

**UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y  
ARTES DE CHIAPAS**  
INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**T E S I S**

Relaciones genotípicas entre  
*Escherichia coli* O25:H4 y los  
serogrupos O16, OR, O25  
provenientes de muestras  
urinarias e intestinales

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

PRESENTA  
**CITLALLI BERENICE LÓPEZ  
VILLAFUERTE**



Tuxtla Gutiérrez, Chiapas

08 de junio de 2021

**UNIVERSIDAD DE CIENCIAS**

**Y**

**ARTES DE CHIAPAS**

**INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**T E S I S**

Relaciones genotípicas entre  
*Escherichia coli* O25:H4 y los  
serogrupos O16, OR, O25  
provenientes de muestras  
urinarias e intestinales

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

PRESENTA

**CITLALLI BERENICE LÓPEZ  
VILLAFUERTE**

DIRECTOR

Dr. Armando Navarro Ocaña

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO**

ASESOR

Dra. Lorena Mercedes Luna Cázares

**INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



Tuxtla Gutiérrez, Chiapas

08 de junio de 2021



Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas  
Dirección de Servicios Escolares  
Departamento de Certificación Escolar  
Autorización de impresión



Lugar: Tuxtla Gutiérrez, Chiapas  
Fecha: 11 de Junio de 2021

C. Citlalli Berenice López Villafuerte

Pasante del Programa Educativo de: Licenciado en Biología

Realizado el análisis y revisión correspondiente a su trabajo recepcional denominado:

"Relaciones genotípicas entre *Escherichia coli* O25:H4 y los serogrupos

O16, OR, O25 provenientes de muestras urinarias e intestinales".

En la modalidad de Tesis Profesional

Nos permitimos hacer de su conocimiento que esta Comisión Revisora considera que dicho documento reúne los requisitos y méritos necesarios para que proceda a la impresión correspondiente, y de esta manera se encuentre en condiciones de proceder con el trámite que le permita sustentar su Examen Profesional.

ATENTAMENTE

**Revisores**

Dr. Javier Gutiérrez Jiménez

Dra. Alma Gabriela Verdugo Valdéz

Dra. Lorena Mercedes Luna Cázares

**Firmas:**

Ccp. Expediente.

## **AGRADECIMIENTOS**

**Agradezco a Dios** por permitir que culminara una etapa y logro muy importante de mi vida.

**A la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas**, por permitirme ser parte de ella; a los docentes que me brindaron su conocimiento y apoyo durante el transcurso de la carrera.

**Al programa de verano científico Delfín:** por brindarme una beca de estancia, que terminó convirtiéndose en este proyecto de tesis.

**A mi director de tesis, el Dr. Armando Navarro Ocaña**, por abrirme las puertas del laboratorio de Salud Pública de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México, por todas sus enseñanzas, por darse tiempo para asesorarme, por su valioso apoyo en este trabajo, por ser un ejemplo a seguir.

**A mis asesores de laboratorio: Lic. Delia Licona Moreno y Téc. Luis Antonio León Alamilla**, por permitirme formar parte de su ambiente laboral, por todas las enseñanzas, por la confianza, por apoyarme desde el inicio del proyecto, sobre todo, por alentarme a seguir adelante durante esta etapa de mi vida.

**A la Secretaría de Educación, Ciencia, Tecnología e Innovación (SECTEI)**, por el apoyo que fue proporcionado por medio del Proyecto titulado “Estudio de la microbiota intestinal de anaerobios estrictos y facultativos en escolares con distinta composición corporal” con número del convenio: SECTEI/275/2019 y número de folio 9200c19.

**A mi asesora del Instituto de Ciencias Biológicas: Dra. Lorena Mercedes Luna Cázares**, quién me aconsejó y asesoró durante el escrito de mi proyecto, además de motivarme. Aunque no pude recibir clases con ella, es un ejemplo a seguir y estoy admirada por su conocimiento.

**A mi compañera Giselle del Carmen Álvarez Cirerol**, por ayudarme, por las pláticas, por los consejos y por esos buenos momentos en el laboratorio durante mi estancia

## DEDICATORIAS

**A mis padres** *María del Carmen Villafuerte Coronel y Patricio Fernando López Pérez*, por su gran amor, comprensión, apoyo incondicional durante este largo proceso, por alentarme a seguir adelante con mis sueños, por siempre estar. Los amo.

**A mis hermanos** *Alexander López Villafuerte y Karen Lizzeth López Villafuerte*, por ayudarme a mejorar día con día, por aconsejarme durante la carrera, por ser buenos hermanos conmigo.

**A mi abuela:** *Marina Coronel López*, por apoyarme, por motivarme, y ser un gran ser humano conmigo, porque cuando tenía que viajar a Ciudad de México, me iba a despedir y siempre me decía '*Me da mucha tristeza que te vayas hija, te voy a apoyar y recuerda que no me voy hasta que pierda de vista el avión*'.

**A mi mejor amiga:** *Ingrid Yazmín Cruz Alegría*, por ser una gran amiga, por ayudarme y motivarme en las buenas y en las malas, además, de soportarme en momentos de estrés. Sobre todo, por hacer más agradable la carrera.

**A la profesora:** *Dr. Alma Gabriela Verdugo Valdez*, por brindarme sus conocimientos durante la carrera, por aceptarme durante el servicio social, por motivarme a ser mejor alumna, por hacer interesantes sus clases, todo eso causó que me gustara estar en laboratorio. La quiero.

# ÍNDICE

ÍNDICE DE CUADROS .....	i
ÍNDICE DE FIGURAS .....	iii
RESUMEN .....	v
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. MARCO TEORICO .....	4
2.1. <i>Escherichia coli</i> .....	4
2.2. Hábitat .....	5
2.3. Características antigénicas de <i>E. coli</i> .....	7
2.4. Patotipos de <i>E. coli</i> intestinal o diarreagénica (DEC) .....	9
2.4.1. <i>E. coli</i> enterotoxigénica (ETEC) .....	9
2.4.2. <i>E. coli</i> productora de la toxina Shiga (STEC) .....	10
2.4.3. <i>E. coli</i> enteroinvasiva (EIEC).....	10
2.4.4. <i>E. coli</i> enteropatógena (EPEC) .....	11
2.4.5. <i>E. coli</i> enteroagregativa (EAEC).....	12
2.4.6. <i>E. coli</i> adherencia difusa (DAEC) .....	13
2.5. <i>E. coli</i> extraintestinales (ExPEC): uropatógena (UPEC).....	14
2.5.1. Principales factores de virulencia de cepas UPEC.....	19
2.6. Grupos filogenéticos de <i>E. coli</i> con el sistema de Clermont. ....	20
2.7. Principales mecanismos de resistencia a los antimicrobianos.....	22
2.7.1. Resistencia a $\beta$ -lactámicos.....	24
2.7.2. Resistencia a Quinolonas.....	27
2.7.3. Resistencia a Tetraciclinas.....	28
2.7.4. Resistencia a Cloranfenicol.....	28
2.7.5. Resistencia a Trimetoprim-sulfametoxazol .....	29

2.7.6. $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (ESBL).....	30
2.8. Integrones.....	32
III. ANTECEDENTES .....	34
IV. OBJETIVOS .....	39
4.1. General.....	39
4.2. Particulares.....	39
V. HIPÓTESIS .....	40
VI. ZONA DE ESTUDIO.....	41
VII. MÉTODO.....	44
7.1. Origen de las cepas. ....	44
7.1.1. Identidad fenotípica de los aislados de <i>E. coli</i> . ....	44
7.1.2. Pureza y aislamiento de <i>E. coli</i> .....	44
7.1.3. Identificación bioquímica. ....	44
7.2. Confirmación de identidad antigénica de las cepas de <i>E. coli</i> .....	44
7.2.1. Antígenos somáticos (O) .....	44
7.2.2. Antígenos flagelares (H).....	45
7.3. Extracción de ADN.....	45
7.4. Grupos filogenéticos.....	46
7.5. Factores de virulencia. ....	47
7.6. Condiciones de la PCR para grupos filogenéticos y factores de virulencia y electroforesis en geles de agarosa.....	48
7.7. Resistencia a los antimicrobianos .....	50
7.7.1. Difusión de Agar - Método de Kirby Bauer.....	50
7.8. Detección de genes relacionados con la producción de $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (ESBL). ....	52
7.8.1 Detección fenotípica de ESBL.....	52

7.8.2 Detección de integrones por PCR .....	53
VIII. RESULTADOS.....	55
8.1. Identidad fenotípica .....	55
8.2. Identificación bioquímica .....	56
8.3. Serotipificación .....	57
8.4. Factores de virulencia .....	58
8.5. Grupos filogenéticos.....	62
8.6. Resistencia a los antimicrobianos .....	65
8.7. $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (ESBL).....	67
IX. DISCUSIÓN.....	70
9.1. Identificación fenotípica y bioquímica.....	70
9.2. Serotipificación .....	71
9.3. Factores de virulencia.....	73
9.4. Grupos Filogenéticos .....	74
9.5. Resistencia a los antimicrobianos.....	75
9.6. $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (ESBL). .....	77
X. CONCLUSIONES .....	79
XI. PROPUESTAS Y RECOMENDACIONES .....	81
XII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	82
XII. ANEXOS.....	104

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Principales mecanismos de resistencia antibiótica estudiados en <i>E. coli</i>	23
Cuadro 2. Clasificación de las $\beta$ -lactamasas.	25
Cuadro 3. Secuencia de nucleótidos de los iniciadores del cuádruplex.	47
Cuadro 4. Secuencia de los iniciadores para identificar los factores de virulencia de <i>E. coli</i> .	48
Cuadro 5. Composición de la mezcla de reactivos utilizados para cada reacción de PCR.	49
Cuadro 6. Condiciones de temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) y ciclos de desnaturalización, extensión y alineamiento de la PCR para la amplificación de cada uno de los genes.	49
Cuadro 7. Interpretación del diámetro de inhibición de los antibióticos.	52
Cuadro 8. Interpretación del diámetro de inhibición de los antibióticos para las $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (ESBL).	53
Cuadro 9. Secuencia de nucleótidos de los integrones 1 y 2.	54
Cuadro 10. Composición de la mezcla de reactivos utilizados para las reacciones de PCR.	54
Cuadro 11. Condiciones de temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) y ciclos de desnaturalización, extensión y alineamiento de la PCR para la amplificación de cada uno de los integrones.	54
Cuadro 12. Origen de las cepas de <i>E. coli</i> del estudio.	55
Cuadro 13. Resultados de pruebas bioquímicas de las cepas de <i>E. coli</i> .	57
Cuadro 14. Frecuencia de los serogrupos en 20 cepas de <i>E. coli</i> aisladas de muestras fecales.	57
Cuadro 15. Frecuencia de serogrupos en 17 cepas de <i>E. coli</i> aisladas de muestras urinarias	58
Cuadro 16. Análisis estadístico de $X^2$ de proporciones de las cepas de <i>E. coli</i> .	59
Cuadro 17. Análisis de $X^2$ de proporciones de puntaje de virulencia de las cepas de <i>E. coli</i> .	59

Cuadro 18. Frecuencia de los grupos filogenéticos con base a las cepas aisladas de muestras urinarias e intestinales. Y análisis estadístico $\chi^2$ de proporciones.	64
Cuadro 19. Patrón de resistencia a los antimicrobianos de las cepas de <i>E. coli</i> .	66

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura antigénica de <i>E. coli</i> .	8
Figura 2. El tracto urinario y los sitios de infección.	15
Figura 3. Adhesinas y estructuras celulares de <i>E. coli</i> .	16
Figura 4. Mecanismo de patogenicidad de <i>E. coli</i> uropatógena en el tracto urinario.	18
Figura 5. Árbol dicotómico de decisión para la asignación de los grupos filogenéticos de <i>E. coli</i> .	21
Figura 6. Estructura genética de los Integrones clase I.	33
Figura 7. Hospital Infantil de México.	41
Figura 8. Mapa de la Ciudad de México, señalando la ubicación del Hospital Infantil de la Ciudad de México.	42
Figura 9. Mapa del estado de Morelos, señalando el municipio de Tlaltizapán.	43
Figura 10. Placas de Petri con medio selectivo Agar-MacConkey.	55
Figura 11. Cepas de <i>E. coli</i> cultivadas en medio selectivo – Agar MacConkey.	56
Figura 12. Frecuencia de serotipos de cepas de <i>E. coli</i> aisladas de muestras urinarias e intestinales.	58
Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa al 1.0% de los amplicones del gen <i>O25 ST131</i> (347pb).	60
Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa al 1.0% de los amplicones del gen <i>fimH</i> (508pb).	60
Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa al 1.0% de los amplicones del gen <i>sat</i> (412pb).	61
Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa al 1.0% de los amplicones de los genes <i>hlyA</i> (1177pb) y <i>cnf1</i> (498pb).	61
Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa al 1.0% de los amplicones del gen <i>cdt</i> (466pb).	62
Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa al 1.0% de los amplicones al 1.8% de los amplicones de <i>arpA</i> (400pb), <i>chuA</i> (288pb), y <i>jaA</i> (211pb) y TspE (152pb).	63
Figura 19. Halos de inhibición y de resistencia a los antimicrobianos.	65

Figura 20. Halos de inhibición de inhibición $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (ESBL) positivas de las cepas de <i>E. coli</i> .	68
Figura 21. Electroforesis en gel de agarosa al 1.0% de los amplicones del integrón 1 (483pb).	68
Figura 22. Electroforesis en gel de agarosa al 1.0% de los amplicones del integrón 2 (788pb).	69

## RESUMEN

Las infecciones del tracto urinario (ITUs) causadas por microorganismos son de alta prevalencia, por lo que representan una carga económica considerable, pueden ser debidas a una gran variedad de patógenos, entre las que se incluyen bacterias Gram negativas, bacterias Gram positivas y hongos (Flores-Mireles et al., 2015).

La bacteria *Escherichia coli* uropatógena (UPEC), es un bacilo Gram negativo anaerobio facultativo más frecuente relacionado tanto en ITUs no complicadas (75%) como en ITUs complicadas (65%). Además, *E. coli* también es un patógeno intestinal y es causa importante de la enfermedad diarreica aguda en niños menores de 5 años en países de América Latina, África y Asia, están asociadas con alta mortalidad en niños en las comunidades más pobres de África y el Sudeste Asiático (Gómez-Duarte, 2014).

En este estudio se analizaron 37 cepas de *E. coli* aisladas de muestras de infecciones del tracto urinario y de muestras fecales de niños menores de 5 años, dichas cepas se obtuvieron del Hospital Infantil de México, en la Ciudad de México y de la comunidad de Tlaltizapán en el estado de Morelos. Con el fin de determinar si la bacteria obtenida de las dos fuentes presentaban características fenotípicas y genotípicas similares al de la cepa de la clona de *E. coli* O25:H4 ST131, asimismo, poder entender aspectos epidemiológicos que presentan las cepas de *E. coli* causantes de infecciones urinarias. Para ello, se realizó la serotipificación para determinar los serotipos de las cepas, para este propósito se utilizaron 188 sueros preparados en conejos (SERUNAM) contra antígenos somáticos (O) y 53 sueros contra antígenos flagelares (H). Por PCR se identificaron genes de virulencia del patotipo UPEC (*hlyA*, *cnf1*, *fimH*, *sat* y *cdt*) y el gen *ST131* de la clona de *E. coli* O25:H4 ST131. Con la misma metodología y utilizando el método cuádruplex de Clermont et al. (2013) se determinaron grupos filogenéticos de las cepas. Finalmente, por el método de Kirby-Bauer se evaluó la resistencia a los antimicrobianos empleando sensibilizadores de cefoxitina, ceftriaxona, ceftazidima, cefotaxima, cefepima, ofloxacina, norfloxacin, ácido nalidíxico, ciprofloxacina, imipenem, aztreonam, trimetoprim/sulfametoxazol y tetraciclina, de manera similar, se evaluó la producción de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (ESBL) empleando ceftriaxona,

amoxicilina/ácido clavulánico y cefuroxima, además se incluyeron dos pruebas PCRs para identificar los integrones 1 y 2 (Int 1 e Int 2).

Los resultados mostraron que, los serotipos más frecuentemente identificados fueron O25:H4 y O16:H5, cada serotipo con 14 (40.5%) cepas y OR:H4 y O? en 7 (18.9%) y 2 (5.40%) respectivamente. En el caso de los factores de virulencia, se identificaron los genes *O25-ST131*, *fimH* y *sat*, en 37 (100%), 33 (89.2%) y 28 (75.7%) de las cepas, el análisis estadístico no mostró diferencias significativas. En el caso de los grupos filogenéticos los más frecuentes, fueron el B2 y A con 19 (51.4%) y 11 (29.7%) cepas, existiendo diferencias significativas en comparación de los otros grupos B1, D y ND. Las cepas analizadas mostraron resistencia a tetraciclina, ácido nalidíxico y trimetoprim/sulfametoxazol en 30 (80%), 17 (56.7%) y 2 (40%) cepas; mientras que para imipenem todas las cepas fueron sensibles. En el caso de las ESBL, 13 (35.2%) de las cepas fueron positivas para la producción de  $\beta$ -lactamasas. En la amplificación del Integron 1 se obtuvieron 7 (18.9%) cepas positivas, mientras que para el Integron 2, 3 (8.1%) cepas fueron positivas.

Se concluye que las cepas de *E. coli* de origen del tracto urinario se ubicaron principalmente en el grupo filogenético B2 reportado como virulento de origen extraintestinal, lo anterior tiene coincidencia con el filogrupo de la clona *E. coli* O25:H4-ST131, en contraste con lo anterior las cepas de origen fecal se clasificaron en el filogrupo A considerado como comensal avirulento. Ambas fuentes presentaron en relación el gen ST131 de la clona de *E. coli* O25:H4-ST131, además de que también en ambas fuentes se presentaron los genes *fimH* y *sat*, que a su vez lo presentan las cepas O25:H4-ST131. Las cepas O25:H4 de las dos fuentes presentaron multirresistencia a los antimicrobianos, esta característica fue similar a lo reportado en la clona O25:H4-ST131 que es multirresistente a los  $\beta$ -lactámicos y fluoroquinolonas, la emergencia de cepas multirresistentes con factores de virulencia pudiese representar un riesgo para la población susceptible, no solo en las infecciones del tracto urinario sino también de infecciones intestinales.

## I. INTRODUCCIÓN

*Escherichia coli* (*E. coli*) forma parte de la microbiota normal del intestino de los humanos y animales, teniendo una relación mutua de beneficio con su hospedero, constituyendo una de las especies bacterianas más abundantes en dicha región anatómica (Tannock, 1995). Esta bacteria coloniza el intestino de los humanos pocas horas después del nacimiento, como tal, hay cepas que pueden ser patógenas y causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos, uno de ellos es la diarrea (Rodríguez-Ángeles, 2002). Sin embargo, hay varias clonas de *E. coli* adaptadas que adquieren atributos específicos de virulencia, los cuales les confieren un aumento a su capacidad para adaptarse a nuevos nichos, y así causar un amplio espectro de enfermedades, estos atributos de virulencia están codificados en elementos genéticos que pueden ser movilizados a diferentes cepas para crear nuevas combinaciones de factores de virulencia, cuyas combinaciones más prominentes o exitosas han convertido a las cepas en patotipos específicos de *E. coli* (Kaper *et al.*, 2004). Se le denomina patotipo a las poblaciones de la misma especie que presentan factores de virulencia comunes y que en los pacientes producen un cuadro clínico similar (Servicio de Investigación Agrícola e Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura; SdeIA e IICA, 2009).

Existen dos tipos de *E. coli* que producen enfermedades, las intestinales que se designan como *E. coli* diarreagénicas (DEC) y la extraintestinal (ExPEC) (Croxen y Brett-Finlay, 2010). De acuerdo con la patogénesis y las características epidemiológicas, el grupo DEC se divide en seis patotipos: *E. coli* enteropatógena (EPEC), productora de toxina Shiga (STEC), enterotoxigénica (ETEC), enteroinvasiva (EIEC), enteroagregativa (EAEC) y difusamente adherente (DAEC) (Nataro y Kaper, 1998).

Con relación a la segunda variedad, se incluye *E. coli* causante de meningitis neonatal y *E. coli* uropatógena (UPEC), esta última es el principal agente etiológico de las infecciones del tracto urinario la cual se asocia con el 80 % los registros (Secretaría de Salud, 2009).

Cabe mencionar que las cepas de UPEC del grupo B2, de acuerdo con el sistema de cuatro genes de Clermont *et al.* (2013) producen el 69 % de las cistitis, 67 % de las pielonefritis y el 72 % de las sepsis con punto de partida en el tracto urinario (Bien *et al.*, 2012; Vimont *et al.*, 2012). Las infecciones del tracto urinario constituyen una de las causas más frecuentes de enfermedades infecciosas encontradas en la práctica médica, la cual, se caracteriza por altas tasas de incidencia y morbilidad en la población pediátrica y adulta en diferentes regiones del mundo (Thomas y Hooton, 2003).

A pesar de la amplia cobertura de antibióticos existentes para tratar estas infecciones del tracto urinario, en ocasiones la sintomatología urinaria no desaparece debido a diversos factores de riesgo que presentan en los pacientes o más aún por un fenómeno creciente y que preocupa a la comunidad médica nacional e internacional, la multirresistencia a los antimicrobianos de las cepas asociada a las ITUs.

En 2008 Nicholas-Chanoine *et al.* reportaron una clona de *E. coli* con distribución mundial denominada *E. coli* ST131, esta cepa presenta el serotipo (formula antigénica O:H) O25:H4 causante de infecciones del tracto urinario en países de los continentes de Europa, Asia y América del Norte, dicho grupo de *E. coli* O25:H4 fue evaluado mediante la secuenciación de siete genes housekeeping o genes constitutivos, los cuales se expresan de manera constitutiva, por secuencias multilocus (MLST) por lo que se le designó la secuencia tipo 131 (ST131) (Nicholas-Chanoine *et al.*, 2008). Dicha variedad se caracterizó por la producción de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (ESBL). De acuerdo con diversos estudios, el 70 al 80 % de las cepas identificadas con esta secuencia tipo presentan resistencia a fluoroquinolonas y aproximadamente el 66% son productoras de ESBL (Nicholas-Chanoine *et al.*, 2014). Sin embargo, recientemente en diferentes países reportaron una nueva variedad antigénica designada como *E. coli* O16 con propiedades genotípicas y un perfil MLST similar al de las cepas O25:H4 ST131 (Dahbi *et al.*, 2013; Blanc *et al.*, 2014).

Por todo lo antes señalado, esta investigación tuvo como propósito caracterizar cepas de *E. coli* de los serogrupos O16, OR y O25 aisladas de infecciones del tracto urinario y cepas de origen fecal de niños menores de cinco años, para determinar si la o las bacterias obtenidas de los dos tipos de muestras presentaban características

fenotípicas y genotípicas similares a las de cepas de *E. coli* O25:H4 ST131. La caracterización de los serogrupos contribuirá a entender los aspectos epidemiológicos que presentan las cepas de *E. coli* causantes de infecciones urinarias.

## II. MARCO TEORICO

### 2.1 *Escherichia coli*

Esta bacteria fue aislada por primera vez de las heces de un niño en 1885 por Theodor Escherich, pediatra alemán, quien denominó a la bacteria como *Coli Comunn* (Fernández-Ferrán *et al.*, 2003), pero después, fue descrito bajo múltiples sinónimos por otros investigadores, la denominación *E. coli* no fue completamente reconocido sino 1954 (Cowan, 1954). Junto a otras especies de incidencia notable, forma el género *Escherichia* (Algorta y Schelotto, 2006) y hoy en día es la bacteria mejor estudiada.

*E. coli* es un habitante común del tracto intestinal de humanos y animales, además es una de las causas comunes de crear infecciones nosocomiales y comunitarias (Von-Baum y Marre, 2005).

Es un bacilo Gram negativo, que posee pocas exigencias nutritivas, por lo que crece en medios comunes (Domínguez-Carmona y Domínguez-De la Calle, 2003) es anaerobio facultativo de la familia Enterobacteriaceae, la cual constituye un grupo grande y diverso de bacterias Gram negativas. Las enterobacterias presentan una doble membrana, la interna y externa, además presentan una pared celular que contiene un lipopolisacárido (LPS), este LPS está constituido por el lípido A, una región central o región core y una cadena lateral de polisacáridos la cual le da especificidad serológica a los antígenos O por las unidades repetidas de la cadena lateral (Puerta-García y Mateos-Rodríguez, 2010).

El lípido A también es conocido por sus propiedades tóxicas por lo que se le denomina endotoxina en las enterobacterias. La pérdida de los antígenos O produce virulencia atenuada, lo que sugiere su importancia en las interacciones hospedero-patógeno (Sarkar *et al.*, 2014).

*E. coli* es capaz de crecer tanto aeróbicamente como anaeróbicamente, preferiblemente a 37 °C (Nataro y Kaper, 1998), y puede ser no móvil o móvil, con flagelos peritricos, se aísla fácilmente de las muestras fecales en medios selectivos.

El cambio de pH debido a la fermentación de lactosa se puede utilizar para diferenciar entre bacterias que fermentan lactosa y las que no la fermentan, dado que las colonias de *E. coli* positivas para lactosa aparecerán rojas o rosas en medios como

Agar MacConkey y Agar Eosina Azul de Metileno, donde crecen los miembros de Enterobacteriaceae y permite diferenciar el organismo en base a su morfología (Nataro y Kaper, 1998) cabe mencionar que no todas las cepas de *E. coli*, fermentan la lactosa particularmente la mayoría de EIEC y *Shigella*, por lo que se debe tener precaución al usar esta característica como diagnóstico (Croxen *et al.*, 2013).

Clásicamente, debido a la presencia abundante de *E. coli* en el intestino, la detección de estas cepas se utiliza como el indicador principal para detectar y medir la contaminación fecal en la evaluación de la inocuidad del agua y de los alimentos (Paiva, 2006).

## 2.2 Hábitat

El hábitat principal de *E. coli* es el intestino de los mamíferos y algunos otros vertebrados. Este es organismo anaerobio facultativo, vive en estrecho contacto con su huésped (Tenailon *et al.*, 2010). Aunque Savageau (1983) menciona que *E. coli* realiza ciclos entre dos hábitats principales, el primario está localizado en el intestino inferior (colon) de animales de sangre caliente (Smith, 1965), mientras que el secundario, está conformado por agua, los sedimentos o el suelo (Faust 1976; Doran y Linn 1979).

Cada uno de estos hábitats consiste a su vez en numerosos microambientes, el hábitat primario está determinado por factores geométricos y físicos complejos, la dieta del huésped, el sistema inmunitario del hospedero, el estado fisiológico del huésped y las interacciones con los otros microorganismos que se encuentran en la misma región (Drasar y Hill, 1974). Además, cabe recalcar, que la microbiota gastrointestinal tiene la capacidad de adaptarse metabólicamente y desarrollarse rápidamente para renovarse (Berg, 1996).

Como ya mencionamos, el colon es el sitio primario de la colonización bacteriana debido a su lento movimiento, se caracteriza por tener un número considerable de bacterias ( $10^{10}$ - $10^{11}$  por gramo), además de tener un potencial de redox bajo y una alta concentración de ácidos grasos de cadena corta (Rivera-Tapia, 2002).

Las bacterias intestinales en niños recién nacidos, son adquiridas a través del canal de parto y es importante mencionar que en su colonización distintos microorganismos gastrointestinales pueden ocupar diversos sustratos disponibles (Dubos, 1965), por tanto, las poblaciones bacterianas en el tracto gastrointestinal se mantienen estables en cuanto a su tamaño y tiempo, y no se requiere de la periódica reintroducción de bacterias en dosis orales repetidas (Freter, 1992).

El hábitat secundario es igualmente complejo, sus determinantes incluyen factores geométricos y físicos asociados con el agua, sedimento o suelo, los nutrientes que fluyen hacia una pradera o cuenca y, por supuesto, los otros microorganismos que componen el mismo ecosistema (Bitton y Marshall, 1980).

En el hábitat secundario, *E. coli* solo subsiste y, de hecho, exhibe una rotación con una tasa de crecimiento negativa neta, que, en promedio, debe equilibrarse con la llegada de otros organismos vivos del hábitat primario para mantener una población relativamente estable en el hábitat secundario. Faust (1976) ha estimado que, en promedio, el 1% de *E. coli* excretada por el ganado alcanza la cuenca asociada.

La concentración de *E. coli* en el agua varía desde un mínimo de 0.01-10 por mL en agua de pozo y arroyos de montaña (Geldreich 1976; McFeters *et al.*, 1978), a 10-100 por mL en las cuencas hidrográficas de pasturas no pastadas, a 100-1 000 por mL en las cuencas hidrográficas de pasturas y pastizales de Texas (Doran y Linn, 1979), a valores superiores a 104 por mL en aguas muy contaminadas (Geldreich, 1976).

Las concentraciones de *E. coli* en el sedimento están altamente correlacionadas con las del agua suprayacente, pero en general el nivel en el sedimento es aproximadamente de 100 a 1 000 veces mayor (Van-Donsel y Geldreich, 1971). Mientras que los niveles en el suelo varían considerablemente de 0.2 a 20 por gramo en campos abiertos y sombreados sin pasto (Van-Donsel *et al.*, 1967) a valores que pueden aproximarse a los de las heces en los corrales de engorda (Geldreich, 1976).

La vida media de *E. coli* en un hábitat secundario es de aproximadamente 1 día en agua (Gerba y McLeod, 1976), 0.5-2 días en sedimento (Van-Donsel y Geldreich, 1971; Gerba y McLeod, 1976) y alrededor de 1-5 días en el suelo (Van-Donsel *et al.*, 1967; Temple *et al.*, 1980).

Los hábitats primarios y secundarios difieren notablemente con respecto a las condiciones físicas y la disponibilidad de nutrientes, en el primario, la temperatura es bastante uniforme, de aproximadamente 37°C, mientras que en el secundario puede variar desde esta temperatura hasta bajo cero con un promedio de aproximadamente 10°C - 14°C (Savageau, 1983).

El colon es un ambiente anaeróbico, mientras que el suelo superficial y el agua pueden ser bastante aeróbicos. Los sedimentos tienden a ser más anaeróbicos, particularmente en aguas más profundas; sin embargo, *E. coli* generalmente no se encuentra en los sedimentos de aguas profundas (Bonde, 1967).

