



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA
ESPECIALIZACIÓN EN BIOQUÍMICA CLÍNICA

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE CEPAS DE *Escherichia coli* A PARTIR DE
AISLADOS DE PACIENTES CON INFECCIÓN CRÓNICA DEL TRACTO
URINARIO DE UN ESTUDIO PROSPECTIVO E IDENTIFICACIÓN DE
HETEROPATOTIPOS**

TESINA

**QUE PARA OBTENER EL:
GRADO DE ESPECIALISTA**

EN:

BIOQUÍMICA CLÍNICA

PRESENTA

DANIELA LEÓN ESPINOSA

TUTOR- DIRECTOR DE TESINA

M. en C. CARLOS ALBERTO ESLAVA CAMPOS

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR



CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX, 2024



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE Dra. Marta Alicia Menjívar Iraheta (Facultad de Química-UNAM)
VOCAL M. A. S. S. Miriam Susana Cruz Gómez (IMSS-U.M.F. No. 1)
SECRETARIO Dra. Barbara Itzel Peña Espinoza (Facultad de Química-UNAM)
1er SUPLENTE Dr. Jesús Norberto Lozano Ruíz Esparza (Facultad de Química-UNAM)
2do SUPLENTE Dra. Paola Viridiana León Mimila (Facultad de Química-UNAM)

Trabajo realizado en Unidad Periférica de Investigación Básica y Clínica en Enfermedades Infecciosas; Departamento de Salud Pública/División de Investigación, Facultad de Medicina, UNAM. En el Laboratorio de patogenicidad Bacteriana, Hospital Infantil de México Federico Gómez, Unidad de Hemato-Oncología e Investigación.

El proyecto del cual forma parte el trabajo realizado fue aprobado por los comités de ética e investigación de la División de Investigación de la Facultad de Medicina, UNAM y de la Dirección de Investigación del Hospital Infantil de México Federico Gómez.

Con Apoyo al Proyecto de Investigación **PAPIIT IN205322** de la Dirección General de Apoyo al Personal Académico (DGAPA), UNAM.



TUTOR

M en C. CARLOS ALBERTO ESLAVA CAMPOS



SUSTENTANTE

Q.F.B. DANIELA LEÓN ESPINOSA

DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Hospital Infantil de Mexico Federico Gómez por brindar el espacio, a la unidad de investigación periférica de la UNAM. Al M en C. Carlos Alberto Eslava Campos por aceptar ser mi tutor, por la paciencia, orientación y coordinación del proyecto durante este proceso de formación como Especialista en Bioquímica Clínica. A la auxiliar de la coordinación Dra. Barbara Itzel Peña Espinoza por la motivación, inspiración, conocimiento y esfuerzo brindados durante las clases de la especialidad y al Médico José Alejandro Rodríguez García por la capacitación, orientación, y sobre todo el ánimo, las risas y las ganas de seguir en la elaboración del proyecto.

A mis compañeros y personal del Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana del HIMFG por su apoyo y consejos mientras se realizó la presente tesina y a la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme la oportunidad de realizar la Especialidad.

El desarrollo de este trabajo se lo dedico a mis *padres, hermanos y tíos* que me dieron las herramientas y la confianza que me llevo a cumplir mis sueños, pues todo este esfuerzo es fruto de la semilla que cada uno sembró en mí.

A mis amigos de la infancia, *Alondra, Leonardo y Laura. A Diana, Montserrat, Ángel y Cristhofer* quienes me enseñaron a conocerme y disfrutar de la vida; a *Karen, Koji, Eduardo y Axel* quienes me llevaron a explorar al máximo mis habilidades académicas. A los *Químicos de la UMF 75* por sembrarme la semilla de la clínica, por sus grandes conocimientos y todo su amor. A mi gran amor, *Lemuel*, y a su familia que me acompañó durante este proceso.

A los pequeños y grandes momentos de amor y dolor en la vida que me han mostrado lo fuerte y capaz que soy, pero sobre todo a *Dios* que me permito cumplir una de las tantas metas marcadas en mi plan de vida.

RESUMEN

Introducción: Las *infecciones de tracto urinario* (ITU) representan un costoso problema de salud pública en México, debido a su alta prevalencia y a la capacidad de volverse una enfermedad *recurrente* (ITUR). El principal agente causal en un 80-90% es *E. coli* y debido a su diversidad genómica, es capaz de producir *reinfecciones* (reITUR) y *persistencias* (peITUR). En los últimos años se ha evidenciado la presencia de cepas híbridas con genes asociados con virulencia *UPEC/DEC*, lo que en cierta forma contribuye a la patogenicidad de la bacteria dificultando el manejo y tratamiento de la enfermedad. Las ITU generan molestias físicas, orgánicas y emocionales, es por ello de gran relevancia realizar la identificación integral de las cepas de *E. coli*, para implementar el tratamiento más conveniente para el paciente. **Objetivo:** Evaluar la presencia de cepas híbridas de *E. coli* portadoras de genes *DEC* en cepas aisladas de pacientes con ITUR y su potencial relación con los cuadros de *recurrencias*. **Metodología:** Se realizó la búsqueda de los genes *DEC Stx1, Stx2, LT, eaeA, bfpA, ipaH* y *aggR* mediante PCR de punto final de 106 cepas *UPEC* aisladas de 38 pacientes durante un estudio previo, las cepas de *E. coli* se clasificaron asociadas a peITUR (13) y reITUR (25) considerando el serotipo de las bacterias. **Resultados:** El 79% (30/38) de los pacientes tuvo presencia de cepas híbridas. El gen *Stx2* (21%) fue el más frecuente seguido de *eaeA* (16 %) e *ipaH* y *bfpA* (ambos con 14%), *aggR* fue el gen con menor frecuencia (8%). Se identificaron que las cepas *UPEC* analizadas presentaban *heteropatotipos* con 1 (33%), 2 (14.4%) y 3(3.8%) genes *DEC*, algunos de estos exclusivos para peITUR o reITUR, sin embargo, no se encontró asociación entre *heteropatotipos* y los cuadros de *recurrencias*. **Conclusión:** Se identificó una frecuencia alta de cepas híbridas en pacientes con ITUR, sin embargo, no se observó asociación con alguna de las variedades de *recurrencia* (peITUR, reITUR). Es necesario realizar estudios para evaluar si los genes *DEC* identificados se expresan durante la ITUR, para definir si contribuyen en la patogénesis de las cepas *UPEC*.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS	I
RESUMEN	II
INTRODUCCIÓN	1
MARCO TEÓRICO	1
Infección del tracto urinario.....	1
Definición.....	1
Epidemiología de la ITU.....	1
Clasificación.....	2
Factores de riesgo.....	3
Etiología	4
<i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)	4
Patogenia de <i>E. coli</i>	6
<i>E. coli</i> uropatógena (UPEC).....	6
<i>E. coli</i> diarreogénicas (DEC)	7
Transferencia horizontal de genes	12
<i>E. coli</i> híbridas (Heteropatotipos).....	13
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	16
PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	16

JUSTIFICACIÓN.....	17
HIPÓTESIS	19
OBJETIVO.....	20
General.....	20
Específicos	20
METODOLOGÍA.....	21
Tipo de estudio:.....	21
Tamaño y origen de la muestra.....	21
Selección y clasificación de cepas	22
Cepas control	24
Verificación de la pureza y conservación	25
Extracción de ADN.....	25
Cuantificación de ADN.....	27
Electroforesis en gel de agarosa para ADN de controles.....	27
Identificación de genes mediante PCR punto final.....	28
Identificación de productos de PCR punto final	30
Análisis estadístico.....	30
RESULTADOS	33
Número de cepas de <i>E. coli</i> seleccionadas.....	33

PCR de cepas control.....	33
Serogrupos de las cepas aisladas de pacientes con reITUR peITUR.....	34
Frecuencia y tipo de genes DEC identificados en las cepas con <i>heteropatotipos</i>	35
Perfil y número de genes <i>DEC</i> identificados en los diferentes pacientes evaluados.....	38
Número de pacientes y tipo de cuadro clínico en los que se identificaron cepas híbridas o Heteropatotipos.....	40
Asociación de heteropatotipos con el tipo de ITUR	40
DISCUSIÓN.....	42
CONCLUSIÓN	50
REFERENCIAS	51
ANEXO 1	62
ANEXO 2	63

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Patotipos <i>DEC</i> y principales genes involucrados en el mecanismo de patogenia.....	8
Tabla 2. Secuencia y peso de iniciadores empleadas para la PCR punto final.....	29
Tabla 3. Condiciones de PCR punto final para la búsqueda de genes de <i>E. coli</i> DEC.	29
Tabla 4. Tabla de operacionalización de variables.....	31
Tabla 5. Serogrupos de pacientes con reITUR y peITUR.....	35
Tabla 6. Frecuencia de perfiles de genes <i>DEC</i> encontrados en los heteropatotipos.....	37
Tabla 7. Pacientes con peITUR y reITUR y perfil de genes <i>DEC</i> identificados.....	39
Tabla 8. Pacientes con reITUR y peITUR con presencia de cepas híbridas.	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema patogénico de subgrupos de DEC. Modificado de Pathogenic <i>Escherichia coli</i> Kaper, et al. (2004).....	9
Figura 2. Diagrama de selección y clasificación de las muestras.....	23
Figura 3. Metodología.	24
Figura 4. PCR punto final de cepas control positivo para los genes de <i>E. coli</i> diarreogénicas (<i>DEC</i>).....	34
Figura 5. Número de pacientes por cuadro clínico en los que se identificaron 1, 2 y 3 cepas híbridas.	40

ABREVIATURAS

ITU	Infección del tracto urinario
ITUC	Infección del tracto urinario crónica
ITUR	Infección del tracto urinario recurrente
reITUR	Infección del tracto urinario recurrente por una reinfección
peITUR	Infección del tracto urinario recurrente por una persistencia o recaída
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FV	Factores de virulencia
DEC	<i>E. coli</i> diarreogénicas
IPEC	<i>E. coli</i> patógena intestinal
ExPEC	<i>E. coli</i> patógena extraintestinal
UPEC	<i>E. coli</i> uropatógena
NMEC	<i>E. coli</i> causante de meningitis neonatal
SEPEC	<i>E. coli</i> asociada a septicemia
APEC	<i>E. coli</i> patógena aviar
EPEC	<i>E. coli</i> enteropatógena
tEPEC	<i>E. coli</i> enteropatógena típica
aEPEC	<i>E. coli</i> enteropatógena atípica
EHEC	<i>E. coli</i> enterohemorrágica
STEC	<i>E. coli</i> productora de toxina Shiga
ETEC	<i>E. coli</i> enterotoxigénica
cAMP	Adenosín monofosfato cíclico

cGMP	Guanosin monofosfato cíclico
EAEC	<i>E. coli</i> enteroagregativa
EIEC	<i>E. coli</i> enteroinvasiva
DAEC	<i>E. coli</i> adherencia difusa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
THG	Transferencia horizontal de genes
PAI	Isla de Patogenicidad
LEE	Locus de borramiento de enterocitos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
HIMFG	Hospital Infantil de México Federico Gómez
EGO	Examen general de orina
LB	Luria-Bertani
ml	mililitro
μL	microlitro
rpm	Revoluciones por minuto
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
°C	Grado Celsius
min	minuto
UMF	Unidad Medico Familiar

INTRODUCCIÓN

MARCO TEÓRICO

Infección del tracto urinario

Definición

La *infección de tracto urinario* (ITU) se caracteriza por presentar un conjunto de signos y síntomas atribuibles al compromiso del tracto urinario (riñones, vejiga, uréteres, uretra, pelvis y próstata), asociado con una reacción inflamatoria y un recuento significativo de bacterias en la orina, usualmente mayor o igual a 100, 000 unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml), observada principalmente en mujeres (Ramírez et al., 2022).

En algunos casos, aunque, existe un recuento significativo de bacterias no hay la presencia de signos y síntomas, para distinguirla de la *infección de tracto urinario* se le denomina Bacteriuria asintomática (Chafra et al., 2018; Ramírez et al., 2022).

Epidemiología de la ITU

Las *infecciones de tracto urinario* (ITU) se encuentran entre las enfermedades infecciosas más comunes a nivel mundial, causando aproximadamente 150 millones de casos por año (Lloyd et al., 2007). En México, este padecimiento (ITU) se ubica como la tercera causa de morbilidad con un promedio de más de 4 millones de casos anuales (Ahumada et al., 2022).

Como ya se hizo referencia su incidencia es mayor en mujeres, exceptuando los primeros años de vida en donde el papel se invierte siendo más común en hombres (Guías de Prácticas clínicas, 2011); sin embargo, es importante considerar que los datos antes referidos corresponden a las personas que acuden a las instituciones públicas y al no ser un padecimiento de notificación obligatoria la incidencia verdadera de las ITUs no es bien conocida (Grigoryan

et al., 2022).

Clasificación

Con base en la región anatómica en la que se presente la ITU se puede clasificar en ITU inferior, localizadas únicamente en el tracto urinario inferior (uretra, vejiga) o ITU superior, refiriéndose a infecciones en el tracto urinario superior (uréter, sistema colector, parénquima renal) (Guías de Practicas clínicas, 2011). Así pues, se denomina cistitis en el caso de localizarse en vejiga; cuando afecta la pelvis renal se define como pielonefritis; en uretra uretritis y prostatitis si se localiza en la próstata (Santomil et al., 2023).

Con base en la severidad y complejidad, y considerando la localización anatómica y duración, las ITUs se clasifican en:

No complicada: Se refiere a aquellas localizadas en su mayoría en el tracto inferior y con sintomatología específica del área (Abhay, 2013).

Complicadas: Son aquellas que en su mayoría se encuentran localizadas en el tracto superior, tienen relación con anomalías estructurales, funcionales, trastornos metabólicos o por problemas de inmunidad (Abhay, 2013).

Recurrente (ITUR): Hace referencia a la antes llamada *infección cónica del trato urinario* (ITUC) que se caracteriza por la presencia de tres o más eventos de ITUs sintomáticas en el plazo de doce meses o bien, cuando se presentan dos o más ITUs sintomáticas en seis meses (Valdevenitom et al., 2018).

Las infecciones recurrentes a su vez se subdividen en:

- **Persistente o recaída (peITUR),** esta se caracteriza por estar ocasionada siempre por el mismo microorganismo y si se trata de una cepa de *E. coli* que presente el mismo

serotipo, en estos casos la bacteria se aloja en las células epiteliales del tracto urinario y emerge cuando las condiciones externas le son favorables (Abhay, 2013).

- **Reinfección (reITUR)**, cuando el agente etiológico es diferente al que inicialmente ocasionó la infección, y por ende proviene de fuera del tracto urinario y probablemente forma parte del microbiota intestinal (Valdevenitom et al., 2018).

Para el desarrollo de este trabajo en el que se evaluó la participación de *Escherichia coli* (*E. coli*), se entenderá como reITUR en la que el evento infeccioso es ocasionado cada vez por una cepa de *E. coli* con un serotipo diferente.

Factores de riesgo

Dentro de los factores de riesgo atribuibles a las ITUs, destacan aquellos inherentes al paciente, puesto que son incontrolables (Ramírez et al., 2022) como:

- Anomalías estructurales y funcionales (uropatía obstructiva, vejiga neurogénica, etc.) (Ramírez et al., 2022).
- El sexo, siendo el femenino más propenso (exceptuando los primeros meses de vida) debido a:
 - **Anatomía.** El ano (reservorio de Gram negativos) se encuentra juntamente con la vagina y uretra, situación que en los varones es diferente (Ramírez et al., 2022).
 - **Durante el embarazo.** Hay disminución de la peristalsis ureteral y el vaciado vesical se dificulta; cambios anatómicos que favorecen la elevación anterosuperior de vejiga y estado hipertónico (Calderón et al., 2013).
 - **Cambios en el pH vaginal.** Debido a regulación hormonal durante la pre y post menopausia.

Existen otras situaciones que influyen en la aparición de una ITU como son el inicio de la vida sexual y la instrumentación urinaria (sonda, catéter, etc.).

