC</i> (fimbria de adherencia agregativa)		Adhesión/Ujier AAF-II
<i>agg3C</i> (agregación 3C)		Adhesión/Ujier AAF-III
<i>aap</i> (proteína de secreción antiagregativa)		Colonización/Capa de proteína dispersina
<i>toxB</i> (toxina)	Enterohemorrágica	Adhesión
<i>bfpA</i> (pilus formador de haces)	Enteropatógena	Adhesión
<i>lpfA</i> (fimbria polar larga)		Adhesión/Fimbrias polares largas
<i>eaeA</i> (<i>E. coli</i> attaching and effacing)	Enteropatógena	Adhesion
<i>vt1</i> (verotoxina)	Enterohemorrágica	Toxinas

1.4 Resistencia a los antimicrobianos

En los últimos años el uso excesivo de antibióticos de amplio espectro, tales como: fluoroquinolonas, cefalosporinas y aminoglucósidos para el tratamiento de las infecciones del tracto urinario por *E. coli*, sobre todo en países en vías de desarrollo, ha ocasionado el

surgimiento de cepas multidrogo-resistentes (MDR), asociado a un incremento en las hospitalizaciones (Bartoletti *et al.*, 2016). Datos recientes han descrito que la resistencia a la cefuroxima (cefalosporina de segunda generación) en Bélgica, Alemania y España fue del 5.5%, 1.8% y 16.6%, respectivamente (Kresken *et al.*, 2016). En Inglaterra se identificaron cepas de *E. coli* en muestras de orina de pacientes hospitalizados resistentes a las cefalosporinas de tercera generación (cefotaxima/ceftazidima) (13.8–21.3%) (Abernethy *et al.*, 2017). Otros estudios mostraron, que cepas de *E. coli* aisladas del tracto urinario en el departamento de urología de Francia, fueron resistentes a la amoxicilina, a la ticarcilina y al ácido nalidíxico alcanzó del 61.4%, el 59% y el 31.9%, respectivamente (Lavigne *et al.*, 2016). En Irán, la resistencia a ampicilina, ceftazidima y ácido nalidíxico fue superior al 50%, (Dehbanipour *et al.*, 2016). La resistencia contra la gentamicina y la amikacina en cepas UPEC aisladas de pacientes ambulatorios en Pakistán fue del 29% y el 4%, respectivamente (Ali *et al.*, 2016). En México, las tasas de resistencia a los antibióticos pertenecientes a los aminoglucósidos fueron de 28.2 %, 19.1 %, 10 % y 5.5 % para gentamicina, tobramicina, amikacina y netilmicina, respectivamente (Ramírez-Castillo *et al.*, 2018). Los carbapenémicos, piperacilina-tazobactam y amikacina fueron muy efectivos (> 95 % de susceptibilidad) contra cepas de *E. coli* de infecciones urinarias recolectadas entre 2010 y 2014 en Canadá y Estados Unidos (Lob *et al.*, 2016). Los carbapenems (ertapenem, imipenem, meropenem y doripenem), se recomiendan para el tratamiento de la pielonefritis aguda no complicada, infección del tracto urinario complicada y la urosepsis (Bonkat *et al.*, 2017).

Uno de los factores más importantes que contribuyen al incremento de la multirresistencia bacteriana, es la transferencia de los genes de resistencia a los antimicrobianos por elementos

genéticos móviles, tales como plásmidos, transposones, e integrones (Hall, 1998), o las alteraciones en el locus de regulación *mar* (Alekhun, 1997).

Actualmente, se han descrito ocho mecanismos de resistencia a los antimicrobianos, algunos de ellos mediados por plásmidos móviles (Figura 4). Estos mecanismos incluyen: 1) la pérdida de porinas, que reduce el movimiento del fármaco a través de la membrana celular. 2) la presencia de β -lactamasas en el espacio periplásmico, que degrada al antibiótico β -lactámico. 3) aumento de la expresión de la bomba de eflujo transmembranal, que expulsa el fármaco de la bacteria antes de que pueda tener efecto. 4) la presencia de enzimas modificadoras de antibióticos, que hacen que el antibiótico sea incapaz de interactuar con su objetivo. 5) mutaciones en el sitio de destino, que impiden que el antibiótico se una a su sitio de acción. 6) mutaciones o modificaciones ribosómicas, que impiden que el antibiótico se una e inhiban la síntesis de proteínas. 7) mecanismos de derivación metabólica, que utilizan una enzima alternativa, resistente al efecto inhibitor del antibiótico 8) una mutación en el lipopolisacárido, que hace que los antibióticos de la clase de las polimixinas sean incapaces de unirse a este objetivo.

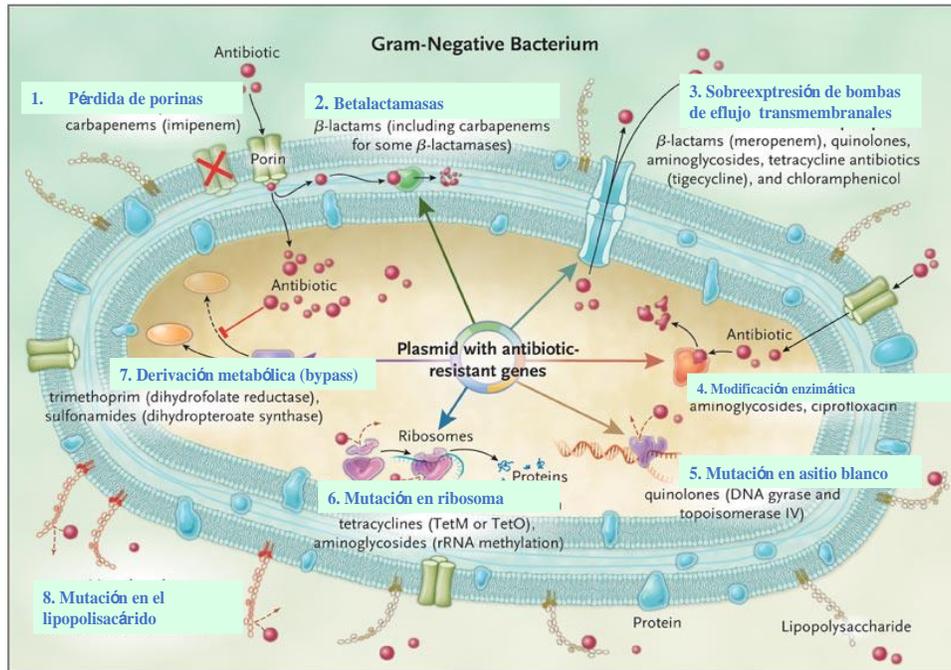


Figura 4. Diferentes mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas (Tomada de Peleg *et al.*, 2010).

La aparición de cepas UPEC resistentes a las quinolonas y las cefalosporinas de espectro a menudo se usan como terapia de primera línea y por consiguiente son un desafío considerable. Entre las betalactamasas de espectro extendido (ESBL, por sus siglas en inglés) más frecuentes producidas por *E. coli*, otras enterobacterias y *Pseudomonas aeruginosa* (Adeyankinnu *et al.*, 2014; Amirkamali *et al.*, 2017), se encuentran las proteínas TEM (temoniera), SHV (sulfhidrilo variable) y CTX-M (cefotaximasa) y en menor frecuencia OXA (oxacilinas), VEB (β -lactamasa de espectro extendido vietnamita), PER (resistencia extendida de *Pseudomonas*) y GES (β -lactamasa de espectro extendido de Guyana).

En México, la distribución de los genes de las cepas diarregénicas en UPEC ha sido poco estudiada, por lo que el presente estudio contribuirá a establecer la frecuencia de expresión

de los genes que codifican para adhesinas, toxinas y enterotoxinas, que son característicos de *E. coli* diarreogénica en un grupo de cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con ITU.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Determinar los diferentes patrones de transcripción de los genes diarreogénicos característicos de los patotipo intestinales de *E. coli* en las cepas UPEC utilizando un modelo *in vitro* de infección en cultivo de células epiteliales humanas.

2.2. Objetivos particulares

- Identificar por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) convencional la distribución de los principales genes descritos en los patotipos diarreogénicos en las cepas UPEC.
- Determinar por PCR en Tiempo real la transcripción de los principales genes de los patotipos diarreogénicos en las cepas UPEC en un modelo de infección en cultivo *in vitro* de células epiteliales humanas.
- Establecer los diferentes patrones de transcripción de los genes en los patotipos diarreogénicos relacionados con el perfil de multirresistencia a los antibióticos en las cepas UPEC.

3. ANTECEDENTES

En el 2008 Abe y cols. estudiaron en 225 cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con infecciones del tracto urinario en el Hospital Sao Paulo, Brasil, la presencia de genes de los patotipos diarreogénicos, la interacción en células HeLa y 12 serogrupos (O1, O2, O4, O6, O7, O14, O15, O18, O21, O25, O75, y O175). Los genes diarreogénicos identificados fueron: *aap*, *aatA*, *aggC*, *agg3C*, *aggR*, *astA*, *eae*, *ehly*, *iha*, *irp2*, *lpfA_{O113}*, *pet*, *pic*, *pilS*, y *shf*. Dieciséis cepas presentaron adherencia agregativa y en su genoma se identificó la secuencia *aatA*, una característica de EAEC. En conclusión, algunas cepas UPEC pueden compartir propiedades de virulencia DEC. Estos autores concluyeron que ciertas cepas UPEC pueden compartir propiedades de virulencia DEC, principalmente asociadas EAEC. Este hallazgo plantea la posibilidad de que al menos algunas cepas de EAEC fecales puedan participar como posibles uropatógenos. Alternativamente, ciertas cepas de UPEC pueden haber adquirido propiedades EAEC, convirtiéndose en una posible causa de diarrea.

En el 2011 Nazemi y cols. analizaron la distribución de genes diarreogénicos *aggR*, *aap* y *aatA* y su asociación con *stb* (un gen esencial para mantener el plásmido pAA), en 244 cepas UPEC aisladas de pacientes con infecciones urinarias de Teherán (Irán) durante 2008-2009. De 140 cepas UPEC con genes diarreogénicos, 94 (46.6%) portaron el gen *aap*, 52 (23%) el gen *aggR* y 80 (35.4%) el gen *aatA*. En un total de 18 cepas también se detectaron todos los genes diarreogénicos. Además, 44 de 144 cepas portaron el gen *stbA*. Este estudio también mostró que estos tres genes en las cepas de EAEC pueden salir del plásmido y relocalizarse en otro sitio del genoma y cambiar su nivel de asociación con el gen esencial *stbA* del

plásmido pAA. Se demostró que los genes *aggR*, *aap* y *aatA* no son específicos solo de cepas EAEC.

En el 2021 Martínez-Santos y cols. determinaron la frecuencia de los genes de virulencia de EAEC (*aap*, *aggR* y *aatA*), la resistencia a los antibióticos y la producción de biopelícula en 100 cepas UPEC aisladas de pacientes ambulatorios con infecciones urinarias no complicadas atendidos durante 2016-2017 en la Clínica ISSSTE en Chilpancingo, Guerrero, México. En este estudio, las cepas se clasificaron como UPEC/EAEC, 22%, 23% y 14% fueron portadoras de los genes *agg*, *aapA* y *aatA*, respectivamente. El grupo filogenético principal fue B2 (44.1% fueron UPEC y 77.2% UPEC/EAEC). El 77.7% de las cepas UPEC/EAEC fueron productores de ESBL y 90.9% MDR. En conclusión, las cepas UPEC/EAEC son más frecuentes en pacientes sintomáticos y los genes *aatA*, *hlyA* y *cfnI* se asociaron con procesos de pielonefritis.

En el 2017 Paniagua-Contreras y cols. estudiaron los patrones de expresión de genes de virulencia característicos de UPEC, y su relación con los genes de resistencia a los antibióticos en 194 cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con infecciones del tracto urinario adquiridas en la comunidad durante el 2013 en la Unidad Médica Familiar (UMF), número 64 (Instituto Mexicano del Seguro Social), ubicada en el Estado de México. Los genes de virulencia expresados con mayor frecuencia entre las cepas UPEC, fueron: *usp* (68%), *iha* (64,9%), *kpsMT* (61,3%), *fim* (58,2%), *irp2* (48,4), *papC* (33,5%), *set* (31,4%) y *astA* (30,9%). Mientras, los genes de resistencia a antibióticos detectados con mayor frecuencia fueron *tet (A)* (34%), *sull* (31,4%) y *TEM* (26,3%). También se encontró que el 14.4% (n=28) de

las cepas presentó el patrón de expresión de genes conformado por *irp2/fim/iha/kpsMT/usp*, el cual se asoció con ocho diferentes combinaciones de genes de resistencia a antibióticos.

4 METODOLOGÍA

4.1 Obtención y siembra de las muestras.

Se analizaron 321 muestras de orina de pacientes, sin importar edad y sexo, con infecciones del tracto urinario de dos unidades médicas del IMSS, Hospital General Regional (HGR) No. 72 “Lic. Vicente Santos Guajardo” y la Unidad de Medicina Familiar No. 64, Unidad Tequesquihuac, ubicadas en el municipio de Tlalnepantla de Baz, Estado de México. Todos los pacientes incluidos en el estudio firmaron una carta de consentimiento informado. Las infecciones bacterianas del tracto urinario fueron establecidas por los médicos de la consulta externa, de acuerdo a los síntomas de los pacientes, como; dolor o ardor al orinar, necesidad de orinar con frecuencia, orina lechosa o turbia, oscura sanguinolenta o con mal olor, y dolor en la parte baja del abdomen o la espalda. Las muestras de orina se recolectaron en frascos estériles etiquetados con los datos de los pacientes. Las cepas fueron caracterizadas previamente como UPEC por Paniagua-Contreras y cols. (2017). Las muestras se sembraron por el método de estría cruzada en los medios de cultivo Agar Sangre (DIBICO, México), Agar Sabouraud (DIBICO, México), Agar Eosina Azul de Metileno (EMB; MCD LAB, México) y Agar S110 (MCD LAB, México). Los medios de cultivo fueron incubados a 37 °C durante 24 h (Anexo: Estrategia Metodológica).

4.2 Identificación bioquímica de *E. coli*

A partir del crecimiento bacteriano en agar EMB (EMB; MCD LAB, México), una colonia con morfología típica de *E. coli* se seleccionó para su identificación por las pruebas bacteriológicas estándares de Kligler (glucosa y lactosa), sacarosa, citrato, urea, manitol, e

Indol. El almacenamiento y mantenimiento de las cepas de *E. coli* se realizó en refrigeración (8 °C) en caldo Luria-Bertani/glicerol.

4.3 Extracción de DNA bacteriano

Las cepas de *E. coli* fueron sembradas por el método de estría cruzada en agar Mueller Hinton (MH; Bioxon, México) e incubadas a 37 °C durante 24 h. Después del crecimiento bacteriano, se realizó la extracción de DNA por el método de ebullición (Ooka *et al.*, 2009), tomando varias colonias del crecimiento bacteriano con un asa estéril. El inóculo se depositó en un tubo estéril de rosca de 16x150 mm que contenía 2 mL de agua desionizada estéril. Las muestras fueron agitadas en un vórtex durante 20 segundos y se llevaron a ebullición durante 20 minutos. Las muestras fueron depositadas en hielo por 10 minutos y 1 mL de cada muestra se depositó en un tubo eppendorf estéril. La muestra se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 minutos. Finalmente se separó con una micropipeta el sobrenadante que contiene el ADN bacteriano y se depositó en otro tubo eppendorf estéril, el cual se etiquetó y almacenó a -20 °C hasta su utilización para la reacción de PCR.

4.4 Identificación molecular por PCR

La identificación de la especie *E. coli* se realizó por PCR mediante la amplificación del marcador cromosómico 16S rRNA (Lane *et al.*, 1985). Para la reacción de PCR se utilizaron los oligonucleótidos 5' AGAGTTTGATCG TGGCTACG y 5' CCGTCAATTCATTTGAGTTT a la concentración de 10 pmoles/μL. Para un volumen final de 20 μL por mezcla de reacción, se agregaron en un tubo eppendorf (de 1.7 mL) 12.5 μL de la Taq DNA Polymerase Master Mix RED (Ampliqon), 1 μL de cada oligonucleótido

(Forward/Reverse) (Integrated DNA Technologies, USA), 3 μL de DNA (200 $\text{ng}/\mu\text{L}$) molde y 2.5 μL de agua libre de nucleasas. Las condiciones de amplificación consistieron en desnaturalización inicial por 5 min a 95 °C, 30 ciclos (desnaturalización a 95 °C por 30 segundos, alineamiento a 55 °C por 1 min y extensión a 72 °C por 1 min). Finalmente, la extensión se prolongó por 5 min a 72 °C. Para cada ensayo de PCR la cepa de *E. coli* ATCC 11775 fue utilizada como control. El tamaño del amplicón fue de 919 pares de bases, ver Anexo (Figura 10).

4.5 Prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos.

A cada una de las cepas de *E. coli* se le determinó la susceptibilidad a los siguientes 12 antimicrobianos; ampicilina (10 μg), cefalotina (30 μg), carbenicilina (100 μg), pefloxacina (5 μg), ceftriaxona (30 μg), trimetoprim con sulfametoxazol (25 μg), netilmicina (30 μg), gentamicina (10 μg), cefotaxima (30 μg), cloranfenicol (30 μg) y amikacina (30 μg) por el método de difusión de disco de Kirby-Bauer (Bio-Rad, México). Brevemente, se tomaron 5 colonias de cada cepa crecida en agar EMB (Bioxon, México) y se cultivaron sobre la superficie de agar Mueller Hinton (MH; Bioxon, México). Después, con una pinza estéril se tomó un sensidisco con los 12 antimicrobianos a determinar, se colocó sobre el agar MH y se incubaron a 37 °C durante 24 horas. El antimicrobiano se difundió formando un gradiente de concentración, que inhibió o permitió su crecimiento. Dependiendo del diámetro del halo de inhibición de cada muestra (el cual se midió con un vernier) las cepas se clasificaron como susceptibles o resistentes (Tabla 2).

Antibiótico	Familia	Diámetro del halo de inhibición (mm)	
		R	S
Ampicilina (AMP)	Betalactámico	<28	>29
Cefalotina (CF)	Cefalosporina de 1ra. Gen	<14	>18
Cefotaxima (CTX)	Cefalosporina de 3ra Gen	<14	>23
Pefloxacina (PEF)	Fluoroquinolona	<15	<21
Cloranfenicol (CL)	Anfenicoles	<12	>18
Ceftriaxona (CRO)	Cefalosporina de 3ra Gen	<12	>17
Gentamicina (GEN)	Aminoglucósido	<12	>15
Amikacina (AK)		<14	>17
Carbenicilina (CB)	Betalactámicos	<18	>23
Netilmicina (NET)		<12	>15
Nitrofuratoína (NF)	Nitrofuranos	<14	>17
Trimetoprim con sulfametoxazol (SXT)	Combinación de diaminopirimidina y sulfonamida	<10	>16

Tabla 1. Criterios de medición para la clasificación de la respuesta a la sensibilidad o resistencia a los antibióticos. R: resistente; S: sensible (Wayne2013; CLSI).

4.6 Identificación de los genes diarreogénicos en las cepas uropatógenas de *Escherichia coli* (UPEC).

La identificación de los 16 genes diarreogénicos (*pet*, *aggA*, *aggC*, *shf*, *aggR*, *pilS*, *toxB*, *ipfA*, *aatA*, *stbA*, *aap*, *vt1*, *bfpA*, *eaeA*, *agg3C*, y *aafC*) en las cepas UPEC se realizó por PCR de acuerdo a lo descrito previamente (Abe *et al.*, 2008). La secuencia de los oligonucleótidos y las condiciones de PCR para cada gen se encuentran referidas en el Anexo (Tabla 5). Para un

volumen final de 20 μL por mezcla de reacción, se agregaron 12.5 μL de Taq DNA Polymerase Master Mix RED (Ampliqon), 1 μL del oligonucleótido forward (10 pmol), 1 μL del oligonucleótido reverse (10 pmol), (Integrated DNA Technologies, USA), 3 μL de DNA molde (bacteriano) y 2.5 μL de agua libre de nucleasas.

4.7 Electroforesis.

Después de la amplificación del DNA, 5 μL de cada muestra fueron sometidas en geles de agarosa y teñidos al 2% con Midori Green como fluoróforo (0.3%, Nippon). Para la conducción eléctrica, se utilizó el amortiguador TBE 1X (Tris-borato) bajo las siguientes condiciones: 120 V y 94 mA durante 120 min. El tamaño del amplicón se determinó a partir de la comparación con el marcador de peso molecular (MWM) de 100 pb. Los geles fueron fotografiados bajo luz ultravioleta con el digitalizador de imágenes Gel Logic 100 (Kodak).

4.8 Preparación e infección del cultivo de la línea celular A431 para la transcripción de los genes diarregénicos en las cepas UPEC.

La línea celular ATCC A431 fue aislada de la epidermis de una paciente de 85 años con carcinoma epidermoide; la cual, presenta una morfología epitelial y es parte de una serie de líneas celulares establecidas para tumores sólidos. La línea celular ATCC A431 fue preparada en el Laboratorio No. 13 de la Unidad de Biomedicina (UBIMED) de la FES Iztacala. En un frasco flask de 50 mL etiquetado con la línea celular (A431), se le adicionaron 5 mL del medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium). Posteriormente, 1 mL del vial con la línea celular descongelada, se adicionó a un tubo falcon con 9 mL de medio DMEM, se

homogeneizó, y el concentrado se vació al frasco flask en forma de cruz y después de incubar a 37° C durante 10 min y se observó la confluencia.

Al término, el frasco flask se dejó incubar a 37 °C durante 24 h, realizando un cambio diario del medio. Cuando se observó la confluencia total, se realizó la triptinización para separar las células del frasco flask para recolectarlas y depositarlas en los pozos de las placas. Posteriormente se tomaron 20 µL, y se cuantificó en la cámara de Neubauer un aproximado de 32500 células /mL. Finalmente se dejó incubar la placa en la estufa de CO₂ a 37° C durante aproximadamente 48 h hasta tener la confluencia necesaria (24 millones de células/mL).

Posteriormente se seleccionaron las cepas de *E. coli* (n=99) con presencia de 3 o más genes diarregénicos para determinar la transcripción de los genes utilizando un modelo *in vitro* de infección en la línea celular epitelial humana ATCC A431. El método de inoculación se realizó de acuerdo con lo descrito por Schaller *et al.*, (2003).

Las cepas de *E. coli* fueron sembradas en el medio de cultivo EMB (DIBICO, México) a 37 °C durante 24 h. Se tomó una colonia de cada cepa y se sembraron en tubos de ensayo de 16 x150 mm con tapón de rosca que contenían 2 mL de caldo BHI (Infusión Cerebro Corazón, por sus siglas en inglés) (Bioxon[®], México) estéril y se incubaron durante 24 h a 37 °C en agitación constante. Posteriormente se realizó una dilución 1:6 (250 µL del cultivo en 1750 µL de caldo BHI) del cultivo bacteriano, el cual se ajustó en un espectofotómetro 2100 (UNICO) a una densidad óptica (600nm) de 0.4, que correspondió a una concentración aproximada de 1×10^9 células/mL (QIAGEN; RNA protect Bacteria Reagen Handbook, 2020).

Las bacterias se colectaron por centrifugación (2000 rpm por 5 min) y se resuspendieron en 500 µL de PBS (Phosphate Buffered Saline, por sus siglas en ingles).

Un inóculo de 50 µL de la suspensión de *E. coli*/PBS (equivalente a 50 millones de células bacterianas) se depositó sobre la superficie del cultivo de la línea celular A431 derivada de carcinoma epidermoide vaginal (ATCC® CRL-1555™) en medio DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium, por sus siglas en ingles) y se incubaron a 37 °C durante 48 horas con 5% de concentración de CO₂ y saturación de humedad. La monocapa del cultivo de la línea celular se desprendió después de este periodo de tiempo. Como controles positivos de la infección de la línea celular A431 se utilizaron cepas UPEC (U155, U169, U171, U207, U245, U249, y U260) provenientes de aislamientos clínicos que son portadoras de los genes diarreogénicos, y que pertenecen al cepario del Laboratorio de Análisis Clínicos, FES Iztacala, UNAM. Como control negativo se utilizó medio DMEM sin línea celular A431 y sin bacterias.

4.9 Cosecha de *E. coli* del cultivo celular.

Las bacterias que no invadieron a las células fueron recolectadas de la superficie del cultivo celular de la línea A431. Se tomaron 300 µL de cada pozo y se depositaron en tubos eppendorf con 500 µL de PBS. Posteriormente, se centrifugaron a 8,000 rpm durante 5 min. El sobrenadante se decantó conservando la pastilla para la extracción del RNA (QIAGEN; RNA protect Bacteria Reagen Handbook, 2020). El experimento de la la infección bacteriana de la línea celular solo se realizó una vez por cada cepa bacteriana.

4.10 Extracción y purificación de RNA.

La extracción del RNA total se realizó con el kit comercial MiniKit RNeasy (Qiagen, Hilden, Germany) con ayuda del equipo robotizado QIAcube (Figura 3). Las pastillas obtenidas en el paso anterior se colocan en la placa de agitación del equipo y el tubo eppendorf con 2 mL de buffer TE (10mM Tris-HCL, 1mM EDTA, pH 8) y 1 μ l/mL de lisozima fue colocado en la posición “A” de la región correspondiente al buffer de lisis. En el compartimento de reactivos se colocaron frascos con 25 mL de amortiguador de pH de lisis RLT que contenía tiocianato de guanidina (se le agregó un volumen de 10 μ l de β -mercaptoetanol por mL de buffer), buffer de lavado RW1 (cloruro de guanidina y etanol), buffer RPE (buffer con 4 volúmenes de etanol), etanol (96-100%) y agua libre de RNAsas. Al término se llenaron los contenedores con puntas de 1 mL. Por último, se colocaron los tubos de columna y elución en la centrifuga del equipo. El equipo se programó para la extracción de RNA con lisis celular siguiendo el protocolo del fabricante y se inició la corrida.

El primer paso que realizó el QIAcube fue la lisis enzimática, para lo cual el equipo adicionó 100 μ L de buffer TE a cada tubo con la pastilla celular bacteriana, los tubos se agitaron durante 5 min y a una temperatura de 25 °C. Después el robot QIAcube adicionó 350 μ L de buffer RLT (amortiguador de pH de lisis con Isotiocianato de guanidina con 100 μ L/mL de β -mercaptoetanol) para inactivar las RNAsas. El equipo adicionó 350 μ L de etanol al 95% para homogeneizar el lisado, agitó los tubos y transfirió 700 μ L de la mezcla a la columna contenida en los tubos de 2 mL, los tubos fueron centrifugados a 10, 000 rpm durante 15 segundos y el líquido de flujo fue desechado. Este paso permitió la unión del RNA a la membrana de sílice. Después adicionó 700 μ L de buffer de lavado RW1 a la columna para la eliminación de biomoléculas que no son afines a la membrana de sílice como proteínas,

lípidos y carbohidratos y centrifugó a 10, 000 rpm/15 s. El equipo adicionó 500 μ L de buffer RPE a la columna lo que permitió eliminar los rastros de sales de los buffers utilizados anteriormente, el equipo centrifugó a 10, 000 rpm durante 15 segundos. Posteriormente adicionó 500 μ L de buffer RPE a la columna y centrifugó a 10, 000 rpm/2 min para lavar la membrana.