Aunque STEC puede sobrevivir meses en suelo y estiércol, durante largos periodos de tiempo en agua, siendo aislado de estanques, arroyos, pozos y pozos de agua. Incluso se ha notificado transmisión de STEC por vía acuática, tanto desde agua potable contaminada como de agua recreativa contenida en piletas y piscinas (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura-Organización Mundial de la Salud; [FAO-WHO], 2011).

### **2.3 Características antigénicas de *E. coli*.**

Los serotipos clásicos se basan en el esquema de clasificación de Kauffman, donde se determinan los lipopolisacáridos (LPS) o antígenos somáticos (O) y antígenos de superficie flagelares (H) (Nataro y Kaper, 1998) (Figura 1). Los antígenos O son muy inmunogénicos y se clasifican con facilidad, por lo que casi todas las cepas de *E. coli* se clasifican de esta manera. Sin embargo, es importante hacer notar que el serogrupo O específico no determina la patogenicidad de un aislamiento específico de *E. coli* (Asociación Española de Ciencia Avícola, [AECA], 2011). La combinación específica de los antígenos O y H definen el serotipo de una bacteria, en tanto que la identificación del antígeno somático hace referencia solo al serogrupo en cepas de *E. coli*.

La serotipificación de *E. coli* requiere de un gran número de antisueros, actualmente hay pocos laboratorios que se dediquen a ello, se prefiere identificar las cepas mediante sus factores de virulencia empleando pruebas *in vitro* como por ejemplo ensayos de adherencia en células Hep-2 y pruebas de toxigenicidad en células. Además, se pueden realizar ensayos *in vivo*, como el asa ligada o la prueba

de Sereny, ensayos inmunológicos y pruebas de biología molecular, para poner de manifiesto la presencia de fragmentos de genes involucrados en el mecanismo de patogenicidad y que sirvan de marcadores moleculares (Rodríguez-Ángeles, 2002).

Los métodos moleculares, como la reacción de cadena de la polimerasa (conocida por sus siglas en inglés como PCR) de genes implicados en la biogénesis del antígeno O (por ejemplo, genes *wzx* y *wzy*) y de *fliC* para el antígeno H, también se pueden utilizar para identificar el serotipo (Wang *et al.*, 2003; DebRoy *et al.*, 2011).

Una designación de NM o H - indica una ausencia del antígeno H, y que el aislado no es móvil. Actualmente, hay 186 *E. coli* O (DebRoy *et al.*, 2011; Fratamico *et al.*, 2016) y 53 *E. coli* H (Fratamico *et al.*, 2016) antígenos reconocidos.

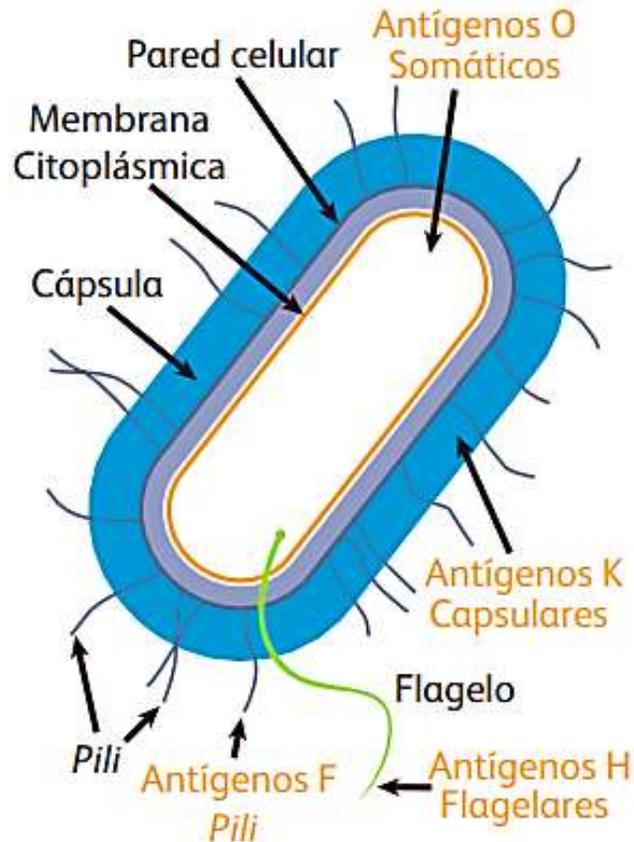


Figura 1. Estructura antigénica de *E. coli* (AECA, 2011).

## 2.4 Patotipos de *E. coli* intestinal o diarreagénica (DEC)

De acuerdo con el mecanismo de patogenicidad, infección y cuadro clínico, las cepas de *E. coli* causantes de diarrea, se clasifican en seis grupos: enterotoxigénica (ETEC), enterohemorrágica también conocidas como productoras de toxina Vero o toxina semejante a Shiga (EHEC o VTEC o STEC), enteroinvasiva (EIEC), enteropatógena (EPEC), enteroagregativa (EAEC) y adherencia difusa (DAEC) (Rodríguez-Ángeles, 2002).

### 2.4.1 *E. coli* enterotoxigénica (ETEC)

El estudio de este patotipo comienza en Calcuta en 1956 donde se inyectaron cepas vivas de *E. coli* aisladas de niños y adultos, que poseían una enfermedad similar al cólera, dentro del íleon de conejos y descubrieron que acumulaba una fuerte cantidad de líquido, semejante a la producida por *Vibrio cholerae* (Nataro y Kaper, 1998; Qadri *et al.*, 2005).

En 1968, se realizaron los primeros estudios en el mismo lugar, aislaron muchas cepas de *E. coli* enterotoxigénica de casos hospitalarios de niños y adultos de diarrea "no causada por *Vibrio cholera*", tanto en las heces, como en el intestino delgado. Más adelante, estos hallazgos se confirmaron por corroboración de estudios en Dhaka, Bangladesh (Evans y Evans, 1973).

Se sabe que es la segunda causa más común de muertes en países de desarrollo en niños menores de cinco años y es responsable de la muerte de alrededor de 525 000 niños cada año que solo es superada por enfermedades respiratorias agudas que abarcan acerca del 20% de todas las muertes infantiles (Kosek *et al.*, 2003). Es un problema mundial que también afecta a animales y adultos, responsable de producir 400 000 a 800 000 muertes por año (Diarrhoeal Diseases Collaborators [GBD], 2017).

ETEC posee factores de virulencia que son específicos, como las enterotoxinas y los factores de colonización diferencian a este patotipo de otros grupos DEC (Qadri *et al.*, 2005).

Como tal, ETEC es un grupo diverso de *E. coli* fermentadora de lactosa, que pertenece a una amplia variedad de tipos antigénicos O, que producen dos enterotoxinas, una que es lábil al calor (LT) y otra que es estable al calor (ST), factores de colonización (CFAs) que permiten a los organismos colonizar fácilmente el intestino delgado, dando como resultado la diarrea (Nataro y Kaper, 1998).

#### 2.4.2 *E. coli* productora de la toxina Shiga (STEC)

Este patógeno se caracteriza por producir una o más toxinas Shiga (Stx) similares a las producidas por *Shigella dysenteriae* tipo 1, por lo que se les denomina Shiga-toxigénicas (O'Brien y LaVeck, 1983). Está asociada a enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) (Zotta *et al.*, 2016), este patotipo puede causar desde diarrea con sangre (DS), hasta enfermedades severas en el hombre, por ejemplo, colitis hemorrágica (CH), síndrome urémico hemolítico (SUH) y púrpura trombocitopénica trombótica (PTT) (Mead y Griffin, 1998).

El principal reservorio animal de STEC son los rumiantes, particularmente el ganado bovino y ovino (Gyles, 2007). Generalmente las epidemias de STEC de forma alimentaria, se dan por la ingesta de productos de origen animal no pasteurizados o mal cocidos, como carne picada cruda, vegetales frescos, jugos no pasteurizados, salami, queso, leche cruda sin pasteurizar (Yoon y Hovde, 2008).

Los brotes por la ingesta de frutas y vegetales contaminados pueden deberse al riego con agua contaminada o al suelo tratado con efluentes que provienen de granjas (Fremaux *et al.*, 2008).

#### 2.4.3 *E. coli* enteroinvasiva (EIEC)

El patotipo EIEC y *Shigella spp.* están relacionados genética y bioquímicamente porque son descarboxilasas negativas, además no son móviles y no fermentan lactosa.

El mecanismo de patogenicidad que tiene EIEC es la invasión del epitelio del colon, para ello el primer paso es la adherencia de la bacteria a las vellosidades de la mucosa requiriendo de mucinasas y adhesinas, para después entrar por endocitosis a la célula, y posteriormente multiplicarse dentro de la célula para la posterior

diseminación a células sanas adyacentes, cuando la infección es severa, hay reacción inflamatoria que se manifiesta con ulceraciones (Nataro y Kaper, 1998).

La información genética para este mecanismo está localizada en el loci del cromosoma y de un plásmido, los genes necesarios para la invasión se encuentran en un plásmido de 140 MDa llamado pInV, que codifica para proteínas, como, por ejemplo, las Ipa (Invasión de antígenos plasmídicos) que permiten la fijación y la posterior invasión, y otras que están involucradas en el proceso de patogénesis (Sethabutr, 2000).

Estos patógenos se adaptan fácilmente a los diversos desafíos ambientales que enfrentan durante el curso de la infección, incluido el pH gástrico bajo, los cambios de temperatura, la disponibilidad de oxígeno y el estrés oxidativo, así como la osmolaridad (Marteyn y Gazi, 2012). Las cepas EIEC se asocian más con brotes que con casos aislados, en los cuales la transmisión puede ser de persona a persona, por ingestión de alimentos y agua contaminada, convirtiéndose en un patógeno importante en niños mayores de seis meses (Snyder *et al.*, 1984). Los síntomas característicos en personas infectadas por EIEC son diarrea acuosa, con sangre y moco, pero algunos casos sólo presentan diarrea que en ocasiones es indiferenciable de la que produce ETEC (Rodríguez-Ángeles, 2002).

#### 2.4.4 *E. coli* enteropatógena (EPEC)

La asociación de EPEC con infecciones intestinales, comenzó en Inglaterra a mediados de la década de los cuarenta (Neter *et al.*, 1995), donde hubo brotes de diarrea en niños de guarderías asociados a *E. coli*, las cuales se denominaron *E. coli* enteropatógenas (EPEC) para diferenciar a este tipo virulento de las bacterias de flora normal (Levine *et al.*, 1978).

Este es uno de los agentes causantes de enfermedades diarreicas en México y se debe a que en el ámbito local se desconocen diversos aspectos que son sobresalientes respecto a su virulencia y al diagnóstico exacto de UPEC (Vidal *et al.*, 2007). EPEC se identificó serológicamente y se asoció con casos de diarrea en niños, siendo la adherencia su principal factor de patogenicidad. Además, presenta una variedad de factores de virulencia que causan daño mediante un mecanismo complejo,

a nivel intestinal induce una alteración histopatológica conocida como lesión A/E (adherencia y esfacelamiento) que se caracteriza por la degeneración de las microvellosidades del enterocito, por la reorganización de algunas proteínas importantes que se encuentran en el citoesqueleto (Celli *et al.*, 2000).

Para la inducción de la lesión A/E la bacteria necesita adherirse al enterocito y translocar hacia las células del huésped proteínas que le son fundamentales para su virulencia (Goosney *et al.*, 2000). Se sabe, además, que los brotes de EPEC muestran una distribución estacional con picos durante los meses del verano (Afset *et al.*, 2003; Afset *et al.*, 2004).

EPEC puede ocasionar brotes o casos aislados de diarrea, ya que afecta principalmente a niños menores de seis meses y a los de dos años, pero también se puede aislar de adultos enfermos y sanos, siendo su principal reservorio, principalmente cuando hay un factor predisponente como diabetes, la forma de transmisión de la enfermedad es por medio de la ruta fecal-oral por manos contaminadas de manipuladores de alimentos (Rodríguez-Ángeles, 2002). Además, los síntomas de la enfermedad inducidos por EPEC suelen ser graves, la característica principal es la diarrea, que puede surgir en diversos grados de severidad, aunque también pueden presentarse vómitos, fiebre en el cuadro clínico (Vidal-Graniel, 2003; Vidal *et al.*, 2007)

#### 2.4.5 *E. coli* enteroagregativa (EAEC)

Puede causar diarrea persistente de un color verde característico y con presencia de moco, tanto en niños como en adultos, en países en vías de desarrollo y se identifica con frecuencia en cuadros diarreicos de personas de países industrializados y en pacientes infectados por VIH (Farfán-García *et al.*, 2016)

Scaletsky y Nataro en 1984 aislaron cepas de pacientes con diarrea, las cuales por el método de serología no correspondían al grupo EPEC, pero si presentaban un patrón característico de adherencia diferente a EPEC y que además eran negativas a la prueba de EAF.

En estudios posteriores, se encontró el fenotipo de adherencia agregativa, caracterizado por auto aglutinación de las bacterias entre sí y por ser inespecífica, porque las bacterias se adhieren a la superficie de las células HEp-2 y a la superficie del cubreobjetos libre de células HEp-2 (Nataro y Kaper, 1998).

En el mecanismo de patogenicidad de EAEC están implicadas la bacteria y diversas moléculas que ella produce; también se sabe que las cepas EAEC tienen la capacidad de incrementar en la mucosa la producción y secreción de moco que atrapa a las bacterias que se autoaglutinan en una fina película en el epitelio intestinal (Rodríguez-Ángeles, 2002).

#### 2.4.6 *E. coli* adherencia difusa (DAEC)

Estas cepas se han asociado más a procesos diarreicos de tipo agudo y persistente en niños que en adultos. Los adultos, al igual que los niños, pueden ser portadores asintomáticos. Dentro de las principales características observadas en la patogénesis de este patotipo, están las siguientes: unión mediante adhesinas a la mucosa intestinal, formación de microcolonias típicas en forma de ladrillos apilados, la producción de citotoxinas y enterotoxinas y finalmente, el desarrollo de una inflamación grave de la mucosa (Farfán-García *et al.*, 2016).

Las cepas de *E. coli* de adherencia difusa, no forman microcolonias cuando se adhieren a células HEp-2, además, se sabe poco de su mecanismo de patogenicidad, pero se ha caracterizado una fimbria de superficie, conocida como F1845, involucrada en el fenómeno de adherencia difusa (Bilge *et al.*, 1989). Los genes que codifican para esta fimbria se pueden encontrar en el cromosoma o en un plásmido. El fenómeno de adherencia difusa también se ha asociado con una proteína de membrana externa de 100 kDa, en una cepa del serotipo O126:H27, cuyos genes se han secuenciado, pero sólo se han encontrado en una minoría de las cepas aisladas (Benz y Schmidt, 1992). Al realizar ensayos *in vitro* en células CaCo y HEp-2, las cepas DAEC tienen la capacidad de inducir la formación de estructuras protuberantes, semejantes a dedos, las cuales confieren protección a las bacterias, pero la presencia de dichas estructuras no se ha demostrado *in vivo*.

## 2.5. *E. coli* extraintestinales (ExPEC): uropatógena (UPEC)

Es la principal causa de las infecciones urinarias adquiridas en la comunidad con valores que oscilan del 80-90%, las infecciones del tracto urinario (ITU) están muy extendidas y afectan a una gran proporción de la población humana. Alrededor de 150 millones de personas en todo el mundo desarrollan ITU cada año, con altos costos sociales (Flores-Mireles *et al.*, 2015).

Sobre la base de la aparición de islas de patogenicidad genómica (PAI) y la expresión de factores de virulencia, como adhesinas, toxinas, polisacáridos de superficie, flagelos y hierro, muchos de estos factores de virulencia son necesarios para que la UPEC cause ITU (Hannan *et al.*, 2012). Sin embargo, además de UPEC, la infección del tracto urinario puede ser causada por *Klebsiella pneumoniae* (aproximadamente el 7%), *Proteus mirabilis* (aproximadamente el 5%) y *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter cloacae*, *Streptococcus bovis* y el hongo *Candida albicans* para el porcentaje restante (Hof, 2017).

Durante las infecciones urinarias, la patogénesis de UPEC incluye de acuerdo a Terlizzi *et al.*, (2017) (Figura 2):

- Colonización de UPEC de las áreas periuretral y vaginal con colonización de la uretra
- Ascendente a la luz de la vejiga y crecimiento como células planctónicas en la orina.
- Adherencia a la superficie e interacción con el sistema de defensa del epitelio de la vejiga.
- Formación de biopelículas.
- Invasión y replicación mediante la formación de Comunidades Bacterianas Intracelulares de la vejiga (RIG) donde los reservorios intracelulares inactivos (QIR) se forman y residen en el urotelio subyacente.
- Colonización renal y daño en el tejido del huésped con mayor riesgo de bacteriemia / septicemia.

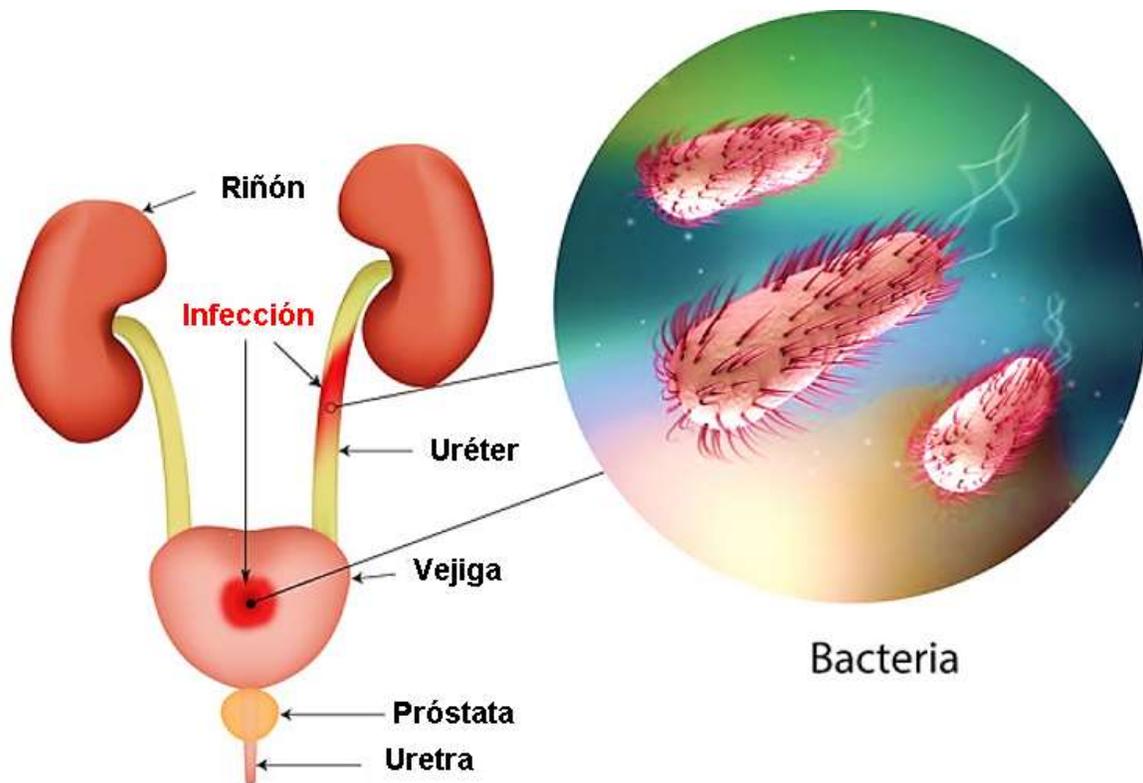


Figura 2. El tracto urinario y los sitios de infección (Terlizzi *et al.*, 2017).

La UPEC coloniza la vejiga utilizando diversos factores de virulencia que, por lo tanto, juegan un papel crítico en la patogénesis de las infecciones urinarias. Estos incluyen componentes estructurales de superficie, como LPS, cápsula de polisacárido, flagelos, vesículas de membrana externa, pili, curli, adhesinas no pilus, proteínas de membrana externa (OMP), así como toxinas secretadas, sistemas de secreción y receptores de captación de hierro TonB-dependientes, incluyendo los receptores de sideróforos como se aprecia en la Figura 3, todos estos componentes son candidatos atractivos para el desarrollo de nuevos medicamentos y vacunas (O'Brien *et al.*, 2016).

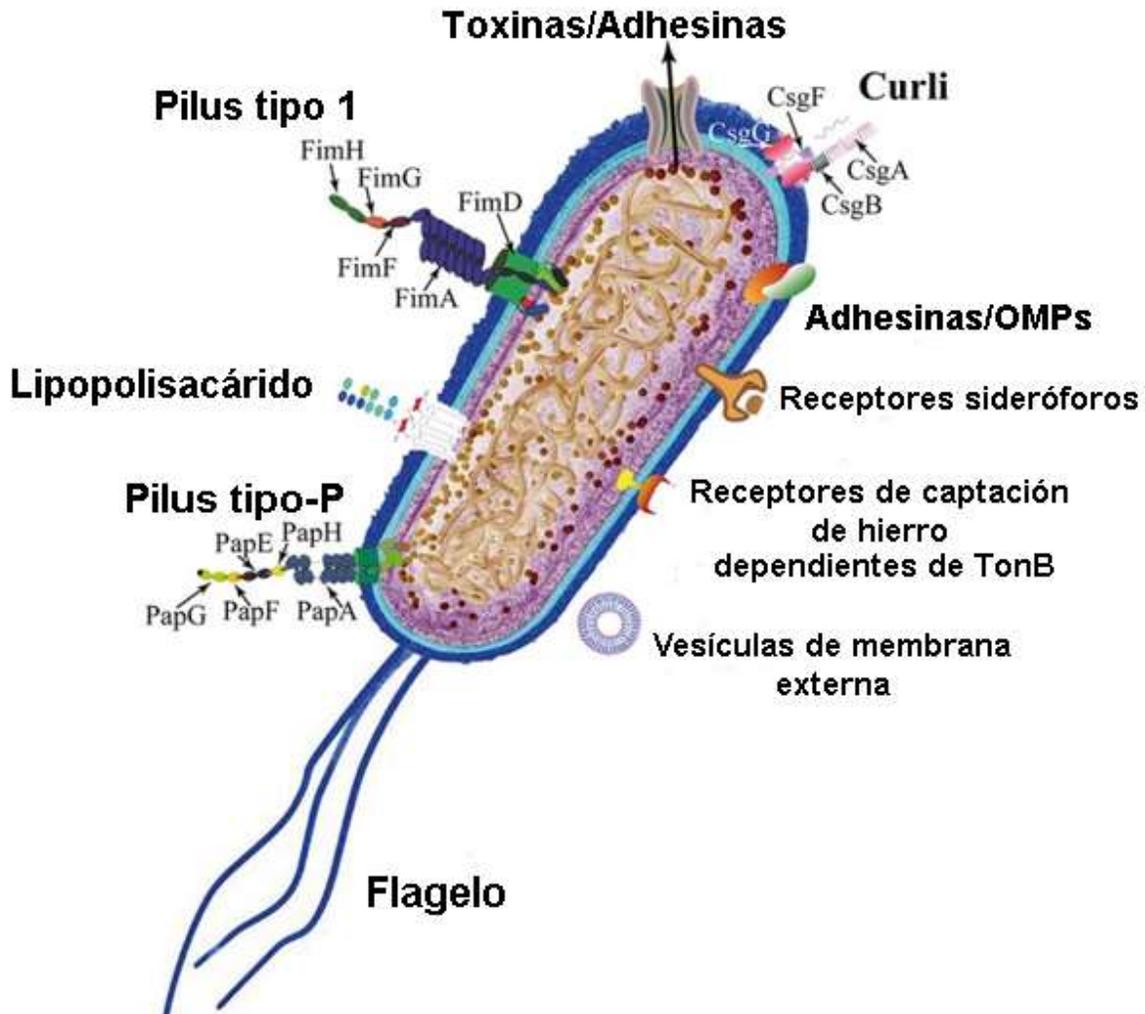


Figura 3. Adhesinas y estructuras celulares de *E. coli* (Terlizzi *et al.*, 2017).

La secuenciación completa de los genomas de las cepas clínicas de UPEC F11, IAI39, UMN026, UTI89, 536, CFT073, ABU 83972 y VR50, ha mostrado que la adquisición de factores de virulencia ocurre en islas de patogenicidad, plásmidos y fagos a través de la transferencia horizontal de genes (Lloyd *et al.*, 2007).

Estos factores de virulencia están localizados en la superficie bacteriana. Algunos de ellos, que la bacteria utiliza para colonizar el tracto urinario (TU) y para generar patología clínica, son exportados para anclarse en la membrana externa de la bacteria (Subashchandrabose y Mobley, 2015).

Las infecciones del tracto urinario se consideran como una de las principales causas de morbilidad en el mundo, aunque son causados por patógenos de origen intestinal que contaminan la uretra y ascienden a la vejiga, *E. coli* uropatogénica

(UPEC), es el agente causal asociado a estas infecciones en más del 80% (Luna-Pineda *et al.*, 2018). Las ITU pueden ser adquiridas en la comunidad y en los hospitales, están asociadas con elevadas tasas de morbilidad en todo el mundo (Foxman, 2014).

El mecanismo de patogenicidad de las cepas UPEC, incluye una serie de eventos (Figura 4), entre ellos el inicio de la adherencia íntima a las células superficiales del tracto urinario, el segundo evento es donde se activa un proceso de invasión para que el tercer evento permita a la bacteria permanecer intracelularmente para formar comunidades bacterianas intracelulares.

En el cuarto evento, es la interacción de UPEC con la célula que promueve un estado de oxidación intracelular, así mismo, promoviendo la filamentación de la bacteria y su posterior eflujo por la lisis de la célula.

El quinto evento, la interacción célula-bacteria estimula un proceso de apoptosis (muerte celular) y el desprendimiento de las células protectoras del TU, como un mecanismo de defensa en el TU.

En el sexto evento, el epitelio intermedio del TU queda expuesto y UPEC se encarga de colonizar nuevamente para un nuevo ciclo de infección.

Después de la reinfección, el séptimo evento es cuando UPEC puede permanecer intracelularmente en estado quiescente hasta por varios meses.

El octavo evento, se basa en el eflujo de UPEC que es estimulado por la misma bacteria o a través de la célula del huésped, saliendo y colonizando el tracto urinario. Por otra parte, la lactoferrina, la uromodulina, los anticuerpos IgA, la catelicidina y las defensinas son secretados por diversos tipos celulares del huésped para inhibir la unión de UPEC al TU. Además, el uroepitelio produce IL-6 e IL-8, estimulando la migración de células de la respuesta inmunitaria, principalmente de neutrófilos.

El noveno evento, consiste en la activación de las células presentadoras del antígeno (APC, por sus siglas en inglés) por la captación de antígenos asociados a UPEC, lo que permite la presentación de péptidos a las células T y la diferenciación de células B a células plasmáticas (CP) que producen inmunoglobulinas, concluyendo como décimo evento (Luna-Pineda *et al.*, 2018).

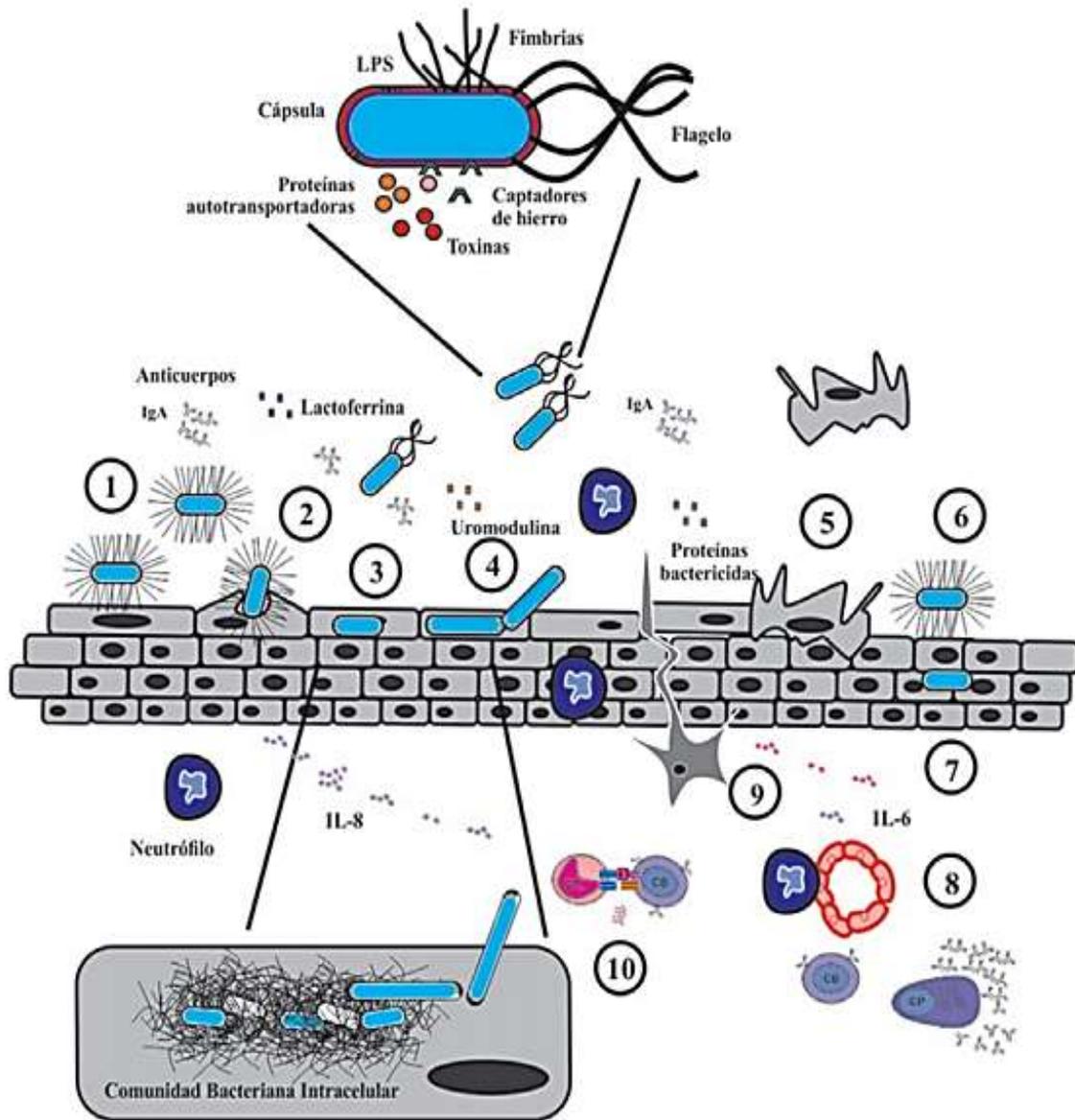


Figura 4. Mecanismo de patogenicidad de *E. coli* uropatógena en el tracto urinario (Luna-Pineda *et al.*, 2018).

