



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

TÍTULO DEL TEMA ESCRITO

**CARACTERÍSTICAS DE *ESCHERICHIA COLI* UROPATÓGENA (UPEC)
CAUSANTES DE INFECCIONES RECURRENTE DEL TRACTO URINARIO**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

Chavero Guerra Pedro Pablo



MÉXICO, D.F. noviembre de 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor Alejandro Camacho Cruz
VOCAL: Profesor Francisco Javier Plasencia de la Parra
SECRETARIO: Profesor Ángel Manjarrez Hernández
1er. SUPLENTE: Profesor Patricia Coello Coutiño
2° SUPLENTE: Profesor Javier Fernández Torres

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio de Patogénesis Bacteriana, Departamento de Salud Pública, Facultad de Medicina, UNAM. Ubicado en el Hospital General “Dr. Manuel Gea González”

Asesor del tema:

Dr. Ángel Manjarrez Hernández

Supervisor técnico:

Dra. Sandra Gavilanes Parra

SUSTENTANTE:

Chavero Guerra Pedro Pablo

INDICE

Resumen.....	4
1. Introducción.....	5
2. Marco teórico.....	6
3. Justificación.....	16
4. Hipótesis.....	17
5. Objetivos.....	17
6. Materiales y métodos.....	18
7. Resultados.....	25
8. Discusión.....	35
9. Conclusiones.....	42
10. Referencias.....	43
Apéndice.....	51

RESUMEN

Las infecciones del tracto urinario (ITU) son muy comunes, afectan principalmente a mujeres y en la mayoría de los casos son causadas por *Escherichia coli* uropatógena (UPEC). Un problema de salud que se ha incrementado entre la población son las infecciones del tracto urinario recurrentes (ITUr), dichas infecciones son difíciles de erradicar a pesar de múltiples tratamientos antimicrobianos. En México no existen estudios sobre ITUr, no obstante es un problema que un gran número de personas padece, se desconoce si las cepas causantes de ITUr tienen características especiales o diferentes de las cepas causantes de ITU no-recurrentes. El propósito de la investigación es caracterizar cepas de UPEC aisladas de infecciones recurrentes en particular se evaluó la susceptibilidad a los antimicrobianos, su capacidad para formar biopelícula, su portación de plásmidos y fueron genotipificadas para conocer la relación genética entre los aislados. Para esto se obtuvieron 32 cepas de pacientes ambulatorios de la Ciudad de México con infección recurrente en el tracto urinario.

Metodología: la susceptibilidad a los antimicrobianos se realizó mediante la técnica de difusión en agar, la producción de enzimas β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) mediante la técnica de sinergismo de doble disco, para el ensayo de formación de biopelícula se empleó cristal violeta y se realizó en medio mínimo M9, la obtención de ADN plasmídico por lisis alcalina y los aislados se genotipificaron mediante el Amplificación Aleatoria del ADN polimórfico (RAPD)-PCR utilizando dos iniciadores con actividad discriminatoria intraespecie.

Los resultados mostraron que el 75% de las cepas fueron multirresistentes a los antimicrobianos, esto es que son resistentes a 3 o más familias de antimicrobianos, y el 37% de las cepas expresan enzimas tipo BLEE. Con respecto a la biopelícula 24 de las 32 cepas (75%) formaron biopelícula del tipo fuerte y moderada. En relación al perfil plasmídico, 84% de los aislados mostraron la presencia de plásmidos de alta masa molecular, mayores a 50 kb. Con la genotipificación se determinó el grado de similitud entre las cepas y se construyó un dendograma, el cual mostró 2 grupos clónales o clúster uno con 13 aislados y otro con 11 donde las cepas que los integran tienen una alta similitud genética, demostrando el origen clonal de los aislados.

Nuestros resultados indican que los aislados de ITUr han desarrollado multiresistencia a los antimicrobianos en mayor grado que los aislados de ITU no-recurrentes, también son en su mayoría formadoras de biopelícula, se desconoce el papel de los plásmidos en estas cepas pero creemos que deben contribuir a la virulencia, finalmente la mayoría de los aislados (75%) están relacionadas clonalmente puesto que formaron dos grupos o linajes.

1. INTRODUCCIÓN

Las infecciones del tracto urinario (ITU) son la segunda infección bacteriana más frecuente en humanos (Oelschlaeger, *et al.* 2002, Schappert y Rechtsteiner, 2008). La incidencia de ITU es significativamente superior en mujeres que en hombres, esto a causa de las diferencias anatómicas entre ambos géneros, se estima que aproximadamente 1 de cada 2 mujeres presentan al menos un evento antes de los 20 años y cerca del 70% de las mujeres en el mundo presentarán por lo menos una ITU en algún momento de su vida. (Barber, *et al.* 2013; Cusumano, *et al.* 2010; Foxman, 2002; Pitout, 2012).

Algunos pacientes padecen varias ITU en periodos muy cortos de tiempo por lo que se denominan como infecciones del tracto urinario recurrentes (ITUr). Al menos el 25% de los pacientes que padecen una ITU podrían presentar recurrencia dentro de los próximos 6 meses y la mayoría de las veces es causada por la misma cepa causante del primer evento. (Aydin, *et al.* 2015; Erjnaes, *et al.* 2011; Lorenzo-Gómez, *et al.* 2015; Sokurenko y Johnson, 2011).

Escherichia coli es el patógeno predominante que causa entre el 80-90% de las infecciones del tracto urinario (Erjnaes, *et al.* 2011). De acuerdo a lo reportado, estas cepas que causan ITUr poseen algunas características específicas que posiblemente contribuyen al establecimiento de dichas infecciones recurrentes, entre las cuales destacan la formación de biopelícula, la invasividad de las células, la portación de material plasmídico y la multiresistencia a antibióticos (Erjnaes, 2011; Hisano, *et al.* 2015; Schwartz, *et al.* 2015; Soto, *et al.* 2006).

Este trabajo es uno de los primeros en estudiar las características de cepas de *E. coli* causantes de ITUr en pacientes de la Ciudad de México, con el fin de identificar algún patrón de características bacterianas que ayude a la identificación de cepas con potencial de causar infecciones recurrentes y desarrollar un método de diagnóstico. Este tipo de investigación también puede contribuir al establecimiento de tratamientos más efectivos para este tipo de infecciones.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Epidemiología de las infecciones del tracto urinario.

Las infecciones del tracto urinario (ITU) son de las infecciones más comunes en humanos junto con las infecciones gastrointestinales y las infecciones del tracto respiratorio, afectando aproximadamente a 150 millones de personas al año en todo el mundo (Cusumano, *et al.* 2010; Flores-Mireles, *et al.* 2015; Oelschlaeger, *et al.* 2002; Pitout 2012; Schappert y Rechtsteiner, 2008).

Sólo en Estados Unidos durante el año 2007, se estimaron 10.5 millones de visitas a los servicios de salud por síntomas de ITU y de 2 a 3 millones de visitas a los servicios de urgencias por este padecimiento. (Flores-Mireles, *et al.* 2015).

Las ITU corresponden a la primer causa de morbilidad en niños, mujeres y hombres en edad avanzada. En México, las ITU representan la primer causa de consulta médica en mujeres en edad reproductiva, es la causa más frecuente de complicaciones perinatales serias y la tercer causa de sepsis neonatal (Calderón, *et al.* 2010; Flores-Mireles, *et al.* 2015).

La incidencia de ITU es significativamente superior en mujeres dadas las diferencias anatómicas entre géneros, entre las que destacan la corta distancia del ano a la uretra femenina y de la uretra a la vejiga, lo que favorece el ingreso de las bacterias al tracto urinario. Se estima que aproximadamente 1 de cada 2 presentan al menos un evento antes de los 20 años y cerca del 80% de las mujeres en el mundo presentarán por lo menos una ITU en algún momento de su vida. (Barber, *et al.* 2013; Cusumano, *et al.* 2010; Foxman y Brown, 2003; Pitout, 2012).

Todos los seres humanos son susceptibles a padecer ITU, sin embargo, también existen algunos factores de riesgo que facilitan la colonización del tracto urinario como lo son: edad, cateterización, hospitalización, anomalías anatómicas, diabetes,

obesidad, obstrucciones del tracto urinario, predisposición genética y actividad sexual (Flores-Mireles, *et al.* 2015; Foxman y Brown, 2003).

Las ITU pueden clasificarse como no complicadas y complicadas. Las no complicadas aparecen en personas sanas, sin anomalías anatómicas y pueden presentarse como cistitis o en casos severos como pielonefritis. En cambio, las ITU complicadas están asociadas a las anomalías en el tracto urinario y la obstrucción del mismo, cateterismo, el embarazo, inmunosupresión y daño renal entre otras. (Flores-Mireles, *et al.* 2015).

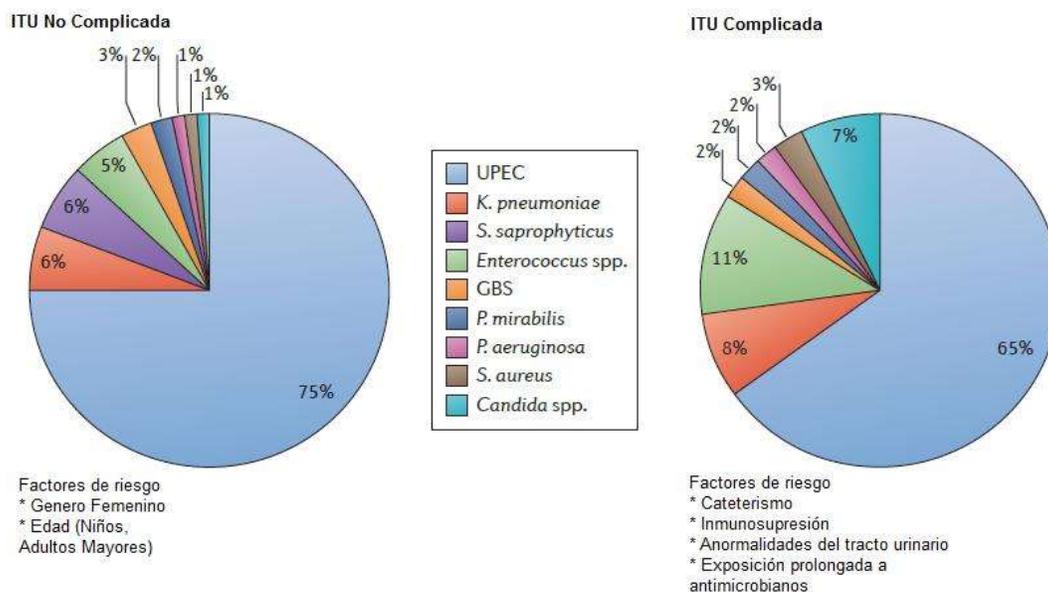


Figura 1. Epidemiología de las ITU. Porcentajes de los principales microorganismos causantes de ITU, así como factores de riesgo determinantes para las infecciones complicadas y no complicadas. *Escherichia coli* uropatógena (UPEC). Tomado y editado de Flores-Mireles, *et al.* 2015.

Las ITU son provocadas por bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas así como algunos integrantes del grupo fungi. Dentro de las bacterias Gram positivas encontramos que los principales causantes de este tipo de infecciones son *Enterococcus sp.*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*. Por parte de los organismos fúngicos el principal agente etiológico es *Candida sp.* Por último, de las bacterias Gram negativas encontramos a *Klebsiella sp.*, *Proteus sp.*, *Pseudomonas aeruginosa* y en donde destaca *Escherichia coli* uropatogena (UPEC), la cual es causante de entre 80 y 90% del total de ITU

(Barber, *et al.* 2013; Calderón, *et al.* 2013; Flores-Mireles, *et al.* 2015; Foxman y Brown, 2003). La figura 1 presenta los porcentajes de los principales microorganismos causantes de ITU así como algunos de los factores de riesgo más determinantes.

2.2 *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E. coli*) es una de las bacterias más estudiadas y es un importante miembro del tracto gastrointestinal de muchos mamíferos. En condiciones normales, *E. coli* establece relaciones simbióticas benéficas con su portador, ayudando a regular la microbiota así como procurar la homeostasis intestinal (Bien, *et al.* 2012). También es reconocida por intervenir de manera activa en algunos roles de la salud en humanos (Fujimura, *et al.* 2010). Toma gran importancia el estudio de *E. coli* después de que se identificaron grupos de bacterias patógenas causantes de enfermedades tanto gastrointestinal como extraintestinales (Rasko, *et al.* 2008, Riley, 2014, Sokurenko y Johnson 2011).

2.2.1 Características morfológicas y bioquímicas

E. coli es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo de la familia *Enterobacteriaceae*. El tamaño promedio de los bacilos es de 0.5 μ de ancho por 3 μ de largo, algunas especies son móviles por la expresión de flagelos peritricos, no esporulados (Rodríguez-Ángeles, 2002).

Las pruebas bioquímicas empleadas para la identificación de cepas de *E. coli* se muestran en la tabla 1.

Pruebas bioquímicas de identificación de *E. coli*

Batería de pruebas primara		Batería de pruebas secundaria	
Prueba	Resultado	Prueba	Resultado
Adonitol	Variable	Arabinosa	Positivo
Arginina	Variable	Inositol	Negativo
Citrato	Variable	KCN	Negativo
DNAsa	Negativo	Lactosa	Variable
Producción de gas a partir de glucosa	Positivo	Malonato	Variable
H ₂ S	Negativo	Manitol	Positivo
Indol	Positivo	Melibiosa	Variable
Lisina	Positivo	ONPG	Positivo
Movilidad	Variable	Rafinosa	Variable
Ornitina	Variable	Ramnosa	Variable
Fenilalanina	Negativo	Salicina	Variable
Sacarosa	Variable	Sorbitol	Variable
Ureasa	Negativo	Trehalosa	Positivo
Voges-Proskauer	Negativo	Xilosa	Positivo

Tabla 1. Conjunto de pruebas bioquímicas de significado clínico para la identificación del genero *Escherichia*. (Tomado de Lennette, E. H., Ballows, A., Hausler Jr, W. J., Shadomy, H. J. *Manual Of Clinical Microbiology*, 4th edition, Washington, USA. 1985. pp 268)

2.2.2 *E. coli* patógena

Como se mencionó anteriormente, *E. coli* es un miembro habitual del tracto gastrointestinal, coloniza el intestino de los humanos a las pocas horas del nacimiento, a pesar de que la mayoría de las cepas logran establecer relaciones simbióticas con sus hospederos, algunas de las cepas pueden llegar a causar ciertas enfermedades (Kaper, *et al.* 2004; Rodríguez, 2002, Wiles, 2008).