Finalmente, el equipo depositó la columna en un tubo colector nuevo de 2 mL, centrifugó durante 1 min y el equipo adicionó 30 μ L de agua libre de RNAsas sobre la membrana de la columna y centrifugó a 10 000 rpm/1 min para obtener el RNA.

La concentración total y la pureza del RNA se midieron utilizando el espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). Debido a la inestabilidad del RNA, inmediatamente se realizó la reversotranscripción a DNA complementario.

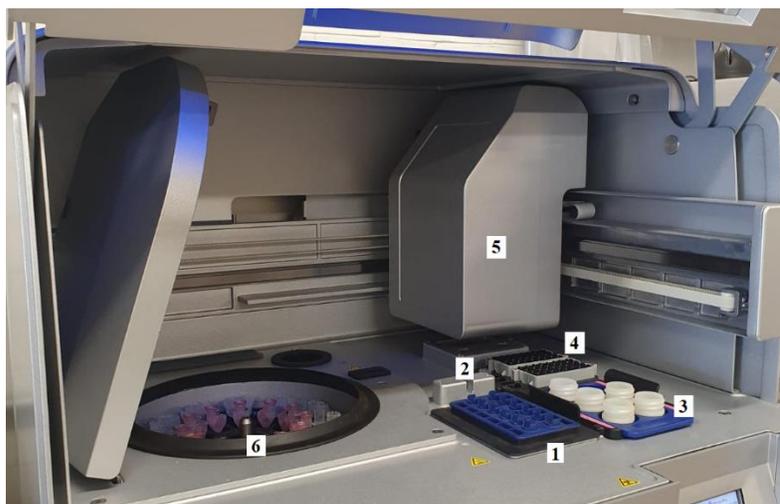


Figura 5. Interior del equipo robotizado QIAcube. 1. Placa de agitación; 2. Posición para buffer de lisis, 3. Posición para reactivos MiniKit RNeasy, 4. Puntas de 1 mL; 5. Brazo robótico; 6. Carrusel (centrifuga).

4.11 Reversotranscripción.

La reversotranscripción de RNA a DNA complementario (cDNA) se realizó utilizando el equipo comercial QuantiTec Reverse Transcription (Qiagen®). Para asegurarse que no hubiese DNA genómico, se utilizó gDNA Wipeout buffer, 7x (cuadro 1). Para una mezcla de reacción con volumen final de 14 µL, se agregaron a un tubo eppendorf de 0.2 mL los componentes descritos en el cuadro 1. Posteriormente los tubos se incubaron a 42 °C durante 2 min e inmediatamente se colocaron en hielo.

Cuadro 1. Reacción para la eliminación del DNA genómico

Componentes	Volumen
gDNA Wipeout buffer, 7x	2 µL
ARN templado	5 µL
Agua libre de RNasas	7 µL
Volumen total	14 µL

El siguiente paso fue la reversotranscripción para la síntesis de la cadena complementaria del cDNA. Para un volumen final de 20 µL se agregaron a cada tubo eppendorf de 0.2 mL los componentes descritos en el cuadro 2.

Cuadro 2. Reacción para la síntesis de la cadena de cDNA.

Componentes	Volumen
Quantiscript Reverse Transcriptasa	1 µL
Quantiscript RT buffer 5x (Mg ²⁺ y dNTPs)	4 µL
RT Primer Mix	1 µL
RNA templado (obtenido de la reacción anterior)	14 µL
Volumen total	20 µL

Después de homogeneizar los tubos se incubaron a 42 °C por 15 min. Para inactivar la transcriptasa reversa los tubos se incubaron en un termoblock a 95 °C durante 3 min. La concentración y pureza del cDNA se midieron utilizando el espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). Finalmente, el cDNA obtenido se almacenó a -20 °C hasta su utilización para PCR en tiempo real.

4.12 Transcripción de los marcadores de virulencia por PCR en tiempo real.

Los oligonucleótidos (forward y reverse) utilizados en la preparación de la mezcla de reacción de PCR en Tiempo Real para la determinación de la transcripción de los diferentes genes diarreogénicos (*pet*, *aggA*, *aggC*, *shf*, *aggR*, *pilS*, *toxB*, *ipfA*, *aatA*, *stbA*, *aap*, *vt1*, *bfpA*, *eaeA*, *agg3C*, y *aafC*) en las cepas de *E. coli* fueron los mismos que se utilizaron en la PCR convencional (Anexo: Tabla 5). Para determinar la transcripción de los genes de virulencia se utilizó el equipo de PCR en Tiempo Real Corbette® (Rotor Gene) y el kit de PCR de Master Mix SYBR Green I (dNTP, *Taq* AND polimerasa, MgCl₂ y SYBR Green I) (QIAGEN). El volumen final de la mezcla de reacción fue de 25 µL; 12.5 µL de Master Mix SYBR Green I (QIAGEN), 1 µL del oligonucleótido forward (10 pmol), 1 µL del oligonucleótido reverse (10 pmol), 1 µL de cDNA (500 ng/µL) y 9.5 µL de agua estéril libre de nucleasas. Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo de activación de la HotStart a 95 °C durante 3 min y 45 ciclos de amplificación (desnaturalización a 95 °C durante 30 seg, alineación a 57 °C durante 30 seg y extensión a 72 °C durante 20 seg). Los controles internos para cada ensayo de PCR en tiempo real fueron los genes constitutivos *arcA* (aerobic respiration control protein, por sus siglas en ingles) y *RPO* (RNA polymerase sigma, por sus siglas en ingles), los controles positivos fueron cepas de *E. coli* (U155, U169, U171, U207, U245, U249, y

U260) del cepario del laboratorio de análisis clínicos. En cada corrida de PCR en Tiempo Real se incluyó la melting point y un NTC (No Template Control, por sus siglas en inglés) (control sin plantilla).

4.13 Análisis estadístico.

La correlación entre la frecuencia de detección de los genes de virulencia diarreogénicos en las cepas UPEC con la resistencia a los antimicrobianos fue analizada con la prueba de χ^2 cuadrada con una $p < 0.05$ utilizando el software Minitab®.

5 RESULTADOS

5.1 Pacientes estudiados.

En el presente estudio se analizaron un total de 321 pacientes con infecciones del tracto urinario, donde el 62% (n= 194) de las muestras de orina fueron positivas para *E. coli* y el 38% (n= 127) negativas. El 80.9% (n=157) de los pacientes fueron mujeres (Figura 6). El 56% (n=109) de los pacientes presentó una edad de 41 a 60 años, seguido de adultos mayores de 61 a 86 años con un 26% (n=50) (Figura 7).

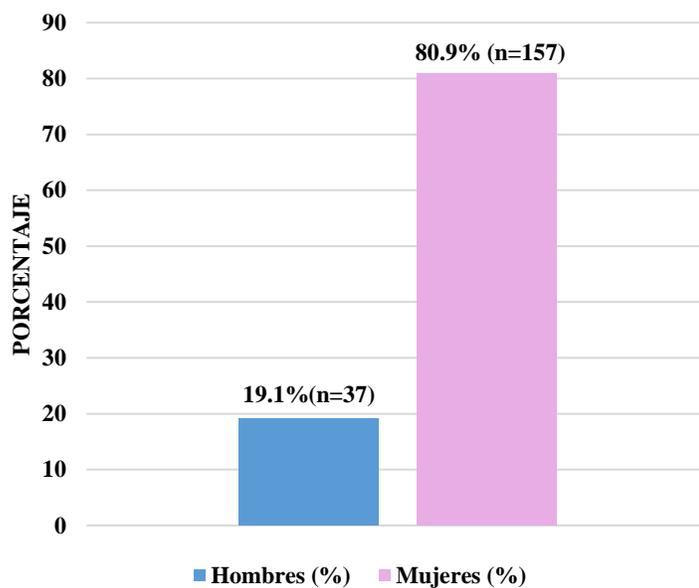


Figura 6. Distribución por sexo de los pacientes analizados.

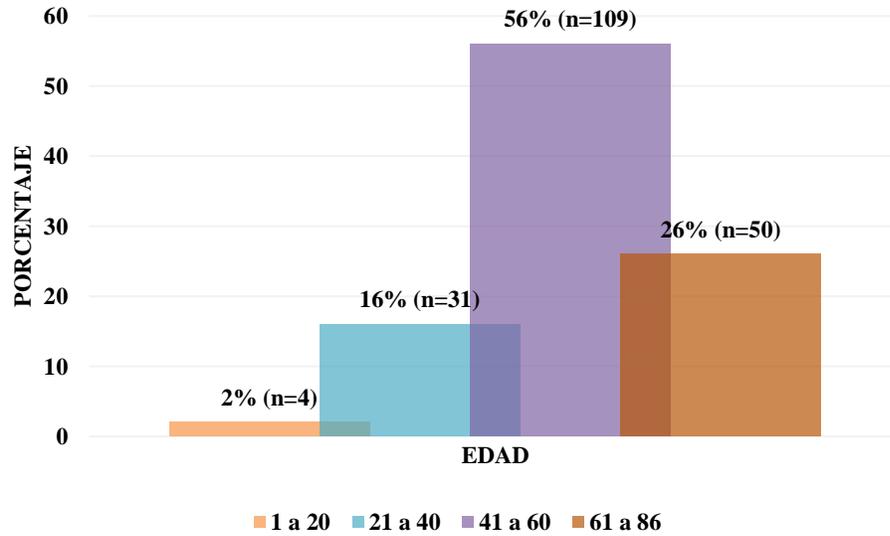


Figura 7. Rangos de edad de los pacientes analizados.

5.2 Resistencia bacteriana a los antimicrobianos.

El 98% (n=191) de las 197 cepas uropatógenas positivas, fueron resistentes a los antimicrobianos betalactámicos, a las quinolonas, al trimetoprim con sulfametoxazol y a la netilmicina (Figura 8). Los antibióticos a los que las cepas UPEC presentaron mayor porcentaje de resistencia fueron los betalactámicos; ampicilina (92%), cefalotina (92%) y carbenicilina (91%), mientras que el antibiótico con menor porcentaje de resistencia bacteriana fue la amikacina (12%).

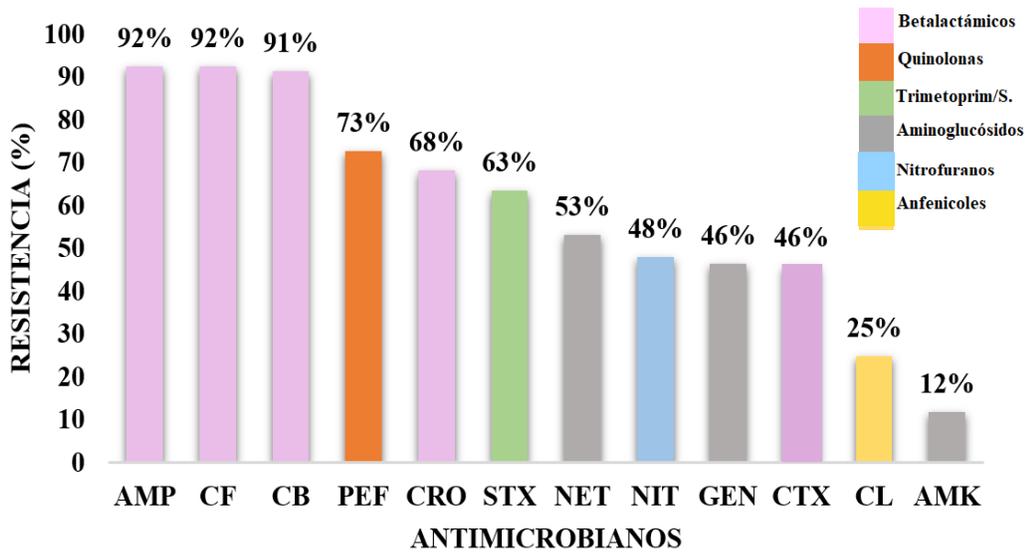


Figura 8. Resistencia de las cepas de *E. coli* a los antibióticos. AMP: ampicilina; CF: cefalotina; CB: carbenicilina; PEF: pefloxacina; CRO: ceftriaxona; STX: trimetoprim con sulfametoxazol; NET: netilmicina; NIT: nitrofuratoína; GEN: gentamicina; CTX: cefotaxima; CL: cloranfenicol; AMK: amikacina.

5.3 Detección de genes los diarreogénicos en las cepas de *E. coli* uropatógenas.

En el análisis de este estudio se detectaron 13 de los 16 genes diarreogénicos (*pet*, *aggA*, *aggC*, *shf*, *aggR*, *pilS*, *toxB*, *ipfA*, *aatA*, *stbA*, *aap*, *vt1*, *bfpA*, *eaeA*, *agg3C*, y *aafC*) en las cepas UPEC. Las frecuencias de los genes diarreogénicos se observan en la Tabla 2 y en la Figura 9. En las cepas UPEC se detectaron genes de virulencia característicos de los distintos patotipos diarreogénicos, principalmente de EAEC y EPEC. Los genes característicos de EAEC identificados con más frecuencia en las cepas uropatógenas de adhesión; *stbA* (87/194), y *shf* (69/194), de toxinas; *pet* (38/194) y de colonización; *aap* (32/194), mientras que los genes de EPEC más comunes en las cepas UPEC fueron de adhesión; *lpfA* (43/194), *eaeA* (18/194) y *bfpA* (8/194). Se identificaron en algunas cepas UPEC genes característicos

de EHEC, que incluyeron de adhesión; *eaeA* (18/194) y de toxinas; *vt1* (3/194) y *toxB* (2/194).

Tabla 2. Frecuencia de detección de los genes DEC en UPEC.

Gen	Patotipo	Función	Frecuencia de detección n=194 (%)	
<i>stbA</i>	EAEC	Adhesión/Herencia del plásmido pAA	87 (44.9)	
<i>shf</i>		Misceláneo/Adhesión	69 (35.6)	
<i>lpfA</i>	EPEC	Adhesión	43 (22.2)	
<i>pet</i>	EAEC	Toxina	38 (19.6)	
<i>aap</i>		Colonización	32 (16.5)	
<i>eaeA</i>	EPEC/EHEC	Adhesión	18 (9.3)	
<i>agg3C</i>	EAEC		11 (5.7)	
<i>aatA</i>			9 (4.6)	
<i>bfpA</i>			EPEC	8 (4.1)
<i>pilS</i>	EAEC		8 (4.1)	
<i>aggC</i>			5 (2.5)	
<i>vt1</i>	EHEC		Toxina	3 (1.6)
<i>toxB</i>				2 (1)
<i>aafC</i>	EAEC	Adhesión	0 (0)	
<i>aggA</i>	EAEC		0 (0)	
<i>aggR</i>	EAEC		0 (0)	

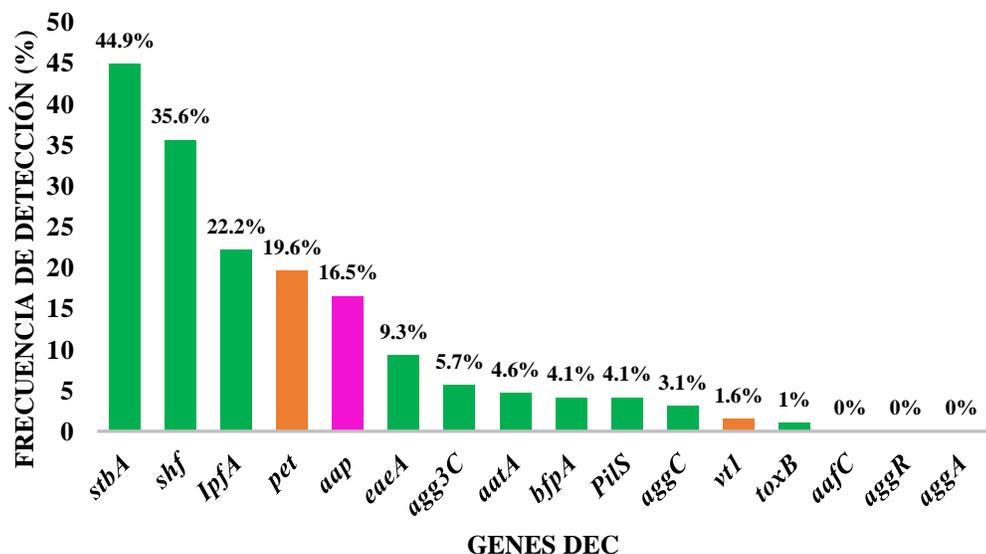


Figura 9. Frecuencia de detección (%) de los genes DEC en las cepas UPEC. Genes que codifican para proteínas relacionadas con adhesión (*stbA*, *shf*, *lpfA*, *eaeA*, *agg3C*, *bfpA*, *aggC* y *toxB*) en verde; genes que codifican para toxinas (*pet*) en anaranjado; genes que codifican para proteínas de colonización (*aap*) en rosa.

5.4 Asociación de la detección de los genes DEC con la multirresistencia a los antimicrobianos.

El 98% (n=191) de las cepas UPEC fueron clasificadas como multidrogo-resistentes (MDR) a los antibióticos (Tabla 3), con los porcentajes más altos en las cepas en las que se detectó la presencia del gen *stbA* (adhesión; EAEC) con el 42.9% (n=70), el gen *lpfA* (adhesión; EPEC) con el 22.7% (n=37) y *pet* (toxina; EAEC) con el 22.1% (n=36) en cepas multidrogo-resistentes en el rango de 3-6 familias de antimicrobianos. La prueba de la chi-cuadrado (X^2) demostró que no existe correlación entre la detección de los genes DEC la multiresistencia a antibióticos ($p < 0.05$).

Tabla 3. Frecuencia de los genes diarreogénicos relacionados a la multirresistencia a los antimicrobianos en las cepas UPEC.

Función del gen	Gen	Resistentes (≤ 2 familias)	Multidrogo-resistentes (≥ 3 familias)	Total
		0 a 2	3 a 6	
		n= 31 (%)	n= 163 (%)	
Toxinas	<i>pet</i>	2 (6.5)	36 (22.1)	38
	<i>vt1</i>	1 (3.2)	2 (1.2)	3
Colonización	<i>aap</i>	10 (32.3)	22 (13.5)	32
Adhesión	<i>stbA</i>	17 (54.8)	70 (42.9)	87
	<i>lpfA</i>	6 (19.4)	37 (22.7)	43
	<i>eaeA</i>	3 (9.7)	15 (9.2)	18
	<i>agg3C</i>	0 (0)	11(6.7)	11
	<i>aatA</i>	3 (9.7)	6 (3.7)	9
	<i>bfpA</i>	0 (0)	8 (4.9)	8
	<i>pilS</i>	1 (3.2)	7 (4.3)	8
	<i>aggC</i>	0 (0)	5 (3.1)	5
	<i>toxB</i>	0 (0)	2 (1.2)	2
	<i>aafC</i>	0 (0)	0 (0)	0
	<i>aggA</i>	0 (0)	0 (0)	0
<i>aagR</i>	0 (0)	0 (0)	0	

5.5 Transcripción de los genes DEC en las cepas uropatógenas de *E. coli*.

Con el propósito de establecer los diferentes patrones de asociación de la transcripción de los genes diarreogénicos en las cepas UPEC después de la infección *in vitro* de la línea celular A431 se seleccionaron las cepas UPEC en las que previamente se detectó la presencia de dos o más genes diarreogénicos, que fueron 99 cepas de las 194 estudiadas. Los genes diarreogénicos que se transcribieron con mayor frecuencia fueron los de adhesión; *stbA* (EAEC; 36/99), y *shf* (EAEC; 24/99), de colonización; *aap* (EAEC; 20/99) y de toxinas; *pet* (EAEC; 13/99) (Tabla 4. Anexo: Figuras 22-47). Los genes transcritos con menor frecuencia

fueron los de adhesión; *aatA* (EAEC; 3/91), *agg3C* (EAEC; 3/91), *eaeA* (EPEC/EHEC; 3/91), *bfpA* (EPEC; 2/91), y *pilS* (EAEC; 2/91).

Tabla 4. Frecuencia de transcripción de los genes DEC en cepas uropatógenas de *E. coli*.

Gen	Patotipo	Función	Frecuencia de transcripción n=99 (%)	
<i>stbA</i>	EAEC	Adhesión/Herencia del plásmido pAA	36 (36.4)	
<i>shf</i>		Misceláneo/Adhesión	24 (24.2)	
<i>aap</i>		Colonización	20 (20.2)	
<i>pet</i>		Toxinas	13 (13.1)	
<i>aatA</i>			3 (3)	
<i>eaeA</i>	EPEC/EHEC	Adhesión	3 (3)	
<i>bfpA</i>	EPEC		2 (2)	
<i>pilS</i>	EAEC		2 (2)	
<i>vt1</i>	EHEC		Toxinas	1 (1)
<i>aggC</i>	EAEC		Adhesión	0 (0)
<i>aggR</i>		0 (0)		
<i>agg3C</i>		0 (0)		
<i>lpfA</i>		EPEC		0 (0)
<i>toxB</i>		EHEC		0 (0)

5.6 Patrones de transcripción de los genes DEC asociados con la resistencia a los antibióticos en las cepas UPEC.

Se identificaron 12 distintos patrones de transcripción de los genes DEC relacionados con el fenotipo de resistencia a los antibióticos en las cepas UPEC después de la infección en la línea celular A431. Los patrones de transcripción más abundantes fueron el no. 1 conformado por los genes *pet/shf* y el no. 2 integrado por *aap/shf* con el 5% (n=5), en cada caso (Tabla 5). Las cepas UPEC distribuidas entre los distintos patrones de transcripción de los genes (n=12) se correlacionaron con la resistencia a los antibióticos en el intervalo de 2 hasta 12 de

estos agentes. También se detectaron 71 (71.7%) cepas UPEC que solo transcribieron un gen de virulencia (no. de patrón 13-83), y cada una de estas cepas presentó un perfil individualizado de resistencia antimicrobiana.

Tabla 5. Patrones de transcripción de los genes DEC relacionados con la multidrogo-resistencia en las cepas UPEC.

No. de patrón	Patrón de transcripción de genes	No. (n=99)	%	Perfil de resistencia a los antibióticos	No. de antibióticos
1	<i>pet/shf</i>	5	5.0	CF/AMP/NIT/CB CF/CRO/AMP/SXT/CTX/NET/PEF/NIT/GEN/CB CF/CRO/AMP/SXT/CTX/NET/PEF/NIT/CL/GEN/CB CF/CRO/AMP/CTX/NET/PEF/NIT/CL/GEN/CB CF/AMP/CTX/PEF/NIT/GEN/CB	4 10 11 10 7
2	<i>aap/shf</i>	5	5.0	CF/CRO/AMP/CTX/NET/PEF/GEN/CB CF/CRO/AMP/SXT/CTX/PEF/AK/GEN/CB CF/AMP CF/AMP/SXT/CTX/PEF/NIT/CB CF/CRO/AMP/SXT/CTX/NET/PEF/NIT/AK/GEN/CB	8 9 2 7 11
3	<i>stbA/shf</i>	4	4.0	CF/CRO/AMP/CTX/NET/PEF/AK/CB CF/AMP/SXT/CB CF/CRO/SXT/CTX/NET/PEF/NIT/CL CF/AMP/SXT/CTX/NET/NIT/AK/GEN/CB	8 4 8 9
4	<i>stbA/aap</i>	4	4.0	CF/AMP/PEF/CB CF/CRO/AMP/CTX/NET/PEF/CB CF/AMP/NET/PEF/CB CF/AMP/CB	4 7 5 3
5	<i>stbA/aap/shf</i>	2	2.0	CF/AM/STX/CF/NIT/CB CF/CRO/AM/STX/CTX/PEF/CB	6 7
6	<i>agg3C/stbA</i>	2	2.0	CF/CRO/AMP/SXT/CTX/PEF/GEN/CB CF/CRO/AMP/SXT/CTX/NET/PEF/AK/GEN/CB	8 10
7	<i>aap/aeA</i>	1	1.0	CF/CRO/AMP/SXT/CTX/NET/PEF/CL/AK/GEN/CB	11
8	<i>pet/aap</i>	1	1.0	CF/AMP/SXT/CTX/NIT/CL/AK/GEN/CB	9
9	<i>shf/pilS</i>	1	1.0	CF/AMP/SXT/PEF/NIT/CB	6
10	<i>aggC/stbA</i>	1	1.0	CF/CRO/AMP/SXT/CTX/PEF/NIT/GEN/CB	9
11	<i>stbA/pilS</i>	1	1.0	CF/CRO/AMP/SXT/CTX/NET/PEF/CL/CB	9
12	<i>aatA/shf</i>	1	1.0	CF/AMP/PEF/CB	4
13-83	Un solo gen	71	71.7	Diferentes perfiles	

6 DISCUSIÓN

6.1 Pacientes estudiados.

Las muestras de orina de 321 pacientes con infecciones del tracto urinario del Hospital General Regional (HGR) No. 72 y de la Unidad de medicina familiar No. 64 del IMSS, Unidad Tequesquihuac, ubicadas en el municipio de Tlalnepantla de Baz, Estado de México, se analizaron microbiológicamente. *E. coli* fue identificada por PCR (Figura 10) en el 62% (n=194) de los pacientes, siendo el género femenino el que presentó el mayor número de aislamientos (80-9%, Figura 6). UPEC se origina principalmente de la flora intestinal, el hecho de que la mayoría de los pacientes hayan sido mujeres se atribuye principalmente a su anatomía, ya que la distancia entre la abertura anal, la cavidad vaginal y la abertura de la uretra es menor en las mujeres y una vez dentro de la uretra, es más probable que la bacteria ascienda a la vejiga ya que la longitud de la uretra es más corta que la del hombre (Matsukawa *et al.*, 2019; Foxman 2014; Foxman, 2003). UPEC es considerada el principal patógeno de las vías urinarias, alcanzando porcentajes hasta del 80% (Klein & Hultgren 2020). En este estudio la mayoría de los pacientes que acudieron a la Unidad Hospitalaria 72 y a la clínica 64 para atención médica, presentaron signos y síntomas característicos de las IsTU, como; sensación de ardor al orinar, necesidad constante de orinar, orina de aspecto turbio, orina de color rojo, rosa o marrón, debido a la presencia de sangre en la orina, orina con olor fuerte y dolor pélvico. La elevada frecuencia de *E. coli* detectada en el grupo de pacientes con IsTU evidencia el riesgo de desencadenar en infecciones más agudas como la cistitis (inflamación de la vejiga urinaria) o pielonefritis, que se caracteriza por la inflamación de la pelvis renal y los riñones (Subashchandrabose & Mobley, 2015). La patogenicidad de las UPEC que

causan pielonefritis, se debe al hecho de que estas cepas pueden acceder a los capilares renales, y provocar bacteremia (presencia de bacterias en la sangre) y sepsis, siendo esta última la complicación más peligrosa y potencialmente mortal de las infecciones urinarias causadas por la UPEC (Subashchandrabose & Mobley 2015). Se ha descrito que la actividad sexual es el principal factor de riesgo en pacientes con infecciones urinarias no complicadas, dentro de los cuales casi una de cada dos mujeres adultas (40%) se verá afectada por cistitis a lo largo de su vida y existe un riesgo del 25% de desarrollar infecciones urinarias recurrentes en el próximo año (Foxman, 2010).

