



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**ESPECIALIZACIÓN EN BIOQUÍMICA CLÍNICA**

**Caracterización de cepas de *Escherichia coli* aisladas de  
pacientes con infección crónica del tracto urinario evaluando la  
presencia de genes asociados con la virulencia, grupo  
filogenético y resistencia a los antimicrobianos**

**TESINA**

QUE PARA OBTENER EL:

**TÍTULO DE ESPECIALISTA**

EN:

**BIOQUÍMICA CLÍNICA**

PRESENTA:

**MARISELA ORTIZ SÁNCHEZ**

TUTOR: M. EN C. CARLOS A. ESLAVA CAMPOS



MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. MARTA MENJÍVAR IRAHETA

M. EN C. LUIS MANUEL PEREA MEJÍA

DRA. BÁRBARA ITZEL PEÑA ESPÍNOZA

DR. HUGO ANTONIO HERNÁNDEZ PÉREZ

DRA. VERÓNICA VIÑUELA BERNI

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2023.



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 se realizó en la Unidad Periférica de Investigación Básica y Clínica en Enfermedades Infecciosas; Departamento de Salud Pública/División de Investigación; Facultad de Medicina, UNAM: Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana, Unidad de Hemato-Oncología e Investigación; Hospital Infantil de México “Federico Gómez” /Facultad de Medicina UNAM



El proyecto del cual forma parte el trabajo realizado fue aprobado por los comités de ética e investigación del programa de Fondos Federales (HIM201851SSA.1554.) y de la División de Investigación de la Facultad de Medicina, UNAM.

## **Agradecimientos:**

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica de la UNAM (PAPIIT- IN205322), a la División de Investigación de la Facultad de Medicina a través del programa de apoyos Institucionales y al programa de Fondos Federales HIM201851 SSA.1554, por el financiamiento otorgado para la realización del proyecto de investigación del cual forma parte el presente trabajo. Al M. en C. Carlos A. Eslava Campos por aceptarme como su alumna durante mi estancia en el Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana, por su paciencia y consejos llenos de sabiduría y experiencia.

Al Dr. Ulises Hernández Chiñas por capacitarme en cada una de las técnicas realizadas y por compartir sus conocimientos.

A mis compañeros del Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana del HIMFG por su apoyo y consejos mientras se realizó la presente tesina y a la Secretaría de Salud por brindarme la oportunidad de realizar la Especialidad.

## Resumen

La orina y las vías urinarias, en condiciones normales, solo presentan los microorganismos que conforman su microbiota. Sin embargo, cuando hay presencia y multiplicación de microorganismos externos al tracto urinario se produce una infección, que puede ser aguda o crónica. Se considera que existe infección crónica del tracto urinario (ICTU) cuando se presentan tres o más infecciones al año, y estas pueden ser ocasionadas por un microorganismo diferente a la primo infección (recurrente) o por el mismo microorganismo (persistente). El principal agente etiológico de las ITU es *Escherichia coli* uropatógena (UPEC), responsable del 80 % de las ITU de comunidad y del 60% de las de origen intrahospitalario. En las cepas UPEC se han identificado diferentes genes de virulencia cuya expresión favorece que puedan establecerse en el tracto urinario del hospedero. Algunos de éstos genes incluyen la producción de adhesinas fimbriales (Pili 1, Pili P), toxinas (CFN-1, HlyA, Sat, Pic, Vat), propiedades para evadir las defensas del hospedero (cápsula, LPS y antígeno O) y sistemas de captación de fierro o sideróforos (aerobactina, enterobactina, yersinobactina). Las cepas UPEC se incluyen en los grupos filogenéticos B2 o D y en diferentes grupos antigénicos definidos por el antígeno somático O (O1, O2, O4, O6, O7, O8, O15, O16, O18, O21, O22, O25, O75, O83), que por su distribución universal son llamados serogrupos UPEC clásicos. **Objetivo:** Se caracterizó cepas UPEC de pacientes con ICTU recurrentes o persistentes, aisladas en un estudio prospectivo analizando la presencia de genes de virulencia, grupo filogenético y resistencia antimicrobiana. **Metodología:** Se incluyeron 49 cepas aisladas de tres pacientes con ICTU a quienes se les dio seguimiento mensual por un año. De cada periodo en que se presentó un cultivo positivo ( $\geq 10^5$  UFC/mL) se seleccionaron 3 cepas a las cuales se les realizó extracción de DNA empleando InstaGeneR Matrix y se determinó por ensayos de PCR punto final su grupo filogenético (*chuA*, *yjaA* y TspE4.C2) y genes relacionados con la virulencia (*fimH*, *papA*, *kpsMT I*, *ompT*, *ibeA*, *sat*, *chuA*, *sitA*, *feoB*, *fyuA*, *iron*, *iutA*, *irp-2*, *malX-PAI*), posteriormente se analizó su presencia utilizando geles de agarosa (1.5%), así como también se analizó la sensibilidad a antimicrobianos.

**Resultados:** Las características fenotípicas y genotípicas de las cepas UPEC aisladas de pacientes con ICTU mostraron la existencia de serogrupos UPEC clásicos y no clásicos. La detección de genes para definir el grupo filogenético reporto 42/49 (86%) cepas dentro de los grupos filogenéticos B2 y D ExPEC (virulentos) y 7/49 (14%) a los grupos filogenéticos A y B1, comensales. En relación con los genes de virulencia la cepa que mostró mayor número de estos fue 13/14 genes (93%) incluida en el filogrupo B2 y la que mostró menor número 6/14 (43%) del grupo filogenético B1, el gen más encontrado fue *fimH* (100%) y el gen que estuvo ausente fue *lbeA*, los genes asociados a cepas ExPEC (B2 y D) que demostraron una significancia ( $p < 0.05$ ), fueron *ompT*, *sat*, *chuA*, *feoB*, *malX-PAI*. En la resistencia bacteriana a los 32 antibióticos de cada una de las 49 cepas UPEC aisladas, sólo del grupo de las Penicilinas: piperacilin/tazobactam, de las cefalosporinas: cefoxitin, de los carbapenémicos: meropenem, de los nitrofuranos: nitroforantoina, monobactámicos: gentamicina y amikacina, de los anfenicoles: cloranfenicol, y de los fosfonatos: la fosfomicina y fosfomicin/trometanol, cumplen con una resistencia menor al 20% (criterio para ser usado en ITU empíricamente). En la comparación de la resistencia obtenida por los grupos filogenéticos ExPEC (B2 y D) sobre los comensales (A y B1), encontrando significancia estadística ( $p < 0.05$ ) en 10 de los 32 antibióticos probados, pertenecientes al grupo de las cefalosporinas: cefalotin (KF), cefamandole (MA), cefoperazone (CFP), ceftriaxone (CRO) y cefurozime (CXM); en el grupo de los monobactámicos: aztreonam (ATM); aminoglucosidos: kanamicina (K) y quinolonas: ciprofloxacina (CIP), norfloxacina (NOR), Ác. naidixico (NA). **Conclusión:** El agente causal de ICTU fue *E. coli* ExPEC en un 86% perteneciente al grupo filogenético B2 y D y *E. coli* comensal en un 14% de los grupos filogenéticos A y B1, causando cuadros clínicos en de los pacientes de tipo persistentes (JMA) y recurrentes (FF y TJT) asociados con cepas de diferentes serotipos. El perfil de urovirulencia constituido por *ompT*, *sat*, *chuA*, *feoB* y *malX-PAI* puede ser una alternativa para la identificación de cepas ExPEC. La fosfomicina y nitrofurantoína, son los antibióticos de primera línea para las ITU, sin embargo la creciente resistencia propone a los lisados bacteriano con una alternativa exitosa en el tratamiento y profilaxis de ICTUR.

# Contenido

<b>AGRADECIMIENTOS:</b> .....	<b>I</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>I</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>2</b>
INFECCIÓN DE TRACTO URINARIO .....	2
CLASIFICACIÓN .....	2
<i>Infecciones Crónicas de Tracto Urinario Recurrentes (ICTUR)</i> .....	3
<i>Infecciones Crónicas de Tracto Urinario Persistentes (IUCP)</i> .....	4
MANIFESTACIONES CLÍNICAS .....	5
FACTORES DE RIESGO .....	6
ETIOLOGÍA DE LA ITU .....	8
<i>Escherichia coli (E.coli)</i> .....	8
<i>Filogenia de E. coli</i> .....	9
UPEC .....	10
FACTORES DE VIRULENCIA .....	11
PATOGENIA .....	15
TRATAMIENTO Y RESISTENCIA ANTIMICROBIANA .....	18
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>21</b>
<b>HIPÓTESIS DE CORRELACIÓN:</b> .....	<b>22</b>
<b>OBJETIVO GENERAL:</b> .....	<b>23</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS:</b> .....	<b>23</b>
<b>METODOLOGÍA</b> .....	<b>28</b>
TIPO DE INVESTIGACIÓN .....	28
CRITERIOS DE INCLUSIÓN .....	28
CRITERIOS DE EXCLUSIÓN .....	29
TAMAÑO DE MUESTRA .....	29
MUESTRAS BIOLÓGICAS .....	29
PROCESAMIENTO DE MUESTRAS .....	30
EXTRACCIÓN DE DNA BACTERIANO .....	33
CUANTIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LA EXTRACCIÓN DE DNA .....	34
DETERMINACIÓN DE LOS GRUPOS FILOGENÉTICOS POR PCR PUNTO FINAL .....	35
DETECCIÓN DE GENES ASOCIADOS A LA VIRULENCIA POR PCR PUNTO FINAL .....	36
ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA .....	39
ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	41
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>41</b>
GRUPOS FILOGENÉTICOS .....	44
GENES ASOCIADOS A VIRULENCIA Y SU RELACIÓN CON GRUPOS FILOGENÉTICOS .....	44
RESISTENCIA BACTERIANA .....	47
<b>DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b> .....	<b>49</b>
<b>CONCLUSIÓN</b> .....	<b>56</b>

<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>57</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>61</b>



## Índice de Figuras

FIGURA 1. FACTORES QUE PREDISPONEN A ICTUR, TOMADO DE PIGRAU-SERRALLACH, 2005.....	6
FIGURA 2. CLAVE DICOTÓMICA PARA LA INTERPRETACIÓN DE LOS GRUPOS FILOGÉNICOS DE UPEC. MODIFICADO DE CLERMONT <i>ET AL</i> , (2000). .....	9
FIGURA 3. FACTORES DE VIRULENCIA DE UPEC QUE CONTRIBUYEN A LAS INFECCIONES DEL TRACTO URINARIO, TOMADO DE FLORES-MIRELES <i>ET AL</i> , (2015). .....	16
FIGURA 4. UPEC COLONIZACIÓN DEL RIÑÓN, TOMADO DE FLORES-MIRELES <i>ET AL</i> , (2015). .....	17
FIGURA 5. SEDIMENTO URINARIO OBSERVADO CON TINCIÓN DE STERNHEIMER-MALBIN, EN DONDE SE OBSERVA COMUNIDADES BACTERIANAS INTRACELULARES.....	31
FIGURA 6. VERIFICACIÓN DE LA INTEGRIDAD DE DNA, POR ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA AL 0.8%, SOMETIDO 100V. LA CEPA NO. 7 SE REPITIÓ LA EXTRACCIÓN. EN EL PRIMER EL CARRIL MPM LAMBDA/ HINDIII 2. ....	34
FIGURA 7. ELECTROFORESIS DE PRODUCTOS DE PCR, EN GEL DE AGAROSA AL 1.5% A 110 V, DE 40-50 MÍN. .....	39
FIGURA 8. PRODUCTOS DE PCR INDIVIDUAL PARA SAT (930 PB), EN GEL DE AGAROSA AL 1.5%,*CONTROL POSITIVO (C+): CF073, CONTROL NEGATIVO (C-): AGUA LIBRE DE NUCLEASAS, EL MPM ES DE 100 PB. ....	40
FIGURA 9. PCR MULTIPLEX PUNTO FINAL EN GEL DE AGAROSA AL 1.5%, PARA DETERMINACIÓN DE GRUPO FILOGENÉTICO. CONTROL NEGATIVO (C-): AGUA LIBRE DE NUCLEASAS, * CONTROL POSITIVO (C+): CFT073, **M (MUESTRA), EL MPM ES DE 100 PB. ....	40
FIGURA 10. MORFOLOGÍA COLONIAL OBTENIDA DE CEPAS DE <i>E. COLI</i> . LA FIGURA 10-A MUESTRA COLONIAS EN AGAR SANGRE Y FIGURA 10-B COLONIAS LACTOSA POSITIVAS Y LACTOSA NEGATIVAS EN AGAR MACCONKEY. ....	42
FIGURA 11. FRECUENCIA DE GRUPOS FILOGENÉTICOS DE CEPAS UPEC AISLADAS EN PACIENTES CON ICTU. .....	44

## Índice de Tablas

TABLA 1. ADHESINAS E INVASINAS ASOCIADAS CON LA VIRULENCIA DE UPEC .....	13
TABLA 2. SIDERÓFOROS, RESISTENCIA AL SUERO, TOXINAS Y GENES ASOCIADOS CON LA VIRULENCIA DE UPEC .....	14
TABLA 3 OPERALIZACIÓN DE VARIABLES PARA LA CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE <i>E. COLI</i> AISLADAS DE PACIENTES CON ICTU EVALUANDO LA PRESENCIA DE GENES ASOCIADOS CON LA VIRULENCIA, GRUPO FILOGENÉTICO Y RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS .....	25
TABLA 4 PRIMERS UTILIZADOS PARA LA DETERMINACIÓN DE GRUPOS FILOGENÉTICOS EN <i>E. COLI</i> . .....	35
TABLA 5. SECUENCIA DE PRIMERS UTILIZADOS PARA LA IDENTIFICAR LA PRESENCIA DE GENES ASOCIADOS A LA VIRULENCIA EN CEPAS DE <i>E. COLI</i> , .....	37
TABLA 6 CONDICIONES DE PCR PUNTO FINAL UTILIZADAS EN EL TERMOCICLADOR MINIAMP .....	38
TABLA 7 GENES DE VIRULENCIA Y SU RELACIÓN CON LOS GRUPOS FILOGENÉTICOS QUE DEFINEN CEPAS COMENSALES (A1Y B1) Y EXPEC (B2 Y D).*	45
TABLA. 8 EXPRESIÓN DE CEPAS UPEC DE SEROTIPO, GRUPO FILOGENÉTICO Y GENES ASOCIADOS A VIRULENCIA AISLADAS EN DIFERENTES UROCULTIVOS DE PACIENTES CON ICTU. ....	46
TABLA 9 RESISTENCIA A 32 ANTIBIÓTICOS EN CEPAS COMENSALES (GRUPOS FILOGENÉTICOS A1 Y B1) Y EXPEC (GRUPOS FILOGENÉTICOS B2 Y D) .....	48

## Abreviaturas

DNA	Ácido desoxirribonucleico
CMI	Concentración mínima inhibitoria
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EGO	Examen General de Orina
Ex PEC	<i>Escherichia coli</i> patógenas extraintestinales
HIMFG	Hospital Infantil de México “Federico Gómez ”
IATU	Infección aguda del tracto urinario
ICTU	Infección crónica del tracto urinario
ICTUP	Infección crónica del tracto urinario persistente
ICTUR	Infección crónica del tracto urinario recurrente
iNOS	Óxido Nítrico Sintasa
ITU	Infección del tracto urinario
OmpT	Proteína de membrana externa
PAI	Isla de Patogenicidad
Pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (por sus siglas en inglés)
PM	Peso Molecular
Sat	Toxina autotransportadora secretada
SB	Buffer S
UFC	Unidad Formadora de Colonias
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
UPEC	<i>Escherichia coli</i> uropatógena
V	Voltaje

## Introducción

Las infecciones del tracto urinario (ITUs) son la tercera causa de morbilidad en México (SUIVE/DGE-Secretaría-de-Salud, 2020), y es más común en mujeres (70%). La ITU se define como la presencia y multiplicación de microorganismos de origen externo que ocasionan diferentes manifestaciones clínicas. Pueden ser aguda o crónica y subclasificarse éstas últimas en recurrentes (cuando el microorganismo causal es diferente en cada episodio) o persistentes (cuando siempre se aísla el mismo microorganismo). Las bacterias se consideran el principal agente etiológico y de éstas *Escherichia coli* (*E. coli*) es la más común ya que se asocia al 80 % de las ITU en comunidad y 60% de las intrahospitalarias (Pigrau-Serrallach, 2005). En *E.coli* se describen las cepas comensales habitantes naturales del intestino y virulentas responsables de diferentes padecimientos. Las cepas asociadas con ITU se denominan *E. coli* uropatógena (UPEC), que presentan características antigénicas y de virulencia específicas. Las cepas UPEC clásicas se integran en 14 serogrupos, sin embargo, estudios realizados por diferentes grupos de trabajo refieren la participación en ITU recurrentes de cepas comensales presentes en la biota del hospedero (Ahumada-Cota *et al*, 2020; Hernández-Chiñas *et al*, 2019). En el presente trabajo se analizaron cepas aisladas de tres pacientes incluidos en un estudio prospectivo de seguimiento, a las cuales se les determinó su grupo filogenético, presencia de genes relacionados con la virulencia de cepas UPEC, sensibilidad a los antimicrobianos y se definió si el comportamiento de éstas cepas UPEC, están asociadas a infecciones crónicas de tipo recurrentes (ICTUR) o de tipo persistentes (ICTUP).

## Marco Teórico

### Infección de tracto urinario

Las Infecciones del Tracto Urinario (ITUs) son la tercera causa de morbilidad en México entre las 20 principales causas de enfermedades con aproximadamente 4, 000,000 casos al año, aunque, por efecto de la pandemia por COVID 19 en el 2020 se observó una disminución con reporte de solo 2,831, 957 nuevos casos (SUIVE/DGE-Secretaría-de-Salud, 2020).

