



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

“COMPARACIÓN DE AISLADOS DE *Escherichia coli* IMPLICADOS EN
INFECCION DE TRACTO URINARIO Y COLIBACILOSIS AVIAR”

TESIS

QUE PARA OBTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

PRESENTA:

QFB. ESTEBAN LÓPEZ SILVA

TUTOR PRINCIPAL:

DR. HIPÓLITO ÁNGEL MANJARREZ HERNÁNDEZ
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR:

DRA. CECILIA ROSARIO CORTÉS
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNÍA, UNAM
DRA. ANA MARÍA CEVALLOS GAOS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO

MARZO 2018



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.



El presente trabajo de investigación se realizó en el Hospital General “Dr. Manuel Gea González”, Laboratorio de Patogénesis bacteriana de la Facultad de Medicina, UNAM. Y se contó con la beca de manutención otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) durante el periodo del 01 de Febrero de 2014 al 31 de Enero de 2016.

DEDICATORIAS

A DIOS:

Porque a lo largo de mi vida académica tuve problemas muy difíciles, estas me ayudaron a crecer no solo como profesional sino como persona.

A MIS PADRES:

ROMEO Y ESPERANZA

Por el amor incondicional que me brindan, por la formación y por siempre hacerme recordar de dónde vengo.

A MIS HERMANOS:

INÉS, ABRAHAM PERFECTO, MARÍA DE JESÚS, CARMELA, ESTEFANÍA, VIVIANA Y BÁRBARA.

Que iluminan mi camino con su presencia, dando un significado diferente a mi vida y a mis sobrinos(as) por formar parte de mi presente y futuro.

A MI ESPOSA:

ANNIA DENNISE

Porque es parte de mi vida, de mis fracasos y de mis logros, junto con ella viví, sufrí y gocé este proyecto.

A MIS AMISTADES:

MAGDA LIMÓN, JUAN JOSE FRANCO, MARIA FERNANDA ECHENIQUE, VICTOR ACEITUNO, AZAF MORENO

Ustedes saben que son parte de mi equilibrio, me dieron siempre su amistad, conocimientos y confianza que da una mano amiga.

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Nacional Autónoma de México**, alma madre de mi formación profesional y a mis maestros por fomentar en mí el deseo de saber.

Al posgrado **Maestría en Ciencias de la producción y de la Salud Animal** de la **Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia**, por aceptarme en su programa.

A mi director de tesis, **Dr. Hipólito Ángel Manjarrez Hernández** por permitirme trabajar en su grupo de investigación y a mis colegas **Pedro Chavero, Michelle Reynoso** y **Raquel Espíndola** por su apoyo y compañerismo.

Al comité tutor y jurado, **Dr. Guillermo Valdivia Anda, Dr. Hipólito Ángel Manjarrez Hernández, Dra. Inda Marcela Figueroa Ochoa, Dra. Ana María Cevallos Gaos** y **Dra. Cecilia Rosario Cortés** por brindarme su tiempo, paciencia, conocimientos y sus consejos para enriquecer este trabajo de investigación.

A la **Dra. Sandra Gavilanes Parra** por su invaluable apoyo académico y asistencia técnica.

Al **Dr. Rigoberto Hernández Castro** por las facilidades otorgadas de material biológico para la realización del presente trabajo.

Al **Dr. Miguel Ángel Cevallos Gaos** por la capacitación de la técnica de Eckhardt

ÍNDICE	
Dedicatorias	3
Agradecimientos	4
Lista de figuras	7
Lista de cuadros	8
Resumen	9
Abstract	10
INTRODUCCIÓN	11
Generalidades	11
Sistema de resistencia ácida	11
Clasificación	12
UPEC, asociada a ITU recurrentes	12
APEC, asociada a infección del saco vitelino	13
Similitud entre APEC y UPEC	15
Factores accesorios a virulencia	17
Adhesión e invasión	17
Biopelícula	19
Plásmidos	19
ANTECEDENTES	21
JUSTIFICACIÓN	23
HIPÓTESIS	24
OBJETIVOS	25
Objetivo general	25
Objetivos específicos	25

MATERIAL Y MÉTODOS	26
Colección de aislados bacterianos	26
Identificación molecular de los aislados de <i>E. coli</i>	27
Cultivo celular	27
Ensayo de adherencia	28
Ensayo de invasividad	29
Ensayo de formación de biopelícula	29
Ensayo de perfil plasmídico	31
a) Lisis alcalina	31
b) Método de Eckhardt	32
Prueba de susceptibilidad antimicrobiana	34
Extracción DNA genómico	36
Amplificación aleatoria de DNA polimórfico (RAPD-PCR)	36
Análisis RAPD	37
Análisis estadístico	37
RESULTADOS	38
Confirmación de la identidad de los aislados de <i>E. coli</i>	38
Evaluación de la capacidad de invasión de los aislados de de APEC y UPEC a células HEp-2	39
Capacidad de formación de biopelícula	41
Presencia de plásmidos grandes	42
Resistencia antimicrobiana	43
Similitud genética entre aislados APEC y UPEC	45
DISCUSIÓN	47
CONCLUSIONES	53
REFERENCIAS	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Amplificación del fragmento del gen *gadA*.

Figura 2. Eficiencia de invasividad de aislados APEC y UPEC.

Figura 3. Cuantificación de la formación de biopelícula.

Figura 4. Ensayo de perfil plasmídico.

Figura 5. Resistencia antimicrobiana.

Figura 6. Patrón electroforético obtenido mediante RAPD-PCR.

Figura 7. Dendograma y coeficiente de similitud entre aislados.

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1: Estándares de interpretación de la zona de diámetro (mm) para cada antimicrobiano en la prueba de susceptibilidad antimicrobiana para *E. coli* de acuerdo con el Comité Nacional de Estándares de Laboratorio Clínico

Cuadro 2. Prevalencia (%) de susceptibilidad entre aislados APEC y UPEC contra algunos antimicrobianos de uso en medicina humana y veterinaria.

Cuadro 3. Cuantificación de adherencia e invasividad de los aislados *E. coli* patógena aviar (APEC) y uropatógena humana (UPEC) en células HEp-2 mantenidas en cultivo.

RESUMEN

Los aislados de *Escherichia coli* (*E. coli*) que causan enfermedad fuera del intestino son llamadas *E. coli* extraintestinales (ExPEC) e incluyen la *E. coli* patógena aviar (APEC) y la *E. coli* uropatógena humana (UPEC) causantes de colibacilosis en aves e infecciones del tracto urinario (ITU) en humanos, respectivamente. Las ExPEC comparten algunas características como; serotipo, grupos filogenéticos y genes de virulencia, sin embargo, no se ha aclarado su relación como patógenos. El objetivo de la investigación es conocer en los aislados de APEC y UPEC sus características fenotípicas de invadir células epiteliales cultivadas, capacidad de formar biopelícula, portación de plásmidos, susceptibilidad a los antimicrobianos así como, analizar la similitud genética entre dichos aislados. Para esto, se estudiaron 35 cepas APEC y 19 de UPEC aisladas de ITU-recurrentes, se utilizó el ensayo de invasividad de protección a gentamicina en células epiteliales HEP-2, la formación de biopelícula se determinó mediante tinción con cristal violeta en microplaca, los plásmidos se aislaron por el método de lisis alcalina, la susceptibilidad a los antimicrobianos se evaluó mediante el método de difusión en agar y la relación genética mediante RAPD-PCR. Los resultados mostraron que la mayoría (90%) de los aislados de UPEC invadieron las células infectadas, mientras que en los aislados de APEC solo el 42.8% resultaron invasivos. La mayoría de los APEC (97%) produjeron biopelícula, en contraste con 68% en UPEC. Todos los aislados UPEC contienen plásmidos grandes (mayor de 45 Kb) mientras que en APEC algunos aislados no los presentaron. En general los UPEC resultaron más resistentes a los antimicrobianos que los aislados APEC. La caracterización molecular mostró elevada diversidad genética entre los aislados y no se diferenciaron respecto a su origen ya sea APEC o UPEC. Conclusión: identificamos diferencias entre ambos grupos como, la resistencia a los antimicrobianos y la formación de biopelícula, sin embargo, también encontramos similitudes; como el fenotipo invasivo y la portación de plásmidos de gran tamaño, lo que sugiere que algunos aislados puedan colonizar o infectar tanto a humanos como aves.

ABSTRACT

Escherichia coli (*E. coli*) isolates that cause disease outside the gut are called Extraintestinal Pathogenic *E. coli* (ExPEC) and include Avian Pathogenic *E. coli* (APEC) and Human Uropathogenic *E. coli* (UPEC) that cause colibacillosis in birds and urinary tract infections (ITU) in humans, respectively. The ExPEC share some characteristics such as; serotype, phylogenetic groups, and virulence genes, however, their relationship as pathogens has not been clarified. The objective of the research is to know in the APEC and UPEC isolates its phenotypic characteristics of invading cultured epithelial cells, ability to form biofilm, carrying plasmids, susceptibility to antimicrobials as well as analyzing the genetic similarity between these isolates. For this, 35 APEC strains and 19 UPEC strains isolated from recurrent UTI were studied, the gentamicin protection assay was carry out in HEp-2 epithelial cells, the formation of biofilm was determined by staining with crystal violet in a microplate, plasmids were isolated by the alkaline lysis method, the susceptibility to antimicrobials was evaluated by the agar diffusion method and the genetic relationship by RAPD-PCR. The results showed that the majority (90%) of the UPEC isolates invaded the infected cells, while in the APEC isolates only 42.8% were invasive. Most of the APEC (97%) produced biofilm, in contrast to 68% in UPEC. All UPEC isolates contain large plasmids (greater than 45 Kb) whereas in APEC some isolates did not present them. In general, UPEC were more resistant to antimicrobials than APEC isolates. The molecular characterization showed high genetic diversity among the isolates and they did not differ with respect to their origin, either APEC or UPEC. Conclusion: we identified differences between both groups, such as resistance to antimicrobials and biofilm formation, however, we also found similarities; such as the invasive phenotype and the carrying of large plasmids, suggesting that some isolates can colonize or infect both humans and birds.

INTRODUCCIÓN

Generalidades

Escherichia coli (*E. coli*) es un bacilo gramnegativo de la familia de las enterobacterias, en su mayoría móvil, anaerobio facultativo, que se encuentra en el tracto gastrointestinal (TGI) de humanos, animales de sangre caliente y reptiles (Tenailon *et al.* 2010).

Sistema de resistencia ácida

Para colonizar el TGI, la bacteria necesita sobrevivir al pH ácido (2 a 3) durante el paso por el estómago después de su ingestión para llegar al intestino (Hersh *et al.* 1996). *E. coli* tiene tres sistemas de resistencia al ácido, uno dependiente del sistema oxidativo, dos dependientes de aminoácidos (arginina y ácido glutámico), (Castanié - Cornet *et al.* 1999). El primero requiere de la RNA polimerasa de fase estacionaria Sigma S (*rpoS*) y del receptor de AMP cíclico y se reprime en presencia de glucosa. Los otros dos sistemas se activan en presencia de glucosa y están conformados por descarboxilasas específicas de cada aminoácido (glutamato o arginina) y un anti-transportador. El sistema dependiente de ácido glutámico es el más potente de los dos. En este sistema, el ácido glutámico es descarboxilado por una de las descarboxilasas, bioquímicamente indistinguibles entre sí, que se encuentran codificadas por los genes *gadA* y *gadB* (De Biase *et al.* 1999). Ambas descarboxilasas (GADs) catalizan la descarboxilación irreversible de ácido glutámico produciendo ácido gamma-amino butírico (GABA) y dióxido de carbono. El anti-transportador GadC (integrado a membrana) exporta el GABA al exterior en intercambio por otro sustrato mantenimiento así el pH neutro (Capitani *et al.* 2003). Los genes *gadB* y *gadC* se co-transcriben mientras que *gadA* forma parte de un operón diferente en el cual se encuentra también el activador del sistema gad (*gadX*). El *gadA* y *gadX* se localiza en la isla de capacidad ácida (acid fitness island [AFI por sus siglas en inglés]), una región que se encuentra únicamente en *E. coli* y en *Shigella*.

Este elemento genético se transfirió horizontalmente y fue la etapa inicial para su evolución como microorganismo entérico (Bergholz *et al.* 2007); ahora el bacilo presenta estos genes por duplicación y no por transferencia horizontal debido a que no se encuentra en otras especies relacionadas (Ej. *Salmonella* spp.) (Lin *et al.* 1995). Es por esto que la amplificación de *gadA* en cepas bacterianas se considera como prueba de identificación en *E. coli*.

Clasificación

E. coli puede ser clasificadas en tres grupos principales: comensales, las cuales coexisten con el huésped sin causar enfermedad; patógenas intestinales (diarreogénicas) y patógenas extraintestinales (ExPEC) (Russo *et al.* 2000). Estas últimas se encuentran comúnmente en el intestino de humanos sin causar daño aparentemente, y pueden diseminarse e infectar otros órganos, como el tracto urinario (*E. coli* uropatógena, UPEC), las meninges (*E. coli* meningitis neonatal, NMEC) e incluso pueden causar septicemia (*E. coli* asociada a septicemia, SEPEC); en aves, infectan la cavidad celómica, el aparato respiratorio, o pueden causar infecciones localizadas en la piel (*E. coli* patógena aviar, APEC) (Johnson *et al.* 2002; Smith *et al.* 2007).

UPEC, asociada a ITU recurrentes

Las infecciones del tracto urinario (ITUs) se encuentran entre las enfermedades infecciosas bacterianas más comunes en la práctica clínica y representan una morbilidad significativa y altos costos de tratamiento. UPEC es el patógeno predominante y causa el 80 - 90 % de las infecciones urinarias (IU) adquiridas en la comunidad y el 30 - 50 % de las IU nosocomiales. Las infecciones del tracto urinario recurrentes (ITUr) se informan en el 25% de las mujeres dentro de los 6 meses posteriores a un episodio agudo de ITU (Ejrnaes, 2011). La ITU se diagnostican con la presencia de dos o más síntomas clínicos como disuria, incremento en la frecuencia o urgencia para orinar, piuria, hematuria y se propone hasta un

crecimiento bajo de 100 UFC de UPEC / mL en el cultivo de orina (Chu y Lowder, 2018). UPEC posee factores accesorios a virulencia (FAV) tales como: genes relacionados con los sistemas de captación al hierro (*iroN*, *irp2*, *iuc*), adhesinas (*fim*, *afal*, *sfa*, *iha*, *tsh*, *papC* y *papGI*, II y III), protectinas (*KpsMT*, *ompT* e *iss*) y genes que codifican a toxinas (*cnf1*, *hlyA*, *set*, *astA*, *vat*, *usp* y *cva/cvi*) (Paniagua Contreras *et al.* 2017). Estos FAV contribuyen a UPEC colonizar e invadir al hospedero, persistir mediante la formación de biopelícula, evasión de la respuesta inmune, daño tisular, ascenso por la vejiga y el riñón que ocasiona cistitis y pielonefritis, además de sobrevivir intracelularmente en las células de la vejiga (Donnenberg *et al.* 1996).

APEC, asociada a infección del saco vitelino

Investigaciones serológicas han sugerido que en adición a una fuente endémica de infección, cepas APEC pueden ser introducidas con los pollitos. Esta posibilidad ha sido confirmada por el aislamiento de APEC en pollitos recién nacidos y de desechos en las incubadoras. La transmisión de APEC por medio del huevo es común a través de la contaminación fecal del cascarón del huevo recién puesto con subsecuente invasión a través del cascarón, otra fuente de contaminación de huevo es la infección del ovario y salpingitis. Si no hay muerte de embrión, se presenta la infección del saco vitelino que es responsable de la mayoría de las muertes en pollitos en un rango de 5 - 10%, pero en brotes graves de la forma aguda, esta puede ser casi del 53.5%, afectando a las aves durante los primeros 3 días después del nacimiento, pero también puede ocurrir hasta los 10 días de edad (Olsen *et al.* 2012a). Las cepas APEC se aíslan entre el 0.5 - 0.6 % de huevos de gallinas sanas (Vandekerchove *et al.* 2004).

