



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES**

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

DEPARTAMENTO DE MORFOLOGÍA

TESIS

**DETERMINACIÓN DE LOS PRINCIPALES FACTORES DE VIRULENCIA
Y RESISTENCIA DE *Escherichia coli* uropatógena EN LA POBLACIÓN DEL
ESTADO DE AGUASCALIENTES Y SU ASOCIACIÓN CON LA
CONTAMINACIÓN BIOLÓGICA DEL RÍO SAN PEDRO**

PRESENTA:

LAQB MARÍA GUADALUPE ROBLEDO GONZÁLEZ

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAestrÍA EN CIENCIAS EN EL ÁREA DE
TOXICOLOGÍA**

COTUTORES:

DR. FRANCISCO JAVIER AVELAR GONZÁLEZ

DRA. ALMA LILIAN GUERRERO BARRERA

ASESORA:

DRA. FLOR YAZMÍN RAMÍREZ CASTILLO

AGUASCALIENTES, AGS., 17 DE MAYO DE 2017



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES
FORMATO DE CARTA DE VOTO APROBATORIO

M. en C. José de Jesús Ruíz Gallegos
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

PRESENTE

Por medio del presente, como Tutor designado del estudiante **MARÍA GUADALUPE ROBLEDO GONZÁLEZ** con ID 99083 quien realizó la tesis titulado: **DETERMINACIÓN DE LOS PRINCIPALES FACTORES DE VIRULENCIA Y RESISTENCIA DE *Escherichia coli* uropatógena EN LA POBLACIÓN DEL ESTADO DE AGUASCALIENTES Y SU ASOCIACIÓN CON LA CONTAMINACIÓN BIOLÓGICA DEL RÍO SAN PEDRO**, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla, y así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 16 de mayo de 2016.

Dra. Alma Lilian Guerrero Barrera

Dr. Francisco Javier Avelar González

Tutores de tesis

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría de Investigación y Posgrado
c.c.p.- Jefatura del Depto. de _____
c.c.p.- Consejero Académico
c.c.p.- Minuta Secretario Técnico



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES
FORMATO DE CARTA DE VOTO APROBATORIO

M. en C. José de Jesús Ruíz Gallegos.
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

PRESENTE

Por medio del presente, como Tutor designado del estudiante **MARÍA GUADALUPE ROBLEDO GONZÁLEZ** con ID 99083 quien realizó la tesis titulado: **DETERMINACIÓN DE LOS PRINCIPALES FACTORES DE VIRULENCIA Y RESISTENCIA DE *Escherichia coli* uropatógena EN LA POBLACIÓN DEL ESTADO DE AGUASCALIENTES Y SU ASOCIACIÓN CON LA CONTAMINACIÓN BIOLÓGICA DEL RÍO SAN PEDRO**, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla, y así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 16 de mayo de 2016.


Dra. Flor Yazmin Ramirez Castillo
Asesor de tesis

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría de Investigación y Posgrado
c.c.p.- Jefatura del Depto. de _____
c.c.p.- Consejero Académico
c.c.p.- Minuta Secretario Técnico



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

MARIA GUADALUPE ROBLEDO GONZÁLEZ
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
PRESENTE.

Estimada alumna:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o caso práctico titulado: **“DEGRADACIÓN DE LOS PRINCIPALES FACTORES DE VIRULENCIA Y RESISTENCIA DE *Escherichia coli* uropatógena EN LA POBLACIÓN DEL ESTADO DE AGUASCALIENTES CON LA CONTAMINACIÓN BIOLÓGICA DEL RÍO SAN PEDRO”**, hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

ATENTAMENTE

Aguascalientes, Ags., a 18 de mayo de 2017

“Se lumen proferre”

EL DECANO

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'José de Jesús Ruiz Gallegos'.

M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS

c.c.p.- Archivo.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Agradecimientos

Gracias a la Comisión Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico para llevar a cabo esta investigación, agradezco también a la Universidad Autónoma de Aguascalientes por el espacio y sus instalaciones, al Centro de Ciencias Básicas y al Departamento de Morfología, específicamente al laboratorio de Biología Celular y Tisular donde se llevó a cabo este trabajo. Gracias a los Doctores Francisco Javier Avelar González y Alma Lilian Guerrero Barrera por aceptarme en sus líneas de investigación, por dirigir esta investigación, así como por su apoyo y asesoría, muchas gracias.

Agradezco a la Doctora Flor Yazmín Ramírez Castillo por su entrega y total apoyo brindado para el desarrollo de esta investigación, así como por su amistad y paciencia muchas gracias.

Gracias a mis compañeros de laboratorio Adriana, Fabiola, Saúl, Roberto, Mauricio, Carlos, Alejandra, Margarita y Nicy, por su amistad y por su constante y desinteresado apoyo.

Gracias al Dr. Eduardo por su apoyo y asesoría en las pruebas de toxicidad implementadas en esta investigación.

Al Laboratorio de Investigación y Desarrollo en Biología Molecular y Biomateriales de la Unidad Médico Didáctica del Departamento de Estomatología gracias por las facilidades otorgadas.

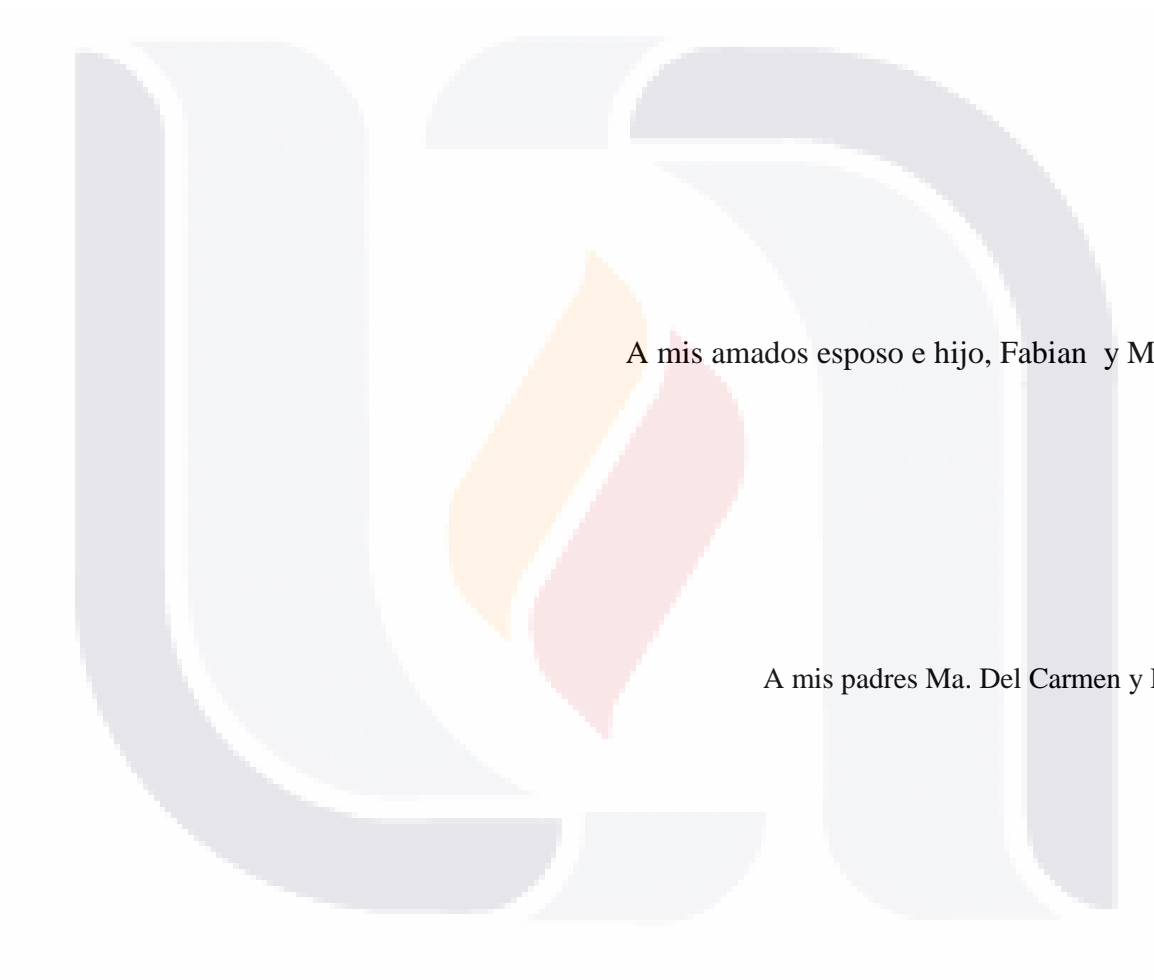
Agradezco a todos los profesores de la maestría por su entrega y paciencia.

Gracias a mis padres Carmen González y Elías Robledo, a mis hermanos Luz Elena, Miguel Ángel, Avelina, Emmanuel, Juan Pedro, Paulina, Teresita, María, Gerónimo, Verónica y Angelina por su incesante apoyo. A Alejandra Medina y Alejandra Aguiñaga gracias por su amistad y apoyo.

Finalmente gracias a mi esposo Fabian, por su apoyo y paciencia.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Dedicatoria



A mis amados esposo e hijo, Fabian y Mateo.

A mis padres Ma. Del Carmen y Elías.

Índice

CONTENIDO	PÁGINA
Índice	1
Índice de tablas	4
Índice de figuras	5
Abreviaturas	9
Resumen	10
Abstract	13
1. Antecedentes directos	16
1.1 Presencia de cepas patógenas de <i>Escherichia coli</i> extraintestinales en el ambiente y el riesgo para la salud humana	16
1.2 Impacto de la resistencia a antimicrobianos en infecciones de vías urinarias en México	17
2. Introducción	21
2.1 Infección del tracto urinario	21
2.2 <i>Escherichia coli</i>	25
2.2.1 <i>Escherichia coli</i> uropatógena	26
2.2.2 Factores de virulencia de UPEC	28
2.2.3 Toxinas de UPEC	31
2.2.3.1 Toxina Alfa-hemolisina	32
2.2.3.2 Factor necrotizante citotóxico	32
2.2.3.3 Toxina autotransportadora secretada (SAT/VAT)	33
2.2.4 Susceptibilidad antimicrobiana	33
2.2.4.1 Mecanismos de resistencia	36
2.2.5 Formación de biopelículas	37
3. Justificación	40
4. Objetivos	42
4.1 Objetivos Generales	42

4.2 Objetivos Específicos	42
5. Hipótesis	43
6. Materiales y métodos	44
6.1 Caracterización de grupos filogenéticos y factores de virulencia	45
6.2 Susceptibilidad antimicrobiana	45
6.2.1 Determinación de genes de resistencia a fluoroquinolonas	46
6.3 Determinación de la capacidad hemolítica	46
6.4 Ensayos de formación de biopelículas	46
6.4.1 Ensayo de Rojo Congo	47
6.4.2 Ensayo de Calcofluor	47
6.4.3 Ensayo de Motilidad	47
6.4.4 Formación de biopelículas por el método de cristal violeta	47
6.5 Obtención de extracto crudo de la toxina HlyA	48
6.5.1 Efecto del extracto crudo de la toxina alfa hemolisina en glóbulos rojos	49
6.5.2 Efecto del extracto crudo de la toxina alfa hemolisina en células endoteliales	49
7. Resultados	51
7.1 Prevalencia de las infecciones del tracto urinario	51
7.2 Caracterización de grupos filogenéticos	53
7.3 Prevalencia de los factores de virulencia	54
7.4 Susceptibilidad antimicrobiana	58
7.4.1 Prevalencia de genes de resistencia a fluoroquinolonas	62
7.5 Determinación de la capacidad hemolítica	64
7.6 Ensayos de formación de biopelículas	64
7.6.1 Ensayo Rojo Congo	65
7.6.2 Ensayo de Calcofluor	66

7.6.3 Ensayo de Motilidad	66
7.6.4 Formación de biopelículas por el método de cristal violeta	67
7.7 Obtención del extracto crudo de la toxina alfa hemolisina	70
7.7.1 Determinación de la actividad hemolítica y citotóxica del extracto crudo de la toxina alfa-hemolisina	71
7.8 Análisis comparativo de las características de las cepas ambientales y las cepas uropatógenas	73
7.8.1 Tipo de patógeno	74
7.8.2 Comparación de los factores de virulencia	75
7.8.3 Susceptibilidad antimicrobiana	77
7.8.4 Capacidad para formar biopelícula por el método de cristal violeta	78
8. Discusión	80
9. Conclusiones	88
10. Glosario	90
11. Referencias bibliográficas	91
Anexos	

Índice de tablas

	PÁGINA
Tabla 1. Factores de virulencia de <i>Escherichia coli</i> uropatógena (UPEC) comúnmente estudiados	30
Tabla 2. Toxinas presentes en <i>Escherichia coli</i> patógena extraintestinal (ExPEC)	31
Tabla 3. Familias más importantes de antibióticos y sus mecanismos de acción	37
Tabla 4. Prevalencia de los factores de virulencia por género y edad del hospedero, tipo de adquisición de la infección y tipo de <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)	58

Índice de figuras

	PÁGINA
Figura 1. Ocurriencia y destino de los farmacéuticos en el ambiente	18
Figura 2. Mecanismos de patogenicidad de UPEC	27
Figura 3. Factores de virulencia de UPEC	28
Figura 4. Adquisición de hierro: Enterobactina	29
Figura 5. Asociación de UPEC con las diferentes toxinas	31
Figura 6. Mecanismos de resistencia de la biopelícula a los antibióticos	35
Figura 7. Mecanismos de resistencia antimicrobiana innata y adquirida	36
Figura 8. Eventos en el desarrollo de una biopelícula	39
Figura 9. Esquema general de la metodología para el estudio	44
Figura 10. Prevalencia de las infecciones del tracto urinario (ITUs) por adquisición de la infección y por género del hospedero	51
Figura 11. Prevalencia del tipo de patógeno en las infecciones del tracto urinario por adquisición de la infección y por género del hospedero	52
Figura 12. Incidencia de infecciones del tracto urinario por edad respecto al género, adquisición de la infección y tipo de patógeno	52
Figura 13. Clasificación de los aislados en los grupos filogenéticos	53
Figura 14. Prevalencia de los factores de virulencia	55
Figura 15. Diagrama de caja y bigotes de la relación entre los factores de virulencia identificados en las cepas de	57

E. coli aisladas de pacientes con infecciones urinarias respecto al género, edad, adquisición de la infección y tipo de *E. coli*

Figura 16.	Promedio de factores de virulencia por filogrupo	58
Figura 17.	Porcentaje de resistencia de las cepas aisladas de <i>E. coli</i> por antibiótico	59
Figura 18.	Porcentaje de multi-drogo resistencia, resistencia y sensibilidad de los aislados de <i>E. coli</i> a los antibióticos prescritos para el tratamiento de ITUs	60
Figura 19.	A) Susceptibilidad a antibióticos por adquisición de la infección y B) por género del hospedero	60
Figura 20.	Prevalencia de cepas multi-drogo resistentes, resistentes y sensibles de los aislados clínicos por filogrupo	61
Figura 21.	Prevalencia de genes de resistencia a fluoroquinolonas	63
Figura 22	Asociación del promedio de los factores de virulencia de las cepas del filogrupo B2 con respecto a la susceptibilidad a levofloxacino y ciprofloxacino	63
Figura 23.	Prevalencia de cepas con capacidad hemolítica	64
Figura 24.	Ensayo Rojo Congo	66
Figura 25.	Enayo de Calcofluor	66
Figura 26.	Ensayo de motilidad	67
Figura 27.	Prevalencia de estructuras involucradas en la formación de biopelículas de cepas causantes de infecciones urinarias de los filogrupos B2 y D	67
Figura 28.	A) Formación de biopelícula por el método de cristal violeta en microplaca de 96 pozos de aislados clínicos pertenecientes a los filogrupos B2	68

	y D. B) Prevalencia del tipo de biopelícula formada	
Figura 29.	Prevalencia de los factores de virulencia en cepas formadoras de biopelícula	68
Figura 30.	Formación de biopelículas de acuerdo a las características del hospedero y genotípicas de los aislados	69
Figura 31.	Curva de calibración con albúmina sérica bovina (ABS) para cuantificación de proteínas por el método de Bradford	70
Figura 32.	Cuantificación de proteína de los extractos totales de los aislados clínicos	70
Figura 33.	SDS-PAGE en poliacrilamida	71
Figura 34	Resultados del ensayo de hemólisis del extracto crudo de la toxina de los aislados clínicos	71
Figura 35	Resultados del ensayo de citotoxicidad del extracto crudo de la toxina de los aislados clínicos	72
Figura 36	Análisis de la presencia o ausencia de los genes <i>hlyA</i> y <i>cnf1</i> respecto a su actividad hemolítica o citotóxica	73
Figura 37.	A) Prevalencia de cepas ExPEC de asilados clínicos y ambientales ($p < 0.001$) B) Prevalencia de cepas UPEC de asilados clínicos y ambientales	74
Figura 38.	A) Promedio de los factores de virulencia de las cepas clínicas y ambientales. B) Prevalencia de los factores de virulencia de las cepas clínicas y ambientales	75
Figura 39.	Prueba de Fisher para la asociación de los factores de virulencia y el origen de la cepa	76
Figura 40.	Susceptibilidad antimicrobiana de los aislados clínicos y ambientales por antibiótico	77

Figura 41.	Prevalencia de cepas MDR, R y S de los aislados clínicos y ambientales	78
Figura 42.	Capacidad para formar biopelículas por el método de cristal violeta de los aislados clínicos y ambientales	79
Figura 43.	Prevalencia de los factores de virulencia de cepas ambientales y clínicas formadoras de biopelícula	79



Abreviaturas

ASB	Bacteruria asintomática
CBI	Comunidades bacterianas intracelulares
DAEC	<i>Escherichia coli</i> adherente difusa
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatógena
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica
ExPEC	<i>Escherichia coli</i> patógeno extraintestinal
FUTI	Infección del tracto urinario alimenticio
InPEC	<i>Escherichia coli</i> patógeno intrainestinal
InPEC	<i>Escherichia coli</i> patógeno intrainestinal
ITUs	Infecciones del tracto urinario
IUR	Infección urinaria recurrente
LB	Caldo Luria Bertani
MDR	Multidrogo resistencia
NMEC	<i>Escherichia coli</i> causante de meningitis neonatal
SEPEC	<i>Escherichia coli</i> causante de sepsis
STEC	<i>Escherichia coli</i> productora de la toxina Shiga
UPEC	<i>Escherichia coli</i> uropatógena

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Resumen

Una infección del tracto urinario (ITU) se produce cuando el tracto urinario estéril es conquistado por microorganismos patógenos, causando desde bacteruria hasta daño renal irreversible y sepsis en los casos más severos. Las ITUs son la segunda causa de morbilidad a nivel mundial y son causadas principalmente por *Escherichia coli* uropatógena (UPEC), un subgrupo de los patógenos extraintestinales de *Escherichia coli* (ExPEC).

En el presente estudio se llevó a cabo el análisis de 64 cepas aisladas de pacientes con ITU adquirida en la comunidad o en el hospital de hombres y mujeres desde la edad neonatal a 94 años, proporcionadas por el Centenario Hospital Miguel Hidalgo que fueron evaluadas para determinar la prevalencia de esta enfermedad por género, adquisición de la infección, el tipo de patógeno, su clasificación en filogrupos, así como los grupos poblacionales más susceptibles. También se llevó a cabo la determinación de los factores de virulencia de cada aislado, así como el perfil de resistencia a antimicrobianos, la capacidad para formar biopelículas y se obtuvieron extractos crudos para determinar la actividad de la toxina alfa-hemolisina sobre glóbulos rojos y células endoteliales. Finalmente las características de los aislados clínicos fueron comparadas con cepas ambientales de *E. coli* patógenas, drogo o multi-drogo resistentes aisladas del río San Pedro en el Estado de Aguascalientes.

El estudio reveló que las ITUs son adquiridas en la comunidad siendo el género femenino el más afectado (57.14%), el agente causal principal es UPEC (57.14%), que contiene una cantidad significativamente mayor de factores de virulencia que las cepas clasificadas como patógenos potenciales ($p < 0.05$). Los grupos poblacionales más susceptibles son los niños de edad neonatal a 10 años, así como los adultos mayores de 51 años ($p < 0.001$). Los aislados pertenecen principalmente a los filogrupos B2 y D (28.57% y 12.59% respectivamente). Los aislados del filogrupo B2 son las cepas significativamente más virulentas (6.5 ± 1.94 factores de virulencia) ($p < 0.0001$) respecto a los filogrupos A, B1 y C, así mismo son las que presentan mayor prevalencia de resistencia a los antimicrobianos (83.33% multi-drogo resistentes).

El patrón de virulencia con mayor frecuencia fue *fimH-kpsMTII-chuA* (52.38%), la toxina *vat* no fue identificada. En el extracto crudo fue encontrada una elevada actividad citotóxica perteneciente a la toxina alfa-hemolisina, sin embargo, no se encontró asociación con la presencia del gen *hlyA* y/o *cnfI* ($p=0.9998$).

Cerca del sesenta porciento de los aislados clínicos presentaron multi-drogo resistencia ($p=0.0335$), incluyendo a los de primera línea para el tratamiento de ITUs donde el patrón de resistencia observado fue para ampicilina-sulbactam (68.25%), por lo que las opciones disponibles para el tratamiento de ITUs en el estado pueden ser ampicilina/tazobactam, ertapenem, imipinem, amikacina y nitrofurantoína. Se encontró elevada prevalencia de genes de resistencia a fluoroquinolonas tanto adquiridos por mutación (88.33%), como los adquiridos por transferencia (50.83%) así como una asociación significativa entre las cepas del filogrupa B2 sensibles a fluoroquinolonas y con un promedio mayor de factores de virulencia (5.5 ± 1.64 factores de virulencia) respecto a los aislados con fenotipo resistente y con menor carga virulenta (2.91 ± 1.08 factores de virulencia) ($p=0.0010$).

Respecto a los ensayos de formación de biopelículas de aislados de los filogrupos B2 y D, 84% de los aislados presentaron curli ($p<0.0001$), 15.4% presentaron celulosa y 50% motilidad flagelar. La formación de biopelículas por el método de cristal violeta reveló que la mayoría de la cepas fueron poco adherentes (92.3%, $p<0.0001$), y que este tipo de bioepícula depende en mayor parte de la presencia de *fimH* y *kpsMTII* ($p<0.0001$), además este tipo de biopelícula se asoció al género masculino ($p=0.0301$), por lo que la formación de biopelícula representa otro mecanismo de virulencia en las ITUs que afecta principalmente al género masculino en el Estado.

Los aislados ambientales presentaron 31.03% de cepas ExPEC, mientras que la proporción en los aislados clínicos fue de 87.30%, y se asoció al origen de la cepa ($p<0.001$); la presencia de cepas UPEC en el ambiente fue de 13.79%, no se observó diferencia significativa en la carga patogénica ($p=0.94$) respecto a los aislados clínicos. Sin embargo, los aislados clínicos poseen mayor capacidad de virulencia en comparación a los aislados ambientales (4.75 ± 2.2 y 1.9 ± 1.4 factores de virulencia respectivamente, $p<0.0001$). No se identificaron las toxinas *vat* y *hlyA* en los aislados ambientales. Los

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

aislados ambientales presentaron resistencia para la ampicilina (41.38%), TMP-SMX (37.93%) y ceftazidima (37.93%), mismos para los que se reportó resistencia en aislados clínicos (82.5%, 55.6% y 36.5% respectivamente), por lo que la presencia de cepas de *E. coli* ambientales resistentes a antibióticos utilizados para el tratamiento de UTIs representan un riesgo no solo para la adquisición de infecciones en el hombre y animales, sino también para la diseminación de resistencia. Finalmente 25.58% de las cepas ambientales forman biopelícula, lo que en el ambiente acuático representa una estrategia de supervivencia donde el factor de virulencia principalmente asociado fue *fimH* (62.5%).

La presencia de cepas patógenas ExPEC en el río San Pedro resistentes a antibióticos representa un riesgo para la salud humana y animal en el Estado de Aguascalientes pues podrían estar asociadas a la adquisición de infecciones urinarias, al compartir similitudes entre factores de virulencia, resistencia así como por su capacidad de formar biopelículas, por lo tanto es necesario plantear nuevas estrategias para el tratamiento de aguas residuales, así como realizar estudios posteriores en los que se recomienda aumentar el número de muestras, así como la implementar estudios como análisis de riesgo, uso de modelos animales, cultivos celulares y MLST para determinar el potencial patogénico de cepas ambientales para causar infecciones urinarias en el Estado.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Abstract

A urinary tract infection (UTI) occurs when the sterile urinary tract is conquered by pathogenic microorganisms, resulting from bacteruria to irreversible kidney damage and sepsis in the most severe cases. UTIs are the second leading cause of global morbidity and are mainly caused by uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC), a subgroup of the extraintestinal pathogens of *Escherichia coli* (ExPEC).

In the present study, the analysis of 64 strains isolated from patients with UTI acquired in the community or in the hospital of both sex: men and women from the neonatal age to 94 years, provided by the Centenario Hospital Miguel Hidalgo, were evaluated to determine the prevalence of this disease by gender, acquisition of the infection, the type of pathogen, its classification into phylogeny, as well as the most susceptible population groups. The determination of the virulence factors of each isolate as well as the antimicrobial resistance profile, the ability to form biofilms and crude extracts were obtained to determine the activity of the alpha-hemolysin toxin on red blood cells and cells endothelial cells. Finally the characteristics of the clinical isolates were compared with environmental strains of pathogenic, drug-resistant or multi-drug resistant *E. coli* isolated from the San Pedro River in the State of Aguascalientes.

The study revealed that UTIs are community-acquired and female gender is the most affected (57.14%), the main causal agent is UPEC (57.14%), which contains significantly more virulence factors than strains classified as potential pathogens ($p < 0.05$). The most susceptible population groups are children of neonatal age at 10 years, as well as adults older than 51 years ($p < 0.001$). The isolates belong mainly to the phylogroups B2 and D (28.57% and 12.59%, respectively). The isolates of the phylogenetic group B2 are the most virulent strains (6.5 ± 1.94 virulence factors) ($p < 0.0001$) with respect to the phylogroups A, B1 and C, as well as those with a higher prevalence of antimicrobial resistance (83.33% Multi-drug resistant).

The most frequent virulence pattern was *fimH-kpsMTII-chuA* (52.38%), the vat toxin was not identified. In the raw extract, a high cytotoxic activity was found belonging to the

alpha-hemolysin toxin, however, no association was found with the presence of the *hlyA* and / or *cnf1* gene ($p=0.9998$).

About sixty percent of the clinical isolates had multi-drug resistance ($p = 0.0335$), including first-line treatment for UTIs where the resistance pattern observed was for ampicillin-sulbactam (68.25%), so the options available for the treatment of ITUs in the state may be ampicillin/tazobactam, ertapenem, imipenem, amikacin and nitrofurantoin. We found a high prevalence of both fluoroquinolone resistance genes acquired by mutation (88.33%) and those acquired by transfer (50.83%) as well as a significant association between fluoroquinolone-sensitive strains of the phylogroup B2 and with a higher average of factors Virulence (5.5 ± 1.64 virulence factors) with respect to isolates with resistant phenotype and with a lower virulent load (2.91 ± 1.08 virulence factors) ($p=0.0010$).

Regarding the biofilm formation tests of isolates of the phylogenetic groups B2 and D, 84% of the isolates presented curli ($p<0.0001$), 15.4% presented cellulose and 50% flagellar motility. Biofilm formation by the crystal violet method revealed that most of the strains were poorly adherent (92.3%, $p <0.0001$), and that this type of biofilm depends in large part on the presence of *fimH* and *kpsMTII* ($p<0.0001$). In addition, this type of biofilm was associated with the male gender ($p = 0.0301$), so biofilm formation represents another mechanism of virulence in ITUs that mainly affects the male gender in the State.

The environmental isolates presented 31.03% of ExPEC strains, while the proportion in the clinical isolates was 87.30%, and it was associated with the origin of the strain ($p<0.001$); the presence of UPEC strains in the environment was 13.79%, there was no significant difference in pathogenic load ($p=0.94$) with respect to clinical isolates. However, clinical isolates have a higher virulence capacity compared to environmental isolates (4.75 ± 2.2 and 1.9 ± 1.4 virulence factors respectively, $p<0.0001$). *Vat* and *hlyA* toxins were not identified in the environmental isolates. The environmental isolates showed resistance to ampicillin (41.38%), TMP-SMX (37.93%) and ceftazidime (37.93%), for which resistance was reported in clinical isolates (82.5%, 55.6% and 36.5%, respectively). The presence of antibiotic resistant *E. coli* strains used for the treatment of UTIs represents a risk not only for the acquisition of infections in man and animals, but also for resistance

disem- bination. Finally 25.58% of the environmental strains form biofilm, which in the aquatic environment represents a survival strategy where the virulence factor mainly associated was *fimH* (62.5%).

The presence of pathogenic strains ExPEC in the San Pedro river resistant to antibiotics represents a risk to human and animal health in the State of Aguascalientes since they could be associated with the acquisition of urinary infections, sharing similarities between factors of virulence, resistance as well its ability to form biofilms, it is therefore necessary to propose new strategies for the treatment of wastewater, as well as carry out further studies in which it is recommended to increase the number of samples, as well as to implement studies such as risk analysis, use Of animal models, cell cultures and MLST to determine the pathogenic potential of environmental strains to cause urinary tract infections in the State.

1. Antecedentes directos

1.1 Presencia de cepas patógenas de *Escherichia coli* extraintestinales en el ambiente y el riesgo para la salud humana.

Escherichia coli normalmente es considerada una bacteria comensal del tracto digestivo y es utilizada como indicador de la contaminación microbiológica del agua, sin embargo algunas cepas específicas son patógenas y pueden causar brotes de infecciones asociadas a actividades recreativas en el agua, a alimentos contaminados, y a la ingestión de agua contaminada con microorganismos fecales (Biswal *et al.*, 2014, Ramírez-Castillo *et al.*, 2013, Cabral, 2010).

Por otra parte, más allá de su importancia como agentes infecciosos, las cepas de *E. coli* también son vectores para la diseminación de la resistencia a los antimicrobianos debido a la colonización el tracto intestinal de humanos y animales, así como por su capacidad para vivir fuera de huéspedes animales, especialmente las cepas patógenas extraintestinales de *E. coli* (ExPEC) ya que poseen diversos factores de virulencia que les confieren ventajas competitivas para la colonización intestinal y posterior infección extraintestinal, así como por la presencia de genes de resistencia a antimicrobianos (Biswal *et al.*, 2014).

Una cepa ExPEC es genotípica y fenotípicamente distinta de *E. coli* comensal y de *E. coli* patógeno intrainestinal (InPEC), causante de infecciones gastrointestinales (Nordstrom *et al.*, 2013). El tracto intestinal humano es el principal reservorio de estas cepas ExPEC, que lo habitan de forma inofensiva y a largo plazo (Mohamed *et al.*, 2015).

Dentro de las infecciones causadas por cepas ExPEC, se encuentran las asociadas al tracto urinario (entre otras como meningitis neonatal y sepsis), donde *E. coli* es el patógeno más común que causa infecciones del tracto urinario (ITU), de un 75 a 95% de todos los casos, y se conoce como *E. coli* uropatógena (UPEC), como ya se mencionó anteriormente, su principal reservorio es el tracto gastrointestinal, y el tiempo entre la colonización gastrointestinal y la posterior infección del tracto urinario puede ser una ventana de riesgo de hasta seis meses (Singer, 2015).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Dado que el tracto intestinal es reservorio de cepas ExPEC, investigadores sugieren la transmisión de infecciones urinarias a través de los alimentos, conocida como infección del tracto urinario alimenticio o ITU alimenticio (FUTI, por sus siglas en inglés), donde alimentos como la carne contaminada y el agua juegan un papel importante en la diseminación de cepas de *E. coli* (Singer, 2015; Nordstrom *et al.*, 2013).

Por otra parte el uso de agentes antimicrobianos en animales que son utilizados como fuentes de alimento promueve la selección de cepas ExPEC resistentes que ya han sido identificadas en carne de pollo, así como también se ha observado un aumento de las infecciones urinarias resistentes a antimicrobianos en mujeres que consumen con frecuencia carne de pollo y de cerdo (Singer, 2015).