La ITU se define como la colonización y multiplicación del agente causal habitualmente por bacterias, a lo largo del tracto urinario. Microbiológicamente se define como un recuento  $>10^5$  UFC/ mL (Unidades Formadoras de Colonias) de bacterias en una muestra de orina y hay bacteriuria asintomática cuando en ausencia de síntomas el recuento es  $>10^5$  UFC/ mL de un microorganismo en cultivo puro en dos muestras recolectadas en diferentes días, con o sin piuria y en mujeres se requiere el aislamiento del mismo patógeno en dos muestras de orina obtenidas con un intervalo de una o dos semanas, mientras que en hombres basta con una sola muestra para establecer dicho diagnóstico (Zboromyrska *et al*, 2019).

### Clasificación

La ITU se denomina pielonefritis si afecta al riñón y a la pelvis renal; cistitis si implica a la vejiga; uretritis si afecta a la uretra y prostatitis si se localiza en la próstata (González Monte, 2016). La mayoría de las ITU se producen por la colonización de la zona periuretral y de la uretra con microorganismos de origen intestinal, que posteriormente afecta la vejiga y puede llegar hasta los riñones e incluso al torrente sanguíneo, causando urosepsis (Zboromyrska *et al*, 2019). Es por ello que dependiendo de su ubicación se clasifican como:

- **ITUs inferiores o de vías bajas:** Cistitis (infección que afecta la mucosa y a la submucosa, de la vejiga), uretritis y prostatitis (González Monte, 2016).
- **ITUs superiores o de vías altas:** Pielonefritis (inflamación con daño en las nefronas), pielitis (infección de la pelvis renal y sus cálices), glomerulonefritis o enfermedad de Bright (inflamación del riñón que afecta al glomérulo), absceso renal (González Monte, 2016).

Otra forma de clasificarlas es por el tiempo de evolución:

- **Infección Aguda del Tracto Urinario (IATU):** solo se presenta un cuadro de ITU en el transcurso de un año (Valdevenito, 2008).
- **Infección Crónica del Tracto Urinario (ICTU):** cuando en el transcurso de un año, se presentan por lo menos tres cuadros de ITU o dos en seis meses (Zboromyrska et al, 2019). A su vez, estas se clasifican en Infecciones Crónicas Recurrentes (ICTUR) e Infecciones Crónicas Persistentes (ICTUP) (Valdevenito, 2008; Pigrau-Serrallach, 2005).

### Infecciones Crónicas de Tracto Urinario Recurrentes (ICTUR)

Las ICTUR, constituyen un problema clínico común, especialmente en mujeres jóvenes sexualmente activas, embarazadas, mujeres posmenopáusicas y en hombres y mujeres con patología urológica subyacente (Zboromyrska *et al*, 2019).

Este padecimiento no sólo supone un malestar físico importante en las mujeres que las padecen, sino que tienen una gran repercusión económica por los costes que representa la asistencia sanitaria ambulatoria, pruebas de diagnóstico, tratamiento y además un costo personal por el efecto emocional, que influye en su desempeño durante el tiempo que presenta el cuadro agudo y posteriormente por saber que presentará una recaída (Ahumada-Cota *et al*, 2020).

Las ICTUR representan el 80% de las ICTU y son infecciones nuevas causadas por cepas o bacterias diferentes (Stamm *et al*, 1991; Valdevenito, 2008; Schaeffer *et al*, 2016) o bien cuando entre las 2 ICTU se documenta un urocultivo estéril (Pigrau-Serrallach, 2005). Estudios en mujeres jóvenes sexualmente activas han referido que, aunque, las infecciones pueden estar causadas por la misma bacteria está en realidad, puede ser una bacteria con características diferentes cuyo reservorio sería el tracto digestivo (Hooton, 2012; Zboromyrska *et al*, 2019).

Entre el 15-20% de las mujeres mayores de 60 años presentarán una recurrencia y este porcentaje es superior en pacientes institucionalizadas, causada por bajos de estrógenos vaginales (Pigrau-Serrallach, 2005).

### Infecciones Crónicas de Tracto Urinario Persistentes (IUCP)

Las ICTUP representan el 20% de las ICTU y se consideran como una recidiva, se presentan generalmente en las 2 primeras semanas tras la aparente curación de la ITU y son debidas a la persistencia de la cepa que originalmente ocasionó el cuadro inicial que se encontraba alojada en el foco de la infección (Hernández-Chiñas *et al*, 2019) ya sea en las propias células uroepiteliales donde crean biopelículas o comunidades bacterianas intracelulares (Flores-Mireles *et al*, 2015), o bien al acantonamiento del microorganismo en un lugar inaccesible al antibiótico (litiasis renal o prostatitis crónica), o ser causadas por un tratamiento antibiótico inadecuado o demasiado corto, en donde adultos mayores o pacientes con síndrome cístico de más de 7 días de evolución han sido tratados durante sólo 3 días (Schaeffer *et al*, 2016; Sola *et al*, 2017).

Esta complicación también debe descartarse en pacientes afectados de una pielonefritis tratada adecuadamente según antibiograma durante 2 semanas y que recidiva debido a la existencia de una pielonefritis focal o bien un absceso renal subyacente (Pigrau-Serrallach, 2005).

## Manifestaciones clínicas

- **Sintomáticas:** disuria, polaquiuria, urgencia urinaria (síndrome miccional), dolor púbico y de espalda, orina turbia, maloliente, hematuria, escalofríos, fiebre ( $\geq 38$  °C), náuseas, vómito, piuria y bacteriuria ( $>10^5$  UFC/ mL) (González Monte, 2016).
- **Asintomáticos:** No hay sintomatología clínica, pero puede haber bacteriuria de más de  $>10^5$  UFC/ mL en 2 muestras de orina, con la presencia de piuria o no (Zboromyrska *et al*, 2019).

La división con base en si hay o no complicaciones es la siguiente:

- **ITU no complicada:** Esencialmente son las ITUs inferior, las cuales tienen un mínimo riesgo de invasión tisular y con previsión de respuesta a un tratamiento estándar corto (3 días). Se presentan en mujeres jóvenes, en edad fértil, sanas, no embarazadas, y que refieren en la clínica como cistitis de menos de una semana de evolución (Schaeffer *et al*, 2016).
- **ITU complicada:** asociadas con factores que comprometen el tracto urinario o la defensa del huésped, incluida la obstrucción urinaria, la retención urinaria causada por una enfermedad neurológica, inmunosupresión, insuficiencia renal, trasplante renal, embarazo y la presencia de cuerpos extraños como cálculos, catéteres permanentes u otros dispositivos de drenaje (Levison y Kaye, 2013). Las complicaciones de una ITU incluyen recurrencias, pielonefritis con sepsis, daño renal en niños pequeños, parto prematuro y complicaciones causadas por el uso frecuente de antibióticos (resistencia bacteriana) y colitis por *Clostridium difficile* (Flores-Mireles *et al*, 2015; Foxman, 2014; Dielubanza, 2011).



## Factores de riesgo

Los factores de riesgo asociados a una ITU son muchos y muy variables, pero básicamente se dividen en los factores que dependen del huésped, medio ambiente y del microorganismo, como lo denota Pigrau-Serrallach (2005), en la *figura 1*, en donde además se muestran los principales factores involucrados como lo son genéticos, biológicos y conductuales en las ICTUR (Pigrau-Serrallach, 2005).

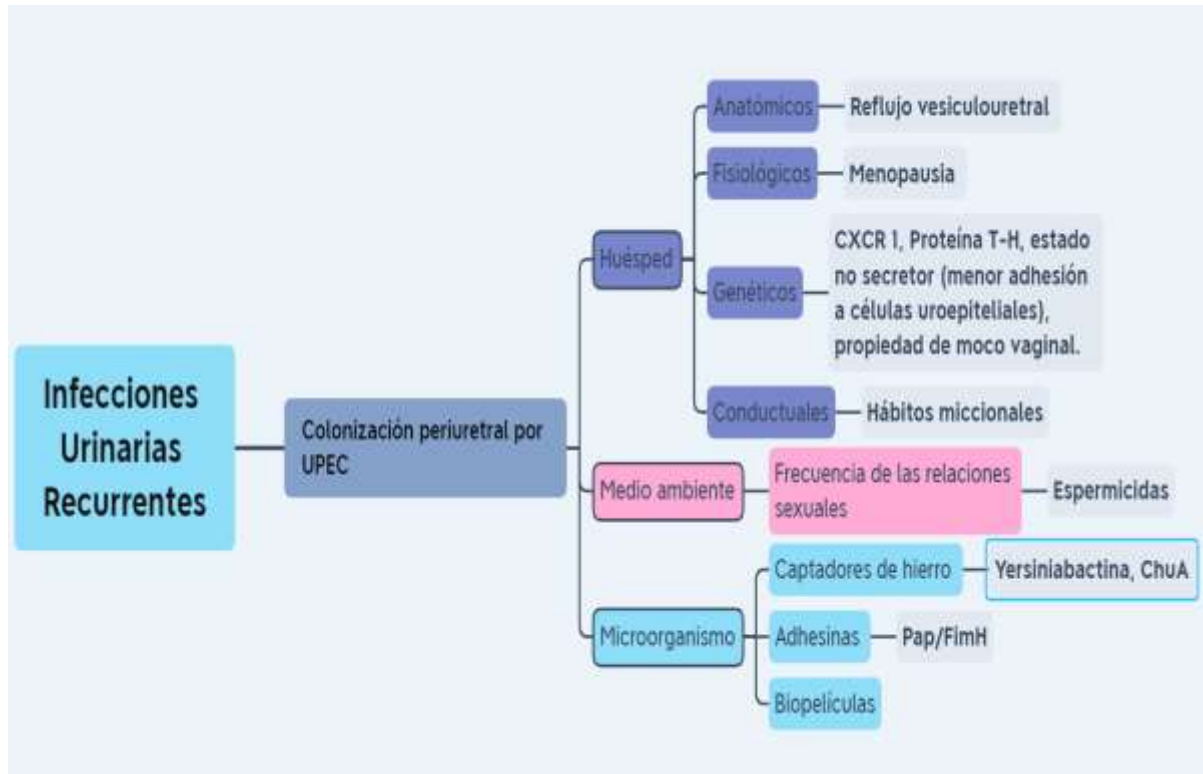


Figura 1. Factores que predisponen a ICTUR, tomado de Pigrau-Serrallach, 2005.

Entre los principales factores de riesgo en mujeres premenopáusicas, se encuentra: la actividad sexual, el uso de espermicidas, familiares de primer grado con historia de ITU o ITU en la infancia (Pigrau-Serrallach, 2005). En las mujeres postmenopáusicas los factores de riesgo comprenden la historia previa de ITU, incontinencia urinaria, vaginitis atrófica debido a la depleción estrogénica, cistocele, aumento del volumen del residuo postmiccional y fenotipo no secretor de los grupos sanguíneos ABO (Zboromyrska *et al*, 2019).

Las alteraciones anatómicas y funcionales del tracto urinario son responsables de ITU complicadas e incluyen cirugía urogenital, sonda vesical permanente u otros tipos de catéteres de uso prolongado, obstrucción de vías urinarias, vejiga neurogénica o reflujo vesicoureteral (Pigrau-Serrallach, 2005).

Las enfermedades de base, tales como diabetes mellitus o estados de inmunosupresión, son otros factores predisponentes (Zboromyrska *et al*, 2019). En los pacientes mayores concurren muchos de los factores de riesgo antes mencionados, y además hay que añadir el deterioro mental y tratamientos antimicrobianos más frecuentes (Pigrau-Serrallach, 2005).

En los varones de entre 15 y 50 años la ITU es poco frecuente y suele estar asociada a una alteración urológica subyacente (Zboromyrska *et al*, 2019), o bien en este rango de edad presentan ITU agudas no complicadas (Sola *et al*, 2017). En los varones mayores de 50 años los síntomas se deben mayoritariamente a la prostatitis crónica o bien una infección concomitante de la próstata y a la obstrucción de las vías urinarias de distinta índole o cateterismo prolongado (Zboromyrska *et al*, 2019; Sola *et al*, 2017).

Los pacientes con ICTUR son más susceptibles a la colonización vaginal por uropatógenos, lo cual está condicionado en parte por factores genéticos, ya que se ha demostrado que las células uroepiteliales de las pacientes no secretoras para el grupo ABO tienen una mayor susceptibilidad para la adherencia por uropatógenos, debido a que expresan dos glucoesfingolípidos en la membrana celular con mayor avidéz para los receptores de *Escherichia coli* uropatógena (UPEC), o bien las alteraciones en el CXCR1 (receptor para la interleucina 8), ya que la ausencia del mismo predispone a bacteriemias por ITU y que en algunos niños con pielonefritis recurrente un defecto en el mismo justificaría las recurrencias, lo que podría explicar la predisposición familiar en las ITU, cuya predisposición genética vendría apoyada por el hecho de que las niñas con ITU durante la infancia tienen más riesgo de presentar bacteriuria e ITU sintomática en la edad adulta, incluso en ausencia de anomalía urológica subyacente (Pigrau-Serrallach, 2005).

Los factores especializados predisponentes de ICTUR dependientes de los uropatógenos son la producción de: adhesinas, invasinas, toxinas, sideróforos e islas de patogenicidad que les permiten colonizar e invadir el tracto urinario y se transmiten entre individuos a través del contacto de persona a persona y posiblemente a través de los alimentos el agua (Foxman, 2010), estudiados con más profundidad más adelante.

## Etiología de la ITU

Las ITUs son causadas por bacterias Gram positivas y Gram negativas, así como por ciertos hongos, virus y parásitos. Los agentes implicados en ITUs muestra a las cepas UPEC con el 75% en los casos observados en comunidad y 65% en las infecciones hospitalarias precedida por *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus* del grupo B, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Candida spp* (Flores-Mireles *et al*, 2015).

### *Escherichia coli (E.coli)*

*E. coli* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*; es un bacilo corto que mide 0.5µm de ancho por 3µm de largo, Gram negativo, no esporulado, con fimbrias, y flagelos peritricos y algunas poseen una cápsula de polisacáridos (Molina, 2015). *E. coli* es miembro de la microbiota del intestino grueso en mamíferos y se clasifican en tres grupos: cepas de *E. coli* comensales (no patógenas), *E. coli* patógenas intestinales (diarrogénicas) y *E. coli* patógenas extraintestinales (ExPEC) (Russo y Johnson, 2000). Su identificación hoy en día sigue realizándose por pruebas bioquímicas (**Anexo 1**) o bien por tecnología muy avanzada como lo es el MALDI-TOF (Zboromyrska *et al*, 2019), tecnología muy costosa en México.

## Filogenia de *E. coli*

Las cepas de *E. coli* son genéticamente diversas de tal manera que se conocen hasta el momento 8 grupos filogenéticos (A,B1,B2,C,D,E,F y clado 1), utilizando datos obtenidos mediante la tipificación de secuencias multilocus (Chaudhuri y Henderson 2012). Sin embargo Clermont *et al* (2000), describieron y validaron una metodología más sencilla para realizar dicha clasificación, basándose en el genotipo obtenido mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) múltiplex punto final que detecta la presencia o ausencia de *chuA* (gen necesario para el transporte del grupo hemo en la membrana externa de *E. coli* O157:H7 enterohemorrágica), *yjaA* (gen de función desconocida, fue identificado en el genoma de *E. coli* K12) y TspE4.C2 (fragmento de ADN anónimo), lo que permite clasificar a las cepas de *E. coli* en cuatro grupos filogenéticos más importantes A, B1, B2 y D (figura 2), de los cuales las cepas ExPEC virulentas pertenecen principalmente al grupo B2 y en menor medida, al grupo D, mientras que la mayoría de las cepas comensales pertenecen al grupo A y en menor medida al B1 (Clermont *et al*, 2000; Cundon *et al*, 2018; ). De tal forma que estudios realizados en UPEC sobre patogenicidad y filogenia han demostrado que son un grupo ampliamente heterogéneo: diferentes cepas pueden generar el mismo síndrome (Bryce *et al*, 2016).

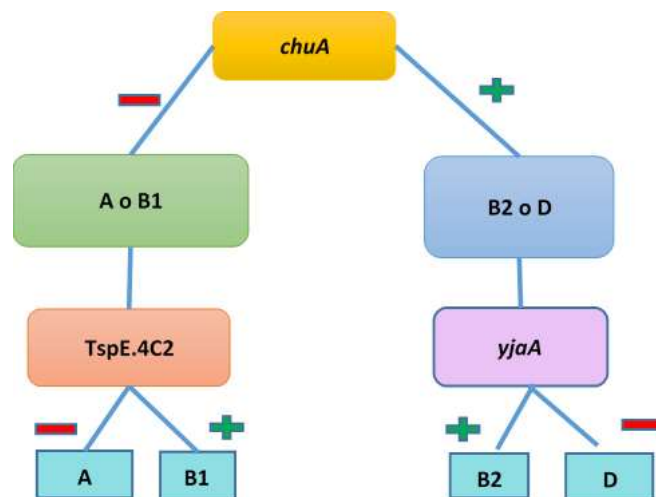


Figura 2. Clave dicotómica para la interpretación de los grupos filogenéticos de UPEC. Modificado de Clermont *et al*, (2000).

Las cepas ExPEC se relaciona con la etiología de ITU, meningitis, neumonía, infecciones de piel y tejidos blandos y sepsis; infecciones de elevada morbilidad, mortalidad y altos costos asociados a la salud (Koga *et al*, 2014).

Los diferentes patotipos de la bacteria se distinguen de la biota normal por el hecho de presentar factores de virulencia, que son adquiridos principalmente por la transferencia horizontal de genes presentes en plásmidos (conjugación), fagos (transducción) y/o el genoma de otras bacterias (transformación) (Andreu, 2013). Las cepas de estos grupos presentan antígenos de superficie (antígeno somático y/o flagelar) diferentes, mecanismos de patogenicidad específicos, y como se mencionó anteriormente ocasionan infecciones y síndromes diferentes (González, 2016).