Los aislados APEC presentan una serie de factores de virulencia, codificados en el cromosoma bacteriano o en el DNA plasmídico, que no siempre poseen las cepas comensales (Ewers *et al.* 2004; McPeakes *et al.* 2005; Dziva, Stevens; 2008). La virulencia de *E. coli* es multifactorial, es

decir, depende de la acción combinada de numerosos genes de virulencia (Ewers *et al.* 2014; Rodriguez Sieck *et al.* 2005).

Con base en estudios realizados en aves, *E. coli* se elimina por vía fecal (1×10^6 UFC/gramo) y son capaces de diseminarse ampliamente mediante la formación de aerosoles, picoteo entre aves o la inhalación del polvo (8×10^5 UFC/gramo) a partir de las heces y adherirse a las células del epitelio del tracto respiratorio superior mediante las fimbrias F1, iniciándose la colonización bacteriana (Kemmett *et al.* 2013; Mellata *et al.* 2013). En las aves, las zonas de intercambio de oxígeno son en los pulmones ya que la barrera existente entre la región capilar aérea y la sangre es extremadamente fina, APEC mediante sus FAV atraviesa al torrente sanguíneo y se produce la diseminación y colonización hacia los órganos internos (Dziva y Stevens, 2008; Kemmett *et al.* 2013). A pesar de que las vías respiratorias se consideran la principal vía de infección, también se han descrito otras vías como son la oral o la vía ascendente desde la cloaca al oviducto (Nolan *et al.* 2013). Además, la transmisión de APEC entre pollos puede aumentar la presencia de pollos colonizados por APEC, y así aumentar la frecuencia de transmisión de APEC en productos de aves de corral. La contaminación fecal de las canales de aves de corral durante el sacrificio, incluida la ruptura del aparato digestivo durante el procesamiento, es probable una fuente importante de contaminación de carne con APEC (Ewers *et al.* 2009; Delicato *et al.* 2003; Johnson *et al.* 2009). Tales microorganismos se podrían transmitir a los humanos a través del consumo de carne o huevo debido a la contaminación cruzada durante la preparación de alimentos, contaminación de las manos a la boca por el preparador de alimentos, o el contacto directo entre humanos y animales (Bélanger *et al.* 2011).

Estudios epidemiológicos han documentado la presencia de ExPEC, definida por criterios moleculares en el intestino de aves sanas y en carne de aves de corral, algunas cepas han sido genéticamente similares a las responsables de infecciones humanas (Ewers *et al.* 2009; Manges *et al.* 2012; Delicato *et al.* 2003). Basándose en el análisis epidemiológico y el

mecanismo molecular, se sospecha que los animales productores de alimentos son una fuente de bacterias capaces de causar infecciones en el humano (Bélanger *et al.* 2011). Sin embargo, la frecuencia con la que los seres humanos adquieren ExPEC a través del consumo o el manejo de alimentos contaminados con ExPEC, que colonizan intestinalmente y posteriormente desarrollar la infección en sitios extraintestinales, es indefinido.

Jonhson JR *et al.* (2006) demostraron perfiles de electroforesis (en geles de campos pulsados) casi idénticos entre aislados de pollos y humanos. Sin embargo, se necesita estudios adicionales para establecer que las ExPEC se transfieren de animales a seres humanos a través de carne contaminada y para definir la frecuencia de dicha transferencia.

Similitud entre APEC y UPEC

Los diferentes patotipos de *E. coli* tienden a ser grupos clonales caracterizados por antígenos comunes tanto de superficie (antígeno O, que es parte de los lipopolisacáridos de la membrana exterior) como de flagelo (flagelina o antígeno H) que definen serogrupos (antígeno O) o serotipos (antígeno O y H) específico (Ochman y Selander 1984; Kaper *et al.* 2004). Algunas clasificaciones utilizan también al antígeno K (polisacárido capsular ácido), (Orskov *et al.* 1977). Se piensa que tanto las cepas enteropatogénicas como las extraintestinales evolucionaron a partir de la adquisición de bloques de genes en cepas con un fondo filogenético permisivo. Estos genes generalmente se originaron en organismos no relacionados y se movieron a *E. coli* vía transferencia horizontal mediada por elementos genéticos móviles tales como islas de patogenicidad, plásmidos y bacteriófagos (Da Silva *et al.* 2017).

Tanto en APEC como en UPEC se ha identificado una gran variedad de serogrupos comunes (O1, O2, O4, O6, O7, O8, O11, O15, O16, O18, O19, O21, O23, O25, O36, O73, O75, O77, O82, O83, O86, O109, O112 y O117) (Bonacorsi *et al.* 2000; Oelschlaeger *et al.* 2002; Bullen *et al.* 2005). Además de que comparten un conjunto de genes de virulencia (*fimA*, *fimC*,

iroD, iroN, iucA, iucD, iss, ompA, vat) para colonizar e invadir al hospedero, tales adhesinas, toxinas, envoltura de polisacárido, protectinas, y sistemas de adquisición de hierro; así como patrones similares de enfermedad y antecedentes filogenéticos, por lo anterior se especula que APEC posee un potencial zoonótico (Johnson *et al.* 2008; Mora *et al.* 2012; Moulin - Schouleur *et al.* 2006; Ronco *et al.* 2017). La principal fuente de infección es a través de los alimentos contaminados por ExPEC que llegan a los humanos y causan enfermedad (Johnson *et al.* 2006; Johnson *et al.* 2007; Johnson *et al.* 2009; Manges *et al.* 2007); los aislados ExPEC se han identificado en carne refrigerada de res y cerdo, colectados en diferentes puntos de ventas y en mayor frecuencia en productos avícolas (carne y huevo) (Hannah *et al.* 2009; Johnson *et al.* 2005; Johnson *et al.* 2003; Johnson *et al.* 2009; Vincent *et al.* 2010; Bergeron *et al.* 2012). Existen controversias en cuanto si los aislados ExPEC son iguales o diferentes, debido a que hay estudios que encuentran aislados APEC que no se pudieron distinguir de los aislados ExPEC humanos e incluso los aislados APEC de carne de pollo son genéticamente relacionadas con los aislados humanos con ITUs (Johnson *et al.* 1991; Bergeron *et al.* 2012) y por lo contrario existen reportes que muestran que los aislados ExPEC humanos son claramente diferentes de los aislados APEC (Graziani *et al.* 2009) y que el consumo de carne de pollo o el contacto con pollos no correlaciona con la colonización de *E. coli* resistente a los quimioterapéuticos (Sannes *et al.* 2008). Sin embargo, se han encontrado aislados APEC serotipo O18:K1:H7 como potencial patógeno de humano debido a que pueden causar meningitis en modelos de ratas (Moulin - Schouleur *et al.* 2006), por otro lado, los aislados ExPEC de humanos pueden causar colibacilosis aviar de manera similar como lo hacen las APEC, esto sugiere que estas cepas ExPEC no son hospedero específicas (Moulin Schouleur *et al.* 2007). Además hay una relación genética entre los aislados de APEC y UPEC (Kaper *et al.* 2004; Moulin Schouleur *et al.* 2006; Ron *et al.* 2006). La secuenciación genética de APEC O1:K1:H7 revela que comparte una fuerte similitud con UPEC y las

otras cepas extraintestinales del 95.5 % de su genoma (Johnson *et al.* 2007). Lo que representa que las cepas APEC tienen un posible riesgo zoonótico (Johnson *et al.* 1991; Zhao *et al.* 2009). Aunque muchas de las cepas ExPEC poseen factores de virulencia que sugieren un huésped o síndrome patogénico específico, los genotipos de virulencia y serotipos de algunas cepas APEC se entrecruzan de manera substancial con las cepas humanas UPEC y NMEC (Johnson *et al.* 2008; Johnson *et al.* 2007; Johnson *et al.* 2012).

Factores accesorios a virulencia

Adhesión e invasión

La adherencia e invasión de las células del huésped, es un paso importante en la patogenia de muchas bacterias y contribuye a la colonización, persistencia y diseminación de un patógeno en el hospedero (Meyer *et al.* 1997; Antao *et al.* 2009). La adhesión ocurre a menudo por apéndices de superficie llamados fimbrias. Los aislados de *E. coli* aviar comúnmente expresan la fimbria tipo 1 y fimbria curli (La Ragione *et al.* 2000). Los aislados UPEC expresan principalmente la fimbria tipo 1 y la fimbrias tipo P. La fimbria tipo 1 se une a los residuos D-manosa y es importante para la adherencia a células de pollo por cepas de *E. coli* de serogrupos O1 y O2 (Bahrani-Mougeot *et al.* 2002; Khan *et al.* 2007; Boudeau *et al.* 2001). La fimbria P confiere hemaglutinación ya que reconocen al receptor α -D-galactopiranosil-(1-4) β -D-galactopiranosido que se expresa en los riñones y eritrocitos humanos. Las fimbrias curli son fimbrias de superficie agregativa, asociadas con la adhesión a tejido de pollo y también se ha reportado que media la invasión a células eucariotas (Gophna *et al.* 2001) y son codificadas por el grupo de genes *csg*, los cuales son expresadas por muchos aislados patógenos de *E. coli* incluyendo a las de colisepticemia aviar (Provence - Curtiss; 1992), Las fimbrias de tipo 1 y P de APEC se han reportado como factores

importantes para la adherencia a las superficies de las células epiteliales *in vitro* e *in vivo*; las fimbrias curli de APEC se ha demostrado *in vitro* que se adhiere a fibronectina, lamina, plasminógeno, proteínas activadoras de plasminógeno y colágeno tipo 1 (La Ragione *et al.* 2000). Con respecto a la expresión de varias adhesinas por APEC durante el proceso de infección, podría aumentar la colonización de diferentes sitios extraintestinales e incluyendo el tracto gastrointestinal (Stordeur *et al.* 2002).

Una enfermedad invasiva de pollos es caracterizada por la internalización de las bacterias en los sacos aéreos, torrente sanguíneo y órganos vitales (Yerushalmi *et al.* 1990), aunque se piensa que las fimbrias curli no son solo los únicos factores de virulencia en la internalización de cepas *E. coli* aviar, una posibilidad de aislados *E. coli* serotipo O78 produce varios factores de virulencia, incluyendo una adhesina fimbrial de la familia fimbria S llamada AC/I (Babai *et al.* 2000) e incluso puede ocurrir un sinergismo entre dos adhesinas que contribuyan a la invasión y virulencia (Gophna *et al.* 2001). En un estudio realizado por Matter *et al.* (2015) encontraron un aislado de *E. coli* SB278/94 en el intestino de un bovino con signos clínicos de diarrea y peritonitis; mediante PCR se detectó que presenta la invasina *gimB* y que ya ha sido reportado en aislados ExPEC, con una frecuencia de 9% en UPEC y 24% en APEC (Ewers *et al.* 2007; Barbieri *et al.* 2013) y además es adherente (1×10^7 UFC/mL) e invasivo (1×10^4 UFC/mL) en células HeLa, por lo que representa el potencial zoonótico para los humanos y a su vez en el mismo hato, debido a que hay bovinos clínicamente sanos que pueden estar diseminando estos aislados. Otra invasina con potencial invasivo e identificado en APEC es la proteína homóloga Tia de 25 KDa que es codificada en el locus de Tia en *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) (Fleckenstein *et al.* 1996). En APEC, el gen *tia* es localizado en una isla de patogenicidad de 56 kb llamada PAI I APEC -01, también contiene el operon *pap* entre otros factores de virulencia (Kariwayasam *et al.* 2006).

Biopelícula

La biopelícula son comunidades multicelulares dentro de una matriz extracelular unida a una superficie. La matriz extracelular ayuda a resistir a los cambios ambientales y evitar las defensas del hospedero (Beloin *et al.* 2008; Branda *et al.* 2005). La formación de biopelícula, es importante para la colonización de UPEC (Tenke *et al.* 2012) ya que proporciona a las bacterias resistencia contra los detergentes, antibióticos y elementos de defensa del hospedero, la contribución de la biopelícula es importante en la persistencia bacteriana dentro del tracto genitourinario (Berry *et al.* 2009). La formación de biopelícula también permite que las bacterias persistan en superficies de productos avícolas tales como carne cruda y huevo (Mitchell *et al.* 2014).

Plásmidos

Generalmente, los aislados APEC poseen plásmidos grandes transmisibles y comúnmente se comparten entre los aislados ExPEC humanos. Estos elementos poseen un grupo de genes (*iutA*, *sitA*, *RepFIB*, *hlyF*, *ompT*, *etsAB*, *iss* e *iroN*) asociados a una región conservada de virulencia codificada en plásmidos y son esenciales para la virulencia de APEC, los cuales también están presentes en UPEC (Tivendale *et al.* 2010; Ewers *et al.* 2007). Interesantemente, la presencia de plásmidos grandes se ha observado en perfiles de plásmidos obtenidos de aislados UPEC en pacientes con ITU-recurrentes (Molina López *et al.* 2011). Se ha identificado que los plásmidos de APEC contribuye a la habilidad de *E. coli* para crecer en orina humana, causar ITU en modelo de ratón (Skyberg *et al.* 2006), meningitis en ratas (Johnson *et al.* 2010).

En la carne de pollo se aísla *E. coli* en un alto nivel y estos aislados son resistentes a uno o más fármacos comparado con otras carnes (Manges y Johnson, 2012). En todo el mundo con el incremento de consumo de carne de pollo, podría haber contribuido a la resistencia a antibióticos en ExPEC y la emergencia de infecciones por ExPEC en humanos (Pitout, 2012). ExPEC emerge como un importante reservorio de resistencia a la primera

línea de antibióticos que incluye betalactámicos, cefalosporinas, fluoroquinolonas e inhibidores de folatos. Por ejemplo, UPEC es frecuentemente resistente a fluoroquinolonas y trimetoprima con sulfametoxazol que son fármacos que se recetan en casos de cistitis no complicadas (Gupta *et al.* 2011). En la industria avícola los antibióticos han sido empleados en la prevención y tratamientos de enfermedades, como promotor de crecimiento; en casos de colibacilosis los tratamientos con fármacos es mediante el empleo de tetraciclinas, fluoroquinolonas y sulfonamidas como uso primario contra *E. coli*, lo que explicaría los niveles altos de resistencia en los aislados APEC con estos antibióticos (Zhao *et al.* 2005).

La resistencia a los antibióticos tiene el potencial de convertirse en uno de los mayores problemas de nuestra generación, dado el aumento cada vez mayor de las cepas bacterianas, los cuales son cada vez menos y menos sensibles a los tratamientos existentes. Tanto en la medicina humana como en la veterinaria la selección y diseminación de bacterias resistentes a los antibióticos va en aumento y el consumo de alimentos que transfieran *E. coli* resistentes podría ser un problema de salud pública. Las cepas de APEC aisladas de pollos son a menudo altamente resistentes a los antimicrobianos, especialmente a tetraciclina, fluoroquinolonas, estreptomycin y sulfonamidas. La resistencia mediada por plásmidos es común y se transmite por vía horizontal, por lo que hay una preocupación sobre la propagación de plásmidos transmisibles que codifican para betalactamasas de espectro extendido. La resistencia a fluoroquinolonas es generalmente alta, sin embargo se ha reportado niveles medios de resistencia a ciprofloxacina en diversos países. *E. coli* comensal de aves de corral tiene patrones similares de resistencia pero a frecuencias bajas (Vidotto *et al.* 1990). En UPEC humana, el aumento en la resistencia se ha acumulado en años, en la ciudad de México se encontró una resistencia muy alta principalmente a trimetoprima con sulfametoxazol (SXT) que excede el 50%, mientras que en fluoroquinolonas y cefalosporinas fue del 55 y 10-15%, respectivamente (Molina López *et al.* 2011).

ANTECEDENTES

La habilidad de APEC para causar enfermedad en mamíferos no ha sido aclarada y desafortunadamente, hay pocos estudios en los que se ha investigado la capacidad de las APEC de infectar células humanas (*in vivo* o *in vitro*). En un estudio se demostró que una cepa APEC serogrupo O1, filogenéticamente relacionada con ExPEC humanas y teniendo múltiples factores de virulencia, es menos virulenta que una cepa UPEC en un modelo de sepsis de ratón y fue incapaz de causar bacteremia o meningitis en ratas neonatales (Johnson *et al.* 2012).

Rosario CC *et al.* (2004) identificaron cepas portadoras de los genes *ipaH*, *cdt* y *eae*, aisladas a partir de aves con infección de saco vitelino (ISV), estos genes codifican para el fenotipo invasivo relacionado con las cepas enteroinvasivas (EIEC) de humanos, la toxina citoletal distensionante y para la proteína intimina, respectivamente.