La presencia de *E. coli* en el organismo corresponde a cepas comensales no patógenas, las cuales forman parte habitual de la microbiota intestinal de animales y humanos, sin embargo, también pueden encontrarse cepas causantes de infecciones intestinales, a las que se les conoce como *E. coli* patógenas intestinales, mientras que existen otras que también causan infecciones fuera del tracto gastrointestinal, mejor conocidas como *E. coli* patógenas extraintestinales o ExPEC por sus siglas en inglés (Pitout, 2012).

Existen 6 patotipos (poblaciones de una misma especie que difiere de las demás por su capacidad patogénica) diferentes en *E. coli* patógenas intestinales. Si las bacterias expresan una toxina termolábil y/o termoestable se denomina *Escherichia coli enterotóxica* (ETEC); si la diarrea causada va acompañada de sangre se denomina a la bacteria que lo produce como *Escherichia coli enterohemorrágica* (EHEC); si la bacteria logra colonizar e invadir el epitelio intestinal se denomina *Escherichia coli enteroinvasiva* (EIEC); si se adhieren a la mucosa intestinal y destruyen las microvellosidades se les conoce como *Escherichia coli enteropatógena* (EPEC); si las bacterias se adhieren de forma característica, autoaglutinandose en las células del intestino se denominan *Escherichia coli enteroagregativa* (EAEC); en cambio si en las células no se forman microcolonias de las bacterias al adherirse se denomina *Escherichia coli adherente difusa* (DAEC) (Donnenberg, 2013; Riley, 2014; Rodríguez, 2002). Algunos de los mecanismos de estos patotipos se muestran en la figura 3.

En lo referente a las cepas causantes de enfermedades extraintestinales (ExPEC), encontramos a un grupo de cepas que tienen la capacidad de colonizar otros nichos en su hospedero además del intestino, estos nichos corresponden a la sangre, el sistema nervioso central y el tracto urinario. Las causantes de la colonización de la sangre y del sistema nervioso central se denominan *Escherichia coli* asociada a meningitis (MNEC) y las que se encargan de colonizar el tracto urinario se denominan *Escherichia coli uropatógena* (UPEC) (Bien, et al. 2011; Kaper, et al. 2004; Wiles, 2008).

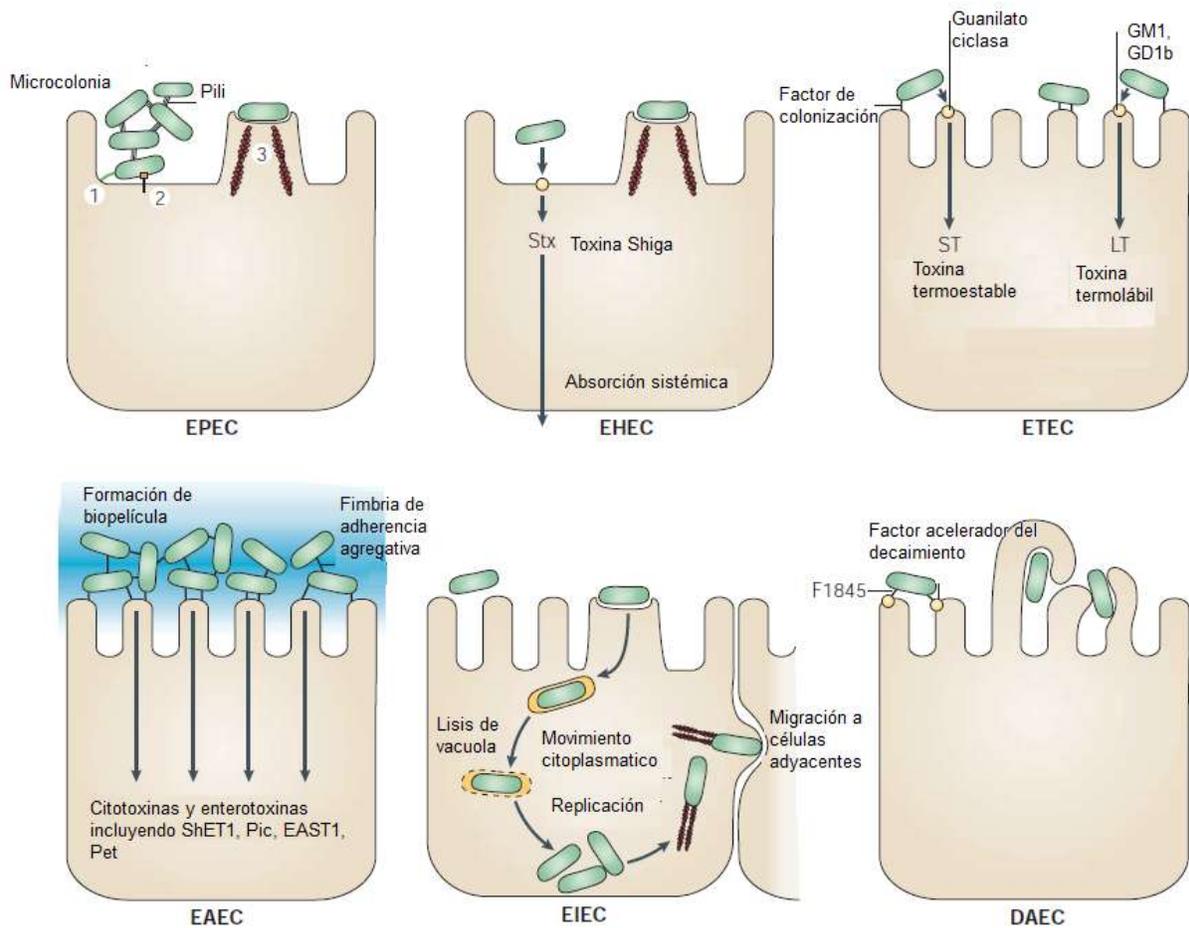


Figura 2. Esquema de los seis patotipos de *E. coli* intestinal. Se muestra la forma en que las cepas se adhieren a la célula y en el caso particular de EIEC la forma en la que se internaliza a la célula. Imagen tomada de Kaper, *et al.* 2004.

2.2.3 *Escherichia coli* uropatógena (UPEC).

Escherichia coli uropatógena o UPEC, por sus siglas en inglés, a diferencia de las cepas intestinales, no puede ser considerada patotipo porque la mayor parte de las cepas no comparten los mismos factores de virulencia entre sí, lo cual las hace difícil de identificar. En general el grupo UPEC es muy diverso y bien se podrían establecer al menos 4 patotipos (Donnenberg, 2013, Marrs, *et al.* 2005).

El principal reservorio de UPEC en el cuerpo humano es el tracto intestinal y se ha demostrado que algunos brotes de UPEC están relacionados al consumo de agua y alimentos contaminados con estas cepas (Pitout, 2012). Llegan al tracto urinario valiéndose de algunos factores de virulencia diferentes a los que tienen las cepas

comensales habituales del intestino, mismos que ayudan al establecimiento, colonización e infección del tracto urinario (Bien, *et al.* 2011; Wiles, 2008).

2.2.4. Factores de virulencia de UPEC

Los factores de virulencia promueven y facilitan la colonización e invasión de las bacterias a los tejidos del hospedero. La patogenia asociada a las cepas UPEC se muestra representada en la figura 3.

A pesar de que se tienen identificados algunos de los factores de virulencia que expresa UPEC no todas las cepas aisladas presentan el mismo patrón de factores de virulencia, por lo cual no se ha demostrado un conjunto de factores de virulencia que defina UPEC como un patotipo (Marrs, *et al.* 2005). En la tabla 2 se muestran algunos de los factores de virulencia que le permiten a UPEC causar ITU.

Característica	Factores de virulencia
Adherencia	Pili F1C
	Pili P
	Pili S
	Pili tipo 1
Toxinas	Adhesinas Dr
	HlyA
	CNF1
Evasión del sistema inmune	HlyA
	Antígenos capsulares
	CNF1
Adquisición de hierro	Yersiniabactina
	Aerobactina
	Enterobactina
	Salmoquelina*
Otras	Yersiniabactina
	Antígeno 43
	Flagelo

Tabla 2. Factores de virulencia de UPEC. HlyA - Hemolisina; CNF1 - Factor necrotizante citotóxico tipo 1. (Tomado y editado de Flores-Mireles, *et al.* 2015)

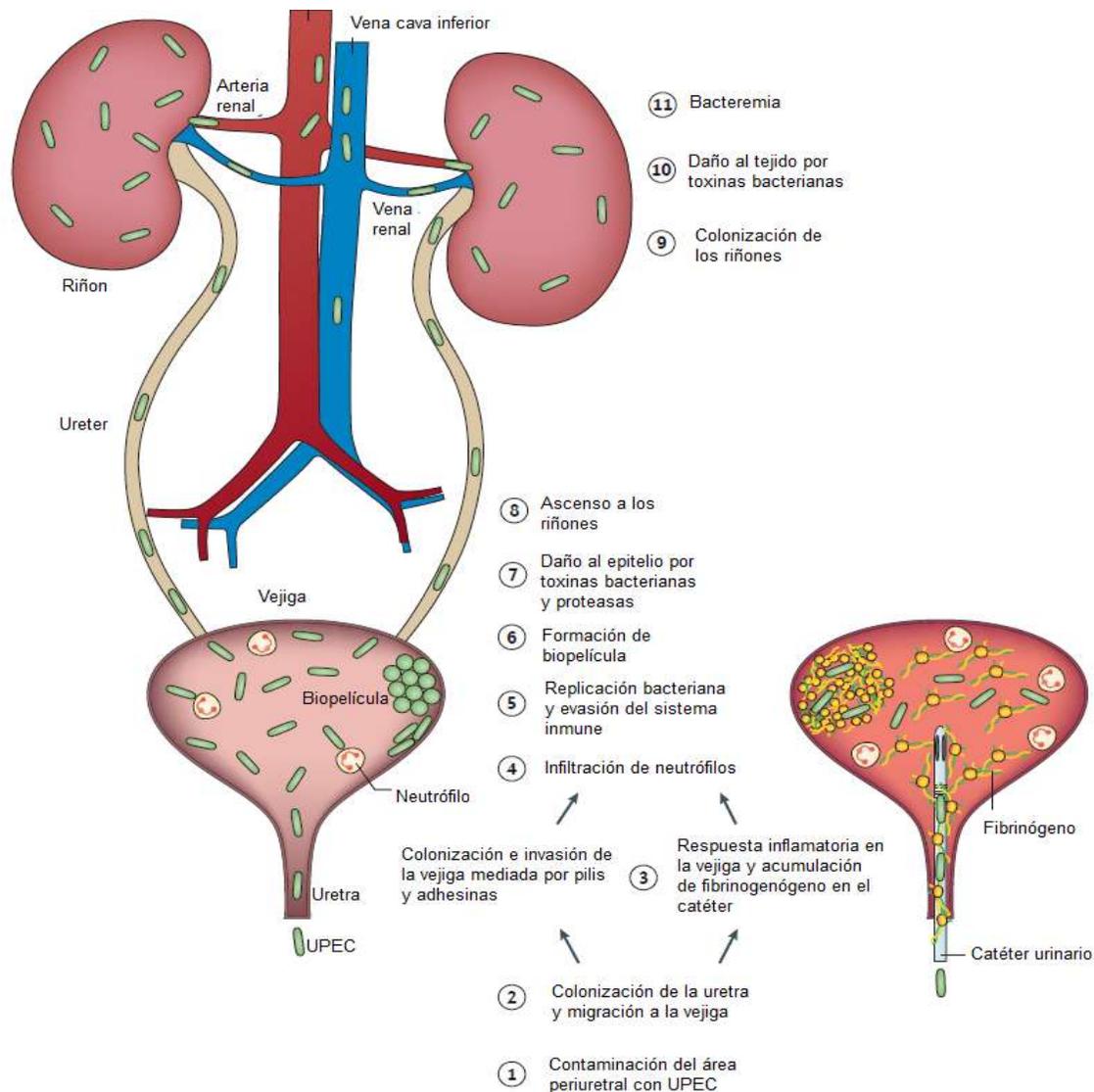


Figura 3. Patogenia de ITU. Comienza cuando los microorganismos contaminan el área periuretral facilitando la colonización de la uretra. Subsecuentemente, las bacterias migran hacia la vejiga mediante la expresión de pilis y adhesinas que también facilitan la colonización e invasión de las células “sombrija” superficiales. En este punto, el sistema inmunitario del hospedero actúa y responde con inflamación e infiltración de neutrófilos para eliminar a las bacterias, sin embargo, algunas logran evadir la respuesta inmunitaria mediante la invasión de las células del epitelio de la vejiga y mediante cambios morfológicos para resistir el ataque de los neutrófilos permitiendo su multiplicación. Otro mecanismo de evasión es la formación de biopelícula. Algunas bacterias pueden producir toxinas y proteasas que inducen daño en las células del tejido, provocando la liberación al medio de nutrientes esenciales para la supervivencia de las bacterias y propiciando el ascenso hacia los riñones. Ya en los riñones, colonizan el tejido produciendo de nuevo daño por medio de la secreción de toxinas. Si aún la infección no ha sido tratada, las bacterias pueden provocar bacteremia si logran cruzar la barrera epitelial tubular para ingresar al sistema circulatorio. (Tomado y editado de Flores-Mireles, *et al.* 2015)

2.3 ITU recurrentes

Las ITU pueden agravarse si se vuelven recurrentes. Se consideran ITU recurrentes (ITUr) cuando un mismo paciente tiene dos periodos de ITU no complicada en 6 meses o 3 episodios en un año (Barber, *et al.* 2013). Aunado a esto, se ha descrito que el 77% de las ITUr es causada por la misma cepa de *E. coli* que provocó la primera infección (Erjnaes, *et al.* 2011).

Bajo esa premisa, se ha investigado el por qué estas cepas no logran ser erradicadas del tracto urinario, aun cuando los pacientes terminan un tratamiento con el antimicrobiano al cual es susceptible. Se ha demostrado que UPEC puede invadir las células epiteliales de la vejiga, y algunas cepas tienen la posibilidad de formar biopelícula en el tejido. Estas características hacen que las cepas que las pueden expresar tengan más armas para evadir los mecanismos inmunitarios (Barber, *et al.* 2013; Erjnaes, *et al.* 2011; Sokurenko y Johnson, 2011).

No obstante, datos como el grupo filogenético, la presencia de diversos factores de virulencia y ciertas características como la formación de biopelícula completan la información que hasta la actualidad se ha publicado referente a estas cepas UPEC (Erjnaes, *et al.* 2011; Sokurenko y Johnson, 2011).