En Estados Unidos en el año 2000, las ISU provocaron aproximadamente 6,8 millones de visitas al médico, 1,3 millones de visitas a la sala de emergencias y 245 000 hospitalizaciones, con un costo anual estimado de \$2,4 billones de USD (Litwin *et al.*, 2005; Defrances *et al.*, 2006). En México, a través de la Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE, 2022), durante el periodo del 1ro de enero al 31 de diciembre del 2022, se reportó un total de 56,859 Infecciones Asociadas a la Atención a la Salud (IAAS), las más frecuentes fueron las neumonías asociadas a ventilación mecánica (8,675 casos) seguidas de las infecciones de vías urinarias asociadas a catéter urinario (7,442 casos) y el principal microorganismo aislado fue *E. coli*.

6.2 Resistencia bacteriana a los antimicrobianos.

La Organización Mundial de la Salud (OMS, 2016) considera que la resistencia bacteriana es una de las principales amenazas de salud al poner en riesgo el desarrollo humano y estima que para el año 2050, la resistencia bacteriana causará 10 millones de muertes por año a nivel

global. La resistencia antimicrobiana puede originarse por selección artificial, debido a un inadecuado tratamiento antibiótico en el que se seleccionan clonas resistentes, o por selección natural, debido a la transferencia horizontal de genes (Giono-Cerezo *et al.*, 2020). La mayoría de las cepas de *E. coli* fueron resistentes a los antibióticos beta-lactámicos ampicilina, cefalotina, carbenicilina y ceftriaxona (Figura 8). La resistencia a los betalactámicos es conferida principalmente por betalactamasas de espectro extendido (ESBL, por sus siglas en inglés) (WHO, 2014), y han sido identificadas en cepas UPEC causantes de IstU (Dhillon & Clark, 2012). Los betalactámicos son el grupo más numeroso de antimicrobianos y el más utilizado en la práctica clínica (Suárez & Gudiol, 2009), lo que ha ocasionado con el tiempo la selección de cepas resistentes a estos agentes por la presencia de genes que codifican para las enzimas betalactamasas. En un estudio realizado en 164 cepas de *E. coli* resistentes a las cefalosporinas de tercera generación (ceftazidima, cefotaxima y ceftriaxona) aisladas de pacientes hospitalizados y ambulatorios en hospitales de Croacia, se encontró que la mayoría de estas cepas fue portadora de los genes de betalactamasas de espectro extendido (BLEE, por sus siglas en inglés); CTX-M (cefotaximasa-Munich, por sus siglas en inglés) o TEM (Temoniera, por sus siglas en inglés) (Krilanović *et al.*, 2020). En México recientemente se identificaron los genes de betalactamasas tipo *bla*CMY y otros genes de betalactamasa (*bla*TEM, *bla*SHV, *bla*CTX-M, *bla*VIM, *bla*IMP, *bla*KPC, *bla*NDM, *bla*OXA y *bla*GES) en un grupo de cepas de *E. coli* resistentes a cefalosporinas de tercera y cuarta generación aisladas de pacientes pediátricos con IstU, neumonía, bacteremia, abscesos perianales, entre otros (Merida-Vieyra *et al.*, 2020). Los porcentajes de resistencia a los antibióticos betalactámicos; ampicilina, cefalotina, carbenicilina y ceftriaxona detectados en estas cepas UPEC son muy semejantes a los descritos recientemente en un grupo de cepas patógenas cérvico-vaginales de *E. coli* (n=200) aisladas de mujeres en México (Paniagua-Contreras *et al.*, 2019). De la

misma manera también se identificaron elevados porcentajes de resistencia en las cepas a la pefloxacina (quinolona) y al trimetoprim con sulfametoxazol (Figura 6), que son semejantes a los porcentajes encontrados en un grupo de cepas UPEC (n=110) aisladas de pacientes con IsTU de un Hospital en Aguascalientes, México (Ramírez-Castillo, 2018).

En esta Tesis la mayoría de las cepas UPEC (n=191) analizadas fue multidrogo-resistente en el intervalo de 3-6 familias de antimicrobianos (Tabla 3), lo que evidencia el grave problema de salud que está ocurriendo en nuestro país, situación que disminuye las opciones terapéuticas (Sánchez & Ríos, 2008) y que puede desencadenar en infecciones de las vías urinarias más agudas y/o crónicas, con repercusiones económicas significativas (Dale & Woodford, 2015). Entre los factores más importantes que han ocasionado el surgimiento de cepas multidrogo-resistentes se encuentra la automedicación, así como el uso indiscriminado de los antimicrobianos en la agricultura y alimentos procesados (Álvarez-Hernández, Garza-Mayén & Vázquez-López, 2015).

La capacidad de las bacterias de evadir la acción de los antibióticos se ha atribuido a la adquisición de material exógeno a través de elementos genéticos móviles como plásmidos, transposones, genes de cassettes presentes en integrones (Hall, 1998), así como también a la alteración en el locus de regulación *mar* para evadir la acción de las tetraciclinas, cloranfenicol, penicilinas, cefalosporinas, puromicina, ácido nalidíxico y rifampicina (Alekhun *et al.*, 1997). En un estudio realizado en Irán, partieron de un grupo de cepas UPEC (n=123) aisladas de pacientes con IsTU, encontrando altos porcentajes de los genes de resistencia a estreptomicina (*aadA1*), tetraciclina (*tetA* y *tetB*), quinolonas (*qnr*), betalactámicos (*CIT*), sulfametoxazol (*sul1*) y menores porcentajes para el trimetoprim (*dfr1*) y betalactámicos (*blaSHV*) (Momtaz *et al.*, 2013). La presencia de genes de resistencia a betalactámicos (*TEM* y *CITM*), tetraciclina (*tetA*), quinolonas (*qnr*), sulfametoxazol (*sul1*),

trimetoprim (*dfp1*) y aminoglucósidos (aac (3) II) también han sido descritos en México en cepas cérvico-vaginales de *E. coli* (Monroy-Pérez *et al.*, 2020)

6.3 Detección de genes diarreogénicos en las cepas de *E. coli*.

En este estudio en las cepas UPEC analizadas se detectaron genes diarreogénicos característicos de los patotipos enteroagregativo, enteropatogénico y enterohemorrágico (Tabla 2). Los genes característicos de *E. coli* enteroagregativa identificados con más frecuencia en las cepas de *E. coli* uropatógenas fueron los de adhesión; *stbA* (44.9%), y *shf* (35.6%), de toxinas; *pet* (19.6%) y de colonización; *aap* (16.5%). El porcentaje de *aap* (16.5%; Tabla 2) identificado en las cepas UPEC es inferior al 46.6% encontrado en cepas UPEC (n=244) provenientes de pacientes con ISTU en Irán (Abe *et al.*, 2008), mientras que, por el contrario, el porcentaje de *stbA* (44.9%; Tabla 2) es superior el descrito en las cepas de Irán, que fue del 5.7% (n=14). La presencia de los genes de adhesión *stbA* y *shf* identificados en las cepas UPEC podrían probablemente coadyuvar a la adhesión durante las infecciones del tracto urinario, debido a que los factores de virulencia relacionados a las ISTU causadas por UPEC, incluyen fimbrias y/o adhesinas afimbriales, que les confieren la habilidad de adherirse a las células uroepiteliales. *stbA* fue el gen que se detectó con mayor frecuencia (Tabla 2), el cual es esencial para el mantenimiento del plásmido pAA de 55,989 pb, ya que produce la proteína StbA necesaria para que el plásmido sea transferido a las células hijas. Se ha descrito que más del 50% de las cepas enteroagregativas acarrean este plásmido y que su transferencia a las células hijas es directamente dependiente de *stbA* (Nazemi *et al.*, 2011). La participación de los genes de adhesión característicos de EAEC en las cepas UPEC durante las infecciones del tracto urinario ha sido poco estudiada, sin

embargo es bien conocido que los genes de adhesión del patotipo EAEC favorecen la adherencia agregativa (AA) en células HeLa/HEp-2, lo cual contribuye a la persistencia en el intestino debido a una fuerte adherencia a la superficie de la mucosa intestinal (Nataro *et al.*, 1992). El patrón AA en el patotipo EAEC ocurre por la presencia de las fimbrias de adherencia agregativa (AAF) y los factores de adherencia. Las fimbrias de adherencia agregativa tipo I, II y III son codificadas en el plásmido pAA por los genes *aggA* (AAF/I), *aafA* (AAF/II) y *agg3* (AAF/III), respectivamente (Abe *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2006). Se ha descrito que la subunidad AAF/I es responsable del fenotipo agregativo y a su vez este gen es regulado por *aggR* (un activador transcripcional) que controla la expresión de los factores de virulencia de EAEC, como *aap*.

En este estudio el gen *pet* (gen del plásmido que codifica para la toxina Pet) del patotipo EAEC fue identificado en el 19.6% (n=38) de las cepas, por lo que su presencia podría probablemente coadyuvar a la degradación de los tejidos y la posterior colonización durante las IsTU. Se ha reportado que los genes *pet*, así como *aap*, y *shf* son acarreados por el plásmido pAA (Abe *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2006), los cuales probablemente han sido transferidos horizontalmente por los patotipos diarreogénicos a las cepas UPEC.

En este estudio también se identificaron genes diarreogénicos característicos de EPEC y EHEC (Tabla 6), dentro de los cuales, los genes de adhesión *ipfA* (EPEC), *eaeA* (EPEC/EHEC) y *bfpA* (EPEC) fueron detectados en el 22.2% (n=43), 9.3% (n=18) y 4.1% (n=8), respectivamente. Los porcentajes de estos genes de adhesión diarreogénicos son superiores a los descritos en cepas UPEC (n=225) aisladas de pacientes en un hospital de Sao Paulo, Brasil, donde *ipfA* fue identificado en el 12.4% (n=28) de las cepas y *eae* en el 0.4% (n=1) (Abe *et al.*, 2008). Si bien la frecuencia de estos genes diarreogénicos característicos de EPEC/EHEC han sido poco descritos en cepas UPEC, estos marcadores de virulencia son

ampliamente identificados en los patotipos diarreogénicos, por ejemplo, en un estudio realizado en un grupo de cepas de *E. coli* (n= 339) de *E.coli* enterohemorrágicas aisladas de pacientes en Noruega durante los años de 1992 a 2013, se encontró una elevada frecuencia de estos genes de adhesión *lpfA* (n=306), y *eaeA* (n=252) (Naseer *et al.*, 2017).

La frecuencia de los genes de adhesión *lpfA*, *eaeA* y *bfpA* característicos de los patotipos enteropatogénicos y enterohemorrágicos, al igual que los genes de toxinas *vt1* y *toxB* de EHEC identificados en menor frecuencia en las cepas UPEC (Tabla 2), demuestra que estas cepas uropatógenas podrían ocasionar infecciones del tracto urinario (IsTU) más agudas, debido a que la proteína fimbrial polar larga (Lpf) codificada por *lpfA*, participa en la persistencia y la colonización del intestino en *E. coli* enterohemorrágica (Farfan *et al.*, 2011), de la misma manera la proteína ToxB, es esencial para la adherencia de EHEC (Badea *et al.*, 2003), mientras que la proteína intimina EaeA facilita la adherencia al enterocito (Ochoa, 2011) y la verotoxina 1 están asociadas con el síndrome urémico hemolítico (HUS, por sus siglas en ingles), la púrpura trombocitopénica trombótica (PTT) y la colitis hemorrágica (Yilmaz *et al.*, 2006).

6.4 Transcripción de los genes diarreogénicos en las cepas uropatógenas de *E. coli*.

Con el propósito de determinar la transcripción de los genes en las cepas UPEC (n=99) con presencia de 3 o más genes diarreogénicos se utilizó un modelo *in vitro* de infección en la línea celular ATCC A431. Los genes diarreogénicos que se transcribieron con mayor frecuencia fueron los genes de adhesión; *stbA* (EAEC; 36/99), y *shf* (EAEC; 24/99), de colonización; *aap* (20/99) y de toxinas; *pet* (EAEC; 13/99) (Tabla 4). Los resultados

encontrados en este estudio evidencian, por primera vez, de manera global que los genes diarregénicos de adhesión, colonización y de toxinas correspondientes a otros patotipos de *E. coli* se transcribieron en las cepas UPEC durante el modelo *in vitro* de infección, lo que refleja que estos genes probablemente podrían coadyuvar durante la patogénesis de las infecciones de las vías urinarias ocasionadas por cepas UPEC. La determinación de la transcripción de genes diarregénicos presentes en estas cepas UPEC no se había estudiado, sin embargo, la transcripción de los genes uropatógenos en las cepas UPEC fueron previamente descritos (n=194) (Paniagua *et al.*, 2017), donde se encontraron elevados porcentajes de los genes de adhesión *fim* (fimbria tipo 1), *iha* (non- haemagglutinating adhesión, por sus siglas en ingles), *papC* (pilus associated with pyelonephritis, por sus siglas en ingles), así como de los sistemas de adquisición de hierro *irp2* (iron-repressible protein, por sus siglas en ingles), la protectina *kpsMT* (K-antigen, por sus siglas en ingles) y las toxinas *usp* (uropathogenic-specific protein gene, por sus siglas en ingles), *hlyA* (haemolysin, por sus siglas en ingles) y *astA* (enteroaggregative heat-stable toxin, por sus siglas en ingles). Estos resultados nos hacen suponer que la participación simultánea y colectiva de los genes diarregénicos con los genes uropatógenos, incrementarían de manera importante la agudeza de las infecciones.

6.5 Patrones de transcripción de los genes diarregénicos asociados con la resistencia a los antibióticos en las cepas UPEC.

Se identificaron 12 distintos patrones de transcripción de los genes diarregénicos relacionados con el fenotipo de resistencia a los antibióticos en las cepas UPEC, dentro de los cuales el patrón más abundante fue el No. 1 conformado por los genes de toxinas y

adhesión *pet/shf* (n=5; Tabla 5), el cual se correlacionó con cinco distintos perfiles de fenotipos de resistencia a los antibióticos conformados por 4 a 11 antibióticos. La asociación de la transcripción de los genes diarreogénicos de adhesión, colonización, y toxinas en las cepas UPEC relacionados con los diferentes perfiles de la multidrogo-resistencia a los antibióticos (betalactámicos, quinolonas, trimetoprim-sulfametoxazol, aminoglucósidos, nitrofuranos y afenicoles) demuestra la capacidad de las cepas para ocasionar infecciones más agudas y/o crónicas, sobre todo considerando que en estas mismas cepas (n=194) estudiadas previamente (2017) se describieron 107 diferentes patrones de transcripción de los genes característicos de la virulencia en UPEC, como son los genes de adhesión, de sistemas de captación de hierro, toxinas y protectinas, relacionados también con el genotipo de resistencia a los antimicrobianos (Paniagua *et al.*, 2017).

En el presente estudio los resultados obtenidos son relevantes por evidenciar una alta composición del genotipo de virulencia diarreogénico, asociada con el fenotipo de resistencia a los antimicrobianos en cepas UPEC aisladas de pacientes con infecciones de vías urinarias. Estos resultados pueden contribuir a mejorar los tratamientos médicos contra las infecciones de las vías urinarias ocasionadas por cepas UPEC.

7 CONCLUSIONES

1. La mayoría de las cepas uropatógenas estudiadas fueron portadoras de los genes diarreogénicos que codifican para adhesinas, factores de colonización y toxinas.
2. Se encontró una elevada multidrogo-resistencia de las cepas uropatógenas a los antimicrobianos.
3. Las cepas uropatógenas de *E. coli* después de la infección de la línea celular A431 transcribieron con mayor frecuencia los genes diarreogénicos relacionados con la adhesión celular, colonización y con la producción de toxinas, principalmente del patotipo *E. coli* enteroagregativo.
4. Los resultados obtenidos sugieren que podría existir una participación colectiva de los factores de virulencia de los genes diarreogénicos durante las infecciones del tracto urinario por las cepas *E. coli* uropatógenas.
5. Para prevenir la resistencia bacteriana, es necesario la vigilancia epidemiológica, el uso racional de antibióticos y control de las infecciones intrahospitalarias, a través de la elaboración y uso de guías locales para la administración de agentes antimicrobianos.

8 PROSPECTIVAS

La presencia de diferentes patrones de transcripción de los genes diareogénicos en las cepas uropatógenas; sumado a la multidrogo-resistencia, podría coadyuvar al establecimiento, cronicidad y/o agudeza de las infecciones del tracto urinario.

Sería importante secuenciar el genoma completo de las cepas de *E. coli* para establecer el genotipo total de virulencia, los filogrupos, y serotipos al que pertenecen las cepas, así como la distribución del genotipo de resistencia a los antimicrobianos.

9 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abe, C. M., Salvador, F. A., Falsetti, I. N., Vieira, M. A., Blanco, J., Blanco, J. E., Blanco, M., Machado, A. M., Elias, W. P., Hernandes, R. T., & Gomes, T. A. (2008). Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) strains may carry virulence properties of diarrhoeagenic *E. coli*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 52(3), 397–406. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2008.00388.x>
2. Abernethy, J., Guy, R., Sheridan, E. A., Hopkins, S., Kiernan, M., Wilcox, M. H., Johnson, A. P., Hope, R., & *E. coli* bacteraemia sentinel surveillance group (2017). Epidemiology of *Escherichia coli* bacteraemia in England: results of an enhanced sentinel surveillance programme. *The Journal of Hospital Infection*, 95(4), 365–375. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2016.12.008>
3. Adeyankinnu, F. A., Motayo, B. O., Akinduti, A., Akinbo, J., Ogiogwa, J. I., Aboderin, B. W., & Agunlejika, R. A. (2014). A Multicenter Study of Beta-Lactamase Resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Reveals High Level Chromosome Mediated Extended Spectrum β Lactamase Resistance in Ogun State, Nigeria. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2014, 819896. <https://doi.org/10.1155/2014/819896>
4. Alekshun, M. N., & Levy, S. B. (1997). Regulation of chromosomally mediated multiple antibiotic resistance: the mar regulon. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41(10), 2067–2075. <https://doi.org/10.1128/AAC.41.10.2067>
5. Ali, I., Rifaque, Z., Ahmed, S., Malik, S., Dasti, J.I. (2016). Prevalence of multi- drug resistant uropathogenic *Escherichia coli* in Potohar region of Pakistan. (2016). *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(1), 60–66. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.09.022>.
6. Álvarez-Hernández, D. A., Garza-Mayén, G. S., & Vázquez-López, R. (2015). Quinolonas. Perspectivas actuales y mecanismos de resistencia [Quinolones. Nowadays perspectives and mechanisms of resistance]. *Revista Chilena de Infectología: organo oficial de la Sociedad Chilena de Infectología*, 32(5), 499–504. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182015000600002>
7. Amirkamali, S., Naserpour-Farivar, T., Azarhoosh, K., & Peymani, A. (2017). Distribution of the bla OXA, bla VEB-1, and bla GES-1 genes and resistance patterns of

- ESBL-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hospitals in Tehran and Qazvin, Iran. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 50(3), 315–320. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0478-2016>
8. Anderson, G. G., Palermo, J. J., Schilling, J. D., Roth, R., Heuser, J., & Hultgren, S. J. (2003). Intracellular bacterial biofilm-like pods in urinary tract infections. *Science (New York, N.Y.)*, 301(5629), 105–107. <https://doi.org/10.1126/science.1084550>
 9. Andrews, S. C., Robinson, A. K., & Rodríguez-Quñones, F. (2003). Bacterial iron homeostasis. *FEMS microbiology reviews*, 27(2-3), 215–237. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(03\)00055-X](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(03)00055-X)
 10. Bäckhed, F., Alsén, B., Roche, N., Angström, J., von Euler, A., Breimer, M. E., Westerlund-Wikström, B., Teneberg, S., & Richter-Dahlfors, A. (2002). Identification of target tissue glycosphingolipid receptors for uropathogenic, F1C-fimbriated *Escherichia coli* and its role in mucosal inflammation. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(20), 18198–18205. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111640200>
 11. Badea, L., Doughty, S., Nicholls, L., Sloan, J., Robins-Browne, R. M., & Hartland, E. L. (2003). Contribution of Efa1/LifA to the adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to epithelial cells. *Microbial Pathogenesis*, 34(5), 205–215. [https://doi.org/10.1016/s0882-4010\(03\)00026-3](https://doi.org/10.1016/s0882-4010(03)00026-3)
 12. Bagg, A., & Neilands, J. B. (1987). Ferric uptake regulation protein acts as a repressor, employing iron (II) as a cofactor to bind the operator of an iron transport operon in *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 26(17), 5471–5477. <https://doi.org/10.1021/bio00391a0039>
 13. Bartoletti, R., Selli, C., & Cai, T. (2016). Editorial Comment. *Urology*, 91, 134–135. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2015.12.064>
 14. Bernier, C., Gounon, P., & Le Bouguéneq, C. (2002). Identification of an aggregative adhesion fimbria (AAF) type III-encoding operon in enteroaggregative *Escherichia coli* as a sensitive probe for detecting the AAF-encoding operon family. *Infection and Immunity*, 70(8), 4302–4311. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.8.4302-4311.2002>
 15. Boletín Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE). (2022). Panorama epidemiológico de las infecciones asociadas a la atención de la salud (IAAS), México, cierre del año 2022.

16. Bonkat, G., Pickard, R., Bartoletti, R., Bruyère, F., Geerlings, S.E., Wagenlehner, F., Wullt, B. (2017). Guidelines on urological infections. Arnhem (The Netherlands): European Association of Urology.
17. Carbonetti, N. H., Boonchai, S., Parry, S. H., Väisänen-Rhen, V., Korhonen, T. K., & Williams, P. H. (1986). Aerobactin-mediated iron uptake by *Escherichia coli* isolates from human extraintestinal infections. *Infection and Immunity*, *51*(3), 966–968. <https://doi.org/10.1128/iai.51.3.966-968.1986>
18. Cerna, J. F., Nataro, J. P., & Estrada-Garcia, T. (2003). Multiplex PCR for detection of three plasmid-borne genes of enteroaggregative *Escherichia coli* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, *41*(5), 2138–2140. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.5.2138-2140.2003>
19. Clermont, O., Christenson, J. K., Denamur, E., & Gordon, D. M. (2013). The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environmental Microbiology Reports*, *5*(1), 58–65. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12019>
20. Connell, I., Agace, W., Klemm, P., Schembri, M., Mårild, S., & Svanborg, C. (1996). Type 1 fimbrial expression enhances *Escherichia coli* virulence for the urinary tract. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *93*(18), 9827–9832. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.18.9827>
21. Conover, M. S., Ruer, S., Taganna, J., Kalas, V., De Greve, H., Pinkner, J. S., Dodson, K. W., Remaut, H., & Hultgren, S. J. (2016). Inflammation-Induced Adhesin-Receptor Interaction Provides a Fitness Advantage to Uropathogenic *E. coli* during Chronic Infection. *Cell Host & Microbe*, *20*(4), 482–492. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.08.013>
22. Crosa J. H. (1989). Genetics and molecular biology of siderophore-mediated iron transport in bacteria. *Microbiological Reviews*, *53*(4), 517–530. <https://doi.org/10.1128/mr.53.4.517-530.1989>
23. Croxen, M. A., Law, R. J., Scholz, R., Keeney, K. M., Wlodarska, M., & Finlay, B. B. (2013). Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, *26*(4), 822–880. <https://doi.org/10.1128/CMR.00022-13>

24. Czczulin, J. R., Whittam, T. S., Henderson, I. R., Navarro-Garcia, F., & Nataro, J. P. (1999). Phylogenetic analysis of enteroaggregative and diffusely adherent *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 67(6), 2692–2699. <https://doi.org/10.1128/IAI.67.6.2692-2699.1999>
25. Dale, A. P., & Woodford, N. (2015). Extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC): Disease, carriage and clones. *The Journal of Infection*, 71(6), 615–626. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2015.09.009>
26. Davis, J. M., Rasmussen, S. B., & O'Brien, A. D. (2005). Cytotoxic necrotizing factor type 1 production by uropathogenic *Escherichia coli* modulates polymorphonuclear leukocyte function. *Infection and Immunity*, 73(9), 5301–5310. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.9.5301-5310.2005>
27. de Lorenzo, V., Bindereif, A., Paw, B. H., & Neilands, J. B. (1986). Aerobactin biosynthesis and transport genes of plasmid ColV-K30 in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, 165(2), 570–578. <https://doi.org/10.1128/jb.165.2.570-578.1986>
28. DeFrances, C. J., Lucas, C. A., Buie, V. C., & Golosinskiy, A. (2008). 2006 National Hospital Discharge Survey. *National Health Statistics Reports*, (5), 1–20.
29. Dehbanipour, R., Rastaghi, S., Sedighi, M., Maleki, N., Faghri, J. (2016). *Journal of Natural Science, Biology and Medicine*, 7(1), 22-26. <https://doi.org/10.4103/0976-9668.175020>.
30. Desvaux, M., Dalmasso, G., Beyrouthy, R., Barnich, N., Delmas, J., & Bonnet, R. (2020). Pathogenicity Factors of Genomic Islands in Intestinal and Extraintestinal *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*, 11, 2065. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.02065>
31. Dhillon, R. H., & Clark, J. (2012). ESBLs: A Clear and Present Danger?. *Critical Care Research and Practice*, 2012, 625170. <https://doi.org/10.1155/2012/625170>
32. Dodson, K. W., Pinkner, J. S., Rose, T., Magnusson, G., Hultgren, S. J., & Waksman, G. (2001). Structural basis of the interaction of the pyelonephritic *E. coli* adhesin to its human kidney receptor. *Cell*, 105(6), 733–743. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00388-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00388-9)
33. Donnenberg, M.S. (2013). *Escherichia coli* (Second Edition), *Academic Press*, 612, ISBN 9780123970480, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397048-0.18001-5>.