Etiología

Diversos autores mencionan que los causantes etiológicos más frecuentes de las *infecciones del tracto urinario* (ITU) son bacterias del grupo Gram negativo de origen intestinal, entre las que destacan: *Escherichia coli* (*E. coli*), *Klebsiella sp*, *Proteus sp.* y *Enterobacter sp.* aunque, también algunas Gram positivas como *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus saprophyticus* y *Streptococcus agalactiae* se relacionan con la etiología de las ITU (Chafla et al., 2018). Sin embargo, los datos epidemiológicos muestran que la mayoría de los casos (80-90%) de las infecciones de la comunidad se deben a *Escherichia coli* (*E. coli*) (Calderón et al., 2013).

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

E. coli es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo de la familia *Enterobacteriácea* que forma parte de las bacterias comensales de la microbiota intestinal (Raeispour et al., 2018). La gran diversidad que presenta esta bacteria se debe a la plasticidad de su genoma que permite el ingreso, por vía horizontal, de genes que expresan diversos componentes. Las propiedades que adquiere la bacteria le confieren la capacidad para adaptarse a vivir en diferentes ambientes y hospederos lo que favorece su mayor diseminación. A los elementos que influyen en la adaptación de la bacteria y de manera consecuente afecta al hospedero se les ha definido como *factores de virulencia* (FV) produciendo diferentes cuadros clínicos incluidas las ITUs (Rodríguez, 2002).

Como ya se mencionó *E. coli* puede ocasionar diferentes padecimientos incluidos algunos en su hábitat natural el tracto digestivo, ocasionando cuadros de diarrea por lo que se

han descrito como patógenas intestinales (*IPEC*), que inicialmente se definieron como *E. coli* que causan diarrea (*DEC*). Sin embargo, su capacidad de adaptación ha permitido que puedan alojarse en ambientes externos como el tracto urinario, sistema nervioso, torrente sanguíneo etc., lo que condujo a proponer a estas como *E. coli* patógena extraintestinal (*ExPEC*) (Riley L., 2020).

La diferencia entre *DEC* y *ExPEC* aún no es clara, sin embargo, se ha buscado la forma de conocer que características particulares pueden presentar, es por lo que se ha tratado de analizar su comportamiento metabólico, antigénico, genómico y molecular. Uno de los primeros avances al respecto consistió en analizar diferencias en su estructura antigénica analizando sus componentes externos utilizando ensayos de aglutinación con sueros. De esta forma, Kauffman desarrolló un esquema de serotipificación (hoy día en uso) con base al antígeno somático “O” que se encuentra en el lipopolisacárido, el antígeno flagelar “H” relacionado con la movilidad de la bacteria (que puede o no estar presente) y el antígeno capsular “K” (Rodríguez, 2002). Este fue el inicio de la subtipificación de *E. coli* por serogrupos (basados en antígenos O) y serotipos (basados en la combinación de antígenos O, K y H) (Riley L., 2020).

“Actualmente hay alrededor de 188 grupos O de *E. coli* reconocidos, 56 tipos H y más de 80 K reconocidos” (Riley L., 2020). Sin embargo, el número de combinaciones entre antígenos nos indica la enorme diversidad de la bacteria, lo que en conjunto con la plasticidad de su genoma complica en gran medida definir con precisión cuales pudieran ser los más relevantes en cada uno de los diferentes cuadros clínicos con los que se le ha relacionado. Es por ello la importancia de analizar en forma integral a *E. coli* asociada con reITUR y peITUR.

Patogenia de *E. coli*

Escherichia coli es uno de los organismos bacterianos mejor adaptados y patológicamente versátiles. La patogenicidad de un microorganismo se atribuye a la presencia de ciertos *factores de virulencia* (FV) que le permiten causar daño al hospedero. Actualmente se han descrito FV para el grupo *ExPEC* y *DEC* que participan en su mecanismo de patogenicidad facilitando la colonización y desencadenando infecciones clínicas como diarrea, síndrome urémico hemolítico (SUH), *infecciones del tracto urinario*, bacteriemia, sepsis y meningitis neonatal (Riley L., 2020) así pues, dentro de los grupos *DEC* y *ExPEC* se han denominado diferentes variantes patógenas de *E. coli* (*patotipo*) o *patovares*.

En el caso de las *ExPECs* se clasifican con base al huésped y al sitio de aislamiento (Priyanka et al., 2023), así pues, los patotipos *ExPEC* incluyen a *E. coli* uropatógena (*UPEC*), *E. coli* causante de meningitis neonatal (*NMEC*), *E. coli* asociada a septicemia (*SEPEC*) y *E. coli* patógena aviar (*APEC*) (Denamur et al., 2021). Los reservorios y la transmisión de las cepas *ExPEC* son diversos y sus mecanismos de patogenicidad son característicos para cada uno de los grupos causantes de enfermedad (Priyanka et al., 2023).

***E. coli* uropatógena (UPEC)**

Las *infecciones del tracto urinario* son causadas por *E. coli* uropatógena (*UPEC*), estas cepas poseen FV estructurales (como fimbrias, Pili, rizos, flagelos, etc.) y de secreción (toxinas, sistemas de adquisición de hierro, etc.) que contribuyen a su capacidad para causar ITU (Terlizzi et al., 2017).

Durante las *infecciones urinarias*, el mecanismo de patogénesis de las *UPEC* se da mediante el siguiente proceso (Terlizzi et al., 2017):

- I. La colonización *UPEC* de las áreas periuretral y vaginal con colonización de la uretra.
- II. La capacidad de ascender a la luz de la vejiga y crecer en la orina.
- III. La capacidad de adherencia a la superficie.
- IV. La formación de biopelículas.
- V. Su invasión y replicación.
- VI. La colonización renal.
- VII. El daño tisular del huésped con mayor riesgo de bacteriemia/septicemia.

Los genes de virulencia más significativos asociados a *UPEC* son aerobactina (*aer*), fimbrias P (*pap*), hemolisina (*hly*), fimbrias tipo 1, adhesina I (*afa I*), factor necrotizante citotóxico 1 (*cnf I*) y fimbrias S (*sfa*) (Momtaz et al., 2013).

La capacidad de adherirse a las células epiteliales del huésped en el tracto urinario representa el determinante más importante de la patogenicidad de *UPEC*, considerando la variedad de barreras o defensas que el epitelio de la vejiga (flujo de orina y la secreción de sustancias antimicrobianas) y hospederio presentan (Terlizzi et al., 2017).

***E. coli* diarreogénicas (DEC)**

En cuanto a las cepas *DEC*, asociadas con enfermedades diarreicas, éstas a su vez poseen factores de adherencia específicos que les permiten colonizar sitios que *E. coli* normalmente no habita, como el intestino delgado (Kaper et al., 2004). Considerando el sitio anatómico en el que se alojan y el cuadro clínico que ocasionan hasta el momento se han descrito seis subgrupos (Tabla 1, Figura 1) bien caracterizados y clasificados en función del mecanismo de patogenicidad de cada grupo.

Tabla 1. Patotipos *DEC* y principales genes involucrados en el mecanismo de patogenia.

<i>Patotipo</i>	<i>Gen</i>	<i>Producto</i>	<i>Localización</i>
<i>E. coli</i> enteropatógeno (EPEC)	<i>bfpA</i>	Proteína de Pili formadora de paquetes <i>bfpB</i>	Plásmido
	<i>eaeA</i>	Intimina	Cromosoma
<i>E. coli</i> enterohemorrágica (EHEC)	<i>Stx1</i>	Toxina Shiga 1	Fago
	<i>Stx2</i>	Toxina Shiga 2	Fago
<i>E. coli</i> enterotoxigénica (ETEC)	Est1b (<i>ST</i>)	Toxina termoestable	Plásmido/ transposón
	<i>LT</i>	Toxina termolábil	
<i>E. coli</i> enteroagregativa (EAEC)	<i>aggA</i>	Fimbria I de adherencia agregativa	Plásmido
	<i>aggR</i> **	Activador transcripcional (Kaper et al., 2004)	Plásmido/ cromosoma (Prieto et al., 2021)
<i>E. coli</i> enteroinvasiva (EIEC)	<i>ipaH</i>	Plásmido de invasión antígeno H	Plásmido/ cromosoma
<i>E. coli</i> adherente difusa (DAEC)	<i>daaE</i>	Proteína de la familia Dr. adhesin DaaE	Cromosoma

**En el caso de varios de los FV de EAEC, están regulados por un único activador transcripcional llamado *aggR* (Prieto et al., 2021)

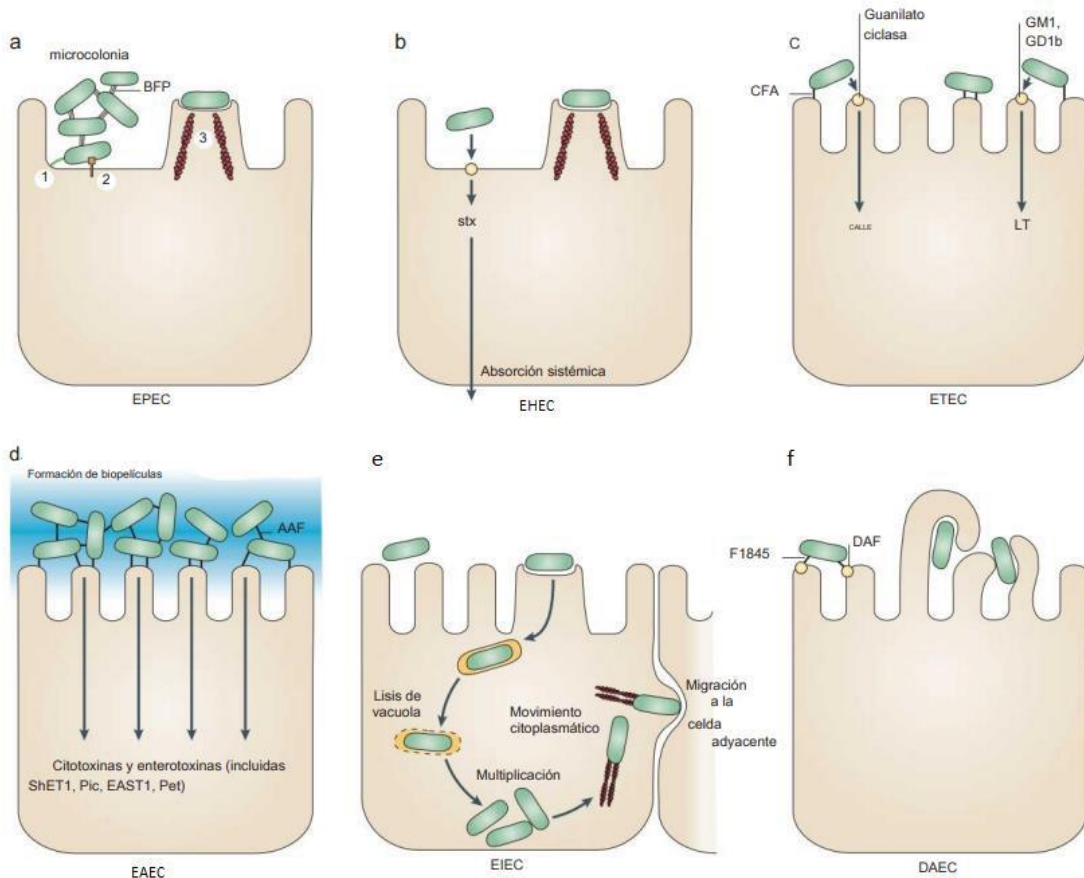


Figura 1. Esquema patogénico de subgrupos de *DEC*. **a.** *E. coli* enteropatógena (EPEC); **b.** enterohemorrágica (EHEC); **c.** enterotoxigénica (ETEC); **d.** enteroagregativa (EAEC); **e.** enteroinvasiva (EIEC); y **f.** adherente difusa (DAEC). Modificado de Pathogenic *Escherichia coli* Kaper, James B. et al., 2004. doi:10.1038/nrmicro818

EPEC se caracteriza por inducir una lesión en el intestino conocida como lesión Attach/Effacement A/E (adherencia y borramiento). Este proceso ocurre con la adherencia inicial entre bacterias (agregación) formando microcolonias y posteriormente, su adherencia a la célula mediante pilis o fimbrias rizadas llamadas *Bfp* (bundle-forming pilus) cuya información genética está codificada en el plásmido *EAF* (EPEC adherence factor). Durante la etapa de adherencia es necesaria la síntesis de una proteína de membrana externa llamada

intimina, codificada por el gen cromosomal *eaeA* que sirve como señal (Rodríguez, 2002) para la posterior secreción de proteínas translocadoras y efectoras de la virulencia mediante un sistema de secreción tipo III, con el propósito de reorganizar el citoesqueleto celular lo que lleva a la pérdida de las microvellosidades intestinales y su función (Vidal et al., 2007).

Un subgrupo de EPEC llamado **aEPEC** "*atípico*" no posee *EAF*, pero tienen la isla de patogenicidad LEE (isla de patogenicidad de 35 kb conocida como el locus de la eliminación del enterocito) que codifica para un sistema de secreción de tipo III permitiendo que esta EPEC atípica tenga el mismo efecto de Attach/Effacement (Kaper et al., 2004).

En el caso de **EHEC**, se trata de *E. coli* productora de una citotoxina con actividad en células Vero, por lo que inicialmente se le denominó verotoxina (VT), esta citotoxina tiene la propiedad de neutralizarse con antitoxina obtenida a partir de la toxina Shiga de *Shigella dysenteriae* tipo 1, por lo que también se le llama "*shiga-like toxin*" o toxina semejante a Shiga (*SLT*) o "Shiga toxin" (*Stx*), y a las *E. coli* capaces de producirla se les da el nombre de *E. coli* productora de toxina Shiga (**STEC**). En las cepas EHEC aisladas, se han encontrado las variantes *Stx1* y *Stx2* que son inmunológicamente diferentes entre sí y son los principales FV asociados al cuadro clínico de síndrome urémico hemolítico (Rodríguez, 2002). La causa por la cual *Stx* es considerado un FV en EHEC se debe a que esta citotoxina se une a la subunidad 60S de los ribosomas de las células intestinales o renales del hospedero lo que conlleva a una alteración en la síntesis de proteínas provocando daño en las células epiteliales del hospedero (Kaper et al., 2004).

Además de la toxina, las cepas EHEC tienen otros mecanismos de patogenicidad como el fenómeno de adherencia y borramiento (A/E), ya que presentan el gen cromosomal *eae*; el plásmido pO157 que codifica para la enterohemolisina y contienen la isla de patogenicidad LEE

que codifica un sistema de secreción de tipo III (Rodríguez, 2002).

ETEC (*E. coli* enterotoxigénica), tiene la capacidad de colonizar la mucosa del intestino delgado mediante pilis o fimbrias que tienen diversas formas denominadas *CFA* (colonization factor antigens). Su principal mecanismo de patogenicidad es la síntesis de una o dos enterotoxinas llamadas *toxina termolábil (LT)* y *toxina termoestable (ST)* codificadas mediante genes localizados en plásmidos o transposones (Riley, 2020).

Las toxinas *LT* y *ST* aumentan el nivel intracelular de cAMP y cGMP respectivamente, que se encuentran en la membrana de las células intestinales, provocando la salida de agua y iones mediando la producción de diarrea acuosa (secretora) (Rodríguez, 2002).

EAEC se definen como *E. coli* que no secretan *LT* ni *ST* y que se adhieren a las células HEp-2 en un patrón conocido como de ladrillos apilados (autoagregativo). Se caracteriza por la adhesión a células y a la mucosa intestinal mediante fimbrias de adherencia agregativa (*AAF*) (Kaper et al., 2004). Se ha descrito que la adhesión se logra mediante la fimbria I de adherencia agregativa (*AAF/I*), codificada por el gen *aggA* que se encuentra en un plásmido o mediante la fimbria *AAF/II* inmunológicamente diferente a *AAF/I* y que está codificada por el gen *aafR*; sin embargo, no todas las EAEC presentan estas fimbrias (Rodríguez, 2002).