La patogenicidad de UPEC por diferentes mecanismos promueve la colonización, la persistencia y la recurrencia de la infección, aunque el huésped también desarrolla una respuesta inmunitaria contra las ITUs.

### **2.5.1. Principales factores de virulencia de cepas UPEC**

Los genes asociados a la virulencia se pueden encontrar codificados en islas de patogenicidad (PAIs), los aislamientos de UPEC pueden contener más de una PAIs (Smith *et al.*, 2008). Entre los factores de virulencia más importantes en la patogénesis de UPEC se encuentra la  $\alpha$ -hemolisina (HlyA), el factor citotóxico necrotizante tipo 1 (CNF1), la adhesina FimH, la toxina secretada auto-transportadora (Sat), la fimbria P y diversos sistemas de adquisición de hierro entre ellos la aerobactina (IutA) (Emody *et al.*, 2003; Slavchev *et al.*, 2009)

Las adhesinas fimbriales (FimH, CsgA y PapG) de UPEC son factores de virulencia que contribuyen a la adherencia, la invasión y la formación de comunidades bacterianas intracelulares. Pocos estudios *in vivo* e *in vitro* han mostrado que las proteínas de fusión promueven una respuesta inmunitaria eficiente y de protección contra las ITU causadas por UPEC (Luna-Pineda *et al.*, 2018).

La adhesión específica está mediada por la adhesina FimH, la cual se encuentra en el extremo distal del pilis tipo 1 y participa en la adherencia de la bacteria a una serie de glucoproteínas del huésped y epítopes peptídicos no glicosilados, incluyendo IgA secretora, miembros de la familia de moléculas de adhesión celular relacionados al antígeno carcino-embriionario (CEACAM), proteínas Tamm-Horsfall, moléculas de adhesión leucocitaria CD11b y CD18,  $\alpha$ 3 y  $\beta$ 1 integrinas, uroplaquina 1a (UP1a) y proteínas de la matriz extracelular, laminina y fibronectina (Weichhart *et al.*, 2008; Dhakal *et al.*, 2008). Esta fimbria es expresada en más de un 90% en todos los aislamientos de *E. coli*, incluyendo tanto cepas patógenas como comensales, distribuyéndose por toda la superficie de la bacteria.

Estudios recientes en modelos de ratón han demostrado que en una infección de la vejiga (cistitis), UPEC utiliza un ciclo patogénico multietapa, en el cual, la bacteria progresa a través del nicho intracelular dentro de las células epiteliales de la vejiga; este nicho intracelular conduce a la replicación de UPEC y la formación de

comunidades bacterianas intracelulares (CBI) (Anderson *et al.*, 2004; Rosen *et al.*, 2007).

El pili P (pili asociado a pielonefritis) se ha encontrado aproximadamente en el 80% de los aislamientos causantes de ITU altas, los genes que codifican las distintas subunidades estructurales de las fimbrias P, así como las proteínas que participan en su ensamblaje se encuentran codificadas por el operón PapC, que es una proteína de membrana externa que forma un poro a través del cual el pili es traslocado al exterior (Slavchev *et al.*, 2009). Cabe mencionar que el 28% de las cepas tiene al menos un factor de virulencia, lo cual es suficiente para causar infección de vías urinarias y un alto porcentaje, además, son cepas virulentas al presentar más de dos factores de virulencia, el factor encontrado con mayor frecuencia en las cepas de UPEC es el gen *fimH* presente en un 84% de las mismas, el cual media la adherencia de la bacteria (Felipe-Díaz, 2016).

## **2.6. Grupos filogenéticos de *E. coli* con el sistema de Clermont.**

Las cepas de *E. coli* son genéticamente diversas, de forma que las diferencias entre cepas patógenas y comensales se fundamentan en sus antecedentes filogenéticos, es decir de acuerdo a la fuente de origen o reservorio. Estas cepas de *E. coli* han sido clasificadas inicialmente en cuatro grupos filogenéticos (Clermont *et al.*, 2000), de este modo se conocen las cepas comensales que están integrados a los grupos A y B1 son consideradas con bajo potencial virulento, mientras que las patógenas extraintestinales, además de albergar genes que codifican factores de virulencia responsables de promover las etapas de colonización, adherencia, invasión y la evasión de los mecanismos de defensa del hospedero humano, derivan principalmente de los filogrupos B2 y D (Bien *et al.*, 2012). El tamaño del genoma varía entre los cuatro filogrupos con cepas A y B1 que tienen genomas más pequeños que las cepas B2 o D (Bergthorsson y Ochman, 1998). Estos estudios han dado una mejor comprensión de cómo las cepas patógenas adquieren genes de virulencia (Bingen *et al.*, 1998).

La agrupación filogenética se puede efectuar mediante electroforesis enzimática multilocus (Herzer *et al.*, 1990) o ribotipado (Bingen *et al.*, 1998), pero estas

técnicas de referencia son complejas y se necesita mucho tiempo, además de requerir una colección de cepas tipificadas (Clermont *et al.*, 2000).

Para llevar a cabo la clasificación, Clermont *et al.* (2013) establecieron una PCR-Quadruplex como herramienta molecular, mediante la utilización de diferentes genes tales como *arpaA*, *chuA*, *yjaA* y TSP E4.C2 (Figura 5). Sin embargo, debido a la complejidad estructural genética de este microorganismo, se han logrado implantar nuevos grupos filogenéticos de *E. coli*, incluyendo A, B1, B2, C, D, E, F y un último grupo el cual aún no ha sido completamente identificado, por tal razón es importante conocer cuáles son los grupos filogenéticos que están presentes en cada una de las regiones mediante el uso de técnicas moleculares que permitan realizar la caracterización filogenética de dicho microorganismo y de esta manera lograr establecer los perfiles de resistencia y evaluar los posibles factores de virulencia asociados al proceso de infección (Serrano *et al.*, 2016).

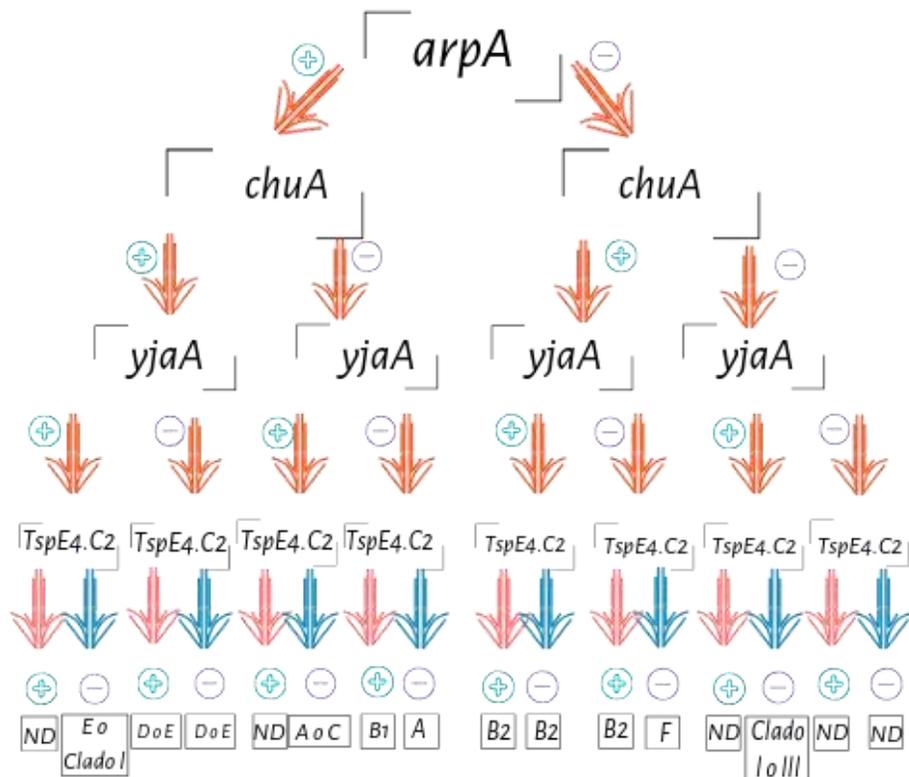


Figura 5. Árbol dicotómico de decisión para la asignación de los grupos de *E. coli* mediante el genotipo obtenido a través de la amplificación de los genes *arpaA*, *chuA*, *yjaA* y TspE4 (Clermont *et al.*, 2013).

## **2.7. Principales mecanismos de resistencia a los antimicrobianos.**

El fenotipo de resistencia a los antimicrobianos es perceptible gracias a la presencia de uno o más mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en la bacteria. Dentro de los tipos de mecanismos moleculares de resistencia destacan por su relevancia: inactivación enzimática, alteraciones en el sitio blanco y alteraciones de la permeabilidad (Tenover, 2006).

Las enterobacterias a nivel mundial presentan alta resistencia a: ampicilina ( $\beta$ -lactámico), trimetoprim/sulfametoxazol, tetraciclina, cloranfenicol y ácido nalidíxico por lo que se debe determinar la prevalencia de los diferentes genes relacionados a nivel molecular (Cuadro 1).

Cuadro 1. Principales mecanismos de resistencia antibiótica estudiados en *E. coli* (Mosquito *et al.*, 2011).

Familia de antibióticos	Mecanismo de acción	Mecanismos de resistencia	Genes implicados
$\beta$ -lactámico	Infiere en las últimas fases de la síntesis del peptidoglucano, componente necesario para la formación de la pared bacteriana.	Producción de $\beta$ -lactamasas: enzimas que se caracterizan por hidrolizar el enlace amida del núcleo $\beta$ -lactámico, inactivando de esta manera el antibiótico.	Genes que codifican $\beta$ -lactamasas: <i>bla</i> TEM, <i>bla</i> SHV, <i>bla</i> CARB, <i>bla</i> OXA, <i>bla</i> CTX-M y <i>bla</i> GES.
Quinolona	Inhibe la acción de las topoisomerasas y de la ADN girasa bacteriana.	Presenta mutaciones puntuales que generan el cambio de aminoácidos en la enzima blanco del antibiótico  Sistemas de expulsión  Presencia de genes plasmídicos antibiótica.	Mutaciones a nivel <i>gyrA</i> (gen que codifica la subunidad de ADN girasa) y <i>parC</i> (gen que codifica una subunidad de la topoisomerasa IV).  ArcAB-like (sistemas presentes en diferentes enterobacterias)  Familia de genes <i>qnr</i> (A, B, C, D S) que codifican proteínas Qnr que impiden estéricamente la unión del antibiótico al blanco.  Gen que codifica la variante cr de la acetiltransferasa 6' (AAC (6')-Ib-cr), capaz de acetilar fluoroquinolonas.
Tetraciclina	Se unen al ribosoma bacteriano, inhibiendo la síntesis de proteínas.	Presencia de bombas de eflujo específicas para tetraciclinas	Genes <i>tetA</i> y <i>tetB</i> que codifican sistemas de eflujo.
Cloranfenicol	Inhibidor de la biosíntesis de las proteínas, previene la elongación de la cadena de péptidos al unirse al centro de la peptidil transferasa del ribosoma 70.	Inactivación enzimática acetilación  Exportadores específicos cloranfenicol	Gen <i>cat</i> que codifica a la enzima cloranfenicol acetiltransferasa  de Genes <i>floR</i> y <i>cmlA</i>

Trimetoprim-sulfametoxazol	Inhibe la síntesis de la enzima dihidropteroato sintasa (sulfametoxazol) y de la enzima dihidrofofato reductasa (trimetoprim), las cuales son enzimas necesarias en la ruta del ácido fólico.	Presencia de genes que codifican formas mutantes de la enzima blanco.	Genes <i>sul1</i> y <i>sul2</i> (sulfametoxazol) y genes <i>dfr</i> (trimetoprim).
----------------------------	---	---	--

### 2.7.1 Resistencia a $\beta$ -lactámicos

Uno de los principales mecanismos de resistencia hacia  $\beta$ -lactámicos es la hidrólisis enzimática, que es debida a la presencia de enzimas llamadas  $\beta$ -lactamasas, que se caracterizan por hidrolizar el enlace amida del núcleo  $\beta$ -lactámico, inactivando de esta manera el antibiótico antes de que genere cualquier efecto, estas enzimas constituyen una amplia familia que según la clasificación de Bush y Jacoby (2010), donde se dividen en los grupos 1, 2 y 3, que a su vez están divididos en 16 subgrupos.

El número de  $\beta$ -lactamasas actualmente descrito es muy elevado y va aumentando cada vez más, dentro de las más de 890  $\beta$ -lactamasas que se han caracterizado hasta el momento, las familias más comunes dentro de las enterobacterias son: *bla*TEM, *bla*SHV, pertenecientes al grupo 2b, es decir son penicilasas, inhibidas por el ácido clavulánico y que en algunos casos también tienen acción contra cefalosporinas de tercera generación; *bla*OXA-1 pertenece al grupo 2d donde están las penicilasas que se caracterizan por la hidrólisis de cloxacilina (oxacilina); y *bla*CARB pertenece al grupo 2c, el cual se caracteriza por tener penicilasas con acción hidrolítica contra carbenicilina (Bush y Jacoby, 2010).

En años recientes, se ha descrito la creciente importancia clínica en enterobacterias de la familia CTX-M (cefotaximasas) (Pallecchi *et al.*, 2007) un grupo de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido que afecta la actividad de cefalosporinas de tercera y cuarta generación.

Otro grupo de  $\beta$ -lactamasas descritas por primera vez en *Pseudomonas aeruginosa* y en *E. coli* son las *bla*GES (Poirel, 2010), estas se caracterizan por hidrolizar a la ceftazidima (Lee y Jeong, 2005). En el caso de *E. coli* esta enzima ha

sido relacionada con el integrón clase 3, clase menos frecuente respecto a la clase 1 y la clase 2 (Poirel, 2010). En el Cuadro 2, se presenta un resumen de la clasificación de las  $\beta$ -lactamasas.

Cuadro 2. Clasificación de las  $\beta$ -lactamasas (Bush y Jacoby, 2010).

Grupo	Clase molecular subclase	Substratos preferidos	Inhibidos por:		Principales características	Enzimas representativas
			AC1	EDTA		
1	C	Cefalosporina	No	No	Mejor hidrólisis de cefalosporinas que de bencilpenicilina	AmpC, P99, ACT-1, CYM-2, FOX-1, MIR-1.
1e	C	Cefalosporina	No	No	Hidrólisis incrementa hacia cefatazidima y otros amino- $\beta$ -lactámicos.	GC1, CYM-27
2a	A	Penicilina	Si	No	Mejor hidrólisis de bencilpenicilina que de cefalosporinas	PC1
2b	A	Penicilina Cefalosporina	Si	No	Hidrólisis similar de bencilpenicilinas y de cefalosporinas	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	Cefalosporina de espectro extendido y monobactámico	Si	No	Hidrólisis incrementada hacia cefatazidima y otros oximino- $\beta$ -lactámicos (cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, cefepime)	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	A	Penicilina	No	No	Resistencia a ácido clavulánico, sulfabactam y tazobactam	TEM-30, SHV-10
2ber	A	Cefalosporina de espectro extendido y monobactámico	No	No	Hidrólisis incrementada hacia oximino- $\beta$ -lactámicos combinados con resistencia a AC, sulfabactam y tazobactam	TEM-50

<b>2c</b>	A	Carbenicilinas	Si	No	Hidrólisis incrementada de la carbenicilina	PSE-1, CARB-3
<b>2ce</b>	A	Carbenicilina, cefepime	Si	No	Hidrólisis incrementada de la carbenicilina, cefepime y cefpirome	RTG-4
<b>2d</b>	D	Cloxacilina	Variable	No	Hidrólisis incrementada de la cloxacilina o de la oxacilina	OXA-1, OXA-10
<b>2de</b>	D	Cefalosporina de espectro extendido	Variable	No	Hidrólisis de cloxacilina u oxacilina y oximino- $\beta$ -lactámicos	OXA-11, OXA-15
<b>2df</b>	D	Carbapenem	Variable	No	Hidrólisis de cloxacilina u oxacilina y carbapenems	OXA-23, OXA-48
<b>2e</b>	A	Cefalosporina de espectro extendido	Si	No	Hidrólisis de cefalosporinas. Inhibido por ácido clavulánico, pero no por aztreonam	CepA
<b>2f</b>	A	Carbapenem	Variable	No	Hidrólisis incrementada de carbapenems, oximino- $\beta$ -lactámicos, cefamicinas	KPC-2, IMI-1, SME-1
<b>3a</b>	B (B1)	Carbapenem	No	Si	Hidrólisis de espectro extendido incluyendo carbapenems, pero no monobactams	IMP-1, VIM-1, CrA, IND-1
	B (B3)					L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
<b>3b</b>	B (B2)	Carbapenem	No	Si	Hidrólisis preferente de carbapenems	CphA, Sfh-1

### 2.7.2 Resistencia a Quinolonas

A *E. coli* uropatógena se le ha descrito como una bacteria con resistencia creciente a ampicilina, amoxicilina y cefalosporinas de primera y segunda generación, debido a esta situación, se recomienda el uso de fluoroquinolonas, siendo ciprofloxacina y norfloxacina, los más usados por prescripción médica y automedicación. Sin embargo, el uso de quinolonas como terapia de primera línea para el tratamiento de ITU no complicada se debería evitar para disminuir la resistencia (Kucheria *et al.*, 2005).

En bacterias Gramnegativas como *E. coli*, el blanco o sitio de acción de las quinolonas es la ADN girasa, que contiene dos subunidades alfa y dos  $\beta$ -s, y es codificada por los genes *gyrA* y *gyrB*, respectivamente y que es la encargada de catalizar el superenrollamiento negativo del ADN (Mosquito *et al.*, 2011).

Entre los mecanismos moleculares de resistencia a estos antibióticos se encuentran las alteraciones en los blancos de quinolonas, las bombas de expulsión activa y la transferencia de genes de resistencia plasmídicos (Ruiz, 2003).

La alta resistencia hacia fluoroquinolonas, tales como la ciprofloxacina (Ruiz, 2003), se relaciona con mutaciones puntuales en los codones del gen *gyrA* que codifican los aminoácidos Ser 83 y Asp 87 de la ADN girasa A en la Región Determinante de Resistencia a Quinolonas (QRDR), vía más común de resistencia a este grupo de antimicrobianos (Leyva y Leyva, 2008) o con mutaciones en *gyrA* a nivel de otros genes como *parC* (codones 80 o 84 de manera usual). Durante los años, se han informado las posiciones en donde ocurren las mutaciones y los cambios de aminoácidos que conlleva cada mutación (Ruiz, 2003).

Otros mecanismos de resistencia son la disminución del número de porinas en la membrana, un sistema de eflujo de la droga del citosol hacia el espacio extracelular (Kucheria *et al.*, 2005) y el relacionado con la transferencia de genes mediante plásmidos, como es el caso de los genes *qnr* que codifican a la familia de las proteínas Qnr (QnrA, QnrB, QnrS, QnrC y QnrD) que se unen a la ADN girasa (*gyrA* y *gyrB*) y a la topoisomerasa IV (*parC* y *parE*) disminuyendo la acción de las quinolonas.

El aumento de la resistencia a esta familia de antibióticos se puede relacionar con el aumento de la concentración mínima inhibitoria (CIM) hacia diferentes quinolonas en *E. coli*, por lo que se habla de una “susceptibilidad disminuida”, dado

que en los últimos años se han descrito numerosos genes *qnr*, se ha efectuado una propuesta de nomenclatura (Jacoby *et al.*, 2008) y se ha dispuesto una página web para recoger aquellos genes descritos hasta la fecha y los que surjan en un futuro.

El incremento de resistencia a diversos antimicrobianos, y en particular a quinolonas, se traduce en un deterioro de la calidad del tratamiento afectando no sólo al paciente, sino que, al reducir la disponibilidad de antimicrobianos, afectan su eficacia y por tanto el tratamiento de las infecciones en el futuro (Horna-Ruíz *et al.*, 2013).

### **2.7.3 Resistencia a Tetraciclinas**

Las tetraciclinas son una familia de antibióticos cuyo mecanismo de acción es unirse a la parte 16S, de la subunidad 30S del ribosoma bacteriano, de manera que inhibe la síntesis de proteínas al evitar la unión del aminoacil-tRNA en la posición A del ribosoma (Chopra y Roberts, 2001).

El mecanismo de resistencia más común hacia este antibiótico es mediante sistemas de flujo, que en Gram negativos son codificados por los genes *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD*, *tetE*, *tetI* y *tetY*, todos ellos previamente reportados en *E. coli*. Sin embargo, existen otros mecanismos de resistencia como protección ribosomal y acción enzimática sobre las tetraciclinas codificados por diferentes genes (Levy *et al.*, 1999; Chopra y Roberts, 2001).

### **2.7.4. Resistencia a Cloranfenicol**

El cloranfenicol se aisló por primera vez en 1947 a partir *Streptomyces venezuelae*. Debido a su simplicidad estructural, desde 1950 se obtiene por síntesis química. A pesar de ser un antibiótico con un amplio espectro de acción, su elevada toxicidad en humanos y en animales ha conllevado a reducir significativamente su uso, como tal el florfenicol, un derivado fluorado del cloranfenicol es otro compuesto aprobado exclusivamente para su empleo en animales de consumo humano. El cloranfenicol es utilizado en el tratamiento de humanos y animales, al ser un antimicrobiano de amplio espectro con acción sobre bacterias Grampositivas y Gramnegativas, clamidias, micoplasmas y Rickettsias (Schwarz *et al.*, 2004).

La modificación enzimática (plasmídica o cromosómica) es el mecanismo de resistencia principal, aunque también se han detectado cambios en la permeabilidad de la membrana externa (García-Sánchez *et al.*, 1997). Penetra en la bacteria por difusión facilitada y se une a la subunidad 50s del ribosoma, causando inhibición de la síntesis de proteínas. Esto impide la translocación del aminoacil-tRNA cargado en el ribosoma (Werner, 1973). La resistencia a cloranfenicol se debe a la presencia de una enzima intracelular, cloranfenicol acetil transferasa (CAT), existente tanto en Gram positivos como en Gram negativos. Esta enzima acetila los dos grupos hidroxilo y previene la unión del cloranfenicol al ribosoma 50s (Fuchs *et al.*, 1994).

El principal mecanismo de resistencia frente al cloranfenicol es el de la inactivación enzimática por acetilación, mediado por los diferentes tipos de cloranfenicol acetiltransferasas (CAT), enzimas habitualmente codificadas por genes plasmídicos que reaccionan con el grupo hidroxilo del alcohol primario del cloranfenicol. La reacción queda impedida frente al florfenicol, ya que en este compuesto el grupo hidroxilo es sustituido por un átomo de flúor no acetilable. Además, la resistencia a cloranfenicol también puede darse por exportadores específicos por genes como *cmlA* o *floR* (este último confiere resistencia al florfenicol), que expulsa el antibiótico de la célula (Schwarz *et al.*, 2004).

### **2.7.5 Resistencia a Trimetoprim-sulfametoxazol**

A partir de 1935, las sulfonamidas han sido extensamente aplicadas en medicina humana y veterinaria, lo que generó rápidamente una alta resistencia antibiótica, por ello se empezó a utilizar de manera combinada con diaminopirimidinas como es el caso del trimetoprim, el mecanismo de acción de las sulfonamidas es inhibir la síntesis de la dihidropteroato sintasa enzima clave en la ruta del ácido fólico. Mientras que en el caso del trimetoprim este actúa inhibiendo la enzima dihidrofolato reductasa (*dfr*), otra enzima importante en la síntesis de ácido fólico (Ho *et al.*, 2009).

Los mecanismos de resistencia a sulfonamidas y a trimetoprima mayormente descritos son los relacionados con la adquisición de genes mutantes mediante elementos móviles. En el caso de las sulfonamidas se han descrito los genes *su1*, *su2* y *su3* relacionados con integrones y que codifican formas mutantes de la enzima

dihidropteroato sintasa que no pueden ser inhibidas por el antibiótico. Lo mismo sucede en el caso del trimetoprim, se han descritos múltiples genes *dfp* que generan resistencia antibiótica (Dahmen *et al.*, 2010).

### **2.7.6 $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (ESBL)**

El inicio del uso de las penicilinas fue en el año 1940, con el descubrimiento de la resistencia bacteriana, Edward P. Abraham y Ernest Chain, quienes habían participado junto con Howard Florey y Heatley en la purificación y aplicación de las penicilinas, observaron en ciertos cultivos de *E. coli* la inactivación de las soluciones de penicilinas por una sustancia producida por dichas bacterias (Abraham y Chain, 1940). Unos años después, Kirby identificó la existencia de cepas de *Staphylococcus aureus* que producían una sustancia capaz de inactivar las penicilinas, que resultaron ser las penicilinasas (Abarca y Herrera, 2001).

Después fue descrita una enzima nueva que realizaba la misma función, a la que se le denominó  $\beta$ -lactamasa, específicamente Temoniera (TEM), por el nombre del paciente del que se aisló, alrededor de 1960 en Grecia (Bradford, 2001).

Posteriormente, fue aislada una cepa de *Klebsiella pneumoniae* productora de una  $\beta$ -lactamasa capaz de inactivar tanto a las aminopenicilinas como a las incipientes cefalosporinas de primera generación, carboxipenicilinas y las ureidopenicilinas, le llamaron SHV-1 (Casellas, 2011).

Así continuó el desarrollo de estas enzimas inactivadoras de betalactámicos hasta que producto de mutaciones de los genes que codificaban las betalactamasas tipo TEM-1, TEM-2, SHV-1 aparecieron las actuales betalactamasas de espectro extendido (BLEE) (Morejón-García, 2013).

Un grupo de investigadores alemanes, encabezados por Knothe *et al.* (1983) aislaron de una cepa de *Klebsiella ozaenae*, siendo una nueva betalactamasa producto de mutaciones de la SHV-1, la nombraron SHV-2, la misma era capaz de hidrolizar las cefalosporinas de tercera generación (ceftriaxona, cefotaxima, ceftazidima) y el aztreonam, fueron Philippon *et al.*, (1989), quienes la llamaron, por primera vez, betalactamasas de espectro extendido (BLEE).

Las enzimas que inactivan penicilinas y cefalosporinas incluyendo las de tercera y cuarta generación (Oliver y Cantón, 2004) son denominadas  $\beta$ -lactamasas, estas son capaces de romper el puente amida del anillo penicilánico o cefalosporánico para producir derivados ácidos sin propiedades bactericidas, esto evita que dichos antibióticos puedan unirse a las proteínas fijadoras de penicilina (PBP–penicillin binding protein), y de esta forma impedir la formación de la pared bacteriana, por lo que no se logra la lisis bacteriana (Morejon, 2005) y se caracterizan por ser inhibidas por el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam (Seral-García *et al.*, 2010).

El mecanismo más importante de resistencia a los  $\beta$ -lactámicos en las enterobacterias es la producción de  $\beta$ -lactamasas. El incremento de la resistencia bacteriana es un hecho notable, a la vez un problema antiguo y aun cuando existan nuevos antibióticos disponibles, la presencia de microorganismos multirresistentes es cada vez más frecuente (García-Hernández *et al.*, 2011). Muchos integrantes de la familia Enterobacteriaceae poseen  $\beta$ -lactamasas cromosómicas naturales, que son probablemente derivadas de las propias PBP con las que tienen analogía secuencial y estructural (Seral-García *et al.*, 2010).

*E. coli* puede producir enzimas  $\beta$ -lactamasas cromosómicas o extracromosómicas (mediadas por plásmidos) (Martín-Clavo *et al.*, 2012), además, se sabe que es el agente etiológico más frecuente en infecciones del tracto urinario y una de las principales causas de meningitis neonatal, además de ocasionar infecciones intestinales y otras como neumonías nosocomiales, colecistitis, peritonitis, osteomielitis, artritis infecciosa, además, otitis externa, siendo también una de las causas más frecuente de bacteriemia (García-López *et al.*, 2008). Por razones que no son bien conocidas, *E. coli*-ESBL se identifica con mayor frecuencia en pacientes que provienen de la comunidad o de centros de larga estancia (Pujol y Peña, 2002), el aislamiento de cepas de *E. coli* con ESBL tanto en la comunidad como en el hospital se ha convertido en un problema creciente.

Las cepas productoras de ESBL presentan resistencia a los  $\beta$ -lactámicos, excepto a las cefamicinas y a los carbapenémicos, además, los plásmidos que codifican las ESBL portan genes de resistencia que se les denominan transposones, a otros antimicrobianos como aminoglucósidos, tetraciclinas y cotrimoxazol, es por lo

que el fenómeno de resistencia cruzada es muy frecuente y el tratamiento de las infecciones producidas por estas cepas tiene una mayor dificultad (Sánchez-Artola, 2004). Los genes que codifican las ESBL y los que codifican la resistencia a otros antimicrobianos, pueden residir en el mismo plásmido conjugativo y, por lo tanto, se transmiten juntos de un microorganismo a otro, confiriendo el perfil de resistencia antibiótica múltiple (Pujol y Peña, 2002).

La prevalencia de cepas ESBL es un problema mundial, en Europa hay un importante aumento, habiendo diferencias entre distintos países, regiones e incluso centros sanitarios de una misma localidad. En España actualmente la frecuencia de cepas *E. coli* con ESBL se encuentra entre el 5-10%, variando el porcentaje según la zona geográfica; y aproximadamente un 60% es de procedencia extrahospitalaria y de infecciones urinarias (Ángel-Díaz *et al.*, 2006)

La importancia que tienen las ESBL, es porque cepas de bacilos Gram negativos, especialmente *K. pneumoniae*-ESBL, es responsable de infecciones nosocomiales graves, habitualmente en pacientes críticos, cursando muchas veces con bacteriemia; aunque naturalmente pueden producirse también infecciones de menor gravedad, como la que provoca *E. coli*-ESBL en el tracto urinario, observadas en pacientes ambulatorios (Pujol y Peña, 2002), sin embargo, no deja de ser importante el hecho de que causen infecciones que al tiempo podrían agravarse.