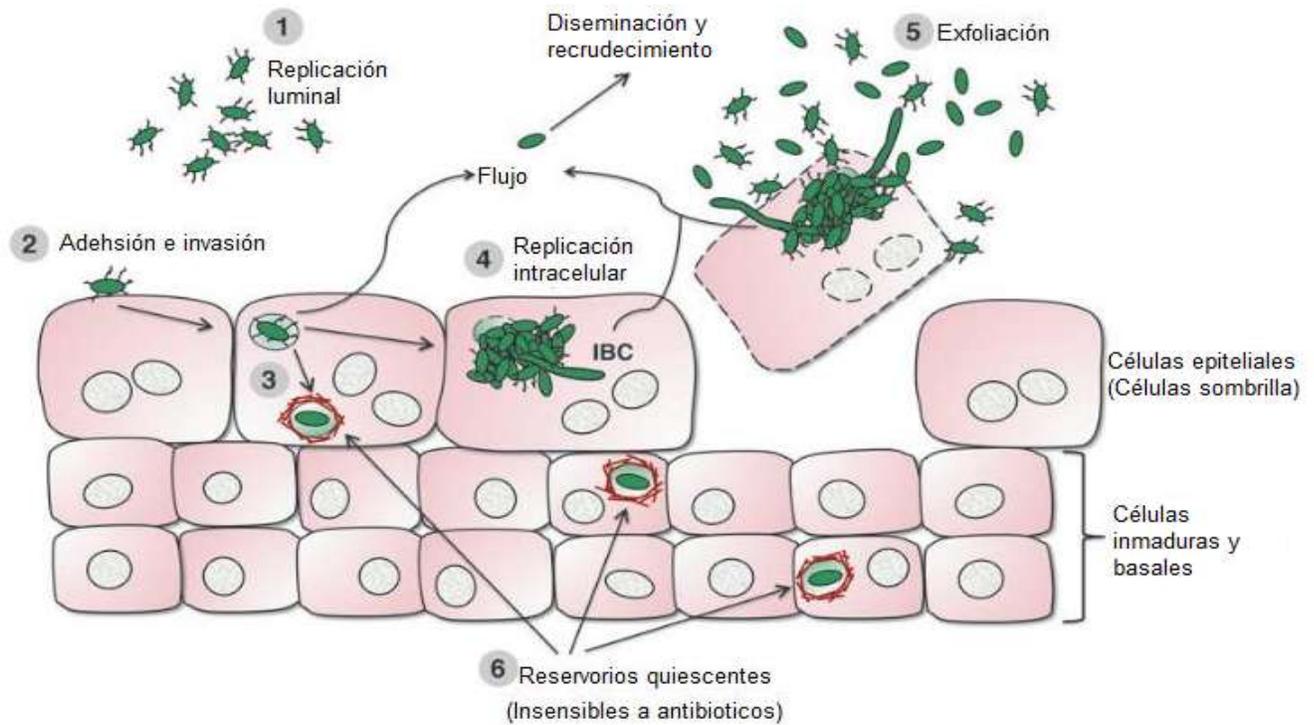


Figura 4. Eventos que promueven el establecimiento y recurrencia de las infecciones del tracto urinario (ITU). 1) Durante la ITU, *E. coli* uropatógena (UPEC) puede replicarse en el lumen de la vejiga o 2) adherirse a las células epiteliales. 3) Continuando con la invasión, UPEC ingresa a las células formando compartimentos parecidos a endosomas cubiertos por filamentos de actina. 4) La alteración a estos compartimentos, permite a UPEC la entrada al citosol de la célula, permitiendo una rápida replicación intracelular y la formación de comunidades bacterianas intracelulares (IBC). Durante estos eventos, la morfología de las bacterias puede variar como la formación de células parecidas a filamentos largos que pueden evadir la respuesta inmunitaria de los neutrófilos. 5) La infección puede desencadenar la exfoliación de las células dado que este proceso puede ayudar a la eliminación de las bacterias adheridas e internalizadas. El flujo que siguen las bacterias después de la exfoliación puede promover la diseminación de los patógenos provocando el recrudescimiento de la ITU. 6) UPEC permanece en reservorios quiescentes de larga duración dentro de las células, gracias a los compartimentos parecidos a endosomas rodeados de actina que formaron al internalizarse. Esto hace que sea extremadamente difícil erradicar las bacterias dada su insensibilidad a los tratamientos con antibióticos. El resurgimiento de UPEC desde estos reservorios puede iniciar ITU recurrentes. Tomado y editado de Barber, *et al.* 2013.

3. JUSTIFICACIÓN.

Las infecciones del tracto urinario causadas por *E. coli* uropatógena se encuentran entre las enfermedades infecciosas más comunes a nivel mundial, siendo en este caso, las infecciones crónicas y recurrentes especialmente problemáticas.

Investigaciones recientes acerca de estas bacterias han demostrado que bacterias de *E. coli* pueden invadir y replicarse dentro de las células del epitelio de la vejiga de ratones (modelo de cistitis en ratón), lo cual implica que las bacterias adquieran ventajas para evadir su erradicación del tracto urinario. La invasión de las bacterias a estas células les permite replicarse intracelularmente evitando el contacto con los antibióticos durante el tratamiento de la enfermedad, siendo eliminadas sólo las bacterias presentes en el lumen de la vejiga.

La presencia de las bacterias dentro de las células les permite invadir a las células vecinas y migrar a capas más profundas y menos maduras del epitelio, logrando establecer reservorios de bacterias. Durante la exfoliación natural del epitelio, las bacterias pueden salir de sus reservorios y siendo completamente viables pueden causar una nueva infección. Sin embargo, aún no se han descrito las características en común de las *E. coli* causantes de infecciones recurrentes. De hecho aún no se puede conocer el potencial de una *E. coli* aislada de ITU para causar infecciones recurrentes.

En México, no hay precedentes de investigaciones sobre este tipo de infecciones recurrentes, no obstante es un problema real que aqueja a la población en general, por lo que es importante conocer las características básicas que pueden presentar estas bacterias recurrentes. Este conocimiento puede facilitar la identificación rápida de cepas de *E. coli* recurrentes y puede contribuir al establecimiento de tratamientos específicos y adecuados para este tipo de infecciones.

4. HIPÓTESIS

Las cepas de *E. coli* uropatógenas causantes de infecciones recurrentes tienen con mayor frecuencia ciertas características como la multirresistencia a los antimicrobianos, la expresión de β -lactamasas de espectro extendido, la capacidad de formar biopelícula y presencia de material plasmídico, las cuales las distingue de los aislados de infecciones no-recurrentes. Además dichas cepas están relacionadas genéticamente y forman clusters.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general:

- Investigar las características bacterianas de cepas de *Escherichia coli* uropatógena aisladas de pacientes con infecciones recurrentes del tracto urinario.

5.2 Objetivos particulares:

- Evaluar la susceptibilidad de los aislados a diversos antimicrobianos y determinar los perfiles de resistencia.
- Determinar la producción de β -lactamasas de espectro extendido por los aislados.
- Determinar la presencia de plásmidos en las cepas estudiadas.
- Determinar la capacidad de formar biopelícula por parte de las bacterias estudiadas.
- Investigar la relación genética entre los diversos aislados de *E. coli* mediante RAPD.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Aparatos.

- Centrifugación: Microcentrífuga Biofuge pico (Heraeus); Centrífuga de mesa para tubos eppendorf (Sigma 1-15K).
- Electroforesis en geles de agarosa: Camara de electroforesis horizontal (Minicell Primo EC320); Fuente de poder EPS 3500 (Pharmacia).
- Electroforesis en geles de poliacrilamida: Cámara de electroforesis vertical (Bio-Rad, Mini protean II, Comb, 10 well, 1.00 mm, Teflon); Fuente de poder: Fuente de poder EPS 3500 (Pharmacia) y Fuente de poder Power Pac Basic (Bio Rad).
- Formación de Biopelícula: Espectrofotómetro (JENWAY 6320D)
- Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR): Termociclador (Bio-Rad, T100 Thermal cycler).
- Otros: Incubadora (Fisher, Modelo 230F); Vortex (Scientific Industries, Vortex-Genie 2); Transiluminador UV (UVP, Upland, CA); Balanza analítica digital (Adventurer Ohaus, Capacidad 310g); Refrigerador (Lab-line Instruments, Inc).

6.2 Reactivos

Identificación: Agar Mac Conkey (BD Bioxon, México); Medio Cromogénico ITU (Oxoid, Inglaterra).

Resistencia a antimicrobianos y expresión fenotípica de BLEE: Agar Mueller-Hinton (BD Difco, E.U.A.); Discos impregnados con diversos antimicrobianos (Oxoid, Inglaterra).

Extracción de plásmidos: Solución de lisis alcalina I, II y III (Apéndice); etanol (Química Meyer); fenol (Ultra-Pure™, Invitrogen); Cloroformo (Química Meyer); TE (Apéndice).

Electroforesis en geles de agarosa: agarosa grado Biología Molecular (Research Organics); solución amortiguadora para electroforesis TAE 1X (Apéndice); amortiguador de carga 6X (Fermentas); bromuro de etidio (BIO-RAD).

Formación de biopelícula: Solución amortiguadora de fosfatos (PBS) (Apéndice); Solución de cristal violeta (Hycel); Etanol (Química Meyer); Acetona (Baker Analyzed); Placas de poliestireno de 96 pozos (NUNC)

6.3 Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento.

Se estudiaron 32 cepas de *E. coli* aisladas de orina de pacientes ambulatorios con infecciones recurrentes de vías urinarias del Hospital General “Dr. Manuel Gea González”. Las infecciones recurrentes se definieron como 3 o más infecciones documentadas mediante cultivo en un año, o 2 o más en 6 meses (Rahn, 2008), la valoración clínica se realizó por los médicos de dicho hospital. Los pacientes no tenían alteraciones morfológicas en el tracto urinario, en el caso de las mujeres no presentaban embarazo y no padecían alguna enfermedad degenerativa grave.

La identificación de las bacterias se realizó en el laboratorio clínico del Hospital “Dr. Manuel Gea González” utilizando el sistema automatizado MicroScan WalkAway. Para confirmar la identidad de las cepas se sembraron en placas de medio UTI (Chromogenic UTI Medium catálogo: CM0949A, OXOID, Inglaterra), el cual es un medio cromogénico selectivo y diferencial para presuntiva identificación de *E. coli*. Las cepas se incubaron de 16 a 18 horas a 37°C, si la coloración adquirida por las colonias fue de color rosa se consideraba como *E. coli*, luego se sembraron en tubos de gelosa especial (Apéndice) para su conservación, así como en medio Luria-Bertani con glicerol para su congelación. Las cepas se denominaron con claves para facilitar el manejo de los datos.

6.4 Ensayo de resistencia a antimicrobianos.

Para la evaluación del ensayo de resistencia a los antimicrobianos se realizó la técnica de difusión en agar método Kirby-Bauer (Bauer, *et al.* 1966) acuerdo a los lineamientos del Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) publicados en Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing del año 2005.

Las cepas se sembraron una noche previa al ensayo para tener células viables. El primer paso fue realizar una dilución de las células en solución salina isotónica a un valor de 0.5 en la escala de MacFarland. Enseguida, con un hisopo estéril se inocularon placas de agar Mueller-Hinton de 4 mm de espesor, tratando de cubrir en su totalidad la superficie de la placa, se incubó un momento a que la disolución de bacterias se absorbiera en el agar y se colocaron los discos impregnados de los antimicrobianos a estudiar. Los antimicrobianos utilizados fueron los siguientes: Ampicilina 10 ug (AMP10); Amoxicilina-Ácido clavulánico 2:1 30 ug (AMC30); Cefazolina 30 ug (KZ30); Ceftriaxona 30 ug (CRO30); Cefepima 30 ug (FEP30); Ciprofloxacino 5 ug (CIP5); Gentamicina 10 ug (CN10); Nitrofurantoina 300 ug (F300); Trimetoprim-Sulfametoxazol 25 ug (SXT25); Meropenem 10 ug (MEM10), todos los sensidiscos fueron marca OXOID.

Las placas de agar Mueller-Hinton inoculadas y con los discos colocados se incubaron de 16 a 18 horas a 37°C. Al término de la incubación se midieron con un vernier los halos de inhibición que se presentaron con cada uno de los discos. Los resultados fueron interpretados según lo reportado por el CLSI en Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement de 2005 (CLSI, 2005).

6.5 Ensayo de detección fenotípica de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE).

Para el ensayo de la detección fenotípica de enzimas BLEE se utilizó la técnica de sinergismo de doble disco de Jarlier (Jarlier, *et al.* 1988), esto basado en la actividad inhibitoria del ácido clavulánico. La prueba consiste en colocar un disco de amoxicilina/clavulanato (20/10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) en el centro de una placa de Mueller Hinton a distancia de 30 mm de uno de ceftazidima (30 μg), ceftriaxona (30 μg) y cefepima (30 μg). El sinergismo observado entre algunas de las cefalosporinas y la amoxicilina/clavulanato expresa la producción de la BLEE.

6.6 Ensayo de formación de biopelícula.

Para la formación de la biopelícula se realizó lo reportado por O'Toole (O'Toole, *et al.* 1999), se utilizaron placas de poliestireno de 96 pozos de fondo redondo. Las cepas bacterianas se cultivaron de 16 a 18 horas en 1 mL de caldo Luria-Bertani a 37°C, después se realizó una dilución 1:100 de esta siembra ahora en medio M9. De la dilución se tomaron 200 µl por cepa y se colocaron dentro de cada uno de los pozos, realizándose por triplicado. Ya con los pozos de la placa de poliestireno conteniendo el medio inoculado se procedió a cubrir con película plástica adherente la parte superior de las placas para evitar la evaporación del mismo.

Las placas se incubaron durante 48 horas a 37°C. Al término de la incubación, se retiró el medio de cada uno de los pozos y se lavó con solución amortiguadora de fosfatos (PBS), tratando de no dejar residuos de PBS en los pozos. Posteriormente, se agregó a cada pozo 200 µL de solución de cristal violeta al 3% y se dejó actuar durante 30 minutos, al término de este tiempo se retiró el colorante y se lavaron los pozos nuevamente con PBS tratando de no dejar exceso de líquido dentro de los pozos. La placa se dejó secar al aire durante 1 hora. A continuación se agregaron 200 µL de una mezcla de etanol-acetona (4:1) para solubilizar y retirar el colorante adherido a las células.