Las cepas EAEC tienen además la capacidad de producir toxinas como *Pic* (proteasa autotransportadora con actividad mucinasa) (Henderson I et al, 1999); la toxina autotransportadora llamada *Pet* codificada en el plásmido que codifica la *AAF* (Eslava et al, 1998); la enterotoxina oligomérica conocida como Shigella enterotoxina 1 (*ShET1*); y la enterotoxina *E. coli ST* enteroagregativa (*EAST I*). El gen *EAST I (astA)* también se puede encontrar en muchos aislados comensales de *E. coli*, por lo que el papel de *EAST I* en la diarrea sigue sin estar claro (Kaper et al., 2004). En el caso de los FV de EAEC, en su mayoría están

regulados por un único activador transcripcional llamado *aggR* (Kaper et al., 2004).

EIEC, tiene una estrecha relación con *Shigella spp*, dado que son taxonómicamente indistinguibles a nivel de especie (Kaper et al., 2004). El mecanismo de patogenicidad de EIEC es la invasión del epitelio del colon mediante la adherencia a las vellosidades de la mucosa, una vez adherida, EIEC entra por endocitosis a la célula y se replica dentro de ella para finalmente diseminarse a células sanas adyacentes (Rodríguez, 2002). La patogenicidad de EIEC está dada por un sistema de secreción tipo III transmitido por plásmidos (codificado por los genes *mxi* y *spa*) que permite la secreción de proteínas, como IpaA, IpaB, IpaC, IpaD e ipaH que median eventos de señalización epitelial, reordenamientos en el citoesqueleto, captación celular, lisis de la vacuola endocítica y otras que permiten la invasión celular (Rodríguez, 2002).

DAEC, se definen por la presencia de un patrón difuso característico de adherencia a la monocapa de células HEp-2 (Kaper et al., 2004). En cuanto a su mecanismo de patogenicidad se ha caracterizado una fimbria de superficie conocida como *F1845* que utiliza como receptor a *DAF* (factor acelerador de desintegración). *DAF* es una proteína anclada a glicosilfosfatidilinositol de la superficie celular encargada de proteger a las células del daño causado por el sistema del complemento.

Transferencia horizontal de genes

La adquisición de ADN por *transferencia horizontal de genes* (THG) es un mecanismo eficaz para la evolución de los microorganismos y generar diversidad entre especies bacterianas. Esta transferencia se puede dar mediante tres mecanismos principalmente: **1)** Transformación (captación del material genético del entorno); **2)** Conjugación (mediante pilis y plásmidos) y **3)** Transducción (mediante fagos) (Lloyd et al., 2007).

La secuenciación completa de los genomas de las cepas clínicas de *UPEC* ha mostrado que la adquisición de *factores de virulencia* (FV) ocurre en islas de patogenicidad, mediante plásmidos, fagos y la *transferencia horizontal de genes* (Luna et al., 2017).

Lloyd et al. (2007), han encontrado que los genes de adhesina no están altamente conservados entre las cepas de *E. coli*, lo que resulta interesante y provechoso para los patógenos bacterianos puesto que les brinda una ventaja para la supervivencia en diferentes nichos ajenos a los que comúnmente colonizan (Terlizzi et al., 2017). Así pues, se ha demostrado la capacidad de *DECs* para adaptarse a nuevos nichos permitiendo causar un amplio espectro de enfermedades, incluida las ITUs, por lo que es común encontrar FV asociados a *DEC* o “*E. coli* diarreogénicas” en este tipo de infecciones (Terlizzi et al., 2017); lo que lleva a considerar la posibilidad de una la transferencia de genes entre cepas *DECs* y *UPEC*.

***E coli* híbridas (Heteropatotipos)**

La evolución de la virulencia se basa en tres mecanismos principales: 1) La adquisición de uno o más genes que no portaba inicialmente; 2) La inactivación de genes cuya expresión es incompatible con la virulencia; y 3) Mutaciones puntuales que conducen a un cambio de función (mutaciones pato-adaptativas) dando como resultado una extensa variedad de FV en las bacterias (Denamur et al., 2021).

Durante los últimos años, se han identificado grupos de aislados patógenos de *E. coli*, que presentan FV de dos o más patogrupos diferentes (Denamur et al., 2021), ya sea dentro de los *patotipos DEC* (por ejemplo, entre EHEC y EAEC) o entre patotipos *DEC* y *ExPEC* dificultando el seguimiento de la clasificación del *patotipo* (Yousefipour et al., 2023).

Estos nuevos grupos han generado controversia al momento de ser definidos, autores

como de Mello Santos et al. (2020) acuñan el término "*hetero patógeno*" o "*hetero patogénico*" para referirse a cepas que contienen FV de dos o más patotipos de *DEC*. El mismo autor menciona que, "*su definición es sencilla porque los genes que delinear DEC (E. coli diarreogénicas) están bien definidos.*" Así mismo destaca la exclusión de DAEC y *E. coli* adherente invasiva (AIEC) debido a la ausencia de marcadores o FV bien descritos para ellas (de Mello Santos et al., 2020).

Así también se ha designado el término de cepas "*híbridas-patógenas*" o "*híbridas-patogénicas*" para referirse a aquellas que presentan FV tanto *DEC* como *ExPEC* o bien aquellas cepas que se aíslan de una infección extraintestinal y codifican *factores de virulencia* definitorios de *DEC* (de Mello Santos et al., 2020). La distinción entre estos grupos es necesaria debido a la ambigüedad de genes necesarios para poder conocer mejor a las cepas *ExPEC* y en particular las cepas de *E. coli* responsables de ITU recurrentes (ITUR) ya sean *persistentes* (peITUR) o *reinfecciones* (reITUR) (Hernández et al., 2023).

Con el propósito de denominar a este grupo de cepas con presencia de genes mixtos, se utilizará el término "*heteropatotipo*" para definir a las cepas *UPEC* que presenten uno o más genes de cepas *DECs* o "*combinación de virulencia intestinal y extraintestinal*" (Bizot et al., 2022).

La emergencia de estas cepas híbridas se está convirtiendo cada vez más en un problema de salud pública (Gati et al., 2021), como fue el caso del brote de síndrome urémico hemolítico (SUH) ocurrido en Alemania en el 2011 (Bielaszewska et al., 2011). Este brote afectó a casi 4,000 personas y fue ocasionado por una cepa de *E. coli* enteroagregativa (EAEC) capaz de producir *Stx2*. La infección por este *heteropatotipo* ocasionó un cuadro diarreico y síndrome urémico hemolítico en el 22% de los afectados. El padecimiento se relacionó con la infección

por una cepa *E. coli* O104: H4 con genes de EAEC y capaz de producir la toxina tipo Shiga 2 (SLT 2) (Scheutz et al., 2011; Rasko et al., 2011).

En el caso de UPEC se ha reportado la presencia de genes *DEC* como *Stx* y el activador transcripcional *aggR* (Prieto et al., 2021). Sin embargo, es factible que existan cepas causantes de ITUR con otros genes de cepas *DEC*, principalmente por el hecho de que los cuadros de *reinfección* se relacionan con cepas que forman parte de la microbiota intestinal (Hernández et al., 2023). Resulta interesante el evaluar la presencia de *heteropatotipos* UPEC para conocer por un lado la diversidad de genes *DEC* que se pueden identificar en las cepas UPEC y evaluar si es factible que contribuyan en la patogenicidad de este grupo de cepas. Con la información que se genere se podrán hacer propuestas para tratar de aclarar los mecanismos de patogenicidad por el que ocurren las ITUR (Murray et al., 2021). Otro aspecto interesante que se podrá evaluar con la identificación de las cepas híbridas, consiste en proponer un potencial biomarcador para identificar incluso de una muestra de orina de la cepa responsable del cuadro clínico en un paciente con ITU (Yousefipour et al., 2023).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las *infecciones de tracto urinario recurrentes* (ITUR) representan un problema de salud pública que afectan de manera importante a un sector de la población (Dirección General de Epidemiología, 2022), además, los métodos convencionales para la detección de *infecciones de tracto urinario* (ITU) son tardados (Josephs et al., 2021) y poco precisos para identificar las cepas asociadas con peITUR y reITUR (Murray et al., 2021). Así mismo, el tratamiento cada vez se complica más, por elevado incremento en la resistencia bacteriana a los antimicrobianos (Sihra et al., 2018), lo que se traduce en una disminución en la calidad de vida de los pacientes (Grigoryan et al., 2022) y en altos costos en las instituciones de salud a nivel mundial (Yang et al., 2022; Ahumada et al., 2022). Es por lo que se requiere de procedimientos que permitan identificar en forma más rápida y precisa a las cepas de *E. coli* causantes de ITU, principal agente causal del padecimiento.

PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

Dado lo anterior, se desglosan las siguientes preguntas de investigación:

- ¿Cuál es la frecuencia de cepas híbridas (*heteropatotipos*) de *E. coli* aisladas en un estudio prospectivo de pacientes con *infección recurrente del tracto urinario* (ITUR)?
- En caso de existir *heteropatotipos*, ¿Los genes se mantienen o se pierden de acuerdo con la historia natural de la enfermedad?
- ¿Existe alguna asociación entre cepas híbridas de *E. coli* y el tipo de ITUR?

JUSTIFICACIÓN

Las *infecciones del tracto urinario* (ITU) son un problema de salud común en todo el mundo tanto en entornos comunitarios como hospitalarios. Se ha estimado que alrededor de 150 millones de personas en todo el mundo desarrollan ITU cada año, con altos costos sociales en términos de hospitalizaciones y gastos médicos (Terlizzi et al., 2017). Ahumada et al. (2022), estimó un costo anual aproximado de \$1,802.00 por paciente, considerando el promedio de casos reportados de 2007 a 2019 (3,809,727/año), con un costo total de aproximadamente \$6,865,128,054 en México (Ahumada et al., 2022). Un aspecto relevante de las ITUs es que pueden hacerse crónicas también llamadas *recurrentes* (ITUR), situación que influye en los costos dependiendo del número de cuadros que cada paciente presente.

Además del costo económico, las ITUs se asocian con alteración en la salud emocional y mental, lo que repercute de manera importante en la calidad de vida de los pacientes. Un estudio realizado para caracterizar las experiencias emocionales de 20 mujeres de 67 a 96 años con *infecciones del tracto urinario recurrentes* (ITUR), refiere diferentes respuestas emocionales como ansiedad, depresión o abulia, asociada con las molestias ocasionadas por la ITUR, así como por los problemas relacionados con fallas en el tratamiento (Grigoryan et al., 2022; Yang et al., 2022). Con base en lo anterior se destaca la importancia de buscar nuevas alternativas para el diagnóstico rápido y efectivo que permita discernir entre ITU aguda e ITU crónica y a la par poder definir si los casos de ITUR son *reinfecciones* (reITUR) o *persistencias* (peITUR), para mejorar el manejo del paciente en cuanto a implementar un tratamiento integral (Murray et al., 2021).

E. coli es el principal microorganismo aislado y causante de ITUs (Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica, 2022); sin embargo, es una bacteria altamente adaptable y versátil

en cuanto a su material genético (Riley L., 2020), por lo que se vuelve una bacteria de importancia clínica no solo por su patogenicidad sino por su versatilidad genética. Ante esta situación realizar la caracterización integral del microorganismo, incluidos su fenotipo y genotipo, permitirá definir la participación de lo que se han definido como *heteropatotipos* en la patogénesis de ITUR.

HIPÓTESIS

La presencia de genes asociados con la virulencia de cepas *DEC* en cepas de *E. coli* aisladas de ITUR, confirma la capacidad de la bacteria para adquirir información genética por vía horizontal y dar origen a cepas híbridas responsables de cuadros de reITUR y peITUR.

OBJETIVO

General

Analizar la presencia de cepas híbridas portadoras de genes de *E. coli* que causa diarrea, en aislados de la bacteria obtenidos de pacientes con ITUR, para definir si los *heteropatotipos* identificados se relacionan con cuadros de *reinfección* o *persistencia*.

Específicos

- Seleccionar de la base de datos generada durante un estudio prospectivo de ITUR, cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con cuadro clínico de *reinfección* y *persistencia*.
- A partir de las muestras seleccionadas recuperar tres cepas de cada paciente, previamente caracterizadas por pruebas bioquímicas, tipificación con sueros, sensibilidad a los antimicrobianos y detección de genes *UPEC* que se han mantenido en conservación.
- Verificar la pureza e identidad de las cepas seleccionadas por siembra en agar sangre y MacConkey.
- Analizar por PCR punto final en las cepas seleccionadas la presencia de: *Stx1*, *Stx2*, *ST*, *LT*, *aggR*, *eaeA*, *bfpA* e *ipaH* de los patotipos de *E. coli* diarrogénica (*DEC*) STEC, ETEC, EAEC, EPEC, EIEC.
- Analizar la frecuencia con la que se identifiquen los diferentes genes de cepas *DEC* en las cepas estudiadas de pacientes con reITUR y peITUR.
- Analizar si existe relación entre alguno o algunos genes asociados con la virulencia de *UPEC* y los *DEC* identificados en las cepas híbridas.
- Definir si existe asociación entre los *heteropatotipos* *UPEC* con el cuadro clínico de *reinfecciones* y *persistencias*.

METODOLOGÍA

El presente trabajo forma parte del proyecto FM/DI/013/2021 “**Modelo animal (ratón) para evaluar la utilidad de lisados de *Escherichia coli* uropatógena (UPEC) y otros patógenos urinarios, para el control y tratamiento de infecciones crónicas de las vías urinarias**” con numero de aprobación IN205322 por los respectivos comités de ética e investigación de la Facultad de Medicina, UNAM y del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) (ANEXO 1 y 2) El estudio se realizó en el Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana del HIMFG unidad periférica de la División de Investigación, Facultad de Medicina. UNAM.

Tipo de estudio:

- Modalidad básica clínica
- Longitudinal, retrospectivo

Tamaño y origen de la muestra

Las cepas se seleccionaron de una población de 56 pacientes ambulatorios con *infección del tracto urinario recurrente* (ITUR), que accedieron a participar mediante un consentimiento informado, en un estudio longitudinal previo realizado durante un año haciendo el seguimiento de la evolución de la ITUR mediante examen general de orina (EGO), urocultivo y la administración de un lisado bacteriano personalizado para el control de la infección.

El cálculo del tamaño de la muestra se realizó con la siguiente ecuación, obteniendo una n=50 pacientes con un error atribuible de 5%.

$$\text{Tamaño de muestra} = \frac{NZ^2pq}{(N - 1)e^2 + Z^2pq}$$

Donde:

N = Tamaño de la población

Z = Valor de z al 95% de confianza (2)

p = probabilidad de que el evento ocurra (0.5)

q = probabilidad de que el evento no ocurra (0.5)

e =Error estimado (0.05)

Selección y clasificación de cepas

Se hizo la selección de 3 cepas por paciente con base a la definición de *infección de tracto urinario recurrente* (ITUR), entendiéndose como aquella en donde se presentan tres o más ITUs sintomáticas en el plazo de doce meses o bien, cuando se presenta dos o más ITUs sintomáticas en seis meses (Valdevenitom et al., 2018). Para la selección de estas cepas, se consideraron los siguientes **criterios de inclusión**: cepas aisladas de dos o tres urocultivos diferentes de pacientes positivos a ITUR. De acuerdo con resultados de estudios previos (Ahumada et al., 2020; Hernández et al., 2021; 2023), se trabajó con *E. coli* microorganismo identificado en el 80% de los casos estudiados. Las cepas puras previamente identificadas con pruebas bioquímicas, serotipificadas, con pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos y detección de genes de virulencia de UPEC con clave en el cepario, se recuperaron y se verificaron en la pureza e identidad. Se excluyeron aquellas cepas con los siguientes **criterios de exclusión**: cepas de urocultivos positivos a ITUR, cuyo agente etiológico no fuera *E. coli*, cepas contaminadas en los tubos de conservación, cepas repetidas (misma clave en el cepario) y pacientes con una única cepa existente en el cepario y un único urocultivo en registro.

De los 50 pacientes inicialmente seleccionados se eliminaron 12 de los que se obtuvieron 106 cepas que cumplieron con los criterios de inclusión (Figura 2).