34. Dudley, E. G., Abe, C., Ghigo, J. M., Latour-Lambert, P., Hormazabal, J. C., & Nataro, J. P. (2006). An IncII plasmid contributes to the adherence of the atypical enteroaggregative *Escherichia coli* strain C1096 to cultured cells and abiotic surfaces. *Infection and Immunity*, 74(4), 2102–2114. <https://doi.org/10.1128/IAI.74.4.2102-2114.2006>
35. Edén, C. S., & Hansson, H. A. (1978). *Escherichia coli* pili as possible mediators of attachment to human urinary tract epithelial cells. *Infection and Immunity*, 21(1), 229–237. <https://doi.org/10.1128/iai.21.1.229-237.1978>
36. Elias, W. P., Jr, Czeczulin, J. R., Henderson, I. R., Trabulsi, L. R., & Nataro, J. P. (1999). Organization of biogenesis genes for aggregative adherence fimbria II defines a virulence gene cluster in enteroaggregative *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 181(6), 1779–1785. <https://doi.org/10.1128/JB.181.6.1779-1785.1999>
37. Eslava, C., Navarro-García, F., Czeczulin, J. R., Henderson, I. R., Cravioto, A., & Nataro, J. P. (1998). Pet, an autotransporter enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 66(7), 3155–3163. <https://doi.org/10.1128/IAI.66.7.3155-3163.1998>
38. European Food Safety Authority (EFSA). (2011). Urgent advice on the public health risk of Shiga toxin producing *Escherichia coli* in fresh vegetables. *European Food Safety Authority Journal*, 9(6), 2274. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2274>
39. Farfan, M. J., Cantero, L., Vidal, R., Botkin, D. J., & Torres, A. G. (2011). Long polar fimbriae of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 bind to extracellular matrix proteins. *Infection and Immunity*, 79(9), 3744–3750. <https://doi.org/10.1128/IAI.05317-11>
40. Flores-Mireles, A. L., Walker, J. N., Caparon, M., & Hultgren, S. J. (2015). Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nature Reviews. Microbiology*, 13(5), 269–284. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3432>
41. Foxman B. (2003). Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. *Disease-a-month: DM*, 49(2), 53–70. <https://doi.org/10.1067/mda.2003.7>

42. Foxman B. (2010). The epidemiology of urinary tract infection. *Nature Reviews. Urology*, 7(12), 653–660. <https://doi.org/10.1038/nrrol.2010.190>
43. Foxman B. (2014). Urinary tract infection syndromes: occurrence, recurrence, bacteriology, risk factors, and disease burden. *Infectious disease clinics of North America*, 28(1), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2013.09.003>
44. Fujiyama, R., Nishi, J., Imuta, N., Tokuda, K., Manago, K., & Kawano, Y. (2008). The shf gene of a *Shigella flexneri* homologue on the virulent plasmid pAA2 of enteroaggregative *Escherichia coli* 042 is required for firm biofilm formation. *Current microbiology*, 56(5), 474–480. <https://doi.org/10.1007/s00284-008-9115-y>
45. Gal-Mor, O., & Finlay, B. B. (2006). Pathogenicity islands: a molecular toolbox for bacterial virulence. *Cellular Microbiology*, 8(11), 1707–1719. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00794.x>
46. Garcia, B. G., Castro, F. S., Vieira, M. A. M., Girão, D. M., Uenishi, L. T., Cergole-Novella, M. C., Dos Santos, L. F., Piazza, R. M. F., Hernandez, R. T., & Gomes, T. A. T. (2019). Distribution of the pilS gene in *Escherichia coli* pathovars, its transfer ability and influence in the typical enteropathogenic *E. coli* adherence phenotype. *International Journal of Medical Microbiology: IJMM*, 309(1), 66–72. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2018.12.001>
47. Garcia, E. C., Brumbaugh, A. R., & Mobley, H. L. (2011). Redundancy and specificity of *Escherichia coli* iron acquisition systems during urinary tract infection. *Infection and Immunity*, 79(3), 1225–1235. <https://doi.org/10.1128/IAI.01222-10>
48. Giono-Cerezo, S., Santos-Preciado, J. I., Morfín-Otero, M. D. R., Torres-López, F. J., & Alcántar-Curiel, M. D. (2020). Resistencia antimicrobiana. Importancia y esfuerzos por contenerla. *Gaceta Medica de Mexico*, 156(2), 171-178. <https://doi.org/10.24875/GMM.M20000358>, <https://doi.org/10.24875/GMM.M20000358>
49. Gomes, T. A., Elias, W. P., Scaletsky, I. C., Guth, B. E., Rodrigues, J. F., Piazza, R. M., Ferreira, L. C., & Martinez, M. B. (2016). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Brazilian Journal of Microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 47 Suppl 1(Suppl 1), 3–30. <https://doi.org/10.1016/j.bjmm.2016.10.015>

50. Guina, T., Yi, E. C., Wang, H., Hackett, M., & Miller, S. I. (2000). A PhoP-regulated outer membrane protease of *Salmonella enterica* serovar typhimurium promotes resistance to alpha-helical antimicrobial peptides. *Journal of Bacteriology*, *182*(14), 4077–4086. <https://doi.org/10.1128/JB.182.14.4077-4086.2000>
51. Gunther, N. W., 4th, Lockett, V., Johnson, D. E., & Mobley, H. L. (2001). In vivo dynamics of type 1 fimbria regulation in uropathogenic *Escherichia coli* during experimental urinary tract infection. *Infection and Immunity*, *69*(5), 2838–2846. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.5.2838-2846.2001>
52. Guyer, D. M., Henderson, I. R., Nataro, J. P., & 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>
53. Guyer, D. M., Radulovic, S., Jones, F. E., & 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>
54. Hall, R. M., & Collis, C. M. (1998). Antibiotic resistance in gram-negative bacteria: the role of gene cassettes and integrons. *Drug resistance updates: reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, *1*(2), 109–119. [https://doi.org/10.1016/s1368-7646\(98\)80026-5](https://doi.org/10.1016/s1368-7646(98)80026-5)
55. Hancock, V., & Klemm, P. (2007). Global gene expression profiling of asymptomatic bacteriuria *Escherichia coli* during biofilm growth in human urine. *Infection and Immunity*, *75*(2), 966–976. <https://doi.org/10.1128/IAI.01748-06>
56. Hancock, V., Ferrières, L., & Klemm, P. (2008). The ferric yersiniabactin uptake receptor FyuA is required for efficient biofilm formation by urinary tract infectious *Escherichia coli* in human urine. *Microbiology (Reading, England)*, *154*(Pt 1), 167–175. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/011981-0>
57. Heimer, S. R., Rasko, D. A., Lockett, C. V., Johnson, D. E., & Mobley, H. L. (2004). Autotransporter genes pic and tsh are associated with *Escherichia coli* strains that cause acute pyelonephritis and are expressed during urinary tract infection. *Infection and Immunity*, *72*(1), 593–597. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.1.593-597.2004>

58. Hernández-Chiñas, U., Pérez-Ramos, A., Belmont-Monroy, L., Chávez-Berrocal, M. E., González-Villalobos, E., Navarro-Ocaña, A., Eslava, C. A., & Molina-Lopez, J. (2019). Characterization of auto-agglutinating and non-typeable uropathogenic *Escherichia coli* strains. *Journal of Infection in Developing Countries*, *13*(6), 465–472. <https://doi.org/10.3855/jidc.11098>
59. Huang, D. B., Mohanty, A., DuPont, H. L., Okhuysen, P. C., & Chiang, T. (2006). A review of an emerging enteric pathogen: enteroaggregative *Escherichia coli*. *Journal of Medical Microbiology*, *55*(Pt 10), 1303–1311. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46674-0>
60. Hui, C. Y., Guo, Y., He, Q. S., Peng, L., Wu, S. C., Cao, H., & Huang, S. H. (2010). *Escherichia coli* outer membrane protease OmpT confers resistance to urinary cationic peptides. *Microbiology and Immunology*, *54*(8), 452–459. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2010.00238.x>
61. Hung, C. S., Bouckaert, J., Hung, D., Pinkner, J., Widberg, C., DeFusco, A., Auguste, C. G., Strouse, R., Langermann, S., Waksman, G., & Hultgren, S. J. (2002). Structural basis of tropism of *Escherichia coli* to the bladder during urinary tract infection. *Molecular Microbiology*, *44*(4), 903–915. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02915.x>
62. Ingle, D. J., Valcanis, M., Kuzevski, A., Tauschek, M., Inouye, M., Stinear, T., Levine, M. M., Robins-Browne, R. M., & Holt, K. E. (2016). *In silico* serotyping of *E. coli* from short read data identifies limited novel O-loci but extensive diversity of O:H serotype combinations within and between pathogenic lineages. *Microbial Genomics*, *2*(7), e000064. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000064>
63. Johnson J. R. (1991). Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clinical Microbiology Reviews*, *4*(1), 80–128. <https://doi.org/10.1128/CMR.4.1.80>
64. Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature reviews. Microbiology*, *2*(2), 123–140. <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>
65. Kanamaru, S., Kurazono, H., Nakano, M., Terai, A., Ogawa, O., & Yamamoto, S. (2006). Subtyping of uropathogenic *Escherichia coli* according to the pathogenicity island encoding uropathogenic-specific protein: comparison with phylogenetic groups. *International Journal of Urology: Official Journal of the Japanese Urological Association*, *13*(6), 754–760. <https://doi.org/10.1111/j.1442-2042.2006.01398.x>

66. Klein, R. D., & Hultgren, S. J. (2020). Urinary tract infections: microbial pathogenesis, host-pathogen interactions and new treatment strategies. *Nature Reviews. Microbiology*, 18(4), 211–226. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0324-0>
67. Korhonen, T. K., Virkola, R., & Holthöfer, H. (1986). Localization of binding sites for purified *Escherichia coli* P fimbriae in the human kidney. *Infection and Immunity*, 54(2), 328–332. <https://doi.org/10.1128/iai.54.2.328-332.1986>
68. Kostakioti, M., Hadjifrangiskou, M., Cusumano, C. K., Hannan, T. J., Janetka, J. W., & Hultgren, S. J. (2012). Distinguishing the contribution of type 1 pili from that of other QseB-misregulated factors when QseC is absent during urinary tract infection. *Infection and Immunity*, 80(8), 2826–2834. <https://doi.org/10.1128/IAI.00283-12>
69. Kresken, M., Körber-Irrgang, B., Biedenbach, D. J., Batista, N., Besard, V., Cantón, R., García-Castillo, M., Kalka-Moll, W., Pascual, A., Schwarz, R., Van Meensel, B., Wisplinghoff, H., & Seifert, H. (2016). Comparative in vitro activity of oral antimicrobial agents against Enterobacteriaceae from patients with community-acquired urinary tract infections in three European countries. *Clinical Microbiology and Infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 22(1), 63.e1–63.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.08.019>
70. Krilanović, M., Tomić-Paradžik, M., Meštrović, T., Beader, N., Herljević, Z., Conzemius, R., Barišić, I., Vraneš, J., Elveđi-Gašparović, V., & Bedenić, B. (2020). Extended-spectrum beta-lactamases and plasmid diversity in urinary isolates of *Escherichia coli* in Croatia: a nation-wide, multicentric, retrospective study. *Folia Microbiologica*, 65(4), 649–667. <https://doi.org/10.1007/s12223-019-00769-1>
71. Lane, D. J., Pace, B., Olsen, G. J., Stahl, D. A., Sogin, M. L., & Pace, N. R. (1985). Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(20), 6955–6959. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.20.6955>
72. Lavigne, J. P., Bruyère, F., Bernard, L., Combescure, C., Ronco, E., Lanotte, P., Coloby, P., Thibault, M., Cariou, G., Desplaces, N., Costa, P., & Sotto, A. (2016). Resistance and virulence potential of uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from patients hospitalized in urology departments: a French prospective multicentre study. *Journal of Medical Microbiology*, 65(6), 530–537. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000247>

73. Leytus, S. P., Bowles, L. K., Konisky, J., & Mangel, W. F. (1981). Activation of plasminogen to plasmin by a protease associated with the outer membrane of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(3), 1485–1489. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.3.1485>
74. Litwin, M. S., Saigal, C. S., Yano, E. M., Avila, C., Geschwind, S. A., Hanley, J. M., Joyce, G. F., Madison, R., Pace, J., Polich, S. M., Wang, M., & Urologic Diseases in America Project (2005). Urologic diseases in America Project: analytical methods and principal findings. *The Journal of Urology*, 173(3), 933–937. <https://doi.org/10.1097/01.ju.0000152365.43125.3b>
75. Lob, S. H., Nicolle, L. E., Hoban, D. J., Kazmierczak, K. M., Badal, R. E., & Sahm, D. F. (2016). Susceptibility patterns and ESBL rates of *Escherichia coli* from urinary tract infections in Canada and the United States, SMART 2010-2014. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 85(4), 459–465. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.04.022>
76. Lundrigan, M. D., & Webb, R. M. (1992). Prevalence of ompT among *Escherichia coli* isolates of human origin. *FEMS Microbiology Letters*, 76(1-2), 51–56. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(92\)90362-r](https://doi.org/10.1016/0378-1097(92)90362-r)
77. Luterbach, C. L., & Mobley, H. L. T. (2018). Cross Talk between MarR-Like Transcription Factors Coordinates the Regulation of Motility in Uropathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 86(12), e00338-18. <https://doi.org/10.1128/IAI.00338-18>
78. Martínez-Santos, V.I., Ruíz-Rosas, M., Ramirez-Peralta, A., Zaragoza García, O., Resendiz-Reyes, L.A., Romero-Pineda, O.J., Castro-Alarcón, N. (2021). Enteroaggregative *Escherichia coli* is associated with antibiotic resistance and urinary tract infection symptomatology. *Peer J*, 9:e11726. <https://doi.org/10.7717/peerj.11726>. eCollection 2021.
79. Matsukawa, M., Igarashi, M., Watanabe, H., Qin, L., Ohnishi, M., Terajima, J., Iyoda, S., Morita-Ishihara, T., Tateda, K., Ishii, Y., Saga, T., Aoki, K., & Bonomo, R. A. (2019). Epidemiology and genotypic characterisation of dissemination patterns of uropathogenic *Escherichia coli* in a community. *Epidemiology and Infection*, 147, e148. <https://doi.org/10.1017/S0950268819000426>

80. Mangel, W. F., Toledo, D. L., Brown, M. T., Worzalla, K., Lee, M., & Dunn, J. J. (1994). OmpT: an *Escherichia coli* outer membrane proteinase that activates plasminogen. *Methods in Enzymology*, *244*, 384–399. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(94\)44029-8](https://doi.org/10.1016/0076-6879(94)44029-8)
81. Maroncle, N. M., Sivick, K. E., Brady, R., Stokes, F. E., & Mobley, H. L. (2006). Protease activity, secretion, cell entry, cytotoxicity, and cellular targets of secreted autotransporter toxin of uropathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, *74*(11), 6124–6134. <https://doi.org/10.1128/IAI.01086-06>
82. McCarter, J. D., Stephens, D., Shoemaker, K., Rosenberg, S., Kirsch, J. F., & Georgiou, G. (2004). Substrate specificity of the *Escherichia coli* outer membrane protease OmpT. *Journal of Bacteriology*, *186*(17), 5919–5925. <https://doi.org/10.1128/JB.186.17.5919-5925.2004>
83. Merida-Vieyra, J., De Colsa-Ranero, A., Calderón-Castañeda, Y., & Aquino-Andrade, A. (2020). Detection of CMY-type beta-lactamases in *Escherichia coli* isolates from paediatric patients in a tertiary care hospital in Mexico. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, *9*(1), 168. <https://doi.org/10.1186/s13756-020-00840-4>
84. Min, Y. N., Tabuchi, A., Fan, Y. L., Womble, D. D., & Rownd, R. H. (1988). Complementation of mutants of the stability locus of IncFII plasmid NR1. Essential functions of the trans-acting stbA and stbB gene products. *Journal of Molecular Biology*, *204*(2), 345–356. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(88\)90581-5](https://doi.org/10.1016/0022-2836(88)90581-5)
85. Momtaz, H., Karimian, A., Madani, M., Safarpour Dehkordi, F., Ranjbar, R., Sarshar, M., & Souod, N. (2013). Uropathogenic *Escherichia coli* in Iran: serogroup distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, *12*, 8. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-12-8>
86. Monroy-Pérez, E., Cerón, A. B., García Cortés, L. R., Alonso, N. N., Domínguez-Trejo, P., Hernández-Jaimes, T., Bustos-Martínez, J., Hamdan-Partida, A., Rojas Jiménez, E. A., Vaca, S., Vaca-Paniagua, F., & Paniagua-Contreras, G. L. (2020). Virulence gene transcription, phylogroups, and antibiotic resistance of cervico-vaginal pathogenic *E. coli* in Mexico. *PloS one*, *15*(6), e0234730. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234730>
87. Montenegro, M. A., Bitter-Suermann, D., Timmis, J. K., Agüero, M. E., Cabello, F. C., Sanyal, S. C., & Timmis, K. N. (1985). *traT* gene sequences, serum resistance and

- pathogenicity-related factors in clinical isolates of *Escherichia coli* and other gram-negative bacteria. *Journal of General Microbiology*, 131(6), 1511–1521. <https://doi.org/10.1099/00221287-131-6-1511>
88. Morabito, S., Tozzoli, R., Oswald, E., & Caprioli, A. (2003). A mosaic pathogenicity island made up of the locus of enterocyte effacement and a pathogenicity island of *Escherichia coli* O157:H7 is frequently present in attaching and effacing *E. coli*. *Infection and Immunity*, 71(6), 3343–3348. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.6.3343-3348.2003>
89. Morin, N., Santiago, A. E., Ernst, R. K., Guillot, S. J., & Nataro, J. P. (2013). Characterization of the AggR regulon in enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 81(1), 122–132. <https://doi.org/10.1128/IAI.00676-12>
90. Mulvey, M. A., Lopez-Boado, Y. S., Wilson, C. L., Roth, R., Parks, W. C., Heuser, J., & Hultgren, S. J. (1998). Induction and evasion of host defenses by type 1-piliated uropathogenic *Escherichia coli*. *Science (New York, N.Y.)*, 282(5393), 1494–1497. <https://doi.org/10.1126/science.282.5393.1494>
91. Nagy, G., Altenhoefer, A., Knapp, O., Maier, E., Dobrindt, U., Blum-Oehler, G., Benz, R., Emody, L., & Hacker, J. (2006). Both alpha-haemolysin determinants contribute to full virulence of uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. *Microbes and Infection*, 8(8), 2006–2012. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2006.02.029>
92. Naseer, U., Løbersli, I., Hindrum, M., Bruvik, T., & Brandal, L. T. (2017). Virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and the risk of developing haemolytic uraemic syndrome in Norway, 1992-2013. *European journal of clinical Microbiology & Infectious Diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 36(9), 1613–1620. <https://doi.org/10.1007/s10096-017-2974-z>
93. Nataro, J. P., & Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(1), 142–201. <https://doi.org/10.1128/CMR.11.1.142>
94. Nataro, J. P., Deng, Y., Maneval, D. R., German, A. L., Martin, W. C., & Levine, M. M. (1992). Aggregative adherence fimbriae I of enteroaggregative *Escherichia coli* mediate adherence to HEP-2 cells and hemagglutination of human erythrocytes. *Infection and Immunity*, 60(6), 2297–2304. <https://doi.org/10.1128/iai.60.6.2297-2304.1992>
95. Nazemi, A., Mirinargasi, M., Merikhi, N., & Sharifi, S. H. (2011). Distribution of Pathogenic Genes *aatA*, *aap*, *aggR*, among Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) and

- Their Linkage with StbA Gene. *Indian Journal of Microbiology*, 51(3), 355–358. <https://doi.org/10.1007/s12088-011-0175-5>
96. Nishi, J., Sheikh, J., Mizuguchi, K., Luisi, B., Burland, V., Boutin, A., Rose, D. J., Blattner, F. R., & Nataro, J. P. (2003). The export of coat protein from enteroaggregative *Escherichia coli* by a specific ATP-binding cassette transporter system. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(46), 45680–45689. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306413200>
97. Ochoa, Theresa J. (2011). Brote severo de *E. coli* productora de Shiga toxina (STEC) en Alemania: ¿Es el resultado de la promiscuidad de la *E. coli*?. *Revista Medica Herediana*, 22(2),45-46. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1018130X2011000200001&lng=es&tlng=es
98. Ooka, T., Terajima, J., Kusumoto, M., Iguchi, A., Kurokawa, K., Ogura, Y., Asadulghani, M., Nakayama, K., Murase, K., Ohnishi, M., Iyoda, S., Watanabe, H., & Hayashi, T. (2009). Development of a multiplex PCR-based rapid typing method for enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(9), 2888–2894. <https://doi.org/10.1128/JCM.00792-09>
99. Organización Mundial de la Salud. (2016). Plan de acción mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos. Organización Mundial de la Salud. <https://iris.who.int/handle/10665/255204>
100. Paniagua-Contreras ,G.L., Hernández-Jaimes, T., Monroy-Pérez, E., Vaca-Paniagua, F., Díaz-Velásquez, C., Uribe-García, A., Vaca. S. (2017). Comprehensive expression analysis of pathogenicity genes in uropathogenic *Escherichia coli* strains *Microbial Pathogenesis*, 103,1-7. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.12.008>.
101. Paniagua-Contreras, G. L., Monroy-Pérez, E., Solís, R. R., Cerón, A. B., García Cortés, L. R., Alonso, N. N., Camarillo, D. H., Arreygue, L. S., Domínguez-Trejo, P., Velásquez, C. D., Vaca-Paniagua, F., Uribe-García, A., & Vaca, S. (2019). O-serogroups of multi-drug resistant cervicovaginal *Escherichia coli* harboring a battery of virulence genes. *Journal of Infection and Chemotherapy: official journal of the Japan Society of Chemotherapy*, 25(7), 494–497. <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2019.02.004>
102. QIAGEN. (2020). RNAprotect Bacteria Reagent Handbook
103. Ramírez-Castillo, F. Y., Moreno-Flores, A. C., Avelar-González, F. J., Márquez-Díaz, F., Harel, J., & Guerrero-Barrera, A. L. (2018). An evaluation of multidrug-

- resistant *Escherichia coli* isolates in urinary tract infections from Aguascalientes, Mexico: cross-sectional study. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 17(1), 34. <https://doi.org/10.1186/s12941-018-0286-5>
104. Reigstad, C. S., Hultgren, S. J., & Gordon, J. I. (2007). Functional genomic studies of uropathogenic *Escherichia coli* and host urothelial cells when intracellular bacterial communities are assembled. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(29), 21259–21267. <https://doi.org/10.1074/jbc.M611502200>
105. Rijavec, M., Müller-Premru, M., Zakotnik, B., & Žgur-Bertok, D. (2008). Virulence factors and biofilm production among *Escherichia coli* strains causing bacteraemia of urinary tract origin. *Journal of Medical Microbiology*, 57(Pt 11), 1329–1334. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.2008/002543-0>
106. Rosen, D. A., Hooton, T. M., Stamm, W. E., Humphrey, P. A., & Hultgren, S. J. (2007). Detection of intracellular bacterial communities in human urinary tract infection. *PLoS medicine*, 4(12), e329. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0040329>
107. Ruiz-Perez, F., Wahid, R., Faherty, C. S., Kolappaswamy, K., Rodriguez, L., Santiago, A., Murphy, E., Cross, A., Sztein, M. B., & Nataro, J. P. (2011). Serine protease autotransporters from *Shigella flexneri* and pathogenic *Escherichia coli* target a broad range of leukocyte glycoproteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(31), 12881–12886. <https://doi.org/10.1073/pnas.1101006108>
108. Russo, T. A., & Johnson, J. R. (2000). Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *The Journal of Infectious Diseases*, 181(5), 1753–1754. <https://doi.org/10.1086/315418>
109. Russo, T. A., Carlino, U. B., & Johnson, J. R. (2001). Identification of a new iron-regulated virulence gene, *ireA*, in an extraintestinal pathogenic isolate of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 69(10), 6209–6216. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.10.6209-6216.2001>
110. Salvador, E., Wagenlehner, F., Köhler, C. D., Mellmann, A., Hacker, J., Svanborg, C., & Dobrindt, U. (2012). Comparison of asymptomatic bacteriuria *Escherichia coli* isolates from healthy individuals versus those from hospital patients shows that long-term

- bladder colonization selects for attenuated virulence phenotypes. *Infection and Immunity*, 80(2), 668–678. <https://doi.org/10.1128/IAI.06191-11>
111. Sánchez, Liliana, Ríos, Rodrigo, & Máttar, Salim. (2008). Detección de beta-lactamasas de espectro extendido en *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* aislados en una clínica de Villavicencio, *Asociación Colombiana de Infectología*, 12(3), 193-200. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-93922008000300004&lng=en&tlng=es.
112. Savarino, S. J., Fox, P., Deng, Y., & Nataro, J. P. (1994). Identification and characterization of a gene cluster mediating enteroaggregative *Escherichia coli* aggregative adherence fimbria I biogenesis. *Journal of Bacteriology*, 176(16), 4949–4957. <https://doi.org/10.1128/jb.176.16.4949-4957.1994>
113. Schaller, M., Bein, M., Korting, H. C., Baur, S., Hamm, G., Monod, M., Beinhauer, S., Hube, B. (2003). The secreted aspartyl proteinases Sap1 and Sap2 cause tissue damage in an *in vitro* model of vaginal candidiasis based on reconstituted human vaginal epithelium. *Infection and Immunity*, 71(6):3227-34. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.6.3227-3234.2003>.
114. Schubert, S., Rakin, A., & Heesemann, J. (2004). The Yersinia high-pathogenicity island (HPI): evolutionary and functional aspects. *International Journal of Medical Microbiology: IJMM*, 294(2-3), 83–94. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2004.06.026>
115. Sheikh, J., Czczulin, J. R., Harrington, S., Hicks, S., Henderson, I. R., Le Bouguéneq, C., Gounon, P., Phillips, A., & Nataro, J. P. (2002). A novel dispersin protein in enteroaggregative *Escherichia coli*. *The Journal of Clinical Investigation*, 110(9), 1329–1337. <https://doi.org/10.1172/JCI16172>
116. Spaulding, C. N., Klein, R. D., Ruer, S., Kau, A. L., Schreiber, H. L., Cusumano, Z. T., Dodson, K. W., Pinkner, J. S., Fremont, D. H., Janetka, J. W., Remaut, H., Gordon, J. I., & Hultgren, S. J. (2017). Selective depletion of uropathogenic *E. coli* from the gut by a FimH antagonist. *Nature*, 546(7659), 528–532. <https://doi.org/10.1038/nature22972>
117. Stapleton, A. E., Stroud, M. R., Hakomori, S. I., & Stamm, W. E. (1998). The globoseries glycosphingolipid sialosyl galactosyl globoside is found in urinary tract tissues and is a preferred binding receptor *In vitro* for uropathogenic *Escherichia coli*