La cepa de *E. coli* aviar (SEP13), aislada de hígado y causante de septicemia en parvadas de pollos de Brazil, presenta 5 plásmidos de tamaño conocido (2.7; 4.7; 43; 56 y 88 Mda), además muestra un patrón adherente e invasivo en células HEp-2; pero al realizar ensayos de mutagénesis en el plásmido grande de 88 Mda con el transposon TnphoA (gen fosfatasa alcalina) se pierde el fenotipo invasivo (Stehling *et al.* 2008) por lo que sugiere que este plásmido puede ser importante en la virulencia de esta cepa de *E. coli* aviar.

En otro estudio trabajaron con 50 cepas APEC, conformada por 11 cepas de pollitos con onfalitis (O), 24 cepas de aves adultas con septicemia (S) y 15 cepas de aves con síndrome de cabeza hinchada (H) fueron comparadas con 30 cepas comensales (C) de pollos sanos, en su capacidad de adhesión e invasión en tres líneas celulares (HeLa, HEp-2 y en células de cultivo primario de riñón-KPCC de embriones de pollo); los resultados mostraron que todas las cepas S y H son adherentes a las células probadas, con excepción a las cepas de O; en cuanto al ensayo de

invasión realizado en presencia o ausencia de D-manosa, demostró que solo seis cepas tuvieron la capacidad de ser invasivas, lo que corresponde a 1 cepa S, 2 cepas C y 3 H. Las cepas comensales invadieron células HEp-2 en ausencia de D-manosa, mientras que las dos cepas de cabeza hinchada invadieron en HeLa y HEp-2 en ausencia de D-manosa. La cepa septicémica invadió los tres tipos de líneas celulares con presencia o ausencia de D-manosa (Días da Silveira *et al.* 2002).

JUSTIFICACIÓN

Hay muy poca información sobre si las cepas APEC son capaces de adherirse e invadir células epiteliales humanas de la misma forma que lo hacen las cepas UPEC.

Las cepas APEC comúnmente contienen plásmidos grandes (Rodríguez-Siek *et al.* 2005b; Barnes *et al.* 2008; Johnson *et al.* 2008a), mientras que las UPEC tradicionalmente no se han reportado como portadoras de plásmidos grandes (Rodríguez-Siek *et al.* 2005a), sin embargo, recientemente se han detectado plásmidos grandes en las cepas UPEC, especialmente en las cepas multiresistentes a los antimicrobianos. Debido a la falta de estudios de estos plásmidos grandes en las cepas UPEC se desconoce su origen, o si estos tienen alguna semejanza o relación con los plásmidos presentes en las cepas APEC. Se reporta que algunas cepas UPEC presentan plásmidos conjugativos grandes (≥ 45 Kb) y que podrían transferirse entre ambos grupos (APEC y UPEC), también se ha observado un aumento de resistencia a los antimicrobianos tanto en las cepas APEC como en las UPEC.

HIPÓTESIS

A pesar de que los aislados de *E. coli* son de diferente origen, de humanos y aves estos muestran ciertas similitudes en cuanto a su capacidad para invadir células epiteliales, formar biopelícula, su patrón de resistencia a los antimicrobianos y la portación de plásmidos grandes. Además, habrá una estrecha relación genética entre los aislados de *E. coli* aviáres y de ITU-recurrentes en humano.

OBJETIVOS

a) Objetivo General

Comparar los aislados de *E. coli* implicados en ITU-recurrentes y colibacilosis aviar en su habilidad de invadir células epiteliales humanas, formar biopelícula, presentar plásmidos y la susceptibilidad a los antimicrobianos. Así como, analizar la similitud genética entre dichos aislados para conocer si son poblaciones iguales o diferentes.

b) Objetivos específicos

1. Confirmar la identidad de los aislados previamente caracterizadas como *E. coli* mediante la detección del gen *gadA*.
2. Determinar en los aislados de *E. coli* su capacidad de invadir células epiteliales HEp-2 de origen humano.
3. Determinar en los aislados la capacidad de formar biopelícula.
4. Determinar la presencia de plásmidos en los aislados APEC y UPEC.
5. Determinar la resistencia de los distintos aislados a diversos antimicrobianos de uso animal y humano.
6. Caracterizar mediante RAPD-PCR la relación genética entre los aislados APEC y UPEC.

MATERIAL Y MÉTODOS

Colección de aislados bacterianos

Se utilizaron 54 aislados de *E. coli* patógena extraintestinal, que incluye 19 aislados UPEC de pacientes ambulatorios con síntomas clínicos de infección aguda no complicada del tracto urinario provenientes de diferentes hospitales de la ciudad de México (Molina López *et al.* 2011), y 35 aislados APEC implicados en infecciones del saco vitelino de granjas productoras de pollo de engorda, de los estados de Querétaro y Guanajuato (Del Rio Ávila *et al.* 2016), las cuales fueron donadas por la Dra. Cecilia Rosario Cortés del Departamento de Medicina y Zootecnia de Aves de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. En el presente trabajo se considera una ITU-recurrente cuando se han presentado al menos dos episodios de ITU (diagnosticado por cultivo de orina) en los últimos seis meses o tres episodios en los últimos 12 meses (Foxman 2003; Scholes *et al.*, 2000). Para el criterio de inclusión se seleccionaron los casos de pacientes ambulatorios que hayan tenido al menos una ITU (comprobado por cultivo de orina en el laboratorio) en los últimos seis meses y que nuevamente acuden al hospital por tener sintomatología de ITU, sin restricción de edad, ni haber tomado terapia con antibióticos (antes de un mes), siempre y cuando sean personas aparentemente sanas que cumplan con la sintomatología de ITU diagnosticada por los médicos. Los aislados se resembraron en TSA y MacConkey para verificar la pureza de las muestras. Se utilizó como control negativo la cepa de referencia *S. Typhimurium* ATIC 14579, Hospital General “Dr. Manuel Gea González. Posteriormente, se almacenaron a -70°C, en caldo Luria Bertani (LB) con glicerol al 50 %.

Identificación molecular de aislados de *E. coli*

Todos los aislados se identificaron molecularmente mediante el ensayo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando un par de oligonucleótidos: sentido: 5'-ACCTGCGTTGCGTAAATA-3' y antisentido 5'-GGGCGGAGAAGTTGATG-3' que amplifican un fragmento del gen de glutamato descarboxilasa A (*gadA*) de 670 pb (McDaniels *et al.* 1996) con una especificidad entre 95 - 99 % (Rice *et al.* 1993; Tsoraeva *et al.* 2005), aunque también se puede amplificar *Shigella sonnei* y *S. flexneri* que están genéticamente relacionadas con *E. coli*, el perfil bioquímico (citrato de Christensen, acetato de sodio y mucato de sodio) las discrimina (Edwards, 1999; Freier *et al.* 1976). Cada 25 μ L de la reacción de PCR contenía 2.5 μ L de solución amortiguadora de PCR 10X (100 mM Tris-HCl, pH 8.4 y 500 mM KCl), 0.3 μ L de 50 mM MgCl₂, 0.5 μ L de 10 mM deoxinucleótidos trifosfatados, 1 μ L de ambos oligonucleótidos (solución madre, 20 mM), 0.3 μ L (5 U μ L⁻¹) de Taq DNA polimerasa (Invitrogen), 2 μ L de templado de DNA extraído por el método de ebullición, y 17.4 μ L de agua destilada estéril. Después de la desnaturalización a 94°C por 4 minutos, las muestras se sometieron a 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 58°C por 1 minuto, y 72°C por 1 minuto, con una extensión final de 5 minutos a 72°C. Las muestras se visualizaron en electroforesis, con un gel de agarosa al 1.0 % (peso/ volumen) y se tiñó con bromuro de etidio.

Cultivo celular

Para los ensayos de adherencia e invasividad *in vitro*, se utilizaron células epiteliales humanas HEp-2 provenientes de carcinoma laríngeo. Las células HEp-2 se cultivaron en botellas de 250 mL (Nunc, Inc.) en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Laboratorios *In vitro* S.A. ciudad de México) suplementado con L-glutamina y con 10% de suero

fetal de bovino (SFB), previamente inactivado (GIBCO) y una mezcla de estreptomicina-penicilina al 1% (in vitro S.A.). Los cultivos celulares se mantuvieron en incubación a 37°C en una atmósfera de 3% de CO₂, se les cambió el medio cada 72 horas y se realizaron pases cuando alcanzaron el 80 % de confluencia.

Ensayo de adherencia

Para los ensayos de adherencia se utilizó la línea celular HEp-2 de acuerdo con el método descrito por Eaves-Pyles *et al.* (2008). Se sembraron 3 x 10⁵ células por mililitro en cada pozo de la placa (microplaca de 24 pozos, Nunc, Denmark), la cual se incubó por 24 horas a 37°C con 3% de CO₂ para formar una monocapa celular a 80% de confluencia. Mientras tanto las bacterias se cultivaron en tubos de 1 mL de medio LB a 37°C durante toda la noche. Al siguiente día, el cultivo bacteriano se diluyó 1:100 en medio DMEM sin antibiótico, sin suero y se incubó por una hora adicional a 37°C. Antes de infectar las células HEp-2, se les cambió el medio por 1 mL de medio DMEM sin antibiótico. A cada pozo conteniendo la monocapa de cultivo celular se le agregó 20 µL de suspensión bacteriana (1 x 10⁷ UFC) y se incubó por 3 horas a 37°C con 3 % de CO₂. Se incluyó un control negativo (cepa *E. coli* K-12, no adherente a células HEp-2) y un control positivo (cepa E2348/69, cepa adherente a células HEp-2). Para cuantificar la adherencia de las cepas de *E. coli*, las células infectadas se lavaron tres veces con PBS estéril para remover las bacterias que quedaron en suspensión sin haberse adherido a la monocapa celular. Posteriormente, las células se desprendieron de la superficie y se lisaron durante 10 minutos a temperatura ambiente con 200 µL de Tritón X-100 (Merck) al 0.1% en PBS. Las bacterias adherentes se recuperaron y se cuantificaron por plaqueo de diluciones seriadas (1:1000 y 1:10000) en placas de agar MacConkey, las cuales se incubaron a 37°C durante toda la noche y las colonias bacterianas se contaron para su análisis estadístico.

Ensayo de invasividad

Para determinar la capacidad invasiva de las cepas de *E. coli*, se infectaron células HEp-2 de la misma forma que se explicó en el ensayo de adherencia. Los ensayos de invasividad se realizaron en pozos en paralelo con los del ensayo de adherencia. Transcurrido el tiempo de tres horas de infección, las células se lavaron tres veces con PBS y se incubaron por 1 hora más a 37 °C con 3 % de CO₂ en medio DMEM fresco suplementado con 100 µg/mL de gentamicina (*in vitro* S.A.) con la finalidad de eliminar a las bacterias que no se internalizaron en las células epiteliales. Después de las 4 horas totales de incubación, las células se lavaron tres veces con PBS, y se lisaron con Tritón X-100 al 0.1% en PBS, posteriormente se realizó la evaluación de las bacterias intracelulares de la misma manera que se evaluaron en el ensayo de adherencia. El ensayo se realizó por duplicado y se realizaron en dos experimentos independientes. Los resultados se expresaron como el porcentaje de invasión del número de bacterias intracelulares (UFC) con respecto al número de bacterias adheridas a la monocapa celular.

Ensayo de formación de biopelícula

El ensayo de formación de biopelícula se realizó en placas de 96 pozos (Costar®) utilizando un método descrito anteriormente (O'Toole y Kolter 1999, Wang *et al.* 2011). Previo al ensayo, los aislados se cultivaron en caldo Luria Bertani (triptona 10 g, extracto de levadura 5 g, NaCl 10 g para 1 L) hasta la fase estacionaria a 37°C y después se diluyeron 1/100 en medio mínimo M9 (K₂HPO₄ 10.5 g, KH₂PO₄ 4.5 g, (NH₄)₂SO₄ 1.0 g, citrato de sodio 0.5 g y triptona 0.06 g en 1 L, suplementado con 20% de glucosa y 0.1 mM de MgSO₄) (Miller, 1972). Se dispensaron alícuotas de 200 µl por pozo en la placa. Se utilizó un pozo como control negativo que contenía medio de cultivo sin bacterias. Los cultivos se mantuvieron en

las placas aeróbicamente sin agitación a 37°C durante 48 horas. El medio de las placas se separó por aspiración, y las placas se lavaron tres veces con PBS estéril (NaCl 8g, KCl 0.2g, Na₂HPO₄ 1.44g, KH₂PO₄ 0.24g/1 L) pH 7.4. Las microplacas se tiñeron con 200 µL de cristal violeta al 0.1 % (peso/volumen) durante 30 minutos, posteriormente se lavaron tres veces con PBS para eliminar el colorante no adherido a la biopelícula, y se dejó secar a temperatura ambiente durante 1 hora. Después del secado, el colorante se solubilizó con 200 µL de la solución alcohol-acetona (80:20 v/v). Posteriormente, se midió la absorbancia a 570 nm en el equipo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) lector (Epoch Biotek espectrofotómetro de placas de microtitulación, programa N5). Todas las pruebas se realizaron por triplicado en dos estudios independientes, finalmente los resultados obtenidos se promediaron y se estableció un punto de corte para cuantificar a los aislados que no formaron biopelícula de aquellos que sí son formadores y de éstos a su vez clasificarlos en tres categorías (débil, moderado y fuerte) de formación de biopelícula mediante la técnica estadística descrita por Stepanovic *et al.* 2004. Los aislados se clasificaron en:

No formadoras: La densidad óptica (DO) de la proteína de la biopelícula producida por el aislado se encuentra por debajo del punto de corte establecido ($DO \leq 0.163$)

Formadores débiles: La DO de la biopelícula producida por el aislado que se encuentra entre el punto de corte y el valor de DO correspondiente al doble del mismo ($0.163 < DO \leq 0.326$).

Formadores moderados: La DO de la biopelícula producida por el aislado que se encuentra entre el doble del valor del punto de corte y el valor de DO correspondiente al cuádruple del mismo ($0.326 < DO \leq 0.650$).

Formadores fuertes: La DO de la biopelícula producida por el aislado se encuentra por encima del cuádruple del valor del punto de corte ($0.650 \leq DO$).

Ensayo de perfil plasmídico

Se utilizaron dos metodologías para extraer plásmidos: lisis alcalina y el método de Eckhardt para plásmidos grandes.

a) Lisis alcalina

Para lisis alcalina se utilizaron cultivos bacterianos a mediana escala (10 – 20 mL) mediante tratamientos de lisis alcalina (Sambrook *et al.* 1989). Se inoculó una colonia de los aislados de APEC o UPEC en 10 mL de caldo LB, se incubó entre 16 y 18 horas a 37°C con agitación vigorosa 160 rpm (New Brunswick™ Excella® E24).