## 2.8 Integrones

Se ha reportado la existencia de la clase de unidades genéticas que se denominan integrones, estos se han detectado principalmente en bacilos Gram negativos fermentadores, de las familias Enterobacteriaceae y Vibrionaceae (Jones *et al.*, 1997).

Son elementos pertenecientes a la familia de transposones Tn21 y Tn3, capaces de albergar genes de resistencia a antibióticos, están constituidos por dos regiones de ADN muy conservadas, situadas en sus extremos. En la región conservada 5' (5'CS) existen tres elementos necesarios para la captura y expresión de genes exógenos (cassettes): uno que codifica una integrasa (*int I*), el otro es el lugar de recombinación sitio-específico (*attI*), y un promotor (*Pant*) para la expresión de los genes cassettes integrados. En la región conservada 3' (3'CS) se hallan insertados el

gen *qacEA1* y el gen *sull* (Lévesque *et al.*, 1995). Entre estas dos zonas se pueden insertar uno o varios tipos de genes (cassetes génicos) de resistencia, en una zona denominada región variable (Martínez-Freijo, 1997) (Figura 6).

Hasta la fecha se han descrito varias familias de integrones de acuerdo a la secuencia nucleotídica del gen *intl* (Paulsen *et al.*, 1993), al menos tres de ellas están relacionadas con la expresión de genes de resistencia. Sus integrasas presentan entre 45% y 58% de homología, sugiriendo una divergencia evolutiva por un período superior a 50 años, lo que corresponde, aproximadamente, a la era antibiótica (Bennett, 1999).

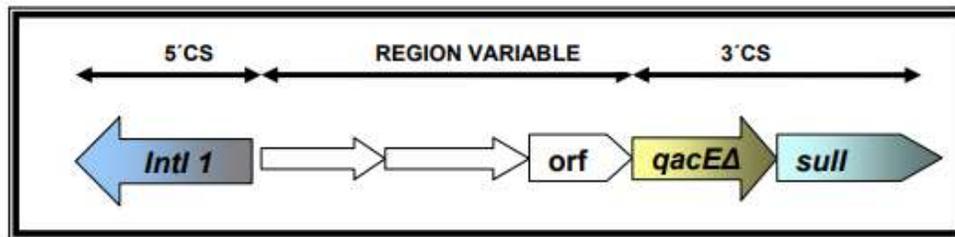


Figura 6. Estructura genética de los Integrones clase I (Martínez-Freijo, 1997).

### III. ANTECEDENTES

Cravioto *et al.* (1990) trabajaron en el estudio denominado: riesgo de diarrea durante el primer año de vida asociado a colonización inicial y posterior por enteropatógenos específicos, lo realizaron en la vereda Lugar sobre la Tierra Blanca, en el estado de Morelos. Las pruebas de la colonización intestinal se realizaron cada 15 días, además de cada vez que un infantil tenía diarrea. En el 82% de los infantes se detectó diarrea con aislamiento inicial de *E. coli* enterohemorrágica y 64% con *E. coli* enteropatógena o *Shigella spp.*

El factor de adherencia de *E. coli* enteropatógeno, las enterotoxinas termoestables humanas o porcinas, los antígenos del factor de colonización fimbrial y las toxinas I y II similares a Shiga fueron características patogénicas importantes relacionadas con la presencia de diarrea y con la protección contra la infección posterior por los mismos organismos.

Nicholas-Chanoine *et al.* (2008) desarrollaron estudios con cepas de *Escherichia coli*  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido de tipo CTX-M-1 (CTX en referencia a la hidrólisis de la cefotaxima). Seleccionaron 41 aislamientos de *E. coli* positivos para ESBL de tres continentes y ocho países, determinaron el grupo filogenético, el perfil de ERIC-PCR (secuencias consenso intergénicas repetitivas enterobacteriana- PCR), el serotipo O:H, la variante de adenosín monofosfato cíclico (AMPc) y el patrón de resistencia a los antimicrobianos.

Se obtuvieron que 36 (88%) de las 41 cepas de *E. coli* presentaron las mismas características genotípicas: grupo filogenético B2, ERIC2-PCR perfil 1, serotipo O25:H4 (causante de infecciones del tracto urinario), AmpC de tipo EC6, resistencia a ciprofloxacina y perfil MLST ST131, cabe mencionar que un MLST se refiere a la tipificación multilocus de secuencias, la cual sirve para la caracterización taxonómica de bacterias. Las 36 cepas de *E. coli* exhibieron perfiles de FV muy similares (91% a 100%). Concluyeron describiendo un grupo clonal de *E. coli* virulento positivo para CTX-M-15 y ampliamente distribuido con genotipos y subgrupos de virulencia altamente homogéneos que presentan perfiles de PFGE muy similares, lo que sugiere una emergencia reciente de las cepas.

Dahbi *et al.* (2014) trabajaron en el estudio denominado: Epidemiología molecular y factores de virulencia de *E. coli* O16:H5-ST131: Comparación con las subclonas H30 (fimbria H30) y H30-Rx de O25b: H4-ST131, donde la subclona H30 representa la mayoría de las cepas de *E. coli* resistente a los antimicrobianos y es la cepa dominante en general, a diferencia de esta, la subclona H30-Rx, es denominada así debido a su perfil de resistencia antimicrobiana más extensa.

El grupo clonal ST131 representó 490 (16%) de los 2995 aislamientos obtenidos de muestras clínicas en cinco hospitales españoles durante el período de estudio (2005-2012). Entre las 490 cepas ST131, 456 pertenecían al serotipo O25b:H4, 27 a O16:H5 y siete eran O-no tipificables:H4 (ONT:H4). Los 27 aislamientos O16:H5 mostraron las fimbrias H41 (*fimH41*), mientras que los alelos *fimH30* y *fimH22* fueron los más frecuentemente entre las cepas O25b:H4.

La mayoría (381/490; 78%) de las cepas ST131 pertenecían a la subclona H30, y 302 de 381 (79%) cepas H30 pertenecían a la subclona H30-Rx. De los 27 las cepas O16:H5, el 48% produjo CTX-M-14; sin embargo, ninguno produjo CTX-M-15. En contraste, el 46% de los aislamientos O25b:H4 produjeron CTX-M-15, mientras que solo el 2% produjo CTX-M-14.

Los 27 aislamientos O16:H5 y 127 O25b:H4, se analizaron por PCR para detectar la presencia de 32 genes que codifican factores de virulencia típicos de ExPEC, solo el gen *kpsM II-K2* se asoció significativamente con los aislamientos O16:H5-ST131 (70% positivos) mientras que 12 genes de virulencia (*papEF*, *papG II*, *papG III*, *afaFM955459*, *cnf1*, *hlyA*, *iucD*, *iroN*, *kpsM II- K5*, *cvaC*, *iss* y *ibeA*) se asociaron significativamente con los aislamientos O25b:H4-ST131. El gen *kpsM II-K2* también se encontró con frecuencia (44%) entre el subclona H30-Rx.

Más de la mitad de las cepas O16:H5 (56%) mostraron propiedades de ExPEC (con dos o más de los siguientes cinco genes de virulencia: *papEF*, *sfa/focDE*, *afa/draBC*, *iucD* y *kpsM II*) que era significativamente más frecuente en las cepas O25b:H4 (81%) (P <0.01), especialmente entre los aislamientos H30-Rx (97%). Aplicaron un esquema de virotipo, basado en la presencia o ausencia de genes de virulencia extraintestinal analizado por PCR, dentro del cual aproximadamente la mitad

(52%) de los aislamientos O16:H5 mostraron el virotipo específico C1, mientras que los virotipos B, C2, D1, D2, D4, D5, E y F se encontraron solo en O25b:H4-ST131.

A pesar de su baja puntuación en el gen de virulencia, el 60% de los aislamientos de O16:H5 mostraron una alta virulencia en el modelo de sepsis en ratones, el ensayo de dosis letal mostró que las cepas mataron 90-100% de ratones.

Además, cuatro aislamientos O16:H5 de los virotipos A y C1, portadores de las variantes del grupo II, mostraron letalidad a las 24h. Por lo tanto, ciertos aislamientos O16:H5 *fimH41* mostraron una virulencia *in vivo* similar a la reportada con los aislamientos altamente virulentos O25b:H4 H30-Rx (Mora *et al.*, 2014), lo que respalda su potencial de virulencia para los humanos.

Mora *et al.* (2014) trabajaron con patrones de virulencia en un modelo de sepsis murina de aislados clínicos de *E. coli* ST131 que pertenecen a los serotipos O25b:H4 y O16:H5 están asociados a virotipos específicos. El objetivo del estudio mencionado fue comparar la virulencia en un modelo de sepsis subcutánea en modelo de ratón con cepas de origen clínico ST131 representativas de los serotipos (O25b:H4, O16:H5) y nueve virotipos y subtipos (A, B, C, D1, D2, D3, D4, D5 y E), basándose en la presencia o ausencia de ciertos genes de virulencia extraintestinal.

La mayoría de las cepas ST131 pertenecen al serotipo O25b:H4, se han informado nuevas variantes con diferentes serotipos, ST131 que utilizan el esquema de tipificación de secuencia multilocus discriminatoria del Instituto Pasteur y perfiles de genes de virulencia (virotipos) con implicaciones desconocidas en las formas de diseminación, persistencia y virulencia. En el estudio los autores, tomaron en cuenta diferentes patrones de virulencia en asociación con virotipos, desde letalidad muy rápida (muerte en menos de 24h) hasta baja letalidad (muerte a los 7 días) pero con presencia de una inflamación aguda. A pesar de su bajo puntaje de virulencia, las cepas del serotipo O16:H5 que exhibieron virotipo C, no mostraron diferencias significativas en la letalidad en comparación con las cepas O25b:H4 altamente virulento pertenecientes a los virotipos A, B y C. Observando que las cepas O16:H5, mataron a los ratones más lentamente. Sin embargo, entre los virotipos A, B, C del

serotipo O25b:H4 se encontraron diferencias significativas (letalidad final  $\geq 80\%$  de los ratones desafiados).

La diversidad de virulencia *in vivo* reportada en este estudio muestran la variabilidad genética dentro del grupo clonal ST131 determinada por la tipificación molecular. Como tal, Mora *et al.*, (2014) concluyeron que el esquema MLST del Instituto Pasteur, así como la clonación, son herramientas moleculares importantes para la discriminación de subtipos dentro del grupo clonal ST131 que presentaron patrones de virulencia *in vivo* asociados a virotipos específicos.

Nicholas-Chanoine *et al.* (2014) describieron las principales características de las cepas del grupo clonal ST131, cabe mencionar que actualmente, ST131 es el linaje predominante las cepas de *E. coli* patógenas extraintestinales (ExPEC) en todo el mundo, esto es debido al espectro de infecciones que causan tanto en ambientes comunitarios como hospitalarios y la gran cantidad de genes asociados a los factores de virulencia que presenta.

Ellos describen las principales características de cepas del grupo clonal ST131, en base a la creciente información publicada, como características biológicas, patogénicas y epidemiológicas importantes de la clon. Nicholas-Chanoine *et al.*, 2014 concluyeron que la clona ST131 es la más competitiva del grupo B2 de *E. coli*. Además, estas clonas se distinguen por colonizar el tracto digestivo humano y causar infecciones del tracto urinario humano, en términos de su capacidad para adherirse a las células epiteliales del intestino, la vejiga y el riñón.

Sin embargo, las características bacterianas inherentes a estas propiedades de virulencia siguen siendo desconocidos porque ningún estudio ha establecido una correlación entre el potencial de virulencia y el contenido del gen VF. Una de las características más notables de *E. coli* ST131 es su bajo nivel de recombinación del genoma de la bacteria. Una comprensión más detallada del nicho ecológico específico de *E. coli* ST131 sería de interés particular estudiar, debido a que *E. coli* ST131 ha sido identificada como el componente predominante del tracto digestivo de individuos sanos.

Se ha demostrado que la clona evoluciona bajo la presión selectiva de los antimicrobianos al adquirir resistencia a las fluoroquinolonas codificada en el cromosoma y plásmidos que codifican las enzimas CTX-M. La posibilidad de que este clona pueda adquirir plásmidos que codifican carbapenemasas no es muy remota por lo que es un tema de gran importancia que debe de abordarse a la brevedad posible.

Varela *et al.* (2017) trabajaron en la diversidad genética de cepas extraintestinales de *E. coli* productoras de las  $\beta$ -lactamasas TEM, SHV y CTX-M asociadas a cepas aisladas de casos clínicos. Estudiaron 12 cepas extraintestinales de *E. coli* con sensibilidad a las cefalosporinas de amplio espectro. La resistencia a los antimicrobianos se determinó por concentración mínima inhibitoria, detección de grupos filogenéticos, factores de virulencia y genes que codifican la resistencia a los antimicrobianos, la determinaron por PCR y la relación clonal se estableció mediante PCR de elementos palindrómicos extragénicos repetitivos (Repetitive Element Palindromic-PCR, REP-PCR).

Los resultados mostraron que todas las cepas presentaron resistencia a las cefalosporinas, quinolonas y aminoglucósidos, la distribución filogenética mostró que los grupos A y B1 fueron los más frecuentes, seguidos por D y B2; en este último, se detectaron todos los factores de virulencia evaluados y el gen más frecuente identificado fue el *fimH*. En todas las cepas analizadas, se encontró *bla*CTX-M, con predominio de las *bla*CTX-M-8, y en dos de estas cepas se reveló la presencia simultánea de *bla*CTX-M-9, variantes *bla*CTX-M-65 y *bla*CTX-M-147.

Concluyendo que las cepas estudiadas demostraron diversidad genética y albergaron diferentes genes de virulencia y  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (ESBL) sin predominio de ningún grupo filogenético en particular. Como tal, constituye el primer reporte de la variante *bla*CTX-M-65 identificada en Venezuela y de la variante *bla*CTX-M-147 en diversas partes del mundo.

## IV. OBJETIVOS

### 4.1 General

Analizar las características antigénicas y genotípicas de cepas de *E. coli* de los serogrupos O16, OR y O25 aisladas de muestras urinarias e intestinales para establecer si dichos serogrupos presentan similitud con la clona O25:H4 ST131 de las cepas UPEC.

### 4.2 Particulares

- Determinar la identidad fenotípica del perfil bioquímico, serogrupo y serotipo de cepas de *E. coli* O16, OR y O25.
- Identificar la presencia de genes de virulencia en las cepas de *E. coli* del patotipo UPEC.
- Determinar la clasificación de los grupos filogenéticos de las cepas de *E. coli* mediante la técnica descrita por Clermont *et al.* (2013).
- Definir el patrón de resistencia a los antimicrobianos de las cepas de *E. coli* de los serogrupos O16, OR y O25.
- Analizar la multirresistencia las cepas de *E. coli* e identificar la presencia de genes de las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido.

## V. HIPÓTESIS

Si las cepas de los serogrupos de O16, OR y O25 de *E. coli* aisladas de infecciones del tracto urinario y de nuestras fecales presentan características fenotípicas y genotípicas de las cepas UPEC, entonces pertenecerán a la clona de *E. coli* O25:H4-ST131.

## VI. ZONA DE ESTUDIO

Las cepas de E. coli provenientes de muestras de pacientes ambulatorios menores a cinco años, identificados con infecciones de vías urinarias no complicadas que acuden a consulta en el Hospital Infantil de México (Figura 7), ubicado en la calle Doctor Márquez 162, Delegación Doctores, Código Postal 06720 en la Ciudad de México.



Figura 7. Hospital Infantil de México (Fuente: Creadores Universitarios, s. d.).

La Ciudad de México colinda al norte, este y oeste con el estado de México y al sur con el estado de Morelos (Figura 8), con coordenadas geográficas al norte  $19^{\circ}35'34''$ ; al sur  $19^{\circ}02'54''$  de latitud norte; al este  $98^{\circ}56'25''$ ; al oeste  $99^{\circ}21'54''$  de longitud oeste, el clima puede variar entre semiseco templado, semifrío húmedo con lluvias abundantes en verano, semifrío subhúmedo con lluvias en verano, de mayor humedad, templado subhúmedo con lluvias en verano, de menor humedad, templado subhúmedo con lluvias en verano, de humedad media, templado subhúmedo con lluvias en verano, de mayor humedad, además, mencionando que posee un total de 8 918 653 habitantes, constituyendo 4 687 003 mujeres y 4 231 650 (Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática [INEGI], 2017).

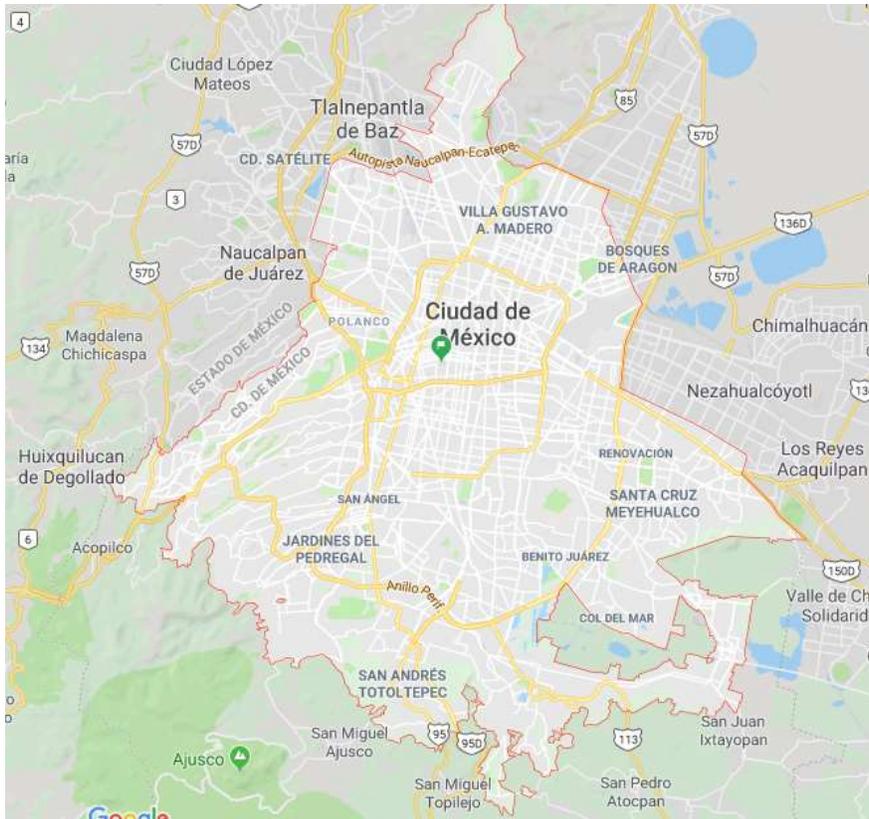


Figura 8. Mapa de la ciudad de México, señalando la ubicación del Hospital Infantil de México (Fuente: Google, s.d).

Con respecto a las cepas de *E. coli* de origen intestinal se obtuvieron de heces de niños menores de cinco años, del Laboratorio de Análisis Clínicos del Instituto Mexicano del Seguro Social en la Ciudad de México y pertenecientes al municipio de Tlaltizapán, del estado de Morelos. El Instituto Mexicano del Seguro Social se encuentra ubicado en calle Roma norte, 06700 Ciudad de México, CDMX.

El municipio de Tlaltizapán colinda al norte con los municipios de Emiliano Zapata, Yautepec y Ayala, al oeste con el municipio de Ayala, al sur con los municipios de Ayala y Tlaquiltenango, al oeste con los municipios de Tlaquiltenango, Jojutla, Zacatepec de Hidalgo, Puente de Ixtla, Xochitepec y Emiliano Zapata (Figura 10), posee un clima cálido subhúmedo con lluvias en verano de menor humedad A (w0) y consta con un total de 9491 habitantes siendo la mayoría mujeres con 4862 y 4629 hombres (INEGI, 1997).

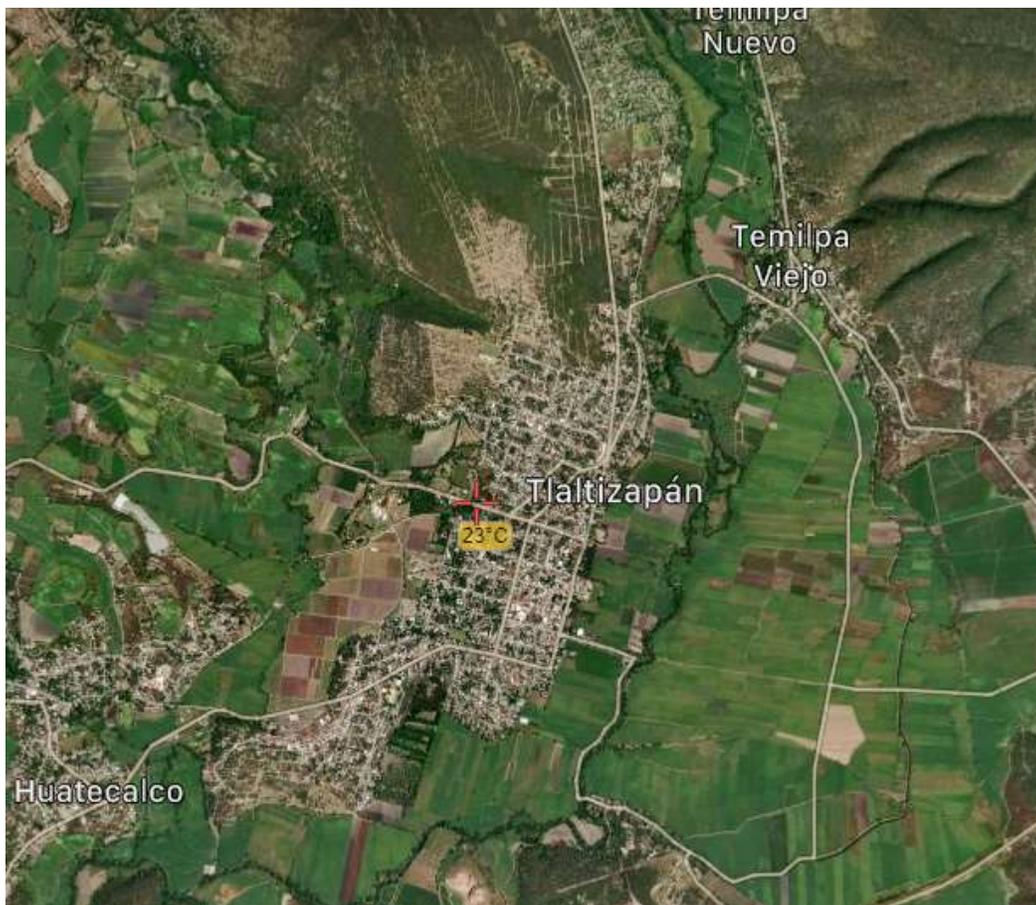


Figura 9. Mapa del estado de Morelos, señalando el municipio de Tlaltizapán (Fuente: Google Earth, s.d).

## **VII. MÉTODO**

### **7.1. ORIGEN DE LAS CEPAS.**

En este estudio se incluyeron cepas de *E. coli* obtenidas de muestras fecales de niños menores de cinco años y de infecciones del tracto urinario.

#### **7.1.1 IDENTIDAD FENOTÍPICA DE LOS AISLADOS DE *E. COLI***

#### **7.1.2 PUREZA Y AISLAMIENTO DE *E. COLI***

Debido a que las que las cepas se conservan en medio de Dorset se confirmó la viabilidad y la pureza. Con respecto a la viabilidad de las cepas, se determinó inoculándolas en agar MacConkey (DIFCO; MI) y se incubaron a 37 °C durante 24h. Posteriormente, de cada placa de agar se eligió una colonia con características de lactosa positiva y se inoculó en tubos de agar soya tripticaseína (TSA) que se consideró como copia de trabajo.

#### **7.1.3 IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA**

La identidad fenotípica de las cepas se realizó utilizando las siguientes pruebas bioquímicas estándares que se prepararon en el laboratorio (Barrow, 1993): lactosa, glucosa, Indol, rojo de metilo, Voges-Proskauer, urea, malonato fenilalanina, movilidad, ácido sulfhídrico, gluconato y citrato de Simons.

### **7.2 CONFIRMACION DE IDENTIDAD ANTIGÉNICA DE LAS CEPAS DE *E. COLI***

La identidad antigénica de las cepas de *E. coli* se realizó utilizando 188 sueros preparados en conejos (SERUNAM) contra los antígenos somáticos (O) y 53 contra los antígenos flagelares (H) del esquema antigénico de *E. coli* de acuerdo con la metodología reportada por Orskov y Orskov (1984).

#### **7.2.1 ANTÍGENOS SOMÁTICOS (O)**

Para obtener el antígeno somático, a partir de las copias de trabajo, las cepas se inocularon en agar TSA en tubos de 16x150 mm y se incubaron a 37 °C durante 24h. Al crecimiento bacteriano del TSA, se agregó solución salina (0.85% de NaCl 0.15M) hasta cubrir el pico de flauta.

El sobrenadante se colocó en tubos de ensaye de 16x150 mm, se calentó a 100°C con vapor fluente durante 1hr. Posteriormente, se le agregó formalina (solución de NaCl 0.15M con 0.6% de formaldehído) y se conservaron a temperatura ambiente hasta su uso.

Para el caso de la identificación del antígeno somático, en microplacas serológicas de 96 pozos de fondo U se distribuyeron 50 µL de cada uno de los 188 sueros anti-O (SERUNAM) del esquema antigénico de *E. coli* diluidos en 1:100.

Se incluyeron sueros anti-O del O1 hasta el O188, adicionalmente, en el sistema de antisueros se incluyeron 50 sueros obtenidos en conejo contra antígenos de *Shigella* (15 de *S. dysenteriae*, 13 de *S. flexneri*, 20 de *S. boydii* y 2 de *S. sonnei*). Posteriormente, las microplacas con las suspensiones suero/antígeno se incubaron a 50°C durante 24h, al finalizar la incubación, se registraron las reacciones de aglutinación.

### **7.2.2 ANTÍGENOS FLAGELARES (H)**

Para la preparación del antígeno H, las cepas de *E. coli* se inocularon en tubos de Craigie con medio semisólido y se incubaron a 30°C durante 14 días aproximadamente.

Cuando en los tubos Craigie hubo presencia de crecimiento bacteriano, se procedió a inocular en caldo biotriptasa y se incubaron a 30 °C durante 24h. Al crecimiento bacteriano se le agregó formalina y se dejó actuar durante 1hr.

Para la identificación del antígeno flagelar, en microplacas serológicas de 96 pozos con fondo U y se distribuyeron 50 µL de cada uno de los 53 sueros (SERUNAM) anti-H de *E. coli* y se incubaron a 50°C durante 2h. Al finalizar la incubación, se registraron las reacciones de aglutinación.

### **7.3 EXTRACCIÓN DE DNA**

Se utilizó el método de ebullición para extraer ADN de las cepas reportado Islam *et al.* (2006). Inicialmente se necesitó que creciera el inóculo en un medio de enriquecimiento, en este caso, caldo Luria-Bertani (LB) en 2.0 mL y se incubaron a 37°C durante 24h.

Del crecimiento bacteriano, se tomó 1 mL y se colocó en un microtubo para centrifugarlo a 13000 rpm durante 5 min, al finalizar, el sobrenadante se decantó muy bien y se le quitó el exceso de agua sobre una tira de papel absorbente.

Posteriormente, al pellet se le adicionó 200  $\mu$ L de agua ultra pura, removiéndolo y re-suspendiéndolo con agitación vigorosa con vórtex, verificando que el tubo se mantenga muy bien tapado.

Se hirvió durante 10 min e inmediatamente se colocó en hielo durante 5 min, asimismo, se volvió a re-suspender el pellet con vórtex hasta homogenizarlo, después se centrifugó a 13000 rpm durante 10 min y del sobrenadante se tomaron 100  $\mu$ L que se pasaron un nuevo microtubo y se congelaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el uso en la PCR.

Se corroboró la integridad del DNA, para esto se mezclaron 2.5  $\mu$ L de colorante azul de bromofenol glicerol con 8  $\mu$ L de DNA, esta misma suspensión, se distribuyó en los pozos de un gel de agarosa al 1.6 % dentro de la cámara de electroforesis (BIO•RAD) con buffer de Tris Borato etilendiamina-tetra acético (TBE) 0.5X. Finalmente, el DNA se visualizó con un programa del digitalizador de imágenes AXYGEN y se tomó una fotografía.

#### **7.4 GRUPOS FILOGENETICOS.**

Para este propósito, se utilizó la técnica de PCR cuádruplex descrita por Clermont *et al.* (2013), para clasificar las cepas de *E. coli* en los grupos filogenéticos (A, B1, B2, C, D, E, F, y clado 1) de acuerdo con la presencia de los genes *arpA*, *chuA*, *yjaA* y TspE4.C2. En el Cuadro 3, se presenta la secuencia de nucleótidos de los iniciadores para identificar los genes del sistema de Clermont.

Cuadro 3. Secuencia de nucleótidos de los iniciadores del cuádruplex (Clermont *et al.*, 2013).

Reacción de PCR	Genes	Nombre del iniciador	Secuencia (5' - 3')	Tamaño (pb)	Ref.
<b>Cuádruplex</b>	<i>chuA</i>	chuA.1b-F chuA.2-R	5-ATGGTACCGGACGAACCAAC-3 5-TGCCGCCAGTACCAAAGACA-3	288	Clermont <i>et al.</i> (2013)
	<i>yjaA</i>	yjaA.1b-F yjaA.2b-R	5-CAAACGTGAAGTGTCAGGAG-3 5-AATGCGTTCCTCAACCTGTG-3	211	
	<i>TspE4</i>	TspE4C2-F TspE4C2.2b-R	5-CACTATTCGTAAGGTCATCC-3 5-AGTTTATCGCTGCGGGTCGC-3	152	
	<i>arpA</i>	AceK.F ArpA1.R	5-AACGCTATTCGCCAGCTTGC-3 5-TCTCCCCATACCGTACGCTA-3	400	
<b>Grupo E</b>	<i>ArpAgpC</i>	ArpAgpE-F ArpAgpE-R	5-GATTCCATCTTGTCAAAATATGCC-3 5-GAAAAGAAAAAGAATTCCAAGAG-3	301	Lescat <i>et al.</i> (2012)
<b>Grupo C</b>	<i>trpAgpC</i>	trpAgpC.1-F trpAgpC.2-R	5-AGTTTTATGCCCAGTGCGAG-3 5-TCTGCGCCGGTCACGCC-3	219	
<b>Control Interno</b>	<i>TrpBA</i>	trpBA.F trpBA.R	5-CGGCGATAAAGACATCTTCAC-3 5-GCAACGCGGCCTGGCGGAAG-3	489	Clermont <i>et al.</i> (2008)

*pb*: pares de bases

*ref*: referencia

## 7.5 FACTORES DE VIRULENCIA.

Para la identificación de los genes de virulencia del patotipo UPEC (*hlyA*, *cnf1*, *fimH*, *sat* y *cdt*) y el gen ST131 de la clona O25:H4, se realizó una PCR con iniciadores previamente reportados por Schmidt *et al.* (1995) y Clermont *et al.* (2009) (Cuadro 4).