La cuantificación se llevó a cabo mediante espectrofotometría, colocando el contenido de 3 pozos (600 µL) de la disolución de etanol-acetona con el colorante dentro de una celda de plástico de 1 cm de paso óptico para la medición de la absorbancia a una longitud de onda de 600 nm en un espectrofotómetro JENWAY 6320D. La cepa de *E. coli* denominada "Naranja" se utilizó como control positivo, la cual se ha confirmado por microscopía su capacidad formadora de biopelícula, mientras que como control negativo se utilizó una cepa inocua de laboratorio llamada *E. coli* K12.

Para la obtención de las imágenes y evaluar la biopelícula de forma cualitativa se utilizaron portaobjetos dentro de tubos para centrifuga de 50 mL, una vez esterilizados se colocó dentro de los tubos 25 mL de medio M9 con la misma concentración de bacterias (1:100) que en el ensayo cuantitativo. Se incubaron durante 48 horas a 37°C. Al término del periodo de incubación se sacaron los portaobjetos de los tubos, se lavaron suavemente con PBS y se fijaron con una mezcla de metanol - ácido acético (3:1) dejándolos secar al aire. Después se tiñeron con cristal violeta al 1% durante 30 minutos, se retiró el exceso de colorante y se procedió a hacer las observaciones en el microscopio óptico.

6.7 Obtención de ADN plasmídico.

La obtención de ADN plasmídico se llevó a cabo mediante la técnica de lisis alcalina. Las cepas se sembraron en 2 mL de caldo LB, se incubaron a 37°C por 18 horas con agitación, después se centrifugaron a 15,000 x g en la microcentrifuga de mesa durante 1 minuto, el botón se resuspendió en 100 µL de solución de lisis I (Apéndice) fría y se agitó vigorosamente en vortex, se agregó 200 µL de solución de lisis II (Apéndice), recientemente preparada, se invirtieron varias veces los tubos (sin agitación), después se agregaron 150 µL de solución de lisis III (Apéndice) sobre una cama de hielo, agitando por inversión los microtubos para formar un líquido viscoso, se dejó durante 5 minutos en hielo. El lisado se centrifugó a 17,000 x g por 5 min a 6°C, posteriormente se separó el sobrenadante y se colocó en un tubo limpio y se agregó solución de fenol-cloroformo (1:1 v/v) agitando en vortex para formar una emulsión y se centrifugó a 17,000 x g por 2 min a 6°C, la fase acuosa resultante se transfirió a un tubo limpio.

Se añadieron 2 volúmenes de etanol y se mezcló la solución en vortex durante 2 minutos, se centrifugó durante 5 min a 14,000 rpm a 6°C. Se retiró el sobrenadante de los tubos mediante una aspiración suave, para retirar el exceso de líquidos se colocaron en posición invertida sobre un pedazo de papel absorbente. Se añadió 1mL de etanol al 70% (v/v) y el botón se resuspendió suavemente mediante inversión del

tubo, luego se centrifugó durante 2 min a 17,000 x g a 6°C. Se retiró cuidadosamente el sobrenadante y el botón se dejó secar durante 10 minutos, luego se resuspendió en 50 µL de solución amortiguadora TRIS-EDTA (TE) pH 8.0 (Apéndice).

El ADN plasmídico se observó en geles de agarosa (Agarose, low EEO, Molecular Biology Grade; Research Organics, cat: 1170A) al 0.5% (m/v), se mezclaron las muestras obtenidas con solución de corrida para ADN (6x DNA loading dye, Fermentas) y se colocaron en los pozos del gel. El gel se colocó en una cámara de electroforesis (BioRad) con solución amortiguadora TRIS-Ácido acético-EDTA 1x (TAE) (Apéndice), con ayuda de una fuente de poder para electroforesis (EPS3500, Pharmacia) a las condiciones: 70V, 45mA, 4W.

Se procedió a teñir el gel con bromuro de etidio (Bio Rad) 10% (v/v) durante 30 minutos con agitación ligera, se enjuagó dos veces con agua corriente y se colocó en un transiluminador con luz ultravioleta (High Performance Ultraviolet Transilluminator, UVP) para su posterior lectura con el software del instrumento (UVP).

6.8 Obtención del ADN bacteriano.

Se utilizó la técnica de Le Bouguenec (Le Bouguenec, 1992), las cepas bacterianas se sembraron en 1 mL de medio Luria, se incubaron por 18 horas a 37° C, posteriormente se centrifugaron a 8000 x g durante 3 minutos en una microcentrifuga de mesa, y el botón bacteriano se lavó una vez con 500 µL de agua destilada. El botón se resuspendió en 200 µL de agua destilada estéril, los tubos se dejaron incubar en hielo durante 5 minutos, posteriormente se colocaron en baño maría a ebullición durante 10 minutos. Al término de este tiempo se colocaron nuevamente en hielo durante 2 minutos. Los tubos se centrifugaron a 8000 x g durante 5 minutos, finalmente el sobrenadante se colocó en un tubo estéril nuevo.

6.9 Análisis de amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD).

El análisis mediante la amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD) requiere de la obtención de ADN correspondiente a cada una de las cepas estudiadas, para lo cual se extrae mediante la técnica de ebullición.

El RAPD se basa en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), sin embargo cuenta con una modificación correspondiente a la utilización de un solo iniciador para la reacción, ya que se basa en la amplificación aleatoria de regiones del ADN, para lo cual se utilizan iniciadores de 10 bases, estos iniciadores pueden o no amplificar segmentos de ADN de la muestra, lo cual depende de diversos factores entre los que destacan los siguientes: que se encuentre una secuencia complementaria a los iniciadores y/o que los iniciadores se acoplen a la cadena de ADN en extremos muy alejados. Por lo tanto, si se han producido mutaciones en el ADN en sitios donde antes era complementario el iniciador, ya no se producirá este producto de PCR, lo que da por resultado un patrón diferente del amplificado. El ADN obtenido mediante lo descrito anteriormente es utilizado como el templado para el análisis RAPD, para el iniciador utilizado corresponden las cantidades de los reactivos en la mezcla de reacción así como las condiciones utilizadas para llevarla a cabo, estas especificaciones se muestran en la tabla 2.

Iniciador	Secuencia	Mezcla de reacción	Programa	Referencias
1247	5'- AAG AGC CCG T-3'	Vol. final: 30 μ L dNTP: 0.2mM Sol. amortiguadora 10X: 1X Iniciador: 30pmol/ μ L Taq polimerasa:2 U ADN: 5 μ L	1 ciclo: 95°C; 15 min 35 ciclos: 94°C; 1 min 35°C; 1 min 72°C; 2 min 1 ciclo: 72°C; 10 min	Schmidt, <i>et al.</i> 1999. Nielsen, <i>et al.</i> 2014.
1254	5'- CCG CAG CCA A-3'	Vol. final: 30 μ L dNTP: 0.2mM Sol. amortiguadora 10X: 1X	1 ciclo: 94°C; 1min 4 ciclos: 94°C; 4 min	Bart, <i>et al.</i> 1998. Schmidt, <i>et al.</i> 1999

Iniciador: 6pmol/uL	35°C; 4 min
Taq pol: 12.5 U	72°C; 4 min
ADN: 10 uL	35 ciclos:
	94°C; 1 min
	35°C; 1 min
	72°C; 2 min
	1 ciclo:
	72°C; 10 min

Tabla 2. Volúmenes de reactivos y condiciones para la realización de análisis RAPD.

7. RESULTADOS

Resistencia a antimicrobianos

Se obtuvieron 32 cepas de *E. coli uropatógena* (UPEC) de pacientes ambulatorios con infecciones recurrentes del tracto urinario. Se determinó la susceptibilidad de todas las cepas ante 10 diferentes agentes antimicrobianos: ampicilina y amoxicilina con ácido clavulánico del grupo de las penicilinas; cefazolina, ceftriaxona y cefepima del grupo de las cefalosporinas; ciprofloxacino por las fluoroquinolonas; gentamicina por los aminoglucósidos; meropenem por los carbapenémicos; trimetoprim-sulfametoxazol para el grupo de las sulfas; y nitrofurantoína como de otros grupos.

Respecto a los resultados obtenidos 24 de las 32 cepas (75%) fueron resistentes a tres o más antimicrobianos de diferentes familias, con lo que se observa que la multirresistencia es una característica importante en este tipo de cepas.

Los diferentes aislados de *E. coli* presentaron un alto porcentaje de resistencia a cuatro de los 10 antimicrobianos probados, siendo ampicilina el que mostró el porcentaje más elevado (78.13%), seguido por ciprofloxacino (71.88%), trimetoprim con sulfametoxazol (68.75%) y la cefalosporina cefazolina (56.25%). El antimicrobiano al cual los aislados no presentaron resistencia fue meropenem (0%) y seguido con resistencia muy baja nitrofurantoína (15.63%). Estos resultados son mostrados en la figura 5.

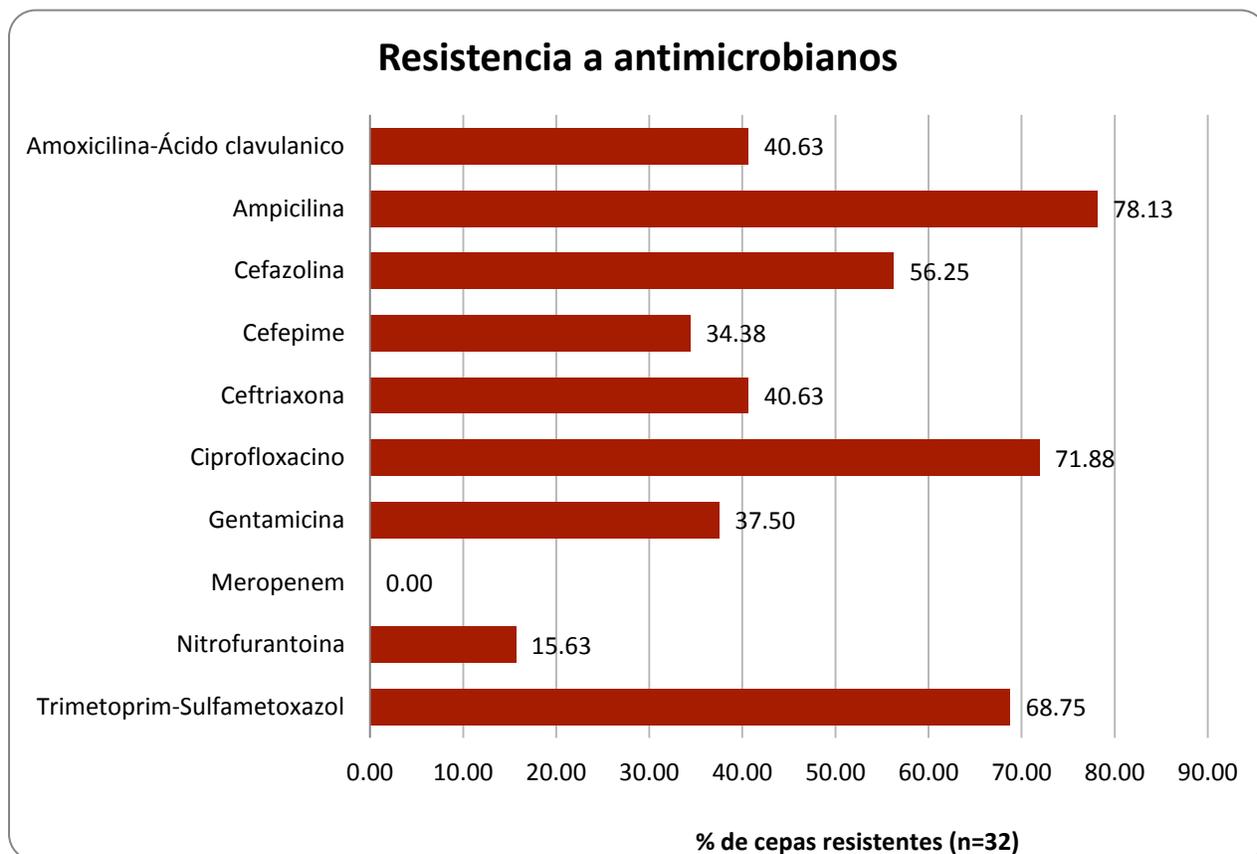


Figura 5. Porcentaje de resistencia a 10 diferentes agentes antimicrobianos. Se muestran los porcentajes de resistencia de 32 diferentes aislados de *E. coli* uropatógena. La prueba de susceptibilidad antimicrobiana se realizó por difusión en agar.

Análisis fenotípico de cepas productoras de enzimas β -lactamasas de espectro extendido (BLEE).

Para demostrar si las cepas que resultaron resistentes a cefalosporinas son productoras de enzimas BLEE, se realizó la prueba que nos indica inhibición de las enzimas BLEE por el clavulanato, el cual se une de manera irreversible a la enzima y provoca su inactividad. Los resultados mostraron que 12 (37.5%) de las 32 cepas UPEC estudiadas poseen capacidad para producir enzimas BLEE (gráfica 2), es decir que las 12 cepas produjeron enzimas que rompieron el anillo β -lactámico de 3 diferentes cefalosporinas (Ceftazidima, ceftriaxona y cefepime), desactivando con esto las propiedades antimicrobianas de las 3 moléculas.

Capacidad de formación de biopelícula por los aislados de UPEC

La formación de biopelícula se determinó de forma cualitativa y semicuantitativa. En la forma cuantitativa se determinó el valor de absorbancia después de teñir con cristal violeta a la biopelícula formada. En la figura 6 se presentan los valores obtenidos para cada una de las cepas estudiadas.