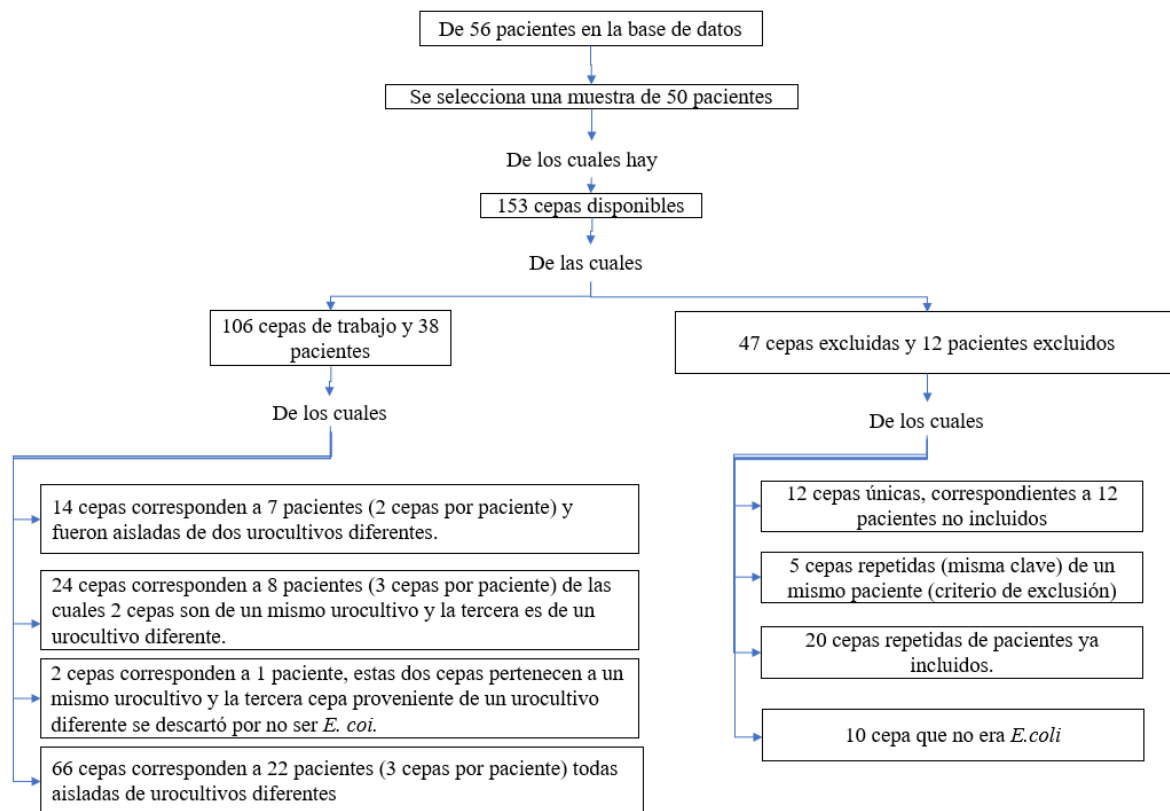


Figura 2. Diagrama de selección y clasificación de las muestras.

Una vez agrupadas las cepas por paciente, se hizo la búsqueda en la base de datos del Laboratorio de Patogenicidad bacteriana del HIMFG de los serotipos de las cepas de trabajo con base a las claves de las muestras y la información disponible. Con la misma información se realizó la clasificación de cada paciente con *infección del tracto urinario recurrente* (ITUR) en *reinfección* (reITUR) y *persistencia* (peITUR) siguiendo la metodología descrita en la Figura 3.

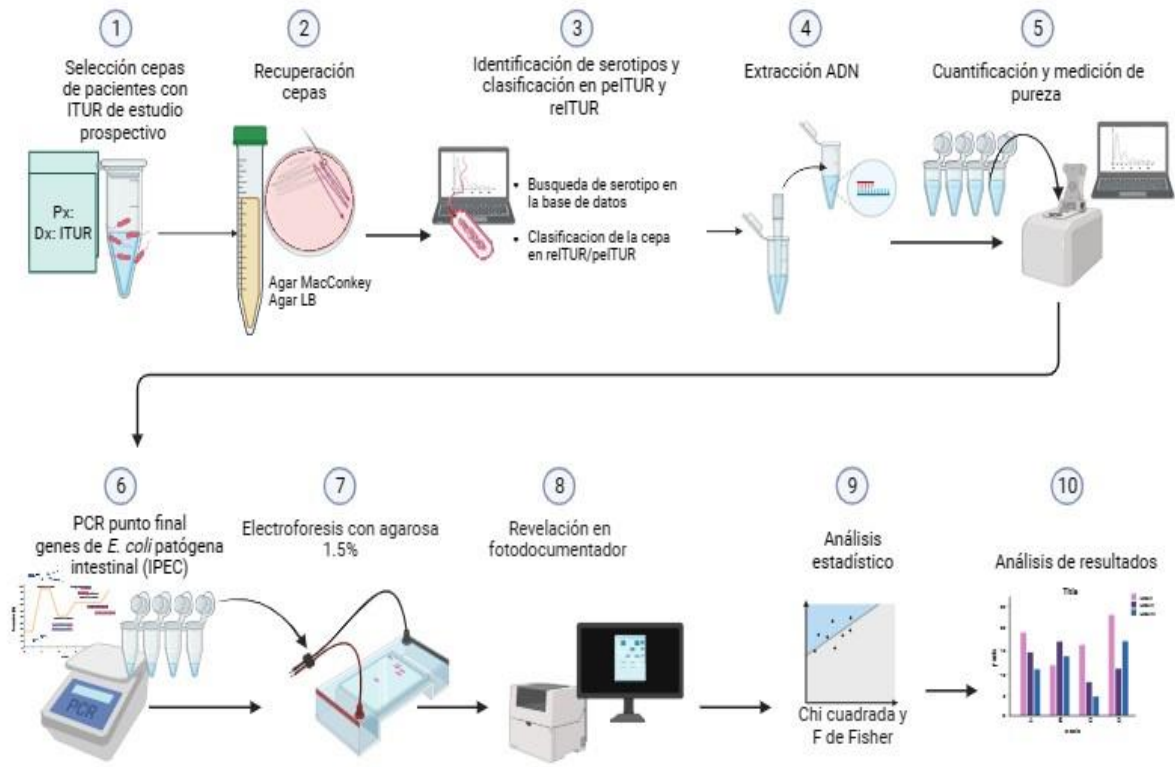


Figura 3. Metodología.

Cepas control

Para validar la búsqueda de los genes diarrogénicos en las cepas de trabajo, se emplearon las siguientes cepas de referencia como controles positivos.

- Para el gen *Stx1* y *Stx2* se empleó EHEC 0157:H7E02933 con un peso de 150 bp y 254 bp respectivamente.
- Para el gen *ST* y *LT* se hizo uso de la cepa ETEC H10707 con un peso de 191 bp para *ST* y 440 bp para *LT*.
- Para el gen *bfpA* y *eaeA* se utilizó EPEC 0127:H6 con un peso de 324 bp y 384 bp respectivamente.
- Para *ipaH* se empleó EIEC 95079 de 650 bp.

- Para el regulador *aggR* se hizo uso de la cepa EAEC 49766 de 188 bp.

Como control negativo se utilizó la cepa de referencia ATCC25922 (*Escherichia coli* Migula Castellani and Chalmers) que carece de los *factores de virulencia* analizados. La mayoría de las cepas fueron donadas al Laboratorio de Patogenicidad bacteriana a excepción de EAEC 49766 (O?:H10), aislada en el laboratorio de una muestra clínica.

Verificación de la pureza y conservación

Una vez seleccionadas las cepas, se sembraron (por cuadrante radial) en placas de agar sangre y agar MacConkey para verificar la pureza de las cepas, así mismo se sembró por estriado masivo en agar Luria-Bertani (LB) y se incubaron a 37° C por 24 h. Una vez que se comprobó la pureza de las cepas, del agar LB se tomaron azadas de la mitad de la caja para preservar en caldo LB glicerol al 20% y tomando azadas de la otra mitad de la caja se inoculó en tubos falcón con 10 ml de caldo LB para realizas la extracción de su material genético.

Extracción de ADN

La extracción de ADN bacteriano de las cepas de trabajo y las cepas de referencia para los genes a evaluar se hizo mediante el método de Tiocianato de Guanidina (Pitcherd et al., 1989), con modificaciones de Acevedo et al. (2022). El procedimiento se describe a continuación, el cual fue el mismo para las 106 cepas de trabajo y las cepas de referencia.

1. Se inoculó la cepa de interés en un tubo falcón de 15ml con 10 ml de caldo LB.
2. Una vez inoculada la cepa, se incubó el inculo por 24 h a 37°C ± 2°C con agitación constante a 200 revoluciones por minuto (rpm).
3. Transcurridas las 24h se homogenizó el inculo en vórtex y se tomaron 1.5ml de caldo homogenizado para transferirlo a un tubo eppendorf de 1.5ml.

4. Se centrifugó el cultivo previamente transferido a 10,000 rpm por 5 minutos.
5. Se desechó el sobrenadante, tratando de no desintegrar el pellet bacteriano.
6. Se repitió el paso 3, 4 y 5 en el mismo tubo eppendorf del paso 3.
7. Se agregó al pellet bacteriano resultante 225µL de solución de lisis (Tiocianato de Guanidina, N-LaurilSarcosil, EDTA) y se agitó vigorosamente en el vórtex.
8. A la mezcla anterior, se adicionó 125µL de acetato de amonio frío y se homogenizó invirtiendo el tubo eppendorf 10 veces tratando que el homogenizado tocara todas las paredes del tubo.
9. La mezcla anterior se incubó 10 minutos en hielo. Al finalizar el tiempo, se agregó 125µL de cloroformo-alcohol isoamílico 24:1 y se agitó en vórtex.
10. Se centrifugó la mezcla a 10,000 rpm por 5 minutos.
11. Una vez centrifugada la mezcla se transfirió el sobrenadante a un tubo eppendorf nuevo.
12. Al sobrenadante previamente transferido se le realizó otro lavado añadiendo 125µL de cloroformo: alcohol isoamílico. Se homogenizó en vórtex y se centrifugó a 10,000 rpm por 5 minutos.
13. Una vez centrifugada la mezcla anterior se transfirió el sobrenadante a un tubo eppendorf nuevo.
14. Se adicionó al sobrenadante transferido, dos volúmenes de etanol absoluto para tener la precipitación inmediata del ADN.
15. Una vez adicionado el etanol absoluto, se centrifugó la mezcla a 10,000 rpm por 10 minutos.
16. De la mezcla anterior, se decantó el sobrenadante y se agregó 1 ml de etanol al 70%.
17. Posteriormente se centrifugó la mezcla anterior a 10,000 rpm por 5 minutos.

18. Una vez centrifugada la mezcla, se desechó el sobrenadante y se dejó secar el ADN en el tubo eppendorf a temperatura ambiente por 24 horas.

19. Transcurridas las 24 h se reconstituyó el ADN con 50 μ L de agua libre de nucleasas estéril (mili-Q).

Cuantificación de ADN

La cuantificación del ADN de las muestras y las cepas control, se realizó en un NanoDrop 1000 (Thermo Scientific®) a una longitud de onda 260/280nm. A partir de la concentración del ADN extraído se realizó una dilución 1/10 en todas las alícuotas de extracción para ajustar la concentración requerida en la PCR de punto final.

Electroforesis en gel de agarosa para ADN de controles

Se realizó electroforesis horizontal en gel de agarosa (Cleaver Scientific®) al 0.8 % siguiendo lo señalado por Brody y Kern (2004) y se utilizó Buffer regulador SB 1X (10mM de hidróxido de sodio y ácido bórico hasta pH igual a 8.5) como conductor y diluyente. El gel se corrió con las siguientes condiciones:

1. Se depositaron 7 μ L de la muestra mezclado con 3 μ L de buffer de carga 1X DNA Loading Dye (Thermo Scientific™) con volumen final 10 μ L por pozo.
2. Se empleó como marcador de peso molecular GeneRuler 100bp DNA Ladder (Cleaver Scientific®) (10 μ L) para identificar el peso de los productos extraídos.
3. El gel se sometió a un campo eléctrico a 100V durante 35 minutos en una cámara de electroforesis (BioRad®).

4. Las bandas del gel se tiñeron con Bromuro de Etidio al 0.01 % (Freifielder., 1981) por 15 minutos, y se revelaron tras una exposición de 2 minutos a luz UV utilizando el fotodocumentador omniDOC Gel Documentation System de (Clever Scientific).

Identificación de genes mediante PCR punto final

Para la identificación de los genes *DEC*, el ADN previamente extraído se ajustó a una concentración entre 5ng/ml y 100 ng/ml. Para la mezcla de reacción se utilizaron 12.5 µL de Taq DNA Polymerase Máster Mix de la marca AMPLICON (cat. A140303), 8.5 µL de agua libre de nucleasas mili-Q (Ambion), 1 µL de iniciador en sentido (F) y 1 µL de iniciador antisentido (R) (ThermoScientific).

Las secuencias de los iniciadores usados (Tabla 2), se tomaron de lo reportado en la literatura por López et al. (2003) con modificaciones realizadas en el laboratorio.

Para la amplificación se utilizaron las condiciones descritas en la Tabla 3 utilizando un termociclador Techneâ 3 Primeâ o MiniAmpâ Thermal Cycler (Applied Biosystems).

Tabla 2. Secuencia y peso de iniciadores empleadas para la PCR punto final.

Gen	iniciador	Peso (bp)	Cepas (C+)
<i>Stx1</i>	F: CTGGATTTAATGTCGCATAGTG R: AGAACGCCCACTGAGATCATC	150	EHEC0157:H7E02933
<i>Stx2</i>	R: GGCAGTGTCTGAAACTGCTCC F: TCGCCAGTTATCTGACATTCTG	254	
<i>ST</i>	F: ATTTTCTTTCTGTATTGTCTT R: CACCCGGTACAAGCAGGATT	191	ETEC H10407
<i>LT</i>	F: GGCGACAAATTATAACCGTGC R: CGGTCTCTATATCCCTGTT	440	
<i>bfpA</i>	F: AATGGTGCTTGCCTTGCTGC R: GCCGCTTTATCCAACCTGGTA	324	EPEC 0127:H6
<i>eaeA</i>	F: GACCCGGCACAAGCATAAGC R: CCACCTGCAGCAACAAGAGG	384	
<i>ipaH</i>	F: GGTATGATGATGATGATGCCA R: GGAGGCCAACAATTATTCC	650	EIEC 95079
<i>aggR*</i>	F: GCCAGTTCAGAAGCAGGAAC R: CGTAAGCCGGGTATGAAAGA	188	EAEC49766 (O?:H10)

Tabla modificada de López et al. (2003) <https://doi.org/10.3201/eid0901.010507>.

*La secuencia del gen *aggR* se diseñó dentro del Laboratorio de Patogenicidad bacteriana del HIMFG-UNAM, tomando como base lo reportado por Acevedo Monroy (2019).

Tabla 3. Condiciones de PCR punto final para la búsqueda de genes de *E. coli* DEC.

<i>Stx1, Stx2, ST y LT</i>		<i>bfpA y eaeA</i>		<i>ipaH</i>		<i>aggR</i>	
T(°C)	Tiempo	T(°C)	Tiempo	T(°C)	Tiempo	T(°C)	Tiempo
95	1 min	95	1 min	95	2 min	45	5 min
95	30 s	95	30 s	95	30 s	95	30 s
50	30s	55	30s	60	30s	52	30s
72	20s	72	20s	72	20s	72	20s
72	7 min	72	7 min	72	7 min	72	7 min
4	Infinito	4	Infinito	4	Infinito	4	Infinito

Identificación de productos de PCR punto final

Para la observación de la amplificación de los productos resultantes de la PCR se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% siguiendo el procedimiento previamente descrito. Para validar los resultados de la PCR punto final se utilizaron las cepas control positivo (C+) (Tabla 2), un control negativo (C-) (ATCC25922) y un blanco (B) que contenía únicamente la mezcla de reacción.

Análisis estadístico

Con base a las variables operacionales descritas (Tabla 4), se clasificó el tipo de ITUR de cada paciente como *reinfección* o *persistencia*, considerando el serotipo de las cepas de cada paciente. Se empleó estadística descriptiva para determinar la frecuencia de genes DEC (*Stx1*, *Stx2*, *LT*, *bfpA*, *eaeA*, *ipaH* y *aggR*) identificados en cada cepa. Así también, se calculó la frecuencia de perfiles de genes DEC encontrados en cada cepa y con ello, se determinó la cantidad de *heteropatotipos* encontrados por cepa, el número de cepas híbridas y el número de pacientes con cepas híbridas. Finalmente se aplicó una prueba de χ^2 (chi-cuadrada) para determinar si existe diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.005$) entre los grupos peITUR y reITUR con base al número de pacientes con cepas híbridas vs aquellos que no, con una confianza del 95% empleando el programa SPSS versión 21.