Cuadro 4. Secuencia de iniciadores para identificar los factores de virulencia de *E. coli*.

Genes	Nombre del Iniciador	Secuencia (5' - 3')	Tamaño (pb)	Referencia.
<i>hlyA</i>	hly-F hly-R	AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT AC56CATATAAGCGGTCATTCCCCTCA	1177	Yamamoto <i>et al.</i> (1995)
<i>cnf1</i>	cnf1-F cnf1-R	GGCGACAAATGCAGTATTGCTTGG GACGTTGGTTGCGGTAATTTTGGG	468	
<i>fimH</i>	fimH-F fimH-R	TGCAGAACGGATAAGCCGTGG GCAGTCACCTGCCCTCCGGTA	508	Johnson y Stell (2000)
<i>sat</i>	sat-F sat-R	GGTGAGTCCGGTGCATGGGC CAAGTTCCGCCTGCGGCTCA	412	Morales-Espinosa <i>et al.</i> (2016)
<i>cdt</i>	cdt-S1 cdt-S2 cdt-AS1 cdt-AS2	GAAAGTAAATGGAATATAAATGTCCG GAAAATAAATGGAACACACATGTCCG AAATCACCAAGAATCATCCAGTTA AAATCTCCTGCAATCATCCAGTTA	466	Tóth <i>et al.</i> (2003)
ST131 O25:H4	O25pabBs pe.F O25pabBs pe.R	TCCAGCAGGTGCTGGATCGT GCGAAATTTTTTCGCCGTACTGT	347	Clermont <i>et al.</i> (2009)

*pb*: pares de bases

*ref*: referencia

## 7.6 CONDICIONES DE LA PCR PARA GRUPOS FILOGENETICOS Y FACTORES DE VIRULENCIA Y ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA

Para la identificación de cada uno de los genes, la PCR se llevó a cabo en microtubos de 200 µL, donde se preparó una suspensión que contenía agua ultra pura, buffer, dNTP's, iniciadores, Taq-polimerasa y DNA como se muestra en el Cuadro 5. Además, se utilizaron controles positivos, negativos y un blanco el cual contenía los reactivos, excepto DNA.

Una vez preparada la mezcla de la reacción, los microtubos se colocaron en un termociclador (XYGEN), se establecieron las condiciones de los ciclos de extensión para cada uno de los genes, además de alineamiento y elongación de la reacción de PCR como se aprecia en el Cuadro 6.

Cuadro 5. Composición de la mezcla de reactivos utilizados para cada reacción de PCR.

Reactivo (Invitrogen)	GENES							
	<i>arpA</i> , <i>chuA</i> , <i>yjaA</i> , TspE4. C2	Grup os A o C	Grupo s D o E	<i>hlyA</i> / <i>cnf1</i>	ST131 O25:H4	<i>fimH</i>	<i>sat</i>	<i>cdt</i>
(µL)								
Agua ultra pura	6.00	8.7	8.7	7.62	10.05	8.82	9.45	8.25
Buffer	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
MgCl <sub>2</sub>	0.45	0.45	0.45	1.2	0.9	1.2	0.6	0.6
dNTP's	1.5	1.2	1.2	1.5	0.6	1.5	1.5	1.5
Iniciadores	4.35	2.4	2.4	2.4	1.2	1.2	1.2	2.4
Taq	0.6	0.15	0.15	0.18	0.15	0.18	0.15	0.15
DNA	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6
<b>TOTAL</b>	15.00	15.00	15.00	15.00	15.00	15.00	15.00	15.00

Cuadro 6. Condiciones de temperatura (°C) y ciclos de desnaturalización, extensión y alineamiento de la PCR para la amplificación de cada uno de los genes.

Fase	GENES							
	Grupo filo- genético	Grupo A o C	Grupo D o E	<i>hlyA</i> / <i>cnf1</i>	ST131 O25:H4	<i>fimH</i>	<i>sat</i>	<i>cdt</i>
T (°C) / t (min)								
Desnatura- lización inicial	94 / 4	94 / 4	94 / 4	94 / 2	94 / 4	94 / 2	94 / 2	94 / 5
Extensión	94 / 0.5	94 / 0.5	95 / 0.5	94 / 1	94/0.05	94 / 1	94 / 1	94 / 1
Alineamiento	58 / 0.20	58 / 0.20	58 / 0.20	63 / 1	65 / 0.10	63 / 1	60.5 / 1	55 / 1
Elongación	72 / 0.40	72 / 0.40	72 / 0.40	72 / 1	72 / 5	72 / 1	72 / 1	72 / 1
Extensión final	72 / 5	72 / 5	72 / 5	72 / 2	72 / 5	72 / 2	72 / 2	72 / 10
% Agarosa	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6

Al finalizar la PCR, se tomaron 8  $\mu\text{L}$  de los amplicones obtenidos, se mezclaron con 2.5  $\mu\text{L}$  de colorante azul de bromofenol glicerol y se distribuyeron en los pozos de un gel de agarosa de 1.6 %. El gel se colocó en una cámara de electroforesis (BIO•RAD) con una solución amortiguadora TBE 0.5X, aplicándole corriente de 100 voltios (V), en cada uno de los geles.

Además de los amplicones, se colocó un marcador de peso molecular de 1600 pb y un blanco que contenía los reactivos para la reacción de la PCR, con excepción del DNA.

El gel se tiñó con colorante Red-Gel y al finalizar, se visualizó el producto amplificado con un programa digitalizador de imágenes AXYGEN y se tomó una fotografía.

## **7.7 RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS**

Mediante el método difusión de agar de Kirby-Bauer se establecieron patrones de resistencia a los  $\beta$ -lactámicos utilizando el método reportado en la décima edición del manual Comité Nacional de Normas de Laboratorio Clínico (CLSI, 2018).

En este ensayo, se evaluó la sensibilidad a los siguientes antimicrobianos: cefoxitina (FOX) 30  $\mu\text{g}$  (cefalosporinas 2 generación), ceftriaxona (CRO) 30  $\mu\text{g}$ , ceftazidima (CAZ) 30  $\mu\text{g}$ , cefotaxima (CTX) 30  $\mu\text{g}$  (cefalosporinas 3<sup>a</sup> generación), cefepima (FEP) 30  $\mu\text{g}$  (cefalosporinas 4<sup>a</sup> generación), ofloxacina (OFX) 5  $\mu\text{g}$ , norfloxacin 10  $\mu\text{g}$  (NOR), ácido nalidíxico (NA) 30  $\mu\text{g}$ , ciprofloxacina (CIP) 5  $\mu\text{g}$ , imipinem (IMP) 10  $\mu\text{g}$ , aztreonam (ATM) 30  $\mu\text{g}$ , trimetoprim/sulfametoxazol (SXT) 1.25/23.73  $\mu\text{g}$  y tetraciclina (TE) 30  $\mu\text{g}$ .

### **7.7.1 DIFUSIÓN DE AGAR - MÉTODO DE KIRBY BAUER**

Se prepararon 7 placas con agar TSA y 88 placas de agar Mueller Hinton (M-H) estandarizadas con 20 mL, se incubaron a 37°C durante 24h para prueba de esterilidad. Además, 50 tubos con 1.8 mL con solución salina estéril.

Al día siguiente, de cada una de las cepas, con el asa se tomó un inóculo y se sembró en octavos en las placas de TSA, al final, se incubaron a 37°C durante 24h

para obtener un cultivo fresco. En el ensayo se incluyeron dos cepas controles de *E. coli* ATCC 25922 y *E. coli* ATCC 35218.

Del crecimiento bacteriano de cada una de las cepas en las placas de TSA, se tomó un inóculo para preparar una suspensión bacteriana en tubos con 1.8 mL de solución salina fisiológica estéril, se agitó con vórtex hasta homogenizarlo y se ajustó al tubo 0.5 del Nefelómetro de McFarland ( $1.5 \times 10^8$  bacterias/mL).

Después de ajustar la suspensión bacteriana, en un tiempo no mayor a 15 min, se sumergió un hisopo de algodón estéril y se escurrió el exceso de la suspensión girando el hisopo en las paredes del tubo, el hisopo impregnado con la suspensión bacteriana se utilizó para sembrar de forma masiva dos placas de agar M-H.

Una vez realizada la siembra masiva, a una de las placas se le colocó con pinzas estériles 7 sensidiscos y a la otra placa 6 sensidiscos de cada antimicrobiano (BBL Sensi Disc BD <sup>TM</sup>) a una distancia no menor a 24 mm entre ellos.

Finalmente, las placas de M-H con los sensidiscos se incubaron a 37 °C durante 24h, al término de la incubación, con un vernier se tomaron medidas del diámetro de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano.

En el Cuadro 7, se presentan los diámetros de inhibición de cada uno de los antimicrobianos recomendados por la CLSI para considerar el ensayo como resistente, intermedio o sensible.

Cuadro 7. Interpretación del diámetro de inhibición de los antibióticos (CLSI, 2018).

Agente antimicrobiano	Código	Concentración del disco (µg)	Diámetro recomendado (mm)		
			R	I	S
Cefoxitina	FOX	30	≤ 14	15-17	≥ 18
Ceftriaxona	CRO	30	≤ 19	20-22	≥ 23
Ceftazidima	CAZ	30	≤ 17	18-20	≥ 21
Cefotaxima	CTX	30	≤ 22	23-25	≥ 26
Cefepima	FEP	30	≤ 18	19-24	≥ 25
Ofloxacina	OFX	5	≤ 12	13-15	≥ 19
Norfloxacina	NOR	10	≤ 12	13-16	≥ 17
Ácido Nalidíxico	NA	30	≤ 13	14-18	≥ 19
Ciprofloxacina	CIP	5	≤ 15	16-20	≥ 21
Imipenem	IPM	10	≤ 19	20-22	≥ 23
Aztreonam	ATM	30	≤ 17	18-20	≥ 21
Trimetoprim/ Sulfametoxazol	STX	25	≤ 10	11-15	≥ 16
Tetraciclina	TE	30	≤ 11	12-14	≥ 15

R: resistente  
I: intermedio  
S: sensible

## 7.8 DETECCIÓN DE GENES RELACIONADOS CON LA PRODUCCIÓN DE β-LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (ESBL).

### 7.8.1 DETECCIÓN FENOTÍPICA DE ESBL

Se realizó un ensayo mediante el método difusión de agar de Kirby-Bauer que se explica con anterioridad en el apartado 7.7.1, donde se establecieron patrones de resistencia utilizando el método reportado en la décima edición del manual Comité Nacional de Normas de Laboratorio Clínico (CLSI, 2018).

En este ensayo, se evaluó la sensibilidad a los siguientes antimicrobianos: ceftriaxona (CRO) 30 µg (cefalosporinas 3ª generación), cefuroxima (CXM) 30 µg (cefalosporinas 2ª generación), finalmente amoxicilina y ácido clavulánico (AMC) 20/10 µg.

En el Cuadro 8, se presentan los diámetros de inhibición de cada uno de los antimicrobianos recomendados por la CLSI para considerar el ensayo como resistente, intermedio o sensible para la detección de las ESBL.

Cuadro 8. Interpretación del diámetro de inhibición de los antibióticos para las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (ESBL) (CLSI, 2018).

Agente antimicrobiano	Código	Concentración del disco ( $\mu$ g)	Diámetro interpretativo (mm)		
			R	I	S
Ceftriaxona	CRO	30	$\leq 19$	20-22	$\geq 23$
Cefuroxima	CXM	30	$\leq 14$	15-22	$\geq 23$
Amoxicilina / ácido clavulánico	AMC	30	$\leq 13$	14-17	$\geq 18$

R: resistente  
I: intermedio  
S: sensible

### 7.8.2 DETECCIÓN DE INTEGRONES POR PCR

Para esto, inicialmente se necesitaron primers específicos de los integrones 1 y 2 como se muestran en el cuadro 9. La PCR se llevó a cabo en microtubos de 200  $\mu$ L, se preparó una suspensión que contenía agua ultra pura, buffer, dNTP's, iniciadores, Taq-polimerasa y DNA (Cuadro 10). Además, se utilizó un control positivo (ECOR3, FMU91022) y negativo (FMU111974, *Shigella flexneri* 2a), un blanco el cual contenía los reactivos, excepto DNA.

Una vez preparada la mezcla de la reacción, los microtubos se colocaron en un termociclador (AXYGEN), se establecieron las condiciones de los ciclos de extensión, alineamiento y elongación de la reacción de PCR como se aprecia en el Cuadro 11.

Al finalizar, se tomaron 8  $\mu$ L de los amplicones obtenidos, se mezclaron con 2.5  $\mu$ L de colorante azul de bromofenol glicerol, se distribuyeron en los pozos de un gel de agarosa de 1.6 %, se colocó un marcador de peso molecular de 1600pb. El gel se colocó en una cámara de electroforesis (BIO•RAD) con una solución amortiguadora TBE 0.5X, aplicando corriente de 100 voltios (V), en cada uno de los geles.

El gel se tiñó con colorante Red-Gel y al finalizar, se visualizó el producto amplificado con un programa digitalizador de imágenes AXYGEN y se tomó una fotografía.

Cuadro 9. Secuencia de nucleótidos de los integrones 1 y 2.

PCR	Secuencia (5' – 3')	Tamaño (pb)	Referencia
Integrón 1	<i>Int1-F</i> GGTC AAGGATCTGGATTTTCG <i>Int1-R</i> ACATGCGTGTA AATCATCGTC	483	Mazel <i>et al.</i> (2000)
Integrón 2	<i>Intl2-F</i> CACGGATATGCGACAAAAAGGT <i>Intl2-R</i> GTAGCAAACGAGTGACGAAATG	788	Mazel <i>et al.</i> (2000)

*pb*: pares de bases

*ref*: referencia

Cuadro 10. Composición de la mezcla de reactivos utilizados para las reacciones de PCR.

Reactivo (Invitrogen)	Integrón 1 y 2 (µL)
Agua ultra pura	10.08
Buffer	1.5
MgCl <sub>2</sub>	0.9
dNTP's	0.6
Iniciadores	1.2
Taq	0.12
DNA	0.6
<b>TOTAL</b>	<b>15.00</b>

Cuadro 11. Condiciones de temperatura (°C) y ciclos de desnaturalización, extensión y alineamiento de la PCR para la amplificación de cada uno de los integrones.

Fase	INTEGRONES	
	1	2
<b>T (°C) / t (min)</b>		
Desnaturalización inicial	94 / 5	94 / 5
Extensión	94 / 0.30	94 / 0.30
Alineamiento	62 / 0.30	62 / 0.30
Elongación	72 / 1	72 / 1
Extensión final	72 / 8	72 / 8
% Agarosa	1.6	1.6

## VIII. RESULTADOS

Se analizaron un total de 37 cepas, de las cuales 20 fueron de origen fecal de niños menores de cinco años del estado de Morelos y 17 de infecciones del tracto urinario de pacientes del Hospital Infantil de México de la Ciudad de México, en el Cuadro 12, se observa el porcentaje total de cepas y su fuente de aislamiento.

Cuadro 12. Origen de las cepas de *E. coli* del estudio.

Origen	N (%)
Fecal	20 (54.05)
UTIs	17 (45.94 %)

N: número.

### 8.1 IDENTIDAD FENOTÍPICA

Después de transportar las muestras al laboratorio, se realizó una prueba de viabilidad en el medio selectivo Agar MacConkey (Figura 10).

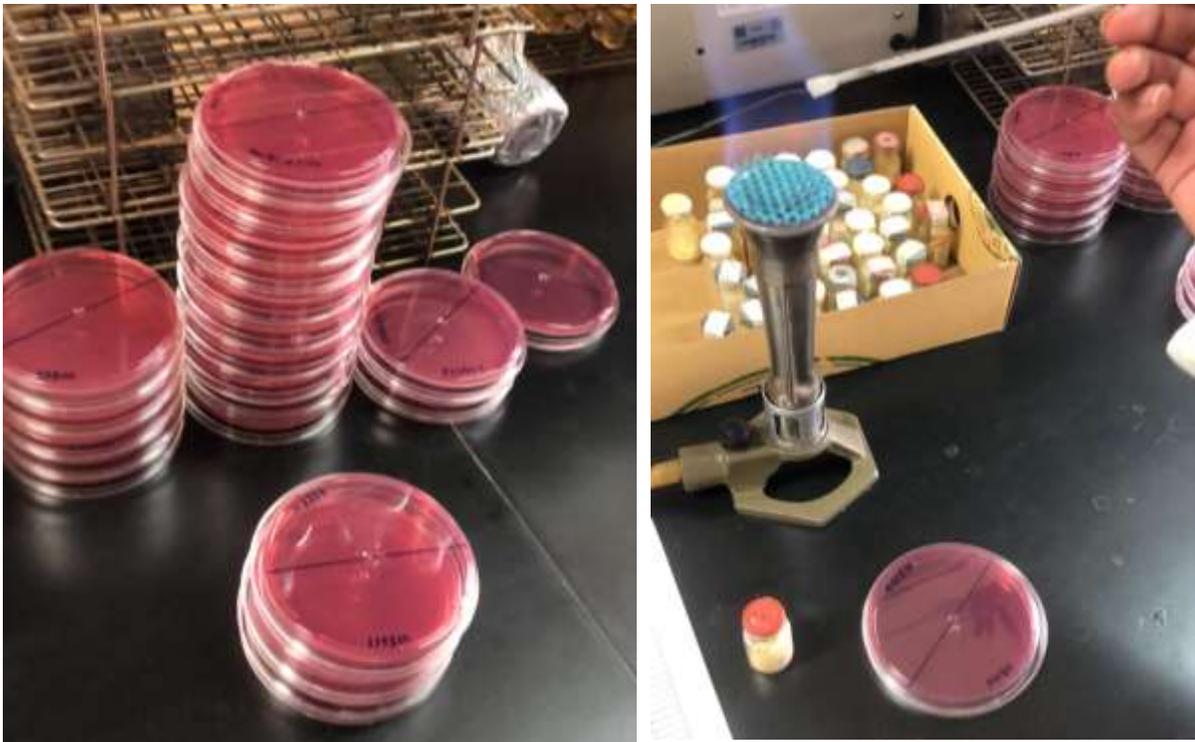


Figura 10. Placas de Petri con medio selectivo Agar - MacConkey.

Como resultado de esta prueba, se obtuvieron dos tipos de colonias de *E. coli* blanquecinas y rojo grosella, como se aprecia en la Figura 11. Las colonias blanquecinas indican que no hay consumo de lactosa o que la utilizan lentamente, por lo tanto, el indicador rojo neutro no se activó; por el contrario, las colonias rojizas indican el consumo de la lactosa del agar MacConkey, por lo tanto, se asume la pureza de las cepas de origen fecal y de vías urinarias y el 100% corresponden a *E. coli*.



Figura 11. Cepas de *E. coli* cultivadas en medio selectivo – Agar MacConkey.

## 8.2 IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA

Con base a los resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas, se confirmó que las cepas de estudio eran *E. coli*.

El perfil bioquímico evaluado consistió en fermentación de glucosa, lactosa, producción de Indol, rojo de metilo, Voges-Proskauer, urea, malonato, fenilalanina, movilidad, ácido sulfhídrico, gluconato y citrato de Simmons, los resultados se observan en el Cuadro 13.

Cuadro 13. Resultados de pruebas bioquímicas de las cepas de *E. coli*.

PRUEBA	RESULTADO
Fermentación de glucosa	+
Fermentación de lactosa	+
Indol	+
Rojo de metilo	+
Voges-Proskauer	-
Desaminación fenilalanina	-
Malonato	-
Ureasa	-
Ácido sulfhídrico	-
Gluconato	-
Citrato de Simmons	-

### 8.3 SEROTIPIFICACIÓN

La tipificación serológica de las cepas de *E. coli* de origen fecal permitió la identificación de dos serogrupos; O16, O25, así mismo, una no tipificable (O?) y dos rugosas (OR), como puede apreciarse en el Cuadro 14.

Cuadro 14. Frecuencia de serogrupos en 20 cepas de *E. coli* aisladas de muestras fecales.

Serotipificación de cepas de origen fecal	SEROGRUPOS	Número de cepas (%)
Tipificables	O16	8 (40)
	O25	9 (45)
Rugosos	OR	2 (10)
No tipificables	O?	1 (5)
Total		20 (100)

Para las cepas de *E. coli* aisladas de infecciones de vías urinarias se identificaron dos serogrupos: O16, O25, una no tipificable (O?) y cinco rugosas (OR), como puede apreciarse en el cuadro 15.

Cuadro 15. Frecuencia de serogrupos en 17 cepas de *E. coli* aisladas de muestras urinarias.

Serotipificación de cepas de UTIs	SEROGRUPOS	Número de cepas (%)
Tipificables	O16	6 (35.3)
	O25	5 (29.4)
No tipificables	O?	1 (5.9)
Rugosos	OR	5 (29.4)
Total		17 (100)

Finalmente, una vez obtenidos los serotipos de las cepas se realizó una gráfica de frecuencias (Figura 12).

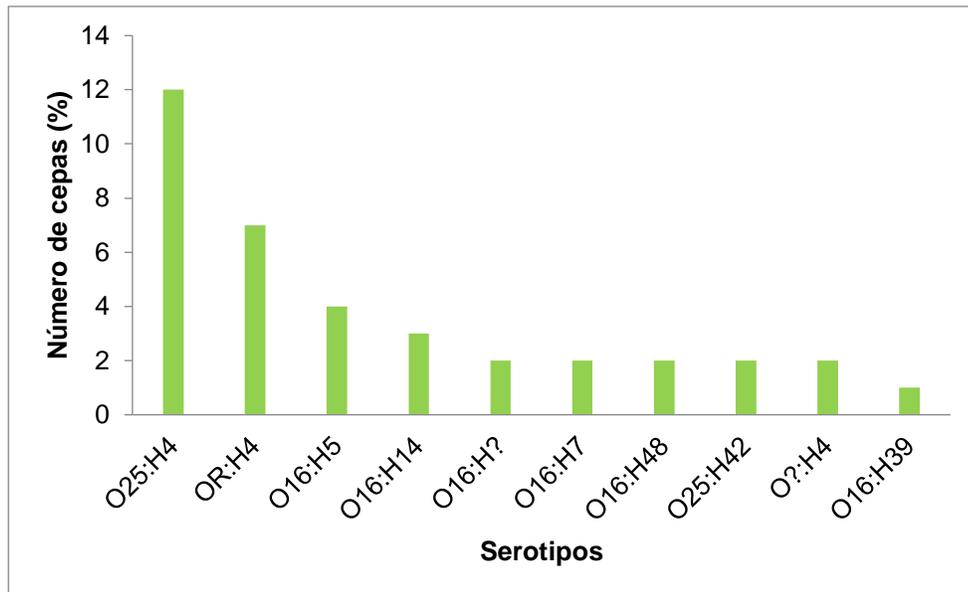


Figura 12. Frecuencia de serotipos de cepas de *E. coli* aisladas de muestras urinarias e intestinales.

## 8.4 FACTORES DE VIRULENCIA

Los genes de virulencia encontrados para las cepas aisladas de origen fecal fueron: 20 (100%) cepas positivas para el gen *O25 ST131*, para el gen *fimH* fueron 16 (80%), para el gen *sat 11* (55%) cepas, por lo contrario, los genes *hlyA/cnf1*, *cdt* no se detectaron en las cepas del estudio.

Con el propósito de conocer si hubo diferencias significativas entre los genes presentes en ambos tipos de cepas se realizó un análisis de  $X^2$  de proporciones. El análisis, no mostró diferencias significativas ( $p>0.05$ ) entre los genes *O25 ST131*, *fimH* y en el gen *sat* (Cuadro 16).

Cuadro 16. Análisis de  $X^2$  de proporciones de las cepas de *E. coli*.

ORIGEN DE LAS CEPAS	GENES		
	O25-ST131	<i>fimH</i>	<i>sat</i>
	<b>N (%)</b>		
<b>UTIs</b>	17 (100)	17 (100)	14 (82)
<b>Fecales</b>	20 (100)	16 (80)	11 (55)
<b>p*</b>	>0.05	>0.05	>0.05

\*p:  $X^2$  de proporciones

Además, se realizó un el análisis de  $X^2$  de proporciones para calcular el puntaje de virulencia por cada cepa, con el fin de conocer si hay diferencias significativas, en el cual, no se encontraron diferencias significativas entre los dos tipos de muestras en cuanto a contenido de genes de virulencia.

Cuadro 17. Análisis de  $X^2$  de proporciones de puntaje de virulencia de las cepas de *E. coli*.

<b>N</b>	<b>CEPAS CON 2 O MÁS GENES DE VIRULENCIA</b>	<b>%</b>
<b>20</b>	11	55
<b>17</b>	14	82.4

$p= 0.0079$

\*p:  $X^2$  de proporciones

De forma general, en ambos grupos de cepas los genes que tuvieron mayor frecuencia fueron O25 ST131 con 37 (100%) cepas positivas (Figura 13), *fimH* con 33 (89.2%) cepas positivas (Figura 14), el gen *sat* lo presentaron 25 (67.6%) cepas positivas (Figura 15), en los genes *hlyA-cnf1* y *cdt* se observó ausencia total con 0 (0%) cepas (Figuras 16 y 17).

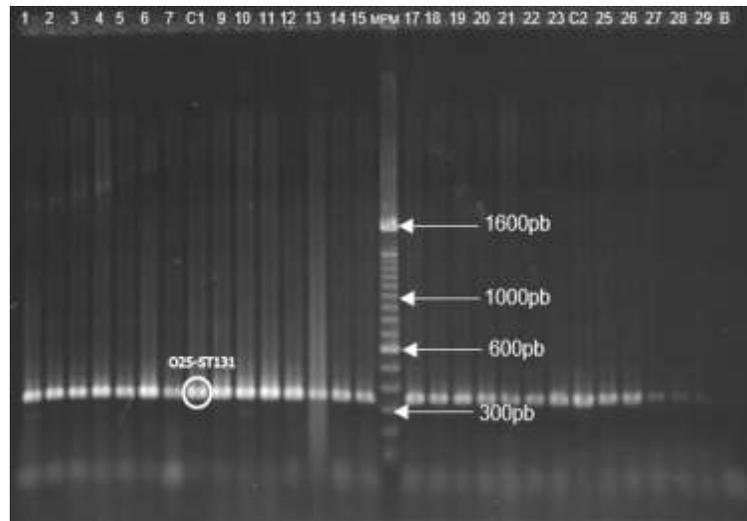


Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa al 1.0% de los amplicones del gen *O25-ST131* (347pb). Carriles: 1-6 (MF), 7 (MTU), 8 C1 (115122), 9-13 (MU), 14-15 (MF), 16 (MPM), 17-23 (MF), 24 C2 (115148), 25 (MF), 26-29 (MU), 30 blanco.

*MF*: muestras fecales

*MU*: muestras urinarias

*MPM*: marcador de peso molecular

*C1*: control 1

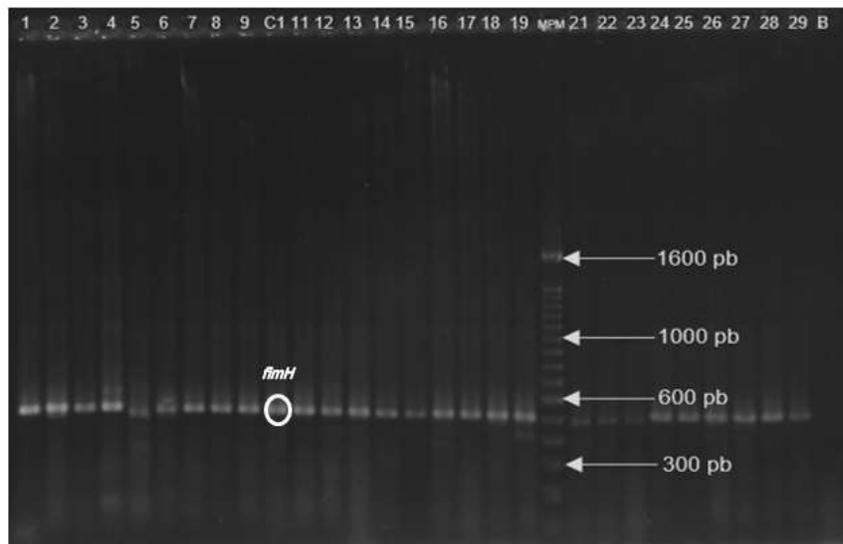


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa al 1.0% de los amplicones del gen *fimH* (508pb). Carriles: 1-6 (MF), 7-9 (MU), 10 C1 (120671), 11-13 (MU), 14-19 (MF), 20 (MPM), 21-24 (MF), 25-29 (MU), 30 blanco.

*MF*: muestras fecales

*MU*: muestras urinarias

*MPM*: marcador de peso molecular

*C1*: control 1.