- expressing pap-encoded adhesins. *Infection and Immunity*, 66(8), 3856–3861. <https://doi.org/10.1128/IAI.66.8.3856-3861.1998>
118. Stumpe, S., Schmid, R., Stephens, D. L., Georgiou, G., & Bakker, E. P. (1998). Identification of OmpT as the protease that hydrolyzes the antimicrobial peptide protamine before it enters growing cells of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 180(15), 4002–4006. <https://doi.org/10.1128/JB.180.15.4002-4006.1998>
119. Suárez, C., & Gudiol, F. (2009). Beta-lactam antibiotics. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(2), 116–129. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.12.001>
120. Subashchandrabose, S., & Mobley, H. L. T. (2015). Virulence and Fitness Determinants of Uropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology Spectrum*, 3(4), 10.1128/microbiolspec.UTI-0015-2012. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.UTI-0015-2012>
121. Tatsuno, I., Kimura, H., Okutani, A., Kanamaru, K., Abe, H., Nagai, S., Makino, K., Shinagawa, H., Yoshida, M., Sato, K., Nakamoto, J., Tobe, T., & Sasakawa, C. (2000). Isolation and characterization of mini-Tn5Km2 insertion mutants of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 deficient in adherence to Caco-2 cells. *Infection and Immunity*, 68(10), 5943–5952. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.10.5943-5952.2000>
122. Torres, A. G., Slater, T. M., Patel, S. D., Popov, V. L., & Arenas-Hernández, M. M. (2008). Contribution of the Ler- and H-NS-regulated long polar fimbriae of *Escherichia coli* O157:H7 during binding to tissue-cultured cells. *Infection and Immunity*, 76(11), 5062–5071. <https://doi.org/10.1128/IAI.00654-08>
123. Trifillis, A. L., Donnenberg, M. S., Cui, X., Russell, R. G., Utsalo, S. J., Mobley, H. L., & Warren, J. W. (1994). Binding to and killing of human renal epithelial cells by hemolytic P-fimbriated *E. coli*. *Kidney International*, 46(4), 1083–1091. <https://doi.org/10.1038/ki.1994.370>
124. Uhlén, P., Laestadius, A., Jahnukainen, T., Söderblom, T., Bäckhed, F., Celsi, G., Brismar, H., Normark, S., Aperia, A., & Richter-Dahlfors, A. (2000). Alpha-haemolysin of uropathogenic *E. coli* induces Ca²⁺ oscillations in renal epithelial cells. *Nature*, 405(6787), 694–697. <https://doi.org/10.1038/35015091>
125. Vidal, J. E., Canizález-Román, A., Gutiérrez-Jiménez, J., & Navarro-García, F. (2007). Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de *Escherichia coli*

- enteropatógena [Molecular pathogenesis, epidemiology and diagnosis of enteropathogenic *Escherichia coli*]. *Salud Publica de Mexico*, 49(5), 376–386. <https://doi.org/10.1590/s0036-36342007000500008>
126. Wayne, P.A. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. In CLSI, Twenty-Third Informational Supplement M100-S23; Carpenter, D.E., Ed.; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA, 2013; p. 74.
127. World Health Organization. (2014). *Antimicrobial resistance: Global Report on Surveillance. European Infectious Disease* (Vol. 5). <https://doi.org/10.4037/nci.0000000000000102>
128. Wurpel, D. J., Beatson, S. A., Totsika, M., Petty, N. K., & Schembri, M. A. (2013). Chaperone-usher fimbriae of *Escherichia coli*. *PloS one*, 8(1), e52835. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052835>
129. Yan, F., & Polk, D. B. (2004). Commensal bacteria in the gut: learning who our friends are. *Current Opinion in Gastroenterology*, 20(6), 565–571. <https://doi.org/10.1097/00001574-200411000-00011>
130. Yilmaz, A., Gun, H., Ugur, M., Turan, N., & Yilmaz, H. (2006). Detection and frequency of VT1, VT2 and eaeA genes in *Escherichia coli* O157 and O157:H7 strains isolated from cattle, cattle carcasses and abattoir environment in Istanbul. *International journal of Food Microbiology*, 106(2), 213–217. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.05.018>
131. Zhang, L., & Foxman, B. (2003). Molecular epidemiology of *Escherichia coli* mediated urinary tract infections. *Frontiers in Bioscience: a Journal and virtual library*, 8, e235–e244. <https://doi.org/10.2741/1007>
132. Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature reviews. Microbiology*, 2(2), 123–140. <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>

9 ANEXO

Estrategia Metodológica

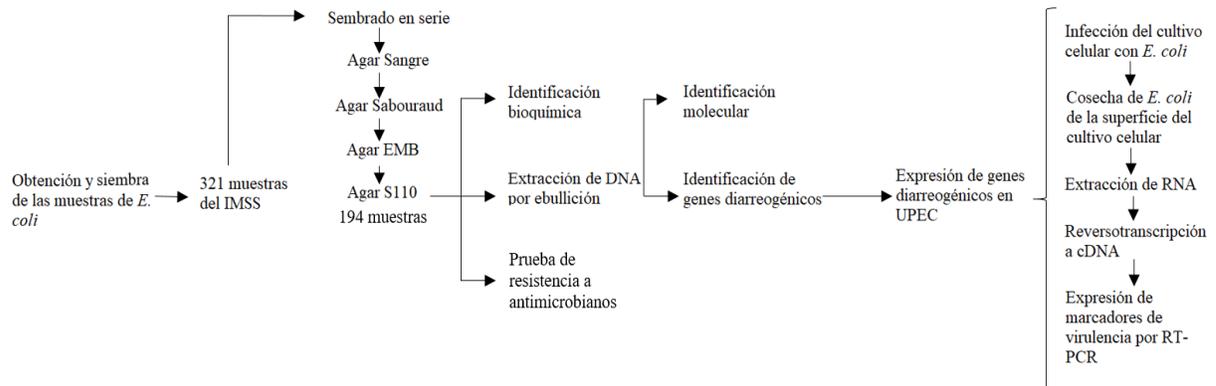


Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados para identificar los 16 genes diarregénicos en las cepas UPEC.

Gen	Oligonucleótidos 5`-3`	Condiciones de amplificación	Tamaño del amplicón (pb)
<i>pet</i>	F-GTG TTT CAA CCA GGT TCA ACA R-CCT TCA CCA ATT TTA TGC AGT	Desnaturalización inicial a 94°C 2 min; 1 min 94°C, 1 min 52°C, 90 s 72°C (30 ciclos); extensión final 72°C 7 min.	1037
<i>aggA</i>	F-GCG TTA GAA AGA CCT CCA ATA R-GCC GGA TCC TTA AAA ATT AAT TCC GGC	Desnaturalización inicial a 94°C 2 min; 1 min 94°C, 1 min 55°C, 1 min 72°C (30 ciclos); extensión final 72°C 7 min.	432-450
<i>aggC</i>	F-TAT TAA ACC ATG GTA GCG R-GCC AAG ATC CGA GAT TGA	Desnaturalización inicial a 94°C 2 min; 1 min 94°C, 1 min 45°C, 1 min 72°C (30 ciclos); extensión final 72°C 7 min.	538
<i>shf</i>	F-ACT TTC TCC CGA GAC ATT C R-CTT TAG CGG GAG CAT TCA T	Desnaturalización inicial a 94°C 2 min; 1 min 94°C, 1 min 51°C, 1 min 72°C (30 ciclos); extensión final 72°C 5 min.	613
<i>aggR</i>	F-CTA ATT GTA CAA TCG ATG TA R-ATG AGG TAA TTC TTG AAT	Desnaturalización inicial 94°C 2 min; 94°C 1 min, 40°C 1 min, 72°C 1 min (30 ciclos); extensión final 72° 7 min.	308
<i>pilS</i>	F-ATG AGC GTC ATA ACC TGT TC R-CTG TTG GTT TCC AGT TTG AT	Desnaturalización inicial 94°C 30 s; 94°C 30 s, 55°C 30 s, 68°C 1 min (30 ciclos); extensión final 72°C 5 min.	400
<i>toxB</i>	F-TAA AGC AGA AAA ATG CGA CAG AAG AT R-TAG TAA GTA GAG TAG AAC TGG GGG ATG	Desnaturalización inicial a 94°C 2 min, 94°C 1 min, 60°C 50 s, 72°C 1 min (30 ciclos); extensión final 72°C 5 min.	250
<i>ipfA</i>	F-ATG AAG CGT AAT ATT ATA G R-TTA TTT CTT ATA TTC GAC	Desnaturalización inicial a 94°C 2 min; 94°C 1 min, 52°C 50 s, 72°C 1 min (30 ciclos); extensión final 5 min 72°C.	573
<i>aatA</i>	F-CTG GCG AAA GAC TGT ATC AT R-CAA TGT ATA GAA ATC CGC TGT T	Desnaturalización inicial a 95°C 5 min; 95°C 45 s, 57°C 35 s, 72°C 45 s (40 ciclos); extensión final 72°C 5 min.	629
<i>stbA</i>	F-CAA ACC TGG CTA TTG CT R-ATC CAC TAT TAC ATC ATC GAA C		200
<i>aap</i>	F-CTT TTC TGG CAT CTT GGG T R-GTA ACA ACC CCT TTG GAA GT	Desnaturalización inicial 95° 5 min; 95° 1 min; 52° 1min; 72° 1 min (40 ciclos); extensión final 72°C 8 min.	232
<i>vt1</i>	R-5' GAA GAG TCC GTG GGA TTA CG R-5' AGC GAT GCA GCT ATT AAT AA	Desnaturalización inicial a 96°C 4 min; 94°C 20 s, 55°C 20 s, 70°C 10	130
<i>bfpA</i>	R-5' TTC TTG GTG CTT GCG TGT CTT TT		367

	R-5' TTT TGT TTG TTG TAT CTT TGT AA	s (30 ciclos); extensión final a 72°C 7 min.	
<i>eaeA</i>	R-5' CAC ACG AAT AAA CTG ACT AAA ATG R-5' AAA AAC GCT GAC CCG CAC CTA AAT	Desnaturalización inicial a 96°C 4 min; 94°C 20 s, 55°C 20 s, 70°C 10 s (30 ciclos); extensión final a 72°C 7 min.	376
<i>agg3C</i>	R-5' ATA CTT TAG ATA CCC CTC ACG CAG F-5' GTT TGG AAC CGG GAA TTA ACA TTG	Desnaturalización inicial a 94°C 2 min; 94°C 30 s, 58°C 30 s, 72°C 3 min (30 ciclos); extensión final 72°C 7 min.	485
<i>aafC</i>	R-5' ATG AGC TCT GCA GAC TGA TAA TGC TC F-5' ATG GTA CCC GTT ATA GCT CGC ACA TAT TC	Desnaturalización inicial a 94°C 1 min; 94°C 1 min, 45°C 2 min, 72°C 2 min (35 ciclos); 94°C 1 min, 45°C 2 min; extensión final 72°C 10 min.	1144

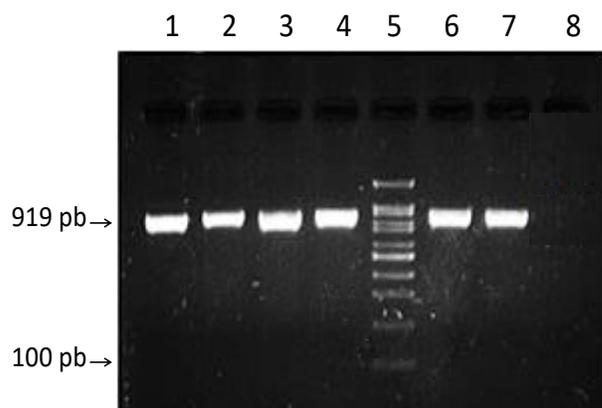


Figura 10. Identificación de *E. coli* mediante amplificación por PCR del gen 16S rRNA (919 pb). Carril 1, control positivo (*E. coli* ATCC 11775); carriles 2-4 y 6-7, gen 16S rRNA en cepas de *E. coli*; carril 5, marcador de peso molecular (100 pb); carril 8, control negativo (sin DNA molde).

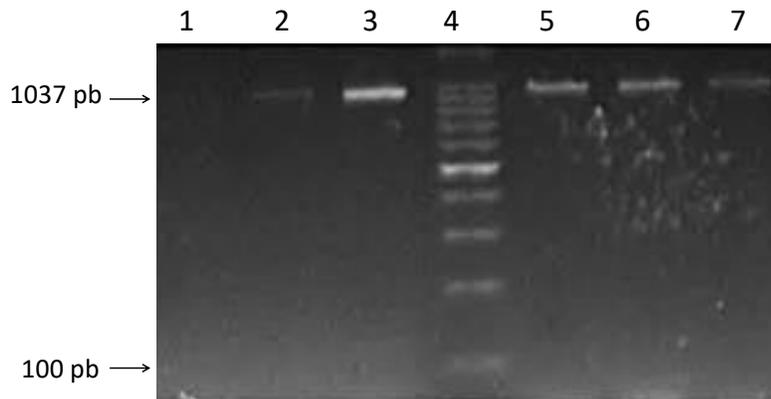


Figura 11. Identificación por PCR del gen *pet* (1037 pb) del patotipo EAEC en cepas uropatógenas de *E. coli* (UPEC). Carril 1, control negativo (sin DNA molde); carriles 2-3 y 5-6, cepas positivas; carril 4, marcador de peso molecular (100 pb); carril 7, control positivo (cepa de *E. coli* portadora de *pet*).

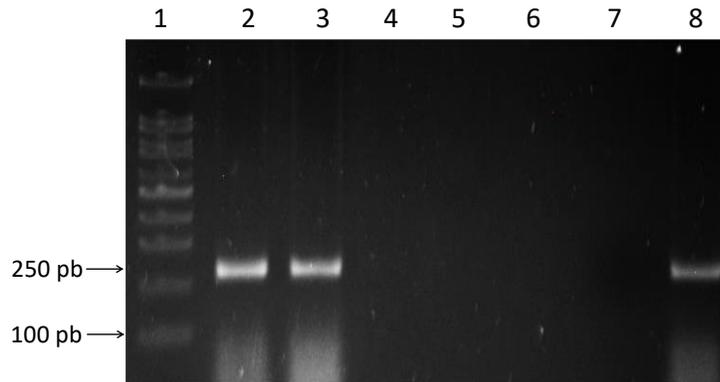


Figura 12. Identificación por PCR del gen *toxB* (200 pb) del patotipo EHEC en cepas uropatógenas de *E. coli* (UPEC). Carril 1, marcador de peso molecular (100 pb); carriles 1 y 2, cepas positivas; carril 4, control negativo (sin DNA molde); carriles 5-7 cepas negativas, carril 8, control positivo (cepa de *E. coli* portadora de *toxB*).

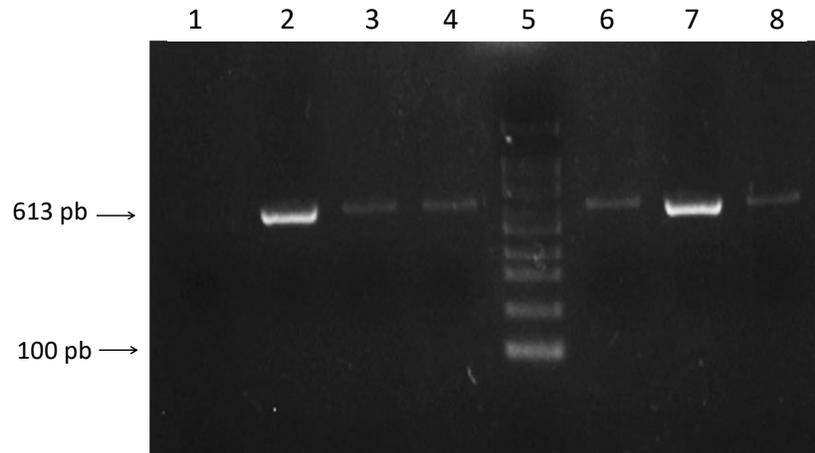


Figura 13. Identificación por PCR del gen *shf* (613 pb) del patotipo EAEC en cepas uropatógenas de *E. coli* (UPEC). Carril 1, control negativo (sin DNA molde); carril 2, control positivo (cepa de *E. coli* portadora de *shf*); carriles 3 y 4, y 6-8 cepas positivas; Carril 5, marcador de peso molecular (100 pb).

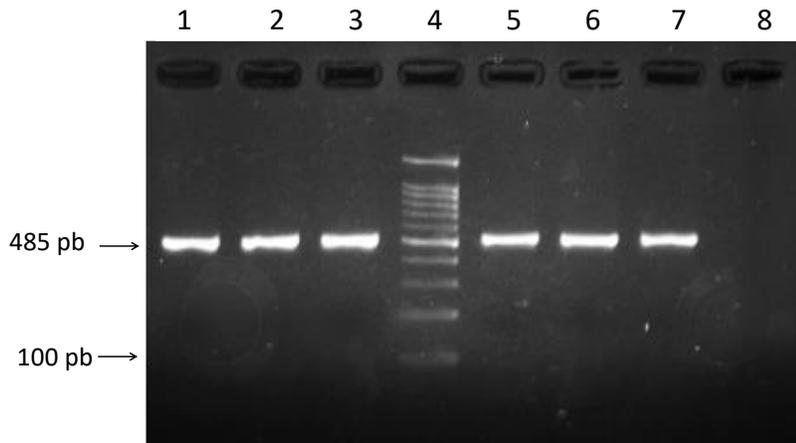


Figura 14. Identificación por PCR del gen *agg3C* (485 pb) del patotipo EAEC en cepas uropatógenas de *E. coli* (UPEC). Carriles 1-3 y 5-6 cepas positivas; carril 4, marcador de peso molecular (100 pb); carril 7, control positivo (cepa de *E. coli* portadora de *agg3C*); carril 8, control negativo (sin DNA molde).

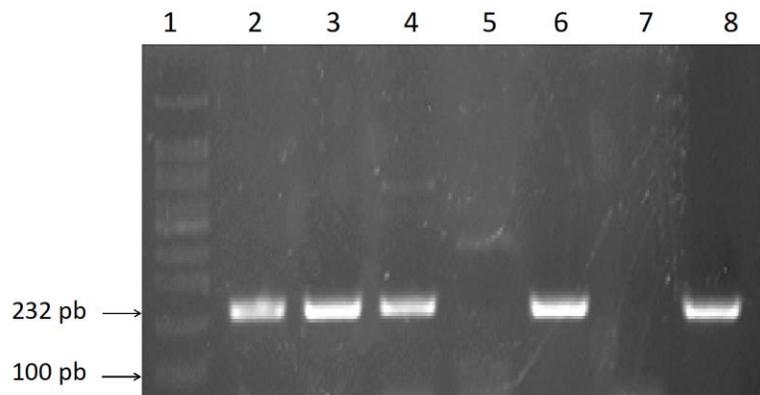


Figura 15. Identificación por PCR del gen *aap* (232 pb) del patotipo EAEC en cepas uropatógenas de *E. coli* (UPEC). Carril 1, marcador de peso molecular (100 pb); carriles 2-4 y 6, cepas positivas; carril 7, control negativo (sin DNA molde); carril 8, control positivo (cepa de *E. coli* portadora de *aap*).

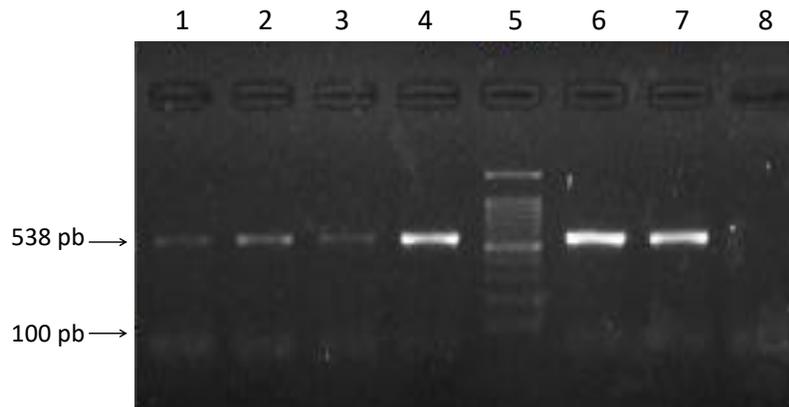


Figura 16. Identificación por PCR del gen *aggC* (538pb) del patotipo EAEC en cepas uropatógenas de *E. coli* (UPEC). Carriles 1-4, y 6 cepas positivas; carril 5, marcador de peso molecular (100 pb); carril 7, control positivo (cepa de *E. coli* portadora de *aggC*); carril 8, control negativo (sin DNA molde).

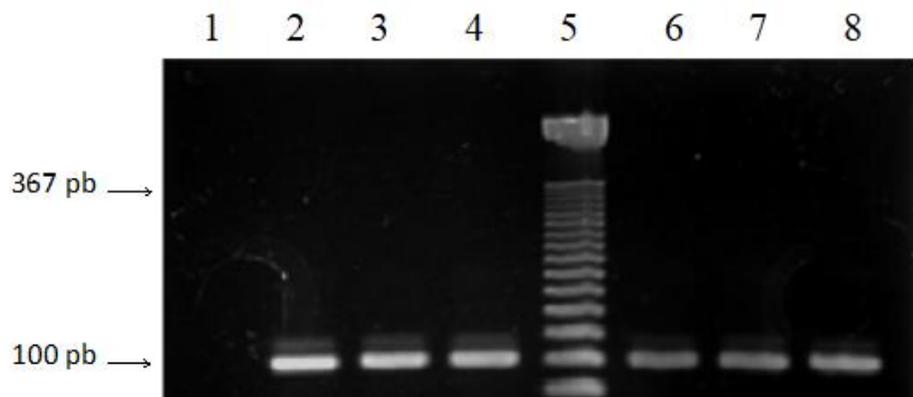


Figura 17. Identificación del gen *bfpA* (367 pb) del patotipo EAEC en cepas uropatógenas de *E. coli* (UPEC). Carril 1, control negativo (sin DNA molde); carriles 2-3 y 5-7, cepas positivas; carril 4, marcador de peso molecular (100 pb); carril 8, control positivo (cepa de *E. coli* portadora de *bfpA*).

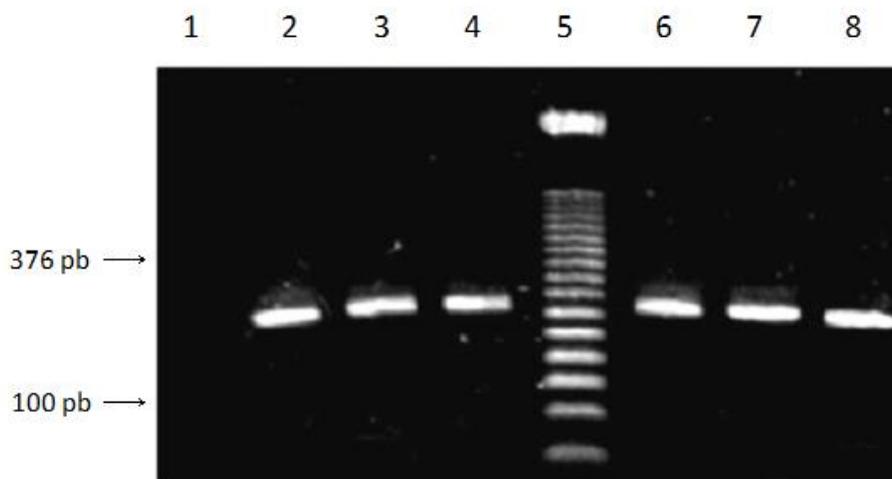


Figura 18. Identificación por PCR del gen *eaeA* (376 pb) del patotipo EAEC en cepas uropatógenas de *E. coli* (UPEC). Carril 1, control negativo (sin DNA molde); carriles 2-3, y 5-7, cepas positivas; carril 4, marcador de peso molecular (100 pb); carril 8, control negativo (sin DNA molde).

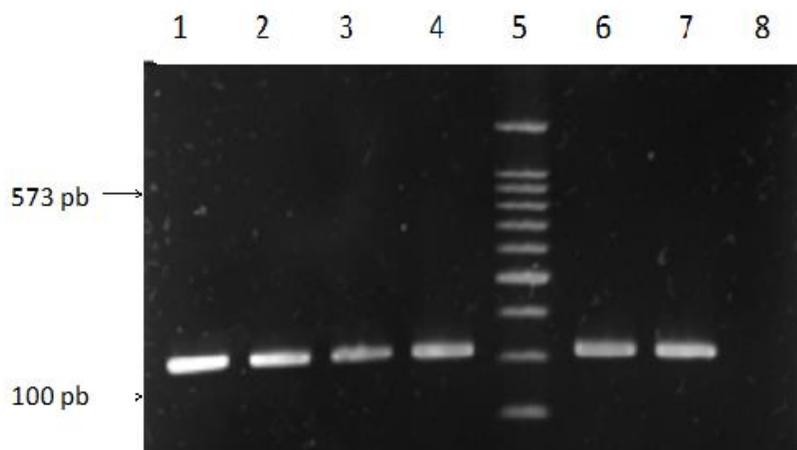


Figura 19. Identificación por PCR del gen *lpfA* (573 pb) del patotipo EAEC en cepas uropatógenas de *E. coli* (UPEC). carriles 1-2 y 6-8 cepas positivas; carril 3, control negativo (sin DNA molde); carril 4, control positivo (cepa de *E. coli* portadora de *lpfA*); carril 5, marcador de peso molecular (100 pb).

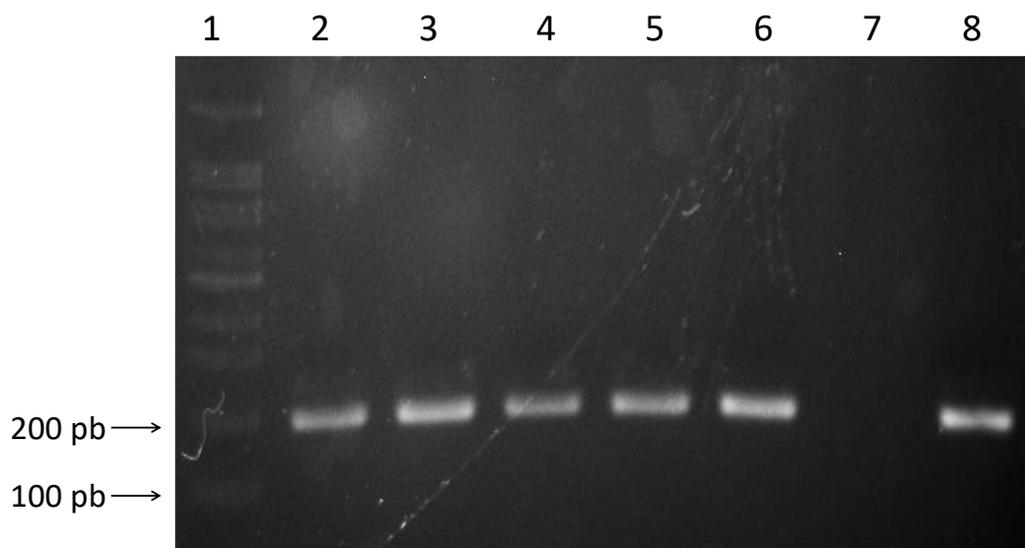


Figura 20. Identificación por PCR del gen *stbA* (200 pb) del patotipo EAEC en cepas uropatógenas de *E. coli* (UPEC). carril 1, marcador de peso molecular (100 pb); carriles 2-6, cepas positivas; carril 7, control negativo (sin DNA molde); carril 8, control positivo (cepa de *E. coli* portadora de *stbA*).