Para definir el grupo patógeno al que pertenecen, Kauffman desarrollo un esquema de serotipificación que actualmente tiene 186 antígenos somáticos (O), 56 flagelares (H) y 60 capsulares (K). El antígeno "O" es el responsable del serogrupo y el análisis de ambos antígenos somático y flagelar (O:H) indica el serotipo de la bacteria, el cual en ocasiones se asocia con un cuadro clínico en particular (Hernández-Chiñas *et al*, 2019).

## UPEC

Como ya se mencionó a lo largo del presente trabajo, UPEC es el grupo de cepas relacionadas con las ITUs, más importante, ya que es el agente causal del 70 al 95% de infecciones en comunidad (Vimont *et al*, 2012). Se considera que su origen, es de la biota intestinal del mismo hospedero (Zboromyrska *et al*, 2019) o bien entre individuos a través del contacto de persona a persona y posiblemente a través de los alimentos o el agua (Foxman, 2010). Estas bacterias tienen que adaptarse al medio ambiente del hospedero (vejiga, riñón y torrente sanguíneo) y los factores de virulencia juegan un papel importante en las etapas iniciales de

interacción con el hospedero (Narciso *et al*, 2012; Hernández-Chiñas *et al*, 2019), los cuales están relacionados como han demostrado diversos estudios con el serogrupo que presenta *E. coli* (Paniagua *et al*, 2017).

## **Serología**

Debido a que UPEC prevalece en el tracto urinario, las personas susceptibles pueden presentar ICTUR o ICTUP, por lo que para definir cuál de las dos infecciones está presente se pueden utilizar ensayos serológicos (determinación de serotipo), que permiten definir la identidad de la cepa responsable del cuadro clínico, ya que no obstante que por pruebas bioquímicas se identifique el mismo género y especie bacteriana con esto no se puede establecer la identidad específica de la cepa que causa el cuadro de infección (Hernández-Chiñas *et al*, 2019) (Ahumada-Cota *et al*, 2020).

La serología ha permitido la asociación de 14 serogrupos “O” más frecuentemente asociados con ITU, denominados como serogrupos UPEC clásicos: O1, O2, O4, O6, O7, O8, O15, O16, O18, O21, O22, O25, O75 y O83 y los serotipos: O1:H4, O1:H6, O1:H7, O1:H-, O2:H1, O2:H4, O4:H5, O6:H1, O7:H4, O7:H6, O7:H-, O8, O16, O18ac:H7, O18ac:H, O22:H1, O25:H1, O75:H5 y O75:H7 (Noie *et al*, 2019; Li *et al*, 2010).

## **Factores de virulencia**

UPEC puede colonizar, invadir, replicarse y persistir en las células epiteliales de la vejiga debido a la versatilidad de su genoma, ya que lo remodela a través de la adquisición y pérdida de genes de virulencia mediante los procesos de recombinación genética (Barber *et al*, 2013).

Para sobrevivir en el micro hábitat del tracto urinario, UPEC necesita expresar algunos factores de virulencia que le van a conferir ventajas sobre otras poblaciones bacterianas y sobre el hospedero, los cuales son principalmente de dos tipos: los

expresados en la superficie celular: desempeñan funciones de adhesión e invasión de tejidos (*Tabla 1*), formación de biopelículas e inducción de citosinas y los producidos dentro de la bacteria y que son exportados al sitio de infección, como lo son toxinas y sideróforos (*Tabla 2*) (Sarowska *et al*, 2019).

**Tabla 1. Adhesinas e invasinas asociadas con la virulencia de UPEC**

Descripción	Gen	Función
<b>Adhesinas</b>		
Fimbria tipo 1	<i>fimH</i>	Factor de colonización en infecciones extraintestinales, formación de biopelículas <sup>a</sup> .
Adhesina afimbrial	<i>afa</i>	La adhesina afimbrial se une al receptor DAF (factor que acelera el decaimiento, por sus siglas en inglés) en el epitelio de la superficie celular, con capacidad de hemaglutinación <sup>a</sup> .
Fimbria Dr	<i>dra</i>	Se une al receptor DAF en las células epiteliales de superficie y media la internalización de la bacteria a las células del hospedero <sup>a</sup> .
Fimbria P	<i>papG</i> alelo I, II y III	Factor de colonización en infecciones extraintestinales <sup>a</sup> .
Fimbria S	<i>sfa</i>	Adhesión a células epiteliales intestinales, riñón. Facilitan la penetración de bacterias hacia los tejidos <sup>a</sup> .
Fimbria F1C	<i>foc</i>	Adhesión a células epiteliales renales, células endoteliales de la vejiga y los riñones <sup>a</sup> .
Fimbria P	<i>papA</i>	Gen que codifica el eje fimbrial principal <sup>b</sup> .
Gen fibra curly	<i>cril, csg</i>	Fimbrias asociadas a la meningitis y reguladas por temperatura <sup>a</sup> .
Antígeno 43	<i>agn43 (flu)</i>	Habilita la formación de biopelículas y promueve la patogenicidad <sup>a</sup> .
Proteína de membrana externa	<i>ompA, ompT</i>	Permite la supervivencia intracelular y la evasión de la defensa del hospedero <sup>a</sup> .
Cápsula	<i>kpsMT, kpsMTII, kpsMTIII</i>	Factor de protección contra la fagocitosis.
<b>Invasinas</b>		
IbeABC	<i>ibeABC</i>	Invasión celular en los tejidos del hospedero.

Modificado de <sup>a</sup>Sarowska *et al*, (2019); <sup>b</sup> Kariyawasam y Nolan, (2011).



**Tabla 2. Sideróforos, resistencia al suero, toxinas y genes asociados con la virulencia de UPEC**

Descripción	Gen	Función
<b>Sideróforos</b>		
Aerobactina	<i>iucABC, aer, iutA</i>	Adquisición de Fe <sup>2+</sup> /Fe <sup>3+</sup> en el sistema del hospedero <sup>a</sup> .
Yersiniabactina	<i>fyuA</i>	Receptor del sideróforo Yersiniabactina <sup>a</sup> .
Salmochelina	<i>iroN, iroBCDEN</i>	Receptor sideróforo. Síntesis de la Salmochelina <sup>a</sup> .
chuA, Hma	<i>chuA, hma</i>	Habilita el uso de hierro a partir de hemoglobina del hospedero <sup>a</sup> .
SitABC	<i>sitABC</i>	Transporte de Fe <sup>2+</sup> y Mn <sup>2+</sup> <sup>a</sup> .
Proteína de virulencia de membrana externa regulada por hierro	<i>ireA</i>	Receptor de sideróforo IreA <sup>a</sup> .
Sistema Feo	<i>feo ABCD</i>	Transporte de Fe <sup>2+</sup> <sup>a</sup> .
<b>Resistencia al suero</b>		
Proteína de exclusión de transferencia conyugal	<i>traT</i>	Inhibe la vía clásica del Complemento <sup>a</sup> .
<b>Toxinas</b>		
Toxina autotransportadora serina proteasa	<i>pic</i>	Degrada mucinas, facilita la colonización del epitelio y daña la membrana celular <sup>a</sup> .
Toxina autotransportadora secretada	<i>sat</i>	Toxina proteolítica, con efecto citopático e inducción de vacuolización <sup>a</sup> .
Toxina Autotransportadora vacuolizante	<i>vat</i>	Toxina proteolítica, induce la vacuolización de células del hospedero <sup>a</sup> .
α -hemolisina	<i>hlyA</i>	Produce lisis celular <sup>a</sup> .
Factor necrotizante citotóxico (CFN)	<i>cfn1</i>	Participa en la necrosis celular <sup>a</sup> .
<b>Genes asociados con la virulencia</b>		
Componente EIICB específico del sistema PTS	<i>malX</i>	Marcador de isla de patogenicidad asociada CFT073 <sup>b</sup> .
Supuesta bacteriocina	<i>usp</i>	Isla de patogenicidad <sup>a</sup> .
Regulador de hierro	<i>irp2</i>	Es el principal gen marcador para la detección de islas de alta patogenicidad y un regulador de hierro. Gen estrechamente relacionado con la virulencia <sup>a</sup>

Modificado de <sup>a</sup>Sarowska *et al*, (2019); <sup>b</sup>Carniel *et al*, (1996).

## Patogenia

Para que una ITU se desarrolle primero se debe establecer una colonización de la cavidad uretral, de bacterias generalmente provenientes del tracto digestivo (Zboromyrska *et al*, 2019) o bien en las mujeres con una alteración de la biota vaginal, por factores hormonales o por el tratamiento con antibióticos, puede haber una disminución de *Lactobacillus sp.* y un aumento de la colonización de uropatógenos provenientes del colon, aumentando la frecuencia de presentarse una ITU (Stapleton *et al*, 2011).

Tras la ascensión de la uretra, las bacterias se encuentran por primera vez con la vejiga, donde las defensas pasivas expresadas de manera constitutiva ayudan a prevenir la infección. En el caso de que las bacterias patógenas eludan estas defensas, se inducen mecanismos inmunitarios innatos y adaptativos adicionales (Ingersoll y Albert, 2013).

En la vejiga (*figura 3*), la expresión de *pili* tipo 1, en UPEC es esencial para la colonización, invasión y persistencia. La adhesina de *pili* tipo 1, FimH, se une a las uroplaquinas manosiladas e integrinas que recubren la superficie de las células paraguas, lo cual induce el reordenamiento de actina y la internalización bacteriana (la integrina FimH- $\alpha 3 \beta 1$ , interacciona induciendo el reordenamiento de actina a través de la activación de GTPasas de la familia RHO), con lo que UPEC evade las defensas del huésped y resiste el tratamiento antibiótico (Blago *et al*, 2014). Sin embargo, lipopolisacárido liberado por UPEC es detectado por Toll-like receptor 4 (TLR4), que induce la producción de AMP cíclico (cAMP) a través de la activación de la adenilil ciclasa 3 (AC3), lo que da como resultado la exocitosis de UPEC vesicular a través de la membrana plasmática apical. UPEC sobrevive a este mecanismo de defensa innato escapando al citoplasma, donde luego se multiplica para formar comunidades bacterianas intracelulares, cuya maduración causa dispersión bacteriana y permite la invasión de otras células huésped y el ciclo se repite (Flores-Mireles *et al*, 2015). Cabe mencionar que UPEC puede establecer

reservorios intracelulares inactivos, en las células de transición subyacentes, los cuales constan de 4 a 10 bacterias no replicantes dentro de los compartimentos unidos a la membrana encerrados en F-actina y pueden permanecer viables durante meses (Hannan *et al*, 2012).

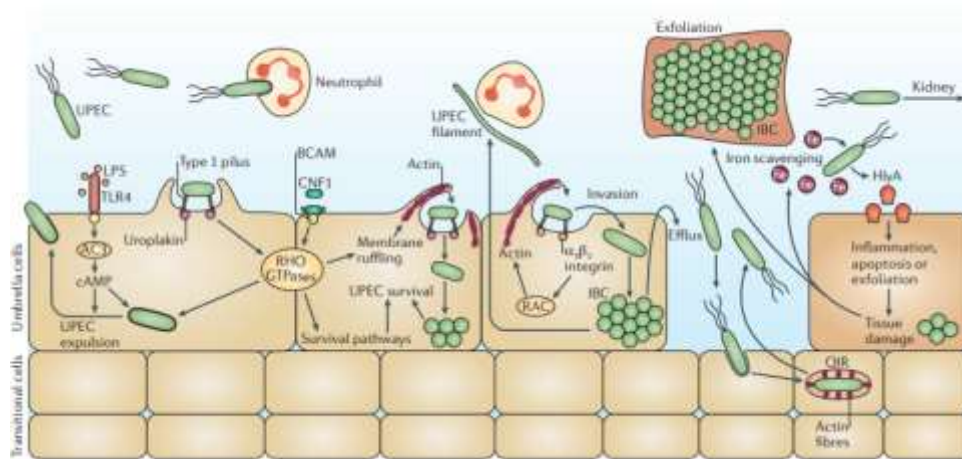


Figura 3. Factores de virulencia de UPEC que contribuyen a las infecciones del tracto urinario, tomado de Flores-Mireles *et al*, (2015).

UPEC sobrevive en la vejiga secretando varios factores que son importantes para la adquisición de nutrientes como lo es la  $\alpha$ -hemolisina, también desencadena la exfoliación epitelial para promover la propagación de UPEC a otros huéspedes después de la expulsión por orina o para exponer capas más profundas del uroepitelio. Los sideróforos que expresa le permiten obtener hierro y por lo tanto, promueva la supervivencia durante un ciclo ITU. El CNF1 (Factor necrotizante citotóxico) también es importante para la remodelación y funciones de la célula huésped al unirse al receptor de la molécula de adhesión de células basales en las células huésped para inducir la activación constitutiva de RHO GTPasas RAC1, RHOA y control de división celular, resultando en el reordenamiento del citoesqueleto y arrugamiento de la membrana. La activación de RAC1 también induce la acción antiapoptótica de la célula huésped (Hannan *et al*, 2012; Flores-Mireles *et al*, 2015).

La supervivencia extracelular de UPEC también requiere la evasión del sistema inmunitario innato mediante la adopción de una morfología filamentosa, que hace que la bacteria sea más resistente a la destrucción de neutrófilos que su forma bacilar (Hovarth *et al*, 2011).

Con respecto a la colonización de los riñones, como lo denota la *figura No. 4*, depende de la expresión de *pilis* asociados a pielonefritis, que se unen a los globosidos glicolípidos que revisten el tejido renal. La fimbria P (*papG*), también interactúa con TLR4, reduciendo la expresión de polímeros. Esto da como resultado una alteración del transporte de inmunoglobulina A (IgA) a través del epitelio, por lo que modulando la respuesta inmune de anticuerpos secretores locales y previniendo la opsonización y eliminación de UPEC (Wright y Hungren, 2006).

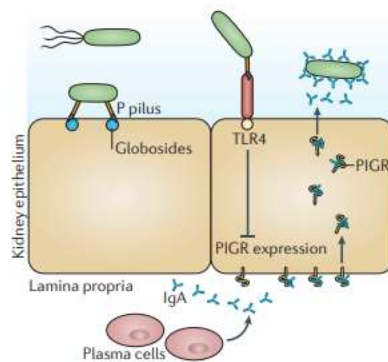


Figura 4. UPEC colonización del riñón, tomado de Flores-Mireles *et al*, (2015).

Por lo cual, además de su prevalencia, una característica notable de la ITU bacteriana es la incidencia de recurrencia, en la que casi el 50 % de las mujeres que experimentan una primera ITU desarrollan una ICTUR (Hooton, 2001), las cuales en su mayoría son mujeres jóvenes y no tienen relación con una patología urológica anatómica o funcional subyacente, sino que son debidas a la compleja interrelación entre la cepa infectante y las células epiteliales (Pigrau-Serrallach, 2005), descritas anteriormente.

## Tratamiento y resistencia antimicrobiana

En los últimos años se ha producido un incremento global de la resistencia a antibióticos, principalmente en bacilos Gram-negativos. En las ITU, el objetivo del tratamiento es hacer desaparecer la sintomatología y erradicar las bacterias, sin embargo en la mayoría de las ocasiones el tratamiento antibiótico se instaura de forma empírica, siendo necesario conocer la epidemiología y las tasas de resistencias locales, algo fundamental en el caso de las enterobacterias, y particularmente de *E. coli* (Zboromyrska *et al*, 2019).

El manejo clínico de la ITU se complica por el aumento de la incidencia de las infecciones causadas por cepas UPEC que son multidrogoresistentes lo que significa que son no sensibles al menos a un agente en tres o más categorías de los antibióticos (Melano, 2017), utilizados comúnmente en el tratamiento de la infección (Ahumada-Cota *et al*, 2020), siendo así que los antibióticos más frecuentemente empleados son la amoxicilina, amoxicilina/ác. clavulánico, sulfametoxazol/trimetoprima nitrofurantoína, fosfomicina cefalosporinas, aminoglucósidos, cotrimaxol y quinolonas (Ejrnaes, 2011; Robledo, 2017), sin embargo es importante resaltar que la CLSI M100 (2023), tiene una lista amplia de antibioticos, clasificados por grupos que se aplican en el tratamiento de la familia *Enterobacteriaceae* y que se modifica cada año con base en estudios clínicos de sencibilidades, proporcionado los puntos de corte para interpretar el antibiograma, definiendo a sensible (S): una categoría definida por un punto de corte que implica que los aislamientos con una concentración mínima inhibitoria (CMI) igual o inferior o un diámetro de zona igual o superior al punto de corte susceptible son inhibidos por las concentraciones generalmente alcanzables de agente antimicrobiano cuando la dosis recomendada para tratar el sitio de la infección, lo que resulta en una probable eficacia clínica. Resistente (R): una categoría definida por un punto de corte que implica que los aislamientos con una CMI igual o superior a un diámetro de zona en o por debajo del punto de ruptura resistente no son inhibidos por las concentraciones generalmente alcanzables del agente con programas de dosificación normales y/o que demuestren CIM o diámetros de zona que caen en el

rango en el que se los mecanismos de resistencia microbiana son probables y la eficacia clínica del agente contra el aislado no ha sido confiable demostrado en estudios de tratamiento.

Es importante mencionar que el tratamiento dependerá del tipo de infección que cause UPEC, las cuales pueden causar IATU, ICTUR o ICTUP, donde estas dos últimas no responden a los tratamientos antimicrobianos comunes y el tratamiento puede variar en general, aumentando el porcentaje de resistencias con la edad y siendo superior en hombres que en mujeres (Sola *et al*, 2017), también por patógenos involucrados, curso de la enfermedad, y el área anatómica del tracto urinario donde se desarrolle la infección (Robledo, 2017).