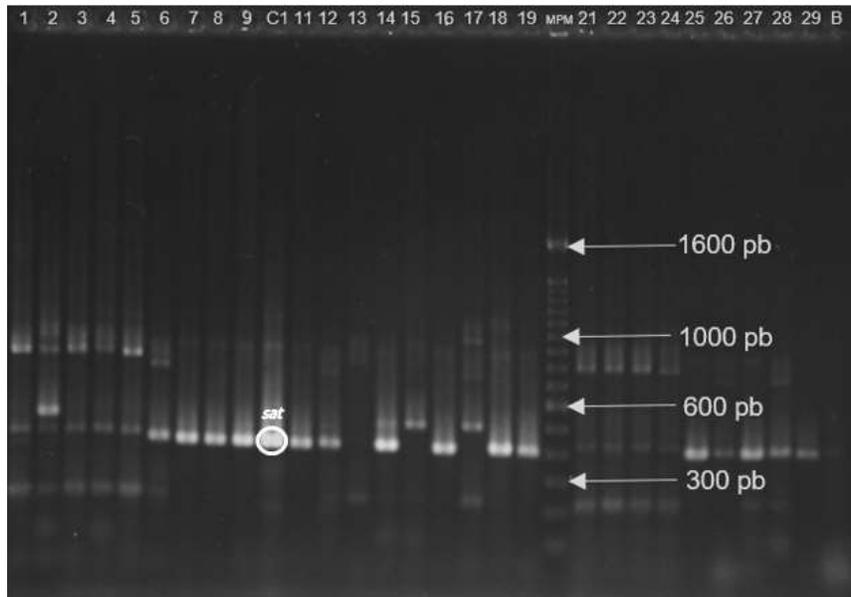


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa al 1.0% de los amplicones del gen *sat* (412pb). Carriles: 1-6 (MF), 7-9 (MU), 10 C1 (116979), 11-13 (MU), 14-19 (MF), 20 (MPM), 21-24 (MF), 25-29 (MU), 30 blanco.

MF: muestras fecales

MU: muestras urinarias

MPM: marcador de peso molecular

C1: control 1.

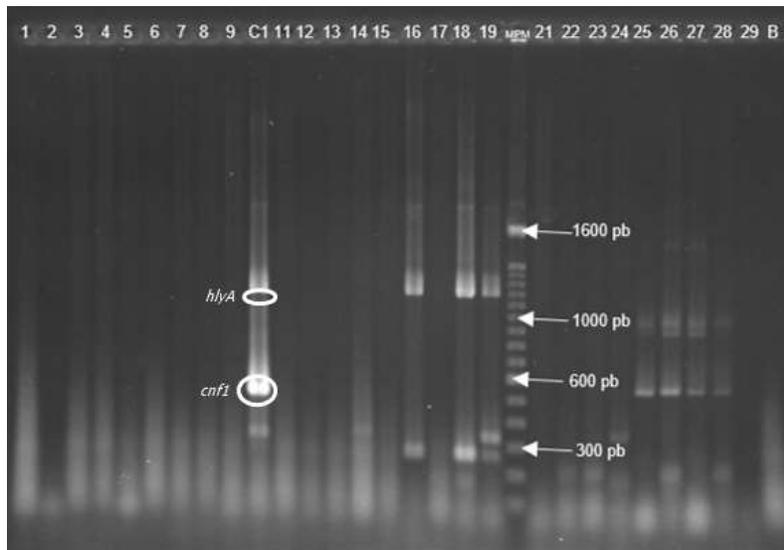


Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa al 1.0% de los amplicones de los genes *hlyA* (1177pb) y *cnf1* (498pb). Carriles: 1-6 (MF), 7-9 (MU), 10 C1 (E 57), 11-13 (MU), 14-19 (MF), 20 (MPM), 21-24 (MF), 25-29 (MU), 30 blanco.

MF: muestras fecales

MU: muestras urinarias

MPM: marcador de peso molecular

C1: control 1.

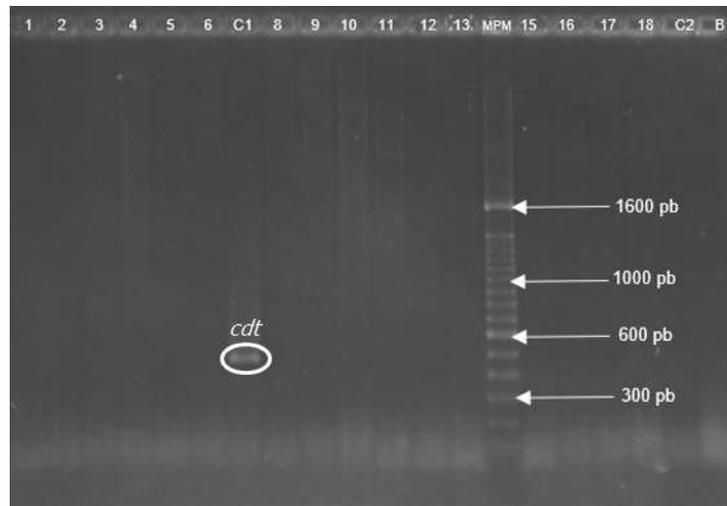


Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa al 1.0% de los amplicones del gen *cdt* (466pb). Carriles: 1-6 (MF), 7 C1 (E6448/62), 8-13 (MU), 14 (MPM), 15-18 (MF), 19 C2 (DH5 (K12), 20 blanco.

*MF*: muestras fecales

*MU*: muestras urinarias

*MPM*: marcador de peso molecular

*C1*: control 1.

## 8.5 GRUPOS FILOGENÉTICOS

Para establecer los grupos filogenéticos de las cepas de *E. coli* se utilizó el esquema de Clermont *et al.* (2013), de acuerdo con la ausencia o presencia de los genes *arpA*, *chuA*, *yjaA* y al fragmento TspE4.C2, mediante una PCR cuádruplex (Figura 18).

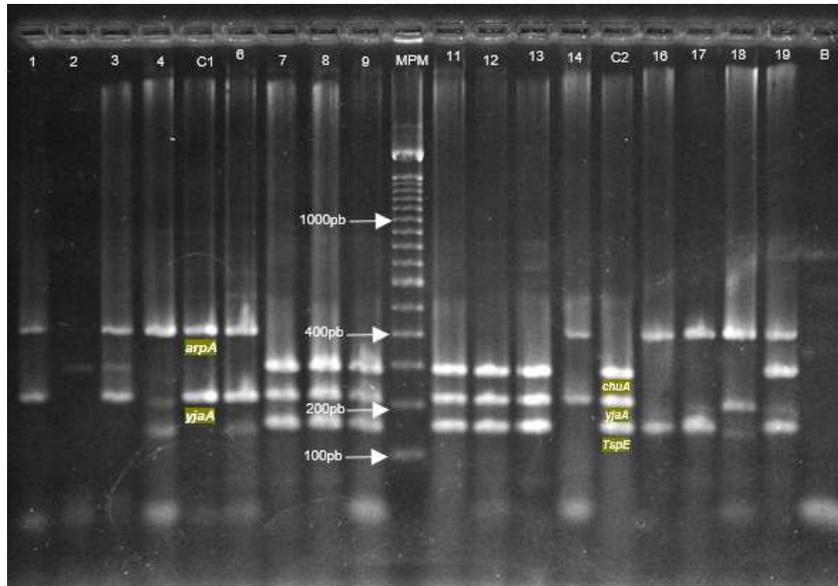


Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa al 1.0% de los amplicones al 1.8% de los amplicones de *arpA* (400pb), *chuA* (288pb), *yjaA* (211pb) y *TspE* (152 pb). Carriles: 1-4 (MF), 5 C1 (K12) para *arpA* y *yjaA*, 6-7 (MF), 8-9 (MU), 10 (MM), 11-14 (MU), 15 C2 (116979) para *chuA*, *yjaA*, *TspE*, 16-19 (MF), 20 blanco.

*MF*: muestras fecales

*MU*: muestras urinarias

*MPM*: marcador de peso molecular

*C1*: control 1

*C2*: control 2.

La distribución de los grupos filogenéticos fue agrupada de la siguiente forma: de las cepas aisladas de muestras fecales 9 (45%) cepas se ubicaron en el grupo A, 6 (30%) cepas en B2, 2 (10%) cepas en B1 y finalmente en el grupo D y categoría ND, una (5%) cepa para cada uno.

Para el caso de las cepas aisladas de infecciones de vías urinarias, 13 (76.5%) cepas se ubicaron en el grupo B2, 2 (11.8) cepas en el grupo A, 1 (5.9%) cepa en el grupo D y 1 (5.9%) cepa en no determinado.

En el cuadro 17, se aprecian los grupos filogenéticos obtenidos con mayor frecuencia, es el caso del grupo B2 que presenta una alta representación con un total de 19 cepas que representando el 51.4% siendo aproximadamente más de la mitad de las cepas estudiadas, seguido del grupo A con 11 cepas que representa el 29.8% y finalmente con una menoría los grupos B1, D y la categoría ND con 2 cepas representando 5.4% cepas cada uno. Además, se realizó un análisis de  $X^2$  de proporciones para conocer sí hubo diferencias significativas entre los filogrupos presentes en ambos tipos de cepas.

El análisis estadístico mostró diferencias significativas entre grupos filogenéticos A y B2. Por lo que respecta a las cepas de infecciones de vías urinarias el filogrupa B2 fue el más frecuente y en segundo lugar el grupo A.

Cuadro 18. Frecuencia de los grupos filogenéticos con base a las cepas aisladas de muestras urinarias e intestinales. Y análisis estadístico  $X^2$  de proporciones.

ORIGEN DE LAS CEPAS	GRUPOS FILOGENÉTICOS					TOTAL
	A	B1	B2	D	ND	
	N (%)					
FECALES	9 (45.0)	2 (10)	6 (30.0)	1 (5.0)	2 (10)	20
TRACTO URINARIO	2 (11.8)		13 (76.5)	1 (5.9)	1 (5.9)	17
<b>TOTAL</b>	11 (29.7)	2 (5.4)	19 (51.4)	2 (5.4)	3 (8.10)	37
<b>*p</b>	0.03	>0.05	0.005	>0.05	>0.05	

N: Número

ND: No determinado

## 8.6 RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS

Respecto al análisis de sensibilidad a los antimicrobianos, se determinó que 30 (81.1%) de las 37 cepas de presentaron resistencia a uno o más antimicrobianos (Figura 19).

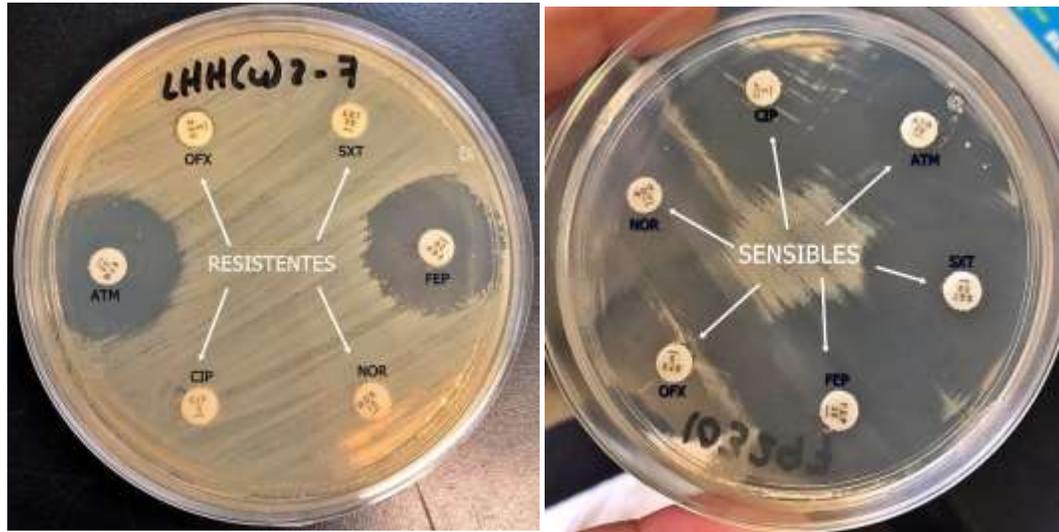


Figura 19. Halos de inhibición y de resistencia a los antimicrobianos. Del lado derecho se muestran halos de crecimiento bacteriano de la cepa (103297) sensible a seis antibióticos, lado izquierdo se observan 2 halos de inhibición y cuatro de resistencia a NOR, CIP, SXT y OFX de la cepa (LHH(U) 2-7).

De estas 30 cepas, 24 (80%) presentaron resistencia a tetraciclina, 17 (56.7%) a ácido nalidíxico, 12 (40%) a trimetoprim/sulfametoxazol, 11 (36.7%) a norfloxacin, ciprofloxacina y ofloxacina, 9 (30%) ceftriaxona, 8 (26.7%) a cefotaxima, 3 (10%) para ceftazidima, 2 (6.7%) ceftazidima, aztreonam y cefepima, finalmente para imipenem (IPM) todas las cepas fueron sensibles (Cuadro 18). Por otra parte, las dos cepas control de *E. coli*, no presentaron resistencia a algún antimicrobiano.

Cuadro 19. Patrón de resistencia a los antimicrobianos de las cepas de *E. coli*.

ORIGEN	Serotipo (O:H)	No. de cepas	β-lactámico							Fluoroquinolonas				Tetraciclina	Trimetoprim / sulfametoxazol	Integrones	
			ATM	IPM	FOX	CRO	CTX	CAZ	FEP	NA	CIP	NOR	OFX	TE	STX	1	2
FECALES	O?:H4	1															
	OR:H4	2											1	1	2	1	
	O16:H7	2											2				
	O16:H14	3											3		1		
	O16:H48	2															
	O16:H39	1											1				
	O25:H4	7			2	3	2	2		4	2	2	2	6	4	2	
	O25:H42	2												2			
URINARIAS	OR:H4	5	1			1	1	1	1	5	4	4	4	2	3		
	O?:H4	1	1			1	1							1			
	O16:H?	2															
	O16:H5	4				1	1			3	1	1	1	3	1		
	O25:H4	5				3	3		1	5	4	4	4	3	3	2	2
<b>TOTAL N (%)</b>		37	2 (5.4)	0	2 (5.4)	9 (24.3)	8 (21.6)	3 (8.10)	2 (5.4)	17 (45.9)	11 (29.7)	11 (29.7)	11 (29.7)	24 (64.8)	12 (32.4)	7 (18.9)	3 (8.1)

O:H:serotipos

Respecto a las cepas aisladas de muestras fecales, se obtuvo que de las 20 (100%) cepas analizadas de *E. coli*, al menos 17 (85%) presentaron resistencia a algún antimicrobiano.

De estas 17 cepas, 15 (88.2%) presentaron resistencia a tetraciclina (TE), 5 (29.4%) a trimetoprim/sulfametoxazol (SXT), 4 (23.6%) a ácido nalidíxico (NA), 3 (17.7%) para ceftriaxona (CRO), 2 (11.8%) para norfloxacin (NOR), ciprofloxacina (CIP), ofloxacina (OFX), ceftazidima (CAZ), cefotaxima (CTX) y para cefoxitina (FOX), y finalmente, aztreonam (ATM), cefepima (FEP) e imipenem (IPM). Adicionalmente, se determinó el porcentaje de cepas Multi droga resistentes (MDR) y extremadamente resistentes (XDR), en este caso, fueron 7 cepas MDR, siendo el 18.91%.

### **8.7 $\beta$ -LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (ESBL).**

De acuerdo con el ensayo realizado, de las 37 (100%) cepas se obtuvo presencia de al menos 13 (35.2%) cepas positivas con presencia de ESBL + (Figura 20). Más un control positivo (122421).

De estas 13 cepas, 6 (46.2%) presentaron resistencia a amoxicilina/ácido clavulánico (AMC), 3 (36.1%) cepas presentaron resistencia a cefuroxima (CXM) y 0 para ceftriaxona (CRO).

De las 20 muestras aisladas de origen fecal, se encontraron 5 (25%) cepas positivas, mientras que, de las 17 muestras aisladas de infecciones de vías urinarias, solamente se obtuvieron 2 (11.8%) de cepas positivas. Por lo que, de forma general, en ambos grupos obtuvieron un total de 7 muestras positivas para el integrón 1 siendo el 18.9 % (Figura 21).



Figura 20. Halos de inhibición de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido positivas de las cepas de *E. coli*.

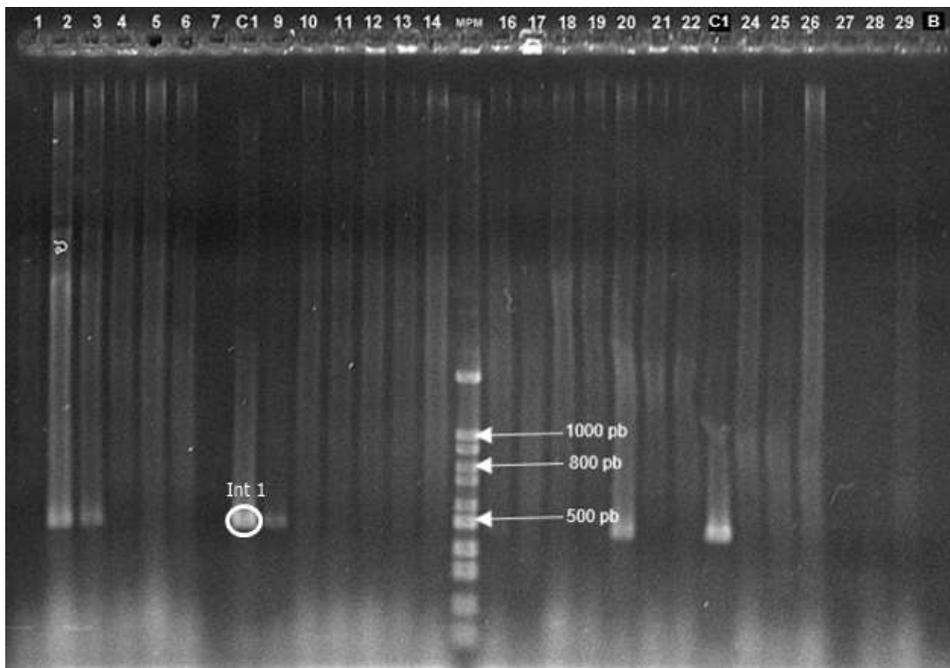


Figura 21. Electroforesis en gel de agarosa al 1.0% de los amplicones del integrón 1 (483pb). Carriles: 1-7 (MF), 8 C1, 9-14 (MF), 15 (MPM), 16-21 (MF), 22 (MU), 23 C1, 24-29 (MU), 30 blanco.

*MF*: muestras fecales

*MU*: muestras urinarias

*MPM*: marcador de peso molecular

*C1*: control 1

Respecto al integrón 2, de las 20 muestras aisladas de origen fecal, se encontró una 1 (5%) cepa positiva, mientras que, de las 17 muestras aisladas de infecciones de vías urinarias, se obtuvieron 2 (11.8%) cepas positivas. Por lo que, en ambos grupos obtuvieron un total de 3 muestras positivas para el integrón 2, siendo un 8.1 % (Figura 22).

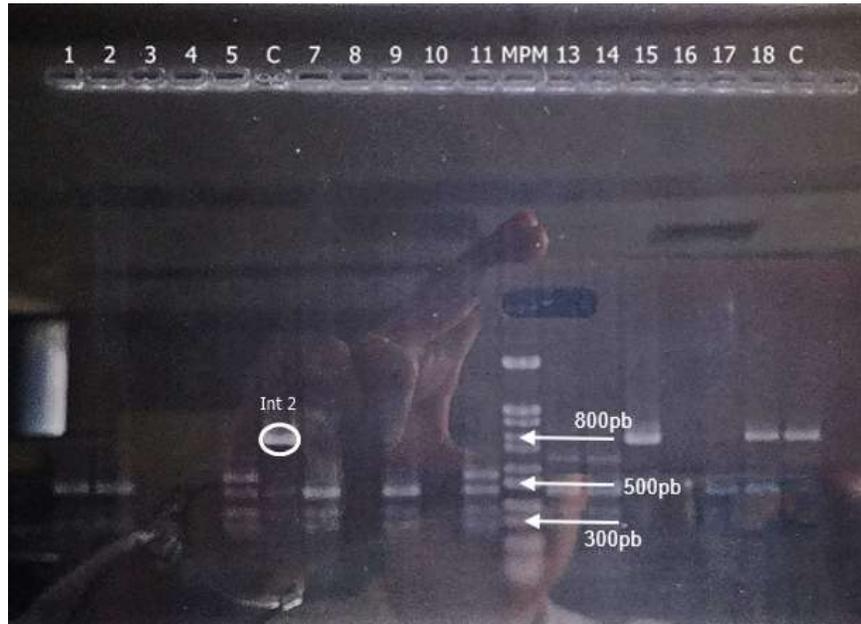


Figura 22. Electroforesis en gel de agarosa al 1.0% de los amplicones del integrón 2 (788pb). Carriles: 1-5 (MU), 6 C1, 7-11 (MU), 12 (MPM), 13-18 (MU), 19 C1.

*MF*: muestras fecales

*MU*: muestras urinarias

*MPM*: marcador de peso molecular

*C1*: control 1

## IX. DISCUSIÓN

### IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA Y BIOQUÍMICA

Se han realizado distintos estudios con el fin de conocer la incidencia de infecciones de vías urinarias y de diarrea, además de que el tamaño de la población continúa incrementando, esto va siendo un problema cada vez más importante para la salud pública de México y varias regiones del mundo. Como bien se ha mencionado anteriormente, *E. coli* es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo de la familia Enterobacteriaceae, tribu Escherichia (Rodríguez-Ángeles, 2002), generalmente es ubicua, se encuentra en la microbiota intestinal de humanos y también de los animales (Chaudhuri y Henderson, 2012), además, se puede encontrar en el medio ambiente, el suelo, arena, sedimentos de esteros y de agua dulce y ambientes templados, tropicales y subtropicales (Jang *et al.*, 2017). Es por ello que las ITUs adquiridas en la comunidad, el agente causal más frecuente es *E. coli*, en especial en las infecciones urinarias no complicadas que van del 80-90% y cuando son adquiridas en el hospital, se aísla en el 50% de los casos (González-Monte, 2012).

Para llevar a cabo la identificación fenotípica de las cepas, se utilizó un medio moderadamente selectivo denominado Agar MacConkey (Figura 10), en el cual, el 100% de las cepas de *E. coli* desarrollaron crecimiento de colonias (Figura 11). Becton-Dickinson (2014) menciona que este agar, es un medio de cultivo que sirve para la diferenciación selectiva y aislamiento de bacterias pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae, por lo que puede utilizarse para el aislamiento de *E. coli*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella* y *Pseudomonas* a partir de muestras clínicas.

De acuerdo con lo mencionado anteriormente, en el Cuadro 13, se observa el perfil bioquímico obtenido de nuestras cepas, el cual fue similar al reportado por Framer (1995) para la identificación bioquímica de *E. coli*, dicho perfil se basa en: fermentación de glucosa positiva, donde las bacterias anaerobias facultativas a menudo fermentan otros carbohidratos con formación de ácidos orgánicos y gas (H<sub>2</sub> o CO<sub>2</sub>).

Las enterobacterias en un agar Kliger (glucosa y lactosa), utilizan primero la glucosa, acidificándose la columna y virando el indicador al amarillo, cuando se agota

dicho carbohidrato, comienzan a usar la lactosa. En un tiempo de incubación de 18-24h, la lactosa se ha consumido y la acidez se observa en todo el medio (Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud, [FCN], 2017). Una vez agotada la glucosa y lactosa, el microorganismo comienza a utilizar las peptonas aeróbicamente alcalinizando el pico de flauta (vira a rojo) por liberación de NH<sub>3</sub> (Fernández-Olmos *et al.*, 2010).

La producción de Indol 98%, es detectado por a la liberación del producto en el cultivo bacteriano. Dicha producción se debe a la degradación del aminoácido triptófano mediante el enzima triptofanasa (Fernández-Olmos *et al.*, 2010), el triptófano puede ser oxidado por ciertas bacterias para formar tres metabolitos principales: indol, escatol e indolacético (Bailón-Lira *et al.*, 2003).

La prueba de rojo de metilo 99%, la cual sirve para comprobar la capacidad de un microorganismo de producir ácidos de la fermentación de la glucosa por la vía de la fermentación ácido-mixta. Se utiliza como parte de la identificación a nivel de especie de los bacilos entéricos Gramnegativos (Fernández-Olmos *et al.*, 2010). Mientras que Voges-Proskauer, desaminación fenilalanina, malonato, ureasa, ácido sulfhídrico, gluconato y citrato de Simmons fueron pruebas negativas. Finalmente, se saben que las pruebas bioquímicas son una serie de análisis para determinar la actividad metabólica de una cepa pura de microorganismos y que, además, algunas pruebas bioquímicas permiten identificar con un alto grado de precisión a las cepas (Fernández-Olmos *et al.*, 2010).

## **SEROTIPIFICACIÓN**

La serotipificación es un método fenotípico (De Carlos-Rodríguez *et al.*, 2002), que sirve para conocer las características antigénicas de los microorganismos y cómo se distribuyen en una zona geográfica determinada, permite detectar brotes y distinguirlos de los casos esporádicos, identificar fuentes de infección y averiguar si existe asociación entre los diferentes serotipos y la resistencia a los antimicrobianos (Vugia *et al.*, 2004).

Las cepas de UPEC pertenecen a un limitado número de serogrupos entre ellos O1, O2, O4, O6, O7, O8, O16, O18, O25, O62 y O75 y las cepas de *E. coli* que producen UTI se relacionan principalmente con los serotipos: O1:H4, O1:H6, O1:H7, O1:H-, O2:H1, O2:H4, O4:H5, O6:H1, O7:H4, O7:H6, O7:H-, O8, O16, H7, H4, H14 H25, H39, H42 O18ac:H7, O18ac:H-, O22:H1, O25:H1, O75:H5 y O75:H7 (Wiles *et al.*, 2008; Sainz *et al.*, 2008).

El serotipo más frecuente fue el O25:H4, el cual ya ha sido reportado en México, indicando que este serotipo ha logrado esparcirse en el país (Molina *et al.*, 2011), y se ha relacionado por la producción de betalactamasas de espectro extendido y resistencia a fluoroquinolonas en una comunidad (Basu *et al.*, 2013).

En estudios previos por Molina-López *et al.* (2011) analizaron cepas de *E. coli* uropatógena de pacientes de la Ciudad de México, se determinaron serotipos, siendo O25:H4 el más frecuente entre sus cepas. Más adelante, Issazadeh *et al.* (2015) reportaron en el norte de Irán, que los serogrupos más frecuentes de sus cepas de *E. coli* uropatógena fueron el O25 y el O2.

Cabe mencionar, que, en 2015, se publicó el primer reporte de O16-ST131 en China y se aisló de muestras fecales de individuos sanos (Zhong *et al.*, 2015) y en la actualidad se ha identificado a nivel mundial. Por lo que esto enfatiza la importancia de estudiar más la clona de *E. coli* O16.

Li *et al.*, (2017) encontraron que la tipificación serológica de cepas aisladas de un hospital chino, mostró que la clona O25b (66.3%) fue la más frecuente entre los aislamientos ST131, seguido del O16 (33.7%). Además, en estudios posteriores reportados por Zhong *et al.* (2019) encontraron que la clona O16-ST131 representó una alta proporción (34.1%) de los aislamientos ST131, mientras que ese mismo tipo de clona en Australia representó el 1%, en España el 4.3%, en Francia el 8% y en Japón el 12% (Platell *et al.*, 2011; Blanc *et al.*, 2014; Nicolas-Chanoine, *et al.*, 2014).

La distribución de serogrupos que observamos en el estudio actual (Cuadros 14 y 15), es muy similar a los previamente reportados de aislamientos consecutivos de *E. coli* de varias muestras clínicas. Cabe mencionar, que, Fiallos-López *et al.*, (2018) realizaron un trabajo que incluía la caracterización serológica de cepas de *E. coli* de origen humano, donde mencionan otros serotipos, como O16:H48 y O?:H4 los cuales

se ubicaron en el filogrupo A, mientras que O25:H4, se ubicó en el filogrupo B. Dichos datos también que concuerdan con nuestros resultados.

En contraste a lo anterior, no se ha reportado algún estudio sobre los serotipos OR:H4, O16:H?, O16:H7, O16:H39, siendo que podrían ser serotipos nuevos (Figura 12), por lo que esto refuerza la importancia de caracterizar cepas de *E. coli* asociada con UTIs e inclusive de origen fecal tanto de humanos como de animales porque pudieran ser los reservorios naturales de la bacteria.

## **FACTORES DE VIRULENCIA**

Los resultados obtenidos en este estudio revelan la presencia de genes que codifican la producción de toxinas presentes en cepas de *E. coli*, situación que podría presentar serios riesgos para la salud pública en México. Las cepas de *E. coli* patógenas son detectables empleando técnicas de biología molecular mediante la amplificación de genes que codifican factores de virulencia específicos (Torres *et al.*, 2010). Se han documentado los mecanismos por medio de los cuales los factores de virulencia promueven el desarrollo de ITUs, y el número de genes puede ser proporcional al potencial patógeno (Bien *et al.*, 2012).

En el Cuadro 16 de nuestro estudio, los genes *O25-ST131*, *fimH* y *sat* (100%, 89.2%, 67.6% respectivamente) fueron los más frecuentes tanto para las cepas aisladas de muestras urinarias y de muestras fecales, y, se aplicó un análisis estadístico de proporciones en el cual, no se encontró alguna diferencia significativa. Weissman *et al.* (2012) menciona que el gen de virulencia *fimH*, está uniformemente presente en todas las cepas ST131, pero Peirano *et al.* (2014) mencionan que no en todos los aislamientos, pero sí en la mayor parte de las cepas de *E. coli* O25:H4 ST131. En el Cuadro 17, se calculó el puntaje de virulencia de cada cepa y con el análisis estadístico de proporciones se determinó que no hay diferencia significativa en cuanto a contenido de genes de virulencia.

En estudios previos, Li *et al.*, (2017) analizaron varios factores de virulencia, donde los más frecuentes fueron *fim-H1*, *fyuA* (yersiniabactina), *iutA* (gen de absorción de hierro), *malX* (marcador de isla asociado a la patogenicidad), *kpsMT II* (cápsula del grupo II) y *traT* (lipoproteína de membrana externa). Por lo que, la alta frecuencia del

gen de *fimH* indica su importancia en la etapa inicial de la infección, por el hecho de que *fimH* reconoce a los receptores sobre la superficie de las células de la vejiga, facilitando la colonización bacteriana (García *et al.*, 2011). Por consiguiente, la toxina Sat es una serina-proteasa que exhibe actividad citopática sobre células HEp-2 y Vero; a nivel renal esta toxina se caracteriza por provocar vacuolización y daño glomerular (Bien *et al.*, 2012). Algunos estudios reportan a la  $\alpha$ -hemolisina como la toxina más prevalente (Oliveira *et al.*, 2011), en contraste, en nuestros resultados los genes de las toxinas,  $\alpha$ -hemolisina, factor necrotizante citotóxico y citoletal distensora (*hlyA*, *cnf1* y *cdt*) tuvieron escasa presencia en las cepas analizadas.