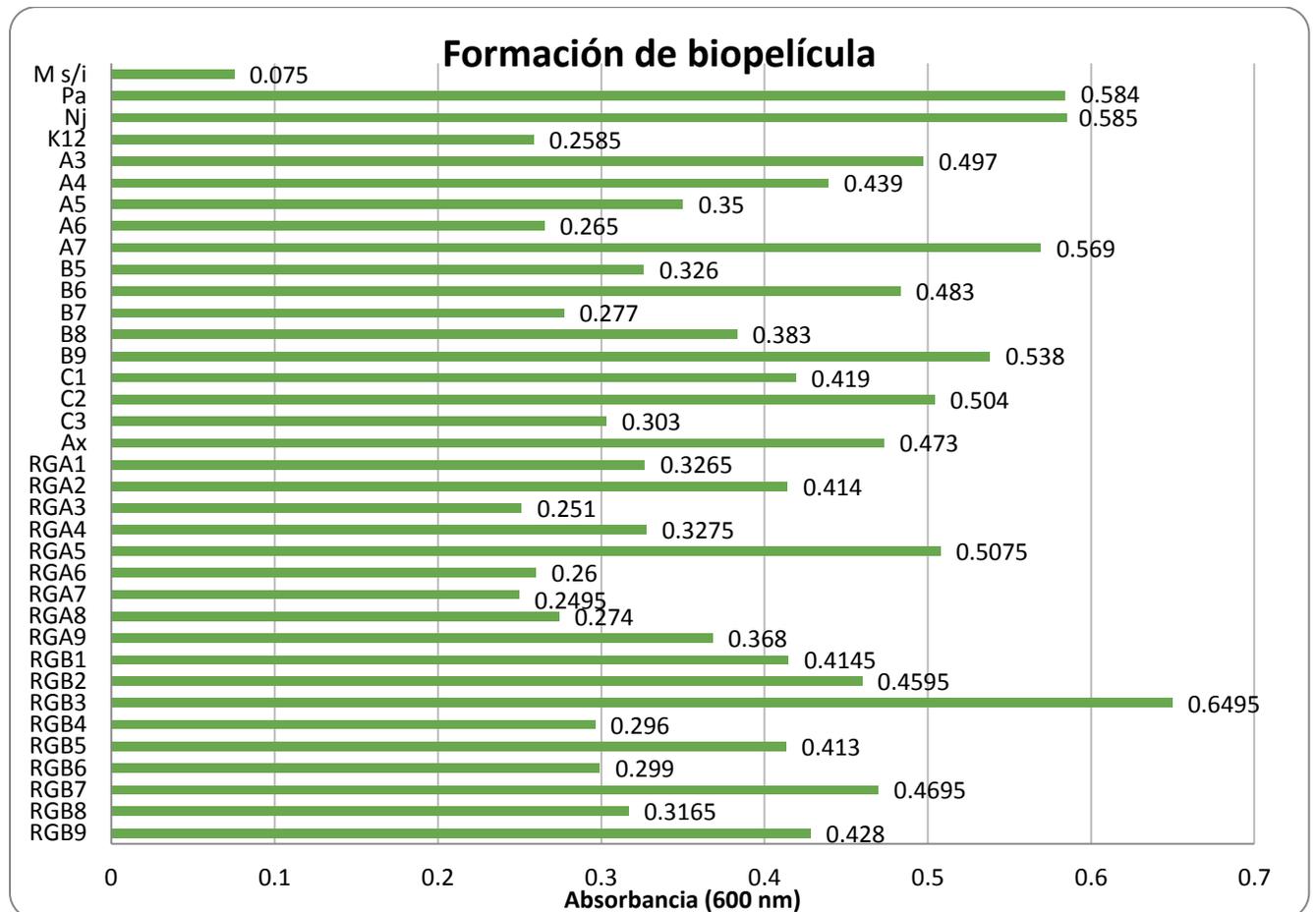


Figura 6. Capacidad de las cepas UPEC para formar biopelícula. DO600nm de bacterias UPEC adheridas. Controles positivos: *Pseudomonas aeruginosa* (Pa) y *E. coli* (Nj); control negativo: *E. coli* (K12); control del experimento: Pozo de la placa de poliestireno sin inocular (M s/i).

La capacidad de los distintos aislados de formar biopelícula se determinó semicuantitativamente y los valores obtenidos a una DO 600nm se los clasificó en 4 categorías: fuerte: ≥ 6.00 , moderada: 5.99 - 4.00; débil: 3.99 - 2.00 y no formadora:

≤ 1.99 ; de acuerdo con la fórmula propuesta por Faleiro en 2010 (Faleiro, 2010): Abs 600nm (muestra) / Abs 600nm (medio sin inocular).

Bajo este criterio, 10 (31.25%) de las 32 cepas fueron consideradas fuerte productoras de biopelícula, 14 (43.75%) productoras moderadas y 8 (25%) como productoras débiles, ninguna de las cepas de estudio fue considerada como no formadora. En la tabla 3 se muestran los resultados obtenidos.

Capacidad de producción de biopelícula		
Categoría	Cepas	Porcentaje (%)
Fuerte	10	31.25
Moderada	14	43.75
Débil	8	25
No formadora	0	0

Tabla 3. Clasificación semicuantitativa de la formación de biopelícula en 4 categorías, según Faleiro 2010.

Perfil plasmídico

La presencia de material plasmídico le da ventajas a las bacterias que lo portan, dada esta importancia en este estudio se encontró que 27 de las 32 cepas presentan al menos un plásmido (84.38%), de acuerdo a su corrimiento en geles de agarosa (electroforesis) la masa molecular de estos plásmidos es mayor a 50 kb. También se encontraron cepas que presentaron 2 o 3 plásmidos, en la figura 7 se muestra un gel de agarosa donde se determinó el número de plásmidos para cuatro cepas y en la figura 8 se presenta el número de plásmidos que contienen cada una de las cepas estudiadas.

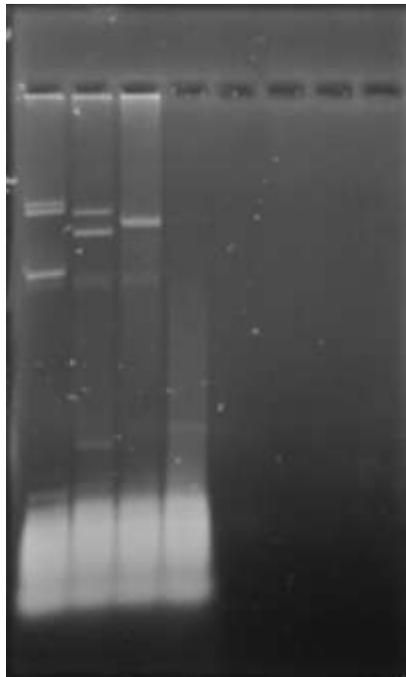


Figura 7. Gel de agarosa de ensayo de extracción de plásmidos. Se observa que en los cuatro carriles hay 3, 2, 1 y 0 plásmidos respectivamente.

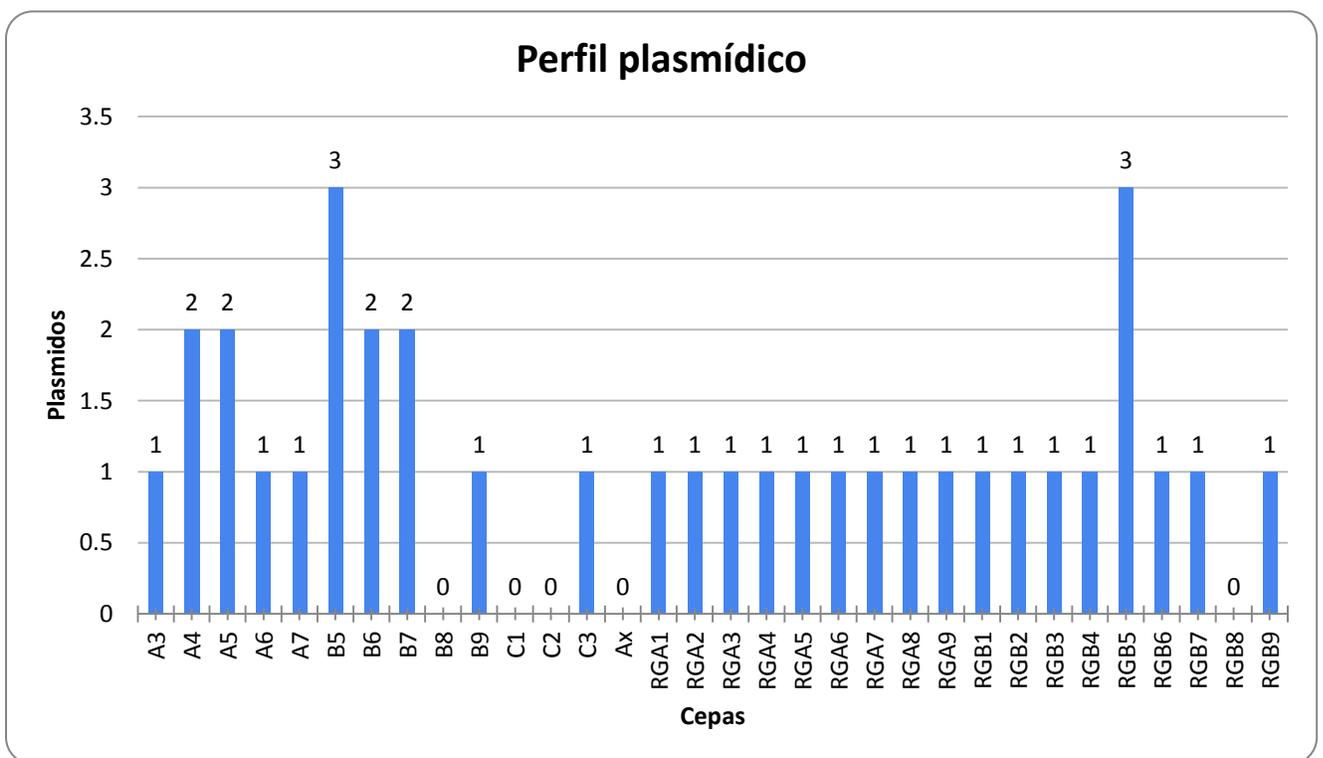


Figura 8. Perfil plasmídico que indica la cantidad de plásmidos presentes en cada una de las 33 cepas evaluadas.

Análisis y relación entre las características bacterianas evaluadas

Con el objetivo de encontrar un perfil de características en común entre los aislados de infecciones recurrentes se elaboró una tabla y se analizaron las cuatro características evaluadas en el presente estudio; multirresistencia a agentes antimicrobianos, presencia de plásmidos, producción de enzimas BLEE y capacidad de formar biopelícula. La tabla 4, muestra las cuatro características evaluadas en este estudio. Para estas asociaciones se consideran como positivas a las cepas productoras de biopelícula moderada. Sólo 6 cepas (18.18%) mostraron la presencia de las cuatro características evaluadas.

También se buscaron las asociaciones entre cada una de las características, la relación entre la multirresistencia y la presencia de plásmidos fue de 62.5%, la relación entre la multirresistencia y la expresión de BLEE fue de 34.38%, entre multirresistencia y biopelícula 53.13%.

La relación entre presencia de plásmidos y expresión BLEE es de 28.13% y entre plásmidos y formación de biopelícula es de 59.38%. Para finalizar la relación entre la expresión BLEE y la formación de biopelícula corresponde al 31.25%. Estos valores se muestran en la figura 9.

Cepa	Multirresistencia	Plásmidos	BLEE	Biopelícula
A3	SI	1	-	F
A4	SI	2	-	M
A5	SI	2	-	M
A6	SI	1	SI	D
A7	SI	1	-	F
B5	SI	3	-	M
B6	-	2	-	F
B7	-	2	-	D
B8	SI	0	SI	M
B9	SI	1	SI	F*
C1	-	0	-	M
C2	SI	0	SI	F
C3	SI	1	-	M
Ax	SI	0	-	F
RGA1	-	1	-	M
RGA2	SI	1	SI	M
RGA3	SI	1	-	D
RGA4	SI	1	-	M
RGA5	SI	1	SI	F
RGA6	SI	1	-	D
RGA7	SI	1	-	D
RGA8	SI	1	-	D
RGA9	-	1	SI	M
RGB1	SI	1	SI	M
RGB2	SI	1	SI	F
RGB3	-	1	-	F
RGB4	SI	1	SI	D
RGB5	-	3	-	M
RGB6	-	1	-	D
RGB7	SI	1	SI	F
RGB8	SI	0	SI	M
RGB9	SI	1	-	M

Tabla 4. Agrupación de los resultados de los estudios realizados.

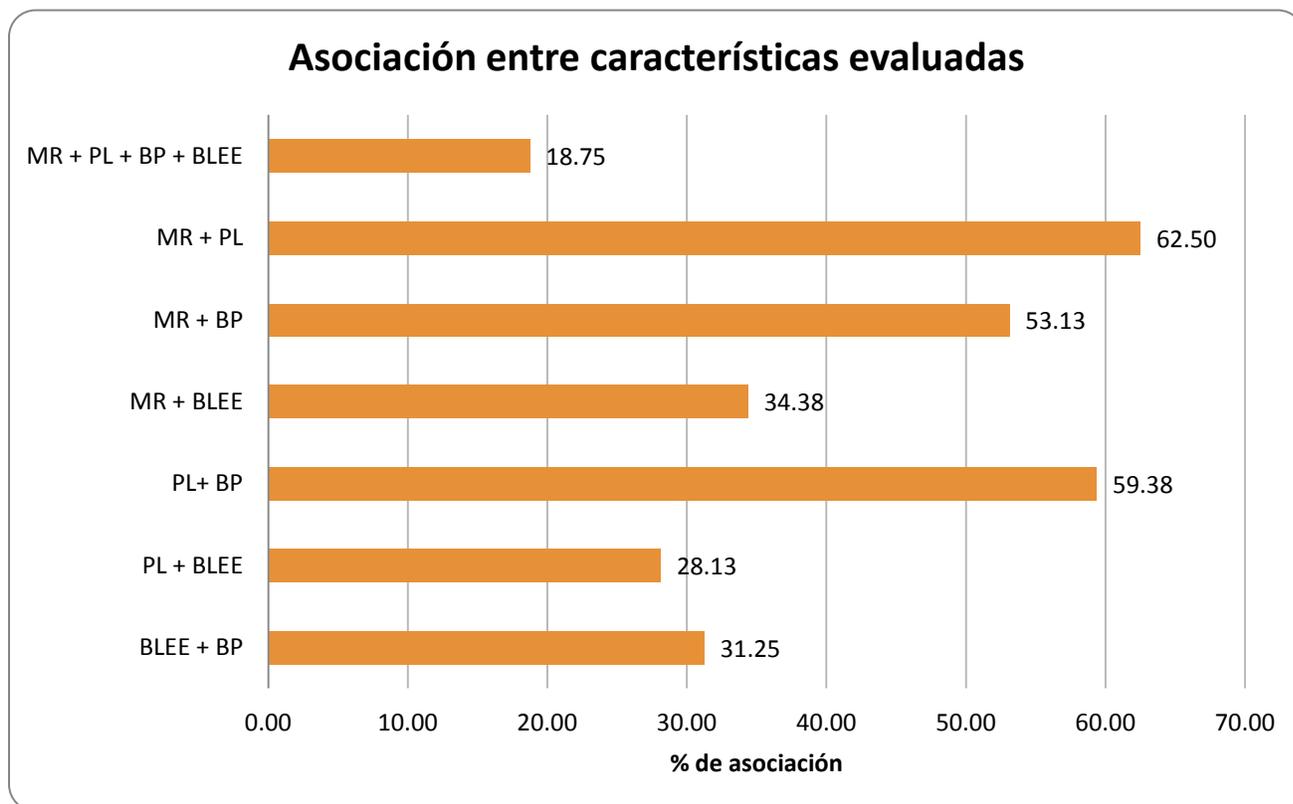


Figura 9. Asociación entre las características evaluadas. MR - Multirresistencia a antimicrobianos; PL - Presencia de material plasmídico; BP - Formación “fuerte/moderada” de biopelícula; BLEE - Expresión fenotípica de enzimas β -lactamasas de espectro extendido.