Hoy en día, en muchos países más del 20% de los uropatógenos son resistentes a sulfametoxazol/trimetoprima (TMP-SMX) y cefalosporinas, lo que complica el tratamiento. También se observa esta resistencia creciente a fluoroquinolonas con tasas de resistencia de hasta el 10% (Robledo, 2017). Otros estudios han reportado 65% de resistencia a carbapenémicos y en el 41% el mecanismo de resistencia implicado fue la síntesis de carbapenemasas (KPC y MBL), lo que revela un cambio importante en el patrón de susceptibilidad frente a este grupo de antimicrobianos al compararlo con los resultados reportados por Abreu *et al* (2014), quienes señalaron que 100% de las cepas UPEC de origen hospitalario en Mérida-Venezuela, eran sensibles a carbapenémicos. Es probable que al utilizar este grupo de antimicrobianos como opción terapéutica en infecciones causadas por bacterias productoras BLEE, se ejerciera presión selectiva y las bacterias rápidamente adquirieran mecanismos para evadir la acción de estos antimicrobianos (Millán *et al*, 2020). De igual forma, el elevado porcentaje de resistencia (100%) frente a ciprofloxacino y la asociación de dicha resistencia con la síntesis de BLEE, se correlaciona con lo referido por Montañez-Valverde *et al* (2015), en cepas UPEC en Perú. Este hallazgo puede indicar la posible circulación de elementos genéticos que codifiquen información sobre mecanismos de resistencia a varias familias de antimicrobianos, (Millán *et al*, 2020), adquiridos por mutación o adquisición por transferencia horizontal de un material

extracromosómico o cromosómico (López *et al*, 2014). Parece haber una adquisición continua de nuevos mecanismos de resistencia entre las bacterias que cambian nichos entre humanos, animales y el medio ambiente (Robledo, 2017).

Otro mecanismo de resistencia ante agentes antimicrobianos es la capacidad de las cepas UPEC de formar biopelículas lo que además trae como consecuencia la recurrencia y/o persistencia de la infección (Flores-Mireles *et al*, 2015). Investigaciones anteriores señalan que la resistencia a antibióticos es la causa más importante de la terapia no efectiva en infecciones asociadas a biopelículas, en donde el aumento de la resistencia exhibida por bacterias es de 101,000 veces menos susceptibles, y se denomina resistencia asociada a biopelículas, ya sea por la pobre penetración antimicrobiana, el despliegue de las respuestas de adaptación al estrés, la heterogeneidad fisiológica de la población de la biopelícula y la presencia de variantes fenotípicas o células persistentes (Ramírez-Castillo *et al*, 2014).

Como se observa el aumento de la resistencia bacteriana a los antimicrobianos dificulta significativamente el tratamiento de las ITU, planteando la necesidad de buscar terapias alternativas, donde investigaciones recientes, proponen el uso de lisados bacterianos obtenidos de *E. coli* y otros uropatógenos (de las cepas encontradas en el paciente), como un tratamiento alternativo de las ITU, donde el tratamiento con lisados bacterianos implicó no sólo la desaparición de los síntomas, sino también la ausencia de infección hasta por cuatro meses, con un mayor efecto en ICTUR (Ahumada-Cota *et al*, 2020).

## Justificación

Las ITUs son un problema de salud importante en todo el mundo y en México, son la tercera causa de morbilidad con 2,831, 957 nuevos casos en el 2020 (SUIVE/DGE-Secretaría-de-Salud, 2020). Las ICTU son padecimientos con alta incidencia comunes en mujeres de todas las edades y en hombres con patologías del tracto urinario, que lo convierte en un problema relevante desde perspectiva clínica y epidemiológica (Pigrau-Serrallach, 2005). Su tratamiento se ha vuelto difícil debido a la resistencia a los antibióticos, por lo que representa un importante problema de salud pública (Ahumada-Cota, *et al*, 2020), es por ello que se requiere conocer de manera integral a los microorganismos asociados con la patogénesis del padecimiento y en particular a las cepas UPEC, bacteria responsable de más del 70% de los cuadros clínicos de ITU causados en comunidad. En México son escasos los estudios que describen las bases genéticas que sustentan el potencial patogénico de los grupos filogenéticos de UPEC, por tal motivo en el presente trabajo se planteó la siguiente pregunta de investigación:

¿La definición de características genotípicas relacionada con la presencia de diferentes genes que codifican para propiedades de virulencia, grupo filogenético por un lado y las características fenotípicas de la bacteria como son el serotipo y la resistencia antimicrobiana en cepas de pacientes ICTU, permitirá contar con marcadores que conduzcan a sugerir el tipo de bacteria así como los cuadros clínicos relacionados con ICTU de tipo recurrente o persistentes?



## **Hipótesis de correlación:**

La definición de características genotípicas como genes de virulencia, grupo filogenético y características fenotípicas como la resistencia antimicrobiana en cepas de pacientes ICTU permitirá definir si se trata de ICTU de tipo recurrente o persistente, con lo que se podrá implementar procedimientos para identificación rápida y establecer un tratamiento específico para cada paciente.

## Objetivo general:

- Caracterizar cepas UPEC aisladas de un estudio prospectivo de pacientes con ICTU, evaluando la presencia de genes asociados a la virulencia, grupo filogenético y resistencia antimicrobiana, para definir si son ICTU recurrentes o persistentes.

## Objetivos específicos:

- Analizar el Examen General de Orina, cuya información será útil para la interpretación del urocultivo.
- Identificar a UPEC como agente causal de ICTU (diez colonias por urocultivo positivo) determinando Gram, morfología bacteriana y pruebas bioquímicas.
- Seleccionar cepas de urocultivos anteriores en conservación (tres por cada urocultivo positivo) de pacientes con ICTU, verificando su pureza e identidad.
- Obtener de la base de datos los serogrupos de las cepas seleccionadas.
- Determinar el grupo filogenético de las cepas UPEC seleccionadas, causantes de ICTU, por el método descrito por Clermont (2000), para clasificarlas en ExPEC y comensales y determinar su porcentaje de frecuencia.
- Identificar en las cepas de UPEC seleccionadas la presencia de 14 genes relacionados con la virulencia y determinar si las cepas ExPEC presentan cierto perfil de genes de virulencia.
- Determinar los genes expresados por cepas del grupo filogenético A1 y B1 (Comensales) y B2 y D (ExPEC).
- Obtener de la base de datos los resultados de sensibilidad a 32 antibióticos, marcados en la CLSI (M100) 2017, de las cepas seleccionadas, y comparar dichos perfiles entre cepas comensales (A1 y B1) y ExPEC (B2 y D)

- Realizar la correlación de los diferentes resultados para definir las características de las cepas de *E. coli* asociadas con ICTU recurrentes y persistentes.

**Tabla 3 Operalización de variables para la caracterización de cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con ICTU evaluando la presencia de genes asociados con la virulencia, grupo filogenético y resistencia a los antimicrobianos**

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de variable	Unidad de medida
<b>Grupo Filogenético</b>	Se basa en la presencia o ausencia de los genes <i>chuA</i> , <i>yjaA</i> y <i>TspE4.C2</i> mediante ensayos de PCR triplex, y se agrupan en 4 grupos filogénicos (A, B1, B2, D) (Clermont, 2000).	<i>E.coli</i> comensal: grupo filogenético A y B1. <i>ExPEC</i> : grupo filogenético B2 y D.	Cualitativa ordinal	A, B1, B2, D.
<b>Factores de virulencia</b>	Los factores de virulencia confieren ventajas sobre otras poblaciones bacterianas y sobre el hospedero, son principalmente de dos tipos: los expresados en la superficie celular (desempeñan funciones de adhesión e invasión de tejidos, formación de biopelículas e inducción de citosinas) y los producidos dentro de la bacteria y que son exportados al sitio de infección (Sarowska et al, 2019). Los factores de patogenicidad de UPEC incluyen: adhesinas fimbriales y afimbriales, toxinas y sideróforos, entre otros.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. <i>fimH</i>: Factor de colonización en infecciones extra intestinales, formación de biopelículas.</li> <li>2. <i>papA</i>: Gen que codifica el eje fimbrial principal.</li> <li>3. <i>kps MT (K1)</i>: Factor de protección contra la fagocitosis</li> <li>4. <i>ompT</i>: Permite la supervivencia intracelular y la evasión de la defensa del hospedero</li> <li>5. <i>lbeA</i>: Invasión celular en los tejidos del hospedero</li> <li>6. <i>sat</i>: Toxina proteolítica, con efecto citopático e inducción de vacuolización.</li> <li>7. <i>chuA</i>: Habilita el uso de hierro a partir de hemoglobina del hospedero.</li> <li>8. <i>sitA</i>: Transporte de Fe<sup>2+</sup> y Mn<sup>2+</sup>.</li> <li>9. <i>feoB</i>: Transporte de Fe<sup>2+</sup>.</li> <li>10. <i>fyuA</i>: Receptor del sideróforo de Yersiniabactina.</li> <li>11. <i>iroN</i>: Receptor sideróforo. Síntesis de la salmochelina</li> <li>12. <i>iutA</i>: Sideróforo, adquisición de Fe<sup>2+/3+</sup> en el sistema del hospedero.</li> <li>13. <i>irp2</i>: Principal gen marcador para la detección de islas de alta patogenicidad y un regulador de hierro. Gen estrechamente relacionado con la virulencia (Carniel , Guilvout , &amp; Prentice, 1996)</li> <li>14. <i>malX-PAI</i>: Marcador de patogenicidad asociada isla de CFT073.</li> </ol> <p>(Sarowska, et al, 2019), (Kariyawasam y Nolan, 2011).</p>	Cualitativa nominal	Presencia o ausencia

<p>Resistencia bacteriana</p>	<p>La resistencia a los antibióticos se produce cuando las bacterias adquieren información genética extra (plásmidos, transposones etc.) y son seleccionadas por fármacos.</p> <p>La CLSI (2023), define a:</p> <p>Sensible (S): una categoría definida por un punto de corte que implica que los aislamientos con una concentración mínima inhibitoria (CMI) igual o inferior o un diámetro de zona igual o superior al punto de corte susceptible son inhibidos por las concentraciones generalmente alcanzables de agente antimicrobiano cuando la dosis recomendada para tratar el sitio de la infección, lo que resulta en una probable eficacia clínica.</p> <p>resistente (R): una categoría definida por un punto de corte que implica que los aislamientos con una CIM igual o superior a un diámetro de zona en o por debajo del punto de ruptura resistente no son inhibidos por las concentraciones generalmente alcanzables del agente con programas de dosificación normales y/o que demuestren CIM o diámetros de zona que caen en el rango en el que se los mecanismos de resistencia microbiana son probables y la eficacia clínica del agente contra el aislado no ha sido confiable demostrado en estudios de tratamiento.</p>	<p>Se basa en la colocación de discos impregnados con antibióticos en placas de agar inoculadas con el microorganismo que está probándose. Después de la incubación (por lo general de 16 a 18 h), se midió el diámetro de la zona de inhibición que rodea a cada disco, evaluando la resistencia o sensibilidad en los siguientes antibióticos, según las directrices del Clinical and Laboratory Standards Institute (M 100) 2017: AMP (ampicilina), PRL (piperacilina), MEL (mecillanam), AMC (Amoxicilina/ác. Clavulánico), TZP (piperacilin/tazobactam), KZ(cefazolin), KF (cefalotin), MA (cefamandole), CID (cefonicid), FED (cefepime), CFP (Cefoperazone), FOX (Cefoxitin), CRO (Ceftriaxone), CAZ (Ceftazidime), CXM (Cefuroxime), MEM (Meropenem), F (Nitroforantoina), ATM (Aztreonam), CN (Gentamicina), AK (Amikacina), K (Kanamicina), TOB (Trobamicina), S (Estreptomycin), TE (Tetraciclina), CIP (Ciprofloxacino), NOR (Norfloxacina), NA (Ác. Nalidixico), STX (Sulfonam/Trime), S3 (Sulfonamidas), W (Trimetropim), C (Cloranfenicol), FOS (Fosfomicina), FOT (Fosfomicin/Trometanol).</p>	<p>Cualitativa ordinal</p>	<p>Sensible o Resistente</p>
-------------------------------	---	--	----------------------------	------------------------------

<p><b>ITU</b></p>	<p>Afección que se presenta cuando las bacterias entran y se multiplican en el aparato urinario (riñones, uréteres, vejiga y uretra). Los signos y síntomas incluyen dolor o ardor al orinar, orina turbia o con mal olor, sangre en la orina, orinar con mucha frecuencia o sensación de urgencia para orinar, dolor de espalda o en la parte baja del abdomen, fiebre, escalofríos y cansancio (González Monte, 2016).  Por tiempo de evolución se clasifican en:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Infección Aguda del Tracto Urinario (IATU): solo se presenta un cuadro de ITU en el transcurso de un año (Valdevenito, 2008).</li> <li>• Infección Crónica del Tracto Urinario (ICTU): cuando en el transcurso de un año, se presentan por lo menos tres cuadros de ITU o dos en seis meses (Zboromyrska <i>et al</i>, 2019). A su vez, estas se clasifican en <b>Infecciones Crónicas Recurrentes (ICTUR) e Infecciones Crónicas Persistentes (ICTUP)</b> (Valdevenito, 2008; Pigrau-Serrallach, 2005).</li> </ul>	<p>Para fines del presente proyecto se trabajó con ICTU</p> <p><b>ICTUR por <i>E. coli</i>:</b> Infección ocasionada por un microorganismo con diferente patrón de serotipo, genes de patogenicidad y diferente grupo filogenético a la primo infección y en general se presenta con más de 2 semanas de diferencia tras la infección inicial o bien cuando se documenta un urocultivo sin desarrollo entre dos infecciones vías urinarias (Schaeffer <i>et al</i>, 2016).</p> <p><b>ICTUP causada por <i>E. coli</i>:</b> Infección que permanece en el tiempo o reaparece con frecuencia, a pesar de un tratamiento antibiótico correctamente instaurado, causada por el mismo microorganismo determinado por mismo patrón de antibiograma, serotipo, genes de patogenicidad y mismo grupo filogenético a la primo infección (Schaeffer <i>et al</i>, 2016).</p>	<p>*Cualitativa ordinal</p>	<p><b>ICTUR por <i>E. coli</i>:</b></p> <p><b>ICTUP por <i>E. coli</i>:</b></p>
-------------------	--	--	-----------------------------	---

## Metodología

El Proyecto fue aprobado por los comités de ética e investigación del Hospital Infantil de México “Federico Gómez” (HIMFG) y de la División de Investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Este estudio fue apoyado por PAPIIT/ UNAM IN205322 y Fondos Federales HIM201851 SSA.1554. El procesamiento de las muestras se realizó en Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana del HIMFG-UNAM.

### Tipo de Investigación

- Modalidad básica clínica.
- Prospectivo (número de urocultivos mínimo por un año).

### Criterios de inclusión

- Pacientes ambulatorios, que acepten participar mediante un consentimiento informado.
- Pacientes de todas las edades.
- Pacientes de sexo indistinto.
- Pacientes con o sin enfermedades crónicas degenerativas.
- Pacientes con o sin enfermedades inmunológicas
- Muestras con un recuento viable  $> 10^5$  UFC/mL.
- Pacientes con ICTU (3 o más infecciones al año).
- Urocultivos con identificación bioquímica de *E.coli* como único agente causal de ICTU.

## Criterios de exclusión

- Pacientes con IATU (pacientes con una sola infección del tracto urinario en el año).
- Pacientes hospitalizados
- Pacientes que se autodescarten.
- Pacientes que fallezcan.
- Pacientes con infecciones causadas por otras bacterias diferentes a *E. coli*. o con más de un uropatógeno.

## Tamaño de muestra

- Este es un estudio piloto, en el cual se emplearon 49 cepas UPEC aisladas de 3 pacientes con ICTU, en un seguimiento mensual durante un mínimo de año.

## Muestras biológicas

1. Se realizó un trabajo prospectivo en cual con base en los criterios de inclusión y exclusión, se seleccionaron 3 pacientes con ICTU, del HIMFG y de la consulta privada, sin restricción en el intervalo de edad, que hasta la fecha siguen asistiendo al Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana del HIMFG/UNAM ya que siguen un tratamiento con una autovacuna (cabe mencionar que no se tuvo participación en esta parte del proyecto).
2. La paciente JMA de edad de 72 años del sexo femenino, sin enfermedades crónico degenerativas, se le realizaron once urocultivos hasta el momento del corte (sep. 21- sep. 22), con una selección de 33 cepas de dichos urocultivos (3 cepas por urocultivo), finalizando con 32 cepas porque una no creció.
3. Para el paciente FF de 66 años del sexo masculino, con un diagnóstico de prostatitis, se le realizó un total de once urocultivos hasta el momento del corte (oct 21-sep 22), de los cuales sólo 3 fueron positivos por lo que sólo se seleccionaron 9 cepas (3 cepas por urocultivo).



4. Para la paciente TJT de 2 años del sexo femenino, con diagnóstico de una anomalía urológica subyacente, se le realizó un seguimiento de (agosto 21-abril22), de los cuales sólo 3 urocultivos fueron positivos (U1, U2 y U5), por lo que se seleccionaron 9 cepas, de las cuales sólo crecieron 8.
5. Los pacientes incluidos en el estudio recibieron una autovacuna, generada por un lisado bacteriano aislado de su urocultivo mensual, después de su primer urocultivo positivo y a lo largo de su participación en dicho protocolo, cuando el urocultivo fue negativo se recurrió a la cepa del urocultivo positivo anterior para la realización de la autovacuna.
6. Se recabaron los resultados de los urocultivos ya realizados, de los tres pacientes JMA, TJT y FF, en las bitácoras del laboratorio, así como del examen general de orina (EGO), tinción de Gram, pruebas bioquímicas, antibiograma y serotipo; de las cepas a las que se le realizó sensibilidad antimicrobiana (tres cepas por urocultivo positivo), se solicitaron para la extracción de DNA, con lo que se determinó el grupo filogenético y los genes de virulencia.
7. A partir de agosto 2022 se procesaron las muestras de orina de JMA, TJT y FF, a las cuales se les realizó el EGO y urocultivo, una vez por mes durante la ICTU y de control, para lo cual se pidió a cada paciente una muestra de orina bajo las especificaciones del **Anexo 2**.