Es probable que la coexistencia de factores determinantes de virulencia y de mecanismos de resistencia en cepas de *E. coli* sea el resultado de un proceso de evolución gradual concertada; además, la asociación de estas características depende del nicho ecológico, la presión selectiva del ambiente, las características bacterianas en diferentes regiones geográficas y de la reacción del sistema inmunitario del huésped sensible (Beceiro *et al.*, 2013; Yun *et al.*, 2014).

Además, cepas comensales y patógenas de diferentes regiones, indican que las condiciones geográficas y climáticas, la dieta, el uso de antibióticos y los factores genéticos pueden influir en la flora comensal para adquirir genes de virulencia y volverse potencialmente patógenas (Duriez *et al.*, 2001).

## **GRUPOS FILOGENÉTICOS**

Se ha reportado que las cepas de *E. coli* causantes de ITUs pertenecen en su gran mayoría a los grupos filogenéticos B2 y D, además, una de sus características es que poseen mayor cantidad de determinantes de virulencia en comparación con las cepas consideradas comensales pertenecientes a los grupos filogenéticos A y B1 (Johnson y Stell, 2000).

En el cuadro 18, la mayoría de las cepas pertenecieron al grupo filogenético B2 con 19 (51.4%), que, de forma prominente, fueron aisladas de infecciones de vías urinarias y de muestras fecales y presentaron mayor cantidad de factores de virulencia. En contraste, para el grupo A se encontraron un total de 11 (29.7%) cepas, donde 9 (45%) pertenecían a las cepas de muestras fecales y 2 (11.8%) de muestras urinarias

y dichas cepas presentaron menor cantidad de genes de virulencia. Mientras que el grupo B1 y el D tuvieron un total de 2 (5.4%) cepas, teniendo en cuenta que solamente tuvieron una cepa por cada grupo (10%), estos fueron los menos frecuentes tanto en las cepas aisladas muestras urinarias y muestras fecales, además no se encontraron diferencias significativas. Finalmente, los grupos A y B2, tuvieron diferencias significativas en el análisis estadístico, por lo que en un estudio previo realizado en dos regiones de México por Miranda-Estrada *et al.*, (2017), encontraron del total de cepas analizadas, que el grupo filogenético predominante fue el B2 (42%), seguido del grupo A (26,1%). Los grupos A y B1 fueron más prevalentes (35 y 21%, respectivamente) en la localidad al suroeste, en contraste con los grupos filogenéticos B2 y F (60% y 12%, respectivamente), que fueron más frecuentes en la localidad en el centro del país, observándose diferencias estadísticamente significativas en estos grupos filogenéticos. El grupo filogenético E no fue detectado.

Por consiguiente, en el estudio de López-Banda *et al.*, (2014) en México, se determinaron 4 grupos filogenéticos donde se encontró que la mayoría de los aislamientos asociados con ITUs pertenecían al grupo filogenético B2 (55.6%), seguido del grupo A (30.6%). Además, en el trabajo elaborado por Bashir *et al.*, (2012) reportaron resultados similares en la región de Faisalabad, en Pakistán, donde el 50% de los aislamientos de UPEC pertenecieron al grupo B2, seguido de los grupos A y B1 (19%).

Por lo tanto, nuestros resultados confirman que cepas consideradas comensales (grupos A y B1) pueden ocasionar ITUs y estas cepas pueden adquirir genes de virulencia en el tracto gastrointestinal por transferencia horizontal de genes que les permita colonizar el tracto urinario (Moreno *et al.*, 2006 y López-Banda *et al.*, 2014).

## **RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS**

El tratamiento antimicrobiano para las ITUs generalmente es empírico, los antimicrobianos comúnmente utilizados son las fluoroquinolonas, trimetoprim/sulfametoxazol, cefalosporinas y penicilinas con o sin inhibidores de betalactamasas (López-Banda *et al.*, 2014).

La resistencia a diversos antimicrobianos puede considerarse como otro factor de virulencia de estas cepas, entre otros aspectos porque son factor importante en las fallas en el tratamiento (Arenas-Hernández, 2013).

En el Cuadro 19 de nuestros resultados, se observa que la mayoría de los aislamientos de O16 fueron susceptibles a la Ciprofloxacina, Norfloxacina y Ofloxacina, en contraste, las cepas de O25:H4 fueron resistentes a dichos antimicrobianos. De acuerdo con Johnson *et al.*, (2014), reportan que la mayoría de los aislamientos de O16 eran susceptibles a la ciprofloxacina. En contraste, el 96.3% de las cepas O25b eran resistentes, lo que sugiere que los aislamientos de O16-ST131 han surgido recientemente entre los aislamientos de ST131 susceptibles a las fluoroquinolonas. Esto va que con el uso a largo plazo y la exposición a quinolonas, estas cepas susceptibles a las fluoroquinolonas pueden estar en condiciones de adquirir resistencia a los antimicrobianos como las fluoroquinolonas.

En un estudio realizado por Prado *et al.*, (1995), reportó en cepas de *E. coli* que el 21% era resistente a ampicilina, 20% de resistencia a cotrimoxazol, 4% de resistencia a cloranfenicol y 3% de resistencia a tetraciclina. En otro estudio realizado por Reyes *et al.* (2004) reportaron que el nivel de resistencia de TE había mantenido en un 3.5% hasta ese momento. Oliveira *et al.*, (2011) tuvieron un resultado mayor de acuerdo a los reportes en México y otros países, con frecuencias del 55% al 74% para ampicilina, del 61.3% al 74% para tetraciclina, del 44% al 60.1% para trimetoprim/sulfametoxazol y 21% para ácido nalidíxico. En contraste, en las figuras 27 y 28, de forma general, TE presentó la mayor resistencia con 24 (80%) cepas, 17 (56.7%) para NA, 12 (40%) para SXT, 11 (36.7%) para NOR, CIP y OFX, 9 (30%) para CRO, 8 (26.7%) CXT, 3 (10%) CAZ, 2 (6.7%) FOX, ATM y FEP. Por lo sugiere que TE actualmente no es un antimicrobianos que se pueda recomendar en el tratamiento de infecciones por *E. coli* y se ha convertido en un problema mundial emergente.

De las propiedades antimicrobianas que presenta el tracto urinario de manera normal, ante la infección por UPEC, el hospedero presenta una respuesta del sistema inmune innato y del sistema inmune adaptativo. Una de estas respuestas es la de tipo inflamatoria que tiene como propósito la eliminación del patógeno. Aunque el tracto urinario humano presenta varios mecanismos antimicrobianos, UPEC presenta

diversos mecanismos que le permiten persistir en el tracto urinario del hospedero, fenómeno que está relacionado con la recurrencia y cronicidad del padecimiento. Finalmente, UPEC posee el potencial de convertirse en un patógeno epidemiológicamente importante por el incremento en el aislamiento de cepas multirresistentes a los antimicrobianos (Arenas-Hernández *et al.*, 2012).

### **β-LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (ESBL).**

Tradicionalmente, los antibióticos β-lactámicos se han utilizado para el tratamiento de las infecciones producidas por *E. coli*. Sin embargo, en los últimos años su efectividad se ha visto disminuida por el incremento en la prevalencia de cepas productoras de β-lactamasas de espectro extendido (Cantón *et al.*, 2012). El grupo O25b-ST131 se ha asociado con la producción de β-lactamasas de espectro extendido (principalmente del tipo CTX-M-15) y resistencia a fluoroquinolonas en la comunidad (Clermont *et al.*, 2009). Ante la emergencia de cepas multirresistentes y productoras de β-lactamasas se ha reportado en diversos estudios, como el caso de Lina (2014) en Bangladesh, reportaron que cepas aisladas de UTIs y de heridas, presentaron una alta prevalencia (43.2%) de *E. coli* productora de ESBL.

En el presente estudio el 13 (35.13%) cepas fueron positivas para la producción de ESBL, el serotipo O25:H4-ST131 se identificó como el serotipo más frecuente, dicho serotipo se ha caracterizado por ser productor de ESBL, que se ha diseminado en varios países de Europa y Asia (Nicholas-Chanoine *et al.*, 2008).

Otra de las propiedades de la cepa de *E. coli* O25:H4 es que asocia principalmente con la producción de β-lactamasa CTX-M15. En las cepas del presente estudio productoras de β-lactamasas, se tuvo correlación con la resistencia a cefotaxima, por lo que pudiera tratarse de cepas CTX-M15, lo cual tendría que confirmarse la presencia de dicha enzima. A la vez que la producción de la β-lactamasa CTX-M15 se ha reportado asociada con la resistencia a la ceftazidima (Lina *et al.*, 2014), aunque en las cepas analizadas del presente estudio la resistencia a ceftazidima tuvo una frecuencia muy baja, solo una cepa OR:H4 de UTIs y dos O25:H4 de origen fecal fueron resistentes. Por lo que se hace necesario, confirmar por metodologías moleculares sí las cepas OR:H4 pertenecen al serogrupo O25, por el

hecho de que cepas no tipificables (O?) e inclusive cepas con un antígeno somático rugoso (OR) multirresistentes a los antimicrobianos, con una PCR e iniciadores específicos se puede establecer si dichas cepas presentan los genes del antígeno O25, tal como fue reportado por Hernández-Chiñas *et al.*, (2019)

Los resultados de este estudio muestran la presencia de *E. coli* (virulenta y comensal) aisladas de UTIS y de muestras fecales pertenecen a la clona de *E. coli* O25:H4 ST131. Las cepas fecales representan un importante reservorio de genes de resistencia, a los antimicrobianos, a la vez que los resultados obtenidos apoyan que las UTIs tienen su origen en cepas de origen intestinal y en México cepas de la clona O25:H4 ST131 tienen presencia en comunidad desde mucho antes de que se describiera por primera vez en 2008 dicha clona con distribución mundial.

## X. CONCLUSIONES

Las cepas de *E. coli* estudiadas confirmaron el 100% de las cepas aisladas y perfil bioquímico pertenecieron a *E. coli*. En cuanto a los serogrupos, los más frecuentes de las cepas de aisladas de muestras de ITUs y fecales fueron O16 y O25, junto con lo anterior, los serotipos más frecuentes de las cepas de *E. coli* fueron O25:H4 con 12 cepas (32.5%), seguido de OR:H4 con 7 cepas (21.9%) y O16:H5 con 3 cepas (8.1%). Adicionalmente los perfiles de genes de virulencia mostraron que aproximadamente la mitad (55%) de las cepas de origen fecal presentaron un perfil similar al de las cepas del tracto urinario. La otra mitad de las cepas de origen fecal se distinguieron por la ausencia del gen *sat*. Otro aspecto del análisis de las cepas de ambas fuentes fue que se detectó la presencia de los genes *fimH* y *sat*, ambos genes lo presentan cepas O25:H4-ST131, sin embargo, las cepas de este estudio carecen de otros genes relacionados con otras toxinas como son *hlyA*, *cnf* y *cdt*, que están presentes en cepas de las clonas O25:H4-ST131, por lo que las cepas de este estudio se pueden considerar como variantes de la clona ST131, de hecho, son de serotipo distinto a la clona O25:H4-ST131

Los grupos filogenéticos de las cepas de *E. coli* de acuerdo al sistema de Clermont *et al.* (2013), las de origen del tracto urinario se ubicaron en el grupo B2 que contiene cepas que poseen mayores factores de virulencia de origen extraintestinal, lo anterior tiene coincidencia con el filogrupo de la clona *E. coli* O25:H4-ST131, en contraste con lo anterior, las cepas de origen fecal se clasificaron en el filogrupo A considerado como comensal avirulento, pero que pueden considerarse como causantes de ITUs. Sin embargo, las cepas de ambas fuentes, en común presentaron el gen ST131 de la clona de *E. coli* O25:H4-ST131.

Las cepas aisladas de muestras fecales presentaron mayor resistencia a la tetraciclina y las cepas aisladas de muestras urinarias presentaron mayor resistencia a ácido nalidíxico (NA) y fluoroquinolonas. Independientemente de los genes de virulencia, las cepas O25:H4 de las dos fuentes presentaron multirresistencia a los antimicrobianos, esta característica fue similar a lo reportado en la clona O25:H4-ST131 que es multirresistente a los  $\beta$ -lactámicos y fluoroquinolonas, lo que significa que la emergencia de cepas multirresistentes con factores de virulencia pudieran

representar un riesgo para la población susceptible, no solo en las infecciones del tracto urinario sino también de infecciones intestinales.

Las características de genes de virulencia y del gen ST131 conducen a inferir que ambos tipos de cepas pudieran tener un origen común, esta propuesta puede ser posible debido a la pérdida o adquisición de genes de virulencia que se da en los microorganismos mediante un mecanismo de transferencia horizontal de genes. En cuanto a la propuesta de establecer el origen común, conduce a llevar a cabo un estudio más detallado de los genes de virulencia en estos grupos de cepas, para conocer si estas cepas derivaron de una clona ancestral de *E. coli* O25:H4-ST131.

.

.

## **XI. PROPUESTAS Y RECOMENDACIONES**

Estos hallazgos indican que es imperativo mantener las medidas básicas de higiene, asepsia y antisepsia, con el fin de evitar la transmisión de microorganismos potencialmente patógenos, así como implementar programas de vigilancia epidemiológica que permitan racionalizar el uso de los antimicrobianos de amplio espectro, reforzar los protocolos para prevenir y controlar las infecciones asociadas con microorganismos multirresistentes.

Asimismo, se recomienda estudios adicionales, empleando técnicas moleculares, para detectar factores de virulencia adicionales o genes que confieren resistencia a antimicrobianos, con el fin de reforzar programas de vigilancia epidemiológica y medir sus efectos sobre la salud pública.

## XII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abarca, G. y Herrera, M. L. 2001. Betalactamasas: su importancia en la clínica y su detección en el laboratorio. *Revista Médica del Hospital Nacional de Niños*. 1 (36): 1-5.
- Abraham, E. P. y Chain, E. 1940. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature*. 3713 (146): 837-837.
- Afset, J. E., Bergh, K. y Bevanger, L. 2003. High prevalence of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in Norwegian children with diarrhoea. *Journal of Medical Microbiology*. 11 (52): 1015–1019.
- Afset, J. E., Bevanger, L., Romundstad, P. y Bergh, K. 2004. Association of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) with prolonged diarrhoea. *Journal of Medical Microbiology*. 1 (53): 1137–1144.
- Algorta, G. y Schelotto, F. 2006. Principales grupos de bacilos gramnegativos no exigentes. En: Temas de Bacteriología y Virología Médica. Departamento de Bacteriología y Virología. Ed. FEFMUR. Montevideo, Uruguay. 315-338.
- Anderson, G., Dodson, K., Hooton, T. y Hultgren J. 2004. Intracellular bacterial communities of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract pathogenesis. *Trends in Microbiology*. 9 (12): 424-430.
- Ángel-Díaz, M., Ramón-Hernández, J., Martínez-Martínez L., Roriguez-Baño J. y Pascual A. 2006. *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de betalactamasas de espectro extendido en hospitales españoles: segundo estudio multicéntrico (Proyecto GEIH- BLEE 2006). *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 27 (9): 503-510.
- Arenas-Hernández, M., Navarro-Ocaña, A., Martínez-Alvarado, J. Martínez-Laguna, Y. 2013. Identificación de *Escherichia coli* uropatógena por reacción en cadena de la polimerasa múltiple y serotipificación. Memorias del IV Congreso Nacional de Tecnología Aplicada a Ciencias de la Salud. Tonantzintla, Puebla. Pp. 1-5.
- Arenas-Hernandez, M., Martínez-Laguna, Y. y Torres, A. G. 2012. Clinical Implications of Enteroadherent *Escherichia coli*. *Current Gastroenterology Reports*. 5 (14): 386–394.

- Asociación Española de Ciencia Avícola (AECA). 2011. Reseña de una Antigua Bacteria: *Escherichia coli*. [https://www.wpsa-aeca.es/aeca\\_imgs\\_docs/ecoli.pdf](https://www.wpsa-aeca.es/aeca_imgs_docs/ecoli.pdf). Consultado el 06 de septiembre de 2019.
- Bailón-Lira, L., González-Meléndez, R. C. y Cervantes-Sandoval, A. 2003. Atlas de Pruebas Bioquímicas para Identificar Bacterias. <https://microbitos.files.wordpress.com/2010/06/atlasmicrobiologia1.pdf>. Consultado el 18 de marzo de 2020.
- Barrow, G. I. y Feltham, R. K. 1993. Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria. 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge.
- Bashir, S., Haque, A., Sarwar, Y., Ali, A. y Anwar, M.I. 2012. Virulence profile of different phylogenetic groups of locally isolated community acquired uropathogenic *E. coli* from Faisalabad region of Pakistan. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 23 (11): 11: 1-6.
- Basu, S., Kumar, S. y Hazra, A. 2013. Molecular characterization of uropathogenic *Escherichia coli*: Nalidixici and Ciprofloxacin resistance, virulent factors and phylogenetic background. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 7 (12): 2727-2731.
- Beceiro, A., Tomas, M. y Bou, G. 2013. Antimicrobial resistance and virulence: A successful or deleterious association in the bacterial world?. *Clinical Microbiology Reviews*. 2 (26): 185-230.
- Becton-Dickinson, G. 2014. BD MacConkey II Agar. Instrucciones de uso, medios en placa listos para usar. *B.D* 1-4.
- Bennett, P. M. 1999. Integrons and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 43: 1-4.
- Benz, I. y Schmidt, M. A. 1992. Isolation and serologic characterization of AIDA-I, the adhesin mediating the diffuse adherence phenotype of the diarrhea associated *Escherichia coli* strain 2787 (O126:H27). *Infection Immunity*. 1 (60) :13-18.
- Berg, R. D. 1996. The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiol*. 4 (1): 430-5.

- Bergthorsson, U. y Ochman, H. 1998. Distribution of chromosome length variation innatural isolates of *Escherichia coli*. *Molecular Biology and Evolution*. 15 (1): 6 - 16.
- Bien, J., Sokolova, O. y Bozko, P. 2012. Role of uropathogenic *Escherichia coli* virulence factors in development of urinary tract infection and kidney damage. *International Journal of Nephrology*.1-15.
- Bilge, S. S., Clausen, C. R., Lau, W. y Moseley, S. L. 1989. Molecular characterization of a fimbrial adhesin, F1845, mediating diffuse adherence of diarrhea-associated *Escherichia coli* to Hep-2 cells. *Journal Bacteriology*. 8 (171): 4281-4289.
- Bingen, E., Picard, B., Brahimi, N., Mathy, S., Desjardins, P., Elion, J. y Denamur, E. 1998. Phylogenetic analysis of *Escherichia coli* strains causing neonatal meningitis suggests horizontal gene transfer from a predominant pool of highly virulent B2 group strains. *The Journal of Infectious Diseases*. 3 (177): 642–650.
- Bitton, G. y Marshall, K. C. 1980. Adsorption of microorganisms to surfaces. New York.
- Blanc, V., Leflon-Guibout, V., Blanco, J., Haenni, M., Madec, J. Y., Ragainon, G., Bruno, P., Mora, A., Lopez, C., Dahbi, G., Dunais, B., Anastay, M., Branger, C., Moreau, R., Pradier, C. y Nicolas-Chanoine, M. H. 2014. Prevalence of day-care centre children (France) with faecal CTX-M-producing *Escherichia coli* comprising O25b:H4 and O16:H5 ST131 strains. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*. 69 (5): 1231-1237.
- Bonde, G. J. 1967. Pollution of a marine environment. *Journal (Water Pollution Control Federation)*. *Control Fed*. 10 (39): R45-R63.
- Bradford, P. A. 2001. Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat *Clinical Microbiology Review*. 4 (14): 933–951.
- Bush, K. y Jacoby, G. A. 2010. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 54 (3): 969-76.
- Cantón, R., González-Alba, J. M. y Galán, J. C. 2012. CTX-M enzymes: Origin and diffusion. *Frontiers in Microbiology*. 110 (3): 1-19.

- Casellas, J. M. 2011. Resistencia a los antibacterianos en América Latina: consecuencias para la Infectología. *La Revista Panamericana de Salud Pública*. 30 (6): 519 - 528.
- Caugant, D. A., Levin, B. R. y Selander, R. K. 1981. Genetic diversity and temporal variation in the *E. coli* population of a human host. *Genetics*. 3 (98): 467-490.
- Celli, J., Deng, W. y Finlay, B. B. 2000. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) attachment to epithelial cells: exploiting the host cell cytoskeleton from the outside. *Cellular Microbiology*. 2 (1): 1-9.
- Chaudhuri, R y Henderson, I. 2012. The evolution of the *Escherichia coli* phylogeny. *Infection, Genetics and Evolution*. 12 (2): 214-226.
- Chopra, I. y Roberts, M. 2001. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 65: 232-60.
- Clermont, O., Bonacorsi, S. y Bingen, E. 2000. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Applied and Environmental Microbiology*. 10 (66): 4555–4558.
- Clermont, O., Lescat, M., O'Brien, C. L., Gordon, D. M., Tenailon, O. y Denamur, E. 2008. Evidence for a humanspecific *Escherichia coli* clone. *Environmental Microbiology*. 10: 1000–10006.
- Clermont, O., Dhanji, H., Upton, M., Gibreel, T., Fox, A., Boyd, D., Mulvey, M. R., Nordmann, P., Ruppé, E., Sarthou, J. L., Frank, T., Vimont, S., Arlet, G., Branger, C., Woodford, N. y Denamur, E. 2009. Rapid detection of the O25b-ST131 clone of *Escherichia coli* encompassing the CTX-M-15-producing strains. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*. 64: 274-277.
- Clermont, O., Christenson, J., Denamur, E. y Gordon, D. 2013. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environmental Microbiology Reports*. 5 (1): 58-65.

- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2018. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing. 28th edition. Ed. CLSI. Wayne, USA.
- Cravioto, A., Reyes, R., Trujillo, F., Uribe, F., Navarro, A., De la Roca, J., Hernández, J.M., Pérez, G., y Vázquez, V. Risk of diarrhea during the first year of life associated with initial and subsequent colonization by specific enteropathogens. *American Journal of Epidemiology*. 1990; 131 (1): 886-904.
- Creadores Universitarios. s.d. Hospital Infantil de México “Federico Gómez” (HIMFG). <https://www.creadores.unam.mx/instituciones/hospital-infantil-de-mexico-federico-gomez/>. Consultado el 11 de agosto de 2019.
- Croxen, M. A. y Brett-Finlay, B. 2010. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature Reviews | Microbiology*. 1 (8): 26-38.
- Croxen, M. A., Law, R. J., Scholz, R., Keeney, K. M., Wlodarska33, M., y Finlay, B. B. (2013). Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 4 Croxen, M. A., Law, R. J., Scholz, R., Keeney, K. M., Wlodarska, M. y Finlay, B. B. 2013. Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 4 (26): 822–880.
- Cowan, S. T. 1954. A review of names for coliform organisms. *International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy*. 2 (4): 119–124.
- Dahbi, G., Mora, A., López, C., Alonso, M. P., Mamani, R., Marzoa, J., Coira, A., García-Garrote, F., Pita, J., Velasco, D., Herrera, A., Viso, S., Blanco, E., Blanco, M. y Blanco, J. 2013. Emergence of new variants of ST131 clonal group among extraintestinal pathogenic. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 42 (4): 347-35.
- Dahbi, G., Mora, A., Mamani, R., López C., Pilar-Alonso, M., Marzoa, J., Blanco, M., Herrera, A., Viso, S., García-Garrote, F., Tchesnokova, V., Billing, M., De la cruz, F., De toro, M., González-López, J. J., Prats, G., Chaves, F., Martínez-Martínez, L., López-Cerezo, L., Denamur, E. y Blanco, J. 2014. Molecular epidemiology and virulence of *Escherichia coli* O16:H5-ST131: Comparison with H30 and H30-Rx subclones of O25b:H4-ST131. *International Journal of Medical Microbiology*. 8 (304): 1247–1257.

- Dahmen, S., Mansour, W., Boujaafar, N., Arlet, G. y Bouallegue, O. 2010. Distribution of cotrimoxazole resistance genes associated with class 1 integrons in clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in a university hospital in Tunisia. *Microbial Drug Resistance*. 16: 43-7.
- De Carlos-Rodríguez, F., Solís-Cuesta, F., Navarro, F., Muñoz, J., Tejero, R., Ibarra-González, A., Linares-Sicilia, M. J. y Casal, M. 2002. *Salmonella spp.* Serotipos aislados en el Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba durante un período de 8 años (1993-2000). *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 5 (20): 208-211.
- Dhakal, B., Kulesus, R. y Mulvey M. 2008. Mechanisms and consequences of bladder cell invasion by uropathogenic *Escherichia coli*. *European Journal of Clinical Investigation*. 38 (S2): 2–11.
- Diarrhoeal Diseases Collaborators (GBD). 2017. Estimates of global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of diarrhoeal diseases: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet Infectious Diseases*. 1 (17): 909–948.
- DebRoy, C., Roberts, E. y Fratamico, P. M. 2011. Detection of O antigens in *Escherichia coli*. *Animal Health Research Reviews*. 2 (12): 169–185.
- Domínguez-Carmona, M. y Domínguez-De la Calle, M. 2003. La *Escherichia coli* enteropatógena y sus factores de patogenicidad. *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia*. 30-95.
- Doran, J. W. y Linn, D. M. 1979. Bacteriological quality of run off water from pastureland. *Applied and Environmental Microbiology*. 5 (37): 985-991.
- Drasar, B. S. y Hill, M. J. 1974. Human intestinal flora. Academic Press, New York.
- Dubos, R., Schaedler, R. W., Costello, R. y Hoet, P. 1965. Indigenous, normal and autochthonous flora of the gastrointestinal tract. *Journal of Experimental Medicine*. 122 (1): 67-76.
- Duriez, P., Clermont, O., Bonacorsi, S., Bingen, E., Chaventré, A., Elion, J., Picard, B. y Denamur, E. 2001. Commensal *Escherichia coli* isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human populations. *Microbiology*. 147 (Pt 6): 1671-1676.

- Emody, L., Kerényi, M. y Nagy, G. 2003. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli*. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 22 (1): 29-33.
- Evans, D. J. y Evans, D. G. 1973. Three characteristics associated with enterotoxigenic *Escherichia coli* Isolated from Man. *American Society for Microbiology*. 3 (8): 322-328.
- Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud. (FCN). 2017. Metabolismo bacteriano, identificación y taxonomía. *Microbiología General*. <http://www.fcn.unp.edu.ar/sitio/microgeneral/wp-content/uploads/2017/02/07-Metabolismo-Identificacion-y-taxonom%C3%ADa.pdf>. Consultado el 18 de marzo de 2020.
- Farfán-García, A. E., Ariza-Rojas, S. C., Vargas-Cárdenas, F. A. y Vargas-Remolina, L. V. 2016. Mecanismos de virulencia de *Escherichia coli* enteropatógena. *Revista Chilena de Infectología*. 33 (4): 438-450.
- Faust, M. A. 1976. Coliform bacteria from diffuse sources as a factor in estuarine pollution. *Water Research*. 7 (10): 619-627.
- Felipe-Díaz, B. 2016. Identificación Molecular de Factores de Virulencia de cepas de *Escherichia coli* uropatógenas. Memorias del III. Encuentro de Jóvenes en la Investigación de Bachillerato-CONACYT. Acapulco, Guerrero. Pp. 159-168.
- Fernández-Ferrán, R., Rodríguez-Pérez, C. Rodríguez-Ribalta, I. y Gómez-Martínez, F. 2003. *Escherichia coli* como causa de diarrea infantil. *Revista Cubana de Pediatría*. 3 (75): 1-8.
- Fernández-Olmos, A., García-De la Fuente, C., Saéz Nieto, J. A. y Valdezate-Ramos, S. 2010. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 8 (29): 601-608.
- Fiallos-López, J. D., Enríquez-De Madrid, M. L. y Navarro-Ocaña, A. 2018. Caracterización serológica de *Escherichia coli* en cepas de origen humano. *Revista Portal de la Ciencia*. 14: 41-52.
- Flores-Mireles, A. L., Walker, J. N., Caparon, M. y Hultgren S. J. 2015. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nature Reviews Microbiology*. 1 (13): 269–284.

- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) - Organización Mundial de la Salud (WHO). 2011. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in raw beef and beef products: approaches for the provision of scientific advice meeting report. *Microbiological Risk Assessment Series*. 18 (1): 1 -126.
- Foxman, B. 2014. Urinary tract infection syndromes: occurrence, recurrence, bacteriology, risk factors, and disease burden. *Infectious Disease Clinics of North America*. 28 (1): 1–13.
- Fratamico, P. M., DebRoy, C., Liu, Y., Needleman, D., Baranzoni, G. M. y Feng, P. 2016. Advances in molecular serotyping and subtyping of *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*. 1 (7): 644.
- Fremaux, B., Prigent-Combaret, C. y Vernozy-Rozand, C. 2008. Long-term survival of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cattle effluents and environment: an updated review. *Veterinary microbiology* 1 (132): 1-18.
- Freter, R. 1992. Factors affecting the microecology of the gut. In: Fuller R, editors. Probiotics- the scientific basis. Ed. Chapman and Hall. New York. p. 11-44.
- Fuchs, L. Y., Chihu, L., Conde, C., González, V. M., Noguez, A. H., Calderón, E. M. C., Avonce, N. y Ovando, C. M. 1994. Mecanismos moleculares de la resistencia bacteriana. *Salud Pública de México*. 4 (36): 428-436.
- García, E. C., Brumbaugh, A. R. y Mobley, H. L 2011. Redundancy and specificity of *Escherichia coli* iron acquisition systems during urinary tract infection. *Infection and Immunity*. 3 (79): 1225-1235.
- García-Hernández, A. M., García-Vázquez, E., Hernández-Torres A., Ruiz J., Yagüe G. y Herrero, J. A. 2011. Bacteriemias por *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) significación clínica y perspectivas actuales. *Revista Española de Quimioterapia*. 24 (2): 57-66.
- García-López, M.V., Gallardo-García, M. H., Rodríguez-Ortega, R., Roperopinto, F., Granados-Martín, E. y Viciano-Ramos, M. I. 2008. Distribución de los patrones de sensibilidad de *Escherichia coli* intrahospitalario y extrahospitalario y los

- fenotipos de resistencias asociados durante el año 2005. *Revista Española de Quimioterapia*. 21 (3): 157-165.
- García-Sánchez, J. E., Fresnadillo, M. J., García-García, M. I. y Muñoz-Bellido, J. L. 1997. Resistencia a los antimicrobianos que no inhiben la síntesis de la pared celular. En: Tratamiento Antimicrobiano. Ed. Emisa. Madrid, España.
- Gear, J. S., Brodribb, A. J., Ware, A. y Mann, J. I. 1980. Fiber and bowel transit times. *British Journal of Nutrition*. 1 (45): 77-82.
- Geldreich, E. E. 1976. Fecal coliform and fecal streptococcus density relationships in waste discharges and receiving waters. *Critical Reviews in Environmental Control*. 4 (6): 349-369.
- Gerba, C. P. y McLeod, J. S. 1976. Effect of sediments on the survival of *Escherichia coli* in marine waters. *Applied and Environmental Microbiology*. 1 (32): 114-120.
- González-Monte, E. 2012. Infecciones del tracto urinario. *Nefrología al día*. 5 (2): 97-118.
- Google. s.d. Mapa de la Ciudad de México, en Google Maps. Recuperado el 23 de septiembre de 2019, de: <https://www.google.com/maps/place/Ciudad+de+M%C3%A9xico,+CDMX/@19.3793054,99.3160648,11z/data=!4m5!3m4!1s0x85ce0026db097507:0x54061076265ee841!8m2!3d19.4326077!4d-99.133208>.
- Google Earth. s.d. Ubicación de Tlaltizapán en el estado de Morelos. Recuperado el 23 de septiembre de 2020 [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/2/29/Tlaltizap%C3%A1n\\_en\\_https://satellites.pro/mapa\\_de\\_Tlaltizapan.Estado\\_de\\_Morelos.Mexico#18.688306,-99.121871,14](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/2/29/Tlaltizap%C3%A1n_en_https://satellites.pro/mapa_de_Tlaltizapan.Estado_de_Morelos.Mexico#18.688306,-99.121871,14).
- Goosney, D. L., Gruenheid, S. y Finlay, B. B. 2000. Gut feelings: enteropathogenic *E. coli* (EPEC) interactions with the host. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 1 (16): 173-89.
- Gyles, C. 2007. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: An overview. *Journal of Animal Science*. 1 (85): E45-E62.

- Hernández-Chiñas, U., Pérez-Ramos, A., Belmont-Monroy, L., Chávez-Berrocal, M. E., González-Villalobos, E., Navarro-Ocaña, A., Eslava, C. A. y Molina-López, J. 2019. Characterization of auto-agglutinating and non-typeable uropathogenic *Escherichia coli* strains. *The Journal of Infection in Developing Countries*. 6 (13): 465-472.
- Hannan, T. J., Totsika M., Mansfield, K. J., Moore, K. H., Schembri, M. A. y Hultgren, S. J. 2012. Host-pathogen checkpoints and population bottlenecks in persistent and intracellular uropathogenic *Escherichia coli* bladder infection. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews*. 3 (36): 616–648.
- Herzer, P. J., Inouye, S., Inouye, M. y Whittam, T. S. 1990. Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 11 (172): 6175–6181.
- Hof, H. 2017. Candiduria! What now? Therapy of urinary tract infections with *Candida*. *Der Urologe Journal*. 2 (56): 172–179.
- Ho, P. L., Wong, R. C., Chow, K. H. y Que, T. L. 2009. Distribution of integron-associated trimethoprim-sulfamethoxazole resistance determinants among *Escherichia coli* from humans and food-producing animals. *Letters in Applied Microbiology*. 49 (1): 627-34.
- Horna-Ruíz, A. M., Zavaleta, A. I., Corahua, L. e Izaguirre, V. 2013. Mecanismos moleculares de resistencia a quinolonas en cepas de *Escherichia coli* uropatógenas. *Ciencia e Investigación*. 2 (16): 83-89.
- Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI). 2017. Anuario estadístico y geográfico de la Ciudad de México. México.
- Islam, M. A., Heuvelink, A. E., Talukder, K. A., Zwietering, M. H. y De Boer, E. 2006. Evaluation of Immunomagnetic Separation and PCR for the Detection of *Escherichia coli* O157 in Animal Feces and Meats. *Journal of Food Protection*. 12 (69): 2865–2869.

- Issazadeh, K., Nasrin-Naghieb, S. y Khoshkholgh-Pahlaviani, M. R. 2015. Drug resistance and serotyping of uropathogenic *Escherichia coli* among patients with urinary tract infection in Rasht, Iran. *The Official Journal of Zahedan University of Medical Sciences*. 6 (17): 1-5.
- Jacoby, G., Cattoir, V., Hooper, D., Martínez-Martínez, L., Nordmann, P., Pascual, A., Poirel, L. y Wang, M. 2008. *qnr* gene nomenclature. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 7 (52): 2297-2299.
- Jang, J., Hur, H., Sadowsky, M., Byappanahalli, M., Yan, T y Ishii, S. 2017. Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications a review. *Journal of applied microbiology* 123(3):570-581.
- Johnson, J. R., Clermont, O., Johnston, B., Clabots, C., Tchesnokova, V., Sokurenko, E., Junka, A. F., Maczynska, B. y Denamurc, E. 2014. Rapid and specific detection, molecular epidemiology, and experimental virulence of the O16 subgroup within *Escherichia coli* sequence type 131. *Journal of Clinical Microbiology*. 5 (52): 1358–1365.
- Johnson, J. R., Gajewski, A., Lesse, A. J. y Russo, T. A. 2003. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* as a cause of invasive nonurinary infections. *Journal of Clinical Microbiology*. 12(41): 5798-5802.
- Johnson, J. R. y Stell, A. L. 2000. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *The Journal of Infectious Disease*. 1 (181): 261-272.
- Jones, M. E., Peters, E., Weersink, A. M., Fluit, A. y Verhoef, J. 1997. Widespread occurrence of integrons causing multiple antibiotic resistance in bacteria. *The Lancet*. 9067(349): 1742-1743.
- Kaper, J. B., Nataro, J. P. y Mobley, H. L. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*. (2): 123–140.
- Knothe, H., Shah, P., Kremery, V., Antal, M. y Mitshashi, S. 1983. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiellapneumoniae* and *Serratiamarcescens*. *Infection*. 11(6): 315-317.

- Kosek, M., C. Bern, y R. L. Guerrant. 2003. The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. *Bull World Health Organ.* 3 (81): 197-204.
- Kucheria, R., Dasgupta, P., Sacks, S, H., Khan, M.S y Sherrin, N. 2005. Urinary tract infections: new insights into a common problem. *Postgraduate Medical Journal.* 81 (952): 83-86.
- Lee, S. H. y Jeong, S. H. 2005. Nomenclature of GES-type extended spectrum beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 5 (49) :2148.
- Levy, S. B., McMurry, L. M., Barbosa, T. M., Burdett, V., Courvalin, P., Hillen, W., Roberts, M. C., Rood, J. I. y Taylor, D. E. 1999. Nomenclature for new tetracycline resistance determinants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 6 (43): 1523-1524.
- Levine, M. M., Bergquist, E. J., Nalin, D. R., Waterman, D. H. Hornick, R. B., Young, C. y Sotman, S. 1978. *Escherichia coli* strains that cause diarrhoea but do not produce heat-labile or heat-stable enterotoxins and are non-invasive. *Lancet* 1(8074): 1119-1122.
- Levine, M. M., Nalin, D. R., Hoover, D. L., Bergquist, E. J., Hornick, R. B. y Young, C. R. 1979. Immunity to Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity.* 3 (23): 729-736.
- Leyva, S. y Leyva, E. 2008. Fluoroquinolonas. Mecanismos de acción y resistencia, estructura, síntesis y reacciones fisicoquímicas importantes para propiedades medicinales. *Boletín de la Sociedad Química México.* 2 (1): 1-13.
- Li, B., Lu, Y., Lan, F., He, Q., Li, C. y Cao, Y. 2017. Prevalence and characteristics of ST131 clone among unselected clinical *Escherichia coli* in a Chinese university hospital. *Antimicrobial Resistance and Infection Control.* 18 (6): 1-9.
- Lina, T. T., Khajanchi, B. K., Azmi, I. J., Islam, M. A., Mahmood, B., Akter, M., Banik, A., Alim, R., Navarro, A., Pérez, G., Cravioto, A. y Talukder, K. A. 2014. Phenotypic and molecular characterization of extended spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Bangladesh. *PLOS ONE.* 10 (9): e108735- e108735.

- López-Banda, D. A., Carrillo-Casas, E. M., Leyva-Leyva, M., Orozco-Hoyuela, G., Manjarrez-Hernández, A. H., Arroyo-Escalante, S., Moncada-Barrón, D., Villanueva-Recillas S., Xicohtencatl-Cortes, J. y Hernández-Castro, R. 2014. Identification of virulence factors genes in *Escherichia coli* isolates from women with urinary tract infection in Mexico. *BioMed Research International*. 40: 1565-1566.
- Lloyd, A. L., Rasko, D. A. y Mobley, H. L. 2007. Defining genomic islands and uropathogen-specific genes in uropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 9 (189): 3532-3546.
- Luna-Pineda, V. M., Ochoa, S., Cruz-Córdova, A., Cázares-Domínguez, V., Vélez-González, F., Hernández-Castro, R. y Xicohtencatl-Cortes, J. 2018. Urinary tract infections, immunity, and vaccination. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*. 1 (75): 67-78.
- Marteyn, B., Gazi, A. y Sansonetti, P. 2012. *Shigella*: A model of virulence regulation *in vivo*. *Gut Microbes*. 2 (3): 104–120.
- Martín-Clavo, S., Martín-Cillero, M. T. y Liso-Rubio, F. J. 2012. Tratamiento de las infecciones producidas por beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE). Ed. Formación Continuada Para Farmacéuticos De Hospital V. 97-127.
- Martínez-Freijo P. 1997. Integrones. Nueva causa de resistencia a antibióticos. *Revista Española de Quimioterapia*. (3): 10.
- Mazel, D., Dychinco, B., Webb, V. A., Davies, J. 2000. Antibiotic resistance in the ECOR collection: integron sand identification of a novel aad gene. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 6 (44): 1568-1574.
- McFeters, G. A., Stuart, S. A. y Olson, S. B. 1978. Growth of heterotrophic bacteria and algal extracellular products in oligotrophic waters. *Applied and Environmental Microbiology*. 2 (35): 383-391.
- Mead, P. S., Griffin, P. M. 1998. *Escherichia coli* O157:H7. *The Lancet*. 9135 (352): 1207-1212.

- Miranda-Estrada, L. I., Ruíz-Rosas, M., Molina-López, J. M., Parra-Rojas, R., González-Villalobos, E. y Castro-Alarcón, N. 2017. Relación entre factores de virulencia, resistencia a antibióticos y los grupos filogenéticos de *Escherichia coli* uropatógena en dos localidades de México. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 7 (35): 426-433.
- Molina-López, G., Aparicio-Ozores, G., Ribas-Aparicio, R. M., Gavilanes-Parra, S., Chávez-Berrocal, M. E., Hernández-Castro, R. y Manjarrez-Hernández, A. 2011. Drug resistance, serotypes, and phylogenetic groups among uropathogenic *Escherichia coli* including O25-ST131 in Mexico City. *The Journal of Infection in Developing Countries*. 12 (5): 840-849.
- Mora, A., Dahbi, G., López, C., Mamani, E., Marzoa, J., Dion, S., Picard, B., Blanco, M., Pilar-Alonso, M., Denamur, E. y Blanco, J. 2014. Virulence Patterns in a Murine Sepsis Model of ST131 *Escherichia coli* Clinical Isolates Belonging to Serotypes O25b:H4 and O16:H5 Are Associated to Specific Virotypes. *PLoS ONE*. 1 (9): e87025- e87025.
- Morales-Espinosa, R., Hernández-Castro, R., Delgado, G., Mendez J. L., Navarro, A., Manjarrez, Á. y Cravioto, A. 2016. UPEC strain characterization isolated from Mexican patients with recurrent urinary infections. *The Journal of the Infection in Developing Countries*. 4 (10): 317-328.
- Morejon, M., Salup, R. y Cue, M. 2005. Actualización en antimicrobianos sistémicos. La Habana: Editorial Ciencias médicas. p. 47-48.
- Morejon, M. 2013. Betalactamasas de espectro extendido. *Revista Cubana de Medicina*. 4 (52): 272-280.
- Moreno, E., Prats, G., Planells, I., Planes, A.M., Pérez, T. y Andreu, A. 2006. Caracterización de *Escherichia coli* de los grupos filogenéticos A y B1 causantes de infección extraintestinal. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 8 (24) :483-489.
- Mosquito, S., Ruiz, J., Bauer, L. J. y Ochoa, T. J. 2011. Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en *Escherichia coli* asociadas a diarrea. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. 28 (4): 648-56.

- Murray, P. R., Baron, E. J., Jorgensen, J.H., Pfaller, M. A. y Tenover, R. C. 2003. Manual of clinical microbiology. 8th ed. American Society for Microbiology. 2: 2322.
- Nataro, J. P. y Kaper, J. B. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*. 1 (11): 142–201.
- Neter, E., Westphal, O., Luderitz, O., Gino, R. M. y Gorzynski, E. A. 1955. Demonstration of antibodies against enteropathogenic *Escherichia coli* in sera of children of various ages. *Pediatrics*. 6 (16): 801–808.
- Nicolas-Chanoine, M. H., Bertrand, X. y Madec, J. Y. 2014. *Escherichia coli* ST131, an intriguing clonal group. *Clinical Microbiology Reviews*. 27 (1): 543–574.
- Nicolas-Chanoine, M. H., Blanco, J., Leflon-Guibout, V., Demarty, R., Alonso, M. P., Caniça, M. M., Park, Y. J., Lavigne, J. P., Pitout, J. y Johnson, J. R. 2008. Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. *Journal Antimicrobial Chemother*. 61 (1): 273–281.
- O'Brien, A. D. y LaVeck, G. D. 1983. Purification and characterization of a *Shigella dysenteriae* 1-like toxin produced by *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*. 2 (40): 675-683.
- O'Brien, V. P., Hannan, T. J., Nielsen, H. V. y Hultgren S. J. 2016. Drug and vaccine development for the treatment and prevention of urinary tract infections. *Microbiology Spectrum*. 1 (4): 1-42.
- Ochman, H. y Selander R. K. 1984. Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations. *Journal of Bacteriology*. 2 (61): 690–693.
- Oliveira, F., Paludo, K. S., Arend, L. N., Farah, S. M., Pedroza, F. O., Souza, E. M., Surek, M., Picheth, G. y Fadel-Picheth, C. M. 2011. Virulence characteristics and antimicrobial susceptibility of uropathogenic *Escherichia coli* strains. *Genetics and Molecular Research*. 4 (10): 4114-4125.
- Oliver, A. y Cantón, R. 2004. Enterobacterias productoras de B-Lactamasas plasmídicas de espectro extendido. *Control Calidad SEIMC*. 1 (1): 1-10.
- Orskov, F. y Orskov, I. 1984. Serotyping of *Escherichia coli*. Ed. T. Bergan. London. p. 44-86.
- Paiva, C. 2006. *Escherichia coli* as a specialized bacterial pathogen. *Revista de biología e ciencias da terra*. 2 (16): 342.

- Pallecchi, L., Bartoloni, A., Fiorelli, C., Mantella, A., Di-Maggio, T., Gamboa, H., Gotuzzo, E., Kronvall, G., Paradisi, F. y Rossolini, G. M. 2007. Rapid dissemination and diversity of CTX-M extended-spectrum beta-lactamase genes in commensal *Escherichia coli* isolates from healthy children from low-resource settings in Latin America. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 8 (51): 2720–2725.
- Philippon, A., Labia, R. y Jacoby, G. 1989. Extended-spectrum beta-lactamas. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 33 (1): 1131-1136.
- Platell, J. L., Cobbold, R. N., Johnson, J. R., Heisig, A., Heisig, P., Clabots, C., Kuskowski, M. A. y Trott, D. J. 2011. Commonality among fluoroquinolone-resistant sequence type ST131 extraintestinal *Escherichia coli* isolates from humans and companion animals in Australia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 8 (55): 3782–3787.
- Poirel, L., Carattoli, A., Bernabeu, S., Bruderer, T., Frei, R. y Nordmann, P. 2010. A novel IncQ plasmid type harbouring a class 3 integron from *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 65 (8): 1594-1598.
- Prado, V., Basualdo, W., Arellano, C., Martínez, D. y Levine, M. M. 1995. Susceptibilidad in vitro de *Escherichia coli* enterohemorrágica frente a 11 antimicrobianos. *Revista Médica Chile*. 123: 1085-1090.
- Puerta-García, A. y Mateos-Rodríguez, F. 2010. Enterobacterias. *Medicine*. 10 (51): 3426-3431.
- Peirano, G., Vander Bj., Freeman, J. L., Poilel, L., Nordmann, P., Costello, M., Tchesnokova, V. L. y Pitout, J. D. 2014. Characteristics of *Escherichia coli* sequence type 131 isolates that produce extended-spectrum beta-lactamasas: global distribution of the H30-Rx sublineage. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 7 (58): 3762–3767.
- Pujol, M. y Peña, C. 2002. El significado clínico de las betalactamasas de espectro extendido. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2 (21): 69-71.

- Qadri, F., Svennerholm, A. M., Faruque, A. S. G. y Bradley.Sack, R. 2005. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. *American Society for Microbiology*. 3 (18): 465-483.
- Reyes, M., Durán, C. y Prado, V. 2004. Perfil de susceptibilidad a los antimicrobianos en cepas de *E. coli* productoras de Shiga toxina (STEC) aisladas de infecciones humanas y de alimentos. *Revista Médica de Chile*. 132(10): 1211-1216.
- Rivera-Tapia, J. A. 2002. Ecología microbiana del tracto digestivo en la etapa neonatal. *Revista Mexicana de Pediatría*. 69 (6): 257-260.
- Rodríguez-Ángeles, G. 2002. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pública de México*. 44 (5): 464-475.
- Rosen, D., Hooton, T., Stamm, W., Humphrey, P. y Hultgren S. 2007. Detection of intracellular bacterial communities in human urinary tract Infection. *PLoS Medicine*. 4 (12): 1949-1958.
- Ruiz, J. 2003. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 5 (51): 1109-1117.
- Sainz, T., Reyes, V., Vicente, J., Zárate, M., Navarro, A. y Eslava, C. A. 2008. Resistencia a antimicrobianos de cepas de *E. coli* de diversos serotipos aisladas de pacientes de un hospital psiquiátrico. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 4 (39): 18-25.
- Sánchez-Artola, B. 2004. Betalactamasas de espectro extendido (BLEE). Curso sepsis grave: capítulo 6. *Revista Electrónica de Medicina Intensiva*. 8 (4): 1-14.
- Sarkar, S., Ulett, G. C., Totsika, M., Phan, M. D. y Schembri, M. A. 2014. Role of capsule and O antigen in the virulence of uropathogenic *Escherichia coli*. *PLoS ONE*. 9 (4): e94786.
- Savageau, M. A. 1983. *Escherichia coli* habitats, cell types, and molecular mechanisms of gene control. *The American Naturalist*. 122 (6): 732–744.

- Schmidt, H., Beutin, L. y Karch, H. 1995. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. *Infection and Immunity*. 63 (3): 1055-1061.
- Schwarz, S., Kehrenberg, C., Doublet, B. y Cloeckaert, A. 2004. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews*. 5 (28): 519-542.
- Secretaría de Salud. 2009. Panorama epidemiológico de las infecciones de vías urinarias en México 2003-2008. <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/13291/sem51.pdf>. Consultado el 27 de agosto de 2019.
- Seral-García, C., Pardos-De la Gándara, M. y Castillo-García, F. J. 2010. Betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias distintas de *Escherichia coli* y *Klebsiella*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 1 (28): 12-18.
- Serrano, A., Serrano, J. J., Ayala, D., Guerra, Y., Padilla, J. y Trejos-Suarez, J. 2016. Caracterización por PCR- múltiple del grupo filogenético de *Escherichia coli* uropatógena aisladas de pacientes ambulatorios de Bucaramanga, Santander. *Revista Facultad de Ciencias de la Salud UDES*. 1 (3): 25.
- Sethabutr, O., Venkatesan, M., Yam-Pang, L. W., Smoak, B. L. y Sang, W. K. 2000. Detection of PCR products of the ipaH gene from *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* by enzyme linked immunosorbent assay. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 1 (37): 11-16.
- Servicio de Investigación Agrícola (SdeIA) e Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). 2009. Glosario. *National Agricultural Library*: 1-392.
- Slavchev, G., Pisareva, E. y Markova, N. 2009. Virulence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of culture collections*. 6 (1): 61-68.
- Smith, H. W. 1965. The development of the flora of the alimentary tract in young animals. *The Journal of Pathology and Bacteriology*. 2 (90): 495-513.

- Smith, Y., Rasmussen, B. y Grande, K. 2008. Hemolysin of uropathogenic *Escherichia coli* evokes extensive shedding of the uroepithelium and hemorrhage in bladder tissue within the first 24 hours after intraurethral inoculation of mice. *Infection of Immuniny*. 76 (7): 2978–2990.
- Snyder, J. D., Wells, J. G., Yashuk, J., Puhr, N. y Blake, P. A. 1984. Outbreak of invasive *Escherichia coli* gastroenteritis on a cruise ship. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2 (33): 281-284.
- Subashchandrabose, S. y Mobley, H. L. 2015. Virulence and fitness determinants of uropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology Spectrum*. 3 (4): 1-20.
- Tannock, G.W. 1995. Normal microflora: an introduction to microbes inhabiting the human body. Ed. Chapman and Hall. London. p. 310-388.
- Temple, K. L., Camper, A. K. y McFeters, G. A 1980. Survival of two Enterobacteria in feces buried in soil under field conditions. *Applied and Environmental Microbiology*. 4 (40): 794 - 797.
- Tenaillon, O., Skurnik, D., Picard, B., Denamu, E. 2010. La genética de poblaciones de *Escherichia coli* comensal. *Nature Reviews Microbiology*. 8 (3): 207 – 217.
- Tenover, F. C. 2006. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *The American Journal of Medicine*. 6 (119): 3-10.
- Terlizzi, M. E., Gribaudo, G. y Maffei M. E. 2017. UroPathogenic *Escherichia coli* (UPEC) Infections: Virulence Factors, Bladder Responses, Antibiotic, and Non-antibiotic Antimicrobial Strategies. *Frontiers in Microbiology*. 1566 (8): 1 – 23.
- Thomas, M. y Hooton, T. D. 2003. The current management strategies for community-acquired urinary tract infection. *Infectious Disease Clinics of North America*. 17 (2): 303-332.
- Torres, A. G., Arenas-Hernández, M. M. y Martínez-Laguna, Y. 2010. Pathogenic *Escherichia coli* in Latin America. Bentham Science Publishers Ltd. I. Texas, USA.
- Tóth I., Héroult F., Beutin, L y Oswald, E. 2003. Production of cytolethal distending toxins by pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from human and animal sources: establishment of the existence of a new *cdt* variant (Type IV). *Journal of Clinical Microbiology*. 41: 4285-4291.

- Varela, Y., Millán, B. y Araque, M. 2017. Diversidad genética de cepas extraintestinales de *Escherichia coli* productoras de las betalactamasas TEM, SHV y CTX-M asociadas a la atención en salud. *Biomédica*. 2 (37): 209-217.
- Van-Donsel, D. J., y Geldreich, E. E. 1971. Relationships of salmonellae to fecal coliforms in bottom sediments. *Water Research*. 11 (5) :1079-1087.
- Van-Donsel, D. J., Geldreich, E. E. y Clarke, N. A. 1967. Seasonal Variations in Survival of Indicator Bacteria in Soil and Their Contribution to Storm-water Pollution. *Applied Microbiology*. 6 (15): 1362-137.
- Vidal, J. E., Canizález-Román, E., Gutiérrez-Jiménez, J., y Navarro-García, F. 2007. Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatógena. *Salud pública de México*. 5 (49): 376 – 386.
- Vidal-Graniel, J. E. 2003. *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC): Una causa frecuente de diarrea infantil. *Salud en Tabasco*. 1 (9): 188-193.
- Vimont, S., Boyd, A., Bleibtreu, A., Bens, M., Goujon, J. M., Garry, L., Clermont, O., Denamur, E., Arlet, G. y Vandewalle, A. 2012. The CTX-M-15- producing *Escherichia coli* clone O25b:H4-ST131 has high intestine colonization and urinary tract infection abilities. *PLoS ONE*. 7(9): e46547.
- Von-Baum, H. y Marre, R. 2005. Resistencia a los antimicrobianos de *Escherichia coli* e implicaciones terapéuticas. *Revista Internacional de Microbiología Médica*. 295 (67): 503–511.
- Vugia, D. J., Samuel, M., Farley, M. M., Marcus, R., Shiferaw, B., Shallow, S., Smith, K. y Angulo, F. J. 2004. Invasive *Salmonella* infections in the United States, FoodNet, 1996-1999: incidence, serotype distribution and outcome. *Clinical Infectious Diseases*. 38 (Suppl 3): S149-S156.
- Wang, L., Rothmund, D., Curd, H. y Reeves, P. R. 2003. Species-wide variation in the *Escherichia coli* flagellin (H-antigen) gene. *Journal of Bacteriology*. 9 (185): 185:2936–2943.
- Weichhart, T., Haidinger, M., Hörl, W. y Säemann, M. 2008. Current concepts of molecular defense mechanisms operative during urinary tract infection. *European Journal of Clinical Investigation*. 38 (S2): 29–38.

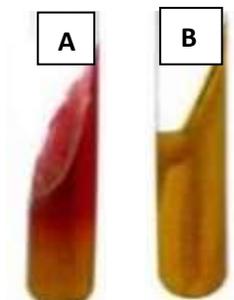
- Weissman, S. J., Johnson, J. R., Tchesnokova, V., Billig, M., Dykhuizen, D., Riddell, K., Rogers, P., Qin, X., Butler-Wu, S., Cookson, B., Fang, F. C., Scholes, D., Chattopadhyay, S. y Sokurenko, E. High-resolution Two-Locus Clonal Typing of Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 5 (78): 1353-1360.
- Werner, R., Kollak, A., Nierhaus, D. Schreiner, G. y Nierhas, K. 1973. Experiments on the binding sites and the action of some antibiotics wich inhibit ribosomal functions. *Drug Receptor Interactions in Antimicrobial Chemotherapy*. 1: 217-234.
- Wiles, T. J., Kulesus, R. R. y Mulvey, M. A. 2008. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Experimental and Molecular Pathology*. 1 (85): 11-19.
- Yoon, J. W. y Hovde, C. J., 2008. All blood, No stool: enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection. *Journal of Veterinary Science*. (9): 219-231.
- Yu, J., Cassels, F., Kersten, T. S., Hammond, S. A., Hartman, A., Angov, E., Corthesy, B., Alving, C. y Glenn, G. 2002. Transcutaneous immunization using colonization factor and heat-labile enterotoxin induces correlates of protective immunity for enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*. 3 (70): 1056-1068.
- Yamamoto, S., Terai, A., Yuri, K., Kurazono, H., Takeda, Y. y Yoshida, O. 1995. Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 12:85–90.
- Yun, K. W., Kim, H. Y., Park, H. K., Kim, W. y Lim, I. S. 2014. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* of urinary tract infections and asymptomatic bacteriuria in children. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 6 (47): 455-461.
- Zhong, Y. M., Liu, W., Meng, Q. y Li, Y. 2019. *Escherichia coli* O25b-ST131 and O16-ST131 causing urinary tract infection in women in Changsha, China: molecular epidemiology and clinical characteristics. *Infection and Drug Resistance*. 12: 2693-2702.

- Zhong, Y. M., Liu, W. E., Liang, X. H., Li, Y. M., Jian, Z. J. y Hawkey, P. M. 2015. Emergence and spread of O16-ST131 and O25b-ST131 clones among faecal CTX-M-producing *Escherichia coli* in healthy individuals in Hunan Province, China. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 8 (70): 2223- 2227.
- Zotta, C. M., Lavayén, S. A., Nario, F. y Piquín, A. 2016. Detección de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga en vísceras de animales bovinos y pollos destinadas para el consumo humano. *Journal of the Selva Andina Research Society*. 1 (7): 2-9.

## XII. ANEXOS

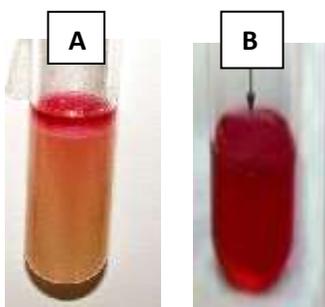
### PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Fermentación de glucosa y lactosa en agar Kligler. Resultados positivos fermentación

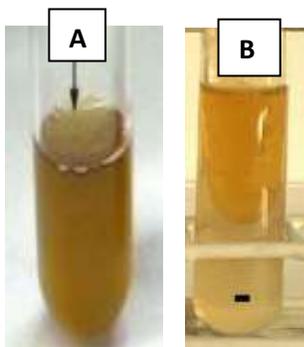


de glucosa (A) y fermentación de lactosa (B).

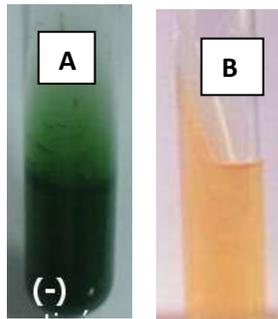
Producción de Indol y de ácido en medio de SIM y caldo RM-VP. Resultados positivos de producción de Indol (A) y ácido (rojo de metilo, B).



Prueba de Voges-Proskauer. Resultados negativos (A) con ausencia de producción de acetoína y de la prueba desaminación de la fenilalanina (B) observando ausencia en la transformación de ácido fenil pirúvico.



Prueba de malonato y producción de ureasa. Resultados negativos de la prueba de malonato (A) y ureasa (B).



Producción de ácido sulfhídrico. Prueba negativa de producción de ácido sulfhídrico.



Finalmente, no utilizaron fuente de carbono en la prueba de citrato de Simmons, por lo tanto, la prueba tuvo una reacción negativa.