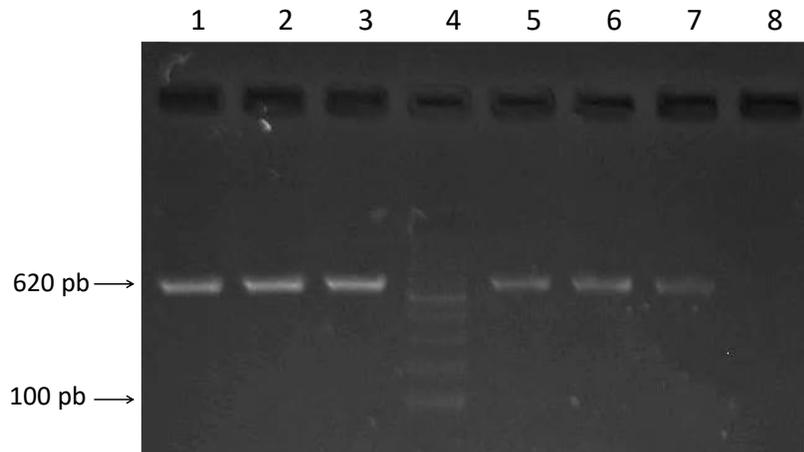


Figura 21. Identificación por PCR del gen *aatA* (620 pb) del patotipo EAEC en cepas uropatógenas de *E. coli* (UPEC). Carriles 1-3 y 6-7, cepas positivas; carril 4, marcador de peso molecular (100 pb); carril 5, control positivo (cepa de *E. coli* portadora de *aatA*); carril 8, control negativo (sin DNA molde).

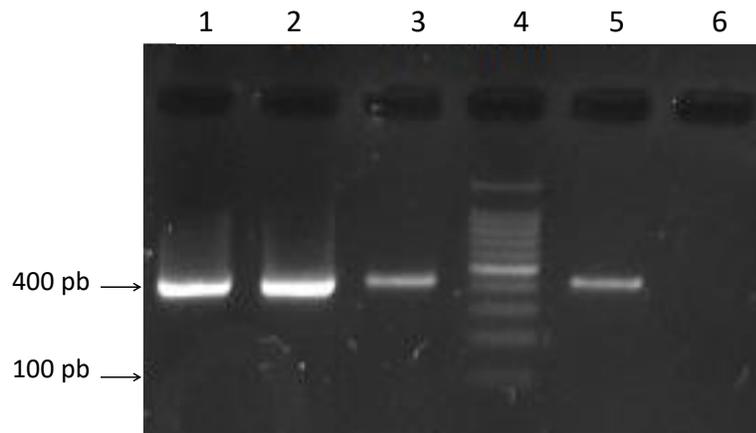


Figura 22. Identificación por PCR del gen *pilS* (400 pb) del patotipo EAEC en cepas uropatógenas de *E. coli* (UPEC); carriles 1-3, muestras positivas; carril 4, marcador de peso molecular (100 pb); carril 5, control positivo (cepa de *E. coli* portadora de *pilS*); carril 6, control negativo (sin DNA molde).

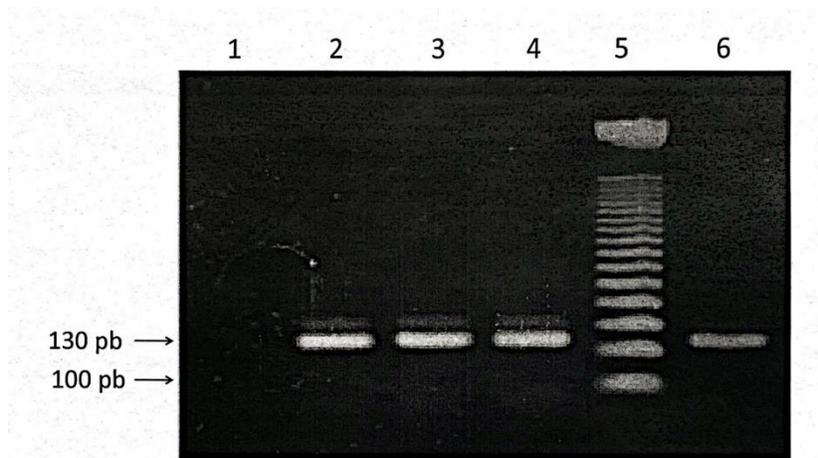


Figura 23. Identificación por PCR del gen *vtI* (130 pb) del patotipo VTEC en cepas uropatógenas de *E. coli* (UPEC); carril 1, control negativo (sin DNA molde); carriles 2-4, cepas positivas; carril 5, marcador de peso molecular (100 pb); carril 6, control positivo (cepa de *E. coli* portadora de *vtI*).

Gráficas de PCR en tiempo real y curvas de fusión.

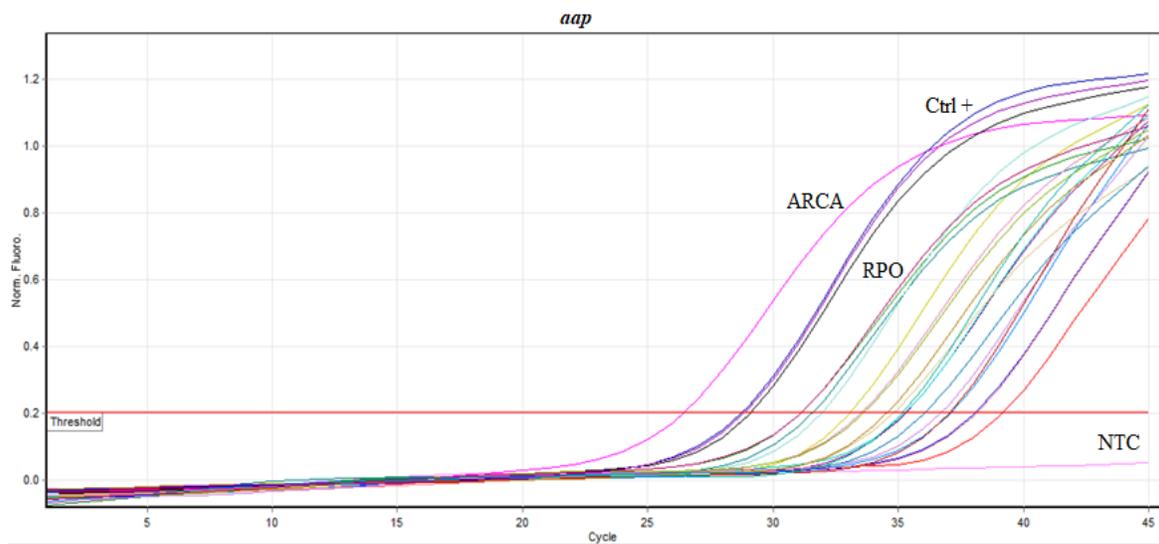


Figura 24. Transcripción del gen diarrogénico *aap* en cepas UPEC por PCR en tiempo real. *ARCA* y *RPO*: Genes constitutivos de *E. coli*. NTC: Control sin molde. Ctrl +: Control positivo, cepa de *E. coli* del cepario del laboratorio clínico.

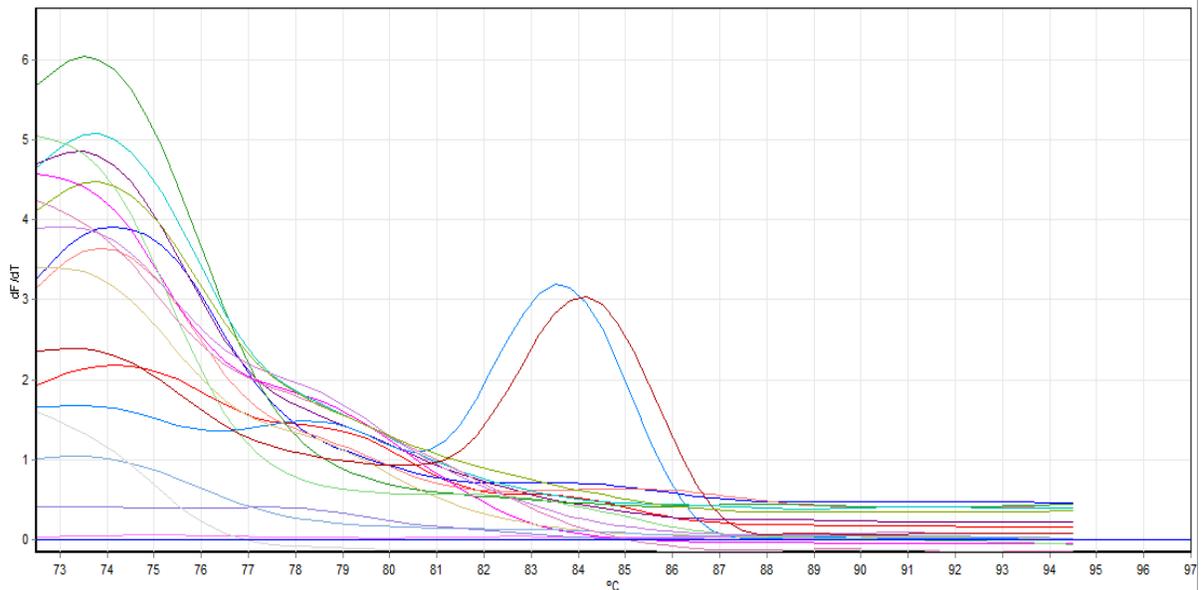


Figura 25. Curva de fusión (melting point) de la transcripción del gen *aap*.

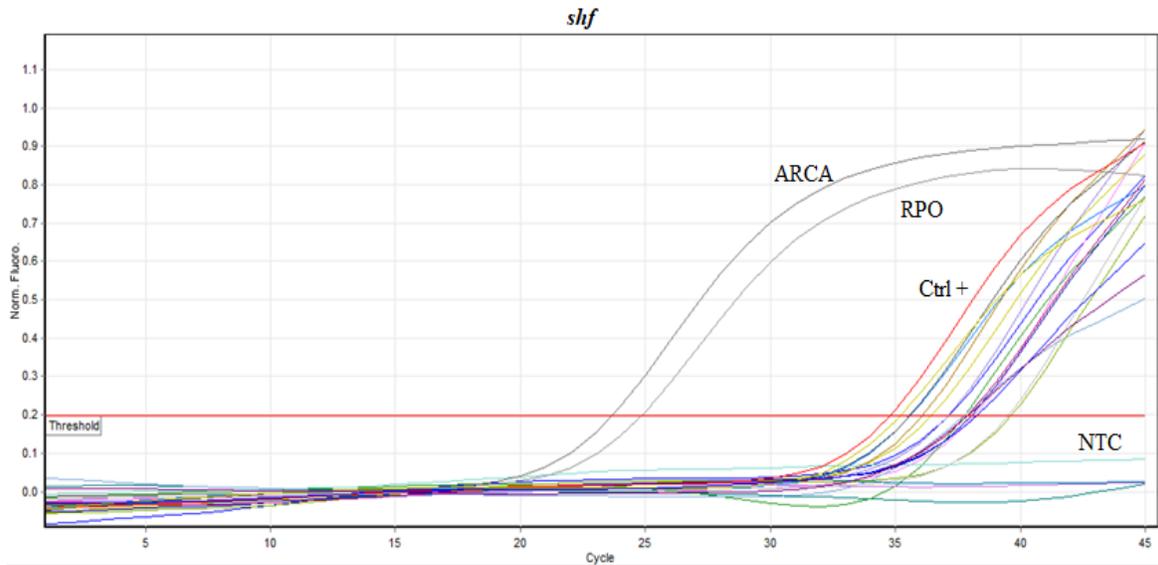


Figura 26. Transcripción del gen diarrogénico *shf* en cepas UPEC por PCR en tiempo real. *ARCA* y *RPO*: Genes constitutivos de *E. coli*. NTC: Control sin molde. Ctrl +: Control positivo, cepa de *E. coli* del cepario del laboratorio clínico.

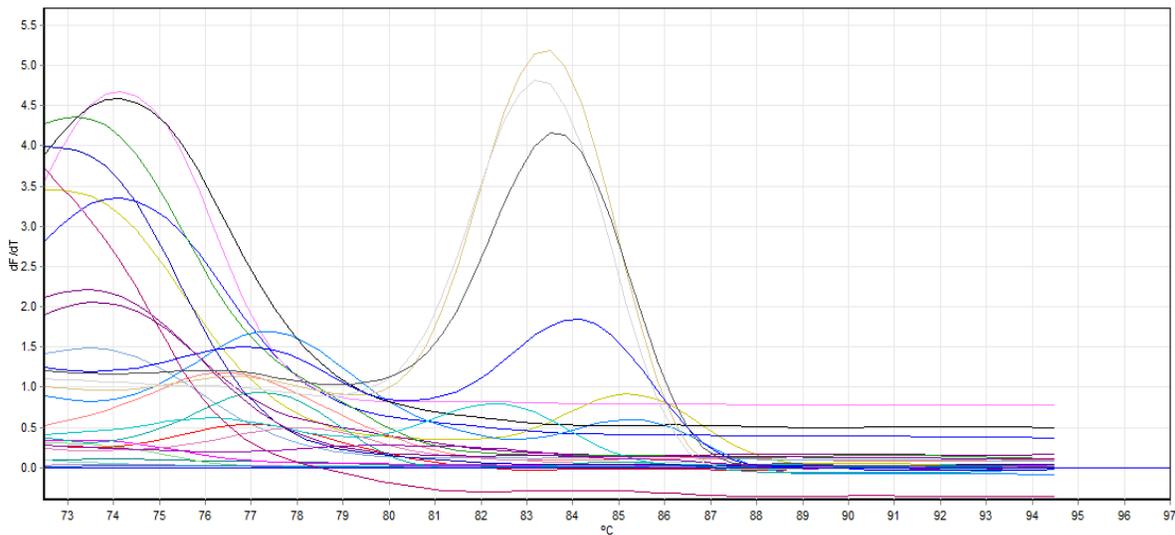


Figura 27. Curva de fusión de la transcripción (Melting point) del gen *shf*.

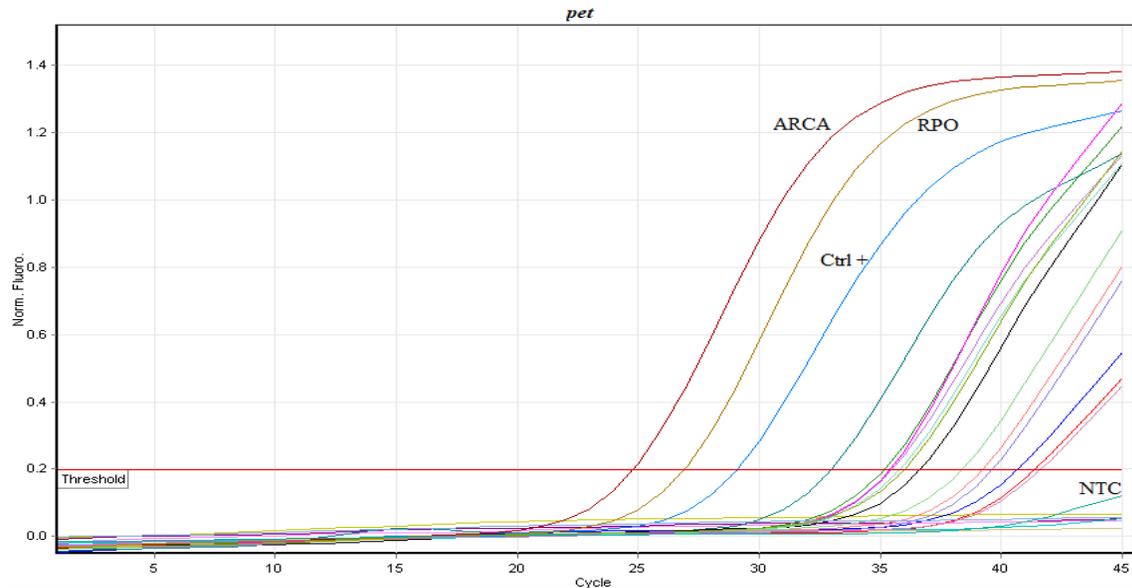


Figura 28. Transcripción del gen diarrogénico *pet* en cepas UPEC por PCR en tiempo real. *ARCA* y *RPO*: Genes constitutivos de *E. coli*. NTC: Control sin molde. Ctrl +: Control positivo, cepa de *E. coli* del cepario del laboratorio clínico.

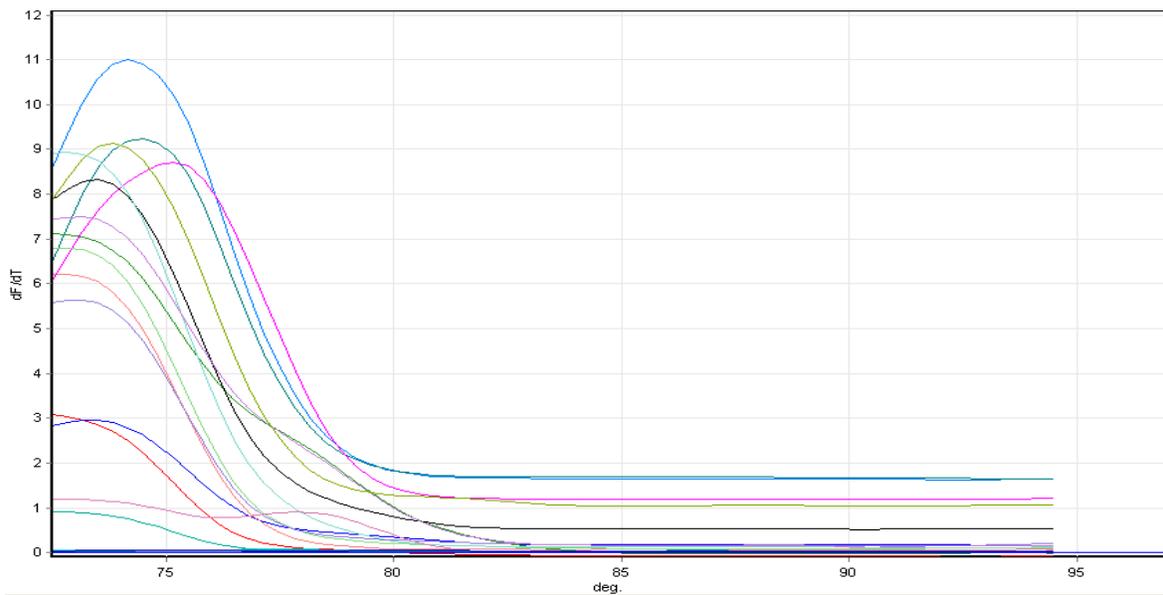


Figura 29. Curva de fusión (Melting point) de la transcripción del gen *pet*.

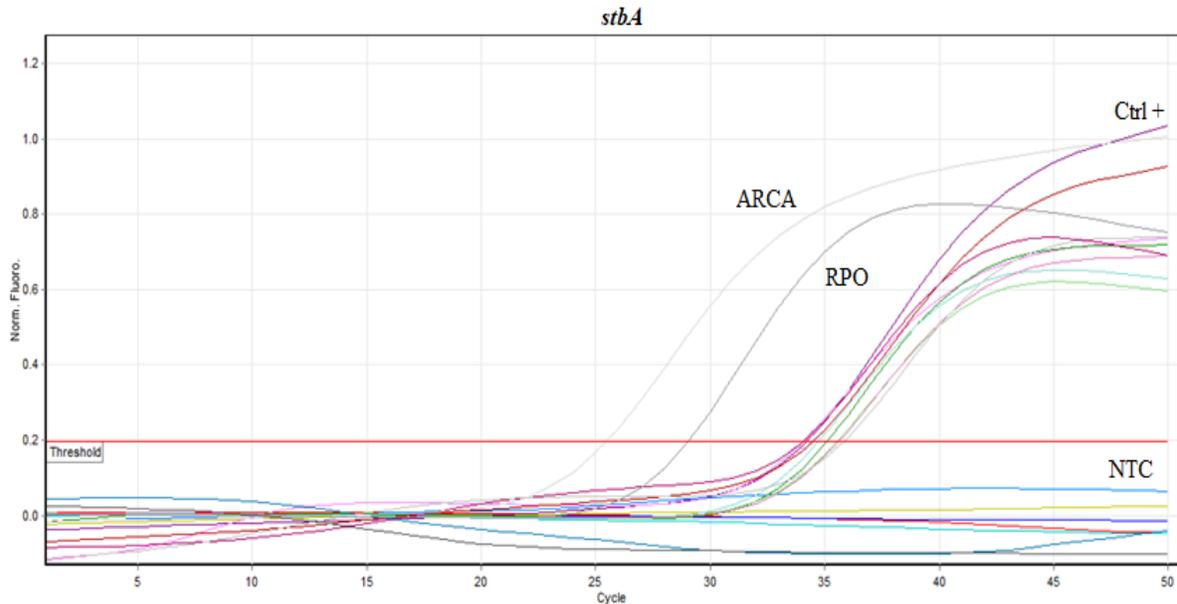


Figura 30. Transcripción del gen diarreogénico *stbA* en cepas UPEC por PCR en tiempo real. *ARCA* y *RPO*: Genes constitutivos de *E. coli*. NTC: Control sin molde. Ctrl +: Control positivo, cepa de *E. coli* del cepario del laboratorio clínico.

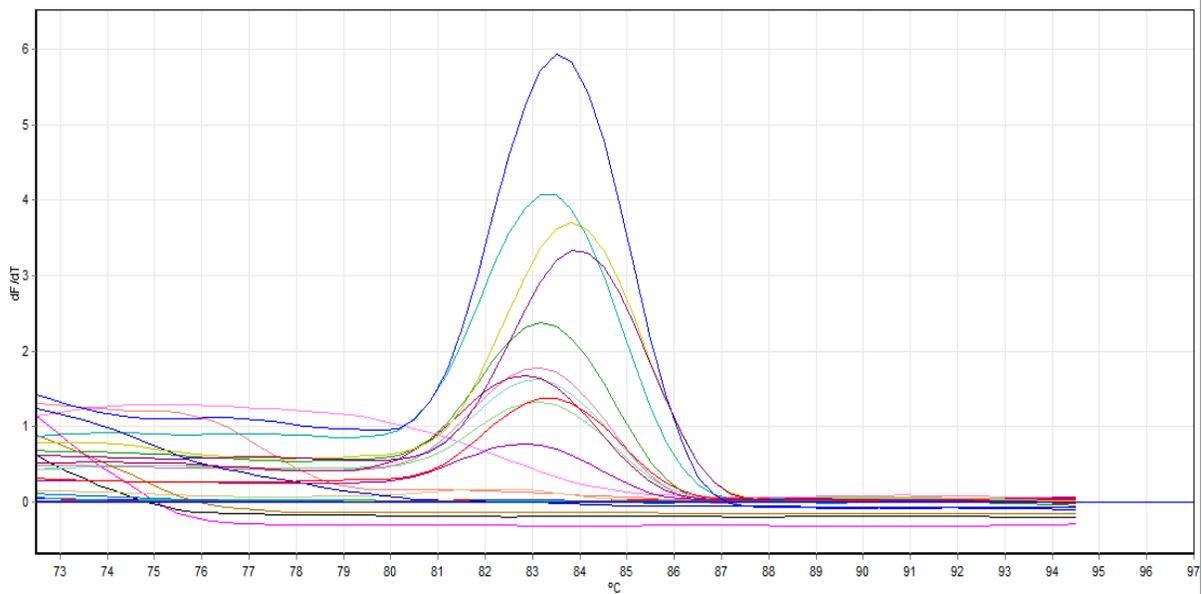


Figura 31. Curva de fusión (Melting point) de la transcripción del gen *stbA*.

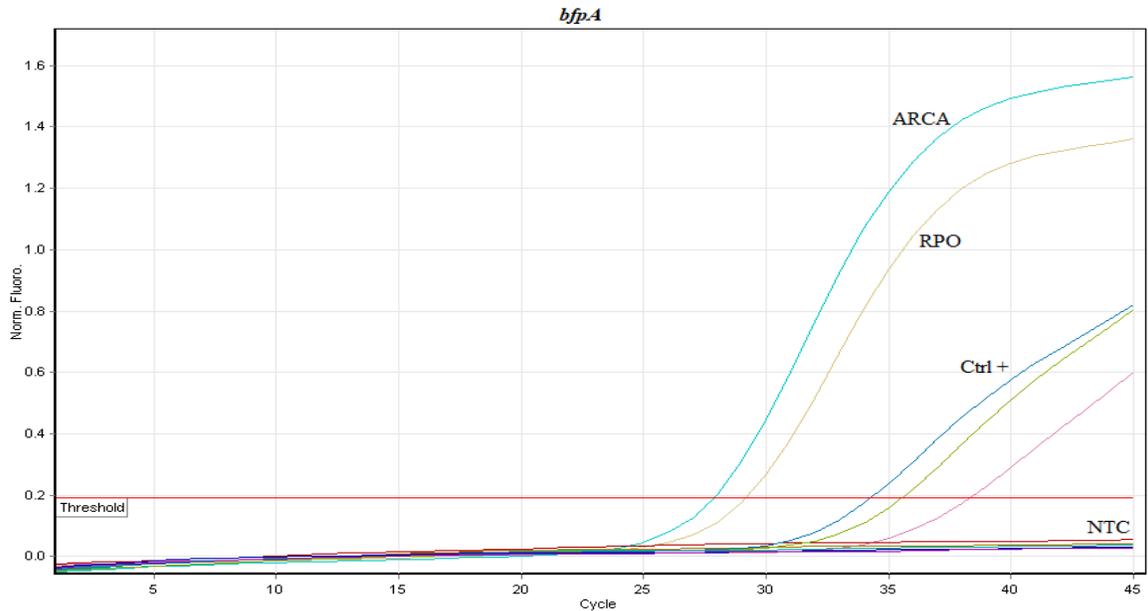


Figura 32. Transcripción del gen diarregénico *bfpA* en cepas UPEC por PCR en tiempo real. *ARCA* y *RPO*: Genes constitutivos de *E. coli*. NTC: Control sin molde. Ctrl +: Control positivo, cepa de *E. coli* del cepario del laboratorio clínico.