Posteriormente, se centrifugó a 17 000 X g, por 30 segundos a 4°C en la microcentrifuga de mesa (Sigma 1-15 K). Se removió el sobrenadante por decantación, dejando la pastilla de bacterias lo más seco posible. Se resuspendió la pastilla de bacterias en 200 µL de solución I [glucosa 50mM, Tris-Cl 25 mM (pH 8.0), EDTA 10 mM (pH 8.0)] conservada en hielo, y se agitó vigorosamente en vórtex. Posteriormente, se añadió 400 µL de la solución II (20 µL NaOH 10 N + 100 µL SDS 10% para 1 mL), preparada al momento. Se cerró el tubo y se mezcló el contenido invirtiéndolo rápidamente 5 veces. No se utilizó el vórtex para no romper el DNA plasmídico. El tubo se mantuvo en hielo durante 5 minutos. Después de ello, se agregó 300 µL de solución III (CH₃COONa 3M, pH 5.2) almacenada en hielo, se cerró el tubo y se dispersó la solución a través del lisado viscoso de bacterias invirtiéndolo varias veces y se colocó el tubo en hielo durante 5 minutos. En seguida se centrifugó el lisado bacteriano a 17 000 X g por 5 minutos a 4°C. El sobrenadante se trasladó a un tubo nuevo y se añadió un volumen igual de fenol-cloroformo, y se centrifugó 10 minutos a 17 000 X g a 4°C. Se transfirió la capa superior acuosa a un tubo nuevo. Posteriormente, se añadió 2 volúmenes de etanol (850 µL) y se mezcló la solución en vórtex dejando reposar la mezcla por 2 minutos a temperatura ambiente. Los ácidos nucleicos se colectaron por centrifugación a 17 000 X g por 10 minutos a 4°C, se removió el

sobrenadante por aspiración suave y el tubo se colocó en posición invertida sobre una toalla de papel para permitir la salida de todo el remanente de alcohol. Se utilizó una punta para remover las gotas adheridas a las paredes del tubo, después se agregó 1 mL de etanol al 70 % y se invirtió el tubo cerrado varias veces. Se recuperó el DNA plasmídico por centrifugación a 17 000 X g por 10 minutos a 4°C. Se removió todo el sobrenadante por aspiración suave, teniendo precaución. Se removieron los restos de etanol que quedaron en las paredes del tubo, dejando el tubo abierto durante 10 minutos a temperatura ambiente hasta que el etanol se volatilizó. Posteriormente, se disolvió el DNA plasmídico en 50 µL de buffer TE (1M Tris-Cl, pH 7.4 vol. 10 mL, 0.5 M EDTA pH 8.0 vol. 2 mL) pH 7.4 con 20 µg/mL de RNAsa-A libre de DNAsa (RNA pancreática), se mezcló la solución suavemente en vórtex por 10 segundos y se almacenó el DNA plasmídico (en solución) a -20°C. La obtención de plásmidos se analizó mediante electroforesis en geles de agarosa de 10 cm al 0.5%, polimerizados y corridos en solución TAE 1x (40mM Tris acetato, 1 mM EDTA), 70 V, 47 mA, 3 W, posteriormente se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizó con luz ultravioleta en un transiluminador.

b) Método de Eckhardt

Los plásmidos grandes se aislaron de cultivos bacterianos puros mediante el método de Eckhardt (Eckhardt, 1978). Cada uno de los aislados APEC o UPEC se cultivaron 19 horas en 3 mL de medio LB a 37°C con agitación constante a 240 rpm (New Brunswick™ Excella® E24). Se utilizó como control positivo la cepa EPEC E2348/69 que tiene un plásmido estable de 97.28 Kb (Nataro *et al.* 1985). En una microplaca se colocó 200 µL de cada una de las muestras y un blanco conteniendo únicamente caldo LB sin bacterias, se midió la población bacteriana de los cultivos mediante espectrofotometría (JENWAY 6320D) a 620 nm. Para una DO de 0.2 - 0.3 se tomó 1 mL de cultivo, cuando las bacterias crecieron más de lo esperado (0.35 - 0.4) se diluyó hasta alcanzar la densidad óptica deseada.

Se centrifugó a 17 000 X g a 4°C (microcentrifuga Sigma 1-15 K), se eliminó el sobrenadante por aspiración con una jeringa de insulina. A partir de aquí todo se trabajó con hielo. Se resuspendió la pastilla en 500 µL de agua estéril, se mezcló hasta resuspender la pastilla, se añadió suavemente por las paredes del tubo 1 mL de solución de Sarkosyl 0.3 % (en TE [Tris 50 mM; EDTA 20 mM] v/v), se centrifugó 5 minutos a 17 000 X g a 4°C, se extrajo el sobrenadante con la jeringa y la pastilla se resuspendió en 80 µL de Ficoll al 20% en TE 10:1 v/v, se mezcló y se dejó en hielo por 15 minutos. Por otro lado, se preparó un gel de agarosa al 0.75% en TBE 1x, se colocó en la cámara y se agregó TBE 1X hasta que tocó el gel sin cubrir los pozos, se añadió a cada uno de los pozos 30 µL de SDS 10X en agua destilada con un poco de Xileno cianol. Se corrió el gel a 100 V (25- 30 mA) durante 15 minutos con el polo negativo invertido (para que la muestra se desplace hacia arriba) posteriormente, se agregó el TBE 1X a la cámara hasta cubrir el gel. Se prepararon alícuotas de 230 µL de la solución de lisis que contenía RNAsa 0.4 mg/mL en TE más 1 mg/mL de azul de bromofenol. También se preparó una alícuota de 200 µL de lisozima 10 mg/mL en agua estéril. Se agregó 80 µL de la solución de lisozima a la solución de lisis. De la mezcla final se tomó 20 µL y se agregó a cada una de las muestras. Se mezcló con cuidado para evitar formar burbujas y se colocó 10 µL en cada pozo por cada una de las muestras, se dejó correr a 40 V por 90 minutos a 20°C y después a 100 V durante 8 horas a 8 °C. Se reveló con solución de bromuro de etidio y se observó con luz ultravioleta en un transiluminador (UVP High Performance).

Prueba de susceptibilidad antimicrobiana

La susceptibilidad antimicrobiana de los aislados se determinó por el método de difusión en disco Kirbi-Bauer (Bauer *et al.* 1966), siguiendo los lineamientos del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio publicados en 2015 (CLSI, por sus siglas en inglés), y de acuerdo a las indicaciones de los fabricantes de los sensidiscos comerciales (OXOID, Inglaterra). Éstos fueron seleccionados para representar a diferentes grupos de antimicrobianos utilizados en la clínica humana y en medicina veterinaria, tales como: amoxicilina/ ácido clavulánico (20/10 µg), ampicilina (10 µg), ciprofloxacino (5 µg), ceftazidima (30 µg), gentamicina (10 µg), trimetoprima/sulfametoxazol (1.25/23.75 µg), enrofloxacin (5 µg), sulfacloropiridacina/trimetoprima (1.25/23.75 µg), oxitetraciclina (30 µg), doxiciclina (30 µg) y ceftriaxona (30 µg). La prueba se realizó preparando una suspensión de la colonia bacteriana pura en solución salina fisiológica con una turbidez de 0.5 del nefelómetro de McFarland que corresponde a 1.5×10^8 bacterias/mL. Posteriormente se inoculó la placa en agar Mueller Hinton con la suspensión estandarizada, se tomó el inoculó con un hisopo estéril y se sembró por estría continua y cerrada. Se colocaron sobre la superficie del agar cinco sensidiscos con una distancia de 15 a 20 mm entre cada uno. Se incubó entre 16-18 horas a 37 °C, después de este tiempo se realizó la lectura, al medir el diámetro del halo de inhibición con un vernier para determinar si *E. coli* era sensible, resistente o intermedio (ver cuadro 1). *E. coli* ATCC® 25922 fue usado como cepa control. Se consideró un aislado multi-resistente (MR) a aquel que presentó resistencia a tres o más grupos de antimicrobianos.

CUADRO 1. Estándares de interpretación de la zona de diámetro (mm) para cada antimicrobiano en la prueba de susceptibilidad antimicrobiana para *E. coli* de acuerdo con el Comité Nacional de Estándares de Laboratorio Clínico.

Grupo de Antimicrobianos	Código	Resistente	Intermedio	Sensible
Penicilinas - Betalactámico				
amoxicilina / ácido clavulánico	AMC	≤ 13	14-17	≥18
ampicilina	AMP	≤ 13	14-16	≥17
Aminoglucósido				
gentamicina	GEN	≤ 12	13-14	≥15
Fluoroquinolonas				
ciprofloxacino	CIP	≤ 15	16-20	≥21
enrofloxacin	EBD	≤ 17	18-21	≥22
Inhibidores de Folatos				
trimetoprima/ sulfametoxazol	SXT	≤ 10	11-15	≥16
sulfacloropiridacina	SCP	≤ 10	11-15	≥16
Tetraciclinas				
oxitetraciclina	OXD	≤ 14	15 - 18	≥ 19
doxiciclina	DOX	≤ 10	11 - 13	≥14
Cefalosporinas				
ceftazidima	CAZ	≤ 17	18-20	≥21
ceftriaxona	CRO	≤19	20 - 22	≥23

Extracción DNA genómico

Una colonia de *E. coli* confirmada por PCR convencional fue crecida en 1 mL de caldo LB por 18 horas hasta la fase estacionaria, se centrifugó a 8 000 X g durante 3 minutos (centrifuga Heraeus Biofuge pico), se decantó el sobrenadante y la pastilla bacteriana se resuspendió en 400 µL de agua destilada estéril, se centrifugó a 8 000 X g durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 200 µL de agua destilada estéril, los tubos con las muestras se incubaron en hielo durante 5 minutos, posteriormente se pusieron en agua a ebullición durante 10 minutos, seguido se colocó nuevamente en hielo durante 2 minutos. Las muestras se centrifugaron a 8000 X g durante 5 minutos, y el sobrenadante se transfirió en condiciones de esterilidad a un tubo nuevo y estéril. Se guardó a 4°C hasta su uso.

Amplificación aleatoria de DNA polimórfico (RAPD-PCR)

El DNA bacteriano fue extraído por el método de ebullición como se describió anteriormente y se cuantificó por espectrofotometría, se utilizó 100 ng de DNA bacteriano como DNA templado en la reacción de PCR-RAPD (RAPD). Cada 30 µL de la reacción contenía 3 µL de 1X buffer [10X], 1.8 µL de 3 mM MgCl₂ [50 mM], 0.6 µL de 0.2 mM deoxinucleótidos trifosfatados [10 mM], 4.5 µL de 30 pmol / µL del oligonucleótido llamado 1247 (concentración madre, 200 pmol / µL), 0.24 µL de 2U / µL Taq DNA polimerasa [5 U µL⁻¹] (Invitrogen), 5 µL de templado de DNA, y 14.86 µL de agua des-ionizada estéril. La amplificación fue realizada en el termociclador T100™ Thermal cycler (Biorad) y las condiciones de reacción fueron las siguientes: Después de la desnaturalización a 95°C por 5 minutos, las muestras se sometieron a 35 ciclos de 95°C por 1 minuto, 58°C por 1 minuto, y 72 °C por 2 minutos, con una extensión final de 10 minutos a 72°C. Los productos amplificados de PCR se les añadió 7.5 µL de buffer Laemmli 4X y se corrieron en un gel de acrilamida al 10%

en buffer de electroforesis 1X (tris 3.03, glicina 14.4 g y SDS 1g para 1 litro). Como marcador de peso molecular se utilizó DNA Ladder de 100 pb (Fermentas^{MR}). El gel se tiñó en solución de bromuro de etidio (10 μ L / 100 mL agua) durante 30 minutos y se visualizó en un transiluminador de ultravioleta (UVP High performance). La documentación del gel se guardó en formato TIFF para su posterior análisis.

Análisis RAPD

Los patrones de bandas obtenidos mediante RAPD se analizaron utilizando el programa GelCompar II (Applied Maths, Bélgica). El Análisis de Cluster (grupo clonal) y dendogramas se determinaron mediante la medición de similitud con base en una curva de densitometría, método UPGMA, utilizando la correlación de Pearson (coeficiente de correlación en el momento del producto).

Análisis estadístico

La diferencia en el tamaño de muestra de los aislados fue evaluada mediante la prueba estadística de Fisher. Con un valor de significancia definida con el valor de $p < 0.05$. Todos los resultados de adhesión e invasión, producción de biopelícula de los aislados APEC y UPEC, fueron analizados en gráficas elaboradas mediante el uso de GraphPad prism versión 6.01

RESULTADOS

Confirmación de la identidad de los aislados de *E. coli*

Se realizó la PCR convencional (templado DNA genómico) a los 54 aislados (35 APEC y 19 UPEC), se amplificó un fragmento del gen constitutivo *gadA*. Resultó que todas las muestras amplificaron el producto esperado de 670 pb, por lo que estos resultados confirman que todos los aislados son de *E. coli* (Figura 1).

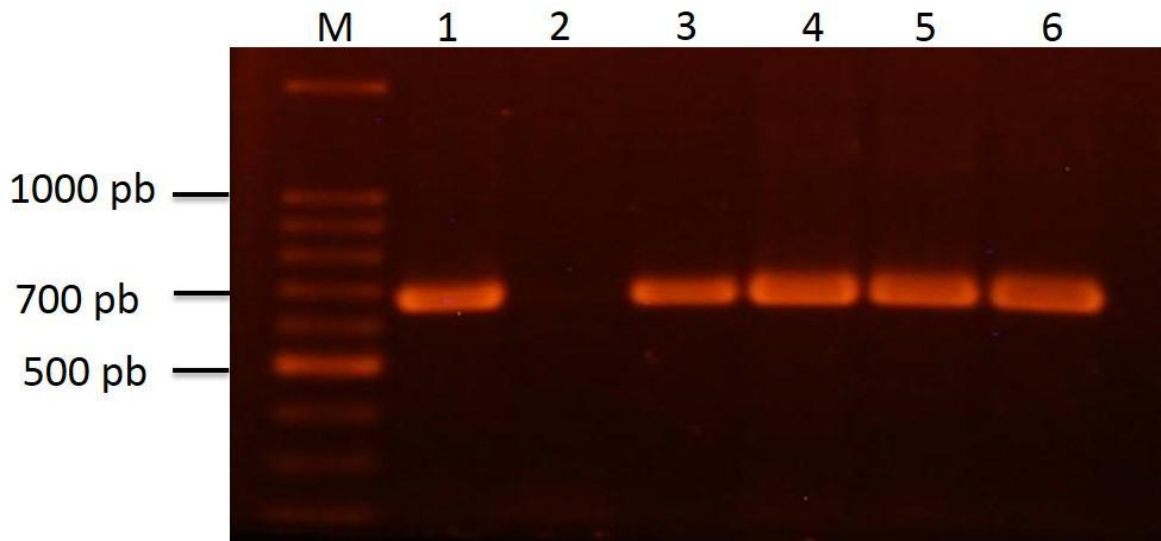
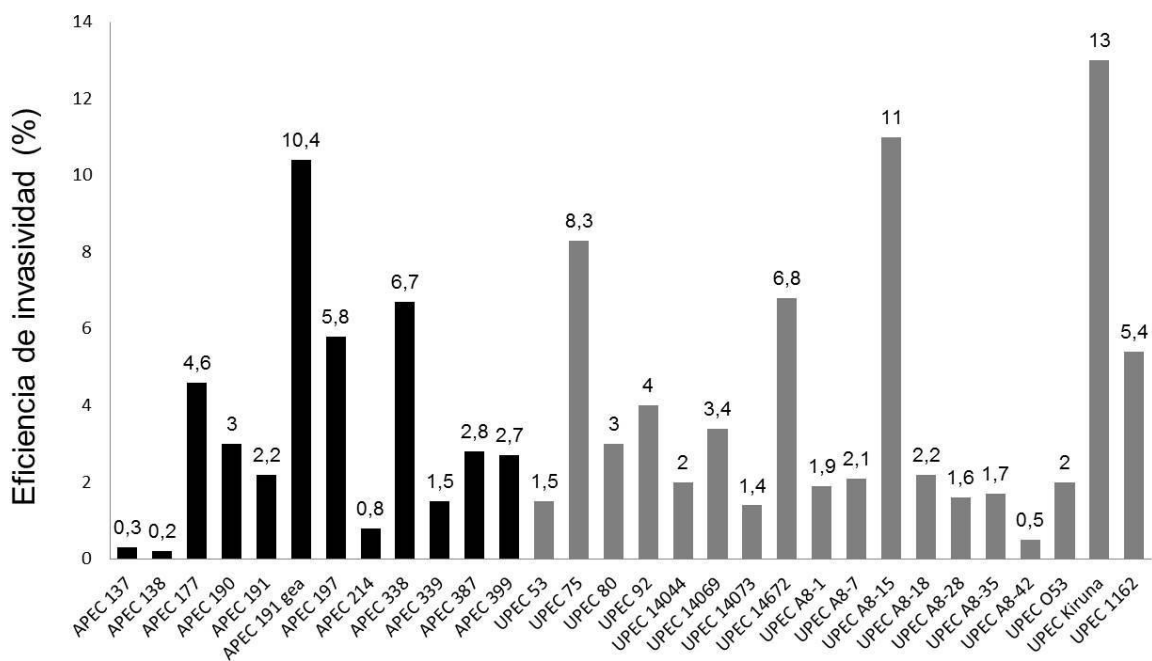


Figura 1. Reacción de PCR para amplificar un fragmento del gen constitutivo *gadA* de *E. coli* obteniendo un producto de 670 pb. En la figura representativa se muestra un gel de agarosa al 1% que contiene: **M.** Marcador de peso molecular GeneRuler™ 100 pb (Fermentas); **1.** Control (positivo) *E. coli* DH5 alfa; **2.** Control (negativo) *Salmonella* spp. **3.** Aislado APEC 119; **4.** Aislado APEC 387; **5.** Aislado UPEC A8-1; **6.** Aislado UPEC Kiruna.