Además de los alimentos y agua contaminados, los animales de compañía tales como perros y gatos también son organismos considerados responsables de la transmisión de cepas UPEC causantes de infecciones urinarias, dada la similitud entre aislados clínicos de humanos y estos animales de acuerdo a un estudio realizado por Liu y colaboradores (2015) sugiriendo la posible transmisión zoonótica de infecciones urinarias por la cercanía del hombre con sus mascotas.

1.2 Impacto de la resistencia a antimicrobianos en infecciones de vías urinarias en México.

Los antimicrobianos se encuentran entre los medicamentos que más se venden y se consumen en México; representan un mercado anual de 960 millones de dólares siendo el segundo lugar de ventas anuales (14.3%) en farmacias privadas en el país, una proporción mayor cuando se compara con otros países desarrollados o en transición con mercados farmacéuticos grandes. Algunos de los factores que se han relacionado con la prescripción inadecuada en México son las deficiencias en la educación médica de pre y posgrado; la falta de información independiente sobre medicamentos; la influencia de la información proporcionada por la industria farmacéutica; la percepción de las expectativas de los

pacientes en cuanto a recibir medicamentos y, por último, la prevalencia de patrones de tratamiento incorrectos, pero institucionalizados (Foxman, 2007).

El tratamiento de las infecciones causadas por cepas patógenas de *Escherichia coli* extraintestinales se ha complicado por la aparición de resistencia a los antimicrobianos, especialmente a finales de 1990 (Pitout, 2012). Dentro de las principales vías de propagación de patógenos resistentes a antibióticos está el medio ambiente, incluyendo el agua, suelo y aire, ya que después de utilizar un antibiótico, éste o sus metabolitos llegan al ambiente a través de las descargas municipales, industriales y hospitalarias, donde no son eliminados por los tratamientos comunes utilizados en las plantas de tratamiento de aguas residuales (Ramírez-Castillo *et al.*, 2014). Por otra parte, fármacos de uso veterinario empleados en la cría de animales pasan al entorno del suelo, donde se utilizan abonos como fertilizantes, donde con el tiempo, los residuos de estos medicamentos se acumulan en el suelo o penetran en las aguas freáticas o superficiales, donde finalmente las reacciones de transformación y degradación que ocurren en el ambiente alteran la movilidad, persistencia y destinos de estos residuos (**Figura 1**) (Weber *et al.*, 2014).

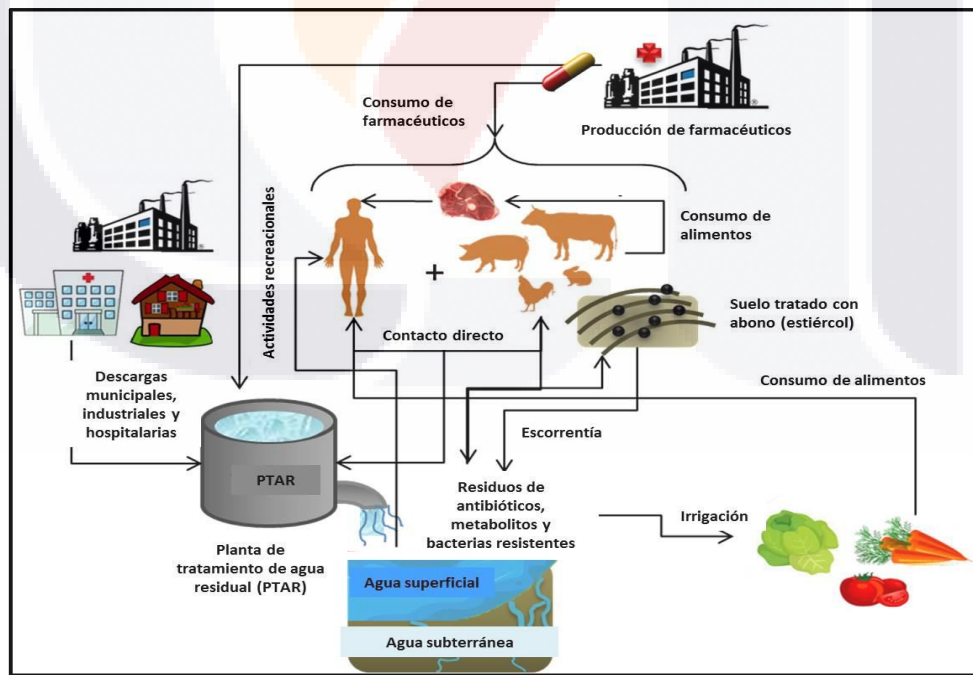


Figura 1. Ocurrencia y destino de los fármacos en el ambiente. PTAR: planta de tratamiento de aguas residuales. Tomado y modificado de Ramírez-Castillo (*et al.*, 2014).

En un reciente estudio realizado en México, las cepas UPEC constituyen una creciente preocupación porque los tres fármacos de primera elección mostraron prevalencia de alta resistencia, el 74% de las cepas fueron resistentes a la ampicilina, 60,1% a cotrimoxazol y el 32,6%, a la ciprofloxacina. Estos resultados indican que el tratamiento empírico inicial con ampicilina, fluoroquinolona y SXT ya no es apropiado en México (Molina *et al.*, 2011).

Aunque el uso adecuado de antibióticos es un enfoque actual en México, existe poca información publicada sobre el impacto en el país con respecto al uso inadecuado de antibióticos en términos de la resistencia bacteriana. Actualmente en nuestro país, no existe una vigilancia integral de las infecciones urinarias adquiridas en la comunidad, por lo tanto, es muy difícil estimar la verdadera incidencia de las infecciones urinarias y el posible tratamiento que podremos utilizar para controlar la propagación de estos organismos (Calderón-Jaimes *et al.*, 2013).

Por otra parte, la formación de biopelículas (comunidades y/o agregados microbianos adheridas a una matriz extracelular producidas por ellas mismas), se considera hoy en día un riesgo potencial para la salud humana, pues está asociado a la resistencia a antimicrobianos y es una necesidad localizar un tratamiento adecuado para infecciones crónicas relacionadas a biopelículas. En la actualidad, se han propuesto varias estrategias con el objetivo de inhibir la formación de estos agregados microbianos por diferentes sustancias tanto en solución como aplicadas a dispositivos médicos (Manges *et al.*, 2008).

El presente estudio se deriva del resultado de trabajos de investigación de tesis de maestría y doctorado realizados anteriormente en la Universidad Autónoma de Aguascalientes que han permitido conocer el efecto de la contaminación ambiental en la salud pública en el Estado de Aguascalientes. Estas investigaciones determinaron la presencia de microorganismos patógenos en cuerpos de agua superficial en el Estado de Aguascalientes, incluyendo *Shigella*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Pseudomonas* y *E. coli* (Carrasco-Rosales *et al.*, 2008); así como la presencia de diversos tipos de patógenos tanto intraintestinales como extraintestinales de *E. coli* con elevada resistencia antimicrobiana en cuerpos de agua superficial afectados con diversos tipos de contaminantes tales como

colorantes, textiles, leche, desechos de rastros municipales, desechos municipales, desechos industriales, etc., que se han identificado estos contaminantes como una causa de afección a la salud humana y animal en nuestro Estado (Ramírez-Castillo *et al.*, 2013).

Debido a la presencia de *E. coli* extraintestinal incluyendo *E. coli* uropatógena (UPEC) y su elevada incidencia en cuerpos de agua cercanos a poblaciones humanas reportados en el Estado (Ramírez-Castillo *et al.*, 2013), este estudio pretende investigar las características de virulencia, resistencia y formación de biopelículas en pacientes con infecciones urinarias debido a cepas de *E. coli* patógenas extra-intestinales con la finalidad de entender e investigar una posible asociación entre la presencia y el impacto de los factores de virulencia en presencia de infecciones en la población, resaltando entre estos factores de virulencia, la toxina alfa hemolisina, secretada por UPEC, altamente asociada a infecciones urinarias superiores como pielonefritis y daño renal (Bien *et al.*, 2011).

2. Introducción

2.1 Infección del tracto urinario.

Las infecciones del tracto urinario (ITU) incluyendo cistitis y pielonefritis son consideradas la segunda causa más común de infecciones en humanos en todo el mundo que afecta tanto a niños como a adultos (Tabasi *et al.*, 2015; Vollmerhausen *et al.*, 2014; Momtaz *et al.*, 2013). A nivel mundial ocurren de 150 a 250 millones de casos cada año, costando a la economía mundial más de 6 millones de dólares (Eshetie *et al.*, 2015).

En México, estas infecciones son la tercera causa de morbilidad, después de las infecciones respiratorias y gastrointestinales. De acuerdo con el Subsistema de Notificación Semanal de casos nuevos de enfermedades de nuestro país, para junio de 2016 se registraron 2,068,095 nuevos casos (Secretaría de Salud, 2016), donde la cistitis (inflamación de la vejiga) y la uretritis (inflamación de la uretra) son las principales manifestaciones de infecciones en vías urinarias bajas, mientras que la pielonefritis (inflamación del riñón) lo es de las vías urinarias altas (Páramo-Rivas *et al.*, 2015).

Se estima que más del 50% de las mujeres tendrán una infección urinaria en su vida (Spurbeck *et al.*, 2012), donde después de un episodio inicial de infección urinaria, las mujeres son más propensas de desarrollar infecciones urinarias recurrentes de un 20% hasta un 40% de los casos (Tabasi *et al.*, 2015).

En niños, Vollmerhausen y colaboradores (2013), estiman que el riesgo de contraer una ITU ocurre durante el primer mes de vida, y se puede presentar la recurrencia de la enfermedad de 10 al 30% de los casos, además de ser una causa importante de morbilidad y que puede acarrear serias complicaciones, como lo es la pielonefritis. Los factores de riesgo para esta población son la edad y el género. Estudios previos mostraron que las ITUs son también la causa de enfermedades febriles del 3-8% de los casos en niñas y del 1% en los niños (Momtaz *et al.*, 2013).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

En adultos mayores, sobre la edad de 65 años, después de las infecciones respiratorias, las ITUs son la segunda causa de infección en pacientes hospitalizados y de infecciones urinarias adquiridas en la comunidad (Rowe *et al.*, 2013).

Por otra parte, las ITUs son un importante factor de riesgo para la mortalidad en pacientes con trasplante renal, ya que también se encuentran asociadas con el fracaso del injerto, debido a que *E. coli* es el uropatógeno principalmente aislado en ITUs en pacientes trasplantados en España, India y Kuwait. En México, un estudio realizado por Rivera-Sánchez y colaboradores (2010) demostró que a pesar del tratamiento profiláctico de los pacientes con transplante de riñón la infección urinaria es una importante complicación postoperatoria donde 19 de 52 pacientes (37%) desarrollaron al menos un episodio de infección urinaria en un lapso de 19.5 días después del transplante renal, causada principalmente por *E. coli* (31.5%), sugiriendo así la necesidad de incluir estudios de enfermedades infecciosas además de las pruebas de función renal durante al menos 3 meses después del transplante de riñón.

Como se mencionó, una infección del tracto urinario (ITU) se define como la infiltración microbiana del tracto urinario estéril (Barber *et al.*, 2013). El término infección urinaria se caracteriza por la colonización e invasión del tracto urinario por microorganismos patógenos, donde se incluye la bacteriuria (presencia de bacterias en orina), la uretra (cistitis), los riñones (pielonefritis) y la próstata (prostatitis) (Avendaño, 2008). Las ITUs pueden presentarse de manera sintomática o bien sin síntomas.

Una ITU sintomática generalmente requiere la presencia de síntomas del tracto urinario específicos como lo son la disuria (dolor o ardor al orinar), frecuencia urinaria, urgencia (repentino deseo irresistible de orinar), dolor suprapúbico y posible hematuria; la orina puede tener un olor desagradable y apariencia turbia (Al-Badr & Al-Shaikh, 2013); y además se presenta junto con “bacteriuria” que se define clínicamente como la presencia de un conteo bacteriano mayor a 10^5 unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/mL) en una muestra de orina.

Por otro lado la bacteriuria asintomática (ASB) se define como la presencia de bacterias en la orina, sin signos clínicos o síntomas sugestivos de una infección urinaria (Rowe *et al.*, 2013). Sin embargo, alrededor del 30% de las mujeres con bacteriuria asintomática no tratada, específicamente durante el embarazo, pueden desarrollar pielonefritis y en consecuencia, parto a pre-término o bebés de bajo peso al nacer (Tadesse *et al.*, 2014).

Las ITUs se clasifican en infecciones complicadas y no complicadas, una infección del tracto urinario no complicada incluye cistitis y/o pielonefritis no complicadas, las cuales hacen referencia a la infección en una persona con tracto urinario y función renal normal; sin anomalías anatómicas o funcionales (Wagenlehner *et al.*, 2011; Silverman *et al.*, 2013). Mientras que las ITUs complicadas están asociadas a los factores anatómicos, funcionales o farmacológicos que predisponen a la persona a la persistencia de la infección, recurrencia o fallo en el tratamiento (e.j., anomalías en el tracto urinario) (Wagenlehner *et al.*, 2011; Silverman *et al.*, 2013).

El desarrollo de infecciones del tracto urinario depende de factores anatómicos, la integridad de los mecanismos de defensa y la virulencia de los organismos infecciosos, mientras que un establecimiento exitoso de la infección dependerá de la adherencia del patógeno a las células del huésped, la colonización de los tejidos y en algunos casos, la invasión celular, seguido por la multiplicación intracelular, la difusión a otros tejidos y la persistencia en el sistema (Bien *et al.*, 2011).

Dentro de los principales factores de riesgo para desarrollar una ITU se encuentran los fisiológicos y anatómicos; la proximidad entre la uretra, vagina y recto en la mujer, la vida sexual activa, así como pacientes inmunocomprometidos con catéteres urinarios permanentes (Wiles *et al.*, 2008).

Respecto a los microorganismos que pueden causar infección en el tracto urinario figuran los géneros *Proteus spp*, *Enterococcus spp*, *Klebsiella spp* y *Staphylococcus spp* (Lebeaux *et al.*, 2013; Brumbaugh *et al.*, 2012). Sin embargo, *Escherichia coli* es el causante principal, del 75% al 95% de los casos, representando un importante problema de salud pública a nivel mundial (Subashchandrabose & Mobley, 2015).

E. coli es un habitante común del tracto gastrointestinal de humanos y animales, y por lo general mantiene una relación simbiótica beneficiosa con su anfitrión y juega un papel importante en la promoción de la estabilidad de la flora microbiana y en el mantenimiento de la homeostasis intestinal normal (organismo comensal) (Bien *et al.*, 2011). Sin embargo, *E. coli* puede adquirir factores de virulencia a través de islas de patogenicidad, plásmidos y transposones y puede también manifestarse como un patógeno intrainestinal causando infecciones diarreicas, o bien puede comportarse como un patógeno extraintestinal, dentro del tracto urinario. En el tracto urinario, *E. coli* puede colonizar la vejiga causando bacteruria, cistitis y pielonefritis (Wiles *et al.*, 2008), donde es responsable del 90% de las infecciones adquiridas en la comunidad y del 50% de las infecciones intrahospitalarias (Mittal, *et al.*, 2015). Otras infecciones tales como la meningitis neonatal y sepsis también son causadas por cepas de *E. coli* extraintestinales.

Por lo general, las infecciones urinarias causadas por *E. coli* son recurrentes. Una infección urinaria recurrente (IUR) está definida como tres o más infecciones en un plazo de 12 meses, o dos o más infecciones en seis meses; debido a una reinfección o a una recaída, donde en el 95% de los casos ocurre una reinfección que es producida por bacterias provenientes del tracto gastrointestinal, mientras que una recaída que ocurre en el 5% de los casos, es producida por la misma bacteria dentro del tracto urinario en las primeras dos semanas del tratamiento inicial; las infecciones urinarias recurrentes son un fenómeno muy frecuente que incrementa con la edad del hospedero (Valdevenito, 2008).

A pesar de la administración de antibióticos la probabilidad de que un paciente desarrolle una segunda infección urinaria en los 6 meses siguientes es del 25%, con la probabilidad de recurrencia durante un periodo de 12 meses que se eleva al 46%, lo que aumenta el costo del tratamiento. Esta recurrencia, puede deberse a la capacidad de *E. coli* de formar biopelículas o comunidades microbianas intracelulares (Barber *et al.*, 2013).

Las ITUs causadas por *E. coli* son una de las infecciones extraintestinales más comunes en las mujeres, y debido a su alta incidencia, la mayoría de los estudios epidemiológicos centran sus esfuerzos hacia en este sentido (Manges *et al.*, 2008), pues la incidencia de infecciones del tracto urinario es aproximadamente cuatro veces mayor en mujeres que en

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

hombres; esta diferencia se atribuye principalmente a la distancia más corta entre el ano y la uretra en la mujer (Subashchandrabose & Mobley, 2015).

En México, *E. coli* es uno de los principales agentes patógenos causantes de ITUs. Estas infecciones presentan la mayor incidencia en mujeres lo que representa un problema costoso para el sector de la salud (López-Banda *et al.*, 2014). De acuerdo con el Subsistema de Notificación Semanal de casos nuevos de enfermedades de nuestro país, para junio de 2016 se registraron 2,068,095 nuevos casos; mientras que para Aguascalientes, la cifra ascendió a 36,754 nuevos casos (Secretaría de Salud, 2016).

2.2 *Escherichia coli*.

Escherichia coli es una bacteria Gram negativa que puede causar una variedad de infecciones patológicas en tracto el gastrointestinal o fuera de este como en el tracto urinario (Baker, 2015). Su forma es bacilar, es un microorganismo móvil, anaerobio facultativo, con flagelos peritricos. La mayoría forman fimbrias y pili, muchas cepas producen una pequeña microcápsula, y no fabrican esporas. En pruebas bioquímicas es positiva al indol, descarboxilasa de lisina, fermentación de manitol y gas a partir de glucosa; además es lactosa positiva en el 90% de las cepas y es negativo a la prueba de citrato (Romero, 2007).

La diversidad de enfermedades causadas por *E. coli*, como los son las infecciones del tracto urinario, infecciones entéricas e infecciones sistémicas en humanos (Pitout, 2012), ha dado como resultado su clasificación en distintos patotipos (o tipos de patógenos) (Baker, 2015).

De manera general, las cepas causantes de infecciones gastrointestinales son las llamadas *E. coli* intractintestinales (IPEC), que incluyen a: *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* productora de la toxina Shiga (STEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* adherente difusa (DAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) y *E. coli* enterotoxigénica (ETEC). Por otro lado, las cepas causantes de infecciones fuera

del intestino son las llamadas *E. coli* extraintestinales (ExPEC) que incluyen: *E. coli* causante de meningitis neonatal (NMEC), *E. coli* causante de sepsis (SEPEC) y *E. coli* uropatógena (UPEC) (Toval *et al.*, 2013).

De acuerdo a su origen filogenético, las cepas de *E. coli* pueden ser reorganizadas en siete grupos: A, B1, B2, C, D, E y F (Clermont *et al.*, 2013), donde las cepas virulentas extraintestinales pertenecen principalmente a los grupos B2, y en menor medida a D y F; las cepas comensales pertenecen en su mayoría a los grupos A y B1; aunque en algunas ocasiones se ha encontrado que las cepas intrainestinales también se encuentran relacionadas con los grupos A, B1 y B2; el grupo C está relacionado con cepas comensales o intrainestinales; el filogrupo E contempla cepas intrainestinales y el filogrupo F es similar a los filogrupos B2 y D para cepas extraintestinales (Clermont *et al.*, 2013),

2.2.1 *Escherichia coli* uropatógena.

Las cepas de UPEC pueden ser encontradas en el tracto gastrointestinal humano y a partir ahí puede llegar a tracto urinario y causar una infección empleando un set de múltiples genes de virulencia para colonizar e infectar de manera ascendente a través de los uréteres, que puede causar daño en riñón o inclusive sepsis (Pitout, 2012). En algunos casos, la difusión de un solo grupo clonal de las cepas de UPEC puede ocurrir dentro de una comunidad a través de los alimentos contaminados o bien a través de mascotas (Wiles *et al.*, 2008).

Las infecciones urinarias causadas por *E. coli* son infecciones ascendentes en las que la contaminación bacteriana del espacio periuretral permite el acceso de UPEC en el tracto urinario. De manera general el ascenso de UPEC está mediado por la acción de flagelos, que impulsan a las bacterias de la uretra hasta la vejiga, que a su vez es colonizada a través de adhesiones fimbriales y afimbriales, emplean sistemas de captación de hierro para facilitar su crecimiento así como toxinas para evitar la respuesta inmune innata. La ascensión de UPEC a los riñones también es mediada por flagelos, por lo que la motilidad

flagelar es esencial para la uropatogénesis (Donnenberg, 2013), y las adhesiones fimbriales y afimbriales le permiten a UPEC soportar el flujo de la orina que puede arrastrar a la bacteria fuera del tracto urinario (Spurbeck *et al.*, 2013).

De manera más específica, la entrada de UPEC en el tracto urinario es seguida por la adherencia al uroepitelio, mediada por la adhesina fimbrial H que se une a las integrinas $\alpha 3$ y $\beta 1$, que se agrupan con la actina en los sitios de invasión, así como desestabilización de los microtúbulos, resultando en la internalización de la bacteria (Croxen & Finlay, 2010) Una vez internalizada, UPEC se replica rápidamente y forma comunidades microbianas o biopelículas, denominadas comunidades bacterianas intracelulares (CBIs) que sirven como entornos de protección. UPEC puede dejar los CBIs y entrar en el lumen de la vejiga, donde la infección promueve la afluencia de polimorfonucleares causando daño a los tejidos, apoptosis y exfoliación de las células de la vejiga. En este punto de la infección, si no es tratada adecuadamente puede ascender a los riñones causando pielonefritis (Croxen & Finlay, 2010). En la **Figura 2** se muestra el mecanismo de patogenicidad de UPEC.

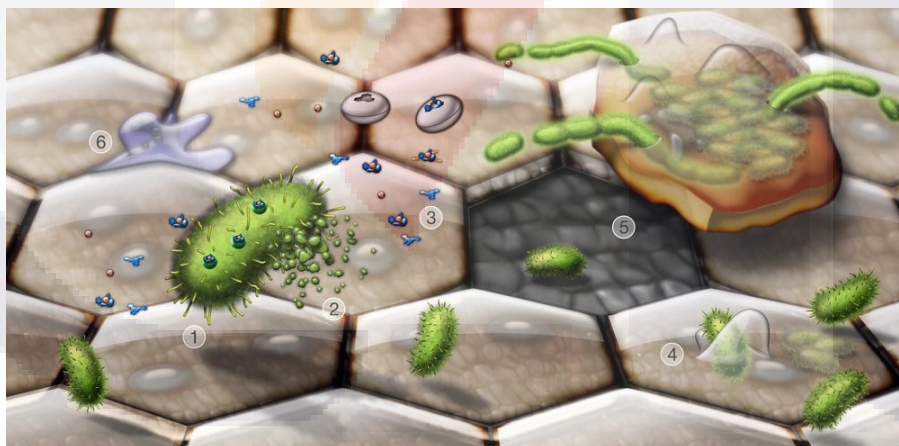


Figura 2: Mecanismo de patogenicidad de UPEC. Dinámica de la invasión de UPEC en el hospedero durante una ITU. UPEC expresa pili tipo I (1, verde), secreta toxinas y otros factores de virulencia, solos o en asociación con vesículas de membrana (2). Sideróforos como enterobactina y salmoquelina (estructuras en azul) de UPEC que atrapan el hierro, en competencia con otras moléculas quelantes de hierro como la lipocalina 2 del huésped (discos blancos). El pili tipo I media la unión de la bacteria y la invasión de las células epiteliales de la vejiga (4). UPEC puede multiplicarse rápidamente en las células superficiales, formando grandes comunidades tipo biopelícula. La exfoliación de células de la vejiga infectadas facilita la eliminación de bacterias del hospedero pero deja a las células inmaduras subyacentes más susceptibles a la infección (5). La liberación de UPEC de las células del huésped infectadas antes de que se lleve a cabo la exfoliación, promueve la difusión y persistencia bacteriana en el tracto urinario. Durante la liberación, UPEC se vuelve filamentosa debido al estrés que promueve el aumento de la activación de las defensas del huésped. Incluyendo la afluencia de neutrófilos (6), así como la generación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno y péptidos antimicrobianos. Tomado y modificado de Wiles (*et al.*, 2008).

2.2.2 Factores de virulencia de UPEC

Las cepas de UPEC contienen varios factores (o genes) de virulencia que facilitan la colonización e invasión de las células del hospedero (Firoozeh *et al.*, 2014), como lo son las toxinas, los receptores de hierro, fimbrias, flagelo, adhesinas afimbriales y mecanismos para evadir la respuesta inmune (**Figura 3**) (Donnenberg, 2013).

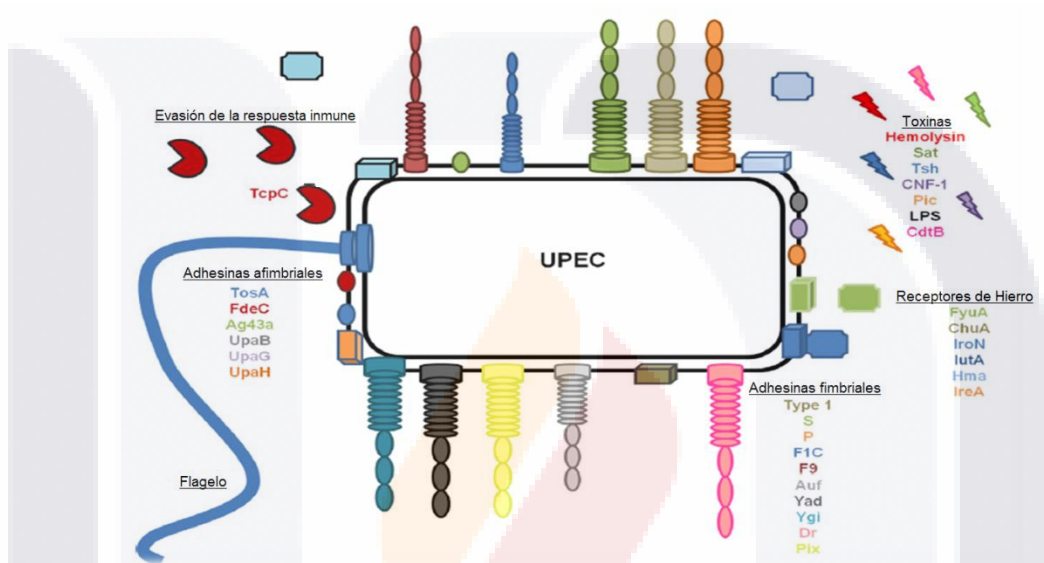


Figura 3. Factores de virulencia de UPEC. Tomado y modificado de Donnenberg (2013).

Las fimbrias y pili son estructuras compuestas de la proteína pilina; las fimbrias pueden nacer en los polos de la célula bacteriana o estar distribuidos en forma regular en toda la superficie y le permiten a la célula adherirse a distintas superficies, incluidas las de otras células. El pili en general es más largo que las fimbrias y su cantidad es de solo 1 a 2 por célula, se unen a la pared celular bacteriana como paso previo a la transferencia intercelular de DNA (conjugación) (Tórtora *et al.*, 2007).

Las adhesinas afimbriales son proteínas de superficie que participan en el proceso de adherencia de varios microorganismos Gram positivos o negativos, entre ellos algunos patógenos. Son proteínas que intervienen en la unión estrecha de la bacteria a la célula hospedera después de la unión inicial mediada por adhesinas fimbriales y algunas de ellas

reconocen como su receptor a moléculas proteicas o componentes de la matriz extracelular del hospedero (Rocha-García *et al.*, 2004).

Por otra parte los receptores de hierro o sideróforos son un mecanismo desarrollado por UPEC para secuestrar el hierro del hospedero y concentrarlo en su citoplasma (Donnenberg, 2013). Los sideróforos son moléculas de bajo peso molecular secretados por las bacterias y que tienen una alta afinidad por el hierro férrico (Fe^{3+}). Las bacterias recuperan los sideróforos unidos al hierro a través de receptores que facilitan el transporte de los complejos a través de la membrana bacteriana hasta el citosol, donde finalmente el hierro es liberado (**Figura 4**) (Wiles *et al.*, 2008). Las cepas de UPEC han desarrollado cuatro sideróforos: hidoxametarobactina; dos catecolatos: enterobactina y salmoquelina; y, yersininbactina, un sideróforo mixto. Cada uno es reconocido por un receptor cognado de hierro. Este sistema de captación de hierro es necesario en UPEC para causar infecciones independientemente de su receptor (Donnenberg, 2013).

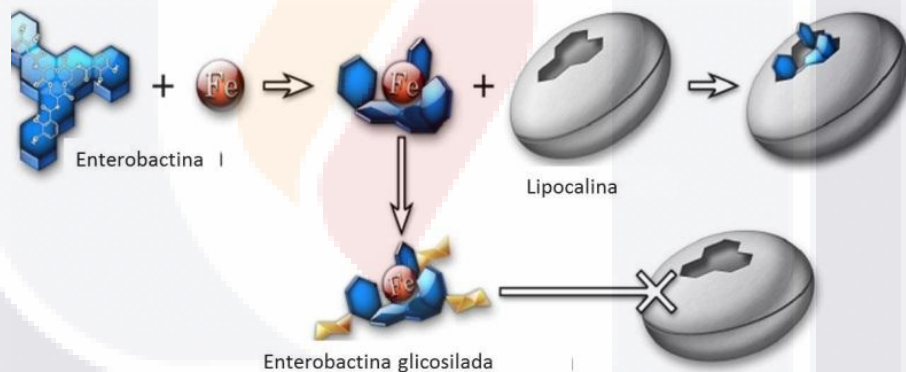


Figura 4. Adquisición de hierro: Enterobactina. La enterobactina secuestra el hierro con alta afinidad, mientras que la lipocalina 2 del huésped (como mecanismo de defensa) se une a la enterobactina y evita su absorción por UPEC. Las bacterias que llevan el grupo de genes *iroA* pueden modificar la enterobactina por glicosilación, creando salmoquelina, que se une de manera efectiva al hierro que no es reconocida por la lipocalina 2. Tomado y modificado de Wiles (*et al.*, 2008).

Las infecciones urinarias causadas por *E. coli* son infecciones ascendentes. El ascenso de UPEC está mediado por la acción de flagelos que impulsan a las bacterias de la uretra hasta la vejiga, así como su posterior ascensión a los riñones en una infección del tracto

superior, por lo que la motilidad flagelar es esencial para la uropatogénesis (Donnenberg, 2013).

Las cepas de UPEC flageladas son causantes del 70 al 90% de todas las infecciones del tracto urinario (Bien *et al.*, 2011); sin embargo, estudios más recientes han demostrado que la capacidad de motilidad en las cepas de UPEC también está relacionada con su potencial para penetrar la barrera epitelial renal, obtener acceso al torrente sanguíneo y causar sepsis (Subashchandrabose and Mobley, 2015).

En la **Tabla 1**, se observan los factores de virulencia más comúnmente estudiados y que serán empleados para caracterizar las cepas provenientes de hombres y mujeres con infección del tracto urinario para esta investigación. Se incluyen las toxinas *hlyA* (alfa-hemolisina), *cnfI* (factor necrotizante) y *vat* (toxina vacuolizante).

Tabla 1. Factores de virulencia de UPEC más comúnmente estudiados.