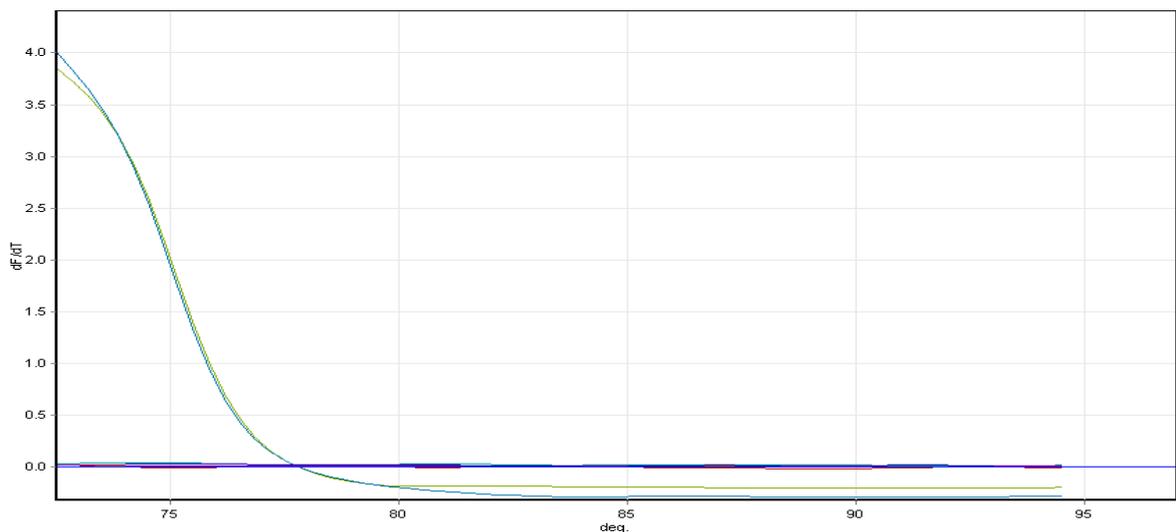


Figura 33. Curva de fusión (Melting point) de la transcripción del gen *bfpA*.

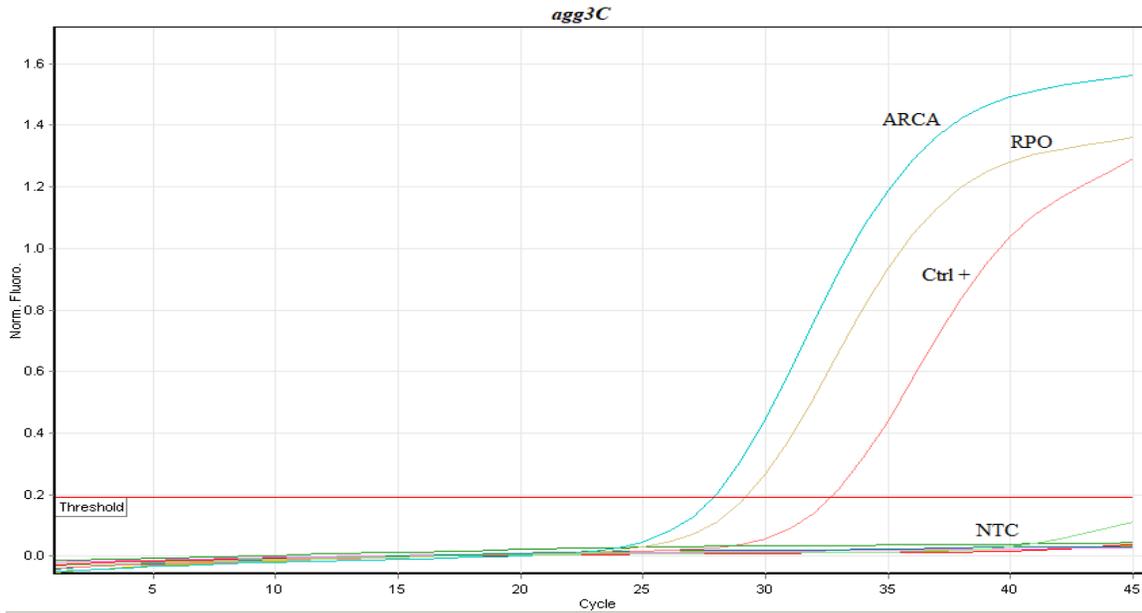


Figura 34. Transcripción del gen diarreogénico *agg3C* en cepas UPEC por PCR en tiempo real. *ARCA* y *RPO*: Genes constitutivos de *E. coli*. NTC: Control sin molde. Ctrl +: Control positivo, cepa de *E. coli* del cepario del laboratorio clínico.

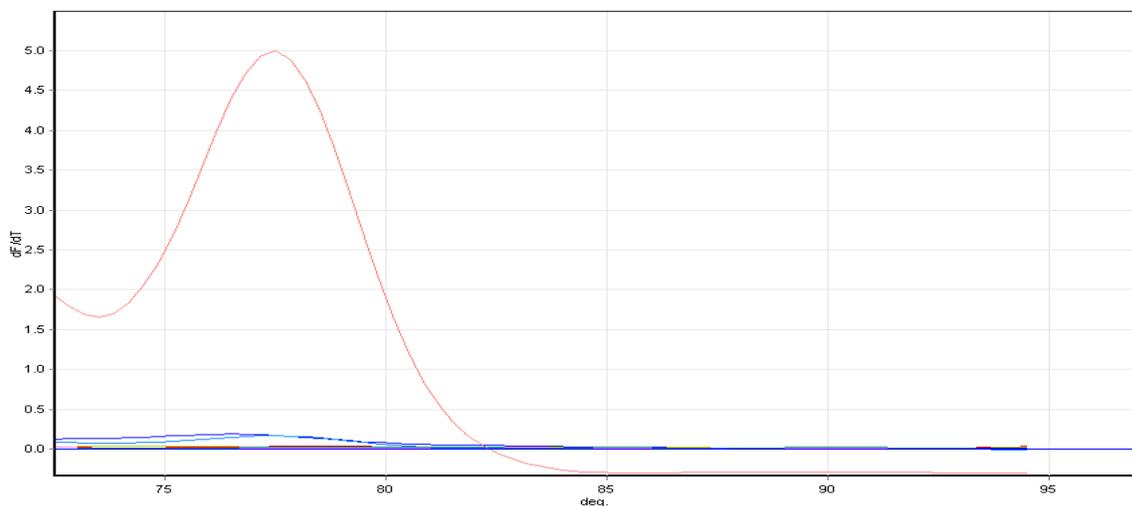


Figura 35. Curva de fusión (Melting point) de la transcripción del gen *agg3C*.

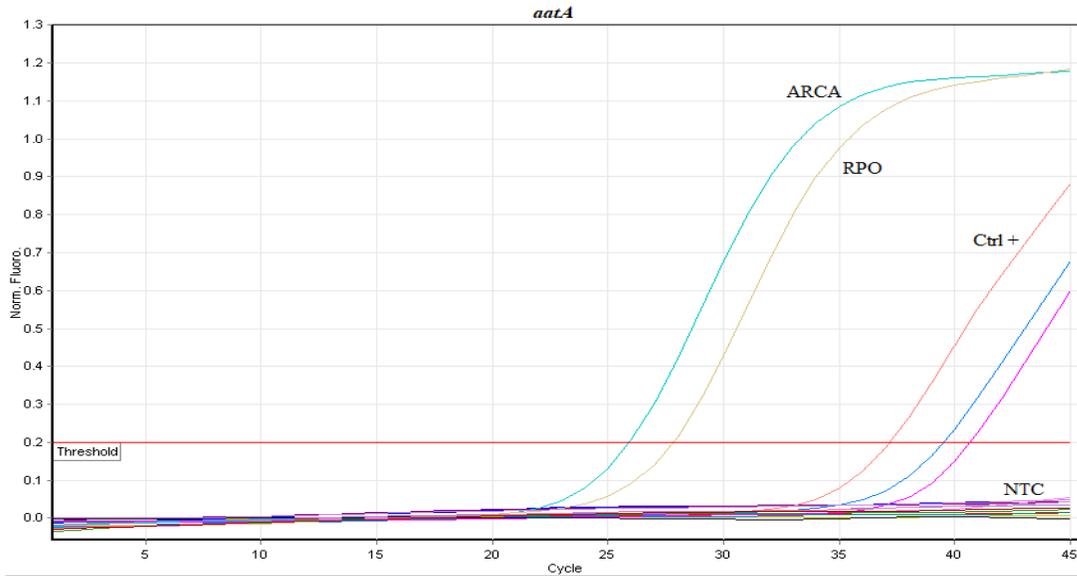


Figura 36. Transcripción del gen diarreogénico *aatA* en cepas UPEC por PCR en tiempo real. *ARCA* y *RPO*: Genes constitutivos de *E. coli*. NTC: Control sin molde. Ctrl +: Control positivo, cepa de *E. coli* del cepario del laboratorio clínico.

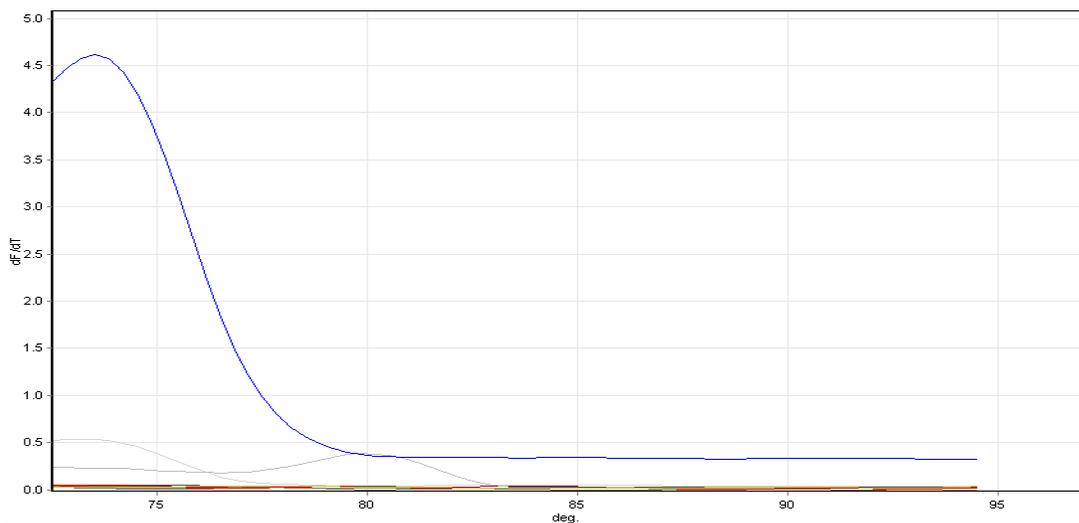


Figura 37. Curva de fusión (Melting point) de la transcripción del gen *aatA*.

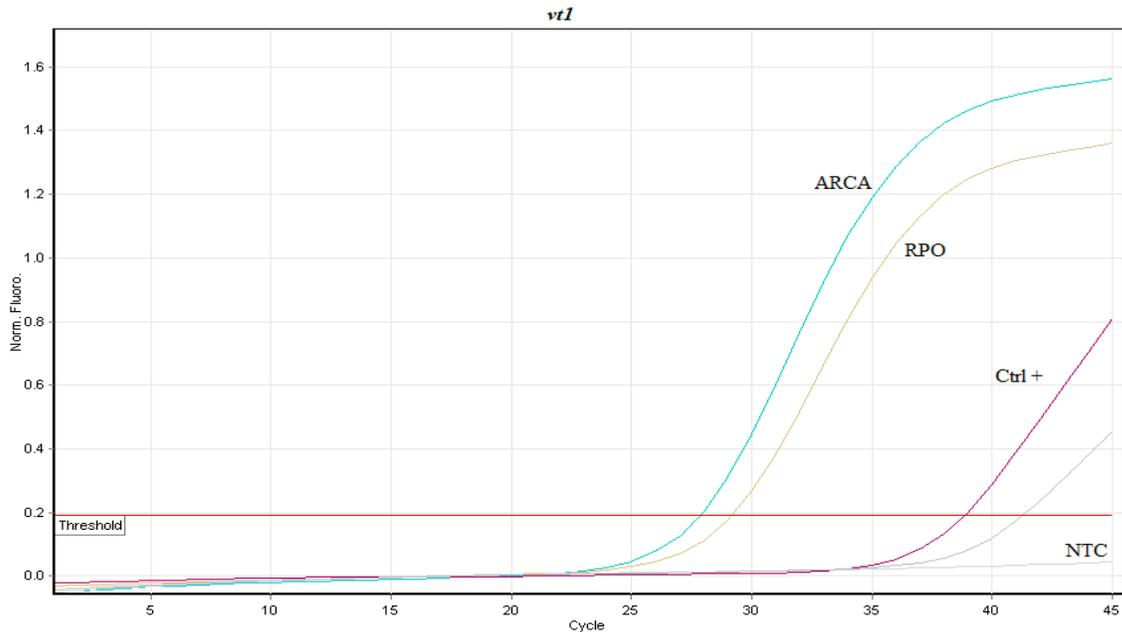


Figura 38. Transcripción del gen diarrogénico *vt1* en cepas UPEC por PCR en tiempo real. *ARCA* y *RPO*: Genes constitutivos de *E. coli*. NTC: Control sin molde. Ctrl +: Control positivo del cepario del laboratorio clínico.

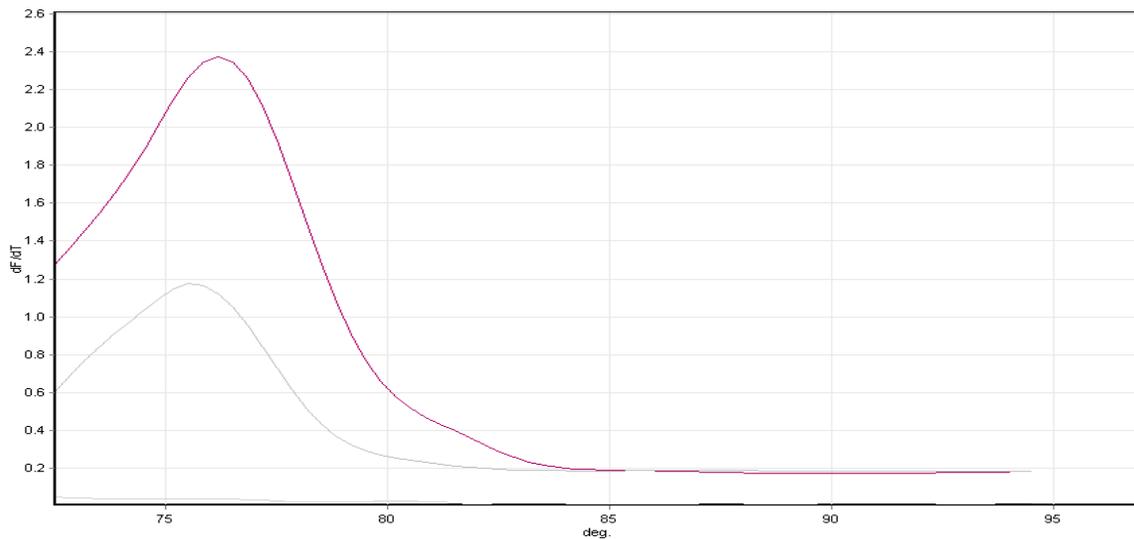


Figura 39. Curva de fusión (Melting point) de la transcripción del gen *vt1*.

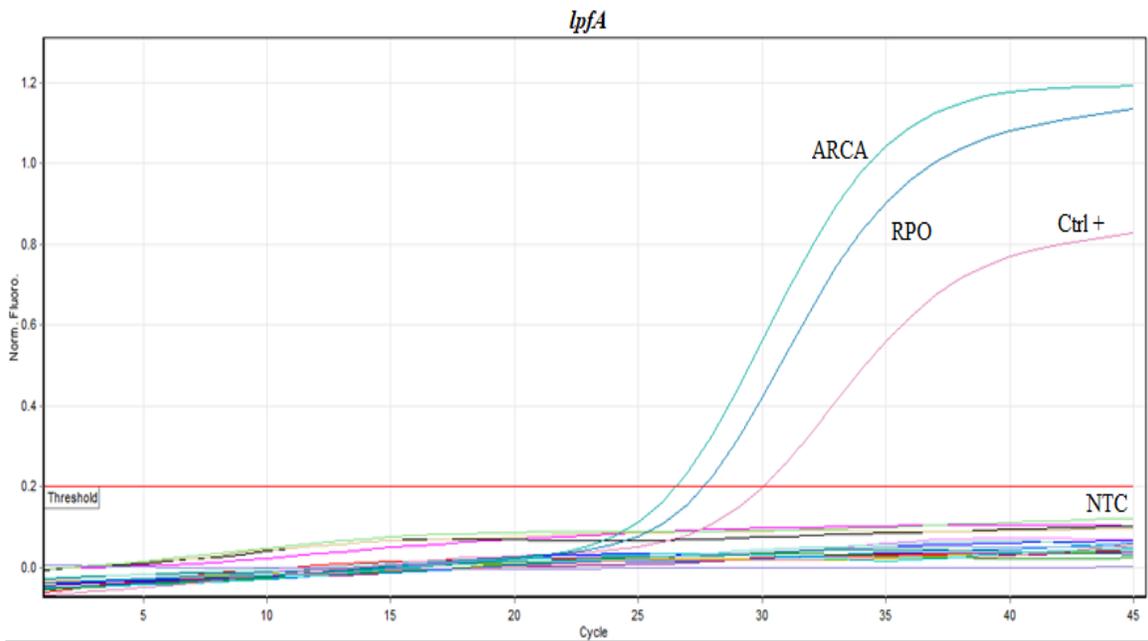


Figura 40. Transcripción del gen diarreogénico *lpfA* en cepas UPEC por PCR en tiempo real. *ARCA* y *RPO*: Genes constitutivos de *E. coli*. NTC: Control sin molde. Ctrl +: Control positivo, cepa de *E. coli* del cepario del laboratorio clínico.

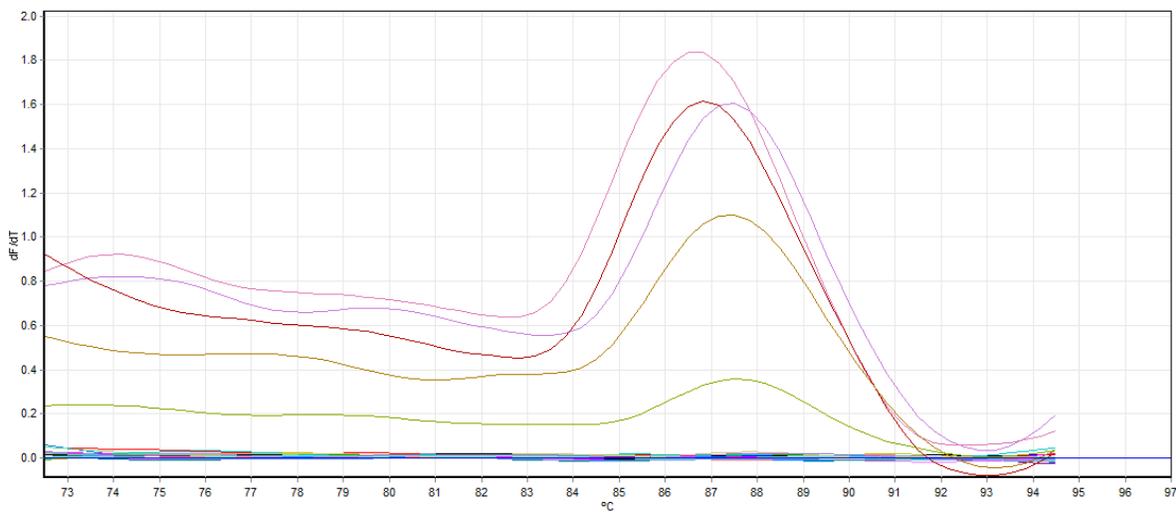


Figura 41. Curva de fusión de la transcripción del gen *lpfA*.

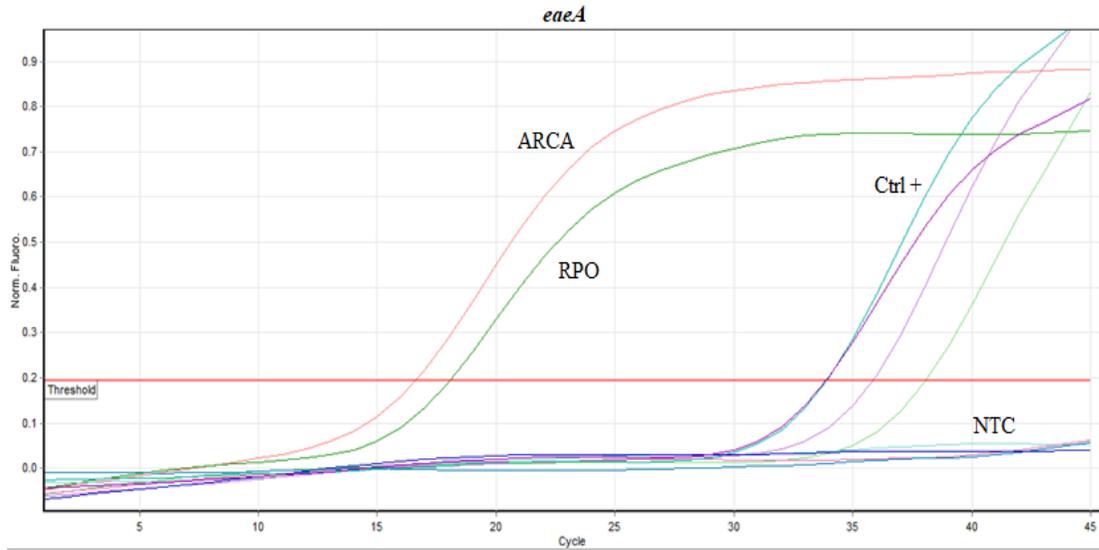


Figura 42. Transcripción del gen diarreogénico *eaeA* en cepas UPEC por PCR en tiempo real. *ARCA* y *RPO*: Genes constitutivos de *E. coli*. NTC: Control sin molde. Ctrl +: Control positivo, cepa de *E. coli* del cepario del laboratorio clínico.

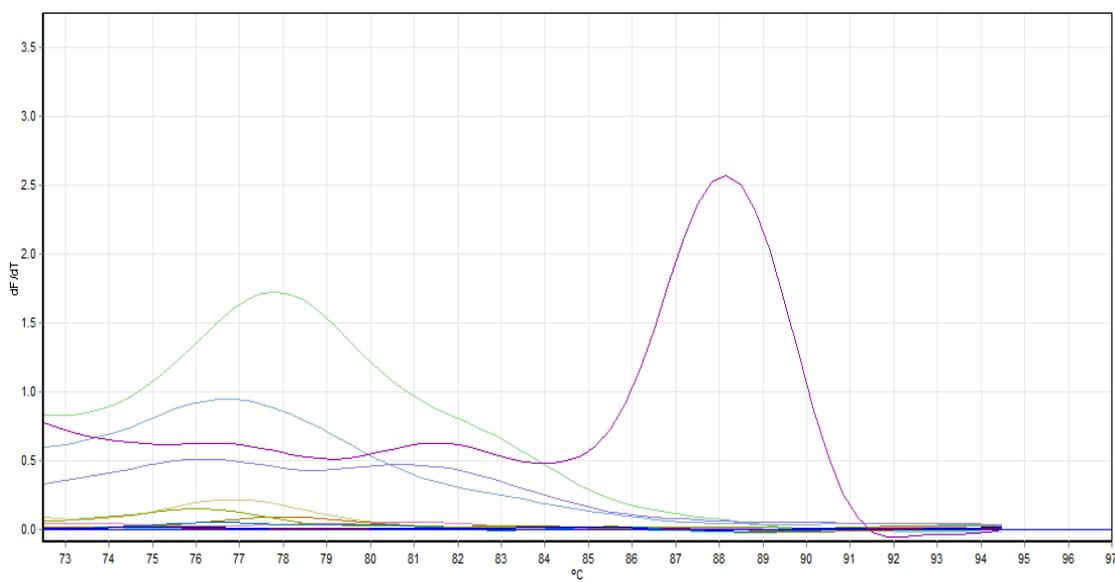


Figura 43. Curva de fusión (Melting point) de la transcripción del gen *eaeA*.

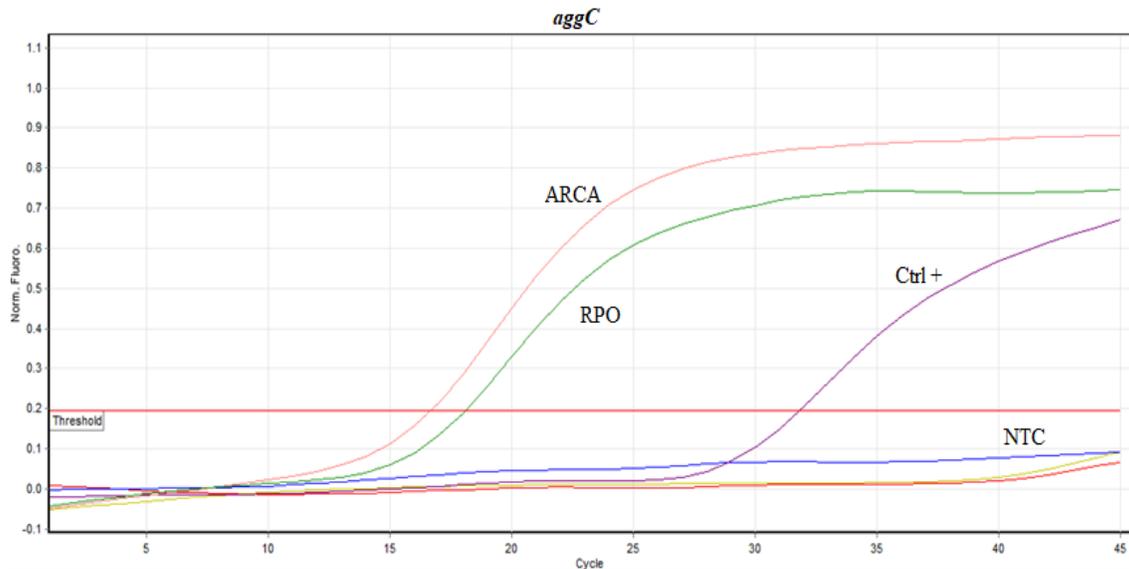


Figura 44. Transcripción del gen diarreogénico *aggC* en cepas UPEC por PCR en tiempo real. *ARCA* y *RPO*: Genes constitutivos de *E. coli*. NTC: Control sin molde. Ctrl +: Control positivo, cepa de *E. coli* del cepario del laboratorio clínico.