Tabla 4. Tabla de operacionalización de variables.

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de variable	Unidad de medida
<i>Heteropatotipos</i>	La combinación de virulencia intestinal y extraintestinal en cepas de <i>E. coli</i> (Bizot et al., 2022).	Para fines prácticos, se denomina como “ <i>heteropatotipo</i> ” a aquellas cepas <i>UPECs</i> que presenten uno o más genes <i>DECs</i> tomando como base la definición de Bizot et al. (2022).	Cualitativa nominal dicotómica	Si es <i>heteropatotipo</i> o No es un <i>heteropatotipo</i>
<i>Factores de virulencia DEC</i> s	Factores de adherencia específicos que les permiten colonizar sitios que <i>E. coli</i> normalmente no habita, como el intestino delgado y la uretra (Kaper et al., 2004).	Los <i>factores de virulencia</i> asociados a <i>DECs</i> que se buscan en las cepas <i>UPECs</i> seleccionadas, los cuales son: <i>Stx1</i> , <i>Stx2</i> , <i>ST</i> , <i>LT</i> , <i>aggR</i> , <i>eaeA</i> , <i>bfpA</i> e <i>ipaH</i> .	Cualitativa nominal dicotómica	Presencia o Ausencia del gen

Tabla 4. Tabla de operacionalización de variables (Continuación)

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de variable	Unidad de medida
ITUR	<p><i>Infección del tracto urinario Recurrente</i> (ITUR): Hace referencia a la antes llamada <i>infección del tracto urinario crónica</i> (ITUC) en donde se presenta tres o más ITUs sintomáticas en el plazo de doce meses o bien, cuando se presenta dos o más ITUs sintomáticas en seis meses (Valdevenitom et al., 2018).</p>	<p>Para fines de este proyecto las ITUR se subdividen en dos clasificaciones.</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Reinfección</i> (reITUR): en la que el evento infeccioso es ocasionado cada vez por una cepa de <i>E. coli</i> con un serotipo diferente. • <i>Persistente o recaída</i> (peITUR): se caracteriza por estar ocasionada siempre por una cepa de <i>E. coli</i> del mismo serotipo la cual esta alojada en las células epiteliales del tracto urinario (Abhay, 2013). 	Cualitativa nominal dicotómica	<i>Reinfección o Persistencia</i>

RESULTADOS

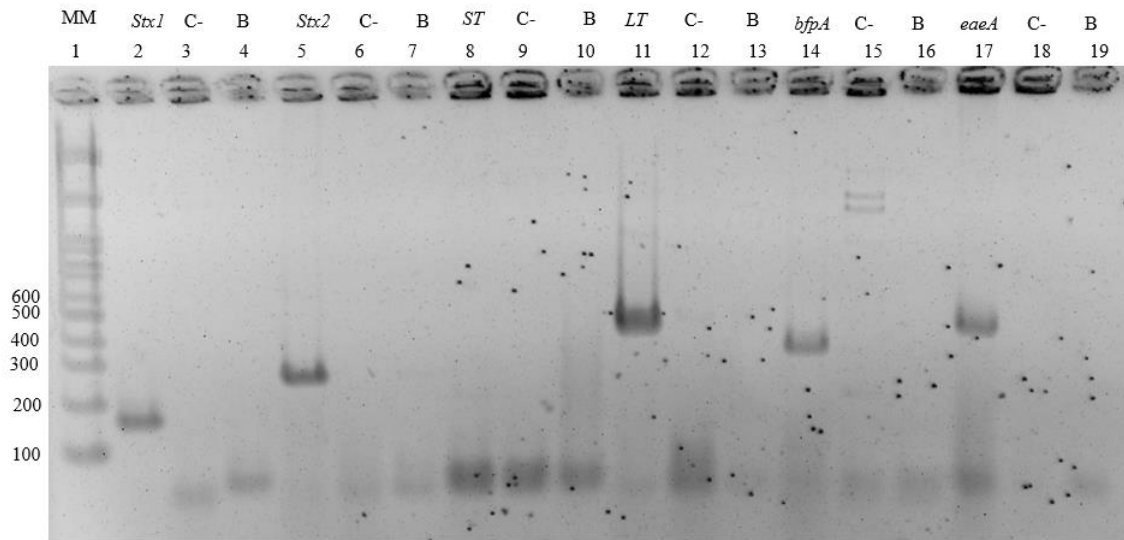
Número de cepas de *E. coli* seleccionadas

De los 50 pacientes inicialmente seleccionados se eliminaron 12 debido a que los aislados de estos no cumplieron con los criterios de inclusión (Figura 2). Finalmente, en el estudio se analizaron 106 cepas de 38 pacientes (25 reITUR y 13 peITUR). Al analizar el número de cepas por tipo de cuadro clínico se identificó que 68 se aislaron de casos con reITUR y 38 con peITUR.

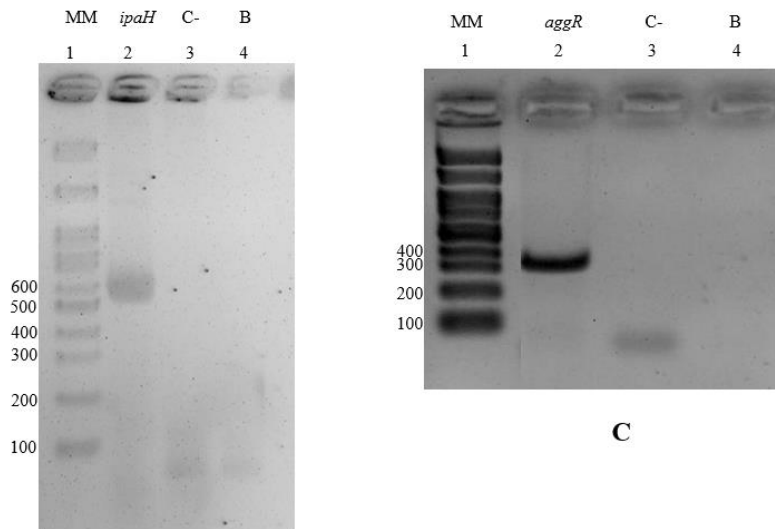
PCR de cepas control

Se realizó la evaluación del procedimiento y de los controles positivos para verificar si los iniciadores correspondientes amplificaban generando el producto del tamaño esperado (Tabla 2).

Los resultados obtenidos con los genes *Stx1*, *Stx2*, *LT*, *bfpA*, *eaeA*, *ipaH* y *aggR* mostraron amplificados de los tamaños esperados (Figura 4: A, B, C), sin embargo, el gen *ST* para la toxina termoestable de ETEC (Figura 4A carriles 8,9,10) no amplificó.



A



B

C

Figura 4. PCR punto final de cepas control positivo para los genes de *E. coli* diarreogénicas (*DEC*). **A**) *Stx1*, *Stx2*, *ST*, *LT*, *bfpA*, *eaeA*; **B**) *ipaH*; **C**) *aggR*. En los carriles 1 de A, B y C, se muestra el marcador de peso molecular (MM) GeneRuler 100bp DNA. Los carriles restantes en **A** (2-19), **B** (2-4) y **C** (2-4), corresponden al amplificado para cada control; C- (control negativo); B (blanco).

Serogrupos de las cepas aisladas de pacientes con reITUR peITUR

Las cepas de *E. coli* productoras de ITUR se caracterizaron por serología (realizada en el laboratorio de patogenicidad de la F. de Medicina, UNAM), al analizar los serogrupos tal y como ha sido señalado previamente, en el caso de las *reinfecciones* son diferentes en cada muestra observando un total de 34 diferentes de 68 cepas (Tabla 5). Con respecto a los pacientes con peITUR el número de serogrupos identificados fue de 10 en 38 cepas.

Tabla 5. Serogrupos de pacientes con reITUR y peITUR.

Tipo de ITUR	Serogrupos UPEC clásicos	Serogrupos no clásicos
peITUR (n= 38)	O25, O16, O22, O75	O76, O178, O1, O9, O?, OR,
reITUR (n= 68)	O25, O16, O75, O6, O8, O7	O11, O14, O17, O19, O20, O23 O49, O44, O48, O57, O73, O76, O85, O100, O101, O102, O125, O130, O147, O148, O153, O159, O166, O170, O174, O49766, O?, OR

OR= Cepa rugosa; O? = Antígeno somático O no identificado.

Frecuencia y tipo de genes DEC identificados en las cepas con *heteropatotipos*

Al hacer el análisis del número de cepas híbridas se observó que 52/ 106 no presentaron genes DEC y las 54 (51%) restantes mostraron entre 1 (33.02%), 2 (14.15%) y hasta 3 (3.77%) genes diferentes.

Con relación a los genes identificados con mayor frecuencia se encontró que *Stx2* (21%) era el más común seguido por *eaeA* (16 %), e *ipaH* y *bfpA* (ambos con 14%), el menos frecuente fue *aggR* (8%).

Para definir los *heteropatotipos* se elaboraron patrones con base a las combinaciones de genes *DEC* identificados (Tabla 6). En el caso de las cepas de pacientes con peITUR se identificaron 4 perfiles (*Stx2+bfpA*, *Stx2+aggR*, *ipaH+ bfpA* e *ipaH+ aggR*). Con relación a las cepas aisladas de pacientes con reITUR se identificaron cinco perfiles (*Stx2+ipaH*, *Stx2+eaeA*, *ipaH+eaeA*, *eaeA+Stx2+ipaH* y *eaeA+bfpA+ipaH*). Únicamente el perfil *eaeA+Stx2+aggR*, se identificó en ambos cuadros clínicos (peITUR/ reITUR). Resulta de interés el hecho de que, en los perfiles de dos y tres genes *Stx2* e *ipaH* fueron los genes que se presentaron con mayor frecuencia, así como *ipaH* que se identificó en 4/5 de los perfiles de pacientes con reITUR, y en 2/4 con peITUR.

Tabla 6. Frecuencia de perfiles de genes *DEC* encontrados en los *heteropatotipos*.

Perfil	peITUR (%)	reITUR (%)	Total de cepas (%)
	(n=38)	(n=68)	(n=106)
Ninguno	18 (47)	34(50)	52(49)
<i>Stx2</i>	4 (11)	6 (9)	10 (9)
<i>bfpA</i>	4 (11)	6 (9)	10 (9)
<i>eaeA</i>	4 (11)	3 (4)	7 (7)
<i>ipaH</i>	1 (3)	3 (4)	4 (4)
<i>aggR</i>	0 (0)	4 (6)	4 (4)
<i>Stx2+aggR</i>	1 (3)	0 (0)	1 (1)
<i>Sxt2+bfpA</i>	2 (5)	0 (0)	2 (2)
<i>Stx2+eaeA</i>	0 (0)	3 (4)	3 (3)
<i>Stx2+ipaH</i>	0 (0)	3 (4)	3 (3)
<i>ipaH+eaeA</i>	0 (0)	3 (4)	3 (3)
<i>ipaH+ bfpA</i>	2 (5)	0 (0)	2 (2)
<i>ipaH+aggR</i>	1 (3)	0 (0)	1 (1)
<i>eaeA+Stx2+aggR</i>	1 (3)	1 (1)	2 (2)
<i>eaeA+Stx2+ipaH</i>	0 (0)	1 (1)	1 (1)
<i>eaeA+bfpA+ipaH</i>	0 (0)	1 (1)	1 (1)

Perfil y número de genes *DEC* identificados en los diferentes pacientes evaluados

El análisis entre cuadro clínico (peITUR-reITUR) y perfil de genes de las cepas híbridas (Tabla 7) permitieron identificar perfiles en pacientes con 1 (37%), 2 (21%) y 3(21%) cepas híbridas.

Con respecto a los pacientes que presentaron solo una cepa híbrida (14/38), se encontraron perfiles con 1, 2 y 3 genes para los 7 (53.85%) pacientes con peITUR: *eaeA*, *Stx2*, *bfpA* (un gen), *bfpA-ipaH* y *bfpA-Stx2* (dos genes) *Stx2- eaeA- aggR* (tres genes). Por otro lado, los siete (28%) pacientes con reITUR, presentaron perfiles con 1 y 3 genes: *Stx2*, *eaeA*, *bfpA*, *aggR* y *Stx2-eaeA-aggR*.

Los perfiles encontrados en pacientes con dos cepas híbridas (8/38) fueron para peITUR: *Stx2-bfpA/ ipaH-aggR* (asociadas al serogrupo O22) y *Stx2/ Stx2* (asociadas a O25). En cambio, los pacientes reITUR presentaron los perfiles *Stx2/ bfpA/aggR*, *eaeA/eaeA-Stx2*, *ipaH/ipaH-eaeA*, *ipaH/aggR* y *bfpA/ eaeA*. Como se puede observar, en ambos casos (peITUR/ reITUR) existen genes que se conservan en algunas cepas como lo es *Stx2* e *ipaH* y otros que no.

En el caso de los pacientes con presencia de tres cepas híbridas, se encontró la misma frecuencia que aquellos que solo tuvieron dos cepas híbridas (8/38), sin embargo, en este caso, se observó una frecuencia mayor de cepas con 2 y 3 genes.

Tabla 7. Pacientes con peITUR y reITUR y perfil de genes *DEC* identificados.

TP(n=30/38)		peITUR (n=12/13)		reITUR (n=18/25)	
Frecuencia		Pacientes	Genes DEC	Pacientes	Genes DEC encontrados por cepa
(%)		(%)	encontrados por cepas	(%)	
1 cepa híbrida	14/38 (37)	7/13 (53.85)	2 <i>eaeA</i> , 1 <i>bfpA</i> , 1 <i>Stx2</i> , 1 <i>bfpA-ipaH</i> , 1 <i>bfpA-Stx2</i> 1 <i>stx2- eaeA- aggR</i>	7/25 (28)	2 <i>Stx2</i> , 2 <i>bfpA</i> , 1 <i>eaeA</i> , 1 <i>aggR</i> y 1 <i>Stx2- eaeA-aggR</i>
2 cepas híbridas	8/38 (21)	2/13 (15.38)	1 <i>Stx2-bfpA/ ipaH-aggR</i> y 1 <i>Stx2/ Stx2</i>	6/25 (24)	1 <i>Stx2/ Stx2</i> , 1 <i>bfpA/aggR</i> , 1 <i>eaeA/eaeA- Stx2</i> , 1 <i>ipaH/ipaH-eaeA</i> , 1 <i>ipaH/aggR</i> , 1 <i>bfpA/ eaeA</i>
3 cepas híbridas	8/38 (21)	3/13 (23.8)	1 <i>ipaH/ eaeA/ Stx2 -aggR</i> , 1 <i>bfpA/ eaeA/ bfpA</i> y 1 <i>bfpA/ Stx2/ bfpA - ipaH</i>	5/25 (20)	1 <i>bfpA/bfpA-eaeA-ipaH/ bfpA</i> , 1 <i>aggR/</i> <i>Stx2-eaeA/ Stx2-eaeA-ipaH</i> , 1 <i>Stx2- eaeA/ Stx2/eaeA-ipaH</i> , 1 <i>eaeA-ipaH/</i> <i>ipaH-Stx2/Stx2</i> y 1 <i>Stx2-ipaH/ipaH/</i> <i>Stx2- ipaH</i>

TP= Total de pacientes

Número de pacientes y tipo de cuadro clínico en los que se identificaron cepas híbridas o Heteropatotipos

De los 38 pacientes que presentaron ITUR, 18% con reITUR 3% con peITUR, no se identificaron cepas híbridas (*Heteropatotipos*), en el resto 79% se identificó la presencia de una a tres cepas híbridas con distintos perfiles (Tabla 7, Figura 5).