### Procesamiento de muestras

1. Con respecto al EGO, el cual consta de un análisis físico, se evaluó: color, aspecto y olor. Así como de un análisis químico, en el que se evaluó con tiras reactivas de 10 parámetros de la marca Mission ®, glucosa, bilirrubinas, cetonas, gravedad específica, sangre, pH, proteínas, urobilinógeno, nitritos. Con respecto al análisis microscópico de la muestra de orina se tomaron 4 alícuotas de 1mL (cuidando de homogenizar la muestra), colocados en tubos para microcentrifuga y se centrifugaron a 2,957g por 15 mín. a 6°C, descartando el sobrenadante y concentrando el sedimento en un solo tubo, del sedimento obtenido se realizó el examen en fresco, del cual se buscó la

presencia de leucocitos, eritrocitos, células, cristales, bacterias (biopelículas, comunidades bacterianas intracelulares, filamentos bacterianos) al igual que características indicativas de patogenicidad bacteriana (figura 5).

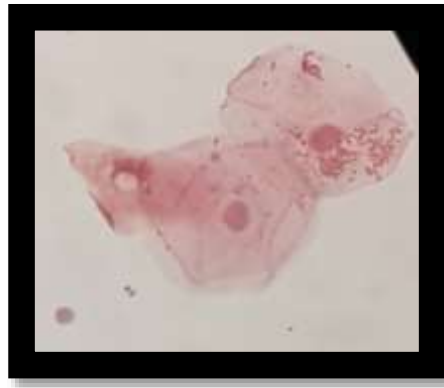


Figura 5. Sedimento urinario observado con tinción de Sternheimer-malbin, en donde se observa comunidades bacterianas intracelulares.

2. Del sedimento anteriormente obtenido, se realizó la tinción de Gram (observando morfología bacteriana).
3. Para el urocultivo de la muestra homogenizada se tomó una alícuota de 100µL y se colocó en gelosa de Agar de Soya Trypticaseina, realizando un extendido de placa, se incubó a 37°C por 24 h, tomando como positivo a todo aquel  $> 10^5$  UFC/mL y como negativo a las menores de este valor.
4. Del sedimento obtenido se tomó una asada (1/1000 roja 3 mmΦ), y por el método de estría cruzada se realizó el aislamiento colonial en gelosa sangre y MacConkey, los cuales se incubaron a 37°C por 24hrs, posteriormente se describió en ambos la morfología colonial obtenida (forma, elevación, margen, tamaño, brillo, color, consistencia).
5. De dichos cultivos se seleccionaron 10 colonias (5 de gelosa sangre y 5 de MacConkey), con lo que se realizó un masivo para cada colonia en agar MacConkey y a partir de este efectuar la identificación bioquímica de las 10 cepas, sí las cepas identificadas correspondían a *E. coli*, se prosigió a realizar a 3 cepas, la sensibilidad a los 32 antibióticos establecidos en la CLSI

(2017), identificación de grupos filogenéticos y genes asociados a virulencia y a 10 cepas el serogrupo.

6. Las pruebas de sensibilidad a los antibióticos se realizaron utilizando el método de difusión disco (Oxoid Ltd, Basingstoke, Reino Unido), para lo cual primeramente se seleccionaron las colonias, se preparó una suspensión del inóculo, se estandarizó la suspensión del inóculo de *E. coli*. (0.5 de McFarland) y se prepararon las placas, se colocaron los discos impregnados de antibiótico en placas de agar inoculadas y se incubaron por lo general de 16 a 18 h, se midió el diámetro de la zona de inhibición que rodea a cada disco, evaluando la resistencia a 32 antibióticos, según las directrices del *Clinical and Laboratory Standards Institute M100 2017*: AMP (Ampicilina), PRL (Piperacilina), MEL (Mecillanam), AMC (Amoxicilina/ác. Clavulánico), TZP (Piperacilin/tazobactam), KZ(Cefazolin), KF (Cefalotin), MA (Cefamandole), CID (Cefonicid), FED (Cefepime), CFP (Cefoperazone), FOX (Cefoxitin), CRO (Ceftriaxone), CAZ (ceftazidime), CXM (Cefuroxime), MEM (Meropenem), F (Nitroforantoina), ATM (Aztreonam), CN (Gentamicina), AK (Amikacina), K (Kanamicina), TOB (Trobamicina), S (Estreptomycin), TE (Tetraciclina), CIP (Ciprofloxacino), NOR (Norfloxacina), NA (Ác. Nalidixico), STX (Sulfonam/Trime), S3 (Sulfonamidas), W (Trimetropim), C (Cloranfenicol), FOS (Fosfomicina), FOT (Fosfomicin/Trometanol), se usó como cepa control la ATCC 25922.
7. La serología de las 10 colonias aisladas de *E. coli* por cada urocultivo positivo de cada paciente, se llevó a cabo en el Laboratorio de Bacteriología de la Facultad de Medicina/UNAM. Donde se usaron antisueros de conejo contra 187 antígenos somáticos. Los aislamientos se cultivaron en agar TSA para la determinación somática. Por el tiempo sólo se cuenta con el serogrupo de los primeros urocultivos.
8. Las cepas de referencia de *E. coli* utilizadas fueron: ATCC 25922, CFT073, APEC 1331, APEC 1336. Todas las cepas se conservan en caldo Luria Bertani con glicerol al 20 %, a -70 °C. Para ser utilizadas como cepas control se sembraron en placas de gelosa sangre, incubando a 37 °C por 24 h, para

verificar su pureza y posteriormente se sembraron en agar gelosa especial por estría masiva y se guardaron a temperatura ambiente (Moreno *et al*, 2006).

### Extracción de DNA Bacteriano

Para la extracción de DNA genómico y plasmídico bacteriano de las 49 cepas seleccionadas de los urocultivos positivos de JMA, TJT y FF se realizó:

1. La siembra a partir de los viales de conservación en gelosa especial a agar MacConkey y se incubaron a 37°C por 24 hrs e igual para las cepas control.
2. En tubos de microcentrifuga de 1.5 mL se colocó 1mL de agua libre de nucleasas, en la cual se resuspendió una colonia de las cepas control y de las 49 cepas seleccionadas, se centrifugo a 8870 g por 1 min, descartando el sobrenadante.
3. Para la extracción de DNA genómico y plasmídico se utilizó el kit InstaGene™ Matrix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE. UU.). El cual se fundamenta en una resina Chelex al 6% p/v especialmente formulada y proporciona ADN molde con calidad de PCR en menos de una hr. Para lo cual al botón se le adicionaron 200 µL de InstaGene™ Matrix (homogenizada) y se incubo en un termoblock a 56 °C por 20 min. Tiempo en el cual cada 10mín el contenido del tubo se resuspendió por medio de un vortex a velocidad No.2 por 10seg.
4. Una vez terminado el tiempo de incubación se mezclaron en un vortex a una velocidad alta por 10 segundos y se colocaron cada uno de los tubos en un baño María en ebullición por 8mín.
5. Nuevamente se homogenizaron por medio de un vortex a una velocidad alta por 10 segundos y finalmente se centrifugo a 8870g por 3mín, a 6°C. Se utilizó 20 µL del sobrenadante por cada 50 µL de reacción de PCR

## Cuantificación e identificación de la extracción de DNA

1. La cuantificación y la determinación de pureza del DNA de las muestras y las cepas control, se realizó en un NanoDrop 1000 de la marca Thermo Scientific®.
2. Posteriormente se realizó una electroforesis horizontal en gel de agarosa (CSL-AG-500) de la marca Cleaver Scientific ® al 0.8 %, utilizando un Buffer regulador SB 1X para hacer el gel y para el llenado de la cámara. En el gel se depositaron por pozo 5µL de la muestra y 3µL del regulador de carga 5X DNA Loading Dye de la marca Thermo Scientific™. Se empleó un marcador de peso molecular lambda/HindIII 2 de la marca Thermo Scientific™ para el peso del producto extraído.
3. El gel se sometió a un campo eléctrico a 100V durante 35mín en una cámara de electroforesis de la marca BioRad®.
4. Posteriormente las bandas del gel se tiñeron con Bromuro de Etidio al 0.01 % (Freifelder, 1981) por 15 min, una exposición de 2 mín a luz UV y se fotografió con el programa omniDOC Gel Documentation System (figura 6).

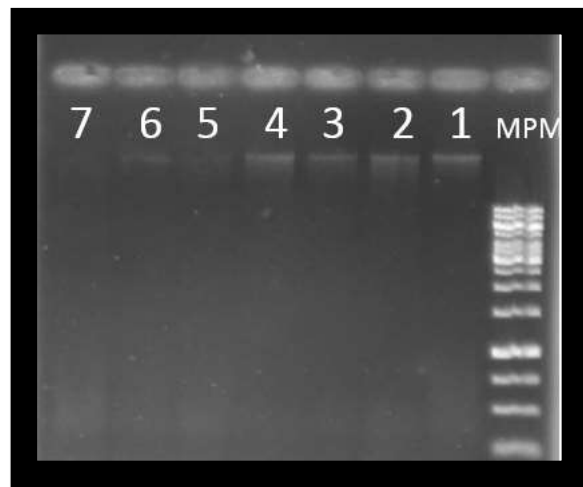


Figura 6. Verificación de la integridad de DNA, por electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, sometido 100V. La cepa No. 7 se repitió la extracción. En el primer el carril MPM lambda/ HindIII 2.

5. El preparado de las cepas de cada muestra y de las cepas control se mantuvo a -20°C para evitar la degradación del DNA, hasta su uso.

### Determinación de los grupos Filogenéticos por PCR punto final

La PCR es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente. Para ello, la reacción aprovecha la actividad de la enzima ADN polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN en las células. Los elementos importantes en la reacción son la hebra molde (ADN o ADNc), la enzima, los oligonucleótidos o *primers*, los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina), el ión magnesio (Mg<sup>+</sup>), una solución amortiguadora o buffer y H<sub>2</sub>O. Todos estos elementos interactúan en tres etapas principales de las que se compone la PCR: desnaturalización, hibridación y extensión, llevados a cabo en un termociclador (Tamay de Dios *et al*, 2013).

1. Se utilizó el método de PCR triplex con base en la presencia o ausencia de la combinación de 2 genes *chuA*, *yjaA* y el fragmento de DNA *TspE4.C2* (Clermont *et al*, 2000), la secuencia de los iniciadores que se utilizaron se muestra en la *Tabla 4*.

Tabla 4 Primers utilizados para la determinación de grupos filogenéticos en <i>E. coli</i> .		
Gen	Secuencia del primer (5'-3')	pb
<b><i>chuA</i></b>	F GACGAACCAACGGTCAGGAT	279
	R TGCCGCCAGTACCAAAGACA	
<b><i>yjaA</i></b>	F TGAAGTGTGTCAGGAGACGCTG	211
	R ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC	
<b>TspE4.C2</b>	F GAGTAATGTCTCGGGCATTCA	152
	R CGCGCCAACAAAGTATTACG	

Tomado de Clermont *et al*, (2000).

2. La mezcla de reacción fue la siguiente: 3 µL de DNA, 1 µL (30pM) de cada iniciador (R y F) y 12.5 µL de PCR Master Mix 2x (Thermo Scientific®) llevando a un volumen final de 25 µL con agua libre de nucleasa (PiSA®).

Las PCR se llevaron a cabo en el termociclador MiniAmp de la marca Applied Biosystems®, bajo el siguiente esquema: desnaturalización inicial 95 °C/5 min (1 ciclo), 30 ciclos a 94 °C/30 s, alineamiento 55 °C/30 s y una extensión 72 °C/30 s al final se realizó una extensión a 72 °C/7 min solo por un ciclo. Para el control negativo se utilizó agua libre de nucleasas y el DNA de la cepa CFT073 como control positivo. El grupo filogenético de cada cepa se determinó de acuerdo con el árbol de decisión dicotómico de Clermont *et al*, (2000) *figura 2*.

### Detección de genes asociados a la virulencia por PCR punto final

1. Se determinó la presencia de 14 genes que codifican para factores de virulencia relacionados con UPEC, de los cuales *chuA* ya se determinó en el apartado de grupo filogenético y los otros 13 para su amplificación se utilizaron las secuencias específicas descritas en la *Tabla 5* (Hernández-Chiñas *et al*, 2019).

<b>Tabla 5. Secuencia de primers utilizados para la identificar la presencia de genes asociados a la virulencia en cepas de <i>E. coli</i>,</b>				
<b>Gen</b>	<b>Secuencia del primer (5'-3')</b>	<b>Cepa control</b>	<b>PM (pb)</b>	<b>Ref.</b>
<b>Adhesinas</b>				
<i>fimH</i>	F TCGAGAACGGATAAGCCGTGG R GCAGTCACCTGCCCTCCGGTA	CFT073	508	(Johnson y Stell, 2000)
<i>papA</i>	F ATGGCAGTGGTGTGTTTTGGTG R CGTCCCACCATACGTGCTCTTC	CFT073	717	Johnson y Stell, (2000)
<b>Protectinas</b>				
<i>kpsMT (K1)</i>	F TAGCAAACGTTCTATTGGTGC (R CATCCAGACGATAAGCATGAGCA)	FMU1336 /1331	153	Johnson y Stell, (2000)
<i>ompT</i>	F ATCTAGCCGAAGAAGGAGGC R CCCGGGTCATAGTGTTTCATC	FMU1331/1336	559	Johnson,(1991)
<i>ibeA</i>	F AGGCAGGTGTGCGCCGCGTAC R TGGTGCTCCGGCAAACCATGC	FMU1331/1336	171	Johnson y Stell, (2000)
<b>Toxina</b>				
<i>sat</i>	F TCAGAAGCTCAGCGAATCATTG R CCATTATCACCCAGTAAAACGCACC	UPEC CFT073	930	Boisen, (2009)
<b>Sideróforos</b>				
<i>sitA</i>	F AGGGGGCACAACCTGATTCTCG R TACCGGGCCGTTTTCTGTGC	FMU 1336/1331 CFT073	608	Runyen-Janecky <i>et al</i> , (2003)
<i>feoB</i>	F AATTGGCGTGATGAAGATAACTG R AGCTGGCGACCTGATAGAACAATG	FMU1336/1331 CFT073	470	Runyen-Janecky <i>et al</i> , (2003)
<i>fyuA</i>	F TGATTAACCCCGCGACGGGAA R CGCAGTAGGCACGATGTTGTA	CFT073	787	Johnson y Stell, (2000)
<i>iroN</i>	F AAGTCAAAGCAGGGGTTGCCCG R GACGCCGACATTAAGACGCAG	FMU1336/ 1331 CFT073	667	Johnson ,(1991)
<i>iutA</i>	F GGCTGGACATCATGGGAACCTGG R CGTCGGGAACGGGTAGAATCG	FMU1336/1331 CFT073	302	Johnson y Stell, (2000)
<i>irp-2</i>	F AAGGATTCGCTGTTACCGGAC R TCGTCGGGCAGCGTTTCTTCT	FMU 1336/1331	287	Janben <i>et al</i> ,(2001)
<b>Isla de patogenicidad</b>				
malX-PAI	F GGACATCCTGTTACAGCGCGCA R TCGCCACCAATCACAGCCGAAC	CFT073	925	Johnson y Stell, (2000)

Tomado de Rodriguez-Siek, (2005) y Hernández-Chiñas *et al*, (2019).



- Se montaron 9 PCR individuales para detectar *fimH*, *papA*, *ompT*, *ibeA*, *sat*, *fyuA*, *iroN*, *iutA* y *malX* y 2 PCR en forma dúplex para las mezclas: Pool 1: *feoB-sitA*; Pool 2: *irp2- kpsMT II*.
- Los genes individuales fueron amplificados utilizando una mezcla de reacción en la cual se adicionaron 2 µL de DNA, 0.4 µL (10 µM) del primer (R y F) y 5 µL de PCR Master Mix 2x (Thermo Scientific®) se ajustó a un volumen de 10 µL con agua libre de nucleasas (PiSA®), a excepción de *sat* y *fimH* donde se colocaron 3 µL de DNA. Para los genes que se trabajaron de forma dúplex las cantidades se duplicaron.
- Las PCR se llevaron a cabo en el termociclador MiniAmp de la marca Applied Biosystems® con las condiciones descritas en la *Tabla 6*. Como controles positivos de DNA para los genes de virulencia se utilizaron las cepas UPEC CFT073, APEC 1331 y APEC 1336 y como control negativo se utilizó agua libre de nucleasas.