Evaluación de la capacidad de invasión de los aislados de APEC y UPEC a células HEP-2

Se realizaron ensayos de invasividad *in vitro* a los 54 aislados de APEC y UPEC. El ensayo consistió en infectar, con cada aislado, la monocapa de células HEP-2, incubarla y exponerla al antibiótico gentamicina, posteriormente recuperar las bacterias del interior de las células y finalmente cuantificarlas en platos con gelosa Mac Conkey. Únicamente las bacterias invasivas se mantienen viables debido a que durante el ensayo la gentamicina no penetra al interior de las células. Las células se infectaron a una MOI aproximada de 30:1 durante 3 horas para determinar adherencia e invasividad bacteriana de los aislados. Se utilizaron como control negativo y positivo de invasividad a las cepas de *E. coli* K-12 y UPEC 1162 respectivamente. La eficiencia de invasión (%) fue calculada dividiendo las UFC adherentes entre las UFC invasivas por 100. Se encontró que de los 35 aislados APEC, 15 (42.8%) fueron capaces de internalizarse en células HEP-2, sin embargo, solo 8 de estos resultaron ser claramente invasivos, su eficiencia de invasividad varió de 0.7% a 2.42% (Figura 2). En el caso de los aislados UPEC la gran mayoría resultaron invasivos (17 de 19 aislados), casi el 90% invadieron las células HEP-2 (ver Figura 2). En este grupo el 64.7% de los aislados resultaron altamente invasivos con una eficiencia de invasividad que va de 0.8% a 3.6% (Figura 2). Una cepa UPEC despegó la monocapa celular, por lo que no se pudo evaluar el ensayo de invasividad, finalmente solo un aislado de este grupo resultó negativo en el ensayo de invasividad.



Aislados APEC y UPEC

Figura 2. Eficiencia de invasividad de aislados *E. coli* patógena aviar (APEC) y uropatógena humana (UPEC) en células HEp-2 mantenidas en cultivo, expresada en porcentaje.

Capacidad de formación de biopelícula

Los resultados muestran que todos los aislados APEC y UPEC produjeron biopelícula, sin embargo, con distinta capacidad, en los aislados APEC se observó mayor proporción de aislados con producción de biopelícula moderada y fuerte, esto es 34 aislados APEC (97%) contra 13 aislados UPEC (68%). Cuatro aislados de APEC mostraron ser fuertes formadores de biopelícula y alcanzaron una densidad óptica mayor a 1.0, lectura-que ningún aislado de UPEC alcanzó. 32 % de los aislados de UPEC fueron débiles formadores de biopelícula en contraste con las APEC que solo 3% resultaron débiles formadoras (Figura 3).

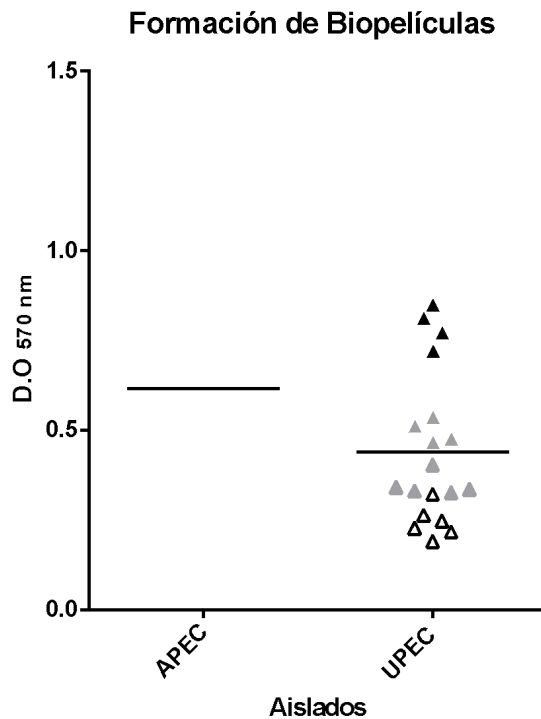


Figura 3. Cuantificación de la formación de biopelícula (mediante el método de solubilización de cristal violeta) de 35 distintos aislados APEC y 19 aislados UPEC en medio M9 incubadas por 48 horas. En círculos y triángulos: blancos (débiles), grises (moderados) y negros (fuertes) formadoras de biopelícula.

Presencia de plásmidos grandes

Se demostró la presencia o ausencia de plásmidos grandes (mayores a 48 kb) en los 54 aislados de APEC y UPEC mediante los métodos de lisis alcalina y de Eckhardt. Se encontró que el 100% de los aislados de UPEC portaron plásmidos grandes, el tamaño aproximado de los diferentes plásmidos varió de 80 kb a 130 kb, aproximadamente. Con respecto a los aislados de APEC el 83% (29 de 35 aislados) de estos presentaron plásmidos, cuyo tamaño varió de 60 kb a 140 kb (Ver cuadro 2)

Algunos aislados aparentemente presentaron dos o tres plásmidos, de acuerdo con lo que se observó, en el gel de agarosa (Figura 4). No se puede asegurar que cada banda en el gel corresponde a un plásmido, en algunos casos dos o tres bandas en el mismo carril pueden deberse al mismo plásmido, pero en diferentes estados de superenrollamiento.

Cuadro 2. Contenido de plásmidos y tamaño (kb) aproximado entre los aislados APEC y UPEC.

# <i>plásmidos</i>	# aislados		tamaño (kb)
	APEC	UPEC	
0	6	0	0
1	13	12	80 a 130
2	11	6	60 a 140
3	5	0	70 a 140
4	0	1	70 a 130

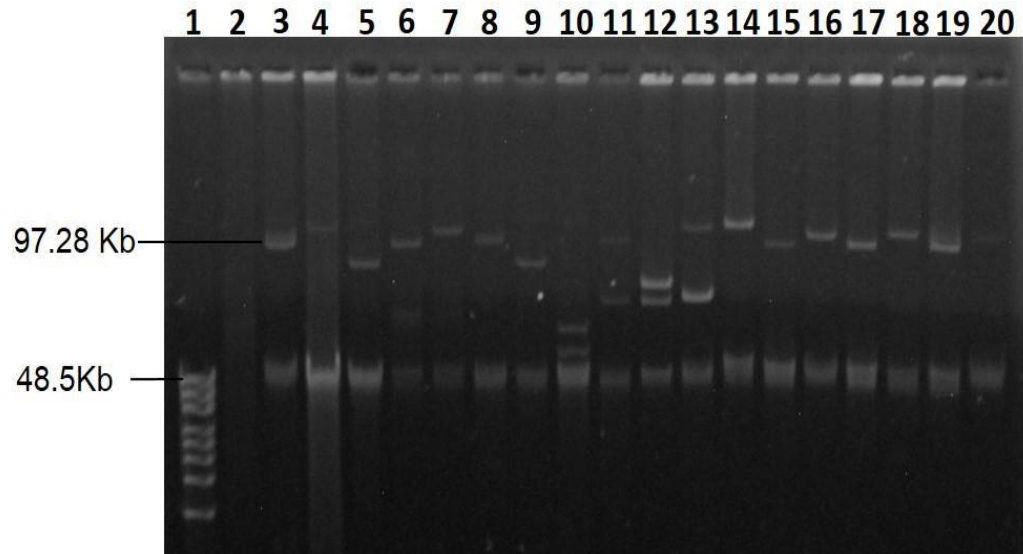


Figura 4. Perfil plasmídico de los aislados de APEC y UPEC. Gel de agarosa al 0.5% teñido con bromuro de etidio después de la electroforesis. Los plásmidos se aislaron mediante la técnica de lisis alcalina. De izquierda a derecha, Carril 1: Marcador de peso molecular (High Range DNA Ladder, Fermentas). Carril 2: K-12 control (-), Carril 3: EPEC E2348 control (+), Carril 4 al 11: aislados APEC (119, 183, 208, 213, 234, 210, 138 y 399), Carril 12 al 20: cepas UPEC (14073, 14044, 92, A8-1, 14369, A8-7, A8-15, A8-35 y Kiruna, respectivamente).

Resistencia antimicrobiana

Se determinó la susceptibilidad antimicrobiana de los 54 aislados de APEC y UPEC. Se observó que los aislados UPEC presentaron mayor resistencia comparado con APEC. Los dos grupos de aislados respondieron a los antimicrobianos de una manera diferente, aunque algunas tendencias se mantuvieron. Se observó que ambos grupos APEC y UPEC tuvieron aislados con más del 45 % de resistencia a seis (AMP, CIP, EBD, SCP, SXT, OXD) de los once antimicrobianos probados, no obstante, en UPEC se encontró mayor porcentaje de estas cepas resistentes (Figura 5); superando a las APEC por 25% de cepas resistentes en el caso de

ampicilina. Llama la atención que lo opuesto sucedió con el antibiótico doxiciclina donde el 66% de los aislados APEC fue resistente, en contraste con sólo 16% de los aislados de UPEC. Ampicilina fue el antibiótico al que se encontró mayor resistencia en ambos grupos, con 100% de resistencia en UPEC y 74% en APEC. La menor resistencia observada fue en el grupo APEC y con los antibióticos ceftazidima y gentamicina; con 3% y 6%, respectivamente. En el caso del grupo UPEC donde se encontró la menor resistencia fue en cuatro antibióticos (AMC, DOX, CRO, GEN) con 16 % de los aislados.

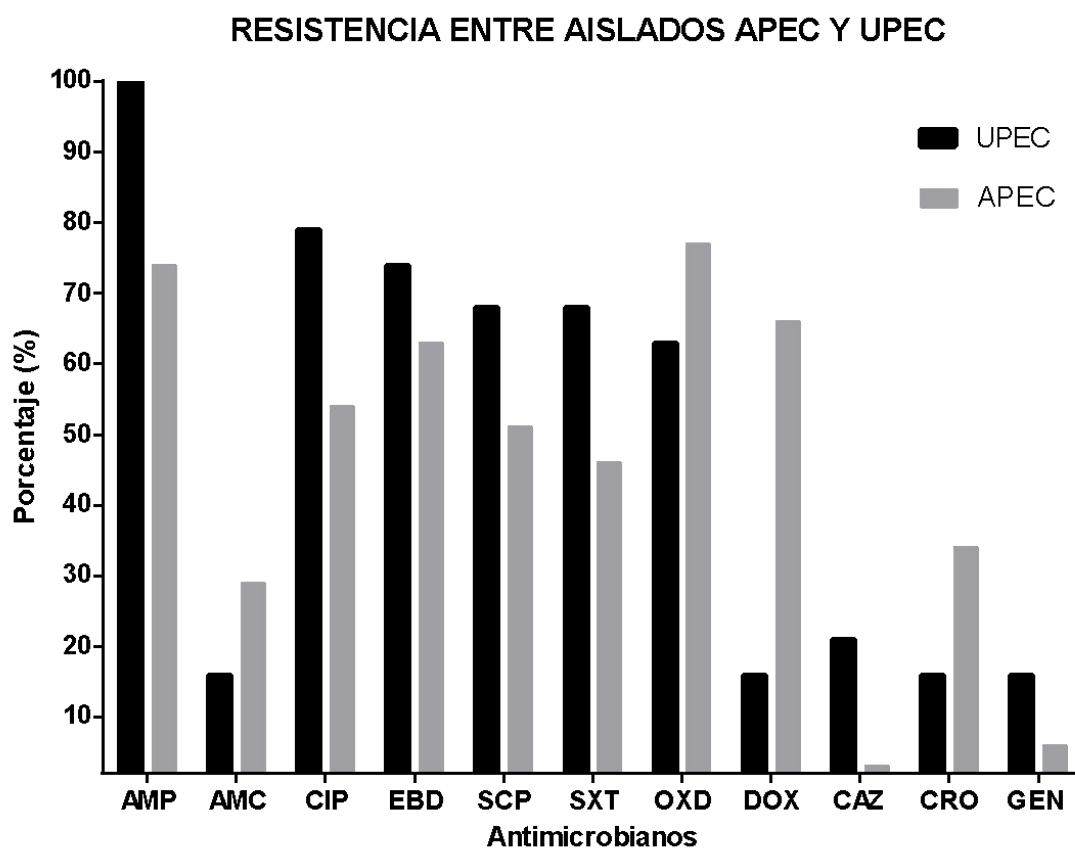


Figura 5. Porcentaje de resistencia a once diferentes antimicrobianos en los aislados APEC y UPEC. AMP: ampicilina; AMC: amoxicilina/ácido clavulánico; CIP: ciprofloxacino; EBD: enrofloxacina; SCP: sulfacloropiridacina/trimetoprima; SXT: trimetoprima/sulfametoxazol; OXD: oxitetraciclina; DOX: doxiciclina; CAZ: ceftazidima; CRO: ceftriaxona; GEN: gentamicina.

Similitud genética entre aislados APEC y UPEC

Se determinó la relación genética entre aislados APEC y UPEC mediante la técnica de RAPD-PCR, utilizando el oligonucleótido informativo 1247. A cada aislado se le obtuvo su huella genómica y las imágenes de los geles fueron digitalizadas en formato TIFF (Figura 6) y analizadas mediante el programa GelCompar II, para la elaboración de un dendograma (Figura 7).

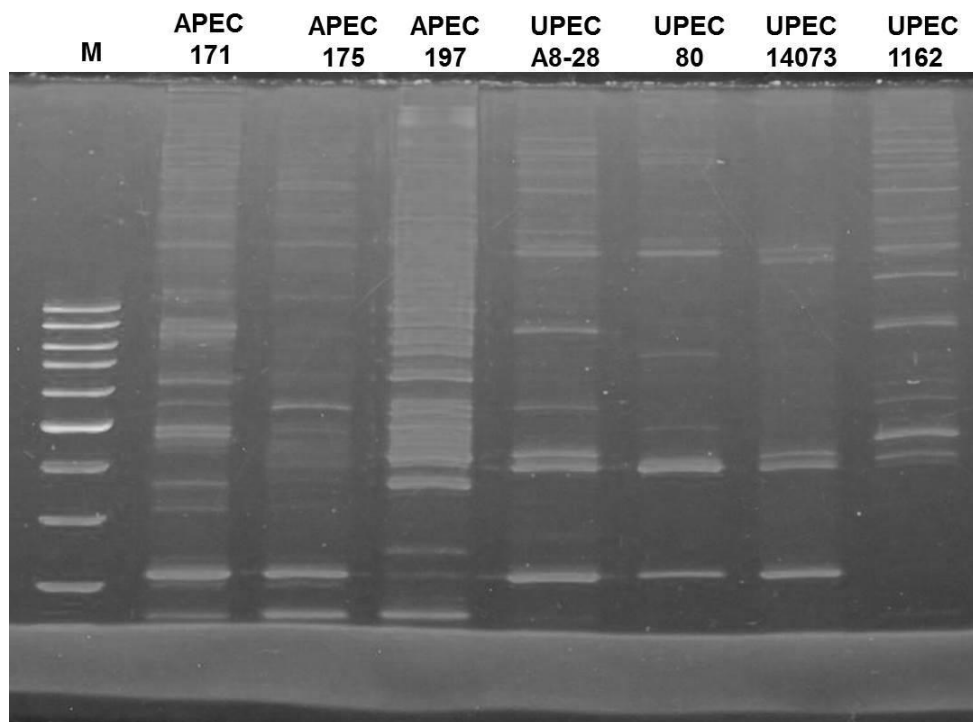


Figura 6. Patrón electroforético obtenido por RAPD - PCR en gel de poliacrilamida al 10%. Pozo 1: Marcador de peso molecular 100 pb; pozo 2,3 y 4: aislados APEC, Pozo 5, 6 y 7: aislados UPEC, pozo 8: Control positivo UPEC 1162.

Se pudo obtener mediante RAPD - PCR la huella genómica de cada uno de los 54 aislados estudiados, sin embargo, al analizar los datos en el dendograma formado no se logró diferenciar los aislados APEC de los de UPEC, puesto que estos se dispersan sin ningún orden aparente, agrupándolos unos aislados UPEC con APEC y viceversa. Tampoco se observó una clara relación genética entre los diferentes aislados.