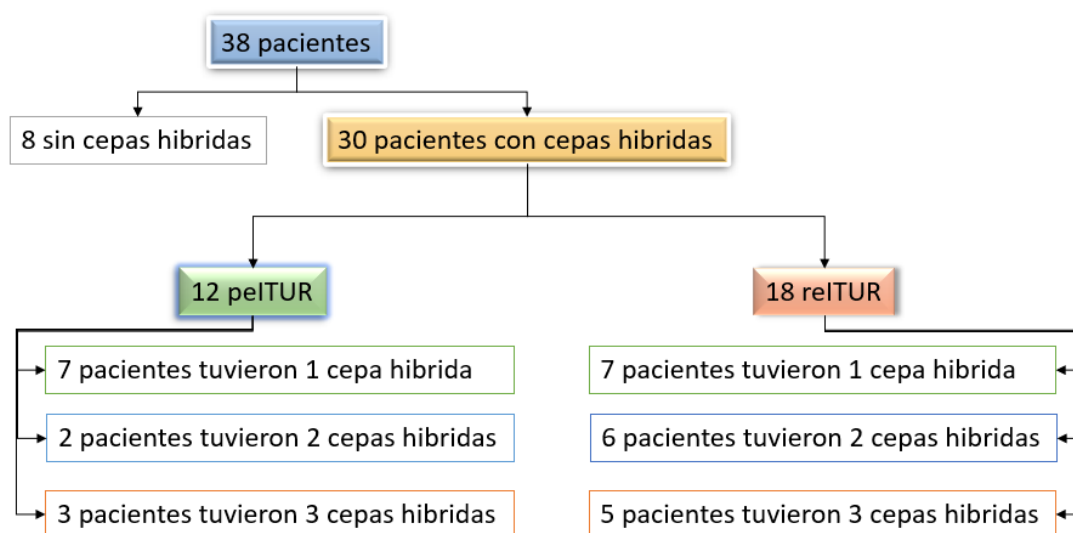


Figura 5. Número de pacientes por cuadro clínico en los que se identificaron 1, 2 y 3 cepas híbridas.

Asociación de heteropatotipos con el tipo de ITUR

De los 38 pacientes con *infección del tracto urinario recurrente* (ITUR), 25 de ellos (66%) se clasificaron como *reinfecciones* (reITUR) y 13 (34%) como *persistencias* (peITUR), reflejando una mayor frecuencia en las reITUR. De estos dos grupos se observó que en el 92% y 72% que presentaban *persistencia* y *reinfección* respectivamente, se identificó al menos una cepa híbrida (Tabla 8).

Tabla 8. Pacientes con reITUR y peITUR con presencia de cepas híbridas.

Grupo	Pacientes con cepas híbridas	Pacientes sin cepas híbridas
Persistencia	12 (92%)	1 (8%)
Recurrencia	18 (72%)	7 (28%)

Al realizar el análisis estadístico al aplicar una prueba de chi- cuadrada, los grupos reITUR y peITUR no mostraron diferencia estadísticamente significativa ($P= 0.2219$).

Dada la alta frecuencia de pacientes que presentaron cepas híbridas (30/38) comparada con aquellos que no (8/38), se realizó un análisis estadístico para evidenciar la diferencia entre ambos, sin embargo, dado el tamaño de la muestra (38 pacientes) este análisis no se pudo realizar por lo que solo se describe la frecuencia de los grupos.

DISCUSIÓN

La emergencia de nuevos patógenos y en particular con *E. coli* bacteria con comportamiento dual (integrante de la biota y patógeno), plantea la importancia de analizar la presencia de cepas híbridas (con genes de virulencia de diferentes patotipos), en nuestro trabajo en aislados obtenidos de pacientes con ITUR. Conocer la existencia de *heteropatotipos* que puedan ser responsables de brotes epidémicos es de gran importancia epidemiológica, tal como fue el caso del *heteropatotipo* Enteroagregativo-Hemorrágico de *E. coli* responsable de brotes de colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico en Alemania y Francia en el 2011 (Bielaszewska et al., 2011). El origen de la cepa de *E. coli* O104:H4 responsable de dicho brote no se logró establecer, aunque, previamente se habían reportado casos aislados de infección por cepas de *E. coli* con el mismo serotipo (Wadl et al., 2011). En los últimos años se han reportado diferentes cepas híbridas de *E. coli* aisladas de pacientes con *Infección del tracto urinario*, en estas bacterias además de los genes relacionados con la patogénesis de las cepas uropatógenas (UPEC), se han identificado genes de cepas diarreogénicas (*DEC*) principalmente del patotipo enteroagregativo (Nascimento et al., 2021; Nascimento et al., 2022; Schüroff et al., 2022). Con el propósito de evaluar si en los aislados de *E. coli* obtenidos de pacientes con ITUR pudiese encontrarse cepas híbridas potenciales responsables de la emergencia de nuevos *heteropatotipos*, fue que en este trabajo se analizó la potencial coexistencia de genes asociados con los *patotipos DEC* y UPEC. Las cepas evaluadas se aislaron durante un estudio prospectivo de seguimiento de niños y adultos con ITUR con mala respuesta al tratamiento con antimicrobianos, en estos pacientes además se analizó la eficiencia de lisados bacterianos autólogos para el control y tratamiento de la ITUR (Ahumada-Cota R. et al., 2020; Hernández-Chiñas U. et al., 2021).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo mostraron que un porcentaje importante de pacientes con ITUR (79%), presentaron cepas híbridas, sin embargo, se observó que no existen diferencias significativas entre los casos peITUR y reITUR (Tabla 8). Esto es de relevancia clínica ya que la mayoría de los pacientes con ITUR tienen la presencia de por lo menos una cepa híbrida lo que implica que posee FV de origen *DEC* adicional a los UPEC.

La existencia de cepas híbridas en ITUR ya había sido evidenciada anteriormente por otros autores. Al respecto, Tanabe et al (2022), en un estudio donde analizaron 112 cepas UPEC aisladas del mismo número de pacientes con *Infecciones de tracto urinario*, reportaron la presencia de 5 (4.5%) cepas híbridas con genes de **EPEC y EAEC**. Por otro lado, Yousefipour et al (2023), analizaron 200 cepas aisladas del mismo número de pacientes con ITU, y encontraron que 42 (21%) de las cepas eran híbridas con el mismo perfil previamente referido (**EPEC/EAEC**). En contraste, Lindstedt et al (2018) observaron una alta frecuencia (93.5%) de cepas *DEC* con FV de UPEC en aislados de materia fecal, lo anterior refuerza la teoría de la *Transferencia horizontal de genes* (THG) entre ambos *patotipos* (DEC/UPEC).

Es importante señalar que en este trabajo se analizaron cepas de pacientes con *Infección del tracto urinario recurrente* (ITUR), a quienes se les realizó seguimiento mensual durante un año, hecho que enriquece las características del material biológico. Al realizar el análisis por cepas en nuestro estudio, se identificó que 54/106 (51%) eran híbridas, este número tan alto observado se atribuye a que se analizó de dos a tres cepas por paciente, aisladas de muestras diferentes. Sin embargo, es importante señalar que, al realizar la comparación por número de pacientes, se encontró que la frecuencia de cepas híbridas por paciente es mayor (79%) a lo reportado por los autores previamente mencionados (Tanabe et al 2022; Yousefipour et al., 2023). La alta frecuencia de pacientes con cepas UPEC/*DEC* aquí encontrada justifica la

realización de más estudios, ya que este fenómeno conduce al surgimiento de cepas híbridas que pudiesen exhibir nuevas estrategias patogénicas.

Es evidente que genes que codifican ciertos *factores de virulencia DEC*, se encuentran entre diferentes patotipos de *E. coli* que no se han asociado tradicionalmente, lo que podría anticipar la aparición de brotes graves causados por estas cepas híbridas. Por lo tanto, se requieren investigaciones adicionales sobre aislamientos de estos *heteropatotipos* para comprender y gestionar de manera más efectiva la propagación de estos patógenos (de Mello Santos et al., 2020). El monitoreo continuo de los aislamientos es crucial para identificar combinaciones nuevas o modificadas de *factores de virulencia* en estas cepas, ya que esto podría proporcionar una alerta temprana sobre cepas emergentes que albergan nuevas combinaciones de esto FV. Estas cepas deben ser estudiadas en detalle para evaluar si también presentan capacidades de virulencia alteradas (Lindstedt et al., 2018).

Estudios similares al nuestro, han realizado la búsqueda de genes *DEC* entre los que destacan *aggR*, *eae*, *bfpB*, *ST*, *LT*, *stx1/2* e *invE*. En estos estudios no se encontró evidencia de la presencia de *ST*, *LT* o *Stx1/2* por otro lado, *aggR* y *eae* han sido los genes reportados con mayor frecuencia en cepas UPEC (Abe et al., 2008; Tanabe et al., 2022; Nascimento et al., 2021; Yousefipour et al., 2023). Al realizar el análisis de la frecuencia entre los genes identificados y lo reportado en la literatura, se observó que *Stx2* fue el gen presente con mayor frecuencia en forma aislada (9%) o en combinación con otros (12%), seguido de *eaeA* (16%). Sin embargo, a diferencia de lo reportado por otros autores (Tanabe et al 2022; Yousefipour et al., 2023), *aggR* fue el gen que con menor frecuencia se identificó en las cepas evaluados por nosotros. Tal hecho nos indica que las condiciones específicas de cada población (características ambientales, tipo de alimentación y hábitos higiénicos) son elementos importantes que influyen en las

propiedades de los microorganismos que colonizan al hospedero.

Otra observación relevante de este estudio fue el hecho de haber identificado la existencia de cepas con *ipaH* que no se había reportado previamente, lo que reveló una combinación interesante de nuevos *heteropatotipos* en nuestras cepas.

El patotipo de *E. coli* enterohemorrágico (**EHEC**) productor de toxina semejante a Shiga (**STEC**), se basa en la presencia simultánea de *Stx* y la isla de patogenicidad (PAI) del locus de borramiento de enterocitos (LEE) para EHEC o en la ausencia de LEE para las cepas definidas como STEC (de Mello et al., 2020). Una observación relevante del estudio fue el hecho de encontrar *Stx2* como el gene identificado con mayor frecuencia, al respecto es importante señalar que al hacer la correlación con los serogrupos identificados en las cepas estudiadas no se encontró ningún serogrupo de los reportados en la literatura (Freedman et al., 2023), relacionados con el patotipo STEC/EHEC (O80, O104, O111, O113, O121 y O145).

En los últimos años se han reportado *patotipos* STEC híbridos con genes EAEC y EPEC de cepas aisladas de heces (de Mello et al., 2020; Abe et al., 2008; Tanabe et al., 2022; Nascimento et al., 2021; Yousefipour et al., 2023).

La presencia o ausencia de un plásmido que posea el gen *bfp* que codifica pili formadores de haces tipo IV define a EPEC como típico (tEPEC) o atípico (aEPEC), respectivamente (Deamur., et al 2021). EPEC posee, al igual que EHEC, el gen *eae* que codifica para la intimina adhesina presente en PAI LEE. Las proteínas codificadas por LEE permiten que EPEC y EHEC formen lesiones de adhesión y borrado (A/E) en los enterocitos (Valiatti et al., 2020). Para efectos del análisis en los *heteropatotipos* encontrados se denominó **tEPEC** a aquella cepa que tenga *bfpA*, **aEPEC** a aquella que contenga *eaeA* y **EPEC** a aquella con ambos genes.

En este estudio se identificaron cepas híbridas con *heteropatotipos* UPEC/STEC (9%),

UPEC/STEC-tEPEC (2%), UPEC/STEC-EIEC (3%), **UPEC/STEC-EAEC** (1%), UPEC/EHEC (3%), **UPEC/EHEC-EAEC** (2%) y UPEC/EHEC-EIEC (1%). Un hallazgo interesante fue encontrar perfiles STEC/EHEC con EIEC que no se ha reportado en estudios similares (Abe et al., 2008; Tanabe et al., 2022; Nascimento et al., 2021; Yousefipour et al., 2023).

Es importante señalar la presencia en las cepas evaluadas de *heteropatotipos* STEC/EHEC con EAEC, la observación es relevante ya que este perfil ha sido previamente detectado y documentado en brotes significativos, como el ocurrido en Alemania y otras partes del mundo asociado al síndrome urémico hemolítico (SUH), en el cual no se identificó la fuente potencial de transmisión de la cepa O104:H4 STX2/EAEC (Bielaszewska et al., 2011; de Mello et al., 2020). En el estudio los serotipos vinculados con el *heteropatotipo* EHEC/EAEC fueron **O25:H4** y **O8:H19** y **OR:H-** para STEC/EAEC.

El análisis entre serogrupos y *heteropatotipos* **reveló** serogrupos relacionados con EPEC (O153, O76 y O85), asociados con la presencia de *bfpA* y *eaeA* (Denamur et al., 2021), sin embargo, solo los serogrupos O76 y O85 presentaban perfil **tEPEC/UPEC** y **aEPEC/UPEC** respectivamente. Adicional a estos perfiles, se encontraron *heteropatotipos* que incluían *Stx2*, *ipaH* y uno con *aggR* resaltando un mayor número de *heteropatotipos* formados con aEPEC.

Un estudio realizado por Valiatti et al (2020) evidencio que un aislado híbrido aEPEC/UPEC-252 (serotipo O71:H40) alberga los 41 genes de la región LEE y demostró que la región LEE, presente en aislados de *E. coli* obtenidos de sitios extraintestinales, puede ser funcional, por lo que resulta interesante que *eaeA* haya sido el gen con mayor frecuencia (16%) encontrado en las cepas híbridas después de *Stx2*. Sin embargo, aún no se ha determinado si las proteínas codificadas por genes de la región LEE contribuyen al establecimiento o agravamiento

de las *infecciones urinarias*.

Selasi et al (2019) señala que hace aproximadamente 100 años, el híbrido STEC/UPEC surgió tras la inserción del profago que alberga *Stx* en el cromosoma, seguido de la inserción de genes (*hlyA*, *cnf1*, *hek* y *pap*) codificados en una isla de patogenicidad (PAI) similar a la PAI II de la cepa 536 de UPEC (PAI II_{536-like}), sentando así las bases para la adquisición de los genes de virulencia *DEC* y *UPEC*. Con el conjunto de observaciones referidas se refuerza la teoría del surgimiento de las cepas híbridas UPEC mediada por THG.

Los *heteropatotipos* identificados en este estudio sugieren la presencia de cepas híbridas con genes UPEC y STEC con la capacidad de codificar citotoxinas que inhiben la síntesis de proteínas en células eucariotas (Karch et al., 2005). Además, se encontraron otras cepas con genes EPEC con la capacidad para inducir lesiones de adhesión y borramiento (de Mello et al., 2020), otras más con habilidad para invadir células (Schroeder et al., 2008) y otras relacionadas con la adherencia agregativa (Schüroff et al., 2022). Los resultados obtenidos dan la pauta para estudiar la expresión de los genes identificados en las cepas UPEC híbridas, con el propósito de conocer su relevancia en la patogénesis de ITUR y a la vez proponer alternativas para el control y tratamiento de las infecciones en la población afectada.

Con relación al patotipo EIEC este se caracteriza por tener un mecanismo de patogenicidad similar a *Shigella spp.* Todas las proteínas efectoras necesarias descritas hasta ahora se transportan en un plásmido de virulencia de 140-MDa (pInv). La identificación de EIEC se basa en la presencia del regulador intermediario *InvE* de las proteínas Ipa que se localiza en pInv. (Müller et al., 2007). El gen *ipaH*, presente en el pInv y en el cromosoma, es multicopia (4-10 copias en total), siendo útil para la identificación incluso en cepas sin plásmidos o con deleciones significativas (van den Beld et al., 2012)

En el análisis de los serogrupos y los *heteropatotipos*, se identificó el serogrupo O159 asociado a EIEC, sin presencia de genes de virulencia *DEC* en esa cepa específica.

Haciendo el análisis por pacientes se observó que 39% (15/38) presentaban cepas con *heteropatotipos* que involucraban *ipaH*, siendo este el segundo gen *DEC* más frecuente encontrado en pacientes después de *Stx2*.

Al definir los *heteropatotipos* que incluían *ipaH*, se observó que estos eran exclusivos para cada grupo (peITUR-reITUR), siendo el perfil UPEC/EIEC el único presente en ambos (3% y 4%). Los *heteropatotipos* encontrados incluyeron combinaciones como UPEC/EIEC-tEPEC (5%) y UPEC/EIEC-EAEC (3%) en peITUR, y UPEC/EIEC-STEC (4%), UPEC/EIEC-aEPEC (4%), UPEC/EIEC-EHEC (1%) y UPEC/EIEC-EPEC (1%) en reITUR.