Factor de virulencia	Clasificación	Función
<i>fimH</i>		Fimbria tipo I involucrada en el desarrollo de cistitis y de comunidades bacterianas intracelulares (CBIs). En túbulos renales puede causar obstrucción del flujo ya que promueve la unión entre bacterias formando comunidades tipo biopelícula.
<i>afa/Dra</i>	Adhesinas	Adhesina afimbrial que aglutina eritrocitos humanos, <i>in vitro</i> se une al colágeno tipo IV, se une a los tejidos conectivo peritubular de riñón humano, en el tejido conectivo entre las capas de células del músculo de la vejiga, a neutrófilos humanos y débilmente a células epiteliales. Dr facilita la invasión de células permitiendo a las bacterias evadir la respuesta inmune humoral. Promueve el tropismo renal mediante la unión a la membrana basal del epitelio tubular renal y la cápsula de Bowman.
<i>sfaS</i>		Adhesina fimbrial tipo S comúnmente aislada de cepas ExPEC, contribuye al establecimiento de la infección y es un determinante que permite la distinción de cepas patógenas de <i>E. coli</i> .
<i>yfcV</i>		Codifica la subunidad principal de una fimbria tipo chaperona para la síntesis de pili.
<i>papC</i>		Fimbria involucrada en la formación de la plataforma para la biogénesis del curli, el componente más abundante de la matriz extracelular de <i>E. coli</i> .
<i>chuA</i>		Sistema de adquisición de hierro. Codifica una proteína de unión al grupo hemo. Importante factor para la formación de CBIs en vejiga.
<i>fyuA</i>	Sideróforos	Codifica para el receptor yersiniabactina. Importante en la formación de biopelícula en la orina y juega un papel protector contra la muerte intracelular al secuestrar cobre derivado del huésped.
<i>kpsMTII</i>	Protección Capsular	Producción de cápsula tipo II que funciona como un sistema estratégico de evasión de la respuesta inmune.
<i>hlyA</i>		Toxina alfa-hemolisina formadora de poros con actividad lítica contra los eritrocitos, y citotóxica hacia células nucleadas, incluyendo las células inmunes, endoteliales y epiteliales en el tracto urinario.
<i>cnfI</i>	Toxinas	Factor necrotizante citotóxico que activa Rho GTPasas, y como consecuencia induce un número de cambios celulares basados en reordenamientos del citoesqueleto de actina.
<i>Vat</i>		Toxina vacuolizante actúa mediante la formación de vacuolas y causa daño tisular.

2.2.3 Toxinas de UPEC.

Las toxinas ayudan a la propagación de patógenos en los tejidos más profundos después de la interrupción de la integridad celular; para obtener acceso a los nutrientes dentro de la célula huésped; o para destruir las células efectoras inmunes, y por lo tanto evadir su potencial de actividad antibacteriana, la **Tabla 2** muestra las diferentes toxinas presentes en *E. coli* extraintestinal. La actividad tóxica es probable que desencadene una fuerte reacción inflamatoria en respuesta a necrosis o a la toxina en sí (Lüthje and Brauner, 2014). La **Figura 5** muestra las diferentes toxinas de UPEC y su mecanismo de acción.

Tabla 2. Toxinas presentes en ExPEC.

Factor de virulencia	Función
Alfa-hemolisina	Citotoxicidad, hemólisis.
Factor citotóxico necrotizante 1	Interferencia en la fagocitosis y apoptosis.
Toxina secretada autotransportadora	Citotoxicidad.
Toxina dilatadora citoletal	Citotoxicidad.

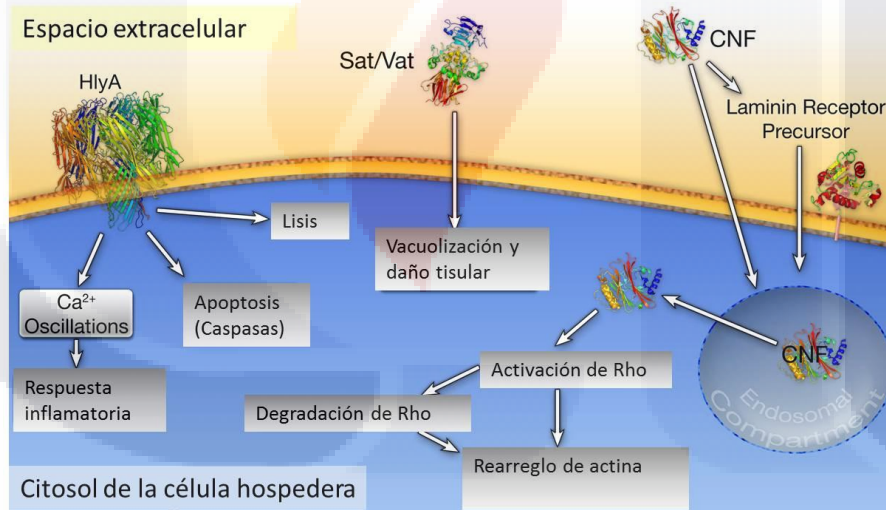


Figura 5. Asociación de UPEC con las diferentes toxinas. α -hemolisina (HlyA), Vat, Sat, y el factor citotóxico necrotizante 1 (CNF1). A altas concentraciones, HlyA se inserta dentro de la membrana de la célula huésped y promueve su lisis; mientras que a concentraciones bajas de HlyA puede modular una cascada de señalización que afecta a la supervivencia celular y la respuesta inflamatoria. La intoxicación de las células por Vat o Sat induce la vacuolización y otros efectos citopáticos, llevando al daño en tejido celular. La endocitosis de CNF1 ocurre a través de precursores receptores o en asociación con vesículas de membrana lo que activa Rho GTPasas, induciendo su eventual degradación y subsecuente malformación de la membrana. Tomado y modificado de Wiles (*et al.*, 2008).

2.2.3.1 Toxina Alfa-hemolisina.

La α -Hemolisina (HlyA) es una toxina secretada formadora de poros con actividad lítica contra los eritrocitos, sin embargo también es citotóxica hacia diversos tipos de células nucleadas, incluyendo las células inmunes, endoteliales y epiteliales en el tracto urinario (Lüthje and Brauner, 2014), está involucrada en enfermedades extra-intestinales humanas tales como infecciones del tracto urinario, peritonitis, meningitis y septicemia (Herlax *et al.*, 2010). HlyA pertenece a la familia de RTX (Repeats in Toxin), donde está demostrado que ejerce su actividad dependiendo de su concentración en las células epiteliales procedentes de los túbulos proximales renales, donde a altas concentraciones es capaz de lisar los eritrocitos del huésped, confiriéndole a UPEC la capacidad de superar las barreras mucosas, dañar células de la respuesta inmune y obtener un mejor acceso a los nutrientes y a las reservas de hierro del huésped. Por otro lado, bajas concentraciones de *hlyA* puede inducir apoptosis de las células diana del huésped, incluyendo a neutrófilos, linfocitos T, y las células renales promoviendo la exfoliación de células epiteliales de la vejiga (Bien *et al* 2011).

La evaluación de su contribución a la virulencia entre cepas clínicas puede obstaculizarse por su frecuente aparición con el factor necrotizante citotóxico 1 (CNF1). Clínicamente, las cepas hemolíticas de UPEC están relacionadas con infecciones hemorrágicas y pielonefritis y son asociadas con una fuerte respuesta proinflamatoria. Aproximadamente el 50% de todos los casos de pielonefritis, como las complicaciones renales, son causadas por *hlyA* (Bien *et al.*, 2011). Por otro lado, las cepas persistentes de UPEC reportan alta frecuencia de esta toxina (Lüthje and Brauner, 2014).

2.2.3.2 Factor necrotizante citotóxico.

La presencia de CNF1 está estrechamente relacionada con HlyA. Esta toxina activa Rho GTPasas, y como consecuencia induce un número de cambios celulares basados en reordenamientos del citoesqueleto de actina. Una activación transitoria seguida por la

reordenación de Rho GTPasas en particular Rac, promueve la internalización bacteriana en las células uroepiteliales, por lo que está involucrado en la colonización temprana de la vejiga. CNF1 ejerce efectos inhibitorios sobre neutrófilos, con la consecuente reducción de la fagocitosis y de la actividad antimicrobiana. Puede inducir apoptosis específicamente en células urepiteliales y por lo tanto puede promover la exfoliación de las mismas (Lüthje and Brauner, 2014).

2.2.3.3 Toxina autotransportadora secretada (SAT/VAT).

La toxina autotransportadora secretada (SAT/VAT) es un factor de virulencia de cepas de *E. coli* asociadas a pielonefritis. SAT tiene una actividad tóxica frente a líneas celulares de origen de la vejiga o el riñón y, por lo tanto, puede ser importante para la patogénesis de las infecciones urinarias. Por otra parte, la toxina de hinchamiento citoletal (CDT) puede ser también considerado como un factor de virulencia en las infecciones urinarias causadas por *E. coli* (Bien *et al.*, 2011).

2.2.4 Susceptibilidad antimicrobiana.

El manejo clínico de la infección del tracto urinario se complica por el aumento de la incidencia de las infecciones causadas por cepas de *E. coli* que son resistentes (resistencia a 1 o 2 antibióticos) o multi-resistentes (resistencia a 3 antibióticos) a los antibióticos utilizados comúnmente en el tratamiento de la infección (Foxman, 2007).

Los antibióticos más frecuentemente empleados en el tratamiento de las infecciones por cepas de *E. coli* extraintestinales son la amoxicilina, amoxicilina/ácido clavulónico, cefalosporinas, aminoglucósidos, cotrimaxol y quinolonas. Sin embargo la capacidad de *E. coli* para adquirir genes de resistencia hace impredecible su sensibilidad, por lo que ésta debe determinarse siempre mediante antibiograma antes de prescribir un tratamiento (Faleiro-Naves, 2010).

La resistencia a los antibióticos es un problema de salud pública emergente y grave que resulta en el aumento de la morbilidad y la mortalidad. En las infecciones del tracto urinario, las tasas de resistencia contra agentes antimicrobianos comúnmente prescritos están en constante aumento. Hoy en día, en muchos países más del 20% de los uropatógenos son resistentes a trimetoprima /sulfametoxazol (TMP-SMX) y cefalosporinas. También se observa esta resistencia creciente a fluoroquinolonas con tasas de resistencia de hasta el 10% (Schmiemann *et al.*, 2012).

Las cepas de UPEC pueden causar infecciones agudas e infecciones recurrentes que no responden a los tratamientos antimicrobianos comunes. El tratamiento contra las ITUs generalmente incluye antibióticos β -lactámicos, fluoroquinolonas o trimetoprima/sulfametoxazol, pero puede variar en función de la edad del paciente, sexo, patógenos involucrados, curso de la enfermedad, y el área anatómica del tracto urinario. Sin embargo, el aumento de la resistencia puede estar relacionado con los cambios en el genoma bacteriano por mutación o adquisición por transferencia horizontal de un material extracromosómico o cromosómico (López-Banda *et al.*, 2014).

Otro mecanismo de resistencia ante agentes antimicrobianos es la capacidad de las cepas de *E. coli*, causantes de ITUs, de formar biopelículas lo que además trae como consecuencia la recurrencia y/o persistencia de la infección (Mittal *et al.*, 2015). Ramírez-Castillo y colaboradores (2014), señalan que la resistencia a antibióticos es la causa más importante de la terapia no efectiva en infecciones asociadas a biopelículas, en donde el aumento de la resistencia exhibida por bacterias es de 101,000 veces menos susceptibles, y se denomina resistencia asociada a biopelículas. En las biopelículas hay cuatro hipótesis principales que explican la reducción de la susceptibilidad a antimicrobianos, las cuales son a) pobre penetración antimicrobiana, b) el despliegue de las respuestas de adaptación al estrés, c) la heterogeneidad fisiológica de la población de la biopelícula y d) la presencia de variantes fenotípicas o células persistentes (**Figura 6**), donde la combinación de estos factores determinan la protección de la biopelícula (Chambless *et al.*, 2006).

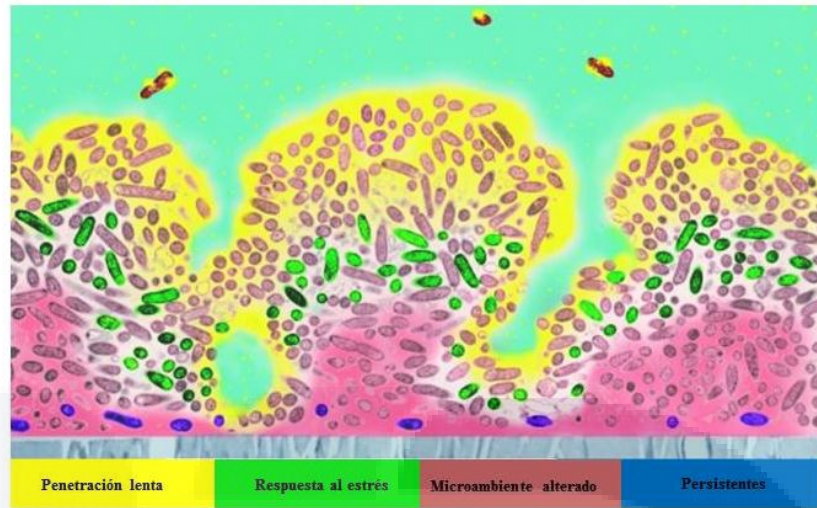


Figura 6. Cuatro posibles mecanismos de resistencia de la biopelícula a los antibióticos. La imagen representa una sección transversal de una biopelícula unida a una superficie (color gris) en la parte inferior y la fase acuosa que contiene el antibiótico (amarillo) en la parte superior. En las zonas donde hay agotamiento de los nutrientes (rojo), la acción de los antibióticos puede ser antagonizada. Algunas bacterias pueden activar las respuestas al estrés (verde), mientras que otros pueden diferenciarse en un fenotipo protegido (púrpura). Tomado y modificado de Chambless (*et al.*, 2006).

El uso de antibióticos es inevitable en el intento de tratar las infecciones agudas y en la prevención y control de las infecciones crónicas. A través de los años, un número cada vez mayor de infecciones ha aumentado el uso de antibióticos, que ha requerido la acción contra una resistencia bacteriana emergente. Parece haber una adquisición continua de nuevos mecanismos de resistencia entre las bacterias que cambian nichos entre humanos, animales y el medio ambiente (Sriramulu, 2013).

El aumento de la resistencia a los antibióticos y múltiples fármacos está agravando el problema clínico, lo que hace aún más imprescindible que se obtenga una comprensión completa de la patogénesis de UPEC incluyendo los detalles moleculares de los factores de huésped-patógeno que influyen en los resultados de enfermedades y secuelas (Hannan *et al.*, 2012).

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (2016), pacientes con infecciones causadas por bacterias resistentes a antibióticos corren mayor riesgo de tener peores

resultados clínicos y morir; además consumen más recursos sanitarios que los infectados por cepas no resistentes de las mismas bacterias. Para el caso de *E. coli*, ya se ha documentado su resistencia generalizada a uno de los medicamentos más utilizados para tratar las infecciones urinarias, las fluoroquinolonas, por lo que en muchos países este tratamiento llega a ser ineficaz para más de la mitad de pacientes infectados.

2.2.4.1 Mecanismos de resistencia.

Una cepa resistente a los antibióticos surge cuando adquiere el ADN que le confiere la capacidad necesaria para sobrevivir en un nicho inusual. Una vez adquirido, un nuevo mecanismo de resistencia evoluciona de acuerdo a la dinámica del microambiente; hay entonces una alta probabilidad de que se transfiera a otras especies o a una cepa virulenta o no de la misma o diferente especie (Sriramulu, 2013).

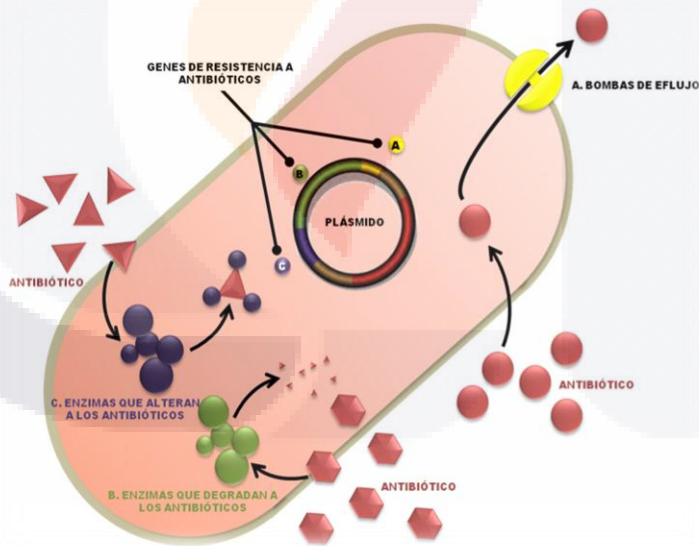


Figura 7. Mecanismos de resistencia antimicrobiana innata y adquirida. Tomado y modificado de Levy y Marshall (2004).

La resistencia bacteriana puede presentarse de manera intrínseca a la bacteria o bien puede transmitirse a través de plásmidos, bacteriófagos, islas de patogenicidad y

mutaciones cromosomales (Levy y Marshall 2004). Los mecanismos de resistencia en las bacterias incluyen la inactivación enzimática, modificación del sitio blanco, la sobreexpresión, el secuestro, la localización intracelular, el aumento del flujo de salida y disminución del afluente, y del bloqueo físico a través de la formación de biopelículas (**Figura 7**) (Sriramulu, 2013).

Tabla 3. Familias más importantes de antibióticos y sus mecanismos de acción (Levy and Marshall, 2004).

Mecanismo de acción	Familias de antibióticos
Inhibición de la síntesis de pared celular	Penicilinas, cefalosporinas, carbapenems, daptomicina, monobactámicos, glicopéptidos.
Inhibición de la síntesis de proteínas	Tetraciclinas, aminoglucósidos, oxazolidinonas, ketólidos, macrólidos, lincosamidas.
Inhibición de la síntesis de ADN	Fluoroquinolonas
Inhibición competitiva de la síntesis de ácido fólico	Sulfonamidas, trimetoprim
Inhibición de la síntesis de RNA	Rifampina

Otros mecanismos de resistencia bacteriana son: 1) la dificultad de difusión de antibióticos en ellos y a la carga electrostática de los exopolisacáridos que atraen a los antibióticos de carga opuesta; 2) una baja tasa de crecimiento; 3) cambios en el fenotipo adquiridos por bacterias que forman biopelículas; y, 4) la inactivación de los antibióticos por polímeros y enzimas secretadas por las bacterias. Por otra parte, las biopelículas son aptas únicamente para la transferencia horizontal de genes, ya que mantienen alta la densidad bacteriana y proporciona un entorno físico estable con el contacto célula a célula (Ramírez-Castillo *et al.*, 2014).

2.2.5 Formación de biopelículas.

Las biopelículas son comunidades multicelulares, compuestas de células bacterianas embebidas en una matriz extracelular (compuesta en general por DNA extracelular, productos de desecho y polímeros de carbohidratos) y son el modo de crecimiento preferido por la mayoría de los patógenos. Dentro de estas biopelículas, las bacterias se protegen de las condiciones adversas del medio ambiente, incluyendo a los tratamientos antimicrobianos y los mecanismos de defensa endógenos del hospedero.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Las biopelículas bacterianas tienen importante impacto médico ya que disminuyen la susceptibilidad a los agentes antimicrobianos. Además, la proximidad de las células dentro de una biopelícula puede facilitar el intercambio de plásmidos y por lo tanto mejorar la propagación de la resistencia a los antimicrobianos y factores de virulencia (Watnick et al., 2000).

La habilidad de las bacterias para formar biopelículas está asociada a la patogénesis de enfermedades severas y persistentes en UPEC, siendo su formación el mayor problema asociado a catéteres urinarios (Lüthje and Brauner, 2014). Además, la generación de agregados intracelulares en las células epiteliales de la vejiga urinaria juega un papel central durante el estadio de cistitis aguda y para las infecciones recurrentes. Estas microcolonias son impermeables a muchos antibióticos, que conducen a la evolución de cepas resistentes a múltiples fármacos (Mittal *et al.*, 2015).

La formación de biopelículas es inducida por una variedad de tensiones, por la limitación de nutrientes, limitación de hierro y estrés en la envoltura celular, por lo que la biopelícula funciona como barrera ante el estrés ambiental (Ramírez-Castillo *et al.*, 2013). El crecimiento bacteriano en superficies depende de la interacción entre varios factores de la superficie bacteriana y del sustrato, además del medio ambiente que los rodea. Los eventos para el desarrollo de una biopelícula se llevan a cabo en 5 etapas (**Figura 8**). Generalmente las superficies son acondicionadas con una fina película de moléculas orgánicas las cuáles pueden ser atractivas a los sistemas quimiotáctiles y permitir el desarrollo de la biopelícula. Tras el acondicionamiento de la superficie ocurre la deposición y adhesión reversible de las células bacterianas como primer etapa, y es un fenómeno pasivo que ocurre por movimiento browniano y simple sedimentación o por movimiento activo de bacterias flageladas lo que permite el establecimiento de interacciones físicas y electrostáticas entre la superficie bacteriana y el sustrato (Faleiro-Naves, 2010).

En la primera etapa, la interacción inicial entre las bacterias y superficies inertes, como material protésico, puede ocurrir tanto sobre material virgen como sobre material recubierto con macromoléculas derivadas del hospedador. En la segunda etapa ocurre la adhesión irreversible de las bacterias por producción de SPE (exopolisacáridos) y debido a la

estimulación de proteínas receptores de la pared bacteriana se lleva a cabo el desarrollo de puentes célula-célula que las une unas a otras, estabilizando la estructura en un proceso denominado maduración. La siguiente etapa es la colonización de la superficie, en él las bacterias adheridas crecen formando microcolonias. La cuarta etapa consiste en la maduración de la biopelícula, que corresponde al crecimiento tridimensional y definición de la arquitectura entre las bacterias adheridas, proceso que conlleva la creación de ambientes heterogéneos desde el punto de vista fisicoquímico en el cuál las bacterias asociadas a la biopelícula presentan características fisiológicas distintas de las planctónicas. Las biopelículas contienen canales de agua que permiten el transporte de nutrientes, metabolitos y señales químicas que las células secretan en respuesta al aumento de la densidad poblacional y que interfieren en el desarrollo de la biopelícula. Una vez que la biopelícula ha madurado, tiene lugar la dispersión de células a otras regiones. Este proceso es activo y estrictamente regulado por las células adheridas. La dispersión está influenciada por las condiciones ambientales (disponibilidad de nutrientes, niveles de oxígenos, pH y presencia de compuestos químicos). En la **Figura 8** se observan los eventos principales implicados en el desarrollo de una biopelícula.

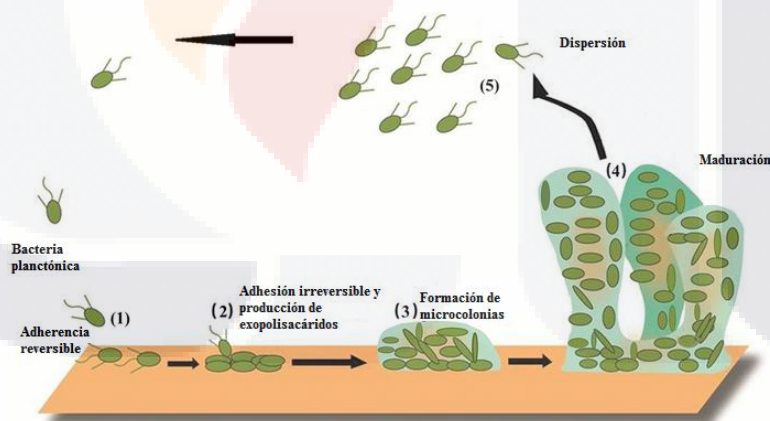


Figura 8. Eventos en el desarrollo de una biopelícula. 1) Adhesión reversible, 2) Adhesión irreversible y producción de exopolisacáridos, 3) Formación de microcolonias, 4) Desarrollo de estructuras tridimensionales y maduración de la biopelícula, 5) Dispersión de células Tomado y modificado de Sadekuzzaman (*et al.*, 2015).

3. Justificación

Las infecciones del tracto urinario pertenecen a las enfermedades infecciosas más comunes en todo el mundo, presentan la mayor tasa de incidencia y morbilidad *Escherichia coli* uropatogénica (UPEC) es el patógeno extra-intestinal más frecuentemente aislado de pacientes con ITUs y es causante del 75 al 95% de todos los casos. En México, *E. coli* es uno de los agentes patógenos causantes de ITU y es más frecuente en mujeres, con una alta incidencia, prevalencia, lo que representa un problema costoso para el sector de la salud.

En México existen pocos estudios que informen de la prevalencia de cepas de UPEC y de las posibles terapias antimicrobianas (López-Banda *et al.*, 2014; Muñoz-Castillo, *et al.*, 2009; Guajardo-Lara *et al.*, 2009), ya que la creciente resistencia a los antibióticos exige la reevaluación constante de la eficacia antimicrobiana, donde el conocimiento de las tendencias resistentes es particularmente importante cuando se prescriben antibióticos empíricamente, como es el caso de las infecciones del tracto urinario en nuestro país, por lo que este estudio propone determinar los factores de virulencia de cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con ITU así como la susceptibilidad a antimicrobianos, ya que es una enfermedad de gran repercusión sobre la función renal y con cierta tendencia a la recurrencia (Firoozeh *et al.*, 2014; Barber *et al.*, 2013).

En México, el Sistema Nacional de Vigilancia y Epidemiología (SNVE), reportó que las ITUs ocuparon el tercer sitio dentro de las principales causas de morbilidad en el 2010, además de ser actualmente la segunda infección nosocomial (26.6%) más frecuente y la principal causa de complicaciones perinatales (Calderon-Jaimes *et al.*, 2013). Sin embargo, pocos estudios se han realizado en México al respecto (Calderón-Jaimes *et al.*, 2013; Chávez-Valencia *et al.*, 2010; Guajardo-Lara *et al.*, 2009; Arredondo-García *et al.*, 2006), por lo que se desconoce la problemática de las ITU. De hecho no se sabe con exactitud la frecuencia de las ITU en la población mexicana, tampoco conocemos las características de las cepas bacterianas que más frecuentemente causan las ITUs en la población.

Las cepas UPEC tienen como característica que pueden persistir un largo periodo como comensales en el tracto intestinal y de hecho pueden compartirse entre los miembros de la familia y las mascotas (Johnson *et al.*, 2008); además las infecciones causadas por UPEC pueden adquirirse a través de agua y alimentos contaminados (FUTI).

En Aguascalientes, ya se ha determinado la presencia de microorganismos patógenos en cuerpos de agua superficial (Rio San Pedro, corriente principal del estado) (Ramírez-Castillo *et al.*, 2013; Carrasco-Rosales *et al.*, 2008); en donde se vierte el agua de plantas de tratamiento (hasta 96%) donde los antibióticos no son eliminados y además de otras descargas crudas generadas por otros sectores del estado (Guzmán-Colis *et al.*, 2011), indicando altos niveles de contaminación fecal, materia orgánica e inorgánica (Carrasco-Rosales *et al.*, 2008); recientemente Ramírez-Castillo y colaboradores (2013), detectaron la presencia de cepas InPEC como ExPEC con elevada resistencia antimicrobiana (tanto resistentes como multi-drogo resistentes) afectadas con diversos tipos de contaminantes tales como colorantes textiles, leche, desechos de rastros municipales, desechos municipales, desechos industriales, etc., los cuales se han identificado como contaminantes que afectan la salud humana y animal en nuestro Estado, ya que el agua puede ser utilizada para el riego, actividades recreativas y de consumo humano y animal.

Por lo anterior, es necesario realizar estudios interdisciplinarios sobre la situación de las infecciones urinarias en Aguascalientes, tanto a nivel epidemiológico como a nivel de investigación básica, lo que ayudará a un diagnóstico eficaz y eficiente y un mejor tratamiento de este tipo de infecciones, para lo que será necesario caracterizar las cepas aisladas de infecciones urinarias e identificar sus factores de virulencia que incluyen toxinas como la alfa hemolisina, que es la toxina secretada más importante de UPEC, así como su capacidad de formar biopelículas ya que es un factor de virulencia que promueve las infecciones recurrentes y disminuye la sensibilidad de las bacterias contra la terapia antibiótica. Además permitirá estimar el riesgo de la presencia de cepas ExPEC en el Río San Pedro y su capacidad para causar infecciones al comparar sus características de factores de virulencia, resistencia y formación de biopelícula con los aislados clínicos proporcionados por el Centenario Hospital Miguel Hidalgo.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

4. Objetivos

4.1 *Objetivos Generales.*

1. Determinar marcadores de cepas de *Escherichia coli* uropatógena con elevado potencial patogénico en el Estado de Aguascalientes.
2. Asociar la presencia de la toxina alfa-hemolisina con la frecuencia de las infecciones del tracto urinario en la población del Estado de Aguascalientes.
3. Correlacionar la presencia de factores de virulencia, resistencia y multi-drogo resistencia a agentes antimicrobianos en cepas aisladas de pacientes y aquellas aisladas del río San Pedro.

4.2 *Objetivos específicos.*

1. Determinar el potencial patogénico de aislados de *E. coli* de infecciones urinarias en base a los factores de virulencia (toxinas, adhesinas y mecanismos de defensa contra el hospedero) detectados en cada aislado.
2. Establecer los perfiles de resistencia antimicrobiana por fenotipo en los aislados de *E. coli*.
3. Determinar grupos poblacionales que presenten infecciones urinarias con patógenos resistentes y multi-drogo resistentes con respecto a la edad y género del hospedero así como de acuerdo a la adquisición de la infección.
4. Evaluar la relación entre las características de las bacterias causantes de infecciones urinarias y las presentes en el ambiente.
5. Evaluar el efecto del extracto crudo de la toxina alfa-hemolisina en glóbulos rojos y células endoteliales.

5. Hipótesis

1. La frecuencia de las infecciones urinarias causadas por cepas de *Escherichia coli* uropatógenas en la población del Estado de Aguascalientes se asocia a la presencia de factores de virulencia específicos de la localidad.
2. La presencia de la toxina alfa-hemolisina es el factor más importante que explica la frecuencia de las infecciones del tracto urinario en la población de Aguascalientes.
3. Las cepas de *Escherichia coli* uropatógenas que causan infecciones del tracto urinario en la población del Estado de Aguascalientes presentan factores de virulencia y resistencia similares a las encontradas a las cepas en el Río San Pedro.

6. Materiales y métodos

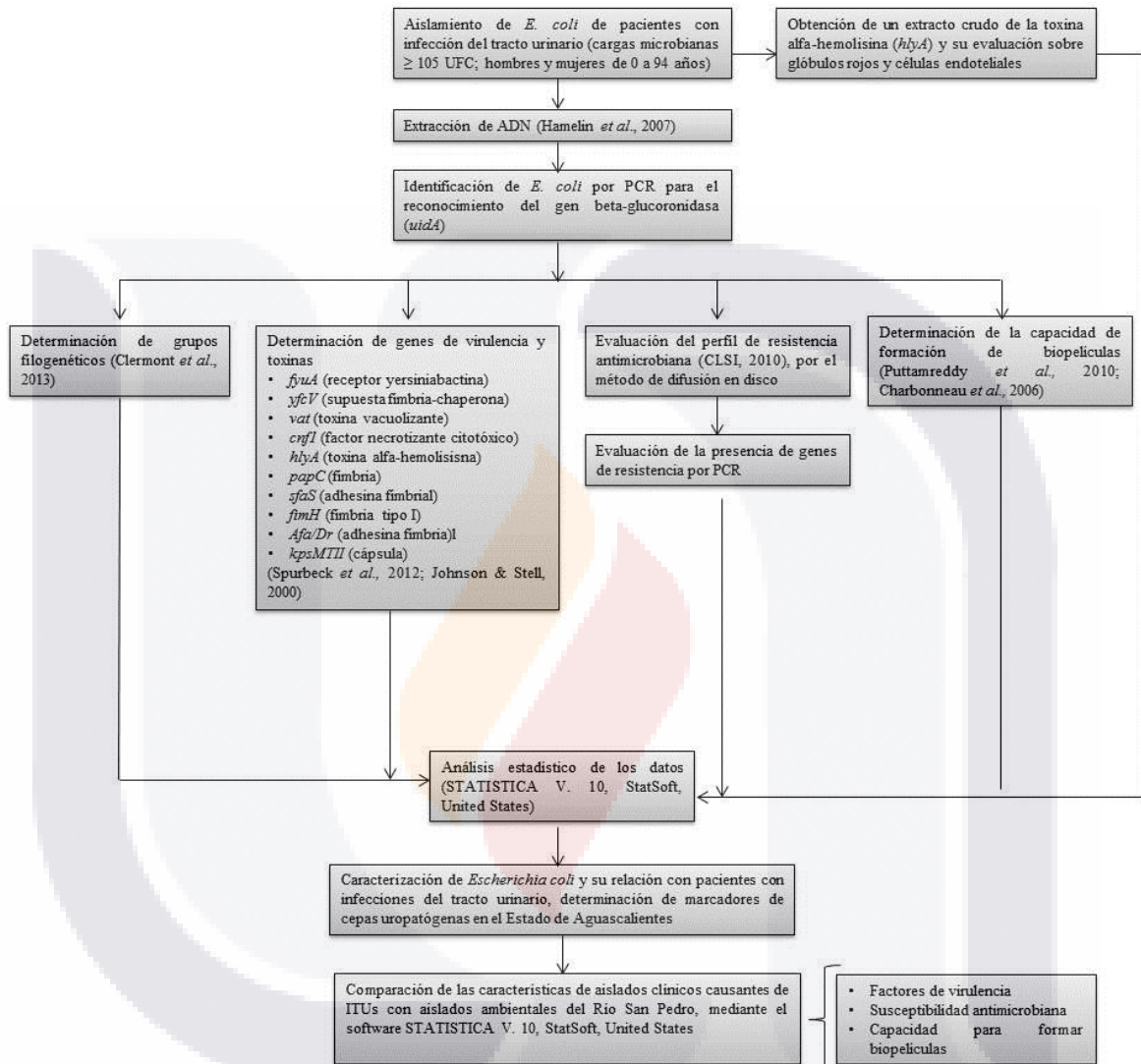


Figura 9. Metodología general para el estudio. *CLSI: Clinical Laboratory Standard Institute, PCR: Polimerase chain reaction, UFC: unidades formadoras de colonia.