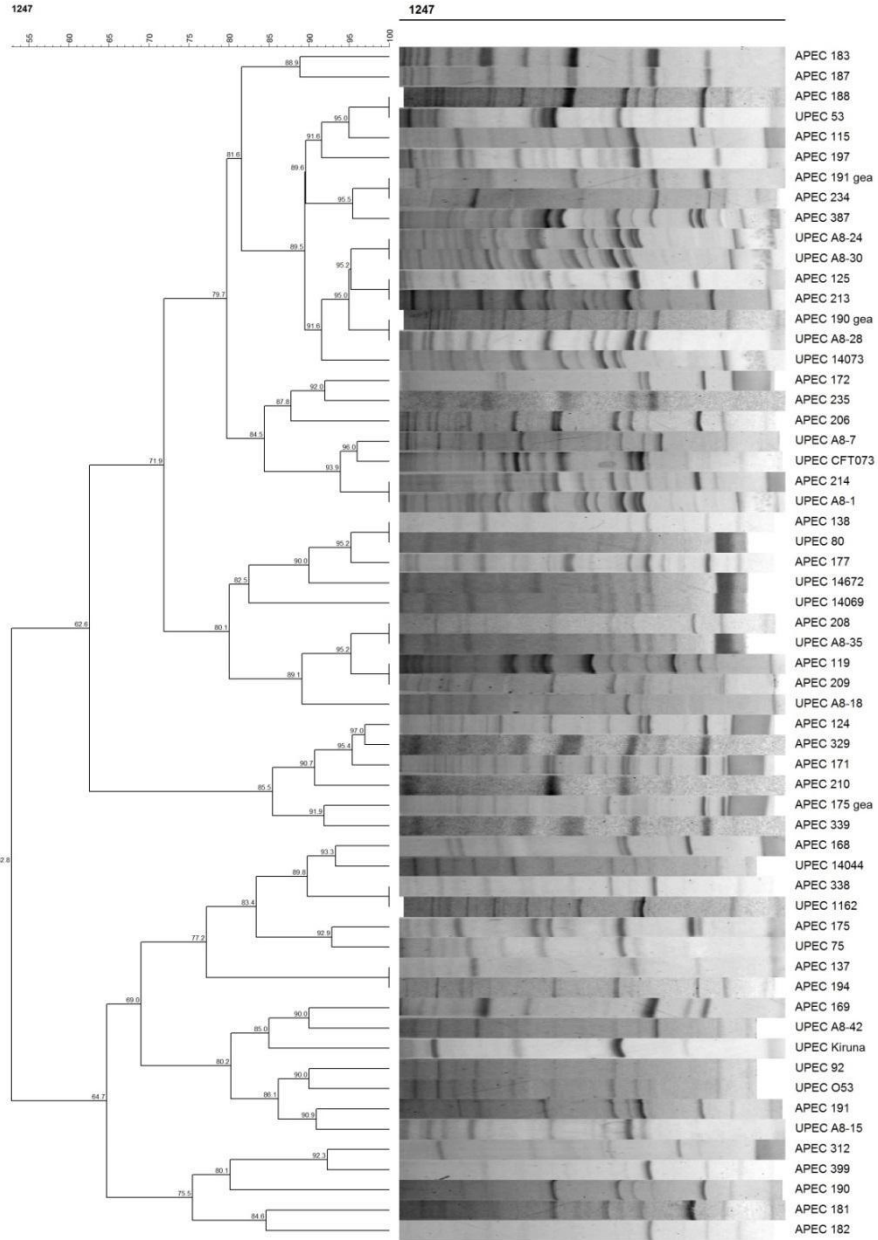


Figura 7. Dendrograma y coeficiente de similitud entre aislados APEC y UPEC. A la izquierda se muestra el porcentaje de similitud entre los aislados, seguido del perfil de electroforesis y la clave de la cepa estudiada.

DISCUSIÓN

En la presente investigación se comparó dos grupos de *E. coli* extraintestinales (APEC y UPEC), uno aislado de aves con colibacilosis y el otro de orina proveniente de pacientes con ITU-recurrente. Se estudiaron las siguientes características bacterianas fenotípicas: capacidad de invadir células epiteliales *in vitro*, capacidad de producir biopelícula, susceptibilidad antimicrobiana, portación de plásmidos y conocer la relación genética entre dichos aislados.

En los ensayos de invasividad, 8 (23%) aislados aviares mostraron capacidad de invadir a las células epiteliales HEP-2 de origen humano, dichas células se derivan de un carcinoma de laringe humano y frecuentemente se utilizan como modelo en los ensayos de adherencia e invasividad en diversos patotipos de *E. coli*. Este resultado ésta de acuerdo con nuestra hipótesis en la que esperamos habilidades de invasividad en los aislados aviares, no obstante que las células del ensayo de invasividad no son de origen aviar. El porcentaje de invasividad entre 0.7% y 2.4%, fue equivalente al encontrado con los aislados de UPEC de humanos. Germon *et al.* 2005, demostraron que aislados de APEC invadieron *in vitro* a células endoteliales de la microvasculatura del cerebro humano y que el gen llamado invasina *ibeA* (invasion of brain endothelium), que solo se había descrito en aislados humanos, está involucrado en invasividad y lo presentaron tanto cepas de *E. coli* aviares como humanas. La habilidad de las APEC para invadir células *in vitro* ya ha sido demostrada, Matter *et al.* (2011), compararon la invasividad de 8 cepas APEC asociadas a septicemia de pollos, de diferentes países (Brazil, Alemania, Estados Unidos y Francia) y como control positivo utilizó *S. Typhimurium* SL 1344, los ensayos de invasividad se realizaron en células de fibroblasto de pollo (CEC-32), lo que resultó que 1 cepa APEC MT78 (Pourbakhsh *et al.* 1997b) invadió más (1.3 UFC / 10 células) que *S. Typhimurium* (0.6 UFC/ 10 células). Al realizar los cálculos del porcentaje de invasión ($\frac{\#bacterias\ intracelulares}{\#bacterias\ asociadas} \times 100$), la

invasividad de APEC MT78 (2.5%) es menor que *S. Typhimurium* (3.5%), debido a que la cepa APEC fue más adherente (60 UFC/célula) que *S. Typhimurium* (20 UFC/ célula), obteniendo en consecuencia un porcentaje de invasividad más bajo. Este tipo de resultados también lo observamos en nuestra investigación con los aislados APEC comparados con UPEC. En cuanto a UPEC, un alto porcentaje (~90%) de estos aislados demostraron ser invasivos en células HEp-2, lo cual era esperado, debido a que en el presente estudio, los aislados de ITU son seleccionados y provienen de pacientes con ITUs recurrentes; al respecto se piensa que la mayoría de las recurrencias se debe a cepas UPEC con capacidad invasiva. Se ha demostrado que una característica sobresaliente de las cepas UPEC causantes de recurrencias es su capacidad para invadir células uroepiteliales de la vejiga, por microscopía electrónica se detectaron comunidades bacterianas intracelulares en células exfoliadas de la vejiga de pacientes con ITU-recurrentes sintomáticas (Rosen *et al.* 2007). En el modelo de cistitis en vejiga de ratón, se mostraron comunidades bacterianas intracelulares parecida a una biopelícula estableciendo reservorios intracelulares quiescentes que representan reservorios bacterianos estables para infecciones recurrentes (Mysorekar *et al.* 2006; Kernn *et al.* 2005). Cabe mencionar que las infecciones recurrentes del tracto urinario, causadas por UPEC han aumentado en frecuencia, en la última década y los tratamientos clínicos frecuentemente fallan y no logran erradicar al microorganismo, esto se debe, en parte, a la característica invasiva de algunas cepas UPEC, ya que en el hospedero, los microorganismos intracelulares se mantienen protegidos de los antibióticos y en cierta forma también protegidos de la respuesta inmunitaria. Actualmente, las infecciones recurrentes del tracto urinario son un problema de salud pública y no exclusivo de países en vías de desarrollo.

El número de bacterias intracelulares detectadas en el presente trabajo fue similar en los dos grupos de aislados APEC y UPEC, estuvieron en el rango de 1×10^3 - 6.5×10^5 / mL y 2×10^3 - 2.8×10^5 / mL, respectivamente.

Desconocemos si el mecanismo de invasividad es igual para los dos grupos y tampoco sabemos si las bacterias se replican intracelularmente. Sería conveniente hacer ensayos de invasividad en el modelo de cistitis en ratón, para demostrar que este fenómeno de invasividad por APEC ocurre *in vivo*, como ha sido demostrado en el caso de las UPEC. Por otro lado, también se debe investigar si los aislados de UPEC tienen la capacidad de invadir células o tejidos aviares. Se describió mediante análisis filogenético y secuenciación de todo el genoma del prototipo *E. coli* (LF82), la cual es adherente e invasiva (AIEC) a enterocitos, reveló que está genéticamente relacionada a la APEC y UPEC, sugiriendo que este patotipo intestinal utiliza una estrategia similar de adhesión e invasión de células epiteliales como lo hacen las cepas extraintestinales de aves y de humanos (Miquel *et al.* 2010, Nash *et al.* 2010, Clarke *et al.* 2011).

En general, en ambos grupos de *E. coli* aviar y uropatógena humana encontramos aislados capaces de producir biopelícula en medio mínimo M9. Este medio de cultivo compuesto básicamente de sales, suplementado con glucosa y pequeñas cantidades de triptona (0.006%) como fuente de carbono y nitrógeno, respectivamente, por su baja cantidad de nutrientes asemeja a la orina como medio de cultivo para *E. coli* (fórmula basada en sales), (Russo *et al.* 1999). En un microambiente parecido al de la vejiga humana, en medio M9, el 97 % de los aislados patógenos aviares (APEC) produjeron biopelícula, en contraste con el 68% de los aislados uropatógenos de humanos (UPEC) que formaron biopelícula. En un estudio realizado por Skyberg *et al.* en 2007, comparó 105 cepas de APEC y 103 cepas AFEC (fecales de pollos sanos) en la capacidad de formar biopelícula en tres distintos medios (M63, BHI y TSB) y la asociación con el grupo filogenético (A, B1, B2 y D), y demostró que la formación de biopelícula se induce de acuerdo a las condiciones pobres en nutrientes del medio de cultivo y además se asocia a los grupos filogenéticos B2, D (cepas patógenas extraintestinales) y B1 (cepas comensales que pueden transformarse a patógenas). Por lo contrario

cepas AFEC fueron mayormente formadoras de biopelícula en medio rico de nutrientes (M63) y se asocia al grupo filogenético A (comensales). Esta capacidad de formar biopelícula les confiere una ventaja en cuanto a la transferencia de plásmidos, ya que en la biopelícula formada las bacterias están más cercanas unas con otras y propicia la transferencia de ADN principalmente por el proceso de conjugación (Ghigo 2001). En la presente investigación del perfil plasmídico (contenido de plásmidos) todos los aislados uropatógenos presentaron plásmidos grandes mayores de 45 kb, en cuanto a los aislados aviares únicamente 6 aislados no presentaron plásmidos, al menos de gran tamaño. Desconocemos los genes que portan dichos plásmidos y sí le confieren virulencia a este tipo de cepas UPEC, para saber esto sería recomendable secuenciar algunos de estos plásmidos.

En la presente investigación, en la prueba de susceptibilidad antimicrobiana se consideraron como cepas resistentes a los aislados que resultaron intermedios además de los resistentes.

Se compararon los aislados APEC y UPEC en cuanto a su resistencia a los antimicrobianos que comúnmente se utilizan en la industria avícola y en la clínica humana. En general, el patrón de resistencia a quimioterapéuticos observados fue en los aislados uropatógenos humanos (AMP, CIP, EBD, SCP, SXT, CAZ y GEN) que en los aislados aviares (AMC, OXD, DOX, CRO). Es interesante que los aislados UPEC presenten resistencia a quimioterapéuticos de uso exclusivo en veterinaria (EBD y SCP) y por lo contrario que los aislados APEC presenten resistencia a los antimicrobianos de medicina humana (AMC, CRO), esto indica que seguramente dichos aislados resistentes han sido expuestos repetidamente a los correspondientes antimicrobianos, y con esto se han seleccionado a las cepas resistentes que posteriormente se diseminan entre las diferentes poblaciones. A esto se le llama presión selectiva y representa un mecanismo de fomentar la resistencia a los antimicrobianos; otro mecanismo es la diseminación de elementos genéticos móviles (plásmidos, transposones, integrones y fagos) que

llevan los genes de resistencia; también el mecanismo de resistencia propia de *E. coli* mediante la inactivación enzimática del quimioterapéutico, bombas de e-flujo, reducción del fármaco y modificación del blanco hacen que se presente el fenotipo de resistencia (Szmolka *et al.* 2012).

En el caso particular de resistencia a ceftriaxona, los aislados de APEC fueron más resistentes que los de UPEC, lo cual está de acuerdo con otros estudios que reportan resistencia de *E. coli* a cefalosporinas, particularmente en brotes de ITUs y en productos avícolas (Bergeron *et al.* 2012). Estos datos obligan a formularse la pregunta ¿Cómo y de dónde surge la resistencia a ceftriaxona en los aislados aviares?

La caracterización genotípica de los aislados mediante la técnica de RAPD-PCR generó la huella genómica de cada uno de los aislados. Se elaboró un árbol filogenético con base en las secuencias amplificadas a partir del oligonucleótido 1247. El dendograma generó cinco clados y las cepas UPEC y APEC no se agruparon en un clado definido; es decir que en los cinco clados podemos ver que se agrupan tanto cepas UPEC como APEC. Esto es que ambas poblaciones se entrecruzan y no se agrupan en un clado definido. El oligonucleótido 1247 previamente demostró poder discriminar cepas patógenas aviares de las fecales (Salehi *et al.* 2008). En un estudio similar donde se comparó aislados APEC (de carne de res, cerdo y pollo) contra UPEC de humano (ITUs) mediante dos métodos de genotipificación inicial (MLVA y ERIC 2) identificaron grupos clonales con alto grado de similitud entre aislados UPEC y APEC, también se caracterizó mediante la técnica de campos pulsados (PFGE) y observaron heterogeneidad, debido a la variabilidad de las muestras, pues fueron colectadas de diferente área geográfica de Canadá y en diferente año. Además PFGE es una prueba de genotipificación para *E. coli* en el contexto de brotes epidémicos, por lo que generalmente no es empleado para establecer relaciones genéticas entre los aislados colectados de diferentes lugares y periodos de tiempo (Bergeron *et al.* 2012; Johnson *et al.* 2006). Sería conveniente emplear la técnica de MLST para conocer qué

secuencia tipo (ST) presentan los aislados APEC y UPEC del presente estudio, y así comparar si tienen la misma ST, cuáles circulan en México comparado con la base de datos mundial y si concuerdan con los ST reportados como potencial zoonótico para humanos ST (10, 14, 23, 48, 73, 95, 117, 131, 155, 359, 393, 404, 405, 678 y 1011) (Dissanayake *et al.* 2014, Mora *et al.* 2012, Olsen *et al.* 2011; Ronco *et al.* 2017; Tivendale *et al.* 2010)

CONCLUSIONES

1. Los 54 aislados ExPEC (35 APEC y 19 UPEC) en el presente trabajo pertenecen a la especie *Escherichia coli*, esto se confirmó con la detección del gen *gadA* en el ensayo de PCR.
2. En ambos grupos tanto en UPEC como en APEC encontramos cepas capaces de invadir las células HEp-2, aunque en APEC solo el 42.8 % mostró dicha capacidad.
3. Los aislados APEC (97%) tuvieron mejor capacidad de formar biopelículas, en contraste con el 68% de aislados UPEC.
4. Todos los aislados UPEC presentaron al menos un plásmido grande (mayor de 45 kb) mientras que en APEC seis aislados no los presentaron.
5. En general, el patrón de resistencia a los antimicrobianos fue mayor en los aislados UPEC (AMP, CIP, EBD, SCP, SXT, CAZ y GEN) que en los aislados aviares (AMC, OXD, DOX, CRO). Sin embargo, en las cepas aviares se esperaba menor resistencia que la encontrada.
6. La caracterización molecular mediante RAPD-PCR mostró una elevada diversidad genética entre los aislados y no se diferenciaron respecto a su origen ya sea APEC o UPEC.