En cuanto a lo aquí encontrado, resalta el hecho de que la mayoría de los *heteropatotipos* con *ipaH* presentan asociaciones principalmente con *eaeA* y *bfpA* ya que la combinación de estos FV, en especial de *ipaH*, pudiese favorecer las *persistencias* al adquirir la capacidad de permanecer intracelularmente y la capacidad de provocar daño al enterocito mediante la inducción de una lesión A/E (Croxen et al., 2013).

Aunque ya se han reportado cepas híbridas UPEC/EPEC, UPEC/EAEC y EHEC/EAEC (Abe et al., 2008), no hay información sobre híbridos EIEC en la literatura.

La frecuencia elevada del gen *ipaH* en pacientes y los *heteropatotipos* identificados en cada grupo clínico sugieren la necesidad de evaluar la presencia y expresión de este gen en cepas UPEC, así como su posible papel en la patogenia de las ITUR. También se plantea la posibilidad de implementar un ensayo rápido (PCR) para analizar perfiles específicos de cada tipo clínico y discernir entre *persistencia* y *reinfección* en casos de *E. coli*.

Se identificó una amplia gama de *heteropatotipos* UPEC/DEC, atribuible a la

flexibilidad genómica de *E. coli* y a los procesos implicados en la *transferencia horizontal de genes*. Se tiene conocimiento de que ciertos aislados de EPEC, STEC y EHEC pueden transformarse entre sí al perder o adquirir el bacteriófago codificante de *Stx* lo que podría explicar los *heteropatotipos* encontrados con estas combinaciones en cepas híbridas UPEC. También se plantea la posibilidad de que cepas UPEC haya admitido LEE PAI relacionado con el gen *eae* y el plásmido EIEC para *ipaH* (Yousefipour et al., 2023).

La combinación de genes DEC analizados (Tabla 6) en los dos tipos clínicos de nuestros pacientes, *Stx2-bfpA*, *Stx2-aggR*, *ipaH-bfpA* e *ipaH-aggR* para los casos de **peITUR** y *Stx2-ipaH*, *Stx2-eaeA*, *ipaH-eaeA* y *eaeA-Stx2-ipaH* para **reITUR**, sugiere la posibilidad de implementar un ensayo rápido (PCR), para evaluar los perfiles específicos de cada tipo clínico y por un lado definir si se trata de una infección aguda o de un proceso *recurrente*. Con esto se podrían implementar tratamientos más dirigidos a cada cuadro clínico, así como medidas para controlar las ITU. Aun así, se requiere realizar más estudios similares para estudiar a profundidad y sobre todo, evaluar la prevalencia de estas cepas híbridas y *heteropatotipos*.

Al tratar de definir la asociación entre los *heteropatotipos* encontrados y las *recurrencias*, se realizó una prueba de chi cuadrada para comparar los grupos peITUR vs reITUR con la frecuencia de *heteropatotipos* por paciente (Tabla 8), los resultados al respecto no mostraron diferencia estadísticamente significativa (P= 0.2219). Lo anterior muy probablemente debido a que el tamaño en las proporciones entre peITUR y reITUR no era equivalente debido al tamaño de la muestra.

CONCLUSIÓN

Se identificó la presencia de *heteropatotipos* mediante la caracterización molecular de cepas de *Escherichia coli* a partir de aislados de pacientes ITUR. La presencia de genes asociados con la virulencia de cepas *DEC* en cepas de *E. coli* aisladas de ITUR confirma la capacidad de la bacteria para adquirir información genética por vía horizontal y dar origen a cepas híbridas responsables de cuadros de reITUR y peITUR.

REFERENCIAS

Abe, M. C., Salvador, A. F., Falsetti, N. I., Vieira, A. M. M., Blanco, J., Blanco, E. J., Blanco, M., Machado, M. O. A., Elías, P. W., Hernández, T. R., & Gomes, A. T. T. (2008). Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) strains may carry virulence properties of diarrhoeagenic *E. coli*, *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, Volume 52, Issue 3, April 2008, Pages 397–406, <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2008.00388.x>

Abhay, R. (2013) Urinary tract infection: clinical perspectives on urinary tract infection. Springer London Heidelberg New York Dordrecht ISBN 978-1-4471-4708-4 ISBN 978-1-4471-4709-1 (eBook) páginas 1-89: DOI 10.1007/978-1-4471-4709-1

Acevedo Monroy, S.E. (2019). Detección molecular de *salmonella spp.*, *Campylobacter spp.* y *Escherichia coli* diarrogénica a partir de huevo. [Tesis de Maestría, Universidad Nacional Autónoma de México]. <http://132.248.9.195/ptd2019/mayo/0789061/Index.html>

Acevedo-Monroy, S.E., Méndez-alemán, J.M., Castro-Mendoza, I. et al (2022). Use of a recombinant positive control in the diagnostic of canine Ehrlichiosis from 16sRNA gen of Ehrlichia canis in Mexico City. *Arch Microbiol* 204, 616 (2022). <https://doi.org/10.1007/s00203-022-03227-8>

Ahumada Cota, R. E., Olalde Ramírez, S., Hernández Chiñas, U., Acevedo Monroy, S. E. & Eslava Campos C. A. (2022). Infecciones del tracto urinario en México, un problema de salud pública. *Revista Tendencias en Docencia e Investigación en Química*. Año 8. Número 8. ISSN 2448-6663 páginas 728-734. <http://hdl.handle.net/11191/9630>

Ahumada, C. R. E., Hernández, C. U., Milián, S. F., Chávez, B. M. E., Navarro, O. A., Martínez, G. D., Patiño, L. G., Salazar, J., E. P., & Eslava, C. A. (2020). Effect and Analysis of Bacterial Lysates for the Treatment of Recurrent Urinary Tract Infections in Adults. *Pathogens*, 9(2), 102. <https://doi.org/10.3390/pathogens9020102>

Bielaszewska, M., Mallman, A., Zhang, W., Köck, R., Fruth, A., Bauwens, A., Peters, G., & Karch, H. (2011). Characterization of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of

hemolytic uraemic syndrome in Germany *Lancet Infect Dis* 2011;11:1967-1976. doi:10.1016/S1473-3099(11)70165-7.

Bizot, E., Cointe, A., Smadja, N., Sergentet, D., Lefèvre, S., Weill, F. X., Levy, C., Cohen, R., Mariani-Kurkdjian, P., & Bonacorsi, S. (2022). Improved Molecular Diagnosis and Culture of the Emerging Heteropathotype Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O80:H2 Using Its Non-Melibiose-Fermenting and Antibiotic-Resistance Properties. *Journal of clinical microbiology*, 60(1), e0153021. <https://doi.org/10.1128/JCM.01530-21>

Brody Jonathan, R. & Kern Scott, E. (2004). Sodium boric acid: a Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. *The Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD, USA Biotechniques* 36:214-216.

Calderón Jaimes, E., Casanova Román, G., Galindo Fraga, A., Gutiérrez Escoto, P., Landa Juárez, S., Moreno Espinosa, S., Rodríguez Covarrubias, F., Simón Pereira, L., & Valdez Vázquez, R. (2013). Diagnóstico y tratamiento de las infecciones en vías urinarias: un enfoque multidisciplinario para casos no complicados. *Boletín médico del Hospital Infantil de México*, 70(1), 03-10. Recuperado en 14 de agosto de 2023, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S166511462013000100003&lng=es&tln g=es.

Chafla Martínez, P. J., Gonzalo Cerón, P. E., & Ortiz Zayas, E. (2018). Infecciones del tracto urinario. Revisión bibliográfica (Urinary tract infections. Literature review). *La Ciencia al Servicio de la Salud y la Nutrición* (abril 2018) Vol. 9 Núm. 1. Facultad de Salud. Recuperado el 13 de agosto del 2023 de: <https://docs.bvsalud.org/biblioref/2019/03/981829/4.pdf>

Croxen, M. A., Law, R. J., Scholz, R., Keeney, K. M., Wlodarska, M., & Finlay, B. B. (2013). Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical microbiology reviews*, 26(4), 822–880. <https://doi.org/10.1128/CMR.00022-13>

da Silva, L. C., de Mello Santos, A. C., & Silva, R. M. (2017). Uropathogenic *Escherichia coli*

pathogenicity islands and other ExPEC virulence genes may contribute to the genome variability of enteroinvasive *E. coli*. BMC microbiology, 17(1), 68. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-0979-5>

de Mello Santos, A. C., Fernandes Santos, F., María Silva, R., & Aparecida Tardelli Gomes, T. (2020) Disciplina de Microbiología, Departamento de Microb (2020). Diversity of hybrid- and hetero-pathogenic *Escherichia coli* and their potential implication in more severe diseases. Rev. Front Cell Infect Microbiol 2020; 10:339. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00339>

Denamur E., Clermont, O., Bonacorsi, S., Gordonet, D. et al., (2021). The population genetics of pathogenic *Escherichia coli* Nat. Rev. Microbiol., 19 (1) (2021), pp. 37-54. <https://www.nature.com/articles/s41579-020-0416-x>

Dirección General de Epidemiología (2022). Veinte principales causas de enfermedad Nacional, por grupos de edad de los Estados Unidos Mexicanos 2022. Población General. https://epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/2022/principales/nacional/grupo_edad.pdf

Echevarría Zarate, J., Sarmiento Aguilar, E., & Osoreo Plenge, F. (2006). Infección del tracto urinario y manejo antibiótico. Acta Médica Peruana, 23(1), 26-31. Recuperado en 17 de agosto de 2023, de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1728-59172006000100006&lng=es&tlng=es.

Eslava, C. A., García, F., Czczulin, J.R., Henderson, I., Cravioto, Al., & Nataro, J.P.. (1998). *Escherichia coli* plasmid pO42 Pet precursor (pet) gene, complete cds.

Freedman, S. B., van de Kar, N. C. A. J., & Tarr, P. I. (2023). Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* and the Hemolytic-Uremic Syndrome. The New England journal of medicine, 389(15), 1402–1414. <https://doi.org/10.1056/NEJMra2108739>

Gati, N. S., Temme, I. J., Middendorf, B. B., Kehl, A., Dobrindt, U., & Mellmann, A. (2021) Comparative phenotypic characterization of hybrid Shiga toxin-producing / uropathogenic *Escherichia coli*, canonical uropathogenic and Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. Rev. International Journal of Medical Microbiology, Volume 311, Issue 7, ISSN 1438-4221,

<https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2021.151533>

Grigoryan, L., Mulgirigama, A., Powell, M. et al. (2022) The emotional impact of urinary tract infections in women: a qualitative analysis. *BMC Women's Health* 22, 182 (2022). <https://doi.org/10.1186/s12905-022-01757-3>

Guía de Práctica Clínica sobre Infección del Tracto Urinario en la Población Pediátrica (2011). Plan de Calidad para el Sistema Nacional de Salud del Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad. Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud; 2011. Guías de Práctica Clínica en el SNS: I+CS No 2009/01. Recuperado de: https://portal.guiasalud.es/wp-content/uploads/2019/01/GPC_483_ITU_poblacion_pediatica_ICS_compl_modif.pdf

Henderson, I., Czeczulin, J., Eslava, C. A., Noriega, F., & Nataro, J. (1999). Characterization of Pic, a Secreted Protease of *Shigella flexneri* and Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*. 67. 10.1128/IAI.67.11.5587-5596.1999.

Hernandez, C. U., Ahumada, C. R.E., Navarro, A., Chavez, B. Ma. E., Molina, L. J., Rocha, R. L. M., Navarro, C. A. del P., Eslava, C. A. (2023) [Rev] Phenotypic and genotypic characteristics of *Escherichia coli* strains isolated during a longitudinal follow-up study of chronic urinary tract infections. *Journal Frontiers*.

Hernández, C. U., Chávez, B. M. E., Ahumada, C. R. E., Navarro, O. A., Rocha, R. L. M., Pérez, del M., Y., Alvarado, C. M., Pérez, S. G., León, A. L. A., Acevedo, M. S. E., Esquiliano, D., Raya, R. A. M., & Eslava, C. A. (2021). Prospective Study in Children with Complicated Urinary Tract Infection Treated with Autologous Bacterial Lysates. *Microorganisms*, 9(9), 1811. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9091811>

Josephs Spaulding, J., Krogh, T. J., Rettig, H. C., Lyng, M., Chkonia, M., Waschina, S., Graspeuntner, S., Rupp, J., Møller Jensen, J., & Kaleta, C. (2021). Recurrent Urinary Tract Infections: Unraveling the Complicated Environment of Uncomplicated rUTIs. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 11, 562525. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.562525>

Kaper James, B., Nataro James, P., & Mobley Harry, L. T. (2004) Pathogenic *Escherichia coli*. Rev. nature reviews. microbiology, volume 2, February 2004. 123-138. doi:10.1038/nrmicro818

Karch, H.; Tarr, P.I.; Bielaszewska, M. Escherichia coli enterohemorrágica en medicina humana. Int. J. Med. Microbiol. 2005, 295, 405–418

Lara, B. M. F., Nery, R. D., de Oliveira, M. P., Araujo, L. M., Carvalho, R. Q. F., Messias-Silva, C. F. E., Ferreira, B. L., Junior, F. C. & Pereira, L. A. (2017). Virulence Markers and Phylogenetic Analysis of Escherichia coli Strains with Hybrid EAEC/UPEC Genotypes Recovered from Sporadic Cases of Extraintestinal Infections. Frontiers in Microbiology, February 2017. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00146

Lindstedt, BA., Finton, M.D., Porcellato, D. et al. (2018) High frequency of hybrid Escherichia coli strains with combined Intestinal Pathogenic Escherichia coli (DEC) and Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli (ExPEC) virulence factors isolated from human faecal samples. BMC Infect Dis 18, 544 (2018). <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3449-2>

Lloyd, A. L., Rasko, D. A., & Mobley, H. L. (2007). Defining genomic islands and uropathogen-specific genes in uropathogenic *Escherichia coli*. Journal of bacteriology, 189(9), 3532–3546. <https://doi.org/10.1128/JB.01744-068/IAI.67.6.2692-2699.1999>. PMID: 10338471

López Saucedo, C., Cerna, J. F., Villegas Sepúlveda, N., Thompson, R., Velázquez, F. R., Torres, J. & Estrada García, T. (2003). Single Multiplex Polymerase Chain Reaction to detect diverse Loci associated with Diarrheagenic *Escherichia coli*. Emerging Infectious Diseases, 9(1), 127-131. <https://doi.org/10.3201/eid0901.010507>

Luna Pineda, V. M., Ochoa, S., Cruz Córdova, A., Cázares Domínguez, V., Vélez González, F., Hernández Castro, R., & Xicohtencatl Cortes, J. (2017). Infecciones del tracto urinario, inmunidad y vacunación. Boletín Médico del Hospital Infantil de México. PERMANYER. páginas 67-78. <https://doi.org/10.24875/BMHIM.M18000011>

Michelacci, V., Prosseda, G., Maugliani, A., Tozzoli, R., Sánchez, S., Herrera-León, S., et al.