6.1 Caracterización de grupos filogenéticos y factores de virulencia.

Sesenta y cuatro aislados de *Escherichia coli* de muestras urinarias de pacientes con infección del tracto urinario (nosocomial o comunitaria, hombre y mujeres, de edad de recién nacido a 91 años) con cuentas bacterianas $\geq 10^5$ UFC/mL se estudiaron para la determinar los grupos filogenéticos, factores de virulencia y toxinas, patrones de resistencia a antimicrobianos y formación de biopelículas. Brevemente, se realizó la extracción de ADN de las cepas mediante el método de ebullición (Hamelin *et al.*, 2007), y se llevó a cabo la identificación de *E. coli* mediante el reconocimiento del gen β -glucuronidasa (*uidA*). El análisis de las muestras para su clasificación filogenética en los grupos A, B1, B2, C, D, E y F, y los clados crípticos I y II; y III, IV y V; fue a través del método de Clermont *et al.*, (2013) mediante PCR cuadruplex, donde los productos de la amplificación fueron visualizados en gel de agarosa 1.5% y teñidos con bromuro de etidio.

La identificación de los factores de virulencia: *fyuA* (receptor yersiniabactina), *yfcV* (supuesta fimbria chaperona), *papC* (fimbria), *sfaS* (adhesina fimbrial), *fimH* (fimbria tipo 1), *afa/Dr* (adhesina afimbrial), *kpsMTII* (cápsula) y las toxinas *vat* (autotransportador serin proteasa), *cnf1* (factor necrotizante citotóxico) y *hlyA* (alfa-hemolisina) fue mediante PCR en punto final siguiendo la metodología de Spurbeck *et al.*, (2012) y Johnson & Stell, (2000). Los productos de la amplificación fueron visualizados en gel de agarosa 1.5%, teñidos con bromuro de etidio. Las cepas que presentaron 2 o más factores de virulencia incluyendo la presencia del gen *papC* fueron clasificadas como UPEC (Johnson and Stell, 2000).

6.2 Susceptibilidad antimicrobiana.

La evaluación del perfil de resistencia a antimicrobianos se llevó a cabo por el método de difusión en disco según lo establecido por Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2010) para los siguientes antibióticos: gentamicina (10 μ g), tobramicina (10 μ g), cefazolina (30 μ g), cefoxitima (30 μ g), ceftazidima (30 μ g), ceftriaxona (30 μ g), cefepima (30 μ g), ampicilina (10 μ g), amikacina (30 μ g), ampicilina/sulbactam (10/10 μ g),

piperacilina/tazobactam (100/10 µg), ertapenem (10 µg), imipinem (10 µg), levofloxacin (5 µg), ciprofloxacino (5 µg), TMP-SMX (25 µg) y nitrofurantoína (300 µg).

6.2.1 Determinación de genes de resistencia a fluoroquinolonas.

Mediante PCR en punto final se determinó la presencia de genes de resistencia a quinolonas: *gyra*, *parC*, *parE*, *aacIb*, *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*, *oqxA*, *oqxB* y *qepA* (Chen *et al.*, 2012) para 30 aislados los cuáles presentaron resistencia a ciprofloxacino (fluoroquinolona de segunda generación) y levofloxacin (fluoroquinolona de cuarta generación) mediante la técnica de difusión en disco. Los productos de la amplificación fueron visualizados en gel de agarosa 1.5%, teñidos con bromuro de etidio.

6.3 Determinación de la capacidad hemolítica.

La capacidad de los aislados para inducir la hemólisis en agar sangre se evaluó para detectar a las cepas productoras hemolisina. Las bacterias se inocularon en placas con 5% de agar de sangre y se incubaron 48 horas a 37 ° C. El ensayo de hemólisis se llevó a cabo en placas suplementadas con 5% de sangre desfibrinada, donde los aislados fueron sembrados e incubados a 37°C por 48 horas para determinar la formación de α -hemólisis, β -hemólisis y γ -hemólisis (Tabasi *et al.*, 2015)

6.4 Ensayo de formación de biopelículas.

Para evaluar la formación de biopelículas, fueron seleccionadas las cepas pertenecientes a los filogrupos B2 y D, es decir, se utilizaron las cepas clasificadas como patógenas extraintestinales.

6.4.1 Ensayo de Rojo Congo.

La determinación de curli se realizó mediante el ensayo de Rojo Congo (Hancock *et al.*, 2006), brevemente, las cepas fueron sembradas en placas de Luria Bertani (LB) sin sal, suplementadas con 0.004% de Rojo Congo y 0.002% de azul brillante., con incubación de 48 horas a 30°C, donde la formación de colonias rojas o rosas indicaron la unión al Rojo Congo.

6.4.2 Ensayo de Calcofluor.

Para el ensayo de calcofluor, se utilizaron placas de LB sin sal, suplementadas con 0.02% de calcofluor, las cepas fueron incubadas 48 horas a 30°C, posteriormente la visualización de colonias fluorescentes bajo luz UV fueron indicativas de la unión de celulosa al calcofluor (Hancock *et al.*, 2006).

6.4.3 Ensayo de Motilidad.

La motilidad se determinó en placas de LB con 0.3% agar, con incubación de 24 horas a 37°C, donde las cepas fueron clasificadas de acuerdo a la distancia de migración del sitio de inoculación en no móviles y móviles debido a la presencia de flagelo (Hancock *et al.*, 2006).

6.4.4 Formación de biopelículas por el método de cristal violeta.

La adhesión a superficies inertes se visualizó mediante la formación de biopelículas por el método de cristal violeta en placa de 96 pozos, sin agitación. Brevemente, se creció la cepa en medio LB 24 horas, 37°C en agitación, posteriormente se hizo una dilución 1/100 en medio M9 1x suplementado con 0.45% de glucosa y se utilizó para inocular la placa de 96 pozos que fue incubada 24 horas a 30°C. Finalmente se lavó la placa con agua

destilada y se tiñó con cristal violeta 1%. El colorante fue resuspendido con etanol-acetona (80:20) y la placa se leyó a 595 nm (Puttamreddy *et al.*, 2010).

6.5 Obtención de extracto crudo de la toxina HlyA.

Los aislados fueron crecidos en placas con medio LB 24 horas a 37°C, posteriormente se crecieron en placas con medio LB con cloranfenicol (20µg/mL) 24 horas a 37°C, en seguida la bacteria fue sembrada en tubos de LB con cloranfenicol (20µg/mL) y fue utilizado como preinóculo para sembrarlo en matraces con medio LB con cloranfenicol (20µg/mL) 24 horas a 37°C. El cultivo fue centrifugado a 6000 rpm por 15 minutos a 4°C en tubos cornic, se recuperó el sobrenadante y se ajustó el pH a 4.5 (punto isoelectrico de hlyA), la proteína se precipitó con etanol frio hasta alcanzar una concentración final de etanol de 20% (v/v), se refrigeró a 4°C por 48 horas y se colectó la proteína por centrifugación a 15,000 rpm durante 1 hora a 4°C y se resuspendió en metanol con TLCK a una concentración final de 10mM.

Se llevó a cabo la cuantificación de proteína por el método de Bradford, mediante la elaboración de una curva de calibración con albúmina. Posteriormente se realizó una electroforesis SDS-PAGE para identificar la proteína mediante su peso molecular a 110 kDa.

6.5.1 Ensayo de actividad hemolítica del extracto crudo de la toxina alfa hemolisina en glóbulos rojos.

La sangre fue colectada en tubos de 5 mL conteniendo EDTA. Se centrifugaron los tubos a 1500 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. Se removió la fracción de plasma y glóbulos blancos, y se realizaron lavados con solución Hartmann, hasta obtener un sobrenadante claro. Se preparó una suspensión de eritrocitos al 2.5%. El ensayo fue realizado en tubos eppendorf de 2mL, se colocaron 10µL de la toxina en 1.5 mL de

eritrocitos lavados al 2.5%. Los tubos fueron incubados a 37°C durante 60 minutos, en seguida fueron centrifugados a 1500 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente, el sobrenadante se leyó a 540 nm y el porcentaje de hemólisis fue calculado en base al porcentaje de hemoglobina liberada de acuerdo a la siguiente fórmula (Florencia-Vázquez, 2015):

$$\% \text{ Hemólisis} = \frac{\text{Abs muestra}}{\text{Abs ctrl positivo} - \text{Abs ctrl negativo}} \times 100$$

El control positivo de hemólisis se realizó utilizando buffer de lisis de eritrocitos.

6.5.2 Efecto del extracto crudo de la toxina alfa hemolisina citotoxicidad en células endoteliales.

Se partió de un cultivo de células endoteliales llevadas a confluencia de acuerdo a Nagamatsu y colaboradores (2015) con modificaciones, en placas de 48 pozos Nunclon™ Delta Surface (Thermo Scientific), con medio Dulbecco's, complementado con 3.5 µg/mL anfotericina B, 100 µg/mL de gentamicina, y 10% de suero fetal bovino (SFB), en una cámara húmeda a 37°C y con 5% de CO₂. Posteriormente las células fueron lavadas 3 veces con PBS 1x, se agregaron 150µL de medio RPMI complementado con antibióticos y 2.8% de SFB, además se agregaron 50µL de la toxina.

El ensayo fue realizado en una repetición. Las células se incubaron 1 hora a 37°C y 5% CO₂ en cámara húmeda. Para evaluar la actividad de la toxina, se determinó la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa con el kit LDH-Citotoxicity Colorimetric Assay Kit (Biovision), de acuerdo a las instrucciones del fabricante, brevemente se colectó el sobrenadante del cultivo, se centrifugó a 250 xg durante 10 minutos a temperatura ambiente, posteriormente 50µL de sobrenadante se mezclaron con 50µL de la mezcla de reacción (250µL de solución catalizadora más 11.25µL de colorante), se incubó 30 minutos a temperatura ambiente protegido de la luz. La absorbancia de las muestras se leyó a 500 nm y el porcentaje de citotoxicidad se determinó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Citotoxicidad} = \frac{\text{Abs muestra} - \text{Abs ctrl negativo}}{\text{Abs ctrl positivo} - \text{Abs ctrl negativo}} \times 100$$



7. Resultados

7.1 Prevalencia de las infecciones del tracto urinario.

Las infecciones del trato urinario fueron adquiridas principalmente en el género femenino y en la comunidad (57.14%), (**Figura 10**). No se encontró asociación entre la adquisición de la infección y el género del hospedero ($p= 0.5032$).

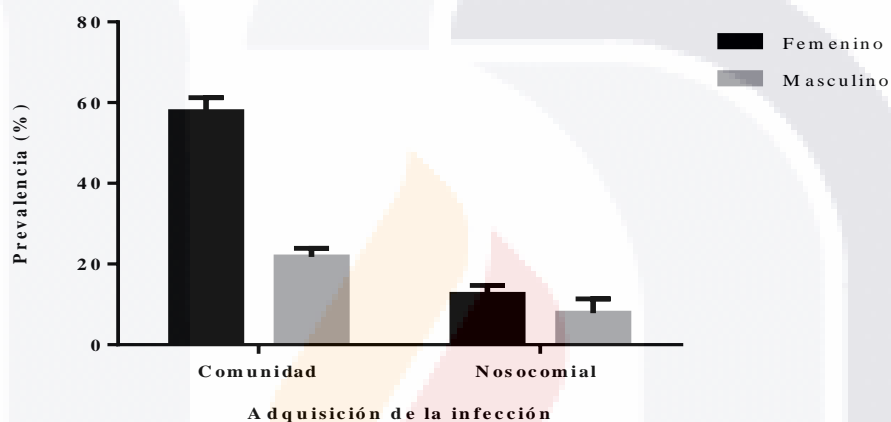


Figura 10. Prevalencia de las ITUs por adquisición de la infección y por género del hospedero.

Escherichia coli uropatógena fue el principal agente causal de las infecciones urinarias adquiridas tanto en la comunidad como intrahospitalarias (43.7 y 12.5% respectivamente), así como en ambos géneros (39% en mujeres y 17.18% en hombres) ($p=0.001$) (**Figura 11**). Sin embargo, la presencia de otras cepas de *E. coli* clasificadas como patógenas potenciales hace referencia a cepas de *E. coli* que si bien no fueron caracterizadas como UPEC debido a la ausencia del gen *papC* que codifica para una proteína de la membrana externa encargada de formar la plataforma para la biogénesis de la fimbria tipo P exclusiva de UPEC y asociado a cepas pielonefríticas (Rahdar *et al.*, 2015), sí cuentan con la capacidad de causar infección del tracto urinario.

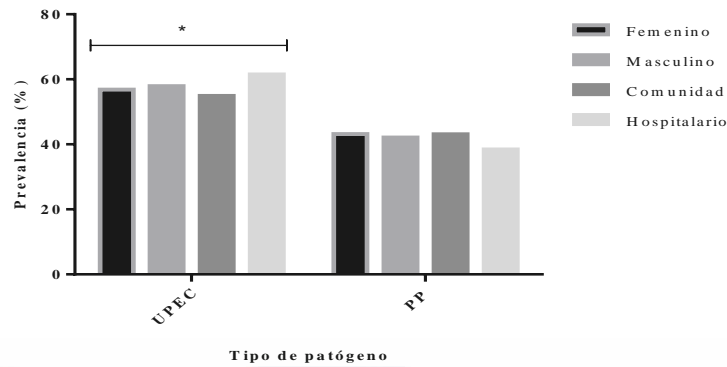


Figura 11. Prevalencia del tipo de patógeno en las infecciones del tracto urinario por adquisición de la infección y por género del hospedero. Las infecciones causadas por UPEC son significativamente mayor que las causadas por patógenos potenciales (PP) ($p=0.001$).

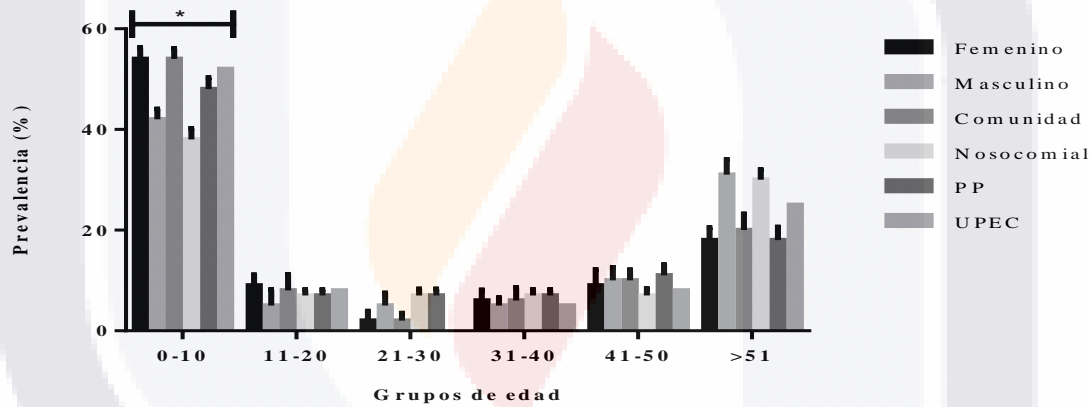


Figura 12. Incidencia de infecciones del tracto urinario por edad en años respecto al género, adquisición de la infección y tipo de patógeno. La incidencia de ITUs fue significativamente mayor en el grupo de edad de 0 a 10 años ($*p<0.001$).

Respecto a la edad del hospedero, la mayor prevalencia de infecciones urinarias se registró principalmente en pacientes pediátricos (recién nacidos y hasta la edad de 10 años) en hombres y mujeres (42.1 y 54.5% respectivamente) ($p<0.001$) (**Figura 12**).

En México las infecciones del tracto urinario en la edad pediátrica ocupan el tercer lugar de las infecciones más comunes después de las infecciones de vías respiratorias superiores y gastrointestinales (Calderón-Jaimes *et al.*, 2013). En el presente trabajo, el segundo grupo con mayor incidencia de infecciones urinarias fue en los adultos mayores de

51 años (31.6% hombres y 18.2% mujeres) (**Figura 12**) donde el predominio de la infección en el género masculino está relacionado con la retención e incontinencia urinaria y al aumento de hiperplasia benigna de próstata (Orrego-Marin *et al.*, 2014).

7.2 Caracterización de grupos filogenéticos.

La clasificación de las cepas de *E. coli* en grupos filogenéticos depende tanto de los factores de virulencia como al tipo de infección que pueden causar, por lo que pueden ser divididas en los siguientes grupos: A, B1, B2, C, D, E y F; como ya ha sido mencionado anteriormente, las cepas virulentas extra-intestinales pertenecen principalmente al grupo B2 y en menor medida a los grupos D y F, ya que poseen mayor número de determinantes de virulencia (adherencia, evasión a los mecanismos de defensa del huésped, adquisición de hierro, invasión celular, etc.) mientras que las cepas intraintestinales están asociadas a los grupos A, B1, C y E (Clermont *et al.*, 2013). Por otra parte, la clasificación en clados crípticos (clado I o II, y clado III, IV y V) sugiere la existencia de cepas con pocas posibilidades de ser importantes para la salud humana, sin embargo pueden influir como indicadores de la calidad del agua (Clermont *et al.*, 2013).

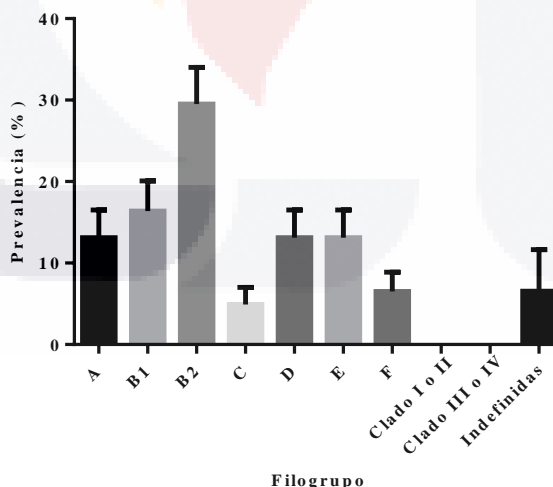


Figura 13. Clasificación de los aislados en los grupos filogenéticos.

Las cepas de *E. coli* de este estudio fueron asociadas principalmente al grupo B2 (29.50%), es decir, pertenecen al grupo de patógenos extra-intestinales, coincidiendo con otros estudios. Este resultado es interesante, puesto que el grupo B2 ha sido asociado con cepas altamente virulentas, lo que sugiere la presencia de infecciones difíciles de erradicar (**Figura 13**). Por otra parte, seguido del grupo B2, la presencia de cepas en el grupo B1 (16.39%), así como en el grupo A (13.11%), grupo E (12.7) y en menor medida al grupo C (4.91%), que están asociados principalmente con cepas comensales, sugiere que el tracto gastrointestinal es el reservorio de cepas que pueden ser capaces de colonizar el tracto urinario (López-Banda *et al.*, 2014).

La presencia de cepas en los grupos D y F (13.11 y 6.55% respectivamente), al igual que el grupo B2, indican la presencia de patógenos extra-intestinales. No se encontró ninguna cepa asociada a los clados crípticos, como es de esperarse dada las pocas posibilidades de este tipo de cepas para causar daño a la salud humana (Clermont *et al.*, 2013).

Finalmente las cepas de *E. coli* clasificadas como indefinidas (6.3%), sugiere la presencia de aislados que no pudieron ser clasificados en los distintos filogrupos de acuerdo a la metodología utilizada de Clermont y colaboradores (2013), basado en un ensayo cuádruplex para la detección de los genes *chuA*, *yjaA*, *TspE4.C2* y *arpA*, por lo que se requieren ensayos adicionales para caracterizar estas cepas como lo es el método de tipificación de secuencias (MLST).

7.3 Prevalencia de los factores de virulencia.

UPEC utiliza numerosos factores de virulencia que le confieren la capacidad para poder entrar, adherirse, adquirir nutrientes esenciales, multiplicarse en un ambiente hostil, causar daño a los tejidos y difundir en el tracto urinario (Subashchandrabose and Mobley, 2015). Se encontró mayor prevalencia de *fimH* o fimbria tipo 1 (95.16%), coincidiendo con un estudio realizado en México por López-Banda y colaboradores (2014), este tipo de adhesina es esencial para el reconocimiento y apego a los receptores de las vías urinarias

permitiendo a la bacteria resistir la eliminación mecánica por el flujo de la orina, aumentando la persistencia de *E. coli* en el hospedero y le confiere la capacidad para colonizar diferentes nichos (Hojati *et al.*, 2015) (**Figura 14**).

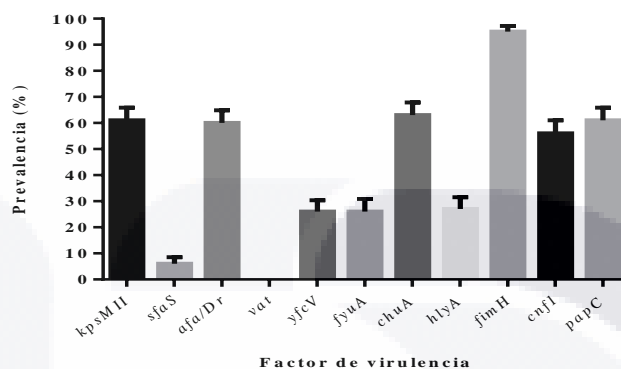


Figura 14. Prevalencia de los factores de virulencia.

Por su parte, *chuA*, proteína de unión al grupo hemo (62.90%), como segundo factor de virulencia de mayor prevalencia identificado, este factor de virulencia es determinante para el agrupamiento filogenético de las cepas de *E. coli* en los filogrupos B2, D y F (Hoffmann *et al.*, 2001), además con el sideróforo *fyuA* (receptor de yersiniabactina), aunque presente en menor proporción (25.81%), contribuyen a la capacidad de UPEC para infectar el tracto urinario, donde específicamente *chuA* está involucrado en la formación de comunidades bacterianas intracelulares (IBCs) dentro de las células epiteliales superficiales de la vejiga, contribuyendo más significativamente a la virulencia de UPEC (García *et al.*, 2011); mientras que *fyuA* es esencial para la supervivencia de *E. coli* en el tracto urinario ya que le permite la captación de hierro del hospedero.

Aunque se realizó la detección del receptor de yersiniabactina (*fyuA*) y fue encontrado en baja proporción, UPEC cuenta con otros tres sistemas para la captación de hierro: hidoxametarobactina, enterobactina y salmoquelina (Donnenberg, 2013). La prevalencia de *papC* (61.29%) o fimbria tipo P, coincide con lo reportado por López-Banda y colaboradores (2013), esta fimbria promueve la fuerte adherencia al endotelio vascular y a la capa muscular de la vejiga, y aunque débil adherencia en la superficie epitelial de la

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

misma, está asociado a cepas pielonefríticas y a la formación de biopelículas. Con la misma prevalencia que *papC*, se encontró *kpsMTII* (cápsula) que es un mecanismo de evasión de la respuesta inmune ya que protege a la bacteria de la muerte mediada por el complemento (Subashchandrabose and Mobley, 2015), sugiriendo la presencia de patógenos que pueden causar daño renal. La detección de la adhesina *afa/Dr* (59.68%) promueve la adhesión bacteriana y la invasión a otros tejidos de las vías urinarias del huésped en conjunto con otras adhesinas como fimbria tipo 1 (*fimH*) y la fimbria tipo P (*papC*) (95.2% y 61.9% respectivamente). La expresión de adhesinas *afa/Dr* puede predisponer el establecimiento de infecciones crónicas o recurrentes (Qin *et al.*, 2013).

En lo que respecta a las toxinas, que son factores de virulencia que contribuyen a la difusión del patógeno a tejidos más profundos, después de la interrupción de la integridad celular para obtener acceso a los nutrientes dentro de la célula huésped, así como para destruir células efectoras inmunes y evadir su potencial de actividad antibacteriana (Lüthje and Brauner, 2014). El factor necrotizante citotóxico (*cnfI*), se encontró en mayor proporción que *hlyA*, toxina alfa-hemolisina (61.29% y 27.42%, respectivamente), mientras que la toxina *vat* (toxina vacuolizante) no fue detectada en los aislados de *E. coli*.

El factor necrotizante citotóxico, *cnfI*, es capaz de producir cambios en el citoesqueleto celular y morfología, mientras que *hlyA* forma poros en la membrana de células eucariotas y tiene la capacidad de lisar eritrocitos (Lüthje and Brauner, 2014), estas dos toxinas están estrechamente relacionadas, ya que aproximadamente el 50% de los aislados de *E. coli* de pacientes con cistitis o pielonefritis producen *hlyA*, mientras que *cnfI* se encuentra en aproximadamente 70% de las cepas hemolíticas, pero rara vez en las no hemolíticas (García *et al.*, 2013).

Para el gen *yfcV* o supuesta fimbria chaperona, la detección fue del 25.81% de los aislados de *E. coli*, es un factor de virulencia altamente asociado a cepas uropatógenas (Spurbeck *et al.*, 2012), y finalmente la detección de *sfaS*, en el 6.45% de los aislados, es una adhesina fimbrial, también conocida como fimbria S y está asociado a cepas de *E. coli* pielonefríticas (Antão *et al.*, 2009).

De manera general, los aislados presentaron un promedio de 4.75 ± 2.2 factores de virulencia (**Tabla 4**), no se observó diferencia significativa de acuerdo a la adquisición de la infección, género y edad del hospedero. Sin embargo, las cepas clasificadas como UPEC presentaron un promedio de 5.6 ± 2.8 factores de virulencia y fue significativamente mayor a los presentes en las cepas clasificadas como patógenos potenciales ($p=0.0001$) (**Figura 15**).

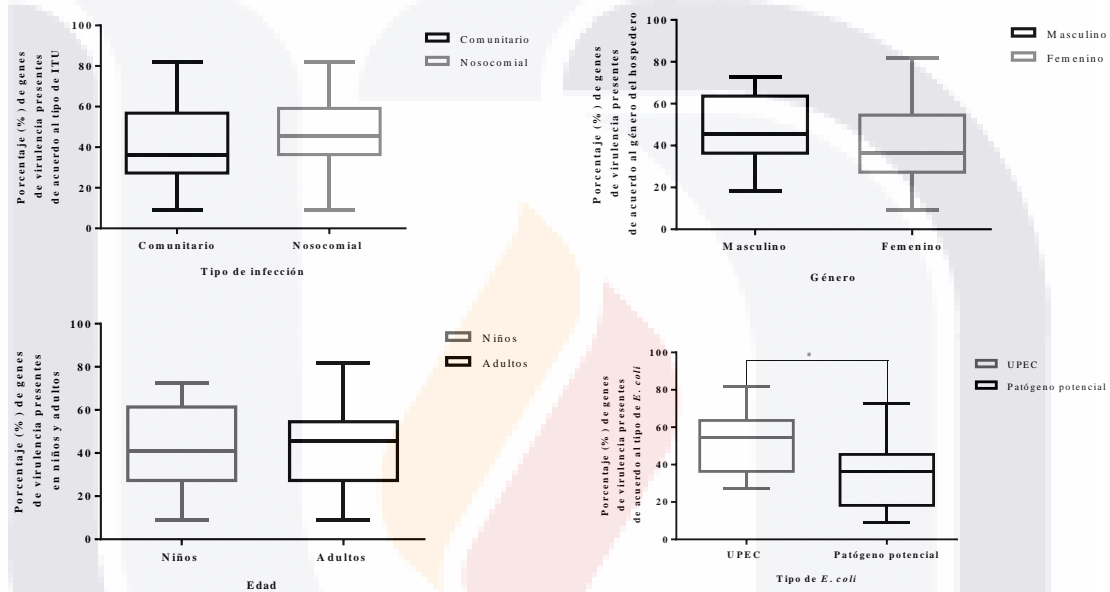


Figura 15. Diagrama de caja y bigotes de la relación entre los factores de virulencia identificados en las cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con infecciones urinarias respecto al género, edad, adquisición de la infección y tipo de *E. coli*. Las cepas potencialmente patógenas mostraron diferencia significativa comparada con las cepas clasificadas como UPEC de acuerdo a la prevalencia de factores de virulencia identificados ($*p < 0.05$).

En relación al filogruppo, y de acuerdo con Piatti y colaboradores (2008), el filogruppo B2, de donde derivan las cepas patógenas de *E. coli* principalmente, se caracterizó por la presencia de las cepas más virulentas (6.5 ± 1.94 factores de virulencia), y se observó diferencia significativa respecto a los factores de virulencia de los filorgupos A, B1 y C ($p < 0.0001$) (**Figura 16**).

Tabla 4. Prevalencia de los factores de virulencia por género y edad del hospedero, tipo de adquisición de la infección y tipo de *E. coli*.

GEN DE VIRULENCIA		GÉNERO (%)		TIPO DE INFECCIÓN (%)		EDAD (%)		TIPO DE <i>E. COLI</i> (%)	
		Femenino (n=44)	Masculino (n=19)	Comunitaria (n=50)	Nosocomial (n=13)	Niños (0 - 17, n=36)	Adultos (>18, n=27)	*PP (n=27)	UPEC (n=36)
Adhesinas	<i>papC</i>	26 (59.1)	13 (68.4)	31 (62.0)	8 (61.5)	23 (63.9)	16 (59.3)	3 (11.1)	36 (100.0)
	<i>sfaS</i>	1 (2.3)	3 (15.8)	4 (8.0)	0 (0.0)	3 (8.3)	1 (3.7)	2 (7.4)	2 (5.6)
	<i>afa/dra</i>	26 (59.1)	11 (57.9)	28 (56.0)	9 (69.2)	18 (50.0)	19 (70.4)	13 (48.1)	24 (66.7)
	<i>fimH</i>	41 (93.2)	19 (100.0)	47 (94.0)	13 (100.0)	34 (94.4)	26 (96.3)	24 (88.9)	36 (100.0)
	<i>yfcv</i>	12 (27.3)	4 (21.1)	12 (24.0)	4 (30.8)	7 (19.4)	9 (33.3)	7 (25.9)	9 (25.0)
Síntesis de cápsula	<i>kpsMTH</i>	29 (65.9)	10 (52.6)	32 (64.0)	7 (53.8)	24 (66.7)	15 (55.6)	18 (66.7)	21 (58.3)
Sideróforos	<i>chuA</i>	28 (63.6)	12 (63.2)	31 (62.0)	9 (69.2)	21 (58.3)	19 (70.4)	17 (63.0)	23 (63.9)
	<i>fyuA</i>	12 (27.3)	4 (21.1)	14 (28.0)	2 (15.4)	10 (27.8)	6 (22.2)	6 (22.2)	10 (27.8)
Toxinas	<i>vat</i>	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
	<i>hlyA</i>	9 (20.5)	8 (42.1)	12 (24.0)	5 (38.5)	12 (33.3)	5 (18.5)	3 (11.1)	14 (38.9)
	<i>cnfI</i>	22 (50.0)	14 (73.7)	27 (54.0)	9 (69.2)	20 (55.6)	16 (59.3)	7 (25.9)	29 (80.6)

*PP: patógeno potencial.