REFERENCIAS

1. Tenaillon O, Skurnik D, Picard B, Denamur E. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nature Reviews. Microbiology*. 2010, 8(3): 207-17. PubMed: 20157339
2. Hersh BM, Farooq FT, Barstad DN, Blankenhorn DL, Slonczewski JL. A glutamate-dependent acid resistance gene in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*. 1996. 178 (73): 3978-81 PubMed: 8682809
3. Castanié-Cornet MP, Cam K, Bastiat B, Cros A, Bordes P, Gutierrez C. Acid stress response in *Escherichia coli*: mechanism of regulation of *gadA* transcription by RcsB and GadE. *Nucleic Acids Res*. 2010. 38 (11): 3546-54. PubMed: 20189963
4. De Biase D, Tramonti A, Bossa F, Visca P. The response to stationary-phase stress conditions in *Escherichia coli*: role and regulation of the glutamic acid decarboxylase system. *Molecular microbiology*. 1999. 32 (6): 1198 - 211. PubMed: 10383761
5. Capitani G, De Biase D, Aurizi C, Gut H, Bossa F, Grütter MG. Crystal structure and functional analysis of *Escherichia coli* glutamate decarboxylase. *The EMBO journal*. 2003. 22(16):4027 - 37. PubMed: 12912902
6. Bergholz TM, Tarr CL, Christensen LM, Betting DJ, Whittam TS. Recent gene conversions between duplicated glutamate decarboxylase genes (*gadA* and *gadB*) in pathogenic *Escherichia coli*. *Molecular biology and evolution*. 2007. 24(10): 2323-33. PubMed: 17675652
7. Lin J, Lee IS, Frey J, Slonczewski JL, Foster JW. Comparative analysis of extreme acid survival in *Salmonella Typhimurium*, *Shigella flexneri*, and *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*. 1995. 177 (14): 4097 - 104. PubMed: 7608084
8. Russo TA, Johnson JR. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *The Journal of Infectious Disease*. 2000, 181(5): 1753 - 1754. PubMed: 10823778

9. Johnson JR y Russo TA: Uropathogenic *Escherichia coli* as agents of diverse non- urinary tract extraintestinal infections. *The Journal of Infectious Disease*. 2002, 186 (6): 859 – 864. PubMed: 12198625
10. Smith JL, Fratamico PM, Gunther NW. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Foodborne Pathogens and Disease*. 2007, 4(2): 134 – 163. PubMed: 17600482
11. Ejrnaes K. Bacterial characteristics of importance for recurrent urinary tract infections caused by *Escherichia coli*. *Dan Med Bull*. 2011; 58 (4): B4187. PubMed: 21466767
12. Chu CM, Lowder JL. Diagnosis and treatment of urinary tract infections across age groups. *Am J Obstet Gynecol*. 2018; PubMed: 29305250
13. Paniagua – Contreras GL, Hernández Jaimes T, Monroy Pérez E, Vaca Paniagua F, Díaz Velásquez C, Uribe García A, Vaca S. Comprehensive expression analysis of pathogenicity genes in uropathogenic *Escherichia coli* strains. *Microb pathog*. 2017; 103: 1 – 7. PubMed: 27993701
14. Donnenberg MS y Welch R. (1996). Virulence determinants of uropathogenic *Escherichia coli*. In *Urinary Tract Infections: Molecular Pathogenesis and clinical management*, pp. 135–174. Edited by H.L. T. Mobley & J. W. Warren. Washington, D.C: American Society for Microbiology.
15. Olsen RH, Frantzen C, Christensen H, Bisgaard M. An investigation on first-week mortality in layers. *Avian Dis*. 2012 Mar; 56(1):51-7. PubMed: 22545528
16. Vandekerchove D, De Herdt P, Laevens H, Pasmans F. Colibacillosis in caged layer hens: characteristics of the disease and the aetiological agent. *Avian Pathol*. 2004; 33(2):117-25. PubMed: 15276977
17. Ewers C, Janssen T, Kiessling S, Philipp HC, Wieler LH. Molecular epidemiology of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from colisepticemia in poultry. *Vet Microbiol*. 2004. 104: 91 – 101. PubMed: 15530743

18. McPeakes SJ, Smyth JA, Ball HJ. Characterisation of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) associated with colisepticaemia compared to faecal isolates from healthy birds. *Vet Microbiol.* 2005 Oct 31; 110(3-4):245-53. PubMed: 16150559
19. Dziva F, Stevens MP. Colibacillosis in poultry: unravelling the molecular basis of virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* in their natural hosts. *Avian Diseases.* 2008. 37 (4): 355 - 366. PubMed: 18622850
20. Ewers C, Bethe A, Stamm I, Grobbel M, Kopp PA, Guerra B, Stubbe M, Doi Y, Zong Z, Kola A, Schaufler K, Semmler T, Fruth A, Wieler LH, Guenther S. CTX-M-15-D-ST648 *Escherichia coli* from companion animals and horses: another pandemic clone combining multiresistance and extraintestinal virulence?. *J Antimicrob Chemother.* 2014; 69(5):1224-30. PubMed: 24398338
21. Rodriguez Sieck KE, Giddings CW, Doetkott C, Johnson TJ, Fakhr MK, Nolan LK. Comparison of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract infection and avian Colibacillosis. *Microbiology.* 2005, 151, 2097 - 2110. PubMed: 15942016
22. Kemmett K, Humphrey T, Rushton S, Close A, Wigley P, Williams NJ. A longitudinal study simultaneously exploring the carriage of APEC virulence associated genes and the molecular epidemiology of faecal and systemic *E. coli* in commercial broiler chickens. *PloS One.* 2013; 8 (6):e67749, 1 - 10. PubMed: 23825682
23. Mellata M. Human and avian extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: infections, zoonotic risks, and antibiotic resistance trends. *Foodborne pathogens and disease.* 2013. 10 (11). 916 - 932. PubMed: 23962019
24. Nolan LK, et al. 2013. Colibacillosis. In: *Diseases of poultry* 13th edition. Blackwell Publishing, 751 - 806.
25. Ewers C, Antão EM, Diehl I, Philipp HC, Wieler LH. Intestine and environment of the chicken as reservoirs for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains with zoonotic potential. *Appl Environ Microbiol.* 2009. 75(1):184-92. PubMed:18997030
26. Delicato ER, de Brito BG, Gaziri LC, Vidotto MC. Virulence-associated genes in *Escherichia coli* isolates from poultry with colibacillosis. *Vet Microbiol.* 2003; 94 (2):97-103. PubMed12781478

27. Johnson TJ, Logue CM, Wannemuehler Y, Kariyawasam S, Doetkott C, DebRoy C, White DG, Nolan LK. Examination of the source and extended virulence genotypes of *Escherichia coli* contaminating retail poultry meat. *Foodborne Pathog Dis.* 2009. 6(6):657-67. PubMed: 19580453
28. Bélanger L, Garenaux A, Harel J, Boulianne M, Nadeau E, Dozois CM. *Escherichia coli* from animal reservoirs as a potential source of human extraintestinal pathogenic *E. coli*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2011; 62(1):1-10. PubMed: 21362060
29. Manges AR, Johnson JR. Food-borne origins of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections. *Clin Infect Dis.* 2012. 55(5):712-9. PubMed: 22615330
30. Johnson JR, Kuskowski MA, Menard M, Gajewski A, Xercavins M, Garau J. Similarity between human and chicken *Escherichia coli* isolates in relation to ciprofloxacin resistance status. 2006. *J Infect Dis.* 194(1):71-8. PubMed: 16741884
31. Ochman H y Selander RK. Evidence for clonal population structure in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U.S. A.* 1984, 81 (1): 198 - 201. PubMed: 6364134
32. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews. Microbiology.* 2004. 2 (2), 123 - 140. PubMed: 15040260
33. Orskov I, Orskov F, Jann B, Jann K. Serology, chemistry, and genetics of O and K antigens of *Escherichia coli*. *Bacteriological reviews.* 1977, 41 (3): 667 - 710. PubMed: 334154.
34. Da Silva LC, de Mello Santos AC, Silva RM. Uropathogenic *Escherichia coli* pathogenicity islands and other ExPEC virulence genes may contribute to the genome variability of enteroinvasive *E. coli*. *BMC microbiology.* 2017, 17 (1): 68. PubMed: 28302076
35. Bonacorsi SP, Clermont O, Tinsley C, Le Gall I, Beaudoin JC, Elion J, Nassif X y Bingen E. Identification of regions of the *Escherichia coli* chromosome specific for neonatal meningitis-associated strains. *Infection and Immunity.* 2000. 68 (4), 2096 - 2101. PubMed: 10722606

36. Oelschlaeger TA, Dobrindt U y Hacker J. Virulence factors of uropathogens. 2002. *Current Opinion in urology*. 12 (1), 33 - 38. PubMed: 11753131
37. Bullen JJ, Rogers HJ, Spalding PB y Ward CG. Iron and infection: the heart of the matter. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 2005. 43 (3), 325 - 330. PubMed: 15708305
38. Johnson TJ, Wannemuehler Y, Johnson SJ, Stell AL, Doetkott C, Johnson JR, Kim KS, Spanjaard L, Nolan LK. Comparison of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains from human and avian sources reveals a mixed subset representing potential zoonotic pathogens. *Appl Environ Microbiol*. 2008. 74 (22): 7043 - 50. PubMed: 18820066.
39. Mora A, López C, Herrera A, Viso S, Mamani R, Dhahi G, Alonso MP, Blanco M, Blanco JE, Blanco J. Emerging avian pathogenic *Escherichia coli* strains belonging to clonal groups O111:H4 - D - ST2085 and O111:H4 - D - ST 117 with high virulence gene content and zoonotic potential. *Vet microbiology*. 2012. 156 (3 -4). 347 - 352. PubMed : 2211854
40. Moulin-Schouleur M, Schouler C, Tailliez P, Kao MR, Brée A, Germon P, Oswald E, Mainil J, Blanco M, Blanco J. Common virulence factors and genetic relationships between O18:K1:H7 *Escherichia coli* isolates of human and avian origin. *Journal of Clinical Microbiology*. 2006. 44 (10), 3484 - 3492. PubMed: 17021071
41. Ronco Troels, Stegger M, Olsen RH, Sekse C, Nordstoga AB, Pohjanvirta T, Lilje B, Lyhs U, Andersen PS y Pedersen K. Spread of avian pathogenic *Escherichia coli* ST 117 O78:H4 in Nordic broiler production. *BMC genomics*. 2017. 18. 1- 8. PubMed: 28049430.
42. Johnson JR, Sannes MR, Croy C, et al. Antimicrobial drug - resistant *Escherichia coli* from human and poultry products, Minesota and Wisconsin, 2002 - 2004. *Emerg Infect Dis*. 2007. 13: 838 - 846. PubMed: 17553221
43. Manges AR, Smith SP, Lau BJ, Nuval CJ, Eisenberg JN, Dietrich PS, Riley LW. Retail meat consumption and the acquisition of antimicrobial resistant *Escherichia coli* causing urinary tract infections: a case-control study. 2007. *Foodborne Pathog Dis*. 4 (4) : 419 - 31. PubMed: 18041952

44. Hannah EL, Johnson JR, Angulo F, Haddadin B, Williamson J y Samore MH. Molecular analysis of antimicrobial- susceptible and resistance *Escherichia coli* from retail meats and human stool and clinical specimens in a rural community setting. *Foodborne pathogens and disease*. 2009. 6 (3). 285 - 295. PubMed: 19272007
45. Johnson JR, Delvari P, O'Bryan TT et al. Contamination of retail foods, particularly turkey, from community markets (Minnesota, 1999 - 2000) with antimicrobial - resistant and extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Foodborne pathog Dis*. 2005. 2; 38 - 49. PubMed: 15992297
46. Johnson JR, Gajewski A, Lesse AJ, et al. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* as a cause of invasive non - urinary infections. *J Clin Microbiol*. 2003a. 41. 5798 - 5802. PubMed: 14662987
47. Vincent C, Boerlin P, Daignault D, Dozois CM, Dutil L, Galanakis C, Reid - Smith RJ, Tellier PP, Tellis PA, Ziebell K, Manges AR. Food reservoir for *Escherichia coli* causing urinary tract infections. *Emerg Infect Dis*. 2010. PubMed: 20507779
48. Bergeron CR, Prussing C, Boerlin P, Daignault D, Dutil L, Reid - Smith RJ, Zhanel GG, Manges AR. Chicken as reservoir for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in humans, Canada. *Emerg Infect Dis*. 2012. 18, 415 - 421. PubMed: 22377351
49. Johnson JR: Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clinical Microbiology reviews*. 1991. 4(1): 80 - 128. PubMed: 1672263
50. Graziani C, Luzzi I, Corro M, Tomei F, Parisi G, Giufre M, Morabito S, Caprioli A, Cerquetti M. Phylogenetic background and virulence genotype of ciprofloxacin-susceptible and ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* strains of human and avian origin. 2009. *J Infect Dis*. *J Infect Dis*. PubMed: PMID: 19226230
51. Sannes MR, Belongia EA, Kieke B, Smith K, Kieke A, Vandermause M, Bender J, Clabots C, Winokur P, Johnson JR. Predictors of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* in the feces of vegetarians and newly hospitalized adults in Minnesota and Wisconsin. *J Infect Dis*. 2008. 197(3):430-4. PubMed: 18184093

52. Moulin – Schouleur M, Schouler C, Tailliez P, Kao MR, Bree A, Germon P, Oswald E, Mainil J, Blanco M y Blanco J. Common virulence factors and genetic relationship between O18:K1:H7 *Escherichia coli* isolates human and avian origin. *Journal of clinical microbiology*. 2006. 44 (10).3484 - 3492. PubMed: 17021071
53. Moulin-Schouleur M, Répérant M, Laurent S, Brée A, Mignon-Grasteau S, Germon P, Rasschaert D, Schouler C. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains of avian and human origin: link between phylogenetic relationships and common virulence patterns. *J Clin Microbiol*. 2007. 45(10):3366-76. PubMed: 17652485
54. Ron EZ. Host specificity of septicemic *Escherichia coli*: human and avian pathogens. *Current Opinion in Microbiology*. 2006. 9 (1), 28 - 32. PubMed: 16384724
55. Johnson TJ, Kariyawasam S, Wannemuehler Y, Mangiamele P, Johnson SJ, Doetkott C, Skyberg JA, Lynne AM, Johnson JR, Nolan LK. The genome sequence of avian pathogenic *Escherichia coli* strain O1:K1:H7 shares strong similarities with human extraintestinal pathogenic *E. coli* genomes. *J Bacteriol*. 2007, 189(8):3228-36. PubMed: 17293413.
56. Zhao L, Gao S, Huan H, Xu X, Zhu X, Yang W, Gao Q y Liu X: Comparison of virulence factors and expression of specific genes between uropathogenic *Escherichia coli* and avian pathogenic *Escherichia coli* in a murine urinary tract infection model and a chicken challenge model. *Microbiology*. 2009, 155 (Pt.5): 1634-1644. PubMed: 19372154
57. Johnson TJ, Logue CM, Johnson JR, Kuskowski MA, Sherwood JS, Barnes HJ, DebRoy C, Wannemuehler YM, Obata-Yasuoka M, Spanjaard L, Nolan LK. Associations between multidrug resistance, plasmid content, and virulence potential among extraintestinal pathogenic and commensal *Escherichia coli* from humans and poultry. *Foodborne Pathog Dis*. 2012; 9(1):37-46. PMID: 21988401
58. Meyer DH, Mintz KP, Fives-Taylor PM. Models of invasion of enteric and periodontal pathogens into epithelial cells: a comparative analysis. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1997. 8(4):389-409. PubMed: 9391752