Análisis de amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD)

Se investigó la relación genética entre los 33 cepas aisladas mediante el RAPD utilizando dos iniciadores de secuencia arbitraria, estos se conocen como 1247 y 1254.

La figura 10 muestra los perfiles electroforéticos obtenidos mediante el RAPD, con cada uno de los iniciadores utilizados. En el dendograma se pueden observar 4 agrupamientos o clusters (I-IV), en los grupos I y II se encontraron el mayor número de cepas (13 y 11 cepas respectivamente). La tabla X muestra la distribución de los rasgos de virulencia entre los diferentes clusters formados. No hay diferencia significativa entre los clusters en cuanto a la multirresistencia (61.5, 90.9, 75 y 75%

respectivamente). En el clúster II se concentraron más rasgos de virulencia que en los otros.

La figura 11 muestra el dendograma resultante del análisis así como una tabla indicativa de las demás evaluaciones realizadas en el estudio.

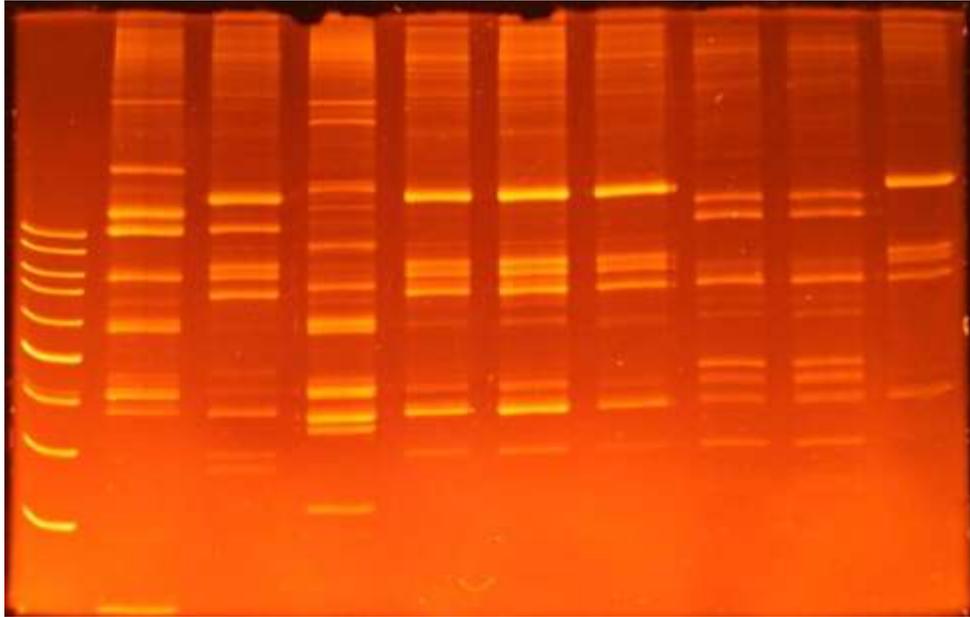


Figura 10. Perfil electroforético del análisis RAPD con el iniciador 1254.

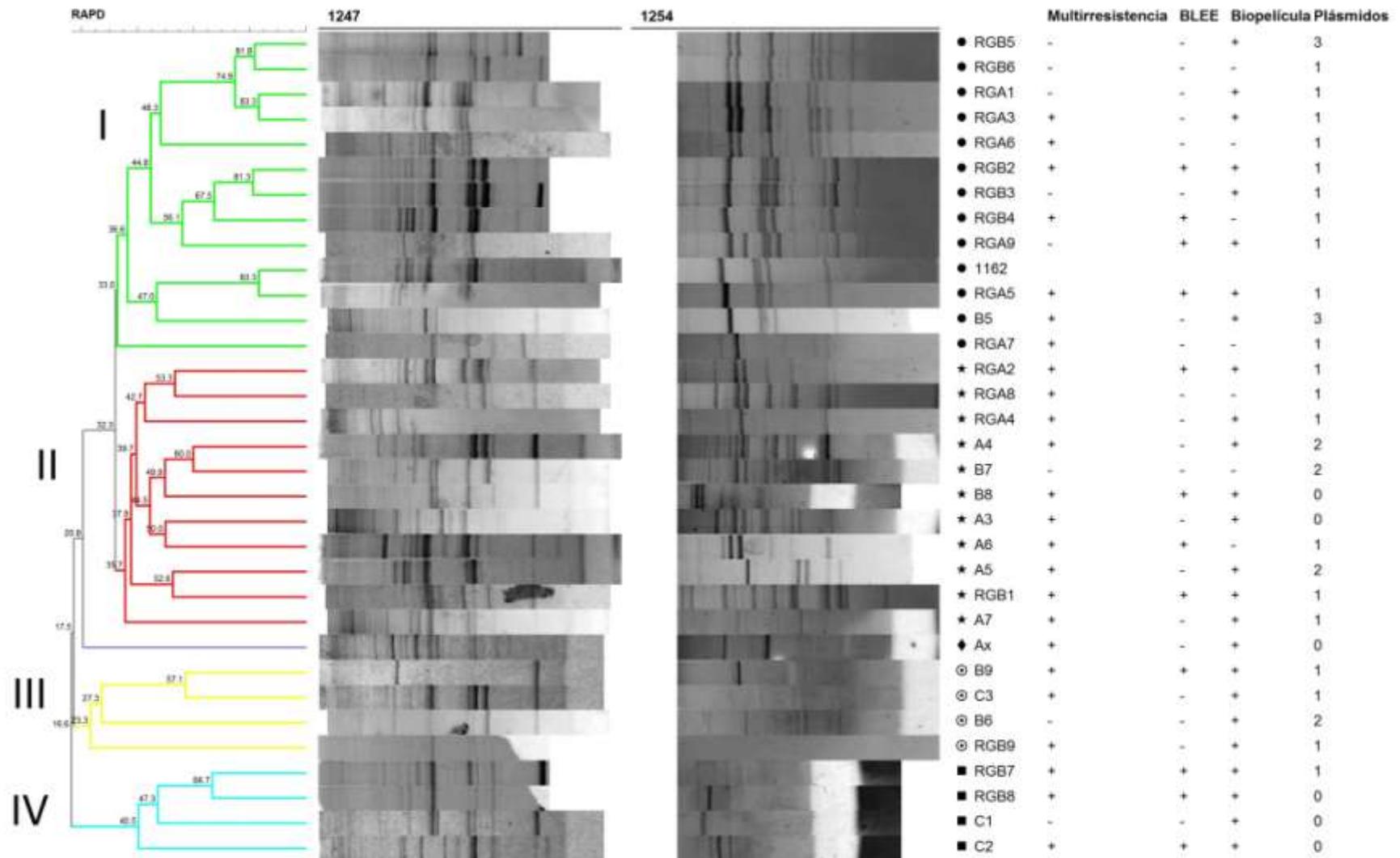


Figura 11. Dendrograma y análisis de agrupamiento por medio del índice de Jaccard y el método UPGMA, se complementa con los datos de multirresistencia a antimicrobianos, producción de enzimas BLEE, formación de biopelícula y número de elementos plasmídicos presentes en las cepas. Los grupos se observan coloreados y en los nodos del dendrograma se encuentran los valores de similitud que hay entre cepas. Análisis e imagen elaboradas en GelCompar II (Applied Maths, Bélgica).

Rasgo de virulencia	Cluster I	Cluster II	Cluster III	Cluster IV
Multirresistencia				
a	61.5%	90.9%	75%	75%
antimicrobianos				
BLEE	38.5%	36.3%	25%	100%
Biopelícula	53.8%	72.7%	100%	100%
Plásmidos	76.9%	81.8%	75%	25%

Tabla 5. Distribución de los rasgos de virulencia entre los diferentes clusters formados mediante el RAPD con los iniciadores 1247 y 1254.

8. DISCUSIÓN

E. coli uropatógena UPEC es causante de aproximadamente el 90% de las ITU. UPEC presenta muchos factores de virulencia que le permiten colonizar e invadir la mucosa uroepitelial del hospedero. Un problema común en las ITU es la recurrencia, esto es infecciones repetidas que a pesar de los tratamientos con antimicrobianos las infecciones continúan. Dichas infecciones se deben, en la mayoría de los casos a la misma cepa que originó la primera infección. Así la tendencia de estas infecciones es convertirse en infecciones permanentes, lo cual representa un serio problema de salud.

En este trabajo se estudiaron las cepas de UPEC causantes de infecciones recurrentes, pensamos que estas cepas (recurrentes) son diferentes a las causantes de infecciones urinarias agudas, estas últimas generalmente son eliminadas después de un tratamiento con antibióticos que incluye prueba de antibiograma. Se ha reportado que las cepas recurrentes tienen factores de virulencia adicionales que favorecen su permanencia en el tracto urinario. En este estudio se analizó algunas características de las cepas recurrentes; su perfil de susceptibilidad a los antimicrobianos incluyendo la producción de β -lactamasas de espectro extendido, presencia de plásmidos, su capacidad de formar biopelícula y su posible relación clonal entre dichos aislados.

Varios estudios han demostrado en general un incremento en los niveles de resistencia a antimicrobianos de cepas *E. coli* causantes de infecciones del tracto urinario de pacientes ambulatorios (Daza, *et al.* 2001; Goettsch, *et al.* 2000; Goldstein, 2000).

En este trabajo se muestra que 75% de las cepas aisladas resultaron multirresistentes, considerando como multirresistentes aquellas cepas que son resistentes a tres o más familias de antimicrobianos. Este porcentaje de cepas multiresistentes es muy alto comparado con el de los aislados provenientes de ITU no-recurrentes, un reporte de este mismo grupo de estudio (Molina, *et al.* 2013) mostró que 30.2% de las cepas aisladas de ITU fueron multiresistentes, el estudio se realizó en la misma población de la Ciudad de México. En dicho estudio sólo se consideró que las muestras sean de ITU sin saber si se trataba de infección recurrente o no. En otros estudios en países como India, Irán y Serbia los porcentajes de cepas multirresistentes en aislados de ITU no-recurrentes son similares (30-36%) a los mostrados por Molina y colaboradores (Derakhshandeh, *et al.* 2015; Kothari, *et al.* 2008; Molina, *et al.* 2011; Neamati, *et al.* 2014; Rijavec, *et al.* 2006).

En particular las cefalosporinas son un grupo de antibióticos muy efectivos y la resistencia reportada en cepas de *E. coli* aisladas de ITU es en promedio máximo de 20% para las cefalosporinas de primera y segunda generación (Cefazolina), mientras que las cefalosporinas de tercera y cuarta generación (Ceftriaxona y Cefepime) presentan menos del 10% de cepas resistentes. En contraste, en este estudio 40% y 33% de las cepas aisladas de ITU recurrentes resultaron resistentes a cefalosporinas de tercera y cuarta generación (Ceftriaxona y Cefepime), respectivamente, demostrando que en general las cepas aisladas de ITU recurrentes han adquirido resistencia en mayor proporción que las cepas aisladas de ITU no-recurrentes. Esto se puede observar claramente en un estudio anterior, con cepas aisladas de ITU no-recurrentes en la misma población de la Ciudad de México, donde los porcentajes de resistencia para las cefalosporinas de tercera y cuarta generación fueron de 10% y 7.6%, respectivamente (Molina, *et al.* 2011).

Los resultados obtenidos en este estudio indican que una consecuencia de las infecciones recurrentes, es favorecer en las bacterias el desarrollo de resistencia a los antimicrobianos. Se sabe que los tratamientos con antibióticos que no logran erradicar a las bacterias, lo que hacen es seleccionar a las resistentes, e inducir en ellas su adaptación en ambientes con antibióticos, esto es desarrollar resistencia. Por lo tanto, es muy posible que las cepas causantes de infecciones recurrentes estén expuestas con mayor frecuencia a los antimicrobianos que las cepas de infecciones agudas.

La resistencia a los fármacos no es el único mecanismo que utilizan estas cepas de UPEC para prevalecer en su hospedero, dentro del mismo contexto, la producción de enzimas como las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) también colaboran con la evasión de los tratamientos contra la infección. Desde que fueron reportadas por primera vez en 1983 (Knothe, *et al.* 1983), el aumento de cepas productoras de estas enzimas ha ido en aumento (Machado, *et al.* 2007). Aquí demostramos que 36% de las cepas aisladas de ITU recurrentes son productoras de enzimas BLEE es decir que 12 de las 33 cepas produjeron enzimas que rompieron el anillo β -lactámico de 3 diferentes cefalosporinas (Ceftazidima, ceftriaxona y cefepime) y que son inhibidas por el clavulanato, el cual se une de manera irreversible a la enzima. Este porcentaje de cepas productoras de BLEE es muy alto, sobre todo si consideramos que se trata de pacientes ambulatorios. Porcentajes más bajos (promedio de 20%) de *E. coli* productoras de BLEE son reportados en casos de ITU no-recurrentes de la Ciudad de México (López-Banda, *et al.* 2014),

En Francia, un estudio ha descrito que en aguas residuales se encuentra una gran cantidad de cepas de *E. coli* productoras de BLEE (96% de los aislados), sugiriendo que estas concentraciones de bacterias productoras son reflejo de que gran parte de la población tiene estas bacterias presentes en su tracto digestivo (Brechet, *et al.* 2014). Debido al uso de aguas residuales para procesos agropecuarios, los animales de corral como puercos y pollos pueden convertirse en reservorios de estas cepas y que a su vez sirven de fuente de contaminación para humanos (Cornejova, *et al.* 2015; Machado, *et al.* 2008).