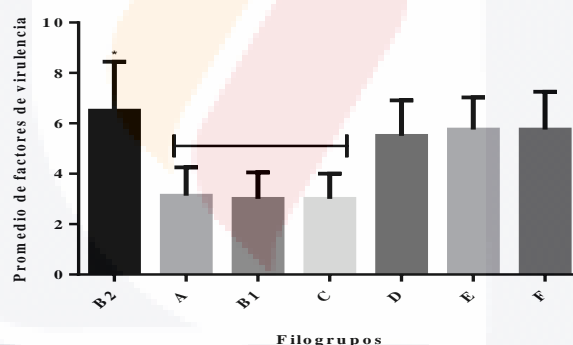


Figura 16: Promedio de factores de virulencia por filogrupo. * Indica diferencia significativa del filogrupo B2 respecto a los filogrupos A, B1 y C ($p < 0.0001$).

7.4 Susceptibilidad antimicrobiana.

El patrón de susceptibilidad de las bacterias ha cambiado por la resistencia progresivamente creciente derivada del uso indiscriminado de los antimicrobianos. Para poder considerar un antibiótico como tratamiento empírico en la población mexicana, el punto de corte recomendado debe ser igual o menor a 20% (Calderón-Jaimes *et al.*, 2013).

Los aislados presentaron resistencia a 12 de 17 antibióticos evaluados, principalmente en ampicilina (85.2%), ampicilina/sulbactam (71.4%) y en trimetoprima/sulfametoxazol (55.6%); en este último caso, el TMP-SMX que es un antibiótico de primera línea utilizado para el tratamiento de infecciones urinarias, ya se había reportado en Turquía desde 1990, el incremento de la resistencia mayor al 50% de los uropatógenos, llevando al fracaso terapéutico de las ITU (Brumbaugh and Mobley, 2012).

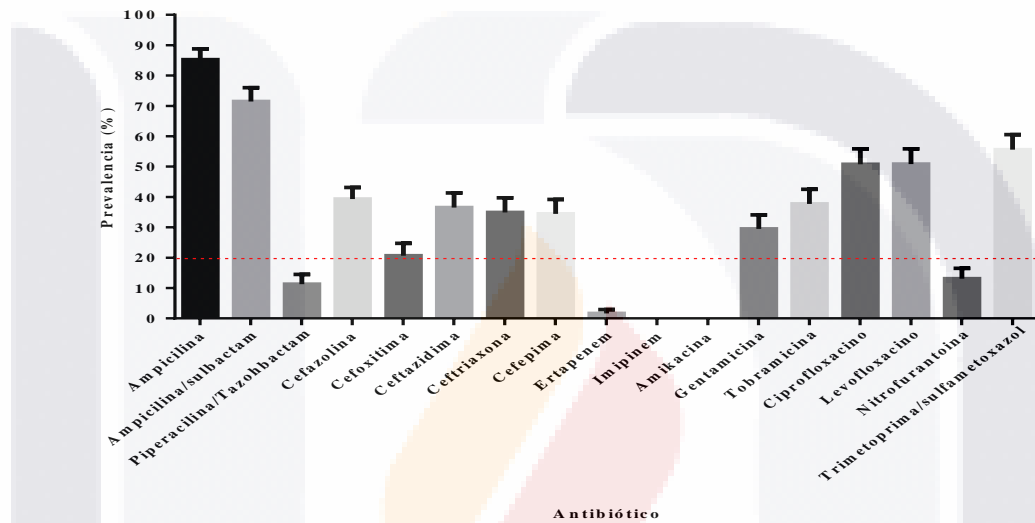


Figura 17. Porcentaje de resistencia de las cepas aisladas de *E. coli* por antibiótico. La línea punteada representa el punto de corte para los antibióticos en México ($\leq 20\%$).

En México, las tasas de resistencia de *E. coli* para aislados comunitarios varían de 60-70% para la ampicilina, así como del 50-60% para TMP-SMX, mientras que para las cefalosporinas parenterales la resistencia reportada es menor al 10% (Calderón-Jaimes *et al.*, 2013). Los resultados del presente estudio mostraron que los aislados de *E. coli* presentaron en promedio una resistencia de 33.2% a todas las cefalosporinas evaluadas, desde 20.6% para la cefoxitina (cefalosporina de segunda generación), hasta 39.3% para el caso de la cefazolina (cefalosporina de primera generación).

Por otra parte, todos los aislados clínicos presentaron sensibilidad del 100% para los antibióticos imipenem y amikacina, por lo que en conjunto con los antibióticos ertapenem, piperacilina/tazobactam y nitrofurantoina (1.6%, 11.3% y 13.1% respectivamente) son

antibióticos que pueden ser utilizados para el tratamiento de ITUs al estar por debajo del punto de corte ($\leq 20\%$) (Calderón-Jaimes *et al.*, 2013) (**Figura 17**).

En cuanto a la presencia de cepas multidrogo-resistentes (resistentes a 3 antibióticos diferentes) fue de 60.31%, 28.57% fueron resistentes a un antibiótico y solo el 11.11% de los aislados fueron sensibles, donde se encontró diferencia significativa de cepas MDR respecto a las sensibles ($p=0.0335$) (**Figura 18**).

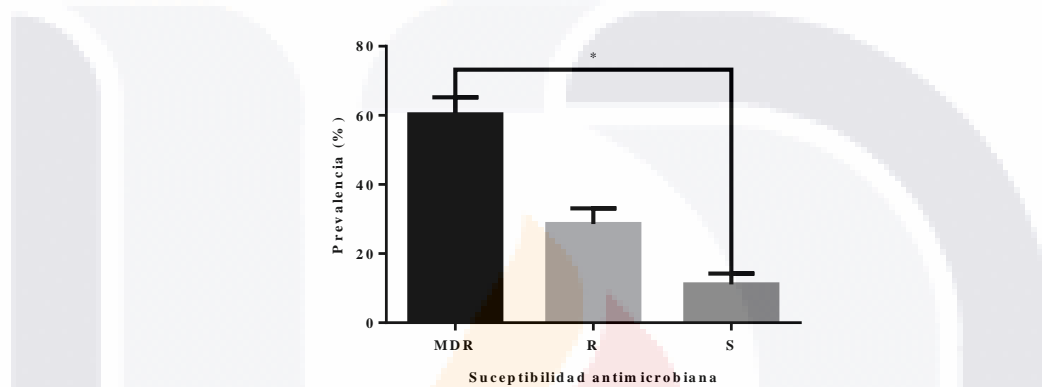


Figura 18. Porcentaje de multi-drogo resistencia, resistencia y sensibilidad de los aislados de *E. coli* a los antibióticos prescritos para el tratamiento de ITUs. Se encontró diferencia significativa de cepas MDR respecto a las sensibles ($p=0.0335$) MDR: multidrogo-resistentes (resistencia a 3 antibióticos diferentes), R: resistente (resistente a 1 antibiótico) y S: sensible.

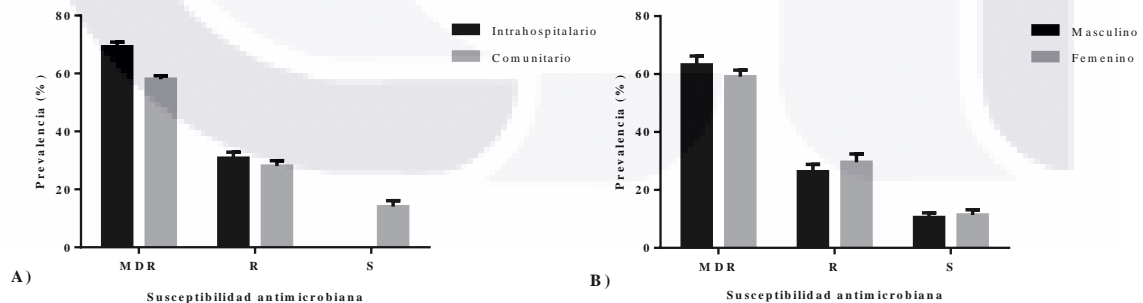


Figura 19. A) Susceptibilidad a antibióticos por adquisición de la infección y B) por género del hospedero. MDR: multidrogo-resistentes (resistencia a 3 antibióticos diferentes), R: resistente (resistente a 1 antibiótico) y S: sensible.

Se observó que si bien la población más susceptible a las infecciones del tracto urinario es el género femenino, el género masculino presentó mayor prevalencia de cepas multidrogo-resistentes (63.15% contra 59.09% en el género femenino) y menor proporción de cepas sensibles a los antibióticos (10.52% contra 11.36% en el género femenino) (**Figura 19 B**).

Las cepas causantes de infecciones urinarias adquiridas en hospitales son en su mayoría multidrogo-resistentes y resistentes (69.23 y 30.76% respectivamente), y ninguno de los aislados presentó sensibilidad a los antibióticos, por otra parte las cepas causantes de infecciones en la comunidad, en su mayoría también fueron multidrogo-resistentes (58%), el 28% como resistentes y solo 14% sensibles (**Figura 19 A**).

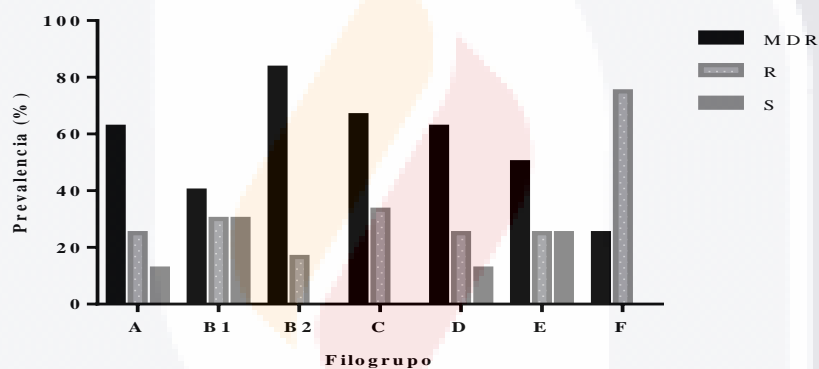


Figura 20. Prevalencia de MDR, R y S de los aislados clínicos por filogrupos.

Finalmente, se observó que la mayoría de cepas multi-drogo resistentes pertenecen al filogrupos B2 (83.33%), cuyo patrón de resistencia está dado en su mayoría por Ampicilina-Ampicilina/Sulbactam (83.33%) (**Figura 20**), por lo tanto las cepas del filogrupos B2 no sólo son las más virulentas, si no que también son las más resistentes a los antibióticos, y puede asociarse al consumo de carne de animales como pollo y cerdo en los que es más común el uso de antibióticos que promueve la selección de cepas ExPEC resistentes (Singer, 2015).

El uso frecuente de antibióticos es considerado el factor más importante que promueve la resistencia a múltiples fármacos en UPEC tanto en medicina humana como veterinaria, por lo tanto, debido al uso indiscriminado de los antibióticos en los países en desarrollo, las bacterias patógenas son mucho más dinámicas, versátiles y mucho más “duras” en comparación con los países desarrollados, por otra parte, las cepas multi-drogo resistentes están en aumento en todo el mundo, principalmente debido a la propagación de genes localizados en elementos genéticos móviles, incluyendo plásmidos, integrones y transposones (Allocati *et al.*, 2013).

7.4.1 Prevalencia de genes de resistencia a fluoroquinolonas.

Las fluoroquinolonas, familia de agentes antimicrobianos sintéticos de amplio espectro, son fármacos de primera elección utilizados para el tratamiento de infecciones intestinales y del tracto urinario (Ramírez-Castillo *et al.*, 2013). En *E. coli*, así como en otras bacterias Gram negativas, la ADN girasa que codifica para la ADN topoisomerasa de tipo II es el principal objetivo de quinolonas y fluoroquinolonas, donde una mutación en el gen *gyrA* es la forma más común de adquirir resistencia (Piatti *et al.*, 2008). Mutaciones en *gyrA* como en *parC*, que codifica para la topoisomerasa IV, son los mecanismos más comunes e importantes de resistencia en enterobacterias (Aoike *et al.*, 2013).

Se detectó elevada prevalencia de los genes adquiridos por mutación, desde un 50% (*aacIb*) hasta 96.7% (*gyrA*), por lo que las cepas con fenotipo resistente a fluoroquinolonas está dado en mayor proporción por el gen *gyrA* seguido por *parC*, coincidiendo con lo reportado por Piatti y colaboradores (2008). Aunque en menor proporción se detectó el gen *aacIb*, éste es importante ya que de acuerdo a otros estudios, también está asociado a la resistencia en aminoglucósidos como la amikacina, kanamicina y tobramicina (Jacoby *et al.*, 2014) (**Figura 21, A**), donde para la amikacina se presentó una resistencia del 37.7%, aunque en el caso de la amikacina el 100% de las cepas fueron sensibles (**Figura 17**).

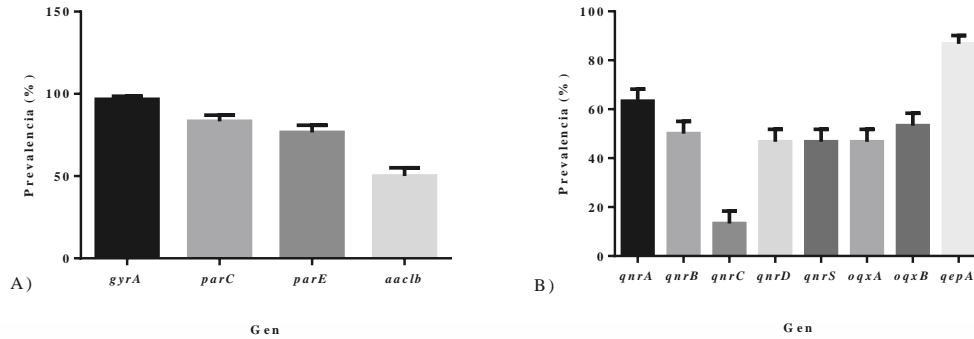


Figura 21. Prevalencia de genes de resistencia a fluoroquinolonas. **A)** Genes adquiridos por mutación, **B)** Genes adquiridos por transferencia.

En lo que respecta a los genes adquiridos por transferencia, el gen de mayor prevalencia fue *qepA* (86.7%), que en conjunto con los genes *oqxA* y *oqxB* (46.7% y 53.3%, respectivamente) (**Figura 21, B**), codifican para bombas de eflujo (Jacoby *et al.*, 2014).

Por otra parte la presencia de los genes *qnr* con valores desde 13.33% (*qnrC*) hasta 63.33% (*qnrA*) también es relevante porque son responsables de que un agente infeccioso sea difícil de tratar con quinolonas, además de que son genes que se encuentran generalmente en plásmidos de multi-resistencia ligados a determinantes de resistencia para β-lactámicos (Jacoby *et al.*, 2014) (**Figura 21, B**). Específicamente *qnrA* también puede causar un aumento en la concentración mínima inhibitoria (CMI) de fluoroquinolonas de hasta 32 veces en *E. coli* (Sedighi *et al.*, 2015).

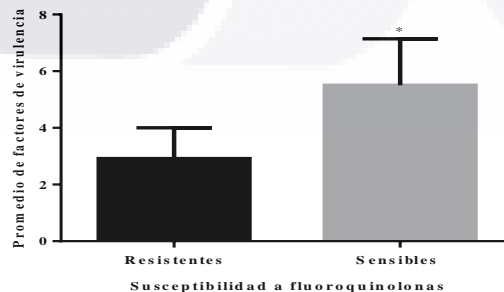


Figura 22: Asociación del promedio de los factores de virulencia de las cepas del filogrupo B2 con respecto a la susceptibilidad a levofloxacino y ciprofloxacino. * Indica que la media de los factores de virulencia de las cepas sensibles a las fluoroquinolonas es mayor que las que tienen un fenotipo resistente ($p=0.0010$).

Finalmente, se evaluó la asociación entre la susceptibilidad a ciprofloxacino y levofloxacino de las cepas aislados del filogrupa B2 (grupo más virulento), respecto a la cantidad de factores de virulencia que presentan, y se encontró que las cepas sensibles a las fluoroquinolonas poseen una cantidad de factores de virulencia significativamente mayor (5.5 ± 1.64) que aquellas que poseen un fenotipo resistente (2.91 ± 1.08) ($p=0.0010$), coincidiendo por lo reportado por Piatti y colaboradores (2008) (**Figura 22**). Dicha asociación es importante ya que las cepas UPEC resistentes a quinolonas y fluoroquinolonas con virulencia reducida invaden a pacientes comprometidos; mientras que cepas susceptibles y con elevada virulencia afectan a pacientes no comprometidos (Piatti *et al.*, 2008).

7.5 Determinación de la capacidad hemolítica de la cepa.

Según Vigil y colaboradores (2011), el fenotipo de hemólisis está dado por la presencia de halos claros alrededor de colonias sembradas en agar sangre (5%). Sesenta y cuatro por ciento de los aislados presentó hemólisis alfa y fue significativamente mayor ($p=0.0204$) a las cepas que no fueron hemolíticas (35.9%). No se observó hemólisis beta (**Figura 23**).

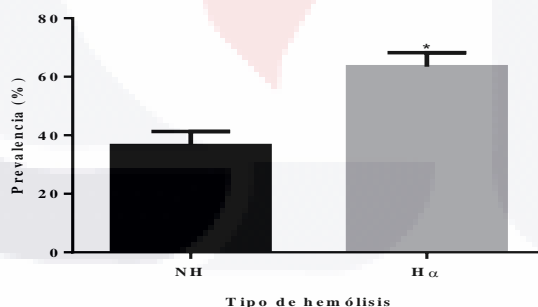


Figura 23. Prevalencia de cepas con capacidad hemolítica. NH: cepas no hemolíticas; H α : cepas que presentaron hemólisis alfa. * Indica la significancia de cepas que presentaron hemólisis alfa ($p=0.0204$).

7.6 Ensayos de formación de biopelículas.

La formación de biopelículas es el crecimiento preferido de los patógenos, lo que incrementa su capacidad para establecerse en el hospedero así como en ambientes no

hospederos, además es un factor de virulencia relacionado con la resistencia a ambientes estresantes (antibióticos y sistema inmune) (Hufnagel *et al.*, 2015). Acorde a la clasificación de los aislados, fueron seleccionadas 26 cepas correspondientes a los filogrupos B2 y D (correspondientes a patógenos de *E. coli* extra-intestinales que poseen un mayor número de factores de virulencia) para evaluar la presencia de curli, celulosa, motilidad, y su capacidad para formar biopelículas en soportes sintéticos.

La importancia de evaluar la capacidad de los aislados de *E. coli* para formar biopelículas *in vitro* es debido a que son difíciles de diagnosticar *in vivo*, por falta de métodos de muestreo, así como su asociación con enfermedades infecciosas humanas y a su relación con la tolerancia a múltiples fármacos y resistencia a la opsonización como a la fagocitosis, prolongando la persistencia de la bacteria en el hospedero (Bordi and Bentzmann, 2011).

7.6.1 Ensayo Rojo Congo.

El ensayo de Rojo Congo, es una prueba que determina la capacidad de las cepas de *E. coli* de formar un tipo de biopelícula en agar que es dependiente de curli. El curli es un polímero de proteína (fibras amiloides adhesivas), uno de los componentes típicos más abundantes de la matriz extracelular de *E. coli* y otras Enterobacterias, involucradas en la formación de biopelículas ya que son mediadores de las interacciones célula-célula y célula-superficie para promover la adhesión bacteriana a las células de mamíferos, así como a células vegetales y en superficies inertes (vidrio, acero inoxidable y plástico) (Hufnagel *et al.*, 2015; Cegelski *et at.*, 2009).

Ochenta y cuatro por ciento de los aislados mostraron presencia de curli (**Figura 24 y 27**) y fue significativamente mayor a la presencia de celulosa y a la motilidad flagelar ($p < 0.0001$).

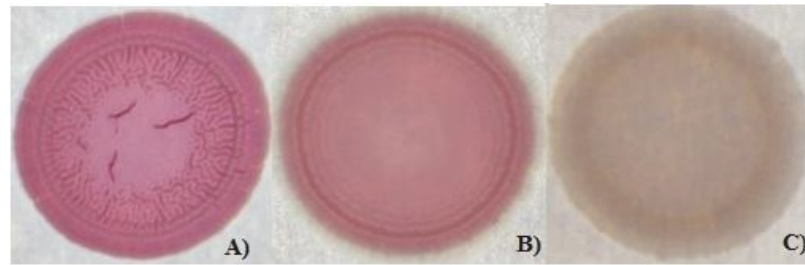


Figura 24. Ensayo Rojo Congo. Colonias de distintos aislados de *E. coli* crecidas en placas de LB sin sal, con 0.004% de Congo Red y 0.002% de azul brillante. A) y B) cepas que presentan curli., C) cepa que no presenta curli.

7.6.2 *Ensayo de Calcofluor.*

La celulosa es un polímero de carbohidratos, y en conjunto con el curli, es otro de los componentes más abundante de la matriz extracelular de *E. coli*, donde ambos actúan de forma sinérgica para promover la colonización en el hospedero, la formación de biopelículas y la supervivencia en diferentes entornos (Cegelski *et al.*, 2009). Quince punto cuatro por ciento de los aislados presentaron celulosa (**Figura 25 y 27**).

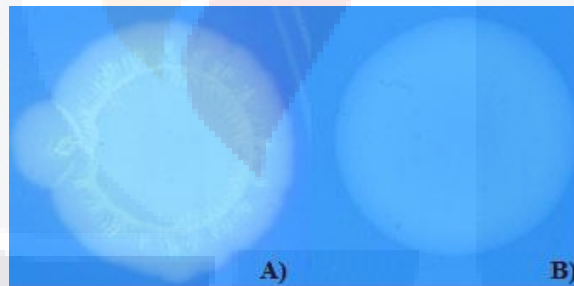


Figura 25. Ensayo Calcofluor. Colonias de aislados de *E. coli* crecidas en placas de LB sin sal, suplementadas con 0.02% de calcofluor, vistas con luz ultravioleta. A) Prueba positiva para celulosa, B) prueba negativa.

7.6.3 *Ensayo de Motilidad.*

La ascensión de UPEC a través del tracto urinario es mediado por flagelos, por lo tanto la motilidad flagelar es esencial para la uropatogénesis (Donnenberg, 2013). La presencia de flagelo está involucrada en la formación de biopelículas en la interface líquido-aire

formando un borde expuesto en tubos de vidrio y pozos de cloruro de polivinilo (Hufnagel *et al.*, 2015). Más recientemente se ha propuesto que la presencia de flagelo puede contribuir a penetrar la barrera epitelial renal, para obtener acceso a la corriente sanguínea (Subashchandrabose and Mobley, 2015). En este ensayo el 50% de las cepas presentó motilidad flagelar (**Figura 26 y 27**).

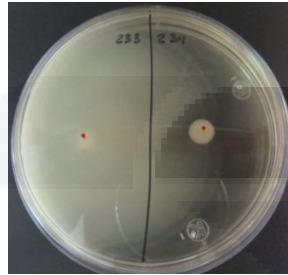


Figura 26. Ensayo de motilidad. Aislados de *E.coli* crecidos en LB con 0.3% de agar. A la izquierda se observa una cepa móvil (halo de crecimiento mayor a 5 cm) y a la derecha una cepa no móvil (halo de crecimiento menor a 5 cm).

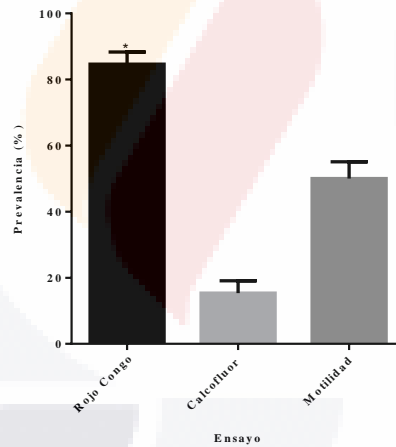


Figura 27. Prevalencia de estructuras involucradas en la formación de biopelículas de cepas causantes de infecciones urinarias de los filogrupos B2 y D. Ensayo Rojo Congo: identificación curli; ensayo de Calcofluor: identificación de celulosa; Ensayo de Motilidad: presencia de flagelo. * Indica la significancia de cepas que presentan curli ($p < 0.0001$).

7.6.4 Formación de biopelícula por el método de Cristal Violeta.

Las cepas fueron clasificadas según su densidad óptica (DO) en comparación con el blanco en: no adherentes, poco adherentes, moderadamente adherentes y fuertemente adherentes (Novais *et al.*, 2013) (**Figura 28, A**). La mayoría de la cepas fueron clasificadas

significativamente como poco adherentes (92.3%) ($p < 0.0001$) y una cepa fue moderadamente adherente. Ninguno de los aislados fue no adherente o fuertemente adherente (**Figura 28, B**).

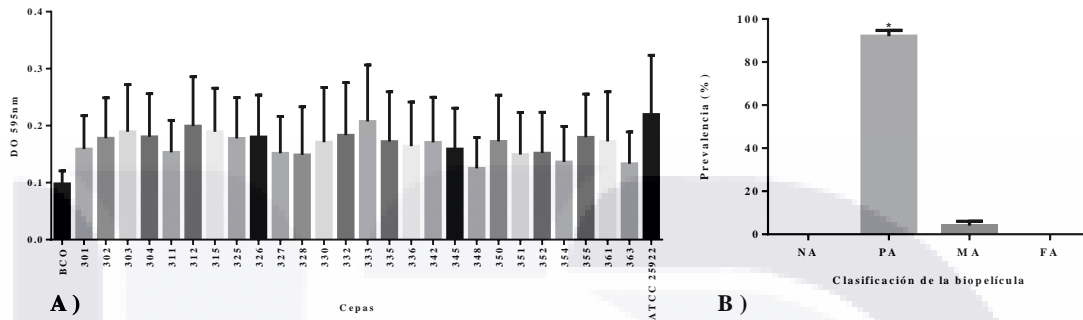


Figura 28. A) Formación de biopelícula por el método de cristal violeta en microplaca de 96 pozos de aislados clínicos pertenecientes a los filogrupos B2 y D. Control positivo: *E. coli* ATCC 25922. B) Prevalencia del tipo de biopelícula formada. NA: no adherente; PA: pobre adherente; MA: moderadamente adherente; FA fuertemente adherente. * Indica la significancia de cepas clasificadas como pobre adherentes ($p < 0.0001$).

La formación de biopelículas en placa es de los modelos más utilizados en laboratorios, en *E. coli* este tipo de biopelícula depende de la adhesina fimbrial tipo I, involucrado en el desarrollo y maduración de dicha estructura (Hufnagel *et al.*, 2015). Por otra parte Novais y colaboradores (2013) sugieren, aparte de la presencia del gen *fimH* (que codifica para la fimbria tipo I), la posible presencia de otros genes involucrados en la producción de biopelículas, como son *papC*, *fyuA* o *kpsMTII*.

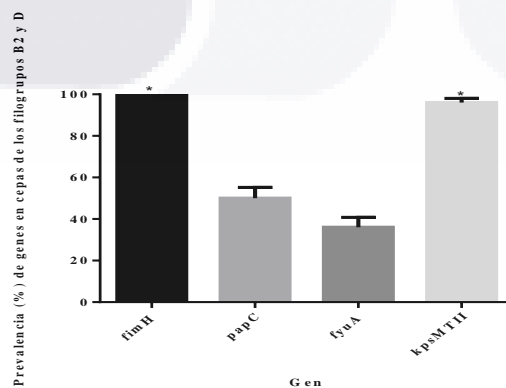


Figura 29. Prevalencia de los factores de virulencia en cepas formadoras de biopelícula. La presencia de los genes *fimH* y *kpsMTII* es significativamente mayor a *papC* y *fyuA* ($p < 0.0001$).

Los aislados de los filogrupos B2 y D presentaron un promedio de 2.8 ± 0.8 factores de virulencia involucrados en la formación de biopelícula, es decir, todos tienen al menos un factor de virulencia que fue *fimH* (Novais et al., 2013) (**Figura 29**). La presencia de los genes *fimH* y *kpsMTII* fue significativamente mayor a *papC* y *fyuA* ($p < 0.0001$). Únicamente la cepa 348 que fue clasificada como no adherente, fue el único aislado que solo posee *fimH* como factor de virulencia, el resto de los aislados presentó mínimo 2 factores de virulencia.

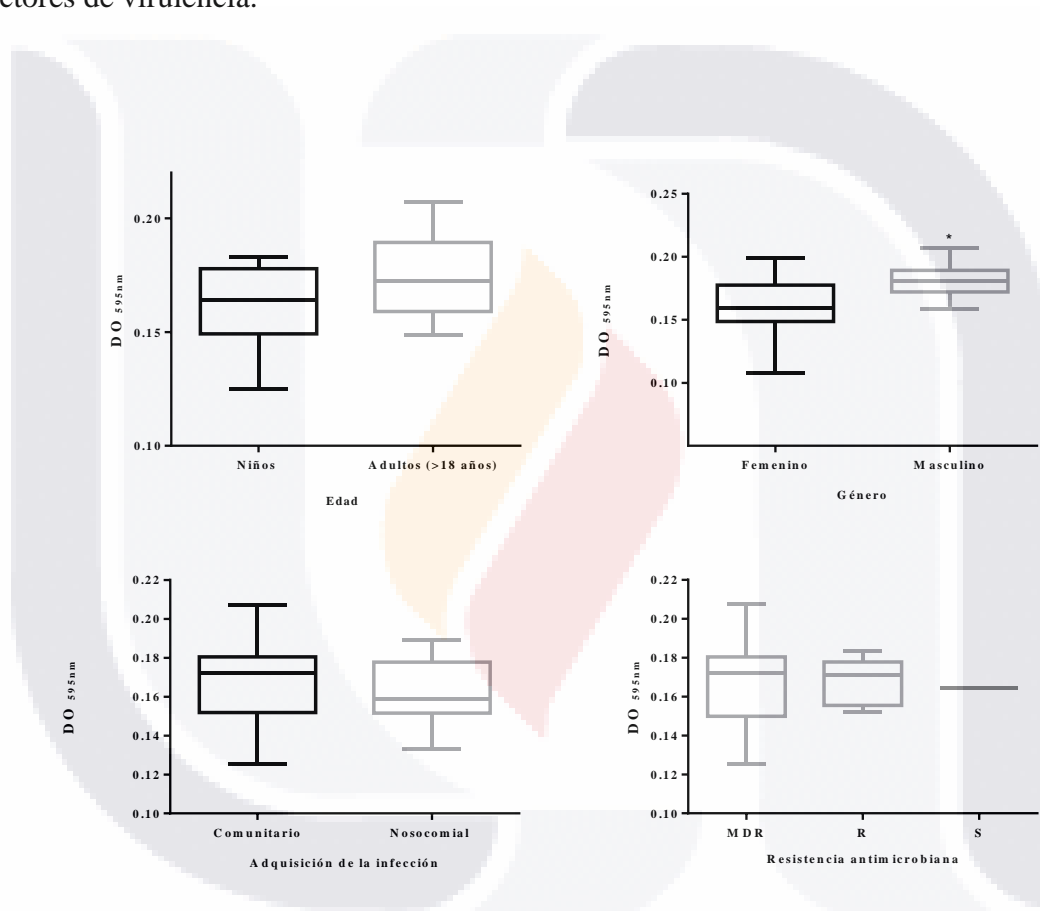


Figura 30. Formación de biopelículas de acuerdo al género y edad del hospedero, así como a la adquisición de la infección y patrones de resistencia antimicrobiana. Se encontró asociación de la formación de biopelícula con el género masculino ($p=0.0301$).

La formación de biopelícula se vió asociada al género masculino ($p=0.0301$), no se encontró asociación en cuanto a la edad del hospedero, la adquisición de la infección y a los patrones de resistencia antimicrobiana (**Figura 30**).

7.7 Obtención del extracto crudo de la toxina alfa hemolisina.

Se obtuvieron extractos totales de los aislados, tanto de las muestras positivas para el gen *hlyA* como para las negativas, y se llevó a cabo la cuantificación del mismo por el método de Bradford (**Figuras 31 y 32**).

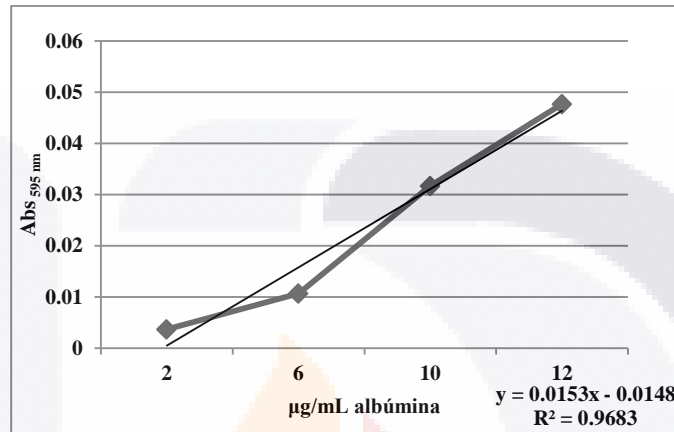


Figura 31. Curva de calibración con albúmina sérica bovina (ABS) para cuantificación de proteínas por el método de Bradford.