(2016). Caracterización de un clon emergente de *Escherichia coli* enteroinvasiva circulante en Europa. *Clin. Microbiol. Infectar.* 22: E11–9. Doi: 10.1016/j.cmi.2015.10.025

Michelacci, V., Tozzoli, R., Arancia, S., D'Angelo, A., Boni, A., Knijn, A., Prosseda, G., Greig, D. R., Jenkins, C., Camou, T., Sirok, A., Navarro, A., Schelotto, F., Varela, G., & Morabito, S. (2020) Tracing Back the Evolutionary Route of Enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) and *Shigella* Through the Example of the Highly Pathogenic O96:H19 EIEC Clone. *JOURNAL=Frontiers in Cellular and Infection Microbiology.* V10. ISSN=2235-2988. DOI=10.3389/fcimb.2020.00260

Middendorf, B., Hochhut, B., Leipold, K., Dobrindt, U., Blum-Oehler, G., & Hacker, J. (2004). Instability of pathogenicity islands in uropathogenic *Escherichia coli* 536. *Journal of bacteriology*, 186(10), 3086–3096. <https://doi.org/10.1128/JB.186.10.3086-3096.2004>

Momtaz, H., Karimian, A., Madani, M., Safarpour Dehkordi, F., Ranjbar, R., Sarshar, M., & Souod, N. (2013). Uropathogenic *Escherichia coli* in Iran: serogroup distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 12, 8. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-12-8>

Müller, D., Greune, L., Heusipp, G., Karch, H., Fruth, A., Tschäpe, H., & Schmidt, M. A. (2007). Identification of Unconventional Intestinal Pathogenic *Escherichia coli* Isolates Expressing Intermediate Virulence Factor Profiles by Using a Novel Single-Step Multiplex PCR. *Applied and Environmental Microbiology.* Journal Article. pg. 3380-3390 V (73) Doi: 10.1128/AEM.02855-06

Murray Benjamin, O., Flores, O., Williams, C., Flusberg, D. A., Marr, E. E., Kwiatkowska, K. M., Charest, J. L., Isenberg, B. C., & Rohn, J. L. (2021) Recurrent Urinary Tract Infection: A Mystery in Search of Better Model Systems. *Rev. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology.* Vol 11. ISSN: 2235-2988. páginas 1-29. DOI:10.3389/fcimb.2021.691210

Naber, K. G., Tirán-Saucedo, J., Wagenlehner, F. M. E., & RECAP group (2022). Psychosocial burden of recurrent uncomplicated urinary tract infections. *GMS infectious diseases*, 10, Doc01. <https://doi.org/10.3205/id000078>

Nascimento, J. A. S., Santos, F. F., Santos-Neto, J. F., Trovão, L. O., Valiatti, T. B., Pinaffi, I. C., Vieira, M. A. M., Silva, R. M., Falsetti, I. N., Santos, A. C. M., & Gomes, T. A. T. (2022). Molecular Epidemiology and Presence of Hybrid Pathogenic *Escherichia coli* among Isolates from Community-Acquired Urinary Tract Infection. *Microorganisms*, 10(2), 302. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020302>

Nascimento, J. A. S., Santos, F. F., Valiatti, T. B., Santos-Neto, J. F., M. Santos, A. C., Cayô, R., Gales, A. C., & A. T. Gomes, T. (2021). Frequency and Diversity of Hybrid *Escherichia coli* Strains Isolated from Urinary Tract Infections. *Microorganisms*, 9(4), 693. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040693>

Ogura, Y., Gotoh, Y., Itoh, T., Sato, M. P., Seto, K., Yoshino, S., Isobe, J., Etoh, Y., Kurogi, M., Kimata, K., Maeda, E., Piérard, D., Kusumoto, M., Akiba, M., Tominaga, K., Kirino, Y., Kato, Y., Shirahige, K., Ooka, T., Ishijima, N., ... Hayashi, T. (2017). Population structure of *Escherichia coli* O26:H11 with recent and repeated stx2 acquisition in multiple lineages. *Microbial genomics*, 3(11), e000141. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000141>

Peirano, V., Bianco, M. N., Navarro, A., Schelotto, F., y Varela, G. (2018). *Escherichia coli* diarreicagénica asociada a gastroenteritis aguda en niños de Soriano, Uruguay. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* 2018:8387218. Doi: 10.1155/2018/8387218

Pettengill, E. A., Hoffmann, M., Binet, R., Roberts, R. J., Payne, J., Allard, M., et al. (2015). Secuencia completa del genoma de *Escherichia coli* O96:H19 enteroinvasiva asociada a un brote grave transmitido por los alimentos. Anuncio del genoma. 3: E00883–15. doi: 10.1128/genomaA.00883-15

Pigrau, C., & Escolà-Vergé, L. (2020). Infecciones urinarias recurrentes: desde la patogenia a las estrategias de prevención. *Medicina clínica*. Doi: 10.1016/j.medcli.2020.04.026

Pitcher, D. G., Saunders, N. A., Slowen, R. J. (1989). Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Letters in Applied Microbiology* 8, 151-156.

Plan Universitario de Control de la Resistencia Antimicrobiana (PUCRA). (2022) Resistencia

antimicrobiana en México 2017 a 2020. Reporte de los hospitales de la Red PUCRA: Resistencia antimicrobiana y consumo de antibióticos. Ciudad de México, julio 2022.

Prieto, A., Bernabeu, M., Sánchez-Herrero, J.F. et al. (2021) Modulation of AggR levels reveals features of virulence regulation in enteroaggregative *E. coli*. *Commun Biol* 4, 1295 (2021). <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02820-9>.

Priyanka, P., Meena, P. R., Raj, D., Rana, A., Dhanokar, A., Duggirala, K. S., & Singh, A. P. (2023). Urinary tract infection and sepsis causing potential of multidrug-resistant Extraintestinal pathogenic *E. coli* isolated from plant-origin foods. *International journal of food microbiology*, 386, 110048. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.110048>

Raeispour, M., & Ranjbar, R. (2018). Antibiotic resistance, virulence factors and genotyping of Uropathogenic *Escherichia coli* strains. *Antimicrobial resistance and infection control*, 7, 118. <https://doi.org/10.1186/s13756-018-0411-4>

Ramírez, F., Exeni, A., Alconcher, L., Coccia, P., García Chervo, L., Suarez, Á., Martín, S., Caminiti, A., Santiago, A., et al. (2022). Guía para el diagnóstico, estudio y tratamiento de la infección urinaria: actualización 2022 [Clinical practice guideline for the diagnosis and management of urinary tract infections: 2022 update]. *Archivos argentinos de pediatría*, 120(5), S69–S87. <https://doi.org/10.5546/aap.2022.S69>

Rasko D.A., Webster D.R., Sahl J.W., Bashir A., Boisen N., Scheutz, F., Paxinos, E.E., Sebra R., C.-S. Chin, D. Iliopoulos, A. Klammer, P. Peluso, L. Lee, A.O. Kislyuk, J. Bullard, A. Kasarskis, S. Wang, J. Eid, D. Rank, J.C. Redman, S.R. Steyert, J. Frimodt-Møller, C. Struve, A.M. Petersen, K.A. Krogfelt, J.P. Nataro, E.E. & Schadt, M.K. (2011). Origins of the *E. Coli* strain causing an outbreak of hemolytic–Uremic syndrome in Germany. *Rev. N. Engl. J. Med.*, 365 (2011), pp. 709-717, DOI: 10.1056/NEJMoa1106920

Reyes, R. N. E., Barba, L. J., Navarro, O. A., Vega, S. V., Gómez, De A. F. R., Talavera, G. J. M., & Talavera, R. M. (2020). Serotypes and Stx2 subtyping of Shiga toxin producing *Escherichia coli*

isolates from cattle carcasses and feces. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 11(4), 1030-1044. Epub 02 de marzo de 2021. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v11i4.5049>

RHOVE (2022). Boletín Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud. Panorama epidemiológico de las infecciones asociadas a la atención de la salud (iaas), Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE). Septiembre, 2022. página 14. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/773554/BOLET_N_RHOVE_SEPTIEMBRE_2022_Final_31102022.pdf

Riley L. W. (2020). Distinguishing Pathovars from Nonpathovars: *Escherichia coli*. *Microbiology spectrum*, 8(4), 10.1128/microbiolspec.AME-0014-2020. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.AME-0014-2020>

Rodríguez Angeles, G. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pública de México*, 44(5), 464-475. Recuperado en 16 de agosto de 2023, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342002000500011&lng=es&tlng=es.

Santomil Ponte, Ma. del C., González Veiga, E. J., Mayán Tobada. A., Rodríguez Romero, E., & Nieto Pol, E. (2023). Infecciones del tracto urinario de repetición, *FMC - Formación Médica Continuada en Atención Primaria*, Volume 30, Issue 2., Pages 90-96, ISSN 1134-2072, <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1134207222002584>

Scheutz, F., Moller N. E., Frimodt M., J., Boisen, N., Morabito, S., Tozzoli, R., Nataro, J.P. & Caprioli, A. (2011). Characteristics of the enteroaggregative Shiga toxin/verotoxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 strain causing the outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, May to June 2011. *Euro surveillance: bulletin européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 16. 10.2807/ese.16.24.19889-en.

Schroeder, G. N., & Hilbi, H. (2008). Molecular pathogenesis of *Shigella* spp.: controlling host cell signaling, invasion, and death by type III secretion. *Clinical microbiology reviews*, 21(1), 134–156.

<https://doi.org/10.1128/CMR.00032-07>

Schüroff, A. P., Abe, M. C., Silva, W. J., Cidéli de Paula Coelho., Andrade, B. F., Hernandes, T. R., Dobrindt, U., Gomes, T. T. A & Elias, P. W. (2022) Role of aggregate-forming pilus (AFP) in adherence and colonization of both intestinal and urinary tracts. *Virulence* 13:1, pages 1423-1433.

Schüroff, A. P., Abe, M. C., Silva, W. J., Coelho, de P. C., Andrade, B. F., Hernández, T. R., Dobrindt, U., Gomes, A. T. T., & Elías. P.W. (2022) Role of aggregate-forming pilus (AFP) in adherence and colonization of both intestinal and urinary tracts. *Virulence* 13:1, pages 1423-1433.

Selasi, N. G., Middendorf, B. B., Bletz, S., Dobrindt, U., Mellmann, A. (2019) Origin and Evolution of Hybrid Shiga Toxin-Producing and Uropathogenic *Escherichia coli* Strains of Sequence Type 141. *Journal of Clinical Microbiology*. V.58., N. 1., DOI: 10.1128/jcm.01309-19

Sihra, N., Goodman, A., Zakri, R. et al (2018). Nonantibiotic prevention and management of recurrent urinary tract infection. *Nat Rev. Urol* 15, 750–776 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41585-018-0106-x>

Smith, J. L., Fratamico P. M., & Gunther N. W. (2014). Chapter Three - Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Advances in Applied Microbiology*, Academic Press, Volume 86,2014, Pages 145-197.<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800262-9.00003-2>.

Tanabe, R.H.S.; Dias, R.C.B.; Orsi, H.; de Lira, D.R.P.; Vieira, M.A.; dos Santos, L.F.; Ferreira, A.M.; Rall, V.L.M.; Mondelli, A.L.; Gomes, T.A.T.; et al. (2022) Characterization of Uropathogenic *Escherichia coli* Reveals Hybrid Isolates of Uropathogenic and Diarrheagenic (UPEC/DEC) *E. coli*. *Microorganisms* 2022, 10, 645. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10030645>

Terlizzi, M., Gribaudo, G., & Maffei, M. (2017). UroPathogenic *Escherichia coli* (UPEC) Infections: Virulence Factors, Bladder Responses, Antibiotic, and Non-antibiotic Antimicrobial Strategies. *Frontiers in Microbiology*. Doi: 8. 1566. 10.3389/fmicb.2017.01566.

Valdevenitom, J. P., &Álvarez, D. (2018) Infección urinaria recurrente en la mujer (Recurrent urinary tract infection in women). *Revista Médica Clínica Las Condes*. Vol. 29. Núm. 2 páginas 222-

231 (marzo - abril 2018) DOI: 10.1016/j.rmcl.2018.02.010

Valiatti, T. B., Santos, F. F., Santos, A. C. M., Nascimento, J. A. S., Silva, R. M., Carvalho, E., Sinigaglia, R., & Gomes, T. A. T. (2020). Genetic and Virulence Characteristics of a Hybrid Atypical Enteropathogenic and Uropathogenic *Escherichia coli* (aEPEC/UPEC) Strain. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 10, 492. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00492>

van den Beld, M. J., & Reubsæet, F. A. (2012). Differentiation between *Shigella*, enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) and noninvasive *Escherichia coli*. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 31(6), 899–904. <https://doi.org/10.1007/s10096-011-1395-7>

Vidal, J. E., Canizález Román, A., Gutiérrez Jiménez, J., & Navarro García, F. (2007). Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatógena. *Salud Pública de México*, 49(5), 376-386. Recuperado en 06 de septiembre de 2023, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S003636342007000500008&lng=es&tln g=es.

Wadl, M., Rieck, T., Nachtnebel, M., et al. (2011) Enhanced surveillance during a large outbreak of bloody diarrhoea and haemolytic uraemic syndrome caused by Shiga toxin/verotoxin-producing *Escherichia coli* in Germany, May to June 2011. *Euro Surveill* 2011; 16:19893-19893

Yang, X., Chen, H., Zheng, Yue Q. S., Wang, H., & Yi, F. (2022). Disease burden and long-term trends of urinary tract infections: A worldwide report. *Rev. Front. Public Health*, 27 July 2022. *Sec. Infectious Diseases: Epidemiology and Prevention*. SN Volume 10. SN 2296-2565 <https://doi.org/10.3389/fpubh.2022.888205>

Yousefipour, M., Elham Rezatofghi, S., & Roayaei Ardakani, M. (2023) Detection and characterization of hybrid uropathogenic *Escherichia coli* strains among *E. coli* isolates causing community-acquired urinary tract infection. *Rev. Journal of medical microbiology*; 2023; vol 72. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001660>

ANEXO 1



Dirección General de Asuntos
del Personal Académico

Oficio DGAP/ 1554 /2021

Mtro. Carlos Alberto Eslava Campos
Profesor
Facultad de Medicina
P r e s e n t e

Estimado maestro Eslava:

El Comité Técnico del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) ratificó la *aprobación* de su proyecto **IN205322 Modelo animal (ratón) para evaluar la utilidad de lisados de escherichia coli uropatógena (upec) y otros patógenos urinarios, para el control y tratamiento de infecciones crónicas de las vías urinaria**, con base en el dictamen del Comité Evaluador del Área de las Ciencias Biológicas, Químicas y de la Salud.

Por lo anterior, deberá atender los siguientes puntos:

1. Consultar el dictamen;
2. Es indispensable que ingrese al sitio web institucional de la DGAPA dirección electrónica: <http://dgapa.unam.mx>, (> Ingreso al sistema GeDGAPA (servicios en línea), >> **FIRMA ELECTRÓNICA DE DOCUMENTOS**, >>> Firma Electrónica Universitaria (FEU) para firmar la carta compromiso y el presupuesto autorizado, con fecha y hora límite del **22 de octubre del presente año a las 24:00 horas**. Una vez firmado lo anterior, concluye el proceso, por lo que no es necesario entregar ningún documento en la DGAPA;
3. Le recomendamos leer cuidadosamente las observaciones anexas en su presupuesto.

Sin más por el momento, aprovecho para enviarle un saludo cordial.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 15 de octubre de 2021
El Director General


Dr. Fernando Castañeda Sabido

Dr. Ulises Hernández Chiñas, Corresponsable del proyecto IN205322



FCS/CCMR/ agg*

ANEXO 2



COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN

OFICIO NO. FMEDI/CEI/PMSS/100/2021

ASUNTO: Dictamen Proyecto FM/DI/013/2021

Dr. Carlos Alberto Eslava Campos
Profesor Titular "C" T.C.
Departamento de Salud Pública
Presente.

Estimado doctor Eslava Campos:

Su proyecto **FM/DI/013/2021** de título "**Modelo animal (ratón) para evaluar la utilidad de lisados de *Escherichia coli* 0LI uropatógena (UPEC) y otros patógenos urinarios, para el control y tratamiento de infecciones crónicas de las vías urinarias**" en su versión del 03 de mayo de 2021, ha sido **APROBADO** por el Comité de Ética de la Investigación, en sesión ordinaria de fecha **07 de diciembre de 2021**, teniendo en consideración el dictamen aprobatorio de la Comisión de Investigación. **Registro CICUAL 002-CIC-2021**

- La vigencia del proyecto será de **3 años** contados a partir de la fecha de la sesión.
- El proyecto deberá ejecutarse de acuerdo con lo especificado en la versión aprobada.
- Es necesario que envíe al correo ciefm@unam.mx, un informe anual de avance en formato PDF. De lo contrario, se podrá cancelar la vigencia del proyecto.
- Deberá notificar cualquier modificación o enmienda al mismo y esperar la autorización correspondiente.

Sin otro particular, aprovecho la oportunidad para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 09 de diciembre de 2021.

LA PRESIDENTA


DRA. PAZ MARÍA SALAZAR SCHETTINO


*PMSS/ETF.