**Tabla 6 Condiciones de PCR punto final utilizadas en el termociclador MiniAmp**

Genes	Desnaturalización inicial	30 ciclos			Extensión final
		Desnaturalización	Alineación	Extensión	
<b>Pool 1</b> <i>(feoB-sitA)</i>	94 °C / 5 min	94 °C / 30 s	59°C / 30 s	72 °C / 30 s	72 °C / 5 min
<b>Pool 2</b> <i>(irp2-kpsMT)</i>	96 °C / 2 min	96 °C / 30 s	63°C / 30 s	72 °C / 1 min	72 °C / 8 min
<i>fyuA</i>	96 °C / 2 min	96 °C / 30 s	52°C / 30 s	72 °C / 1 min	72 °C / 8 min
<i>ibeA</i>	96 °C / 2 min	96 °C / 30 s	57°C / 30 s	72 °C / 1 min	72 °C / 8 min
<i>iutA</i>	96 °C / 2 min	96 °C / 30 s	58°C / 30 s	72 °C / 1 min	72 °C / 8 min
<i>sat</i>	95 °C / 1 min	95 °C / 1 min	59 °C / 1 min	72 °C / 1 min	72 °C / 7 min
<i>malX</i>	96 °C / 2min	96 °C / 30s	57 °C / 30s	72 °C / 1min	72 °C / 8min
<i>ompT</i>	96 °C / 2 min	96 °C / 30 s	62.5°C/30 s	72 °C / 1 min	72 °C / 8 min
<i>iroN</i>	96 °C / 2 min	96 °C / 30 s	53 °C / 1 min	72 °C / 1 min	72 °C / 8 min
<i>papA</i>	96 °C / 2 min	96 °C / 30 s	54°C / 30 s	72 °C / 1 min	72 °C / 8 min

## Electroforesis en gel de agarosa

1. Todos los productos de PCR se sometieron a electroforesis en gel horizontal en un campo eléctrico a 110 V-120 V durante 40-50 min al 1.5 % de agarosa disuelta en regulador SB 1x (*figura 7*), a excepción de *ibeA* y *irp-2-kpsMT II*, que se utilizó gel de agarosa al 2%, el tamaño de los amplicones se determinó por comparación con el marcador de peso molecular escalera de 100 pb (Clever scientific® y Thermo Scientific®).

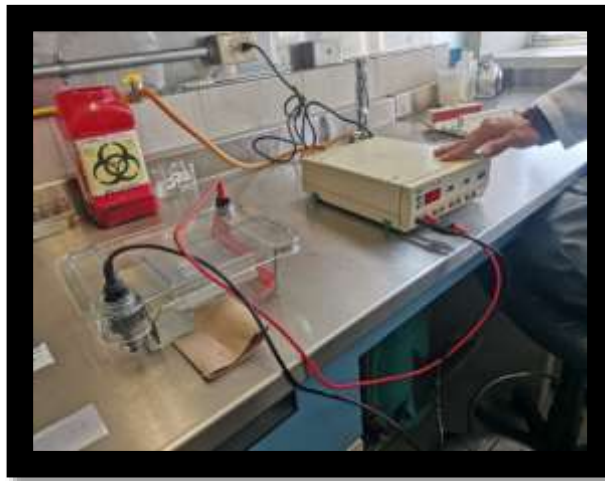


Figura 7. Electroforesis de productos de PCR, en gel de agarosa al 1.5% a 110 V, de 40-50 min.

2. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (BrEt) al 0.01 % por 15 min y las bandas se visualizaron con un transiluminador de luz UV (UVPR).
3. Cada producto de PCR fue validado si los controles positivos amplificaron y el control negativo no (*figura 8 Y 9*).

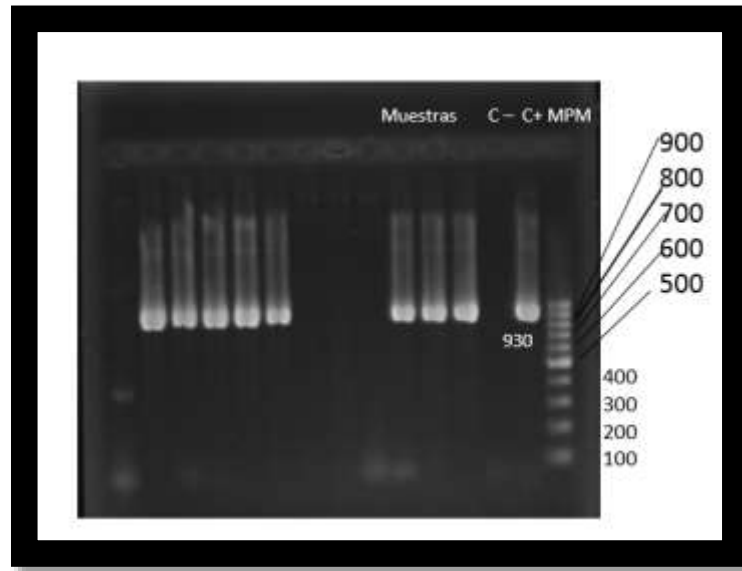


Figura 8. Productos de PCR individual para *sat* (930 pb), en gel de agarosa al 1.5%, \*Control positivo (C+): CF073, Control negativo (C-): agua libre de nucleasas, el MPM es de 100 pb.



Figura 9. PCR multiplex punto final en gel de agarosa al 1.5%, para determinación de grupo filogenético. Control negativo (C-): agua libre de nucleasas, \* Control positivo (C+): CFT073, \*\*M (muestra), el MPM es de 100 pb.

## Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó comparando los grupos filogenéticos comensales (A1 y B1) y los ExPEC (B2 y D), utilizando la prueba de Fisher exacta calculando el valor de p en una tabla de contingencia de 2x2 con el software GraphPad by Dotmatics 2022, versión 9.5.1, <https://www.graphpad.com/quickcalcs/contingency1/>, tomando el valor de p <0.05 como estadísticamente significativo.

## Resultados

Se evaluaron 49 cepas aisladas de tres pacientes con ICTU (JMA, TJT y FF) quienes forman parte de un estudio prospectivo con un seguimiento mensual por un año y bajo tratamiento con una autovacuna después del primer urocultivo positivo y durante toda su estancia en dicho proyecto.

A partir del mes de agosto 2022 se trabajó el EGO de los pacientes JMA y FF (3 urocultivos), los cuales en el caso de JMA se encontró en el examen químico: nitritos positivos, estereasa leucocitaria de 125 leu/ $\mu$ L y en el examen microscópico: bacterias abundantes (biopelículas bacterianas y colonias bacterianas intracelulares), cristales ausentes, eritrocitos 0-1/c y leucocitos escasos. Los 3 urocultivos realizados fueron positivos y se obtuvieron 10 cepas para la identificación bioquímica y 3 para la realización de sensibilidad antimicrobiana y evaluación de genes de virulencia por cada urocultivo, aislando 9 cepas durante dicho periodo y obteniendo 23 del cepario, correspondientes a los urocultivos positivos anteriores, cuyos EGO fueron similares a los observados según los registros en bitácoras.

En el caso del paciente FF, los EGO de los urocultivos 1,2 y 5 registrados en bitácoras muestran nitritos positivos y estereasa leucocitaria de 125 leu/ $\mu$ L, proteínas 15mg/dL, y en el sedimento bacterias abundantes, leucocitos abundantes y cristales de oxalato de calcio dihidratado escasos, mientras que para los urocultivos 3,4,6,7,8 y 9 el examen químico, tanto leucocitos como nitritos fueron

negativos y en el examen microscópico se encontró con bacterias escasas, cristales ausentes, células escasas y eritrocitos ausentes, razón por la cual los urocultivos realizados fueron negativos hasta el mes de noviembre 2022, y por tanto no se realizó el aislamiento de ninguna cepa durante dicho periodo, las 9 cepas analizadas fueron obtenidas del cepario correspondientes a los urocultivos positivos pasados (1,2 y 5).

Con respecto a TJT los urocultivos 1,2 y 5 fueron positivos, sin embargo, los EGO no fueron registrados por falta de personal durante la pandemia y las 9 cepas analizadas fueron obtenidas del cepario correspondiente a dichos urocultivos.

La morfología colonial obtenida de las 49 cepas del cepario y las aisladas fue la presentada en la *figura 10 A*, en las se verifico pureza en gelosa sangre de carnero obteniendo colonias del tamaño de 1-2 mm, borde entero, grisáceas, mucoides, planas, circulares y lisas. En la *figura 10 B*, en agar MacConkey se encontraron colonias de 1mm, de borde entero, mucoides, convexas, circulares, lisas y de color rosa (lactosa positivo) y transparentes (lactosa negativo).

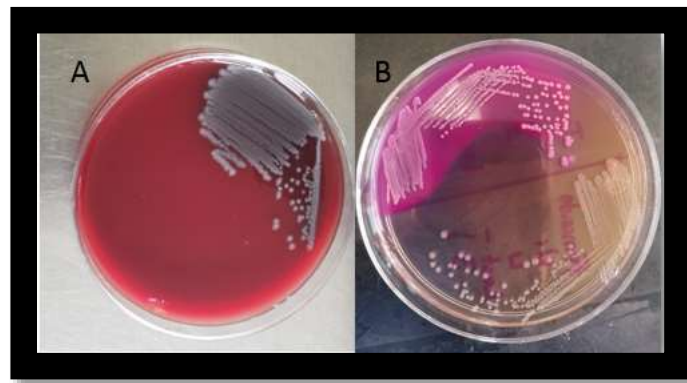


Figura 10. Morfología colonial obtenida de cepas de *E.coli*. La figura 10-A muestra colonias en agar sangre y figura 10-B colonias lactosa positivas y lactosa negativas en agar MacConkey.

Los serogrupos identificados en el Laboratorio de Bacteriología de la Facultad de Medicina/UNAM, fueron serogrupos UPEC clásicos para JMA en los urocultivos 1, 2 y 3 y para FF en los urocultivos 1 y 2 de FF. Mientras que en TJT solo se identificaron cepas con serotipos no clásicos de UPEC (*Tabla 7*). Cabe

mencionar que los serogrupos faltantes de las otras cepas, no fueron recopilados ya que es una técnica tardada (se analizan 10 cepas) y por el tiempo de estancia del presente trabajo ya no se pudieron obtener dichos datos.

También se observó en los pacientes FF y TJT, la negatividad de los urocultivos 3 y 4, efecto causado por el empleo de la autovacuna modificando el curso de la infección (Ahumada-Cota *et al*, 2020; Hernández-Chiñas *et al*, 2019), la autovacuna fue preparada con el lisado bacteriano aislado a partir del primer urocultivo positivo y así sucesivamente la correspondiente a cada mes, cabe mencionar que la autovacuna para los meses con urocultivo negativo (3 y 4) se preparó con el lisado bacteriano del urocultivo anterior positivo (urocultivo 2). Posteriormente ambos volvieron a presentar una infección en el urocultivo 5, se suministró la autovacuna correspondiente a dicho urocultivo positivo en el caso de FF por los 6 urocultivos siguientes. En el caso de TJT el urocultivo 5 fue positivo, pero ya no se acudió por el tratamiento y seguimiento.

En la paciente JMA los 9 urocultivos realizados fueron positivos, por lo que no hubo un efecto de negativización por la autovacuna, sin embargo, controló la infección ocasionada por la cepa O25 (UPEC clásica), pero se infectó inmediatamente con otra cepa con serogrupo O16 (UPEC clásica), conjuntamente la paciente manifestó mejoría en la sintomatología.

El análisis genotípico de DNA genómico y plasmídico extraído mostró concentraciones de 57-295 ng/μL y la pureza definida por densidad óptica realizada en el NanoDrop 1000 fue entre 1.8 y 2.0, ambos resultados indican que se trata de un DNA adecuado tanto en cantidad como en calidad. La integridad en todas las muestras de DNA se realizó por análisis electroforético en gel de agarosa al 0.8%, el resultado mostró que el DNA de todas las muestras estaba integro (*figura 6*).

## Grupos filogenéticos

La identificación del grupo filogenético para definir si se trataba de cepas comensales (A y B1) o ExPEC (B2 y D), mostro que el 14% (7/49) de las cepas evaluadas pertenece a los grupos filogenético A y B1 (comensales), y el 86% (42/49) a los grupos filogenético B2 y D (ExPEC) (*figura 11*).

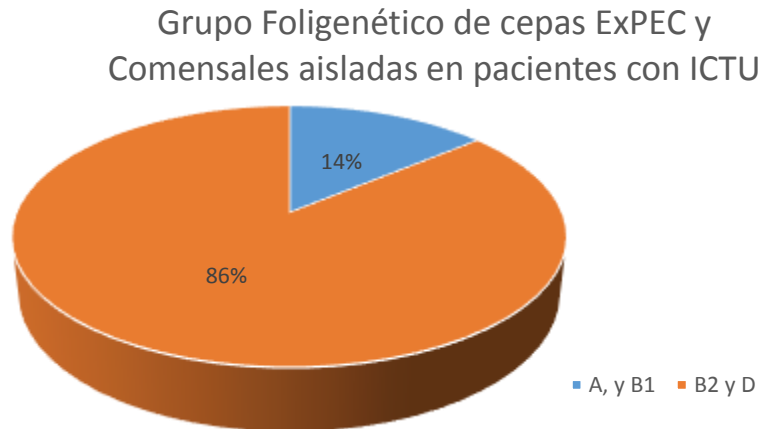


Figura 11. Frecuencia de grupos filogenéticos de cepas UPEC aisladas en pacientes con ICTU.

## Genes asociados a virulencia y su relación con grupos filogenéticos

Se realizó la detección de 14 genes asociados a virulencia en las 49 cepas UPEC de pacientes con ICTU. El análisis mostró que *fimH* se encuentra en el 100% de las cepas e *ibeA*, por el contrario, en ninguna (*Tabla 7*). Al realizar el análisis estadístico por cada gen comparando entre cepas comensales (A y B1) y ExPEC, reportó significancia estadística ( $p < 0.05$ ) para las cepas ExPEC (B2 y D) en *ompT*, *sat*, *chuA*, *feoB*, y *malX-PAI* (*Tabla 7*).

Cuando el análisis se realizó en las cepas de cada paciente se observó que las que amplificaron para un mayor número de genes correspondían a las definidas como ExPEC o virulentas de los grupos filogenéticos B2 y D con 7 a 13 genes (*Tabla 8*).

En el caso de la paciente JMA en todos los urocultivos presentó cepas ExPEC con un importante número de genes. Sin embargo, en las cepas del paciente FF en los primeros urocultivos sus cepas amplificaron un alto número de genes y en las aisladas del urocultivo 5 la presencia de genes asociados a virulencia disminuyó. En el paciente TJT por el contrario las cepas *E. coli* aisladas en los primeros cultivos mostraron menor presencia de genes y en el urocultivo 5 el número de genes amplificados aumentó (*Tabla 8*).

<b>Tabla 7 Genes de virulencia y su relación con los grupos filogenéticos que definen cepas comensales (A1y B1) y ExPEC (B2 y D).*</b>					
No.	Genes	%Total n=49	Comensales (A,B1 n=7)	ExPEC (B2,D n=42)	*p
1	<i>fimH</i>	100%	7	42	1.0000
2	<i>papA</i>	37%	2	16	1.0000
3	<i>kpsMT (K1)</i>	12%	0	6	0.5742
4	<b><i>ompT</i></b>	<b>80%</b>	<b>0</b>	<b>39</b>	<b>0.0001*</b>
5	<i>ibeA</i>	0%	0	0	1.0000
6	<b><i>sat</i></b>	<b>65%</b>	<b>0</b>	<b>32</b>	<b>0.0002*</b>
7	<b><i>chuA</i></b>	<b>86%</b>	<b>0</b>	<b>42</b>	<b>0.0001*</b>
8	<i>sitA</i>	84%	5	36	0.3195
9	<b><i>feoB</i></b>	<b>84%</b>	<b>3</b>	<b>38</b>	<b>0.0092*</b>
10	<i>fyuA</i>	71%	7	28	0.1697
11	<i>iroN</i>	71%	5	30	1.0000
12	<i>iutA</i>	82%	5	35	0.5978
13	<i>irp-2</i>	92%	7	38	1.000
14	<b><i>malX-PAI</i></b>	<b>76%</b>	<b>0</b>	<b>37</b>	<b>0.0001*</b>

\*p<0.05, estadísticamente significativo por la prueba de prueba de Fisher exacta.



Tabla. 8 Expresión de cepas UPEC de serotipo, grupo filogenético y genes asociados a virulencia aisladas en diferentes urocultivos de pacientes con ICTU.

Paciente	Urocultivos	cepas	Serogrupo	Gpo. Filogenético	<i>fimH</i>	<i>papA</i>	<i>kpsMT (K1)</i>	<i>ompT</i>	<i>ibeA</i>	<i>sat</i>	<i>chua</i>	<i>sita</i>	<i>feoB</i>	<i>fyuA</i>	<i>iron</i>	<i>iuta</i>	<i>irp-2</i>	<i>malX-PAI</i>	Total =14	
1. JMA	1	3	O25	B2	X	X		X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	12	
	2	3	O16	B2	X						X	X	X			X			7	
	3	3	O16	B2	X			X		X	X	X	X	X		X	X	X	10	
	4	3		B2	X			X		X	X	X	X	X		X	X	X	10	
	5	3		B2	X			X		X	X	X	X	X		X	X	X	11	
	6	3		B2	X			X		X	X	X	X	X		X	X	X	11	
	7	3		B2	X			X		X	X		X		X	X	X	X	9	
	8	2		B2	X			X		X	X		X		X		X	X	8	
	9	3		B2	X			X		X	X		X		X	X	X	X	9	
	10	3		B2	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	13
	11	3		B2	X	X		X		X	X	X	X	X		X	X	X	11	
2. TJT	1	2		A,B1	X							X		X	X	X	X		6	
	2	3	0115,O77	B1	X	X		X						X		X	X		6	
	5	3	O115	D	X	X	X	X		X	X	X		X	X	X	X		11	
3. FF	1	3	O25	B2	X			X		X	X	X	X		X	X	X	X	10	
	2	3	O25	B2	X			X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	11	
	5	3		B1	X							X	X	X	X	X	X		7	

\*Se denota con una X la presencia del gen.