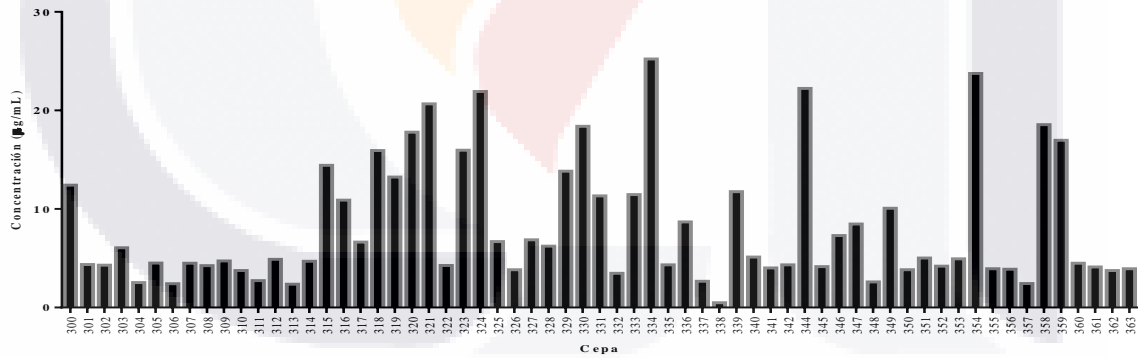


Figura 32: Cuantificación de proteína de los extractos totales de los aislados clínicos.

Los extractos crudos de los aislados presentaron en promedio 8.21 µg/mL (± 6.28 µg/mL) de proteína. En la **figura 33** se observa el patrón de bandas obtenido en el análisis mediante SDS-PAGE para las muestras positivas para el gen *hlyA*. En el gel se presentan otras bandas, dado que es un extracto total y la toxina no fue purificada.

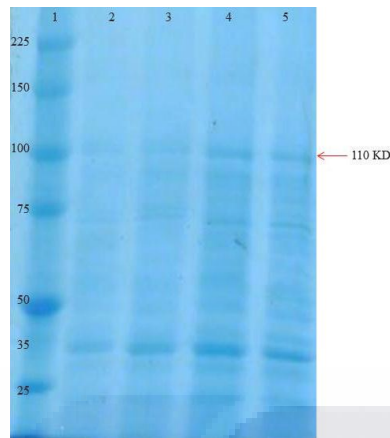


Figura 33: SDS-PAGE en poliacrilamida 30%. Carril 1: marcador de peso molecular de 250 kDa; y carriles 2 a 5: cepas positivas para el gen *hlyA*. La flecha indica la presencia de bandas a 110 kDa, peso molecular de la toxina alfa-hemolisina.

7.7.1 Determinación de la actividad hemolítica y citotóxica del extracto crudo de la toxina alfa-hemolisina.

La α -Hemolisina (*hlyA*) es una de las toxinas secretadas por UPEC, la cual es formadora de poros y presenta actividad lítica contra los eritrocitos, incluyendo también citotoxicidad hacia otros tipos de células nucleadas (células inmunes, endoteliales y epiteliales en el tracto urinario). Clínicamente, las cepas hemolíticas de UPEC están relacionadas con infecciones hemorrágicas y pielonefritis, además de ser asociadas con una fuerte respuesta proinflamatoria. Por otro lado, las cepas persistentes de UPEC reportan la frecuencia de esta toxina (Lüthje and Brauner, 2014).

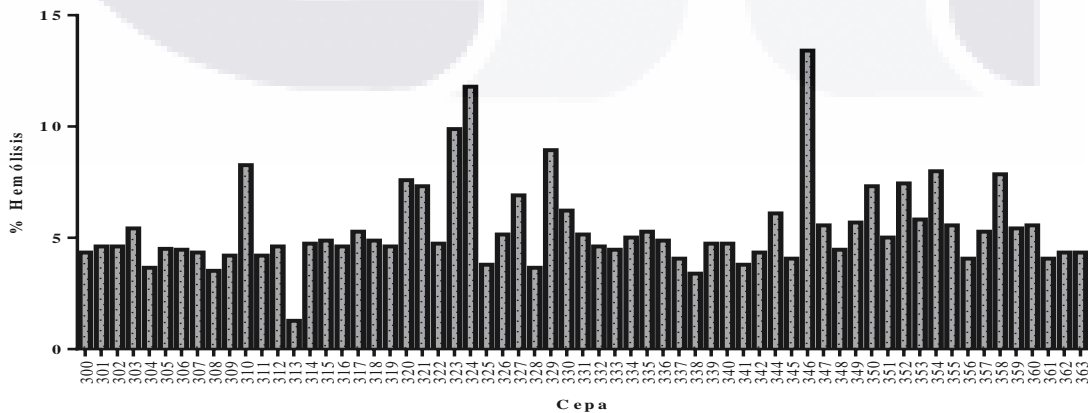


Figura 34: Resultados del ensayo de hemólisis del extracto crudo de la toxina de los aislados clínicos.

Los aislados presentaron en promedio 5.41% (± 1.96 %) de actividad hemolítica (**Figura 34**); según un estudio realizado por Everett y colaboradores (1971), para concentraciones de eritrocitos de oveja al 1 y 2% se observó una hemólisis de 10 y 15%, respectivamente.

Se encontró que 74.60% de los aislados presentó actividad citotóxica, con valores de hasta 87.49% (cepa 316); mientras que 25.39% de las cepas que no presentaron actividad citotóxica (**Figura 35**). En general, se observó mayor actividad citotóxica que hemolítica, sin embargo, no se encontró asociación entre la presencia de la toxina alfa-hemolisina y la actividad hemolítica ($p=0.1619$) o citotóxica ($p=0.6686$).

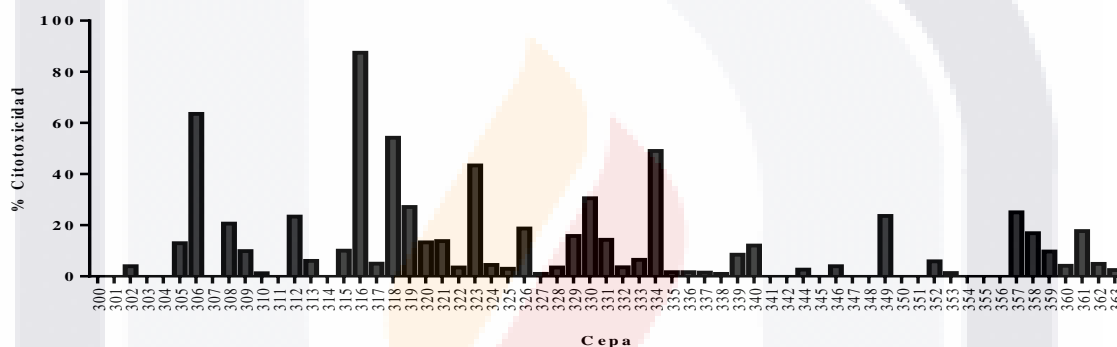


Figura 35: Resultados del ensayo de citotoxicidad del extracto crudo de la toxina de los aislados clínicos. Citotoxicidad 0 para las cepas 300, 301, 303, 304, 311, 314, 341, 342, 345, 347, 348, 350, 351, 354, 355 y 356.

Dado que es un extracto crudo, se realizó la posible asociación entre la actividad citotóxica y hemolítica con la presencia de *cnf1*, toxina encontrada en mayor proporción a *hlyA*, sin embargo no se encontró asociación con la presencia o ausencia de los genes *hlyA* y *cnf1* (**Figura 36**) ($p=0.9998$).

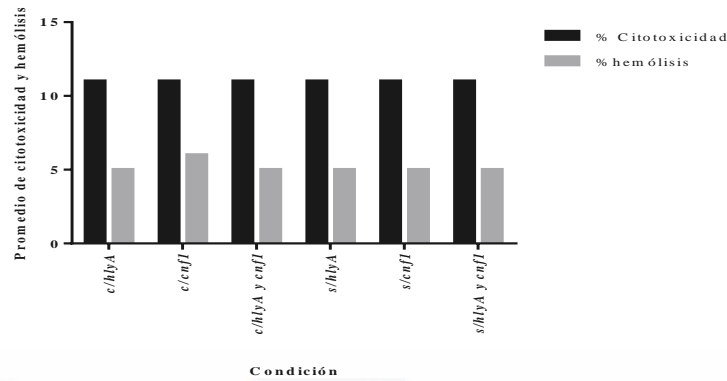


Figura 36: Análisis de la presencia o ausencia de los genes *hlyA* y *cnfI* respecto a su actividad hemolítica o citotóxica ($p=0.9998$).

E. coli uropatógena contiene otros factores de virulencia citotóxicos que pueden irrumpir en los tejidos y causar infecciones urinarias más severas y que en este estudio no fueron determinadas, sin embargo podría proponerse la presencia de otras toxinas como nuevos marcadores en el estudio de las infecciones urinarias causadas por *E. coli* en la población de Aguascalientes como lo son: *Sat* (toxina autotransportadora secretada) que causa alteraciones en las proteínas del citoesqueleto, común en cepas pielonefríticas y sepsis y *PicU*, proteína involucrada en la colonización intestinal presente en aproximadamente 50% de los aislados UPEC que causan cistitis y pielonefritis, entre otras (Welch, 2016).

7.8 Análisis comparativo de las características de las cepas ambientales y las cepas uropatógenas.

Dado que ya se han identificación cepas patógenas de *E. coli* extraintestinales en el río San Pedro (Carrasco-Rosales *et al.*, 2008, datos sin publicar; Guzmán-Colis *et al.*, 2011; Ramírez- Castillo *et al.*, 2013), con características de droga y multi-droga resistencia, en este trabajo se llevó a cabo la comparación de la carga virulenta, la susceptibilidad antimicrobiana y la capacidad de formar biopelícula de los aislados ambientales respecto a los aislados clínicos de pacientes con ITUs, ya que otros estudios han revelado la capacidad

de las cepas ambientales para ser transmitidas al hombre a través de alimentos y agua contaminada así como por el contacto directo con mascotas (Singer, 2015).

7.8.1 Tipo de patógeno.

En los aislados ambientales se detectó que solo el 31.03% de cepas pertenece a la categoría ExPEC, mientras que para los aislados clínicos fue de 87.30% (**Figura 37, A**), existiendo una asociación entre el origen de la cepa y su clasificación ($p < 0.001$), dado que las cepas clínicas previamente generaron una infección. Cabe destacar que la presencia de cepas ExPEC en el ambiente es importante ya que son vectores para la diseminación de genes de resistencia a antimicrobianos por su capacidad de colonizar el intestino del hombre y de animales, así como por su capacidad para vivir en ambientes no hospederos (Biswal *et al*; 2014).

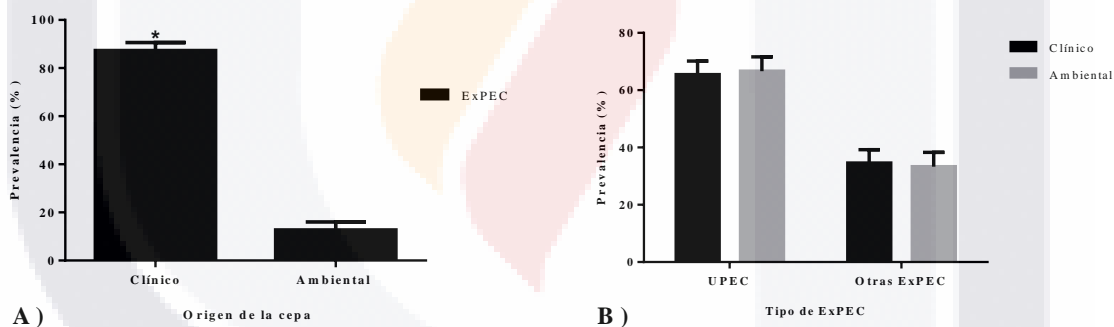


Figura 37. A) Prevalencia del tipo de *E. coli* de acuerdo al origen de la cepa ($p < 0.001$). B) Prevalencia del tipo de ExPEC de acuerdo al origen de la cepa ($p = 0.94$).

Según Biswal y colaboradores (2014), las descargas de aguas residuales aumentan la población de microorganismos patógenos así como la resistencia a los agentes antimicrobianos, donde éstos últimos no son eliminados en las plantas de tratamiento, y que el patotipo de *E. coli* más comúnmente encontrado es UPEC, sin embargo en este estudio la prevalencia de UPEC en el ambiente fue relativamente baja (13.79%), mientras que la presencia de cepas UPEC clínicas fue de 57.14 % (**Figura 37, B**), no se encontró diferencia entre el origen de la cepa y la denominación UPEC ($p = 0.94$), indicando que las cepas

patógenas presentes en el río San Pedro y las causantes de ITUs son similares en carga patogénica.

7.8.2 Comparación de los factores de virulencia.

Los aislados ambientales presentaron un promedio significativamente menor de factores de virulencia (1.9 ± 1.4 factores de virulencia) que las cepas clínicas (4.75 ± 2.2) ($p < 0.0001$) (Figura 38, A).

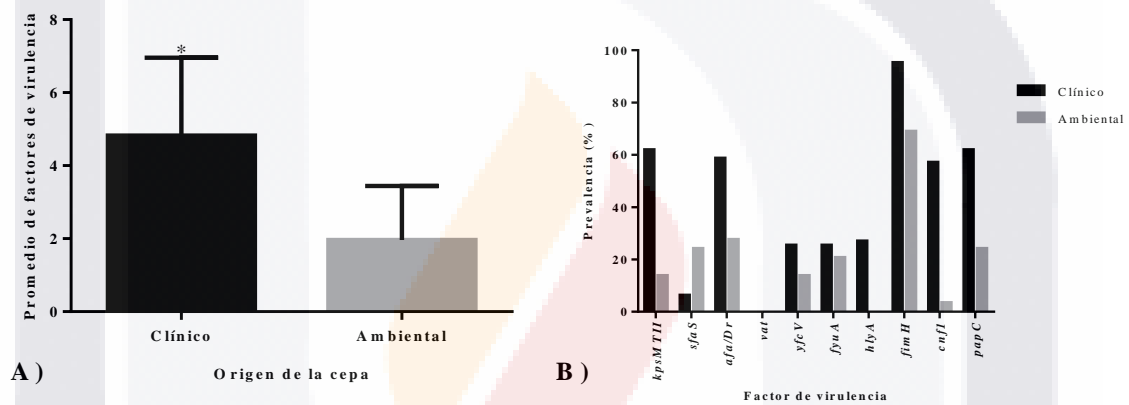


Figura 38. A) Promedio de los factores de virulencia de las cepas clínicas y ambientales. * Indica que la media de los factores de virulencia de las cepas clínicas es mayor a las cepas ambientales ($p < 0.0001$). B) Prevalencia de los factores de virulencia de las cepas clínicas y ambientales.

El gen de mayor prevalencia en las cepas ambientales y clínicas es *fimH* (68.96%), sin embargo no es una característica exclusiva de UPEC, pero si lo es en general para las cepas ExPEC (Momtaz *et al.*, 2013). Se observó la ausencia del gen *vat* tanto para aislados clínicos como para los ambientales, así como *hlyA* ausente en cepas ambientales.

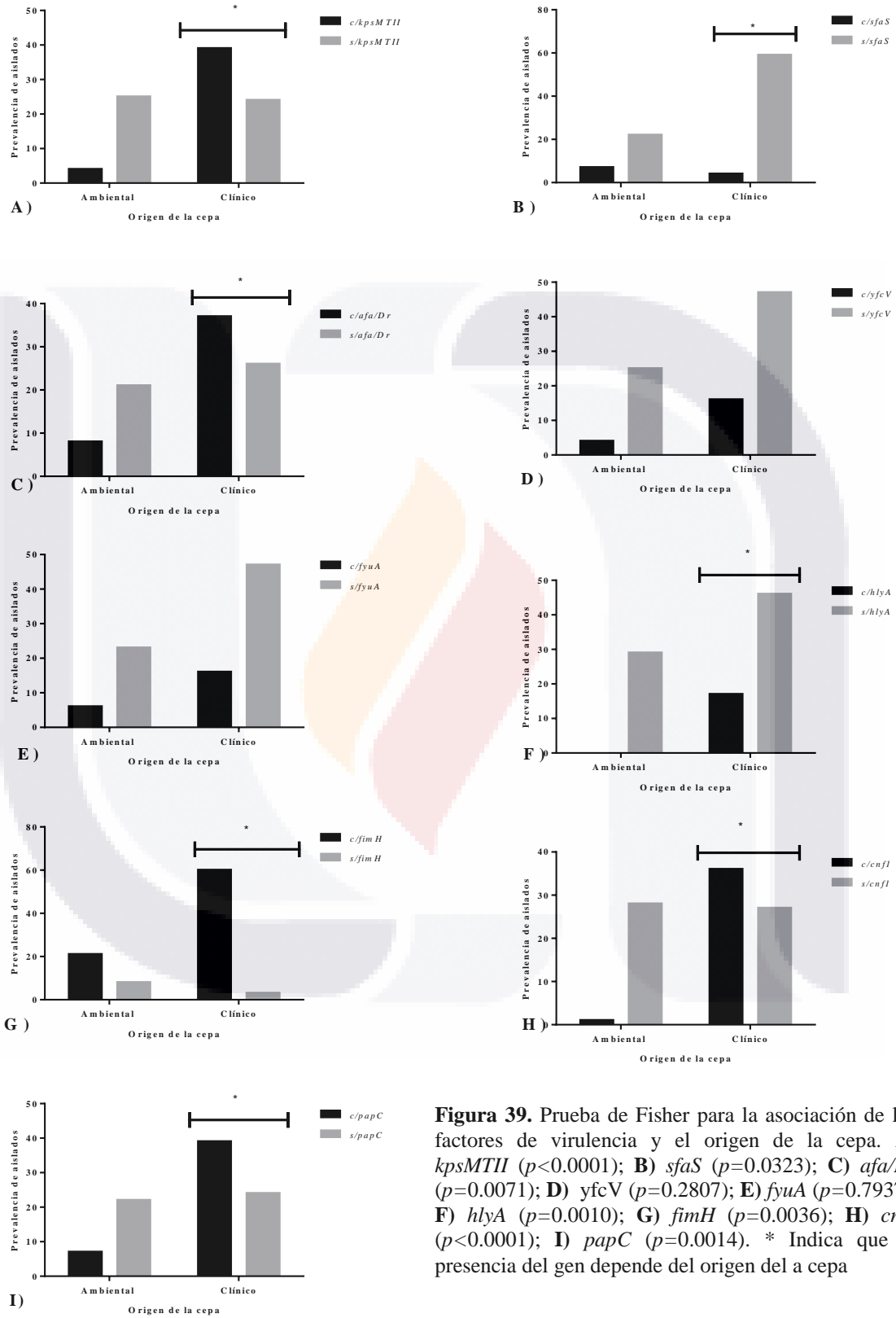


Figura 39. Prueba de Fisher para la asociación de los factores de virulencia y el origen de la cepa. **A)** *kpsMTII* ($p < 0.0001$); **B)** *sfaS* ($p = 0.0323$); **C)** *afa/Dr* ($p = 0.0071$); **D)** *yfcV* ($p = 0.2807$); **E)** *fyuA* ($p = 0.7937$); **F)** *hlyA* ($p = 0.0010$); **G)** *fimH* ($p = 0.0036$); **H)** *cnfI* ($p < 0.0001$); **I)** *papC* ($p = 0.0014$). * Indica que la presencia del gen depende del origen de la cepa

La prueba de Fisher reveló que la mayoría de los genes dependen del origen de la cepa (**Figura 39**), coincidiendo que los aislados clínicos presentan mayor número de factores de virulencia que los aislados ambientales (**Figura 38**).

7.8.3 Susceptibilidad antimicrobiana.

Para comparar esta característica, se seleccionaron únicamente las cepas evaluadas para el mismo antibiótico y se encontró que los aislados ambientales presentaron resistencia a 3 de 8 antibióticos evaluados (37.5%), entre los que se encontró la ampicilina (41.38%), trimetoprima/sulfametoxazol (37.93%) y ceftazidima (37.93%), y en comparación con los aislados clínicos también se presentó resistencia para los mismos antibióticos (ampicilina 85.20%, trimetoprima/sulfametoxazol 55.60% y ceftazidima 36.50%), por lo que los aislados clínicos comparten características de resistencia con al menos tres antibióticos respecto a los aislados clínicos.

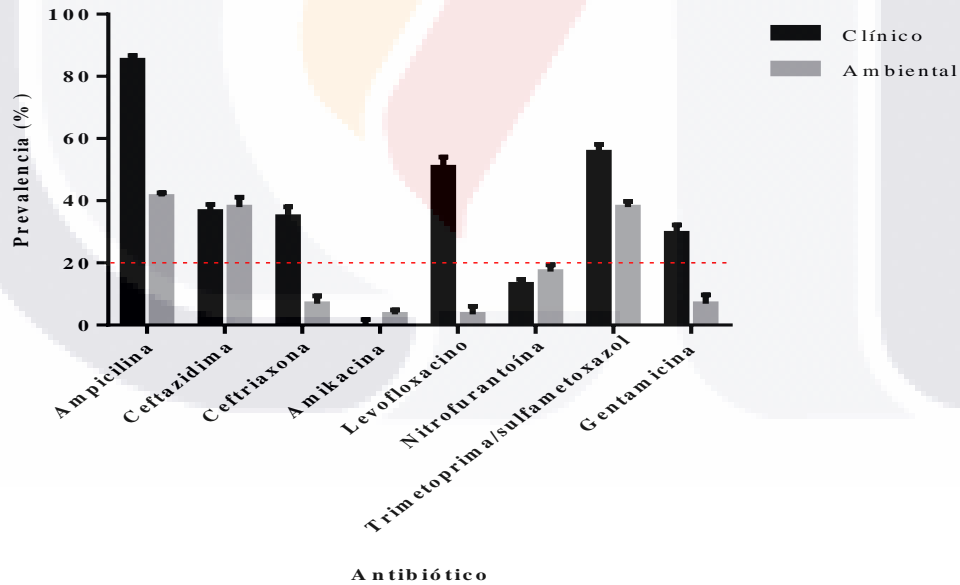


Figura 40. Susceptibilidad antimicrobiana de los aislados clínicos y ambientales por antibiótico. La línea punteada representa el punto de corte para los antibióticos en México ($\leq 20\%$).

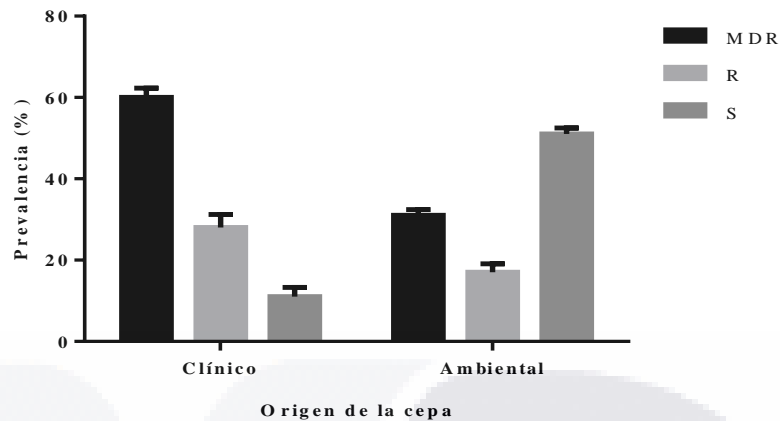


Figura 41. Prevalencia de cepas MDR, R y S de los aislados clínicos y ambientales. MDR: resistencia a 3 o más antibióticos distintos; R: resistencia a 1 ó 2 antibióticos distintos; S: sensibles.

Por otra parte se observó que las cepas clínicas presentaron mayor prevalencia de multi-drogo resistencia y resistencia que las cepas ambientales, y por el contrario, la cantidad de cepas sensibles fue mayor en aislados ambientales que en cepas clínicas y se encontró asociación significativa al origen de la cepa (**Figura 41**).

Los antibióticos son algunas de las sustancias farmacológicamente activas que están presentes en agua superficial o subterránea, ya que no son eliminados a través de los procesos convencionales de tratamiento de aguas residuales. Tradicionalmente, la resistencia a antimicrobianos se consideraba un problema clínico, sin embargo se destacan los ambientes no clínicos como un factor importante en la diseminación de genes de resistencia a antibióticos, en el caso de los ambientes acuáticos, dicha diseminación de genes de resistencia es mediada principalmente por la transferencia horizontal de genes (Berglund, 2015).

7.8.4 Capacidad para formar biopelícula por el método de cristal violeta.

Se encontró que los aislados clínicos son en su mayoría formadores de biopelícula (96.15%; **Figura 42**), y se asoció al origen de la cepa ($p < 0.0001$), y además contienen

mínimo 2 factores de virulencia involucrados en la misma *fimH* y *kpsMTII* fue significativamente mayor a *papC* y *fyuA* ($p < 0.0001$) (**Figura 28**).

Por su parte en los aislados ambientales se encontró que 25.58% fueron formadores de biopelícula (**Figura 42**), y a *fimH* como único factor de virulencia (**Figura 43**).

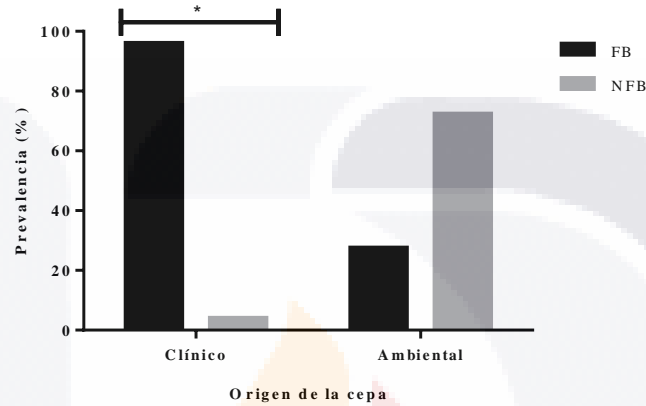


Figura 42. Capacidad para formar biopelículas por el método de cristal violeta de los aislados clínicos y ambientales. FB: cepa formadora de biopelícula; NFB: cepa no formadora de biopelícula. *La formación de biopelícula se asoció al origen de la cepa ($p < 0.0001$).

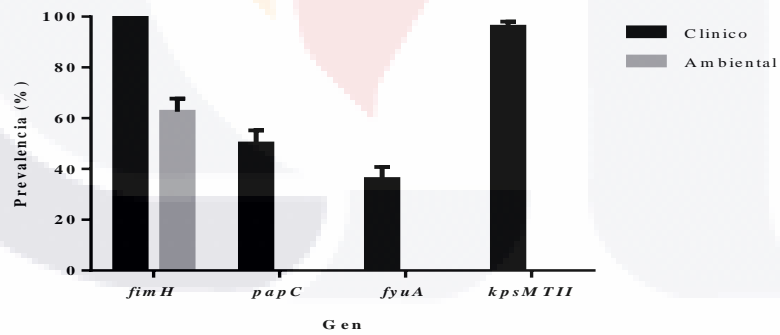


Figura 43. Prevalencia de los factores de virulencia de cepas ambientales y clínicas formadoras de biopelícula.

8. Discusión

Anteriores estudios sobre la contaminación microbiológica del río San Pedro en Aguascalientes determinaron altos niveles de contaminación fecal y de materia orgánica e inorgánica que predisponen el crecimiento de microorganismos resistentes y multi-drogo resistentes capaces de causar daños a la salud del hombre y de los animales, además del hallazgo de cepas virulentas de *E. coli*, tanto InPEC como ExPEC (Ramírez-Castillo *et al.*, 2013), dónde el grupo ExPEC es de los patógenos más importantes causales de infecciones extraintestinales (Millán *et al.*, 2014), donde las infecciones del tracto urinario es la causa más común (después de las infecciones respiratorias) de visitas al médico a nivel mundial, afectando a hombres y mujeres de todas las edades (Tabasi *et al.*, 2015; Vollmerhausen *et al.*, 2014; Momtaz *et al.*, 2013).

En México existen pocos estudios que informen de la prevalencia y características de UPEC en las infecciones del tracto urinario en su población (Paniagua-Contreras *et al.*, 2016; López-Banda *et al.*, 2014; Páramo-Rivas *et al.*, 2014; Arredondo-García *et al.*, 2007; Calderón-Jaimes *et al.*, 2013; Hernández-Porras *et al.*, 2004), en Aguascalientes, es el primer estudio que muestra la distribución y prevalencia de las ITUs en personas de ambos géneros y de todas las edades, en el que se llevó a cabo la caracterización del agente causal de las infecciones urinarias, se determinó la susceptibilidad antimicrobiana, se evaluó su capacidad para formar biopelículas, así como la obtención de un extracto crudo para probar la actividad hemolítica y citotóxica de la toxina *hlyA* ya que un análisis de una colección de cepas de una región en particular es útil para correlacionar la virulencia y resistencia antibacteriana con las tendencias locales en el uso y/o consumo de antibióticos y productos de origen animal (Piatti, 2008); finalmente y ya que se conocen las características de aislados ambientales de *E. coli* del río San Pedro, se compararon las características de los aislados clínicos con los aislados ambientales.

Se analizaron 64 cepas aisladas de hombres y mujeres de 0 a 94 años, con infección del tracto urinario, adquirida en la comunidad o en el hospital. Se determinó que 98.43% de los aislados son cepas de *E. coli*, coincidiendo con otros estudios que indican que *E. coli* es el

principal agente causal de ITUs (Subashchandrabose & Mobley, 2015). Se encontró que las ITUs son más frecuentes en el género femenino y adquiridas en la comunidad (57.14%) y según Subashchandrabose y Mobley (2015) se atribuye principalmente a diferencias anatómicas (menor longitud de la uretra y la corta distancia entre el ano y apertura uretral en las mujeres); y la población más susceptible son los niños de 0 a 10 años y los adultos mayores de 51 años.

El patotipo UPEC fue encontrado en mayor proporción (57.14%) (Firoozeh *et al.*, 2014; Cegelski *et al.*, 2008), aunque los patotipos de *E. coli* en su mayoría son designados por el origen de su aislamiento, en este estudio se determinó a UPEC por la presencia de *papC*, gen que codifica para una proteína de la membrana externa encargada de formar la plataforma para la biogénesis de la fimbria tipo P exclusiva de UPEC y comúnmente asociado a cepas pielonefríticas (Rahdar *et al.*, 2015),

Mediante la distribución de los aislados en los grupos filogenéticos se encontró que las cepas ExPEC pertenecen mayormente al grupo B2 (28.57%, **Figura 16**) principal filogrupo que alberga a las cepas ExPEC y además es el grupo más virulento (6.5 ± 1.94 factores de virulencia) coincidiendo con Piatti y colaboradores (2008), mientras que 12.69% de las cepas fueron distribuidas en el filogrupo D, el cuál alberga en menor medida a cepas ExPEC. Sin embargo, se observó la distribución de las cepas en el resto de los filogrupos, lo que sugiere que además de la presencia de cepas ExPEC, el tracto gastrointestinal es reservorio de cepas que pueden ser capaces de colonizar el tracto urinario (López-Banda *et al.*, 2014).

Respecto a la prevalencia de los factores de virulencia de los aislados clínicos en general presentaron 4.75 ± 2.2 factores de virulencia y el patrón de mayor prevalencia fue *fimH-kpsMTII-chuA* (52.38%), Las cepas clasificadas como UPEC presentaron un promedio significativamente mayor de factores de virulencia (5.6 ± 2.8) (**Figura 15**), la adhesina de mayor prevalencia fue *fimH* (95.2%) y contrario a lo reportado por Paniagua-Contreras y colaboradores (2017), un estudio realizado en la Cd. de México en hombres y mujeres en un rango de edad de 20 a 74 años, con infecciones del tracto urinario únicamente adquiridas en la comunidad, el factor de virulencia con mayor prevalencia fue

la adhesina de sideróforo *iha* (64.94%). La elevada prevalencia de *fimH* es de gran importancia ya que dicha adhesina fimbrial está involucrada en el desarrollo de comunidades bacterianas intracelulares (CBIs) y en la formación de biopelículas en soportes biológicos e inertes (Flores-Mireles *et al.*, 2016).