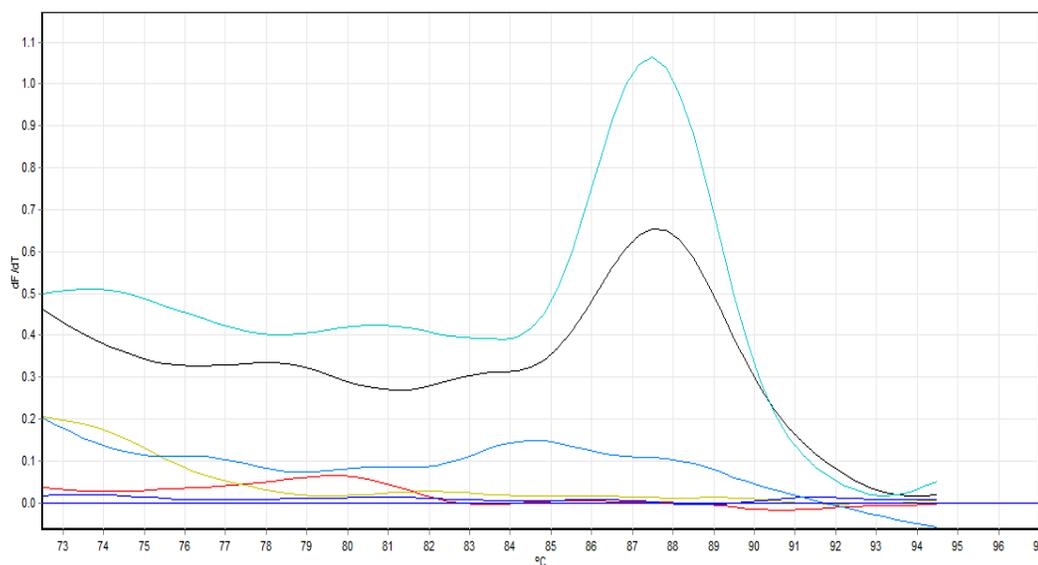


Figura 45. Curva de fusión (Melting point) de la transcripción del gen *aggC*.

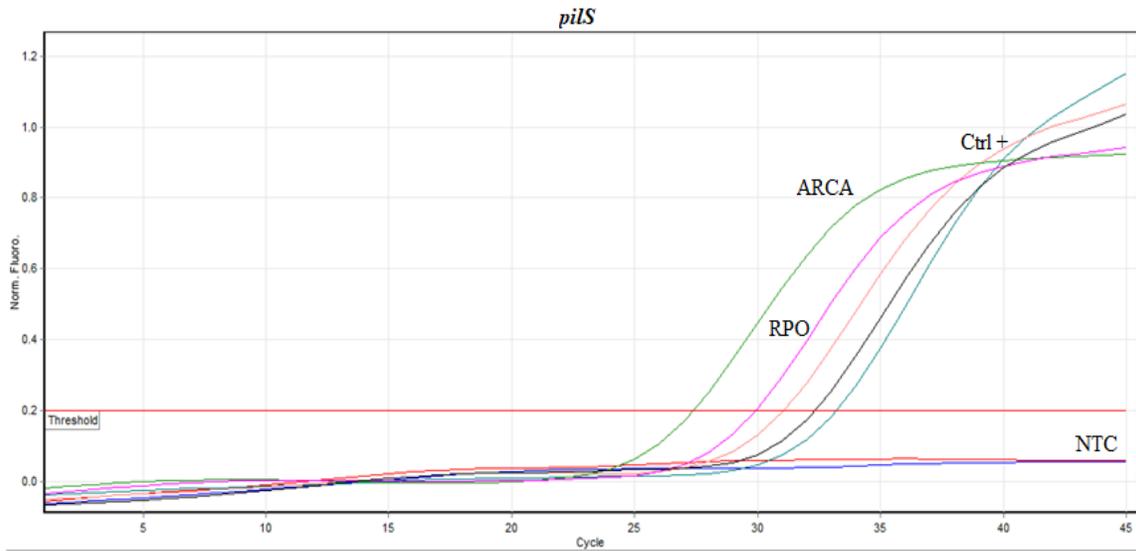


Figura 46. Transcripción del gen diarrogénico *pilS* en cepas UPEC por PCR en tiempo real. *ARCA* y *RPO*: Genes constitutivos de *E. coli*. NTC: Control sin molde. Ctrl +: Control positivo, cepa de *E. coli* del cepario del laboratorio clínico.

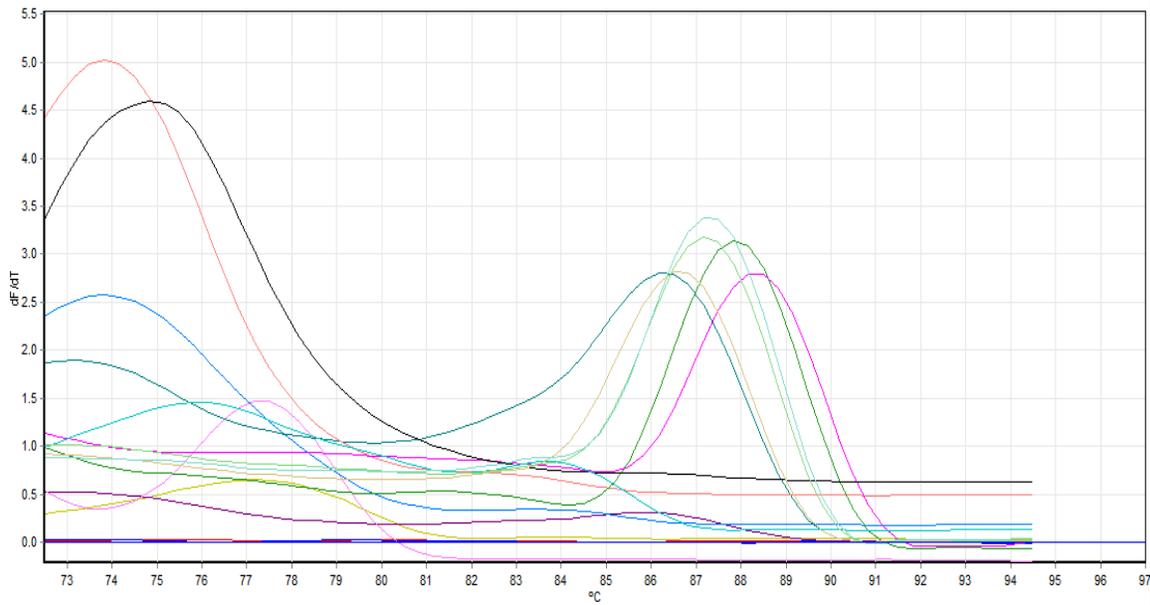


Figura 47. Curva de fusión (Melting point) de la transcripción del gen *pilS*.

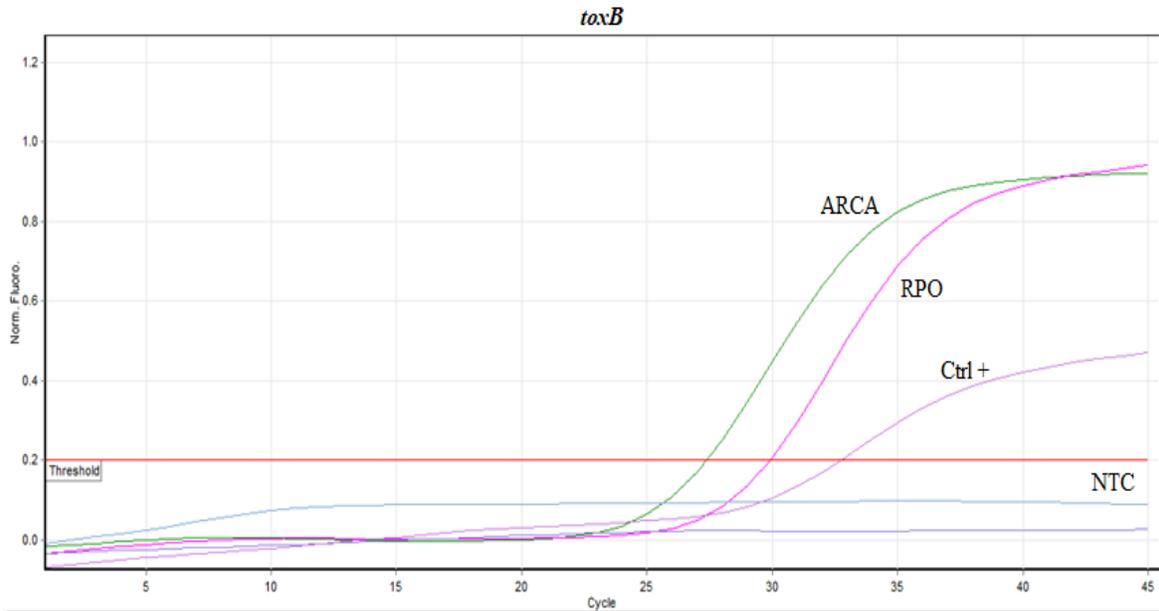


Figura 48. Transcripción del gen diarreogénico *toxB* en cepas UPEC por PCR en tiempo real. *ARCA* y *RPO*: Genes constitutivos de *E. coli*. NTC: Control sin molde. Ctrl +: Control positivo, cepa de *E. coli* del cepario del laboratorio clínico.

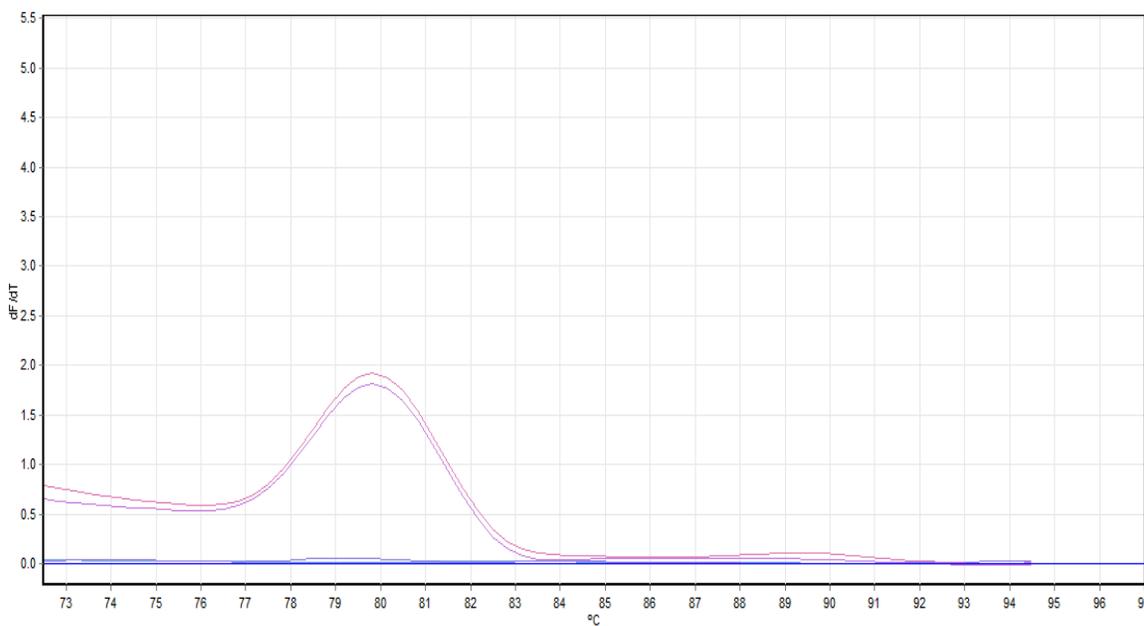


Figura 49. Curva de fusión (Melting point) de la transcripción del gen *toxB*.

Tabla 6. Resultados de la prueba de resistencia a los antimicrobianos en las cepas de *E. coli*. AMP: ampicilina; CF: cefalotina; CB: carbenicilina; PEF: pefloxacina; CRO: ceftriaxona; STX: trimetoprim con sulfametoxazol; NET: netilmicina; NIT: nitrofuratoína; GEN: gentamicina; CTX: cefotaxima; CL: cloranfenicol; AMK: amikacina. R= Resistente, S= Susceptible.

RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS															
No.	Cepa	Betalactámicos					Trimetoprim con sulfametoxazol	Aminoglucósidos			Quinolonas	Nitrofuranos	Anfenicoles	Total por antimicrobiano	Total por familia
		CF	CRO	AMP	CTX	CB		STX	NET	AMK					
1	1	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S	R	9	4
2	2	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	S	7	3
3	3	R	S	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	4	2
4	6	R	S	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	7	4
5	7	R	S	R	S	R	R	R	S	S	R	R	S	6	4
6	8	R	S	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S	6	3
7	9	R	S	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S	7	4
8	10	R	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	6	3
9	11	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	S	7	3
10	12	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	S	8	3
11	13	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	9	4
12	14	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S	7	4
13	15	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	8	4
14	16	R	S	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	7	4
15	17	R	S	R	R	R	R	S	R	S	S	S	R	6	3
16	18	R	S	S	S	R	R	S	S	S	R	S	S	3	2
17	19	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	9	5
18	20	R	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	5	2
19	21	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	S	8	4
20	22	R	S	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	7	4
21	23	R	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	4	1
22	25	R	S	R	R	R	R	S	R	S	R	R	S	7	3
23	28	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	S	8	3
24	29	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	R	9	5
25	32	R	S	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	8	5
26	33	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	10	5
27	36	R	S	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	7	4
28	37	R	S	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S	7	4
29	39	R	R	R	S	R	R	S	R	S	R	R	S	8	4
30	40	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	11	6
31	41	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	S	8	3
32	42	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	10	5
33	43	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	9	5
34	44	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	S	9	4
35	45	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	10	5
36	46	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	9	5
37	47	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S	8	4
38	48	R	S	R	R	R	R	S	R	S	R	R	S	8	4
39	50	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	11	5
40	51	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	9	4
41	52	R	S	R	S	R	R	S	S	S	R	S	S	4	2
42	53	R	S	R	R	R	R	R	S	R	S	R	S	7	4
43	55	R	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	4	1
44	60	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	11	6
45	61	R	S	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	8	5
46	62	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	11	5
47	64	R	S	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S	6	3
48	65	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	9	4
49	67	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	11	5
50	69	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	10	5
51	72	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	S	7	3
52	73	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	9	5
53	74	R	S	R	R	R	R	S	R	S	S	R	S	7	4
54	75	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	S	8	4
55	76	S	S	R	S	R	R	R	S	S	S	R	S	5	4
56	77	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	10	5
57	78	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	S	9	4
58	79	R	S	R	S	R	R	S	R	S	R	S	S	6	3
59	80	R	S	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	8	5
60	81	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	8	4
61	82	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	S	9	4
62	83	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S	7	3
63	84	R	S	R	S	R	R	S	S	S	R	R	S	6	4
64	85	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	9	4
65	86	R	S	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S	7	4
66	87	R	S	R	R	R	R	S	S	S	S	R	S	6	3
67	88	R	S	R	S	R	R	S	S	S	S	R	S	4	2
68	89	R	S	R	S	R	R	R	S	S	S	R	R	7	5
69	90	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	R	S	7	3
70	91	R	S	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	8	5
71	92	R	S	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S	6	3
72	93	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	S	8	4
73	96	R	S	R	S	R	R	R	S	S	S	R	R	7	5
74	97	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	8	4
75	98	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	S	8	3
76	99	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	10	5
77	101	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	9	4
78	102	R	S	R	S	R	R	R	S	S	S	R	S	5	3

79	104	R	S	R	S	R	R	R	S	R	R	R	S	S	8	5
80	105	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	9	4
81	106	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	S	8	4
82	107	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	11	5
83	108	R	S	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	8	5
84	109	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	11	6
85	110	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	8	4
86	111	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	9	5
87	112	S	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	3	1
88	123	R	S	R	S	R	R	R	S	R	R	S	S	S	6	3
89	126	R	S	R	S	R	R	R	S	S	S	S	R	R	6	4
90	127	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	S	7	3
91	129	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	9	4
92	130	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	11	6
93	131	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	11	5
94	133	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	10	6
95	136	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	10	5
96	137	R	S	R	S	R	R	R	S	S	S	R	S	S	4	2
97	138	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	10	6
98	139	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	10	6
99	140	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	S	8	3
100	141	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	2	1
101	144	R	S	R	S	R	S	R	S	S	S	R	R	S	5	3
102	146	R	S	R	S	R	R	R	R	S	R	R	S	S	7	4
103	148	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	11	6
104	149	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	8	4
105	151	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	5	1
106	153	R	S	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	S	7	3
107	155	R	S	R	S	R	R	R	S	R	S	R	R	S	6	3
108	158	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	S	8	3
109	160	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	10	5
110	161	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	0
111	162	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	9	4
112	163	R	S	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	R	7	4
113	164	R	S	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	S	6	3
114	166	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	9	4
115	167	R	S	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	4	2
116	168	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	S	8	3
117	169	R	S	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	7	4
118	171	R	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	7	4
119	173	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	8	4
120	174	R	S	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	R	7	5
121	175	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	11	6
122	177	R	S	R	S	R	R	R	S	S	S	S	R	S	4	2
123	178	R	S	R	S	R	R	R	S	S	S	R	S	S	5	3
124	179	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	7	3
125	180	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	9	5
126	181	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	9	5
127	182	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S	7	3
128	184	R	S	R	S	R	R	R	S	R	S	S	R	R	6	4
129	185	R	S	R	S	R	R	R	S	S	S	R	R	S	5	3
130	186	R	S	R	S	R	R	R	R	S	S	S	R	S	6	4
131	187	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	11	5
132	188	R	S	R	S	R	R	R	S	S	S	S	R	S	4	2
133	189	R	S	R	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	4	2
134	190	R	S	R	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	4	2
135	191	R	S	R	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	4	2
136	192	R	S	R	S	R	R	R	R	S	S	S	S	R	5	3
137	193	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	7	3
138	194	R	S	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	R	8	6
139	195	R	S	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S	8	4
140	197	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	9	5
141	198	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	10	5
142	199	R	S	R	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	4	2
143	200	R	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	7	4
144	201	R	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	7	4
145	203	R	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S	6	3
146	204	R	S	R	S	R	R	R	R	S	S	R	S	S	5	3
147	205	R	S	R	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	4	2
148	206	R	S	R	S	R	R	R	R	S	R	R	S	S	6	3
149	207	R	S	R	S	R	R	R	R	S	S	R	S	R	6	4
150	209	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	11	6
151	210	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	5	1
152	211	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1	1
153	213	R	S	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	6	3
154	214	R	S	R	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	4	2
155	215	S	S	R	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	3	2
156	216	R	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	8	5
157	217	R	S	S	S	R	R	R	R	S	S	S	R	S	4	3
158	221	R	S	R	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	4	2
159	224	R	S	R	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	3	1
160	228	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	9	4
161	229	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	R	8	4
162	230	R	S	R	S	R	R	R	R	S	S	S	R	R	6	4
163	235	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	9	5
164	238	R	S	R	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	4	2
165	239	R	S	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	7	4
166	244	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	9	4
167	245	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	8	4
168	249	R	S	R	S	R	R	R	R	S	S	S	R	S	5	3
169	251	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	8	4
170	252	R	S	R	S	R	R	R	R	S	S	S	R	S	5	3
171	254	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S	7	3
172	255	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	7	3
173	256	R	S	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	R	6	3

174	257	R	S	R	S	R	S	R	S	S	R	S	S	5	3
175	258	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	9	5
176	259	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	9	4
177	260	R	R	S	R	S	R	R	S	S	R	R	R	8	6
178	262	R	S	R	S	R	S	S	S	S	R	S	S	4	2
179	263	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S	9	5
180	286	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	S	9	4
181	295	R	S	R	S	R	S	R	S	S	R	S	S	5	3
182	296	S	R	S	S	R	R	S	S	R	R	S	S	5	4
183	306	R	S	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	4	2
184	307	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	3	1
185	308	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	10	4
186	310	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	R	9	5
187	312	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S	S	7	3
188	313	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S	S	7	3
189	314	R	S	R	S	S	R	S	S	S	R	S	S	4	3
190	317	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S	S	7	3
191	318	R	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	3	1
192	319	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	10	4
193	320	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	10	4
194	321	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	9	4

Tabla 7. Resultados de la técnica de PCR convencional para la detección de genes diarregénicos en cepas UPEC.

DETECCIÓN DE GENES																		
No.	ID Cepa	<i>aggA</i>	<i>aggC</i>	<i>agg3C</i>	<i>aggR</i>	<i>pet</i>	<i>toxB</i>	<i>aafC</i>	<i>aatA</i>	<i>stbA</i>	<i>aap</i>	<i>shf</i>	<i>pilS</i>	<i>lpfA</i>	<i>eaeA</i>	<i>bfpA</i>	<i>vt1</i>	Total por cepa
1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	2
2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
3	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	2
4	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
5	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
6	8	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	2
7	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	1
8	10	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	3
9	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	2
10	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	4
11	13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	2
12	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	2
13	15	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	3
14	16	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
15	17	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
16	18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
17	19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	1
18	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	1
19	21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	2
20	22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	1
21	23	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
22	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	4
23	28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	4
24	29	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	3
25	32	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
26	33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	3
27	36	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
28	37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	3
29	39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	1
30	40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	1
31	41	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	3
32	42	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	3
33	43	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	4
34	44	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	2
35	45	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
36	46	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
37	47	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	2
38	48	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
39	50	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	2
40	51	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	2
41	52	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
42	53	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
43	55	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	2
44	60	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	3
45	61	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
46	62	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
47	64	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	1
48	65	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	3
49	67	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	3
50	69	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
51	72	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	1
52	73	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	1
53	74	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	2
54	75	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
55	76	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
56	77	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	3
57	78	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	2
58	79	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
59	80	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
60	81	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	2
61	82	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
62	83	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1

63	84	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
64	85	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	2
65	86	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
66	87	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
67	88	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	2
68	89	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	3
69	90	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	2
70	91	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
71	92	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	2
72	93	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	2
73	96	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	1
74	97	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
75	98	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
76	99	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	2
77	101	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	1
78	102	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	2
79	104	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
80	105	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
81	106	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
82	107	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	2
83	108	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	2
84	109	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	1
85	110	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
86	111	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	2
87	112	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	1
88	123	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	3
89	126	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
90	127	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
91	129	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
92	130	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
93	131	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
94	133	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	1
95	136	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	1
96	137	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
97	138	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	2
98	139	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	2
99	140	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
100	141	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
101	144	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	1
102	146	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	1
103	148	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	3
104	149	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	1
105	151	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	2
106	153	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	2
107	155	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	5
108	158	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	4
109	160	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	3
110	161	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	3
111	162	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	2
112	163	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	2
113	164	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	2
114	166	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	3
115	167	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	2
116	168	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	3
117	169	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	4
118	171	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	4
119	173	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	2
120	174	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	3
121	175	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	1
122	177	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	3
123	178	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
124	179	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	2
125	180	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
126	181	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
127	182	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
128	184	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	2
129	185	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
130	186	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	2
131	187	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	2
132	188	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	3
133	189	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	1
134	190	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1

135	191	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	2
136	192	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
137	193	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	3
138	194	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	2
139	195	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	2
140	197	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
141	198	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	1
142	199	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	1
143	200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	1
144	201	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
145	203	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	2
146	204	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
147	205	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
148	206	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	3
149	207	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	2
150	209	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	2
151	210	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	3
152	211	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
153	213	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
154	214	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
155	215	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	2
156	216	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
157	217	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
158	221	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
159	224	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
160	228	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
161	229	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
162	230	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	2
163	235	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
164	238	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	3
165	239	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
166	244	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	1
167	245	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	3
168	249	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	3
169	251	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	2
170	252	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	1
171	254	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	5
172	255	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	2
173	256	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	3
174	257	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	2
175	258	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
176	259	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
177	260	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	5
178	262	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	1
179	263	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	3
180	286	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	2
181	295	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	3
182	296	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	1
183	306	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	3
184	307	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	3
185	308	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	1
186	310	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	4
187	312	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	3
188	313	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	1
189	314	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	2
190	317	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	3
191	318	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	3
192	319	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	1
193	320	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	3
194	321	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	2
Total por gen		0	5	11	0	38	2	0	9	87	32	69	8	43	18	8	3	333

Tabla 8. Resultado de transcripción de genes diarreogénicos en cepas UPEC.

TRANSCRIPCIÓN DE GENES																	
No.	ID Cepa	<i>aggC</i>	<i>agg3C</i>	<i>aggR</i>	<i>pet</i>	<i>toxB</i>	<i>aafC</i>	<i>aatA</i>	<i>stbA</i>	<i>aap</i>	<i>shf</i>	<i>piS</i>	<i>lpfA</i>	<i>eeA</i>	<i>bfpA</i>	<i>vt1</i>	Total por cepa
1	1								-		-						0
2	3									+	-						1
3	8				+						-						1
4	10								+	+	+						3
5	11										-						0
6	12									+	+		-	-			2
7	13									+	+						2
8	14									-				+			1
9	15				-				+			-					1
10	21									+				-			1
11	25									+	-			-			1
12	29								+		-		-				1
13	33										-			-			0
14	37										-			+			1
15	41								+		+		-				2
16	42				+				-								1
17	43							-			-			-			0
18	44				-												0
19	47								+					-			1
20	50								-		-						0
21	51								-								0
22	53		-		-												0
23	55										-			-			0
24	60		-						-	+							1
25	65									+	-			-			1
26	67									+	-			+			2
27	74										-						0
28	77								-		-		-				0
29	78										-			-			0
30	81				+									-			1
31	85				+									-			1
32	88				+						+						2
33	89								-		+	-					1
34	90				-				+								1
35	92		-											-			0
36	93		-											-			0
37	99				+						+						2
38	102								-	+							1
39	107				+								-				1
40	108		-						-								0
41	111				+					+							2
42	123		-										-				0
43	138				-				+								1
44	139				-								-				0
45	148				+			-			+						2
46	151								-					-			0
47	153				+				-								1
48	155		-		-				-	+	-						1
49	158								-	-			-				0
50	160				+						+						2
51	161								-		-		-				0
52	162								-		+						1
52	163								-				-				0
53	164				+												1
54	166								-		+		-				1
55	167								-		-						0
56	168								-	-	-	-					0
57	169				+				-	-	+						2
58	171								-	-	+	+					2
59	173									-			-				0
60	174								-	-	-						0
61	177								+	+					+		3
62	179								+				-				1
63	184								-		-						0
64	186								-				-				0