## Resistencia bacteriana

Se evaluó la resistencia a cada una de las 49 cepas UPEC aisladas contra 32 antibióticos marcados para enterobacterias por la CLSI (2017), el resultado obteniendo (*Tabla 9*), mostro resistencia menor al 20% en los grupos de Penicilinas (piperacilin/tazobactam), cefalosporinas (cefoxitin), carbapenémicos (meropenem), nitrofuranos (nitroforantoina), monobactámicos, gentamicina y amikacina, anfenicoles (cloranfenicol), y de los fosfonatos (fosfomicina y fosfomicin/trometanol).

El análisis comparativo de la resistencia obtenida entre los grupos filogenéticos B2 y D y comensales A y B1, mostró significancia estadística ( $p < 0.05$ ) en 10 de los 32 antibióticos incluidos los pertenecientes al grupo de las cefalosporinas: cefalotin (KF), cefamandole (MA), cefoperazone (CFP), cefriaxone (CRO) y cefurozime (CXM); monobactámicos (aztreonam), aminoglucosidos (kanamicina), quinolonas (ciprofloxacina, norfloxacina) y Ác. naidixico).

**Tabla 9 Resistencia a 32 antibióticos en cepas comensales (grupos filogenéticos A1 y B1) y ExPEC (grupos filogenéticos B2 y D)**

Grupo	Antibióticos 32	Resistencia de cepas UPEC N=49 %	Comensales (A1,B1) n=7	ExPEC (B2,D) n=42	*p
Penicilinas	AMP	98	7	41	1.0000
	PRL	84	7	34	0.5812
	MEL	63	5	26	1.0000
	AMC	53	5	21	0.4238
	TZP	16	2	6	0.3195
Cefalosporinas	KZ	98	7	41	1.000
	KF	76	0	37	<b>0.0001*</b>
	MA	76	0	37	<b>0.0001*</b>
	FEP	63	2	29	0.0841
	CFP	76	0	37	<b>0.0001*</b>
	FOX	6	0	3	1.0000
	CRO	78	0	38	<b>0.0001*</b>
	CAZ	45	2	20	0.4363
	CXM	78	1	37	<b>0.0002*</b>
Carbapenémicos	MEM	16	0	8	0.5812
Nitrofuranos	F	0	0	0	1.0000
Monobactámicos	ATM	59	0	29	<b>0.0009*</b>
Aminoglucósidos	CN	8	0	9	0,3221
	AK	6	0	8	0,5812
	K	49	0	24	<b>0.0096*</b>
	TOB	29	0	14	0.1697
	S	92	7	38	1.0000
Tetraciclinas	TE	76	7	30	0.1712
Quinolonas	CIP	88	1	42	<b>0,0001*</b>
	NOR	71	0	35	<b>0,0001*</b>
	NA	90	2	42	<b>0,0001*</b>
Sulfas	SXT	73	5	31	1.0000
	S3	82	7	33	0.3221
Diaminopirimidinas	W	67	5	28	1.0000
Anfeniloces	C	0	0	0	1.0000
Fosfonatos	FOS	4	0	2	1.0000
	FOT	4	0	2	1.0000

AMP (ampicilina), PRL (piperacilina), MEL (mecillanam), AMC (Amoxicilina/ác. Clavulánico), TZP (piperacilin/tazobactam), KZ(cefazolin), KF (cefalotin), MA (cefamandole), CID (cefonicid), FED (cefepime), CFP (Cefoperazone), FOX (Cefoxitin), CRO (Ceftriaxone), CAZ (Ceftazidime), CXM (Cefuroxime), MEM (Meropenem), F (Nitroforantoina), ATM (Aztreonam), CN (Gentamicina), AK (Amikacina), K (Kanamicina), TOB (Trobamicina), S (Estreptomycin), TE (Tetraciclina), CIP (Ciprofloxacino), NOR (Norfloxacina), NA (Ác. Nalidixico), STX (Sulfonam/Trime), S3 (Sulfonamidas), W (Trimetropim), C (Cloranfenicol), FOS (Fosfomicina), FOT (Fosfomicin/Trometanol). \*p<0.05, estadísticamente significativo, por la prueba de prueba de Fisher exacta.

## Discusión de resultados

Las cepas UPEC pertenece grupo de *E. coli* ExPEC (Russo y Johnson, 2000), patógeno predominante en ITU responsable del 80 al 90% de las infecciones urinarias adquiridas en la comunidad y de 30 al 50 % de las adquiridas en el nosocomio (Vimont *et al*, 2012). De un estudio longitudinal con seguimiento mensual durante un año se evaluaron 49 cepas de 3 pacientes con ICTU, JMA (72 años), FF (66 años) y TJT (2 años), de sexo femenino y masculino. Los tres pacientes fueron recibieron tratamiento con una autovacuna (lisado de bacterias autólogas) que fue administrado después del primer urocultivo positivo y durante toda su estancia en el proyecto.

Los datos obtenidos en el EGO proporcionaron información importante para el diagnóstico de ITU y fueron predictores del resultado del urocultivo al analizar el aspecto (turbio), nitritos (positivos), cantidad de bacterias y leucocitos (Arispe *et al* 2019). En el análisis microscópico de uno de los pacientes (JMA) se observó la presencia de comunidades bacterianas intracelulares, formación de biopelículas y filamentación bacteriana (Flores-Mireles *et al*, 2015). En otro de los pacientes (FF) se identificó la presencia de cristales (oxalato de calcio dihidratado) situación que sugiere la infección por uropatógenos en varones mayores de 50 años (Zboromyrska *et al*, 2019; Sola *et al*, 2017).

La caracterización por serogrupos en los aislados de los primeros urocultivos de JMA (1, 2 y 3) y FF (1 y 2), pertenecían a cepas UPEC clásicas, llamadas así por ser los que tienen una distribución universal Li *et al*, (2010). Por otro lado en el tercer paciente (TJT) solo se identificaron cepas de *E coli* con serogrupos no clásicos. Al realizar la correlación entre serogrupos y grupo filogenético de cada cepa, se identificó que los grupos B2 y D (ExPEC) se presentaban mayormente en las cepas UPEC clásicas, mientras A y B1 (comensales) en los serogrupos no clásicos (*Tabla 8*). Estos últimos resultados son concordantes con lo reportado por Hernández-

Chiñas *et al* (2019); Paniagua *et al* (2017) y Molina *et al* (2011), quienes han identificado serogrupos similares observación que sugiere que se trata de cepas comunes (autóctonas) en nuestra población. Sin embargo, es importante señalar que debido a lo laboriosa y el alto costo que tiene la tipificación con sueros, en muchos de los trabajos publicados no se realiza este procedimiento lo que no permite asegurar que los serogrupos identificados en los reportes de trabajos en México, no existan en otros países.

El grupo filogenético B2 fue el que se aisló con mayor frecuencia tal y como ha sido referido previamente (Zboromyrska *et al*, 2019; Robledo González, 2017; Ejrnaes, 2011). Sin embargo, es importante resaltar como lo menciona Moreno *et al*. (2006), que las cepas UPEC involucradas en la patogénesis de ICTU pueden pertenecer a cualquiera de los 4 grupos filogenéticos. En este trabajo se encontró que los grupos filogenéticos B2 y D pertenecientes al grupo ExPEC, se encontraron con gran frecuencia (86%). Lo anterior era esperado ya que son los que mayormente se asocian con cepas de *E. coli* que causan ITU persistente (Koga *et al*, 2014). Al respecto Robledo (2017), menciona que ambos grupos filogenéticos (B2 y D) poseen propiedades como la formación de biopelículas, característica que les brinda la capacidad de sobrevivir en entornos poco hospitalarios como son la presencia de anticuerpos y antimicrobianos. Las bacterias ExPEC además tiene la capacidad de invadir las células y formar comunidades bacterianas viviendo en estas condiciones por largos periodos. Cuando las condiciones desfavorables cambian las bacterias censan el ambiente y salen de las células, situación que da lugar a la persistencia del cuadro clínico (Hannan *et al*. 2012, Blango *et al*. 2014).

El 14% de las cepas evaluadas pertenecían a los grupos filogenéticos A y B1 o comensales (Clermon *et al.*, 2000), estas cepas se relacionan principalmente con reinfecciones, pero no con cuadros de persistencia, la mayor frecuencia con la que se presentan asociadas a los cuadros de ITU se debe a que forman parte de la biota del intestino (Ahumada *et al.*, 2020, Hernández *et al.*, 2021). Que elementos han

contribuido para que estas cepas comensales presenten genes asociados a la virulencia de las cepas UPEC clásicas, indudablemente uno de los más importantes es la plasticidad del genoma de *E. coli* que favorece el intercambio de información genética con las cepas virulentas, lo que les facilita adaptarse a nuevos nichos y como es el caso sobrevivir en el tracto urinario (Zboromyrska *et al*, 2019). Por otro lado, también es importante considerar que algunos factores predisponentes del hospedero (como alteraciones anatómicas, enfermedades crónicas como la diabetes, prostatitis, edad, sexo, estado inmune hábitos de higiene, etc.), favorecen que las cepas comensales puedan volverse oportunistas y ocasionar ICTU (Narciso *et al.*, 2012). En el trabajo realizado uno de los pacientes (FF) de quién se aislaron cepas comensales presentó un cuadro de prostatitis y otro (TJT) presentaba una anomalía urológica subyacente.

Con respecto a los factores de virulencia, es sabido que UPEC puede colonizar, invadir, replicarse y persistir en las células epiteliales de la vejiga debido a la capacidad de su genoma para adquirir (mediante los procesos de recombinación genética) o perder genes. Este cambio de información favorece su adaptación a ambientes poco propicios, como lo es el tracto urinario (Barber *et al*, 2013). Para evaluar el comportamiento de las cepas incluidas en el estudio se analizó la presencia de 14 genes asociados a virulencia. Los resultados obtenidos mostraron la presencia de *fimH* en el 100% de las cepas analizadas, datos que concuerdan con lo encontrado por Robledo (2017), quién reporta una frecuencia del 95.2% en cepas UPEC, lo cual lo hace un gen constitutivo, que codifica el factor de colonización en infecciones extra intestinales y formación de biopelículas (Sarowska *et al*, 2019). Por otro lado *ibeA* involucrado en la invasión celular en los tejidos del hospedero no se identificó en ninguna de las cepas (Sarowska *et al*, 2019). Lo anterior no fue coincidente con el serogrupo ni con los filogrupos identificados en las cepas (*Tabla 8*), esta observación plantea la importancia de incluir un mayor número de genes ya que es probable que sea otro el que le confiera la propiedad de invasión a las cepas UPEC evaluadas.

En el análisis de los grupos filogenéticos y la presencia de genes de virulencia, los resultados mostraron que las cepas pertenecientes al grupo filogenético B2 y D (ExPEC) presentaron entre 7 y 13 genes, comparadas con las de los grupos filogenéticos A y B1 (comensales) con la presencia de un menor número de genes (6 a 7). Al respecto los resultados son contundentes ya que las cepas ExPEC (virulentas) requieren propiedades que faciliten su permanencia en el hospedero. Los datos obtenidos son similares a lo reportado por otros autores, quienes en diversas investigaciones han observado que las cepas ExPEC contiene una cantidad significativamente mayor de factores de virulencia (Ejrnaes, 2011; Hernández-Chiñas *et al*, 2019) y que parecen tener diferentes nichos ecológicos y propensión para causar enfermedad (Ejrnaes, 2011).

Las ITUs son un importante problema de salud en México y en el mundo, donde las herramientas utilizadas para su diagnóstico hoy en día son insuficientes, ya que no basta con realizar un urocultivo y determinar el agente causal de la infección y de manera consecuente administrar un tratamiento. Aún hay mucho por explorar y aunque, a lo largo de los años en los diferentes estudios que se han realizado con cepas de UPEC se ha evaluado la presencia de diversos genes de virulencia, aún no se ha logrado establecer un perfil específico de urovirulencia (Ejrnaes, 2011), como sucede con los patógenos intestinales, que se caracterizan por factores de virulencia específicos lo que ha permitido definir diferentes patotipos de las cepas de *E. coli* diarreogénica (Donnenberg *et al*, 1992). Es por ello que un aporte del presente trabajo al realizar la comparación entre los grupos filogenéticos virulentos (B2 y D) y los comensales (A y B1), se encontró significancia estadística ( $p < 0.05$ ), en *ompT*, *sat*, *chuA*, *feoB* y *malX-PAI* (Tabla 7), con lo que se puede sugerir a estos genes como un posible perfil genético de virulencia que puede ayudar a discriminar las cepas que se encuentren dentro de los grupos filogenéticos B2 y D (ExPEC), de las cepas A y B1 (comensales), sin la necesidad de realizar un perfil de genes más amplio.

Como se sabe el tratamiento de las ITU se instaure de forma empírica, siendo necesario conocer la epidemiología y las tasas de resistencias locales, algo fundamental en el caso de *E. coli* (Zboromyrska *et al*, 2019). Se ha establecido que un máximo de 20 % de cepas resistentes no hace recomendable la prescripción de un antibiótico para su uso empírico (Gupta *et al*, 2001). En este estudio se identificó que en forma general las 49 cepas estudiadas (UPEC clásicas y no clásicas) mostraron un alto porcentaje de resistencia a los antibióticos. Entre los antimicrobianos evaluados sólo cumplieron con el criterio para recomendar un antibiótico de forma empírica el grupo de las Penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos nitrofuranos, monobactámicos, anfenicoles y los fosfonatos (*Tabla 9*). Sin embargo, por un lado, debemos considerar que en este reporte únicamente se evaluaron 49 cepas lo que no permite hacer una conclusión definitiva. Así mismo estudios globales muestran una baja resistencia a la fosfomicina (3%), lo que la convierte en una alternativa de primera línea en el tratamiento empírico de las ITU causadas por UPEC (Beltrán *et al*, 2020), lo cual concuerda con los datos obtenidos en el presente trabajo, donde se muestra una resistencia de 0% en las 49 cepas, tanto ExPEC y comensales.

En otros estudios se ha reportado una resistencia a nitrofurantoína del 5% (Zboromyrska *et al*, 2019; Beltrán *et al*, 2020), concordante con la baja resistencia reportada por el presente trabajo (0%) en las 49 cepas. Sin embargo se emplea muy poco por su toxicidad pulmonar, y quizá por ello el porcentaje bajo de resistencia se ha mantenido estable en los últimos años (Beltrán *et al*, 2020).

Así mismo es importante considerar que la resistencia a los antimicrobianos puede variar de región en región y es por ello que se deben realizar estudios que permitan identificar el comportamiento de la resistencia de diferentes microorganismos.



Por otra parte, en la comparación de la resistencia obtenida por los grupos filogenéticos ExPEC (B2 y D) sobre los comensales (A y B1) (*Tabla 9*), se obtuvo que de los 32 antibióticos probados en 10 de ellos, pertenecientes al grupo de las cefalosporinas (cefalotin, cefamandole, cefoperazone, ceftriaxone y cefurozime), monobactámicos (aztreonam), aminoglucosidos (kanamicina) y quinolonas (ciprofloxacina, norfloxacina, ác. naldixico), las cepas ExPEC fueron significativamente más resistentes que las comensales. Ante esta situación se podría considerar que al realizar un antibiograma en una ITU y la cepa UPEC presente resistencia a dichos antibióticos se podría sugerir como una cepa candidata para realizar un perfil de urovirulencia ya que es muy probable que pertenezca a la cepa ExPEC (B2 o D).

Lo anterior fundamenta el incremento gradual de la resistencia de UPEC a antibióticos (Betrán, *et al*, 2020), y dado que la OMS plantea se deben buscar alternativas para el tratamiento y control no solo de este tipo de infecciones sino que de cualquier proceso infeccioso, cabe destacar que los pacientes del proyecto, estuvieron sometidos a lisados bacterianos autólogos (autovacunas) con buenos resultados (Ahumada cota *et al*, 2020; Hernández Chiñas *et al.*, 2019), Es por ello que los datos de urocultivos de los diferentes pacientes evaluados mostraron diferencia en el número de muestras analizadas y de manera consecuente el número de cepas estudiadas, ya que en el caso de FF un diagnóstico de prostatitis, se obtuvieron urocultivos negativos hasta por 6 meses seguidos. En el caso de JMA, mujer con menopausia, no se ha logrado obtener urocultivos negativos, sin embargo, controló la infección ocasionada por la cepa UPEC clásica, identificada, pero se infectó inmediatamente con otra cepa con serogrupo O16, aunado a esto la paciente manifestó mejoría en la sintomatología. Con respecto a TJT, abandonó el proyecto al U5 con lo que no se puede brindar mayor análisis.

Por último, los cuadros clínicos de los pacientes corresponden a ICTU, ya que presentaron más de 3 cuadros de ITU en un año, los cuales fueron de tipo persistentes (JMA) y recurrentes (FF y TJT) asociados con cepas de diferentes

serotipos y con mayor incidencia pertenecientes a los grupos filogenéticos definidos como virulentos (B2 y D).

Dado que la diversidad de asociaciones entre genes de virulencia y perfiles de resistencia en las cepas UPEC evolucionan continuamente, es necesario buscar alternativas para el control y tratamiento de la ICTU. Los lisados bacterianos autólogos parecen ser una buena alternativa, sin embargo, por su costo se vuelve un procedimiento poco factible. Es por ello que en el grupo de trabajo con el que se realizó el proyecto actualmente está trabajando en el desarrollo de lisados polivalentes preparados con las bacterias que se aislaron con mayor frecuencia en el estudio prospectivo y aunque la participación en el proyecto fue mínima los resultados aportados fueron una contribución importante para tomar decisiones en la selección de las cepas que se utilizarán en la elaboración del lisado polivalente.

## Conclusión

El agente causal de ICTU fue *E. coli* ExPEC en un 86% perteneciente al grupo filogenético B2 y D y *E. coli* comensal en un 14% de los grupos filogenéticos A y B1, causando cuadros clínicos en de los pacientes de tipo persistentes (JMA) y recurrentes (FF y TJT) asociados con cepas de diferentes serotipos.