La expresión de toxinas en UPEC puede causar daño a los tejidos del huésped, facilitando la diseminación bacteriana, así como la liberación de nutrientes del huésped y las células efectoras inmunitarias (Lüthje and Brauner, 2014), en este estudio la toxina de mayor prevalencia fue *cnfI*, contrario a Paniagua-Contreras y colaboradores (2016), donde la toxina de mayor prevalencia fue *usp* (proteína uropatógena específica), y la toxina *vat* no fue detectada; por otra parte, diversos estudios reportan que la toxina *hlyA* como la de mayor prevalencia (Lüthje and Brauner, 2014; García *et al.*, 2013; Bien *et al.* 2011; Herlax *et al.*, 2010); sin embargo, en este estudio se encontró en menor proporción (27.42%) por lo que puede no ser un factor de virulencia asociado a las ITUs para la población de Aguascalientes.

Por otra parte, la obtención del extracto crudo de la toxina *hlyA* y la posterior evaluación de la actividad hemolítica y citotóxica, se observó un promedio de 5.41% de hemólisis y hasta 87.49% de actividad citotóxica sobre células endoteliales, sin embargo no se encontró una asociación entre la presencia de la toxina alfa-hemolisina y la actividad hemolítica y/o citotóxica, y ya que es un extracto crudo también se realizó el análisis de dicha actividad con la posible presencia de la toxina *cnfI*, sin encontrarse asociación, por lo que se propone para posteriores estudios la purificación de la toxina *hlyA*, así como la evaluación de otras toxinas que pueden estar presentes en ITUs como son: *Sat* (toxina autotransportadora secretada) que causa alteraciones en las proteínas del citoesqueleto, común en cepas pielonefriticas y sepsis; y *PicU*, proteína involucrada en la colonización intestinal presente en aproximadamente 50% de los aislados UPEC que causan cistitis y pielonefritis entre otras (Welch, 2016).

Desde la década de 1990 ya se había reportado la resistencia de cepas ExPEC a antimicrobianos como las cefalosporinas, fluoroquinolonas y TMP-SMX que son comúnmente utilizados para el tratamiento de infecciones extraintestinales causadas por *E.*

coli, complicando el tratamiento, retrasándolo y aumentando la morbilidad y mortalidad (Pitout, 2012), en este estudio los aislados presentaron resistencia a 12 de 17 antibióticos evaluados, principalmente a aquellos de primera línea utilizados para el tratamiento de ITUs en México según Calderón-Jaimes y colaboradores (2013). (ampicilina: 85.2%, ampicilina/sulbactam 71.4% y TMP-SMX: 55.6% en este estudio) y fue similar a los reportado por Paniagua-Contreras y colaboradores (2016) incluso para ceftriaxona y gentamicina, mientras que para la nitrofurantoína en este estudio se encontró sensibilidad de 12.9%, Paniagua-Contreras (2016), encontró una resistencia mayor (44.8%). El patrón de resistencia observado fue ampicilina-ampicilina/sulbactam en el 68.25% de los aislados clínicos.

Se detectó resistencia del 50% para las fluoroquinolonas (**Figura 17**), antibióticos de primera línea utilizados para el tratamiento de ITUs (Calderón-Jaimes *et al.*, 2013), evaluadas en este estudio (ciprofloxacino y levofloxacino), similar a lo reportado por López-Banda y colaboradores (2014), en otro estudio realizado en aislados de *E. coli* de mujeres con ITU en la ciudad de México. Posteriormente detección de genes de resistencia a fluoroquinolonas, indicaron elevada presencia de genes adquiridos por mutación así como por transferencia (**Figura 21A y B**), y además los genes como *aacIb* y *qnrA* que también fueron detectados en este estudio (76.7% y 63.3% respectivamente) son relacionados con la resistencia a otros antibióticos como aminoglucósidos y β -lactámicos (Jacoby *et al.*, 2014). Este estudio coincidió con lo reportado por Piatti y colaboradores (2008) al encontrar una asociación entre la susceptibilidad de las cepas del filogrupo B2 a las fluoroquinolonas (ciprofloxacino y levofloxacino) en relación a los factores de virulencia que presentan (**Figura 22**), donde los aislados con fenotipo resistente presentaron menos factores de virulencia que las cepas con fenotipo sensible, donde una cepa de virulencia reducida invade a pacientes comprometidos y las cepas susceptibles con elevada virulencia afectan a pacientes no comprometidos.

Por otra parte los antibióticos que podrían recomendarse para el tratamiento de las ITUs en Aguascalientes son piperacilina/tazobactam, ertapenem, imipinem, amikacina, y nitrofurantoína (15.6%, 0.3%, 0%, 4.2%, 12.9% respectivamente) al estar por debajo del punto de corte para los antibióticos en México (Calderón-Jaimes *et al.*, 2013).

Se encontró que 61% de las cepas de *E. coli* son multi-drogo resistentes (resistencia a 3 antibióticos distintos), donde el principal factor asociado es el uso indiscriminado de los mismos, tanto en medicina humana como animal (Allocati *et al.*, 2013), sin asociación al género del hospedero (**Figura 19**); mientras que para la adquisición de la infección, el 100% de los aislados de ITUs adquiridas en el hospital son resistentes a los antibióticos evaluados (69.23% multi-drogo resistentes y 30.76% resistentes). Aunque las infecciones urinarias son más comúnmente adquiridas en la comunidad, las infecciones adquiridas en el hospital representan el 40% de todas las infecciones nosocomiales por lo que son un problema costoso y potencialmente mortal para el paciente, además se asocia al uso de catéteres urinarios (Toval *et al.*, 2014; Saint *et al.*, 2008).

Los aislados del filogrupo B2 presentaron la mayor prevalencia de cepas multi-drogo resistentes (83.33%), donde la transferencia de cepas de *E. coli* resistentes a antimicrobianos ocurre a través de los alimentos contaminados (Kazemnia *et al.*, 2014), por lo que el tracto gastrointestinal es reservorio de cepas ExPEC donde no causan daño, y al alcanzar sitios como el tracto urinario causan infección (Biswal *et al.*, 2014).

Los ensayos para la formación de biopelículas, evaluadas en las cepas ExpEC pertenecientes a los filogrupos B2 y D (patógenos extraintestinales con mayor número de determinantes de virulencia), donde la formación de biopelículas está estrechamente relacionado con la patogenicidad de las bacterias al funcionar como una barrera contra el sistema inmune y la tolerancia a múltiples fármacos, así como su asociación con enfermedades infecciosas en el hombre (Hufnagel *et al.*, 2014; Bordi and Bentzmann, 2011); en las ITUs, la formación de biopelícula está asociado a la recurrencia de la misma (Hufnagel *et al.*, 2014), por lo que el ensayo consistió en la evaluación de los principales componentes de la matriz extracelular de *E. coli* y la motilidad flagelar involucrados en la capacidad de la bacteria para formar biopelícula (Cegelski *et al.*, 2009). De los estudios realizados en México, ninguno provee información acerca de la capacidad de aislados de *E. coli* causantes de ITUs para formar biopelículas *in vitro* (Paniagua-Contreras *et al.*, 2016; López-Banda *et al.*, 2014; López-Martínez *et al.*, 2014; Páramo-Rivas *et al.*, 2014; Arredondo-García *et al.*, 2007; Calderón-Jaimes *et al.*, 2013; Hernández-Porras *et al.*, 2004), por lo que este es el primer estudio que brinda información al respecto.

El estudio reveló que 84% de los aislados mostraron presencia de curli, el cual promueve la adhesión bacteriana a las células de mamíferos, células vegetales y superficies inertes (Hunfnagel *et al.*, 2015); 15.4% de los aislados presentaron celulosa que en asociación con el curli, promueven la colonización del hospedero y por lo tanto la supervivencia de la bacteria a distintos entornos (Cegelski *et al.*, 2009); y el 50% de los aislados presentó motilidad flagelar, relacionado con el ascenso de UPEC a través del tracto urinario (Donnenberg, 2013), involucrado también en la formación de biopelículas en soportes inertes (Hufnagel *et al.*, 2015) y contribuye a penetrar la barrera epitelial renal para obtener acceso a la corriente sanguínea (Subashchandrabose and Mobley, 2015).

Por otra parte, los resultados de los ensayos de formación de biopelícula por el método de cristal violeta, donde este tipo de biopelícula depende principalmente de la adhesina fimbrial tipo 1 (*fimH*) (Hufnagel *et al.*, 2015), mostraron que las cepas aisladas de pacientes del género masculino fueron significativamente las mayores formadoras de biopelícula que el género femenino (**Figura 30**); además el 92.3% de los aislados fueron clasificados como poco adherentes, y un aislado fue moderadamente adherente, sin embargo al poseer la capacidad de adherirse, estos patógenos pueden persistir en el tracto urinario causando infecciones recurrentes (Flores-Mireles *et al.*, 2016), además de acuerdo con Novais y colaboradores (2013), se encontró que hay otras adhesinas involucrados en la formación de la misma como son *kpsMTII*, *papC*, *papG* y el sideróforo *fyuA*, que a excepción de *papG*, también fueron determinados en este estudio, encontrándose una prevalencia significativamente mayor de *fimH* y *kpsMTII* (**Figura 29**).

De acuerdo con otros estudios que sugieren la transmisión de infecciones urinarias a través de alimentos y agua contaminada (Singer, 2015; Nordstrom *et al.*, 2013), así como la cercanía del hombre con sus mascotas (Liu *et al.*, 2015), y con el conocimiento de la situación microbiológica del río San Pedro en Aguascalientes, se compraron las características de las cepas clínicas causantes de ITUs con las cepas ambientales caracterizadas por Ramírez-Castillo y colaboradores (2013) ya que considerando que el agua del río San Pedro es utilizada para la irrigación de cultivos y como ingesta de agua para el ganado constituye una fuente de contaminación bacteriana que afecta a los seres humanos y animales que están en contacto directo o indirecto con ella (Ramírez-Castillo *et*

al., 2013) existiendo una alta probabilidad de contraer una infección intestinal o bien una infección del tracto urinario alimenticio o FUTIs por sus siglas en inglés (Singer, 2015).

En este estudio se compararon las características de 29 aislados ambientales de las cuales sólo 31.03% correspondió a cepas ExPEC, sin embargo la presencia de este tipo de patógenos en el ambiente es importante debido a que son vectores para la diseminación de genes de resistencia a antimicrobianos y a su capacidad de colonizar el intestino del hombre y de animales (Biswal *et al.*; 2014). Estas cepas fueron caracterizadas a partir de la presencia de 2 factores de virulencia de acuerdo con Singer (2015). Del grupo de ExPEC encontrado, 67% correspondió al patotipo UPEC, coincidiendo con otros estudios la presencia de cepas ExPEC en el ambiente (Biswal *et al.*, 2014), sin embargo no se observó diferencia entre origen de la cepa (clínica o ambiental) (**Figura 37B**).

Los factores de virulencia implican mecanismos que permiten que las bacterias patógenas causen infecciones. Sin embargo, la presencia de un solo factor rara vez hace que un organismo sea virulento; una combinación de factores de virulencia determinará si una bacteria puede causar o no una infección. Además, el factor determinante no es simplemente la presencia o ausencia de genes asociados a la virulencia, sino también sus niveles de expresión, que pueden variar entre aislados patogénicos y no patogénicos (Pitout, 2012). Bajo estas circunstancias se encontró que 6.34% (4 aislados clínicos) que causaron infección del tracto urinario poseen solo un factor de virulencia de los 11 genes evaluados en este estudio, mientras que las cepas ambientales apenas presentaron un promedio de 1.96 ± 1.47 factores de virulencia, por lo que es necesario llevar a cabo más estudios para determinar el potencial de las cepas ambientales para causar ITUs.

Los aislados ambientales presentaron la mayor prevalencia para *fimH* (66.67%), fundamental en la etapa inicial de la infección y en la formación de biopelículas (Subashchandrabose & Mobley, 2015) el cuál también fue el principal gen reportado en los aislados clínicos, por otra parte, el patrón de virulencia de mayor prevalencia fue *fimH-afa/Dr* (17.24%) y se observó la ausencia de las toxinas *vat* y *hlyA*, que contrario a los aislados clínicos, únicamente la toxina *vat* no fue identificada.

Se encontró que la mayoría de los genes evaluados para cepas ExPEC dependen del origen de la cepa (origen clínico), excepto para los genes *fyuA* y *yfcV*, los cuáles son llamados genes predictores asociados a la presencia de otros genes de virulencia (Spurbeck *et al.*, 2012), aunque estos últimos fueron encontrados en baja proporción (20.7% y 13.8% respectivamente), se encontró un asilado ambiental que contiene ambos genes y además es la cepa más virulenta (con 7 factores de virulencia).

Respecto a la susceptibilidad antimicrobiana se encontró que los aislados ambientales presentaron resistencia para ampicilina, TMP-SMX, y ceftazidima, mismos para los cuáles los aislados clínicos presentaron resistencia, por lo tanto, aunque los aislados ambientales presentan menos factores de virulencia, su resistencia antibacteriana podrían repercutir en huéspedes comprometidos (Piatti *et al.*, 2008).

Por otra parte, los resultados de formación de biopelícula mostraron que las cepas ambientales tienen la capacidad para formar biopelícula aunque en menor proporción que los aislados clínicos (25.58% y 96.15% respectivamente), y que depende de la adhesina fimbrial *fimH*, sin embargo esta capacidad de adherirse debe ser considerada puesto que está asociado con infecciones recurrentes (Flores-Mireles *et al.*, 2016).

Aunque los aislados clínicos y los ambientales comparten características de factores de virulencia, resistencia a antimicrobianos y capacidad para formar biopelícula es necesario llevar a cabo otro tipo de estudios para determinar el potencial de los aislados ambientales para causar infecciones del tracto urinario en la población de Aguascalientes, entre las metodologías propuestas por otros autores se encuentra realizar un análisis de riesgo que permita establecer cuál podría ser la población más susceptible y evaluar el impacto de manera tal que pueda prevenirse, además existen los modelos *in vivo* de infecciones urinarias en modelos animales y cultivos celulares (Nielsen *et al.*, 2014; Bashir *et al.*, 2012), así como técnicas moleculares como la tipificación multilocus de secuencias (multilocus sequence typing, MLST) para la caracterización inequívoca de aislamientos de bacterias, el cual ya ha sido utilizado para demostrar similitudes entre aislados de *E. coli* causante de ITUs entre el hombre y sus mascotas como perros y gatos (Liu *et al.*, 2015),

9. Conclusiones

El principal agente causal de las infecciones urinarias fue *Escherichia coli* uropatógena (57.14%).

Las infecciones urinarias son mayormente adquiridas en la comunidad afectando principalmente al género femenino (57.14%).

Las poblaciones más susceptibles son los niños de 0 a 10 años y adultos mayores de 51 años.

Los aislados clínicos pertenecen principalmente el filogrupos B2 y en menor proporción al filogrupos D, además contienen mayor carga de factores de virulencia y la mayor prevalencia de cepas multi-drogo resistentes.

El patrón de factores de virulencia más común asociado a las infecciones urinarias en el estado fue *fimH-kpsMTII-chuA*.

La toxina *hlyA* no es un factor de virulencia que determine la frecuencia de las infecciones urinarias en la población de Aguascalientes.

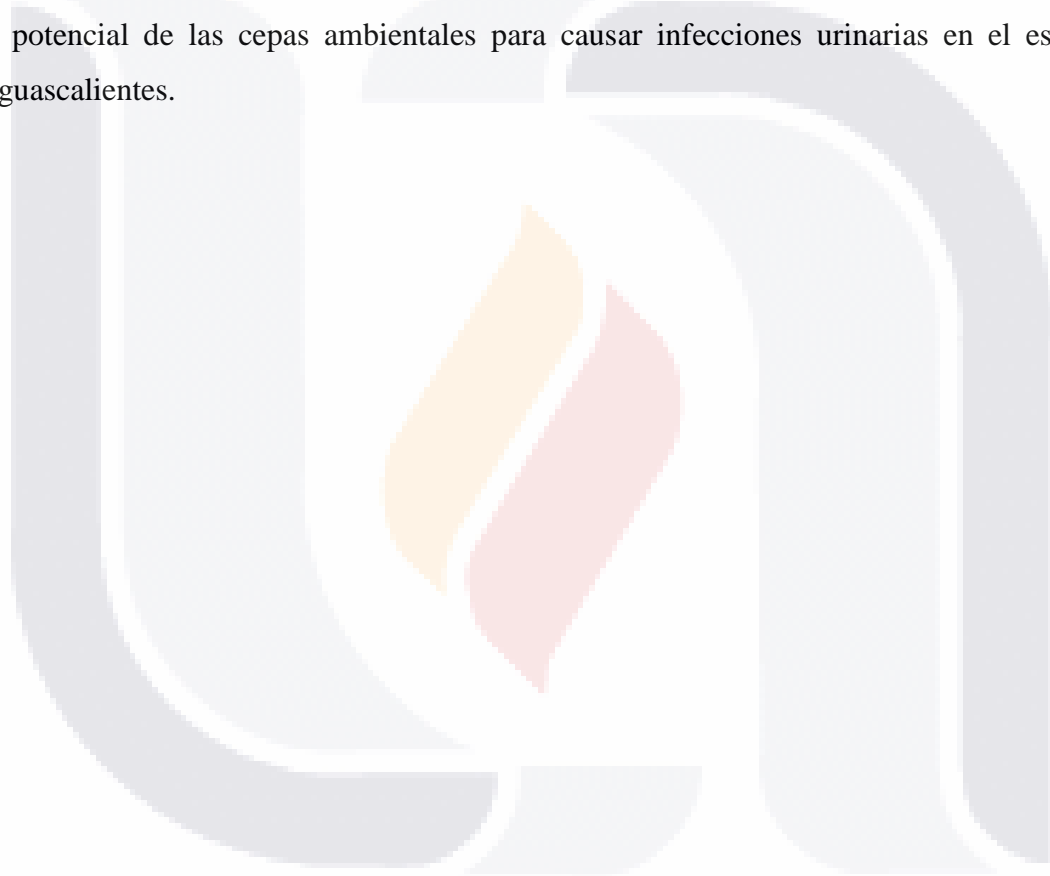
La elevada resistencia a los agentes antimicrobianos de primera línea para el tratamiento de infecciones urinarias en el estado debe ser considerado para la búsqueda de terapias alternativas y efectivas, para lo cual es recomendable realizar siempre antibiograma.

La alta prevalencia de genes asociados a la resistencia a fluoroquinolonas también está relacionada con resistencia a los aminoglucósidos como la amikacina.

Los aislados clínicos del filogrupos B2 y D por sus características fenotípicas de formación de biopelícula poseen la capacidad de sobrevivir a entornos hospederos y no hospederos y pueden estar involucrados en la recurrencia de infecciones urinarias, fallo en el tratamiento antimicrobiano y asociarse a infecciones por el uso catéteres urinarios.

La presencia de cepas ExPEC en el agua de río San Pedro en Aguascalientes, por sus características de resistencia a antibióticos son un riesgo para la diseminación de genes de resistencia y por su capacidad de formación de biopelícula pueden colonizar el intestino del hombre y de los animales.

Los aislados ambientales comparten características de factores de virulencia, resistencia a antimicrobianos y capacidad de formar biopelículas con respecto a los aislados clínicos, sin embargo es necesaria la implementación de otras metodologías para determinar el potencial de las cepas ambientales para causar infecciones urinarias en el estado de Aguascalientes.



10. Glosario

Biopelícula: comunidades multicelulares, compuestas de células bacterianas embebidas en una matriz extracelular (compuesta en general por DNA extracelular, productos de desecho y polímeros de carbohidratos).

Patotipo: grupos de microorganismos que tienen características, factores de virulencia y sintomatología clínica comunes.

Filogrupo: poblaciones que representan clados intraespecíficos que pueden ser identificados genéticamente y representan linajes recíprocamente monofiléticos, generalmente sobre la base del ADN mitocondrial.

Toxina: sustancias venenosas producidas por ciertos microorganismos y a menudo representan el factor que más contribuye a las propiedades patogénicas de dicho organismo.

Resistencia bacteriana: cuando los microorganismos sobreviven a una concentración de antibiótico mayor a que se puede alcanzar *in vivo*.

Susceptibilidad: consiste en estudios *in vitro* donde se enfrentan bacterias con antimicrobianos para obtener la concentración mínima inhibitoria y la resistencia antimicrobiana.

Potencial patogénico: cantidad de daño producido por un microorganismo sobre el hospedero.

11. Referencias bibliográficas

1. Abraham, S., Chapman, T.A., Zhang, R., Chin, J., Mabbet, A.N., Totsika, M., and Shembri, M.A. (2011). Molecular characterization of *Escherichia coli* strains that cause symptomatic and asymptomatic urinary tract infections. *Journal of clinical Microbiology* 50, 1027-1030.
2. Al-Badar, A., and Al-Shaikh, G. (2013). Recurrent urinary tract infections management in woman. *Sultan Qaboos University Medical Journal*.13, 359-367.
3. Allocati, N., Masulli, M., Alexeyev, M.F., and Di Llio, C. (2013). *Escherichia coli* in Europe: an overview. *Int J Environ Res Public Health*. 10, 6235-6254.
4. Antão E.M., Wieler, L.H., and Ewers, C. (2009). Adhesive threads of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Pathog*.1, 1-12.
5. Aoike, N., Saga, T., Sakata, R., Yoshizumi, A., Kimura, S., Iwata, M., Yoshizawa, S., Sugazawa, Y., Ishii, Y., Yamaguchi, K., and Tateda, K.(2013) Relationship between sequence types and mutation patterns of quinolone resistance-determining regions analyzed by pyrosequencing. *Journal of Clinical Microbiology*. 51, 1692-1698.
6. Arredondo-García, J.L., Soriano-Becerril, D., Solórzano-Santos, F., Arbo-Sosa, A., Coria-Jiménez, R., and Arzate-Barbosa, P. (2007). Resistance of Uropathogenic bacteria to first-line antibiotics in Mexico City: a multicenter susceptibility analysis. *Current Therapeutic Research*. 68, 120-126.
7. Baker, K.S. (2015). Demystifying *Escherichia coli* patovars. *Nature Reviews, Microbiology* 13, 5.
8. Barber, A.E., Norton, J.P., Spivac, A.M., and Mulvey M.A. (2013). Urinary Tract Infections: Current and Emerging Management Strategies. *Clinical Practice* 57, 719-724.
9. Berglund, B. (2015). Environmental dissemination of antibiotic resistance genes and correlation to anthropogenic contamination with antibiotics. *Infect Ecol Epidemiol*. 5, 1-10.
10. Bien, J., Sokolova, O., and Bozko, P. (2011). Role of Uropathogenic *Escherichia coli* factors in development of urinary tract infection and kidney damage. *International Journal of Nephrology*. 2012, 1-15.
11. BiomedTracker. (2014). Drugs, bugs & the patients who get them. *Inc. and Tucker BioPharma Consulting* 1-44.
12. Biswal, B.K., Khairallah, R., Bibi, K., Mazza, A., Gehr, R., Masson, L., and Frigon, D. (2014). Impact of UV and peracetic acid disinfection on the prevalence of virulence and antimicrobial resistance genes in uropathogenic *Escherichia coli* in wastewater effluents. *Appl Environ Microbiol*. (12), 3656-3666.
13. Biswas, B., Bhushan, S., Rajesh, A., Suraj, S.K., Lu, Y., Meinhardt, A., and Yenugu, S. (2014). Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) induced antimicrobial gene expression in the male reproductive tract of rat: evaluation of the potential of defensin 21 to limit infection. *Andrology*. 1-8.

14. Brumbaugh, A.R., and Mobley, L.T. (2012). Preventing urinary tract infection: progress toward an effective *Escherichia coli* vaccine. *National Institutes of Health* 11, 663-676.
15. Cabral, J.P.S. (2010). Water microbiology. Bacterial pathogens and wáter. *Int J Environ Res Public Health*. (10), 3657-3703.
16. Calderón-Jaimes, E., Casanova-Román, G., Galindo-Fraga, A., Gutiérrez-Escoto, P., Land-Juárez, S., Moreno-Espinoza, S., Rodríguez-Covarrubias, F., Simón-Pereira, L., y Valdez-Vázquez, R. (2013). Diagnóstico y tratamiento de las infcciones en vías urinarias: un enfoque multidisciplinario para casos no complicados. *Bol Med Hops Infant Mex*. (1), 3-10.
17. Cegelski, L., Pinkner, J.S., Hammer, N.D., Cusumano, C.K., Hung, C.S., Chorell, E., Åberg, V., Walker, J.N., Seed, P.C., Almqvist, F., Chapman, M.R., and Hultgren, S.J. (2009). Small-molecule inhibitors target *Escherichia coli* amyloid biogenesis and biofilm formation. *Nat Chem Biol*. 5, 913-919.
18. Chambless, J.D., Hunt, S.M., and Stewart, P.S. (2006). A three-dimensional computer model of four hypothetical mechanisms protecting biofilms from antimicrobials. *Appl Environ Microbiol*. 72, 2005-2013.
19. Charbonneau, A., Novakowski, K., and Ross, N. (2006). The effect of a biofilm on solute diffusion in fractured porous media. *J Contam Hydrol* 85, 212-228.
20. Chen, X., Zhang, W., Pan, W., Yin, J., Pan, Z., Gao, S., Jiao, X. (2012). Prevalence of *qnr*, *aac(6')-lb-cr*, *qepA*, and *oqxAB* in *Escherichia coli* isolates from humans, animals, and the environment. *AAC Journals ASM.org*. 56, 3423-3427.
21. Clermont, O., Christenson, J.K., Denamur, E., and Gordon, D.M. (2013). The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environmental Microbiology Reports* 5, 58-65.
22. Croxen, M.A., and Finlay B.B. (2010). Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature Review Microbiology*. 8, 26-38.
23. Donnenberg, M.S. (2013). *Escherichia coli*, pathotypes and principles of pathogenesis. 2nd. Editon. Academic Press. USA. 212 pp
24. Eshetie, S., Unakal, C., Gelaw, A., Ayelign, B., Endris, M., and Moges, F. (2015). Multidrog resistant and carbapenemase producing *Enterobacteriaceae* among patient with urinary tract infection at referral Hospital, Northwest Ethiopia. *Antimicrobial Resistance & Infection Control* 4, 1-8.
25. Everett C., Short, J.R., and Kurtz, H.J. (1971). Properties of hemolytic activities of *Escherichia coli*. *Infection and immunity*. 678-687
26. Faleiro-Naves, P.L. (2010). *Escherichia coli* y su correlación con factores de virulencia: prevención y actividad de antimicrobianos frente a organismos planctónicos y asociados a biopelículas. Tesis que para obtener el Grado de Doctor. Universidad Complutense de Madrid. 1-163.
27. Firooze, F., Saffari, M., Neamati, F., and Zibaei, M. (2014). Detection of virulence genes in *Escherichia coli* isolated from patients with cystitis and pyelonephritis. *International Journal of Infectuos Diseases*. 219-222.
28. Florencia-Vázquez, R. (2015). Mecanismo de acción de la toxina alfa hemolisina de *Escherichia coli*. Tesis que para obtener el grado de Doctor de la facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de la Plata. 1-142.

29. García, E. C., Brumbaugh, A. R., and Mobley, H.L.T. (2011). Redundancy and specificity of *Escherichia coli* iron acquisition systems during urinary tract infection. *Infect Immun.* 79, 1225-1235.
30. García, T. A., Ventura, C.L., Smith, M.A., Merrell, D.S., and O'Brien, A.D. (2013). Cytotoxic necrotizing factor 1 and hemolysin from uropathogenic *Escherichia coli* elicit different host responses in the murine bladder. *Infect immune.* 81, 99-109.
31. Guajardo-Lara, C.E., González-Martínez, P.M., y Ayala-Gaytán, J.J. (2009). Resistenci antimicrobiana en la infección urinaria por *Escherichia coli* adquirida en la comunidad. ¿Cuál antibiótico voy a usar? *Salud pública Méx.* 51, 155-159.
32. Hagan, C.E., Lloyd, A.L., Rasko, D.A., Faerber, G.J., and Mobley, H.L.T. *Escherichia coli* global gene expression in urine from women with urinary tract infection. *PLoS Pathogens.* 6, 1-18.
33. Hamelin, K., Bruant, G., El-Shaarawi, A., Hill, S., Edge, T.A., Bekal, S., Faibrother, J.M., Harel H., Maynard, C., Masson, L., and Brousseau, R. (2006). A virulence and antimicrobial resistance DNA microarray detects a high frequency of virulence genes in *Escherichia coli* isolates from Great Lakes recreational waters. *Appl Environ Microbiol* 72(6):4200-4206.
34. Hancock, V.; Ferrieres, L.; Klemm, P. (2007) Biofilm formation by asymptomatic and virulent urinary tract infectious *Escherichia coli* strains. *FEMS Microbiol Lett.* 267, 30-37.
35. Hannan, T.J., Totsika, M., Mansfield, K.L., Moore, K.H., Schembri, M.A., and Hultgren, S.J. (2012). Host-Pathogen checkpoints and population bottlenecks in persistent and intracellular uropathogenic *E. coli* bladder infection. *FEMS Microbiol Rev.* 36, 616-648.
36. Herlax, V., Henning, M.F., Bernasconi, A.M., Goñi, F.M., and Bakás, L. (2010). The lytic mechanism of *Escherichia coli* α -hemolysin associated to outer membrane vesicles. *Natural Science.* 2. 484-492.
37. Hojati, Z., Zamanzad, B., Hashemzadeh, M., Molaie, R., and Gholipour, A. (2015). The FimH gene in uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from patients with urinary tract infection. *Jundishapur J Microbiol.* 8, 1-4.
38. Hufnagel, A.A., Depas, W.H., and Chapman, M.R. (2015). The biology of the *Escherichia coli* extracellular matrix. *Microbiology Spectrum.* 3, 1-14.
39. Jacoby, G.A., Strahilevitz, J., and Hooper, D.C. (2014). Plasmid-mediated quinolone resistance. *Microbiol Spectr.* 2, 1-42.
40. Johnson, J.R., and Stell, A.L. (2000). Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *Journal of Infectious Diseases* 181, 261-272.
- Kazemnia, A., Ahmadi, M., and Dilmaghani, M. (2014). Antibiotic resistance pattern of different *Escherichia coli* phylogenetic groups isolated from human urinary tract infection and avian colibacillosis. *Iran Biomed J.* 4, 219-224.
41. Kölher, C.D., and Dobrind, U. (2011). What defines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*?. *International Journal of Medical Microbiology.* 301, 642-647.
42. Lebeaux, D., Chauhan, A., Rendueles, O., and Beloin, C. (2013). From *in vitro* to *in vivo* models of bacterial biofilm-related infections. *Pathogens.* 2, 288-356.