Las biopelículas bacterianas son complejas comunidades microbianas que muestran limitada sensibilidad a los antimicrobianos tradicionales, a la reacción del sistema inmunológico y a estímulos externos, la adquisición de estas ventajas hace que sea más complejo el tratamiento de las infecciones recurrentes (Cegelski, *et al.* 2009; Ito, *et al.* 2009; Mittal, *et al.* 2015; Teodosio, *et al.* 2012; Soto, *et al.* 2005)

En nuestros resultados observamos que 24 de 32 cepas (75%) formaron biopelículas de las consideradas “fuertes” y “moderadas”, este porcentaje es superior a lo reportado por Mittal y colaboradores, donde se mencionan porcentajes cercanos al 20% en ITU no-recurrentes (Mittal, *et al.* 2015). Un estudio, pero en aislados de ITU recurrentes reportó porcentajes cercanos al 70% (Soto, *et al.* 2006). Dicha investigación apoya nuestros resultados ya que encontraron que la formación de biopelícula *in vitro* es más frecuente entre las *E. coli* causantes de ITU recurrentes (recaídas con la misma cepa) que las *E. coli* asociadas con reinfecciones (causada por una cepa nueva de *E. coli*). En otro estudio con muestras de 155 mujeres no se encontró una correlación entre la formación de biopelícula *in vitro* y las cepas causantes de infección recurrente, en este caso los experimentos de biopelícula se realizaron con medios de cultivo diferentes al utilizado en nuestra investigación, el cual es un medio mínimo (M9) compuesto únicamente de sales y adicionado con glucosa (Sambrook 2001).

La formación de biopelícula es considerada como un factor de virulencia dentro del repertorio de las cepas UPEC, ya que favorece el establecimiento de las bacterias en el epitelio del tracto urinario (Oliveira, *et al.* 2015; Ponnusamy, *et al.* 2012) Se ha descrito que uno de los factores importantes para que las cepas UPEC establezcan infecciones recurrentes es la formación de comunidades bacterianas intracelulares, las cuales corresponden a asociaciones parecidas a las biopelículas al interior de las células que han sido colonizadas y a su vez éstas pueden migrar a las células adyacentes para evadir la exfoliación del epitelio (Flores-Mireles, *et al.* 2015; Oliveira, *et al.* 2014; Schwartz, *et al.* 2015).

Esta no es la única implicación que tienen las biopelículas en las ITU recurrentes, diversas publicaciones han demostrado que la formación de biopelícula está relacionada directamente con la multirresistencia a antimicrobianos y la producción de enzimas BLEE (Ito, *et al.* 2009; Mittal, *et al.* 2015; Oliveira, *et al.* 2014; Ponnusamy, *et al.* 2015). Este aumento en la resistencia a los fármacos y la activa participación de las enzimas BLEE corresponde a que los antimicrobianos tienen dificultad de llegar a los estratos más internos de las biopelículas, por lo tanto son inefectivos, de la misma manera las enzimas BLEE se acoplan a la matriz que forma la biopelícula, realizando su función en beneficio de un mayor número de bacterias (Aslam, 2002; Tenke, *et al.* 2006).

Respecto a los plásmidos, en nuestro estudio se encontró que el 84% de las cepas portan al menos un plásmido grande, mayor de 50 kb, al respecto no existen estudios publicados que hablen acerca de la presencia de material plasmídico en cepas causantes de infecciones recurrentes, pero existen trabajos que hablan sobre el perfil plasmídico de cepas UPEC que causan infecciones agudas, se menciona que del 79 a 88% de las cepas portan plásmidos pero en su mayoría son plásmidos pequeños (Ali, *et al.* 2014; Farshad, *et al.* 2012). Recientemente se reportó que un plásmido grande de UPEC (114 kb) llamado UTI89 está involucrado en la invasión de la bacteria a las células de vejiga (modelo de cistitis en ratón), sobre todo en las primeras etapas de la infección (Cusumano, *et al.* 2010). Prácticamente no hay estudios que muestren la frecuencia en la que aislados de UPEC porten plásmidos grandes, sin embargo parece ser que es más frecuente de lo esperado.

La virulencia en enterobacterias se ha asociado con la adquisición de plásmidos grandes que confieren atributos patógenos. Estos plásmidos virulentos están generalmente en pocos números de copias, en tamaño son aproximadamente de 60 a 200 kb, y son usualmente similares a los plásmidos F o al plásmido R100 (Venkatesan, *et al.* 2004). Plásmidos virulentos de este tipo se han reportado en *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterotoxigénica, y *E. coli* enteroagregativa, y son

plásmidos grandes tipo F que típicamente codifican para diferentes adhesinas fimbriales que facilitan la colonización del epitelio intestinal. A pesar de que se ha descrito que un gran número de genes de resistencia a antimicrobianos son portados por plásmidos y además que son reservorio de factores de virulencia aún no se ha demostrado que tengan una participación directa sobre el establecimiento de las infecciones recurrentes (Erjnaes, 2011; Johnson, 2003).

La tipificación mediante RAPD-PCR nos permitió identificar grupos bacterianos relacionados clonalmente a partir de los 33 aislados de ITU recurrentes. El análisis filogenético basado en RAPD, utilizando dos iniciadores arrojó resultados interesantes; Encontramos claramente dos diferentes grupos clónales, el grupo I que está compuesto por 13 cepas que se relacionan genéticamente y el grupo II que tiene 11 cepas, en total tenemos 24 cepas (73%) que pertenecen a dos diferentes linajes. Esto significa que los aislados que forman un grupo muy probablemente tienen un origen ancestral en común, y que entre los aislados de diferentes grupos existen diferencias genéticas significativas.

Este resultado es importante porque nos indica que ciertos linajes en particular de *E. coli* se han adaptado muy bien al ambiente del tracto urinario, especialmente a la vejiga, y que posiblemente estos dos grupos clónales están capacitados para permanecer en el tracto urinario a pesar de los tratamientos. Sin embargo todavía hace falta realizar más estudios como PFGE para corroborar esta observación. Es frecuente encontrar grupos clónales entre los aislados provenientes de pacientes que están hospitalizados, porque se trata de cepas que están circulando dentro del hospital, sin embargo en este estudio los aislados fueron de pacientes ambulatorios que llegaron al hospital a consulta externa, y tienen en común que viven en la Ciudad de México y que tienen infecciones recurrentes del tracto urinario. El hecho de encontrar dos grupos clónales que comprenden el 73% de los aislados indica que las cepas de *E. coli* causantes de infecciones recurrentes están relacionadas genéticamente y posiblemente tienen características en común que las capacita a permanecer en el tracto urinario. Al respecto hay pocos estudios que analicen la relación filogenética de

aislados de infecciones recurrentes, en general en los diversos estudios no se ha reportado alguna relación clonal entre los aislados. La diferencia de dichos estudios con respecto al nuestro puede deberse a la selección de los pacientes con recurrencias, o a la región geográfica.

El grupo clonal II parece ser el más virulento debido a que la mayoría de sus cepas tienen determinantes de virulencia como plásmidos donde el 82% los posee, el 73% de los aislados son capaces de formar biopelícula, y 91% de los aislados son multiresistentes a los antimicrobianos.

Entre nuestros aislados posiblemente hay otros dos grupos clonales III y IV con cuatro cepas en cada grupo, sin embargo, sabemos que son pocas las cepas como para considerarlos grupos clonales. Al respecto en un futuro pensamos completar este estudio con más aislados de infecciones recurrentes para analizar la formación de los grupos clonales y saber si los grupos se mantienen o si surgen otros grupos clonales.

De acuerdo con la hipótesis de trabajo esperamos que nuestros aislados de infecciones recurrentes formen pocos grupos clonales con cepas especializadas o adaptadas al tracto urinario. Pensamos que sería muy útil tipificar nuestros aislados mediante MLST para identificar grupos clonales en específico involucrados con las infecciones recurrentes. Con esto podríamos comparar nuestros resultados con los de otras partes del mundo, a través de la tipificación del MLST.

Es bien sabido que existen diversos grupos filogenéticos entre las *E. coli*, de hecho varios de los patotipos de *E. coli* tienden a ser clonales, también el grupo de las *E. coli* extraintestinales incluyen grupos clonales uropatógenos tales como el O25:H4 ST131 y el grupo CGA ST69, los cuales, se han diseminado en todo el mundo. Los clones de *E. coli* altamente adaptados han adquirido atributos de virulencia específicos, los cuales les confieren mayor habilidad para adaptarse a un nuevo nicho y de esta forma poder causar un amplio espectro de enfermedades (Kaper, *et al.* 2004). Las diferentes cepas de *E. coli* responsables de la mayoría de los casos de UTI, sepsis y

meningitis neonatal representan un número limitado de clones virulentos que se derivan predominantemente del grupo filogenético de *E. coli* B2, y en menor grado al grupo D, de acuerdo con lo establecido por el ensayo de electroforesis de enzimas multilocus (Johnson, *et al.* 2001; Russo y Johnson 2000).

9. CONCLUSIONES

Las cepas de infecciones recurrentes han desarrollado significativamente multirresistencia a los agentes antimicrobianos, posiblemente debido a que han estado sobreexpuestas a dichos agentes en el hospedero.

La capacidad bacteriana de formar biopelícula y la presencia de plásmidos grandes deben ser muy importantes en el establecimiento de las infecciones, particularmente en las infecciones recurrentes.

Las cepas aisladas de infecciones urinarias recurrentes están relacionadas genéticamente y pertenecen en su mayoría a ciertos cluster o grupos clónales, los cuales aparentemente se han adaptado al ambiente del tracto urinario.

10. REFERENCIAS

- Ali, I., Kumar, N., Ahmed, S., Dasti, J.I., Antibiotic Resistance in Uropathogenic E. Coli Strains Isolated from Non-Hospitalized Patients in Pakistan. Journal of Clinical and Diagnostic Research. 8(9):1-4.
- Aslam, S. 2002. Effect of antibacterials on biofilms. American Journal of Infection Control. 36(10):9-11.
- Aydin, A., Ahmed, K., Zaman, I., Khan, M.S., Dasgupta, P., 2015. Recurrent urinary tract infections in women. International Urogynecology Journal. 26:795-804.
- Barber, A.E., Norton, J.P., Spivak, M.A., Mulvey, A., 2013. Urinary Tract Infections: Current and Emerging Management Strategies. Clinical Infectious Diseases. 57(5):719-724.
- Bart, A. Schuurman, I.G.A., Achtman, M., Caugant, D.A., Dankert, J., Van der Ende, A., 1998. Randomly Amplified Polymorphic DNA Genotyping of Serogroup A Meningococci Yields Results Similar to Those Obtained by Multilocus Enzyme Electrophoresis and Reveals New Genotypes. Journal of Clinical Microbiology. 1746-1749.
- Bauer, A., Kirby, W., Sherris, J., Turck, M., 1966. Antibiotic sensitivity testing by a standardized single disk method. American Journal of Clinical Pathology. 45:493-496.
- Bien, J., Sokova, O., Bozko, P., 2011. Role of Uropathogenic *Escherichia coli* Virulence Factors in Development of Urinary Tract Infection and Kidney damage. International Journal of Nephrology. 2012:1-15.
- Blango, M.G., Mulvey, M.A., 2010. Persistence of Uropathogenic *Escherichia coli* in the Face of Multiple Antibiotics. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 54(5):1855-1863.
- Brechet, C., Plantin, J., Sauget, M., Thouverez, M., Talon, D., Cholley, P., Guyeux, C., HOquet, D., Bertrand, X., 2013. Wastewater Treatment Plants Release Large Amounts of Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* Into the Environment. 58(12):1658-1665.

- Calderón-Jaimes, E., Casanova-Román, G., Galindo-Fraga, A., Gutiérrez-Escoto, P., Landa-Juárez, S., Moreno-Espinosa, S., Rodríguez-Covarrubias, F., Simón-Pereira, L., Valdez-Vázquez, R., 2013. Boletín Médico del Hospital Infantil de México. 70(1):3-10.
- Cegelsky, L. Pinkner, J.S., Hammer, N.D., Cusumano, C.K., Hung, C.S., Chorell, E., Aberg, V., Walker, J.N., Seed, P.C., Almgvist, F., Chapman, M.R., Hultgren, S.J., 2009. Small-molecule inhibitors target *Escherichia coli* amyloid biogenesis and biofilm formation. *Nature chemical biology*. 5(12):913-919.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2005. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement. Vol. 25. No. 1. 34-42
- Cornejova, T., Venglovsky, J., Gregova, G., Kmetova, M., Kmet, V., 2015. Extended spectrum β -lactamases in *Escherichia coli* from municipal wastewater. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. 22(3):447-450.
- Cusumano, C.K., Hung, C.S., Chen, S.L., Hultgren, S.J., 2010. Virulence Plasmid Harbored by Uropathogenic *Escherichia coli* Functions in Acute Stages of Pathogenesis. *Infection and Immunity*. 78(4):1457-1467.
- Daza-Pérez, R.M., 1998. Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. *Información Terapeutica del Sistema Nacional de Salud*. 22:57-67.
- Derakhshandeh, A., Firouzi, R., Motamedifar, M., Motamedi Boroojeni, A., Bahadori, M., Arabshahi, S., Novinrooz, A., Heidari, S., 2015. Distribution of virulence genes and multiple drug-resistant patterns amongst different phylogenetic groups of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from patients with urinary tract infection. *Letters in Applied Microbiology*. 60(2):148-154.
- Donnenberg, M.S. 2013. *Escherichia coli*. Patotypes and Principles of Pathogenesis. 2nd Edition. Oxford, UK. Elsevier.
- Erjnaes, K. Recurrent Urinary Tract Infections Caused by *Escherichia coli*. *Danish Medical Bulletin*. 2011. 58(4):1-22.
- Erjnaes, K., Stegger, M., Reisner, A., Ferry, S., Monsen, T., Holm, S.E., Lundgren, B., Frimodt-Moller, N., 2011. Characteristics of *Escherichia coli* causing

persistence or relapse of urinary tract infections. Phylogenetic groups, virulence factors and biofilm formation. *Virulence*. 2(6):528-537

- Faleiro-Naves, P.L., 2010. Formación de biopelículas por *Escherichia coli* y su correlación con factores de virulencia: prevención y actividad de antimicrobianos frente a organismos planctónicos y asociados a biopelículas. Tesis doctoral inédita. Universidad Complutense de Madrid.
- Farshad, S., Ranjbar, R., Japoni, A., Hosseini, M., Anvarinejad, M., Mohammadzadegan, R., 2012. Microbial susceptibility, virulence factors, and plasmid profiles of uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from children in Jahrom, Iran. *Archives of Iranian Medicine*. 15(5):312-316.
- 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 of Microbiology*. 13:269-284.
- Foxman, B., 2002. Epidemiology of Urinary Tract Infections: Incidence, Morbidity, and Economic Cost. *American Journal of Medicine*. 113(1A):5S-13S.
- Foxman, B., Brown, P. 2003. Epidemiology of urinary tract infections. Transmission and risk factors, incidence, and cost. *Infectious Disease Clinics of North America*. 17:227-241.
- Fujimura, K.E., Slusher, N.A., Cabana, M.D., Lynch, S.V., 2010. Role of the gut microbiota in defining human health. *Expert Review of Anti-infective Therapy*. 8(4): 435-454.
- Goettsch, W., van Pelt, W., Nagelkerke, N., Hendrix, M.G., Buiting, A.G., Petit, P.L., Sabbe, L.J., van Griethuysen, A.J., de Neeling, A.J., 2000. Increasing resistance to fluoroquinolones in *Escherichia coli* from urinary tract infections in the Netherlands. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 46(2):223-228.
- Goldstein, F.W., 2000. Antibiotic susceptibility of bacterial strains isolated from patients with community-acquired urinary tract infections in France. Multicentre Study Group. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 19:112-117.
- Hisano, M., Bruschini, H., Nicodemo, A.C., Mendes Gomes, C., Lucon, M., Srougi, M., 2015. The bacterial spectrum and antimicrobial susceptibility in

female recurrent urinary tract infection: how different they are from sporadic single episodes?. *Urology*. 86(3):492-497.