El perfil de urovirulencia constituido por *ompT*, *sat*, *chuA*, *feoB* y *malX-PAI* puede ser una alternativa para la identificación de cepas ExPEC.

La fosfomicina y nitrofurantoína, son los antibióticos de primera línea para las ITU, sin embargo la creciente resistencia propone a los lisados bacteriano con una alternativa exitosa en el tratamiento y profilaxis de ICTUR.

## Referencias

Abreu S., Varela Y., Millán B., Araque M.(2014). *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* productoras de beta-lactamasas de espectro extendido, aisladas en pacientes con infección asociada a los cuidados de la salud en un hospital universitario. *Enf Inf Microbiol.* 34 (3), 92-99. <https://www.medigraphic.com/pdfs/micro/ei-2014/ei143d.pdf>.

Ahumada-Cota R., Hernández-Chiñas U., Milián-Suazo F., Chávez-Berrocal M., Navarro-Ocaña A., Martínez-Gómez D., Eslava C. (2020). Effect and Analysis of Bacterial Lysates for the Treatment of Recurrent Urinary Tract Infections in Adults. *Pathogens* 102 (9), 1-13. doi:<https://doi.org/10.3390/pathogens9020102>.

Andreu, D. (2013). *Patogenia de las infecciones del tracto urinario*. Salvat: 1-176.

Barber A. E., Norton J. P., Spivak A. M. y Mulvey, M. A. (2013). Urinary tract infections:current and emerging management strategies. *Clinical infectious diseases*, 57(5), 719–724. <https://doi.org/10.1093/cid/cit284>.

Beltrán A, Lavilla M., Cebollada R. Calderón J y Torres L (2020). Resistencia antibiotica de *Escherichia coli* en infecciones urinarias nosocomiales y adquiridas en la comunidad del Sector Sanitario de Huesca 2016-2018. *Rev. Clínica de Medicina de Familiar*, 13(3), 198-202.

Blango M., Ott E., Erman A., Veranic P. y Mulvey M. (2014). Forced resurgence and targeting of intracellular uropathogenic *Escherichia coli* reservoirs. *Targeting Intracellular UPEC Reservoirs* 9, 1-9.

Bryce A., Hay A., Lane I., Thornton H., Wootton M. y Costelloe C. (2016). Global prevalence of antibiotic resistance in paediatric urinary tract infections caused by *Escherichia coli* and association with routine use of antibiotics in primary care: systematic review and meta-analysis. *The bmj*, 1-11. doi: 10.1136/bmj.i939.

Carniel, E. (1999). The Yersinia high-pathogenicity island. *Int Microbiol.*,2(3) 161-167. PMID: 10943409.

Chaudhuri R, Henderson I. (2012). The evolution of the *Escherichia coli* phylogeny. *Infect Genet Evol* 12 (2): 214-26. DOI: 10.1016/j.meegid.2012.01.005.

Clermont, O., Bonacorsi, S. y Bingen, E. (2000). Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Applied and environmental microbiology*, 4555-4558. doi:4558. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.10.4555-4558.2000>.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. (2017). CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 27th ed. 1-282.

CLSI.(2023) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute). 33th ed. 1-357.

Cundon C., Ameal A., Maubecín E., y Bentancor, A. (2018). Characterization of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from household dogs and cats in Buenos Aires,. *Rev Argent Microbiol*, 290-294. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.11.003>.

Dielubanza E.J. (2011). Urinary tract infections in women. *The Medical*, 27-41. doi:<https://doi.org/10.1016/j.mcna.2010.08.023>.

Donnenberg M., Girón J., Nataro J., & Kaper J. (1992). Un gen fimbrial tipo IV codificado por plásmido de *Escherichia coli* enteropatógena asociado con adherencia localizada. *Microbiología molecular*, 3427-3437.

Ejrnaes K. (2011). Bacterial Characteristics of Importance for Recurrent Urinary Tract Infections Caused by *Escherichia coli*. *Danish Medical Bulletin*, 1-22.

Flores-Mireles, A. L., Walker, J. N., Caparon, M., & Hultgren, S. J. (2015). Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nature reviews.*, 269-284. doi:<https://doi.org/10.1038/nrmicro3432>.

Foxman B. (2010). The epidemiology of urinary tract infection. *Nature reviews Urology.*, 653-660. doi:<https://doi.org/10.1038/nrurol.2010.190>.

Foxman B. (2014). Urinary tract infection syndromes: occurrence, recurrence, bacteriology, risk factors, and disease burden. *Infect Dis Clin North Am.*, 1-13. doi:<https://doi.org/10.1016/j.idc.2013.09.003>.

Freifielder, D. (1981). Técnicas de Bioquímica y Biología Molecular. Reverte.234-260.

González E. (2016). Infecciones del tracto urinario. En V. Lorenzo y J. López, Nefrología al día (pág. 940). Madrid, España: Sociedad Española de Nefrología. doi:<file:///C:/Users/Carolina1/Downloads/XX342164212000532.pdf>.

GraphPad by Dotmatics 2022, versión 9.5.1, <https://www.graphpad.com/quickcalcs/contingency1/>.

Gupta K, Sahm D, Mayfield D y Stamm WE (2001). Antimicrobial resistance among uropathogens that cause community-acquired urinary tract infections in women: a nationwide analysis. *Clin Infect Dis.*33:89-94.

Hannan T., Totsika M., Mansfield K., Moore K., Schembri M. y Hultgren S. (2012). Host-Pathogen Checkpoints and Population Bottlenecks in Persistent and Intracellular Uropathogenic *E.coli* Bladder Infection. *FEMS Microbiol Rev.* 36(6). 1-47.

Hernández-Chiñas U., Pérez-Ramos A., Belmont-Monroy L., Chávez-Berrocal M., González-Villalobos E., Navarro-Ocaña A., Molina-Lopez J. (2019). Characterization of auto-agglutinating and non-typeable uropathogenic *Escherichia coli* strains. *Journal of infection in developing countries*, 465-472. doi:<https://doi.org/10.3855/jidc.11098>.

Hooton T. M. (2001). Recurrent urinary tract infection in women. *International journal of antimicrobial agents*, 17(4), 259–268. [https://doi.org/10.1016/s0924-8579\(00\)00350-2](https://doi.org/10.1016/s0924-8579(00)00350-2).

Hooton, T. (2012). Clinical practice. Uncomplicated urinary tract infection. *The New England journal of medicine*, 1028-1037. doi:<https://doi.org/10.1056/NEJMcp1104429>.

Horvath D. et al. (2011). Morphological plasticity promotes resistance to phagocyte killing of uropathogenic *Escherichia coli*. *Microbes Infect.* 13, 426–437.

Ingersoll M. & Albert M. (2013). From infection to immunotherapy: host immune responses to bacteria at the bladder mucosa. *Mucosal immunology*, 1041-1053. doi:<https://doi.org/10.1038/mi.2013.72>.

Kariyawasam S., & Nolan L. (2011). papA Gene of Avian Pathogenic *Escherichia coli*. *Avian Diseases*, 532-538. Obtenido de <https://doi.org/10.1637/9663-011911-Reg.1>.

Koga V., Tomazetto G., Cyoia P., Neves M., Vidotto M., Nakazato G., y Kobayashi R. (2014). Molecular screening of virulence genes in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from human blood culture in Brazil. *BioMed research international*. 1-9 doi:465054. <https://doi.org/10.1155/2014/465054>.

Levison M. y Kaye D. (2013). Treatment of complicated urinary tract infections with an emphasis on drug-resistant gram-negative uropathogens. *Current infectious disease reports*, 109-115. doi:<https://doi.org/10.1007/s11908-013-0315-7>.

Li, D., Liu, B., Chen, M., Guo, D., Guo, X., Liu, F. y Wang, L. (2010). A multiplex PCR method to detect 14 *Escherichia coli* serogroups associated with urinary tract infections. *Journal of microbiological methods*, 71-77. doi:<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.04.008>.

López D., Carrillo E., Leyva M., Orozco, G., Manjarrez A., Arroyo S. y Villanueva S. (2014). Identification of virulence factors genes in *Escherichia coli* isolates from women with urinary tract infection in Mexico. *BioMed Research International*, 1-10.

Melano R. Detección y notificación de patógenos multi-resistentes, con resistencia extrema o pan-resistentes: Definiciones provisionales para la resistencia adquirida. Reunion Bienal Conjunta ReLAVRA/RILAA. <https://www.paho.org/es/documentos/presentacion-deteccion-notificacion-patogenos-multi-resistentes-con-resistencia-extrema>.

Millán Y., Araque M., Ramírez A. (2020). Distribución de grupos filogenéticos y factores de virulencia y susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *Escherichia coli* uropatógena. *Rev. Chil. Infectol.*, 37 (2), 117-123.

Molina-López, J. (2015). *Escherichia coli*. En: Mendez (Eds.), *Microbiología, Bacteriología y Virología*. (pp 213-222).

Montañez R., Montenegro I., Arenas F., Vásquez R. (2015) Infección urinaria alta comunitaria por *Escherichia coli* resistente a ciprofloxacino: características asociadas en pacientes de un hospital nacional en Perú. *An Fac Med*; 76 (4): 385-91. DOI. 10.15381/anales.v76i4.11408.

Moreno E., Andreu A., Pérez T., Sabaté M., Johnson J. y Prats, G. (2006). Relationship between *Escherichia coli* strains causing urinary tract infection in women and the dominant faecal flora of the same hosts. *Epidemiology and Infection*, 136, 1015-1023. doi:<https://doi.org/10.1017/S0950268806005917>.

Narciso A., Nunes F., Amores T., Lito L., Melo-Cristino J. y Duarte, A. (2012). Persistence of uropathogenic *Escherichia coli* strains in the host for long periods of time: relationship between phylogenetic groups and virulence factors. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, 211-1217. doi:<https://doi.org/10.1007/s10096-011-1431-7>.

Noie A., Hasani A., Ahangarzadeh M., Soroush H., Hasani A. y Soltani E. (2019). A Relationship Between O-Serotype, Antibiotic Susceptibility and Biofilm Formation in Uropathogenic *Escherichia coli*. *Microbial drug resistance*, 1-8. <https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0330>.

Pacheco-Gahbler, C., Aragón-Tovar, A., Cantellano-Orozco, M., Moreno-Aranda, J., Moreno-Palacios, J., & Serrano-Brambila, E. (29 de Agosto de 2010). Diagnóstico y tratamiento antibacteriano de Infecciones de vías urinarias (IVU). *GUÍA MAPPA*. Ixtapa, Guerrero, México: Academia Nacional de Medicina de México.

Paniagua G., Monroy E., Rodríguez JR., Domínguez P., Vaca Felipe & Vaca S (2017). Virulence factors, antibiotic resistance phenotypes and O-serogroups of *Escherichia coli* strains isolated from community-acquired urinary tract infection patients in Mexico. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 478-485.

- Pigrau-Serrallach C. (2005). Infecciones urinarias recurrentes. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 28-39.
- Ramírez-Castillo, F., Harel, J., Moreno-Flores, A., Loera-Muro, A., Guerrero-Barrera, A., & Avelar-González. (2014). Antimicrobial resistance: the role of aquatic environments. *International Journal of Current Research and Academic Review*, 1-17.
- Robledo, M. (2017). Determinación de los principales factores de virulencia y resistencia de *Escherichia coli* uropatógena en la población del Estado de Aguascalientes y su asociación con la contaminación biológica del Río San Pedro. Aguascalientes: Maestría en Ciencias. Universidad Autónoma de Aguascalientes. 1-128. <http://hdl.handle.net/11317/1325>.
- Rodriguez-Siek, K. (2005). Characterizing the APEC pathotype. *EDP Sciences*, 241-244.
- Russo T. A. y Johnson J. R. (2003). Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes and infection*, 5(5), 449–456. [https://doi.org/10.1016/s1286-4579\(03\)00049-2](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(03)00049-2).
- Sarowska J., Futoma B., Jama A., Frej M., Ksiazczyk M., Bugla G. y Choroszy I. (2019). Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from different sources: recent reports. *Gut pathogens*, 11(10), 1-16. <https://doi.org/10.1186/s13099-019-0290-0>.
- Schaeffer A., Matulewicz R. y Klumpp D. (2016). Infections of the Urinary Tract. Elsevier-Saunders.
- Sola M., Rodríguez M., & Monteagudo N. (2017). Infecciones Urinarias. *Boletín Farmacoterapéutico de Castilla La Mancha XVIII*(2). 1-11.
- Stamm W., McKeivitt, M., Roberts, P. y White, N. (1991). Natural history of recurrent urinary tract infections in women. *Infect Dis.*, 77-84.
- Stapleto A., Au M., Hooton T., Fredricks D., Roberts P., Czaja C., Yarovaya Y., Fiedler T., Cox M. y Stamm Walter. (2011), Randomized, Placebo-Controlled Phase 2 Trial of a *Lactobacillus crispatus* Probiotic Given Intravaginally for Prevention of Recurrent Urinary Tract Infection. *Major Article*. 1212-1217.
- SUIVE/DGE-Secretaría-de-Salud. (Octubre de 2020). Anuario de Morbilidad 1984-2020. Obtenido de [https://epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/html/morbilidad\\_nacional.html](https://epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/html/morbilidad_nacional.html).
- Tamay de Dios L., Ibarra C. y Velasquillo C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Medigraphic*, 70-78.
- Valdevenito S. (2008). Infección urinaria recurrente en la mujer (Recurrent urinary tract infection in women). *Revista chilena de infectología*, 268-276.
- Vimont S, Boyd A, Bleibtreu A, Bens M, Goujon J M, Garry L, et al (2012). The CTX-M-15- producing *Escherichia coli* clone O25b:H4- ST131 has high intestine colonization and urinary tract infection abilities. *PLOS ONE*; 7 (9): 1-10. DOI: 10.1371/journal.pone.0046547.
- Wright K y Hultgren S. (2006). Sticky fibers and uropathogenesis: bacterial adhesins in the urinary tract. *Future Microbiol.* 1, 75–87.
- Zboromyrska Y., de Cueto López M., Alonso-Tarrés C., y Sánchez-Hellín V. (2019). Diagnóstico microbiológico de las infecciones del tracto urinario. *Procedimientos en Microbiología Clínica* (1-78). Sevilla: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Micro-biología Clínica (SEIMC).

## Anexos

### Anexo 1: Identificación bioquímica de *E. coli*

IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE <i>E. coli</i>			
Prueba bioquímica	% de positividad	Prueba bioquímica	% de positividad
Oxidasa	0	Fermentación de mucato	95
Producción de indol	98	Fermentación de dulcitol	60
Rojo de metilo	99	Fermentación de salicina	40
Voges Proskauer	0	Fermentación de adonitol	5
Citrato de Simmons	1	Fermentación de inositol	1
H <sub>2</sub> S (TSI)	1	Fermentación de L-arabinosa	99
Hidrólisis de urea	1	Fermentación de la rafinosa	50
Utilización de manolato	0	Fermentación de L-ramnosa	80
Ác. De glucosa	100	Fermentación de maltosa	95
Gas de glucosa	95	Fermentación de D-xilosa	95
Fenilalanina desaminasa	0	Fermentación de trealosa	98
Lisina descarboxilasa	90	Fermentación de celobiosa	2
Arginina dihidrolasa	17	Fermentación de α-metil D glucósido	0
Ornitina descarboxilasa	65	Fermentación de eritritol	0
Movilidad a 36°C	95	Hidrólisis de esculina	35
Hidrólisis de gelatina a 22°C	0	Fermentación de melobiosa	75
Crecimiento en KCN	3	Fermentación de D-arabitol	5
Fermentación de lactosa	95	Fermentación de D-manosa	98
Fermentación de sacarosa	50	Fermentación de glicerol	75
Fermentación de D-manitol	98	Nitrato a nitrito	100
Lipasa (aceite de maíz)	0	Tartrato de Jordán	95
DNasa a 25°C	0	Utilización de Acetato	90
Fermentación de D-sorbitol	94		

Anexo 1 Tomado de (Rodríguez-Angeles, 2002).



## **Anexo 2 Recolección de Muestras de orina para Urocultivo**

**Tipo de muestra:** Orina de micción espontánea

### **Cuidados y recomendaciones:**

La recolección debe realizarse por la mañana, preferiblemente de la primera micción del día, o después de una retención de la vejiga de dos a tres horas. Los pacientes con urgencia urinaria pueden quedar exentos de esta retención, teniendo en cuenta este hecho en la solicitud. Para la toma de muestras guiar de manera clara y objetiva todos los pasos del procedimiento y advertir sobre las consecuencias de una recolección mal realizada.

### **Toma de muestras de orina en mujeres:**

- Separar las piernas lo máximo posible.
- Con una mano, apartar los labios mayores y continuar de esta manera mientras realiza la limpieza. Usar una gasa empapada en jabón neutro, lavar de adelante hacia atrás y asegurarse de estar limpiando los pliegues de piel lo mejor posible. Manteniendo los labios mayores apartados, comenzar a orinar.

### **Toma de muestras de orina en hombres:**

- realizar antisepsia rigurosa de los órganos genitales con agua limpia y jabón neutro, hacer retracción del prepucio y lavar el meato urinario con agua jabonosa, enjuagar con abundante agua y secar.

Indicaciones generales:

- No estar tomando ningún antibiótico por lo menos 72 hrs antes.
- Recolectar, de preferencia, la 1ª orina de la mañana o, entonces, después de una retención vesical de 2 a 3h.
- Descartar el primer chorro de orina. Recoger la muestra del chorro intermedio en un frasco suministrado por el laboratorio (5-10 mL). Evitar llenar el frasco.
- La muestra debe procesarse en los siguientes 30 minutos a su toma; en caso contrario, puede permanecer en refrigeración (4 a 8 °C) durante 24 horas. (Zboromyrska *et al*, 2019; Pacheco *et al*, 2010).