59. Antão EM, Wieler LH, Ewers C. Adhesive threads of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Pathog.* 2009. 1(1):22. PubMed: 20003270
60. La Ragione RM, Cooley WA y Woodward MJ. The role of fimbriae and flagella in the adherence of avian strains of *Escherichia coli* O78:K80 to tissue culture cells and tracheal and gut explant. *Journal of Medical Microbiology.* 2000a. 49 (4), 327 - 338. PubMed: 10755626
61. Bahrani-Mougeot FK, Buckles EL, Lockatell CV, Hebel JR, Johnson DE, Tang CM, Donnenberg MS. Type 1 fimbriae and extracellular polysaccharides are preeminent uropathogenic *Escherichia coli* virulence determinants in the murine urinary tract. *Mol Microbiol.* 2002.45(4):1079-93. PubMed: 12180926
62. Khan NA, Kim Y, Shin S, Kim KS. FimH-mediated *Escherichia coli* K1 invasion of human brain microvascular endothelial cells. *Cell Microbiol.* 2007. 9(1):169-78. PubMed: 17222190
63. Boudeau J, Barnich N, Darfeuille-Michaud A. Type 1 pili-mediated adherence of *Escherichia coli* strain LF82 isolated from Crohn's disease is involved in bacterial invasion of intestinal epithelial cells. *Mol Microbiol.* 2001. 39(5):1272-84. PubMed: 11251843.
64. Gophna U, Barlev M, Seiffers R, Oelschlager TA, Hacker J y Ron EZ: Curli fibers mediate internalization of *Escherichia coli* by eukaryotic cells. *Infection and immunity.* 2001. 69(4): 2659 - 65. PubMed: 11254632
65. Provence DL, Curtiss R 3rd. Role of *crl* in avian pathogenic *Escherichia coli*: a knockout mutation of *crl* does not affect hemagglutination activity, fibronectin binding, or curli production. *Infect Immun.* 1992. 60(11):4460-7. PubMed: 1398960
66. Stordeur P, Marlier D, Blanco J, Oswald E, Biet F, Dho-Moulin M, Mainil J. Examination of *Escherichia coli* from poultry for selected adhesin genes important in disease caused by mammalian pathogenic *E. coli*. *Vet Microbiol.* 2002; 84(3):231-41. PubMed: 11731175
67. Yerushalmi Z, Smorodinsky NI, Naveh MW, Ron EZ. Adherence pili of avian strains of *Escherichia coli* O78. *Infect Immun.* 1990 Apr; 58(4):1129-31. PubMed: 1969393

68. Babai R, Stern BE, Hacker J, Ron EZ. New fimbrial gene cluster of S-fimbrial adhesin family. *Infect Immun*. 2000; 68(10):5901-7. PubMed: 10992500
69. Matter LB, Spricigo DA, Tasca C, C. de Vargas A. Invasin *gimB* found in a bovine intestinal *Escherichia coli* with an adherent and invasive profile. *Brazilian Journal of microbiology*. 2015. 46 (3). 875 - 878. PubMed: 26413073
70. Ewers C, Li G, Wilking H, Kiebling S, Alt K, Antao EM, Laturnus C, Diehl I, Glodde S, Hommeier T, Böhnke U, Steinrück H, Philipp HC, Wieler LH. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis causing *Escherichia coli*: How closely related are they? *International Journal of medical microbiology*. 2007. 163 - 176. PubMed: 17374506
71. Barbieri NL, de Oliveira AL, Tejkowski TM, Pavanelo DB, Rocha DA, Matter LB, Callegari-Jacques SM, de Brito BG, Horn F. Genotypes and pathogenicity of cellulitis isolates reveal traits that modulate APEC virulence. *PLoS One*. 2013; 8(8):e72322. PubMed: 23977279
72. Fleckenstein JM, Kopecko DJ, Warren RL, Elsinghorst EA. Molecular characterization of the *tia* invasion locus from enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 1996; 64(6):2256-65. PubMed: 8675335
73. Kariyawasam S, Johnson TJ, Debroy C, Nolan LK. Occurrence of pathogenicity island I (APEC-O1) genes among *Escherichia coli* implicated in avian colibacillosis. *Avian Dis*. 2006; 50(3):405-10. PubMed: 17039841
74. Beloin C, Roux A, Ghigo JM. *Escherichia coli* biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2008.322. 249-89. PubMed: 18453280
75. Branda SS, Vik S, Friedman L, Kolter R. Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol*. 2005. 13(1):20-6. PubMed: 15639628
76. Tenke P, Köves B, Nagy K, Hultgren SJ, Mendling W, Wullt B, Grabe M, Wagenlehner FM, Cek M, Pickard R, Botto H, Naber KG, Bjerklund Johansen TE. Update on biofilm infections in the urinary tract. *World J Urol*. 2012 Feb; 30(1):51-7. PubMed: 21590469

77. Berry RE, Klumpp DJ, Schaeffer AJ. Urothelial cultures support intracellular bacterial community formation by uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 2009. 77(7):2762-72. PubMed: 19451249
78. Mitchell NM, Johnson JR, Johnson B, Custiss R 3rd, Mellata M. Zoonotic potential of *Escherichia coli* isolates from retail chicken meat products and eggs. *Appl Environ Microbiol*. 2015; 81 (3): 1177 – 87. PubMed: 25480753
79. Tivendale KA, Logue CM, Kariyawasam S, Jordan D, Hussein A, Li G, Wannemuehler Y, Nolan LK. Avian-pathogenic *Escherichia coli* strains are similar to neonatal meningitis *E. coli* strains and are able to cause meningitis in the rat model of human disease. *Infect Immun*. 2010; 78(8):3412-9. PubMed: 20515929
80. Molina-López J, Aparicio-Ozores G, Ribas-Aparicio RM, Gavilanes-Parra S, Chávez-Berrocal ME, Hernández-Castro R, Manjarrez-Hernández HA: Drug resistance, serotypes and phylogenetic groups among uropathogenic *Escherichia coli* including O25-ST131 in Mexico City. *J Infect Dev Ctries* 2011, 5:840-849. PMID: 22169782
81. Skyberg JA, Johnson TJ, Johnson JR, Clabots C, Logue CM, Nolan LK. Acquisition of avian pathogenic *Escherichia coli* plasmids by a commensal *E. coli* isolate enhances its abilities to kill chicken embryos, grow in human urine, and colonize the murine kidney. *Infect Immun*. 2006; 74(11):6287-92. PubMed: 16954398.
82. Johnson TJ, Jordan D, Kariyawasam S, Stell AL, Bell NP, Wannemuehler YM, Fernández AC, Li G, Tivendale KA, Logue CM, Nolan LK. Sequence analysis and characterization of a transferable hybrid plasmid encoding multidrug resistance and enabling zoonotic potential for extraintestinal *Escherichia coli*. *Infection and immunity*. 2010. 78 (5). 1931 – 1942. PubMed: 20160015
83. Pitout JD. Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*: A Combination of virulence with antibiotic resistance. *Front Microbiol*. 2012; 3:9. PubMed: 22294983

84. Gupta K, Hooton TM, Naber KG, *et al.* International clinical practice guidelines for the treatment of acute uncomplicated cystitis and pyelonephritis in women: A 2010 update by the infectious diseases society of America and the European society for microbiology and infectious diseases. *Clin Infect Dis.* 2011; 52 (5): e103 – 20. PubMed: 21292654
85. Zhao S, Maurer JJ, Hubert S, De Villena JF, McDermott PF, Meng J, Ayers S, English L, White DG. Antimicrobial susceptibility and molecular characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* isolates. *Vet Microbiol.* 2005; 107(3-4):215-24. PubMed: 15863280
86. Vidotto MC, Müller EE, de Freitas JC, Alfieri AA, Guimaraes IG, Santos DS. Virulence factors of avian *Escherichia coli*. *Avian Dis.* 1990. 34, 531 – 538. PubMed: 2241678.
87. Rosario CC, López AC, Téllez IG, Navarro OA, Anderson RC, Eslava CC. Serotyping and virulence genes detection in *Escherichia coli* isolated from fertile and infertile eggs, dead-in-shell embryos, and chickens with yolk sac infection. *Avian Dis.* 2004 Dec; 48(4):791-802. PubMed: 15666860
88. Stehling EG, Campos TA, Brocchi M, de Carvalho Azevedo VA, da Silveira WD. The expression of plasmid mediated afimbrial adhesin genes in an avian septicemic *Escherichia coli* strain. *J Vet Sci.* 2008; 9(1):75-83. PMID: 18296891
89. Dias da Silveira W, Ferreira A, Brocchi M, Maria de Hollanda L, Pestana de Castro AF, Tatsumi Yamada A, Lancellotti M. Biological characteristics and pathogenicity of avian *Escherichia coli* strains. *Vet Microbiol.* 2002; 85(1):47-53. PubMed: 11792491
90. Del Rio-Avila C, Rosario C, Arroyo-Escalante S, Carrillo-Casas EM, Díaz-Aparicio E, Suarez-Güemes F, Silva-Sanchez J, Xicohtencatl-Cortes J, Maravilla P, Hernández-Castro R. Characterisation of quinolone-resistant *Escherichia coli* of 1997 and 2005 isolates from poultry in Mexico. *Br Poult Sci.* 2016; 57(4):494-500. PubMed: 27166917
91. Foxman B, Brown P. Epidemiology of urinary tract infections: transmission and risk factors, incidence, and costs. *Infect Dis Clin North Am.* 2003, 17 (2): 227 – 41. PubMed: 12848468

92. Scholes D, Hooton TM, Roberts PL, Stapleton AE, Gupta K, Stamm WE. Risk factors for recurrent urinary tract infection in young women. *J Infect Dis.* 2000, 182 (4): 1177 - 82. PubMed: 10979915
93. McDaniels AE, Rice EW, Reyes AL, Johnson CH, Haugland RA, Stelma GN Jr. Confirmational identification of *Escherichia coli*, a comparison of genotypic and phenotypic assays for glutamate decarboxylase and beta-D-glucuronidase. *Appl Environ microbiol.* 1996; 62 (9): 3350 - 4. PubMed: 8795225
94. Rice EW, Johnson CH, Dunnigan ME, Reasoner DJ. Rapid glutamate decarboxylase assay for detection of *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* 1993; 59(12):4347-9. PubMed: 8285721
95. Tsoraeva A, Muñoz del Campo JL. Application of the rapid test of glutamate decarboxylase for the confirmation of *Escherichia coli* isolated from clinical samples. *Rev Cubana Med Trop.* 2005; 57(3):180-4. PubMed: 17969270
96. Edwards BH. Salmonella and Shigella species. *Clin Lab Med.* 1999; 19(3):469-87. PubMed: 10549421
97. Freier PA, Graves MH, Kocka FE. A rapid glutamic decarboxylase test for identification of bacteria. *Ann Clin Lab Sci.* 1976; 6(6):537-9. PubMed: 793504
98. Eaves - Pyles T, Allen CA, Taormina J, Swidsinski A, Tutt CB, Jezek GE, Islas - Islas M, Torres AG. *Escherichia coli* isolated from a Crohn's disease patient adheres, invades, and induces inflammatory responses in polarized intestinal epithelial cells. *Int J Med Microbiol.* 2008. 298, 397 - 409. PubMed: 17900983.
99. O'Toole GA, Pratt LA, Watnick PI, Newman DK, Weaver VB y Kolter R: Genetic approaches to study of biofilms. *Methods Enzymol.* 1999. 310: 91 - 109. PubMed: 10547784
100. Wang S, Niu C, Shi Z, Xia Y, Yaqoob M, Dai J, Lu C. Effects of *ibeA* deletion on virulence and biofilm formation of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 2011; 79(1):279-87. PubMed: PMID: 20974831
101. Miller J. 1972. *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.

102. Stepanović S, Cirković I, Ranin L, Svabić-Vlahović M. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. *Lett Appl Microbiol*. 2004;38(5):428-32, PubMed: 15059216
103. Sambrook J, Fritsch EF y Maniatis T (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
104. Eckhardt T. A rapid method for the identification of plasmid desoxiribonucleic acid in bacteria. 1978. Plasmid I. 584 - 588. PubMed: 107540
105. Nataro JP, Scaletsky IC, Kaper JB, Levine MM, Trabulsi LR. Plasmid mediated factors conferring diffuse and localized adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 1985; 48 (2): 378 - 83. PubMed: 2859247
106. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Truck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Tech Bull Regist Med Technol*. 1966; 36(3):49-52. PubMed: 5908210
107. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2015. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Fourteenth information supplement. M100-S14. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, P. A.
108. Germon P *et al.* *ibeA*, a virulence factor of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology*. 2005. 151, 1179 - 1186. PubMed: 15817785
109. Matter LB, Barbieri NL, Nordhoff M *et al.* Avian pathogenic *Escherichia coli* MT78 invades chicken fibroblasts. *Vet Microbiol*. 2011; 148: 51 - 59. PubMed: 20850232
110. Pourbakhsh SA, Dho-Moulin M, Brée A, Desautels C, Martineau-Doize B, Fairbrother JM. Localization of the in vivo expression of P and F1 fimbriae in chickens experimentally inoculated with pathogenic *Escherichia coli*. *Microb Pathog*. 1997 Jun; 22(6):331-41. PubMed: 9188088
111. Rosen DA, Hooton TM, Stamm WE, Humphrey PA, Hultgren SJ. Detection of intracellular bacterial communities in human urinary tract infection. *PLoS Med*. 2007; 4(12):e329. PubMed: 18092884

112. Mysorekar IU, Hultgren SJ. Mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli* persistence and eradication from the urinary tract. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103(38):14170-5. PubMed: 169968784
113. Kern MB, Struve C, Blom J, Frimodt-Møller N, Krogfelt KA. Intracellular persistence of *Escherichia coli* in urinary bladders from mecillinam-treated mice. *J Antimicrob Chemother*. 2005; 55(3):383-6. PubMed: 15681580
114. Miquel S, Peyretailade E, Claret L, de Vallée A, Dossat C, Vacherie B, Zineb el H, Segurens B, Barbe V, Sauvanet P, Neut C, Colombel JF, Medigue C, Mojica FJ, Peyret P, Bornet R, Darfeuille-Michaud A. Complete genome sequence of Crohn's disease - associated adherent - invasive *E. coli* strain LF82. *PLoS one*. 2010. 5, e12714. PubMed: 20862302.
115. Nash JH, Villegas A, Kropinski AM, Aguilar - Valenzuela R, Konczyk P, Combes BK. Genome's sequence of adherence - invasive *Escherichia coli* and comparative genomic analysis with other *E. coli* pathotypes. *BMC Genomics*. 2010. 11, 667. PubMed: 21108814.
116. Clarke DJ, Chaudhuri RR, Martin HM, Campbell BJ, Rhodes JM, Constantinidou C, Pallen MJ, Loman NJ, Cunningham AF, Browning DF, Henderson IR. Complete genome sequence of the Crohn's disease associated adherent - invasive *Escherichia coli* strains HM605. *J. Bacteriol*. 2011; 193. 4540. PubMed: 21705601.
117. Russo TA, Carlino UB, Mong A, Jodush ST. Identification of genes in an extraintestinal isolate of *Escherichia coli* with increased expression after exposure to human urine. *Infect Immun*. 1999; 67(10):5306-14. PubMed: 10496910
118. Skyberg JA, Siek KE, Doetkott C y Nolan LK. Biofilm formation by avian *Escherichia coli* in relation to media, source and phylogeny. *J. Appl. Microbiol*. 2007. 102 (2): 548 - 554. PubMed: 17241361
119. Ghigo JM. Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature*. 2001; 412 (6845): 442 - 5. PubMed: 11473319

120. Szmolka A, Anjum MF, La Ragione RM, Kaszanyitzky EJ, Nagy B. Microarray based comparative genotyping of gentamicin resistant *Escherichia coli* strains from food animals and humans. *Vet Microbiol.* 2012; 156(1-2):110-8. PubMed: 22018659
121. Salehi TZ, Madani SA, Karimi V, Khazaeli FA. Molecular genetic differentiation of avian *Escherichia coli* by RAPD-PCR. *Braz J Microbiol.* 2008 Jul; 39(3):494-7. PubMed: 24031252
122. Dissanayake DR, Octavia S, Lan R. Population structure and virulence content of avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from outbreaks in Sri Lanka. *Vet Microbiol.* 2014 Jan 31; 168(2-4):403-12. PubMed: 24388626
123. Olsen RH, Stockholm NM, Permin A, Christensen JP, Christensen H, Bisgaard M. Multi-locus sequence typing and plasmid profile characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* associated with increased mortality in free-range layer flocks. *Avian Pathol.* 2011; 40(5):437-44. PubMed: 21780978
124. Tivendale KA, Logue CM, Kariyawasam S, Jordan D, Hussein A, Li G, Wannemuehler Y, Nolan LK. Avian-pathogenic *Escherichia coli* strains are similar to neonatal meningitis *E. coli* strains and are able to cause meningitis in the rat model of human disease. *Infect Immun.* 2010; 78(8):3412-9. PubMed: 20515929