- Ito, A., Taniuchi, A., May, T., Kawata, K., Okabe, S. 2009. Increased Antibiotic Resistance of *Escherichia coli* in Mature Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*. 75(12):4093-4100.
- Jarlier, V., Nicolas, M., Fournier, G., Philippon, A., 1988. Extended broad-spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Reviews of infectious diseases*. 10(4):867-878.
- Johnson, J.R., O'Bryan, T., Delavari, P., Kuskovski, M., Stapleton, A., Carlino, U., Russo, T.A., 2001. Clonal Relationship and Extended Virulence Genotype among *Escherichia coli* Isolates from Women with a First or Recurrent Episode of Cystitis. *Journal of Infectious Diseases*. 183:1508-1517.
- Johnson, J.R., Kuskovski, P., Owens, K., Gajewski, A., Winokur, P.L., 2003. Phylogenetic origin and virulence genotype in relation to resistance to fluoroquinolones and/or extended-spectrum cephalosporins and cephamycins among *Escherichia coli* isolates from animals and humans. *Journal of Infectious Diseases*. 188:759-768.
- Kaper, J.B., Nataro, J.P., Mobley, H.L.T., 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews of Microbiology*. 2:123-140.
- Knothe, H., P. Shah, V. Krcmery, M. Antal, and S. Mitsuhashi. 1983. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens* *Infection* 11:315-317
- Kothari, A., Sagar, V., 2008. Antibiotic resistance in pathogens causing community-acquired urinary tract infections in India: a multicenter study. *Journal of Infection in Developing Countries*. 2(5):354-358.
- Le Bouguenec, C., Archambaud, M., Labigne, A., 1992. Rapid and Specific Detection of the *pap*, *afa* and *sfa* Adhesing-Encoding Operons in Uropathogenic *Escherichia coli* Strains by Polymerase Chain Reaction. *Journal of Clinical Microbiology*. 1189-1193.

- Lennette, E. H., Ballows, A., Hausler Jr, W. J., Shadomy, H. J., 1985. Manual Of Clinical Microbiology, 4th edition, Washington, USA. pp 268.
- López-Banda, D.A., Carrillo-Casas, E.M., Leyva-Leyva, M., Orozco-Hoyuela, G., Manjarrez-Hernandez, A., Arroyo-Escalante, S., Moncada-Barron, D., Villanueva-Recillas, S., Xicotencatl-Cortes, J., Hernandez-Castro, R., 2014. Identification of Virulence Factors Genes in *Escherichia coli* Isolates from Women Urinary Tract Infection in Mexico. Biomedical Research International, 2014:1-10.
- Lorenzo-Gómez, M.F., Padilla-Fernández, B., García-Cenador, M.B., Virseda-Rodríguez, A.J., Martín-García, I., Sánchez-Escudero, A., Vicente-Arroyo, M.J., Mirón-Canelo, J.A., 2015. Comparison of sublingual therapeutic vaccine with antibiotics for the prophylaxis of recurrent urinary tract infections. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 5(50):1-8.
- Machado, E., Coque, T.M., Cantón, R., Novais, A., Sousa, J.C., Baquero, F., Peixe, L., 2007. High diversity of extended-spectrum b-lactamases among clinical isolates of Enterobacteriaceae from Portugal. 60:1370-1374.
- Marrs, C.F., Zang, L., Foxman, B., *Escherichia coli* mediated urinary tract infections: Are there distinct uropathogenic *E. coli* (UPEC) pathotypes?. FEMS Microbiology Letters. 252:183-190.
- Mittal, S., Sharma, M., Chaudhary, U., 2015. Biofilm and multidrug resistance in uropathogenic *Escherichia coli*. Pathogens and Global Health. 109(1):26-29
- Molina-López, J., Aparicio-Ozores, G., Ribas-Aparicio, R., Gavilanes-Parra, S., Chávez-Berrocal, M.E., Hernández-Castro. R., Manjarrez-Hernandez, H.A., 2011. Drug resistance, serotypes, and phylogenetic groups among uropathogenic *Escherichia coli* including O25-ST131 in Mexico City. Journal of Infection in Developing Countries. 5(12):840-849.
- Neamati, F., Firoozeh, F., Saffari, M., Zibaei, M., 2014. Virulence genes and antimicrobial resistance pattern in Uropathogenic *Escherichia coli* Isolated from Hospitalized in Patients in Kashan, Iran. Jundishapur Journal of Microbiology. 8(2):1-6.
- Nielsen, K.L. Dynesen, P., Larsen, P., Frimodt-Moller, N., 2014. Faecal *Escherichia coli* from patients with *E. coli* urinary tract infection and healthy

controls who never had a urinary tract infection. *Journal of Medical Microbiology*. 63:582-589.

- O'Toole, G.A., Pratt, L.A., Watnick, P.I., Newman, D.K., Weaver, V.B., Kolter, R., 1999. Genetic approaches to study biofilms. *Methods in Enzymology*. Vol. 310. Cap. 6. pp 91-109.
- Oelschlaeger, T.A., Dobrindt, U., Hacker, J., 2002. Virulence factors of uropathogens. *Current Opinion in Urology*. 12:33-38.
- Oliveira, M., Rocha-Dias, F., Pomba, C., 2014. Biofilm and fluoroquinolone resistance of canine *Escherichia coli* uropathogenic isolates. 7:499
- Pitout, J.D.D., 2012. Extraintestinal, pathogenic *Escherichia coli*: a combination of virulence with antibiotic resistance. *Frontiers in Microbiology*. 3(9): 1-7.
- Ponnusamy, P., Natarajan, V., Sevanan, M., 2012. *In vitro* Biofilm formation by uropathogenic *Escherichia coli* and their antimicrobial susceptibility pattern. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 2012:210-213.
- Rahn, D.D., 2008. Urinary Tract Infections: Contemporary Management. *Urologic Nursing*. 28(5):333-341.
- Rasko, D.A., Rosovitz, M.J., Myers, G.S.A., Mongondin, E.F., Fricke, W.F., Gajer, P., Crabtree, J., Sebahia, M., Thompson, N.R., Chaudhuri, R., Henderson, I.R., Sperandio, V., Ravel, J., 2008. The Pangenome Structure of *Escherichia coli*: Comparative Genomic Analysis of *E. coli* Commensal and Pathogenic isolates. *Journal of Bacteriology*. 190(20):6881-6893.
- Rijavec, M., Erjavec, M.S., Ambrozic, J., Reissbrodt, R., Fruth, A., KrizanHergouth, V., Zgur-Bertok, D., 2006. High Prevalence of Multidrug Resistance and Random Distribution of Mobile Genetic Elements Among Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) of the Four Major Phylogenetic Groups. *Current Microbiology*. 53:158-162.
- Riley, L.W., 2014. Pandemic Lineages of Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology and Infection*. 20:380-390.
- Rodríguez-Ángeles, G. 2002. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pública de México*. 44:464-475.

- Russo, T.A., Johnson, J.R., 2000. A proposal for an inclusive designation for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* ExPEC. *Journal of Infectious Diseases*. 181:1753-1754.
- Schmidt, H., Scheef, J., Huppertz, H.I., Frosch, M. Karch, H., 1999. *Escherichia coli* O157:H7 and O157:H2 Strains That Do Not Produce Shiga Toxin: Phenotypic and Genetic Characterization of Isolates Associated with Diarrhea and Hemolytic-Uremic Syndrome. *Journal of Clinical Microbiology*. 37(11): 3491-3496.
- Sambrook, J., Fritseh E.F., Mariatis, T., 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd edn. Cold Spring Harbour, NY: Cold Spring Harbour Laboratory Press
- Schwartz, D.J., Conover, M.S., Hannan, T.J., Hultgren, S.J., 2015. Uropathogenic *Escherichia coli* Superinfection Enhances the Severity of Mouse Bladder Infection. *PLoS Pathogens*. 11(1):e1004599.
- Shappert, S.M., Rechtsteiner, E.A., 2008. Ambulatory medical care utilization estimates for 2006. *National Health Statistics Report*. 8:1-29.
- Sokurenko, E., Johnson, J.R., 2011. Clonal identity of *Escherichia coli* as a predictive factor for recurrent cystitis. *Virulence*. 2(6):495-497.
- Soto, S.M., Smithson, A., Horcajada, J.P., Martinez, J.A., Mensa, J.P., Vila, J., 2005. Biofilm Formation in Uropathogenic *Escherichia coli* Strains: Relationship With Prostatitis, Urovirulence Factors and Antimicrobial Resistance. *The Journal of Urology*. 177:365-368.
- Soto, S.M., Smithson, A., Horcajada, J.P., Martinez, J.A., Mensa, J.P., Vila, J., 2006. Implication of biofilm formation in the persistence of urinary tract infection caused by uropathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology and Infection*. 12(10):1034-1036.
- Tenke, P., Kovacs, B., Jackel, M., Nagy, E., 2006. The role of biofilm infection in urology. *World Journal of Urology*. 24:13-20.
- Teodosio, J.S., Simoes, M., Mergulhao, F.J., 2012. The influence of nonconjugative *Escherichia coli* plasmids on biofilm formation and resistance. *Journal of Applied Microbiology*. 113:373-382.

- Venkatesan, M.M., Burland, V., 2004. Genome-Scale analysis of virulence plasmids: the contribution of plasmid-borne virulence genes to enterobacterial pathogenesis. *Plasmid biology*. 395-411
- Wiles, T.J., Kulesus, R.R., Mulvey, M.A., 2008. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Experimental and Molecular Pathology*. 85:11-19.

APENDICE

Medios de cultivo

- Gelosa Especial:

Base gelosa sangre: 20 g
Agar bacteriológico: 15 g
Extracto de carne: 1.5 g
Agua destilada: cbp 1 L
pH = 7.4

- Caldo Luria-Bertani:

Triptona: 10 g
Extracto de levadura: 5 g
Cloruro de sodio: 10 g
Agua destilada: cbp 1 L
pH = 7.0

- Agar Mueller-Hinton:

Infusión deshidratada de carne de res: 2 g
Peptona de caseína ácida: 17.5 g
Almidón: 1.5 g
Agar: 17 g
Agua destilada: cbp 1 L
pH = 7.3

- Medio sintético M9:

Sulfato dibásico de sodio: 6 g
Sulfato monobásico de potasio: 3 g
Cloruro de sodio: 0.5g
Cloruro de amonio: 1g
Agua destilada: cbp 1L

- Medio para congelar bacterias:

70% caldo Luria-Bertani
30% glicerol

- Agar MacConkey:

Peptona de caseína: 1.5 g
Peptona de gelatina: 7 g
Peptona de carne: 1.5 g
Lactosa: 10 g
Sales biliares: 1.5 g
Cloruro de sodio: 5 g
Agar: 13.5 g
Rojo neutro: 0.03 g
Cristal violeta: 0.001 g
Agua destilada: cbp 1 L
pH = 7.0

La preparación de este medio incluye la adición de 10 mL de solución de glucosa al 20% y 100 mM de sulfato de magnesio esterilizada mediante filtración.

Electroforesis en gel de poliacrilamida con Dodecil Sulfato de Sodio (SDS-PAGE)

- Solución de poliacrilamida:

Acilamida: 29.2 g
Bisacrilamida: 0.8 g
Agua destilada: cbp 100 mL

- Gel separador (10%)

Solución de poliacrilamida: 2.5 mL
Solución amortiguadora TRIS-HCl 3.0M
pH 8.8: 0.935 mL
SDS 10%: 0.075 mL
Persulfato de amonio 1.5%: 0.375 mL
Agua destilada: 3.61 mL
TEMED: 0.004 mL.

- Gel concentrador:
Solución de poliacrilamida: 0.65 mL
Solución amortiguadora TRIS-HCl
0.5M pH 6.8: 1.25 mL
SDS 10%: 0.05 mL
Persulfato de amonio 1.5%: 0.25 mL
Agua destilada: 2.82 mL
TEMED: 0.004 mL

- Solución Laemmli:
SDS: 2%
b-mercaptoetanol: 5%
TRIS-HCl: 0.063M
pH: 6.8

- Solución amortiguadora de corrida 1X:
TRIS: 3.03 g
Glicina: 14.4 g
SDS: 1 g
Agua destilada: cbp 1L

Electroforesis en gel de agarosa

- TAE:
TRIS-Base: 4.84 g
Ácido acético: 1.142 mL
EDTA 0.5M pH 8.0: 2 mL
Agua destilada: cbp 1 L

- Gel de agarosa 0.8%:
Agarosa grado biología molecular:
0.8 g
TAE: 100 mL

Soluciones de lisis para la extracción de ADN plasmídico

- Solución alcalina de lisis I:
Glucosa: 50 mM
TRIS-Cl pH 8.0: 25 mM
EDTA pH 8.0: 10 mM

Debe prepararse a partir de soluciones patrón y esterilizarse en autoclave durante 15 minutos. Refrigerar a 4°C.

- Solución alcalina de lisis II:
NaOH: 0.2 N (a partir de una solución patrón 10N)
SDS: 1% (p/v)

La preparación de esta solución debe ser inmediatamente antes de utilizarse.

- Solución alcalina de lisis III:
Acetato de potasio 5M: 60 mL
Ácido acético glacial: 11.5 mL
Agua destilada: 28.5 mL

Mantener en refrigeración y colocarla en un baño de hielo para mantenerla fría justo antes de utilizarse

- Solución amortiguadora TRIS-EDTA (TE) pH 8.0
TRIS-Cl pH 8.0: 100 mM Mantener a temperatura ambiente
EDTA pH 8.0: 10 mM