43. Liu, X., Thungrat, K., and Boothe, D.M. (2015). Multilocus Sequence Typing and Virulence Profiles in Uropathogenic *Escherichia coli* Isolated from Cats in the United States. *PLoS One*. 10(11), 1-14.
44. 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-Rencillas, S., Xicohtencatl-Cortes, J., and Hernández-Castro, R. (2014). Identification of virulence factors genes in *Escherichia coli* isolates from women with urinary tract infection in Mexico. *BioMed Research International*. 1-10.
45. Lüthje, P., and Brauner, A. (2014). Uropathogenic *E. coli* and their interaction with the host. *Advances in Microbial Physiology* 65, 338-359.
46. Manges, A.R., Tabor, H., Tellis, P., Vincent, C., and Pierre-Paul, T. (2008). Endemic and epidemic lineages of *Escherichia coli* that cause urinary tract infections. *Emerging Infectious Diseases* 14, 1575-1583.
47. Mittal, S., Sharma, M., and Chaudhary U. (2015). Biofilm and multidrug resistance in uropathogenic *Escherichia coli*. *Pathogenes and global health* 109, 26-29.
48. Mohamed, M., Owens, K., Gajewski, A., Cñabots, C., Johnston, B., Thuras, P., Kuskowski, M.A., Johnson, J.R. (2015). Extraintestinal pathogenic and antimicrobial-resistant *Escherichia coli* contamination of 56 public restrooms in the Greater Minneapolis-St. Paul metropolitan area. *Applied and Environmental Microbiology*. 13, 4498-4506.
49. Momtaz, H., Karimian, A., Madani, M., Safarpour, D.F., Ranjbar, R., Sarshar, M., and Souod, N. (2013). Uropathogenic *Escherichia coli* en Iran: serogroup distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials* 12, 1-12.
50. Muñoz-Castillo, M.S., Díaz-Ramírez, Y., León-García, M. de J., Villanueva-Trejo, M., y Barrios-Casarrubias, A. (2009). Frecuencia de infecciones nosocomiales del tracto urinario en el Hospital General Dr. Raymundo Abarca Alarcón de Chilpancingo Guerrero, México. *Bioquímica*. 34, 107.
51. Nagamatsu, K., Hannah, T.J., Guest, R.L., Kostakioti, M., Hadjifragiskou, M., Binkley, J., Dodson, K., Raivio, T.L., and Hultgren, S.J. (2015). Dysregulation of *Escherichia coli* α -hemolysin expresión alters the course of acute and persistent urinary tract infection. *Proc Natl Acad Sci USA*. 112(8). 871-880
52. Najar, M.S., Saldanha, C.L., and Banday K.A. (2009). Approach to urinary tract infections. *Indian Journal Nephrology* 19, 129-139.
53. Novais, A., Vuotto, C., Pires, J., Montenegro, C., Donelli, G., Coque, T., and Peixe, L. (2013). Diversity and biofilm-production ability among isolates of *Escherichia coli* phylogroup D belonging to ST69, ST393 and ST405 clonal groups. *BMC Microbiology*. 13, 1-9.
54. Orrego-Marin, C.P., Henao-Mejía, C.P., Cardona-Arias, J.A. (2014) Prevalencia de infección urinaria, uropatógenos y perfil de susceptibilidad antimicrobiana. *Acta Médica Colombiana*. 39, 352-358.
55. Páramo-Rivas, F., Tovar-Serrano, A., Rendón-Macías, M.E. (2015). Resistencia antimicrobiana en pacientes con infección de vías urinarias hospitalizados en el servicio de Medicina Interna del Nuevo Sanatorio Durango, de enero a diciembre de 2013. *Med Int Méx*. 31, 34-40.

56. Piatti, G., Mannini, A., Balistreri, M., and Schito, A.M. (2008). Virulence factors in urinary *Escherichia coli* strains: Phylogenetic background and quinolone and fluoroquinolone resistance. *Journal of Clinical Microbiology*. 46, 480-487.
57. Pitout, J.D.D. (2012). Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: a combination of virulence with antibiotic resistance. *Frontiers in Microbiology* 3, 1-7.
58. Puttamreddy, S., Cornick, N.A., and Minion, F.C. (2010). Genome-wide transposon mutagenesis reveals a role for pO157 genes in biofilm development in *Escherichia coli* O157:H7 EDL933. *Infect Immun* 78, 2377-2384.
59. Qin, X., Hu, F., Ye, X., Zhu, D., Zhang, Y., and Wang, M. (2013) Comparison of adhesins genes and antimicrobial susceptibilities between uropathogenic and intestinal commensal *Escherichia coli* strains. *PloS One*. 8, 1-7.
60. Rahdar, M., Rashki, A., Reza-Miri, H., Rashki-Ghalehnoo, M. (2015). Detection of *pap*, *sfa*, *afa*, *foc* and *fim* adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* isolates collected from patients with urinary tract infection. *Jundishapur J Microbiol*. 8, 1-11.
61. Ramírez-Castillo, F.Y. (2014). *Escherichia coli* species present in biofilms in stream water in San Pedro River at Aguascalientes state, Mexico. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas. UAA. Pp. 196.
62. Ramírez-Castillo, F.Y., Harel, J., Moreno-Flores, A.C., Loera-Muro, A., Guerrero-Barrera, A.L., and Avelar-González, F.J. (2014). Antimicrobial resistance: the role of aquatic environments. *International Journal of Current Research and Academic Review*. 2, 1-17.
63. Rivera-Sanchez, R., Delgado-Ochoa, D., Flores-Paz, R.R., García-Jimenez, E.E., Espinosa-Hernández, R., Bazan-Borges, A.A., and Arriaga-Alba, M. (2010). Prospective study of urinary tract infection surveillance after kidney transplantation. *BMC, Infectious Diseases*. 10, 1-6.
64. Rocha-García, R.C., Lozano-Zarain, P., y Martínez-Laguna, Y. (2004). Mecanismos de patogenicidad e interacción parásito-hospedero. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. México. 324 pp.
65. Romero, C.R. (2007). Microbiología y parasitología humana: bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias. 3ra. Edición. Editorial Médica Panamericana. México, D.F. Pp. 1802.
66. Rowe, T.A., and Junthani-Mehta, M. (2013). Urinary tract infection in older adults. *National Institutes of Health* 9, 1-15.
67. Sadekuzzaman M., Yang, S., Mizan, M.F.R., and Ha, S.D. (2015). Current and recent advanced strategies for combating biofilms. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 4, 491–509.
68. Saint, S., Kowalski, C.P., Kaufman, S.R., Hofer, T.H., Kauffman, C.A., Olmsted, R.N., Forman, J., Banaszak-Holl, J., Damschroder, L., and Krein, S.L. (2008). Preventing hospital-acquired urinary tract infection in the United States: a national study. *Clinic Infect Dis*. 2, 243-250.
69. Schmiemann, G., Gágyor, I., Hummers-Pradier, E., and Bleidorn, J. (2012). Resistance profiles of urinary tract infections in general practice –an observational study. *BMC Urology*. 12, 1-5.

70. Secretaría de Salud. (2015). Notificación semanal casos nuevos de enfermedades 2015. Subsistema de notificación semanal de casos nuevos de enfermedades. Información epidemiológica de morbilidad correspondiente a marzo 2015. Pp. 154.
71. Sedidhi, I., Arabestani, M.R., Rahimbakhsh, A., Karimitabar, Z., and Alikhani, M.Y. (2015). Dissemination of Extended-Spectrum β -Lactamasas and quinolone resistance genes among clinical isolates of uropathogenic *Escherichia coli* in children. *Jundishapur J Microbiolo.* 8, 1-6.
72. Silverman, J.A., Schreiber, H.L., Hooton, T.M., and Hultgren, A.J. (2013). From physiology to pharmacy: developments in the pathogenesis and treatment of recurrent urinary tract infections. *HHS Public Access.* 14, 448-456.
73. Singer, R.S. (2015). Urinary tract infections attributed to diverse ExPEC strains in food animals: evidence and data gaps. *Frontiers in Microbiology.* (6), 1-9.
74. Soto, S.M., Smithson, A., Horcajada, J.P., Martínez, J.A., Mensa, J.P., and Vila, J. (2006). Implication of biofilm formation in the persistence of urinary tract infection caused by uropathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology and infection.* 12, 1021-1045.
75. Spurbeck, R.R., Alteri, C.J., Himpsl, S.D., and Mobley H.L.T. (2013). The Multifunctional protein YdiV represses P fimbria-mediated adherence in Uropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 195, 3156-3164.
76. Spurbeck, R.R., Dinh Jr, P.C., Walk, S.T., Stapleton, A.E., Hooton, T.M., Nolan, L.K., Sik-Kim, K., Johnson, J.R., and Mobley, H.L.T. (2012). *Escherichia coli* isolates that carry *vat*, *fyuA*, *chuA*, and *yfcV* efficiently colonize the urinary tract. *Infection and Immunity* 80, 4115-4122.
77. Sriramulu, D. (2013). Evolution and impact of bacterial drug resistance in the context of cystic fibrosis disease and nosocomial settings. *Microbiology Insights.* 6, 29-36.
78. Subashchandrabose, S., and Mobley, H.L.T. (2015). Virulence and Fitness Determinants of Uropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr.* 3, 1-32.
79. Tabasi, M., Karam, M.R.A., Habibi, M., Yekaninejeab, M.S., and Bouzari, S. (2015). Phenotypic assay to determine virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) isolates and their correlation with antibiotic resistance pattern. *Osong public Health Res Perspect.* 6(4). 621-268.
80. Tadesse, E., Teshome, M., Merid, Y., Kibret, B., and Shimelis, T. (2014). Asymptomatic urinary tract infection among pregnant women attending the antenatal clinic of Hawassa Referral Hospital, Southern Ethiopia. *BMC Research Notes* 7, 1-5.
81. Tasbakan, M.I., Durusoy, R., Pullucku, H., Sipahi, O.R., Ulusoy, S. (2013). Hospital-acquired urinary tract infection point prevalence in Turkey: differences in risk factors among patient groups. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 21, 1-31.
82. Tchesnokova, V., Billig, M., Chattopadhyay, S., Linardopoulou, E., Aprikian, P., Roberts, P.L., Skrivankova, V., Johnston, B., Gileva, A., Igyusheva, I., Toland, A., Riddell, K., Rogers, P., Qin X., Butler-Wu, S., Cookson, B.T., Fang, F.C., Kahl, B., Price, L.B., Weissman, S.J., Limaye, A., Scholes, D., Johnson, R.J., and Sokurenko, E.V. (2013). Predictive diagnosis for *Escherichia coli* infections base on the clonal association of antimicrobial resistance and clinical outcome. *Journal of Clinical Microbiology.* 51, 2991-2999.

83. Tórtora, G.J., Funke, B.R., y Case, C.L. (2007). Introducción a la microbiología. 9na. Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. 959 pp.
84. Toval, F., Köler, C.D., Vogel, U., Wagenlehner, F., Mellmann, A., Frut, A., Schmidt, M.A., Karch, H., Bielaszewska, M., and Dobrindt, U. (2013). Characterization of *Escherichia coli* isolates from hospital inpatients or outpatients with Urinary tract infection. *Journal of Clinical Microbiology* 52, 407-418.
85. Valdevito, J.P. (2008). Infección urinaria recurrente en la mujer. *Rev. Chil. Infectol.* 25, 268-276.
86. Vollmerhausen, T.L., and Katouli, M. (2014). Molecular characterization of *Escherichia coli* isolated from hospitalized children and adults with urinary tract infection. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis* 33, 976-982.
87. Weber, F.A., Beek, T., Bergman, A., Carius, A., Grüttner, Hickmann, S., Ebert, I., Hein, A., Küster, A., Rose, J., Koch-Jugl, J., and Stolzenberg, H.C. (2014). Fármacos en el medio ambiente: la perspectiva global. Umwelt Bundesamt.
88. Welch, R. A. (2016). Uroathogenic *Escherichia coli*-associated exotoxins. *Microbiolol Spectr.* 4. 1-16.
89. Wiles, T.J., Kulesus, R.R., and Mulvey M.A. (2008). Origins and virulence mechanisms of Uropathogenic *Escherichia coli*. *National Institutes of Health* 85, 11-19.

ANEXOS

Tabla 1: Oligonucleótidos utilizados para determinar el grupo filogenético.

Nombre	Gen blanco	Oligonucleotido 5' → 3'	Tamaño del amplicón (pb)	Referencia
Maracdor de <i>E. coli</i> .				
uidA.f uidA.r	<i>uidA</i>	ATGTGCTGCCTGAACC ATTGTTTGCCTCCCTGCTG	450	(Ramírez-Castillo <i>et al.</i> , 2013)
Genes para la determinación de filogrupos				
chuA.1b chuA.2	<i>chuA</i>	ATGGTACCCTACGAACCAAC TGCCGCCAGTAGTAAAGACA	288	(Clermont <i>et al.</i> , 2012; Clermont <i>et al.</i> , 2013)
yjaA.1b yjaA.2b	<i>yjaA</i>	CAAACGTGCGGTGTCAGGAG AATGCGTTTGTCAACCTGTG	211	(Clermont <i>et al.</i> , 2012)
TspE4C2.1b TspE4C2.1b	<i>TspE4C2</i>	CACTATTCGACAGGTCATCC AGTTTATACCTGCGGGTCCGC	152	(Clermont <i>et al.</i> , 2012)
trpAgpC.1 trpAgpC.2	<i>trpA</i>	AGTAGTATGCCAGTGCAG TCTGCAGCGGTCACGCC	219	(Clermont <i>et al.</i> , 2012)
Acek.f Acek.f	<i>arpA</i>	AATCCTATTCGACGCTTGC TCTCCCGCTACCGTACGCTA	400	(Clermont <i>et al.</i> , 2012)
Nombre	Gen blanco	Oligonucleotido 5' → 3'	Tamaño del amplicón (pb)	Referencia
Genes de virulencia para <i>E. coli</i> extra-intestinal				
FyuAf FyuAr	<i>fyuA</i>	TGAGTGACGCCGGAAGAGGA CTCAGTAGGCTGGGTGATGTA	880	(Johnson and Stell, 2000)
KpsMTIIIf KpsMTIIr	<i>kpsMT II</i>	ACACGTGTCCACATGCTTTTG CGTGCAGACGATAAGCCATATCT	289	(Johnson and Stell, 2000)
	<i>cnfI</i>	AGTTCTGCAGTCCGTCGTCGGAAT CGTTTGCAGTCATGCAAGGTCCCTG	497	
	<i>hlyA</i>	AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT ACCATATAAGCGGTCATTCCCCTCA	1176	
	<i>fimH</i>	GGGGTGCACCTCAGGGAACCATTGAGGCA GGGGCAATGCTTATGATAACAAAGTCAC	502	
papC-F papC-R	<i>papC</i>	CACGCCGACTTTAGTGGGTGGTG GTATGCTGTTGGAGGGAAGCATAA	350	(Blanco <i>et al.</i> , 1997)
SfaSf SfaSr	<i>sfaS</i>	GTGCAGAGGTCCACTGCTGTC CTGGCGAGGACTACATGCAGTC	240	(Johnson and Stell, 2000)
Afaf Afar	<i>afa/dra</i>	GGTTGATGGTCCGCTACATGC CAACTTAACGCGCCAGCATCTC	596	(Johnson and Stell, 2000)
Vatf Vatr	<i>vat</i>	TCAGAGACAGTCAGGGACTGAGT TGGCACGAAATATACTCACTGGTT	1109	(Spurbeck <i>et al.</i> , 2012)
Yfcvf Yfcvr	<i>yfcV</i>	AGCAGGTAGACCATGGTGAGG GCTAACGCATCAGTTAGTGACC	292	(Spurbeck <i>et al.</i> , 2012)
Nombre	Gen blanco	Oligonucleotido 5' → 3'	Tamaño del amplicón (pb)	Referencia
Genes de resistencia a quinolonas				
parE-up parE-down	<i>parE</i>	TAC CGA GCT GTT CTT TGT GG GGC AAT GTG CAG ACC ATC AG	261	
EC-PAR-A EC-PAR-B	<i>parC</i>	CTGAATGCCAGCGCCAAATT GCGAACGATTCGGATCGTC	187	(Deguchi <i>et al.</i> , 1997)

Nombre	Gen blanco	Oligonucleotido 5' → 3'	Tamaño del amplicón (pb)	Referencia
Genes de resistencia a quinolonas				
gyrA11753		GTATAACGCATTGCCGC		
gyrA12004	<i>gyrA</i>	TGCCAGATGTCCGAGAT	250	(Wang <i>et al.</i> , 2001)
aac-up	<i>acc-(6')-lb</i>	TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA		
aac-down		CTCGAATGCCTGGCGTGTTT	482	(Park <i>et al.</i> , 2006)
qnrA-up	<i>qnrA</i>	TCAGCAAGAGGATTTCTCA		
qnrA-down		GGCAGCAGTATTACTCCCA	520	(Maynard <i>et al.</i> , 2004)
qnrB-up	<i>qnrB</i>	GATCGTGAAAGCCAGAAAGG		
qnrB-down		ACGATGCCTGGTAGTTGTCC	469	(Robicsek <i>et al.</i> , 2006)
qnrC-up	<i>qnrC*</i>	TGCGTGCCGTTTATTGG		
qnrC-down		GCAGGTTATGCGGTGGAAT	447	(Wang <i>et al.</i> , 2001)
qnrD-up	<i>qnrD*</i>	GGGTTGATTTAAC TGATAC		
qnrD-down		TTCGACTTTTCTAATATGAC	205	(Robicsek <i>et al.</i> , 2006)
qnrS-up	<i>qnrS</i>	ACGACATTCGTCAACTGCAA		
qnrS-down		TAAATTGGCACCTGTAGC	417	(Robicsek <i>et al.</i> , 2006)
oqxA-up	<i>oqxA</i>	GACAGCGTCGCACAGAATG		
oqxA-down		GGAGACGAGGTTGGTATGGA	339	Wang <i>et al.</i> , 2001)
oqxB-up	<i>oqxB</i>	CGAAGAAAGACCTCCCTACCC		
oqxB-down		CGCCGCAATGAGATACA	240	(Robicsek <i>et al.</i> , 2006)
qepA-up	<i>qepA</i>	CCTGAGGCTAGGCCTTCTTA		
qepA-down		AACTGACCTGAGTCTCCAG	403	(Wang <i>et al.</i> , 2001)

Tabla 2: Características de las muestras clínicas y clasificación de los aislados por grupo filogenético y por tipo de patógeno.

Muestra	Género	Edad	Tipo de infección	Filogrupo	Clasificación
300	Masculino	80	Comunitaria	B1	UPEC
301	Femenino	76	Nosocomial	B2	Patógeno potencial
302	Femenino	0	Nosocomial	B2	Patógeno potencial
303	Masculino	27	Nosocomial	B2	Patógeno potencial
304	Masculino	2	Comunitaria	B2	Patógeno potencial
305	Masculino	9	Comunitaria	B1	Patógeno potencial
306	Masculino	49	Comunitaria	E	UPEC
307	Masculino	6	Comunitaria	B1	UPEC
308	Masculino	58	Comunitaria	C	Patógeno potencial
309	Masculino	0	Nosocomial	A	UPEC
310	Masculino	0	Nosocomial	A	UPEC
311	Femenino	1	Nosocomial	D	Patógeno potencial
312	Femenino	43	Comunitaria	B2	Patógeno potencial
313	Femenino	6	Comunitaria	B1	UPEC
314	Femenino	3	Comunitaria	E	Patógeno potencial
315	Femenino	55	Comunitaria	B2	UPEC
316	Femenino	62	Comunitaria	E	UPEC
317	Femenino	3	Comunitaria	E	UPEC
318	Femenino	8	Comunitaria	A	UPEC
319	Femenino	5	Comunitaria	Indefinida	Patógeno potencial
320	Femenino	34	Comunitaria	B1	Patógeno potencial
321	Femenino	36	Nosocomial	A	UPEC
322	Masculino	45	Nosocomial	F	UPEC
323	Femenino	85	Comunitaria	B1	UPEC
324	Femenino	4	Comunitaria	B1	Patógeno potencial
325	Femenino	13	Nosocomial	B2	UPEC
326	Femenino	62	Comunitaria	B2	UPEC
327	Femenino	57	Nosocomial	B2	UPEC
328	Femenino	36	Comunitaria	D	UPEC
329	Masculino	94	Nosocomial	E	UPEC
330	Femenino	1	Comunitaria	D	Patógeno potencial
331	Femenino	1	Comunitaria	C	UPEC
332	Masculino	0	Comunitaria	B2	UPEC
333	Masculino	69	Comunitaria	B2	UPEC
334	Femenino	89	Nosocomial	B1	Patógeno potencial
335	Masculino	34	Comunitaria	B2	Patógeno potencial
336	Femenino	4	Comunitaria	D	UPEC
337	Masculino	0	Comunitaria	E	UPEC

Muestra	Género	Edad	Tipo de infección	Filogrupo	Clasificación
338	Femenino	17	Comunitaria	Indefinida	Patógeno potencial
339	Femenino	7	Comunitaria	F	UPEC
340	Femenino	1	Comunitaria	E	UPEC
341	Masculino	63	Comunitaria	A	Patógeno potencial
342	Femenino	41	Comunitaria	B2	UPEC
343	Femenino	54	Comunitaria	No <i>E. coli</i>	Patógeno potencial
344	Femenino	5	Comunitaria	F	UPEC
345	Masculino	0	Comunitaria	B2	Patógeno potencial
346	Femenino	7	Comunitaria	B1	UPEC
347	Masculino	68	Comunitaria	E	Patógeno potencial
348	Femenino	1	Comunitaria	B2	Patógeno potencial
349	Femenino	10	Comunitaria	Indefinida	UPEC
350	Femenino	52	Comunitaria	B2	UPEC
351	Femenino	0	Comunitaria	D	UPEC
352	Femenino	6	Comunitaria	B2	UPEC
353	Femenino	5	Comunitaria	C	Patógeno potencial
354	Femenino	6	Comunitaria	D	Patógeno potencial
355	Femenino	5	Comunitaria	B2	Patógeno potencial
356	Femenino	49	Comunitaria	A	Patógeno potencial
357	Femenino	17	Comunitaria	Indefinida	Patógeno potencial
358	Femenino	50	Comunitaria	F	Patógeno potencial
359	Femenino	18	Comunitaria	B1	UPEC
360	Femenino	25	Comunitaria	A	Patógeno potencial
361	Masculino	13	Comunitaria	D	UPEC
362	Femenino	0	Comunitaria	A	UPEC
363	Femenino	7	Nosocomial	D	UPEC

Indefinida: indica las cepas de *E. coli* que no fueron clasificadas en los filogrupos.

Tabla 3: Presencia de factores de virulencia de los aislados clínicos.

Muestra	Factor de virulencia										
	<i>kpsMII</i>	<i>sfaS</i>	<i>afa/Dr</i>	<i>vat</i>	<i>yfcV</i>	<i>fyuA</i>	<i>chuA</i>	<i>hlyA</i>	<i>fimH</i>	<i>cnfI</i>	<i>papC</i>
300	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1
301	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0
302	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0
303	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0
304	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0
305	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
306	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1
307	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1
308	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
309	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
310	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
311	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0
312	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0
313	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1
314	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0
315	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
316	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1
317	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1
318	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
319	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
320	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0
321	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1
322	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1
323	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1
324	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
325	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1
326	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
327	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
328	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1
329	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1
330	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
331	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1
332	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1
333	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1
334	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
335	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0
336	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1
337	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1

Muestra	Factor de virulencia										
	<i>kpsMII</i>	<i>kpsMII</i>	<i>kpsMII</i>	<i>kpsMII</i>	<i>kpsMII</i>	<i>kpsMII</i>	<i>kpsMII</i>	<i>kpsMII</i>	<i>kpsMII</i>	<i>kpsMII</i>	<i>kpsMII</i>
338	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
339	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1
340	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1
341	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0
342	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
344	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1
345	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0
346	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
347	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0
348	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0
349	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
350	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1
351	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1
352	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1
353	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0
354	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0
355	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
356	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
357	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
358	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0
359	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
360	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
361	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1
362	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
363	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1

1: presencia; 0: ausencia.

Tabla 4: Prevalencia de los patrones de virulencia de los aislados clínicos.

Gen	Total de Aislados	Porcentaje
<i>kpsMTII</i>	39	61.90
<i>chuA</i>	40	63.49
<i>fimH</i>	60	95.24
<i>cnf1</i>	36	57.14
<i>kpsMTII-chuA</i>	33	52.38
<i>kpsMTII-fimH</i>	38	60.32
<i>kpsMTII-cnf1</i>	24	38.10
<i>chuA-fimH</i>	39	61.90
<i>chuA-cnf1</i>	26	41.27
<i>fimH-cnf1</i>	36	57.14
* <i>kpsMTII-chuA-fimH</i>	33	52.38
<i>kpsMTII-chuA-cnf1</i>	22	34.92
<i>chuA-fimH-cnf1</i>	26	41.27
<i>kpsMTII-chuA-fimH-cnf1</i>	22	34.92
<i>kpsMTII-yfcV-fyuA</i>	9	14.29

El patrón de virulencia más frecuente para 3 genes fue *fimH-kpsMTII-chuA* (52.38%).

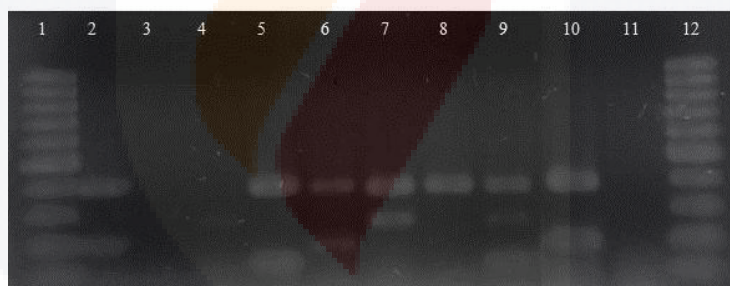


Figura 1: Electroforesis en gel de agarosa (1.5%) de PCR múltiplex para los genes *arpA* (400 pb), *chuA* (288 pb), *yjaA* (211 pb) y *TspE4.C2* (15C2 pb). Carriles 1 y 13: marcador de peso molecular (100 pb); carriles 2-9 aislados clínicos de *E. coli*; carril 10 : control positivo cepa CFT073; carril 11: control negativo (agua).

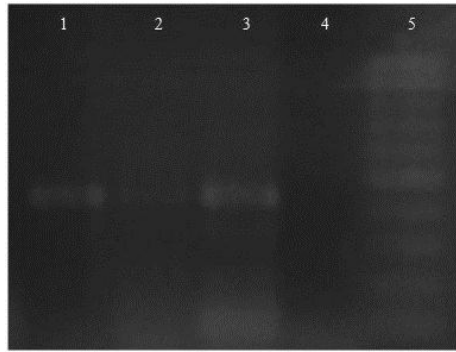


Figura 2: Electroforesis en gel de agarosa (1.5%) de PCR para el gen *uidA* (450 pb). Carril 1 y 2: aislados clínicos de *E. coli* ; carril 3: control positivo cepa CFT073; carril 4: control negativo (agua); carril 5: marcador de peso molecular (100 pb).

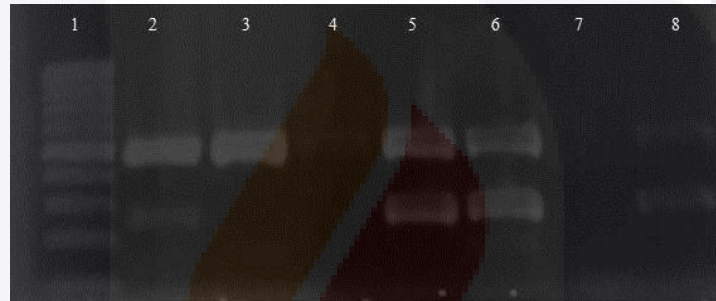


Figura 3: Electroforesis en gel de agarosa (1.5%) de PCR dúplex para los genes *fimH* (502 pb) y *kpsmTII* (289 pb). Carril 1: marcador de peso molecular (100 pb); carriles 2-6 aislados clínicos de *E. coli* ; carril 8 : control positivo cepa CFT073; carril 7: control negativo (agua).

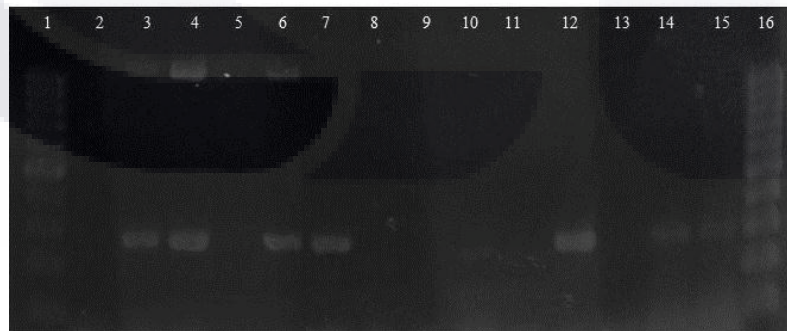


Figura 4: Electroforesis en gel de agarosa (1.5%) de PCR dúplex para los genes *vaT* (1109 pb), y *yfcV* (291 pb). Carriles 1 y 16: marcador de peso molecular (100 pb); carril 2 control negativo (agua); carriles 3 y 4: control positivo cepa CFT073; carriles 5-15 aislados clínicos de *E. coli*.

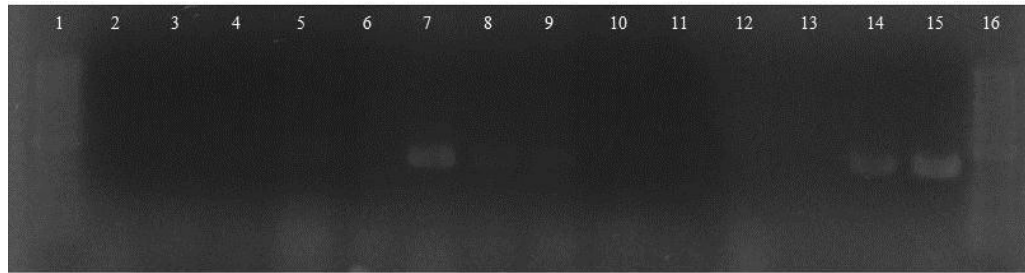


Figura 5: Electroforesis en gel de agarosa (1.5%) de PCR para el gen *sfaS* (241 pb). Carriles 1 y 16: marcador de peso molecular (100 pb); carriles 2-12 aislados clínicos de *E. coli*; carriles 14 y 15: control positivo cepa CFT073; carril 13: control negativo (agua).



Figura 6: Electroforesis en gel de agarosa (1.5%) de PCR dúplex para los genes *fyuA* (784 pb) y *yfcv* (291 pb). Carriles 1 y 16: marcador de peso molecular (100 pb); carriles 2-13 aislados clínicos de *E. coli*; carril 15: control positivo cepa CFT073; carril 14: control negativo (agua).

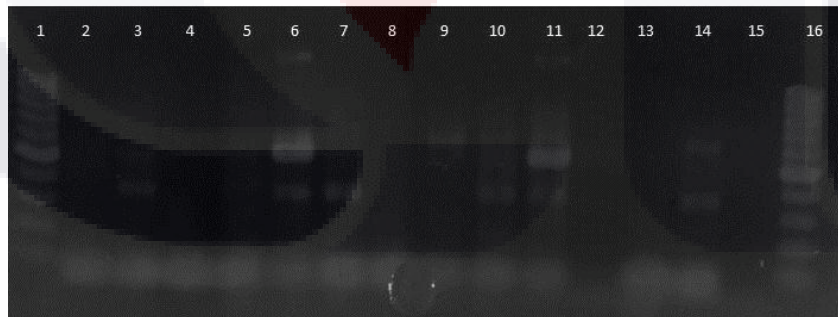


Figura 7: Electroforesis en gel de agarosa (1.5%) de PCR triplex para los genes *hlyA* (1176 pb), *cnf1* (497 pb) y *papC* (350 pb). Carriles 1 y 16: marcador de peso molecular (100 pb); carriles 2-11 aislados clínicos de *E. coli*; carril 14: control positivo cepa CFT073; carril 13: control negativo (agua); carriles 12 y 15 vacíos.

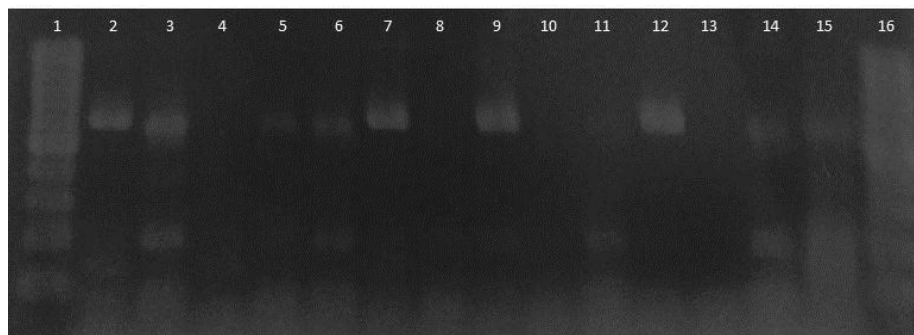


Figura 8: Electroforesis en gel de agarosa (1.5%) de PCR para el gen *afa/Dra* (596 pb). Carriles 1 y 16: marcador de peso molecular (100 pb); carriles 2-12 aislados clínicos de *E. coli*; carril 13: control negativo (agua); carriles 14 y 15: control positivo cepa CFT073.

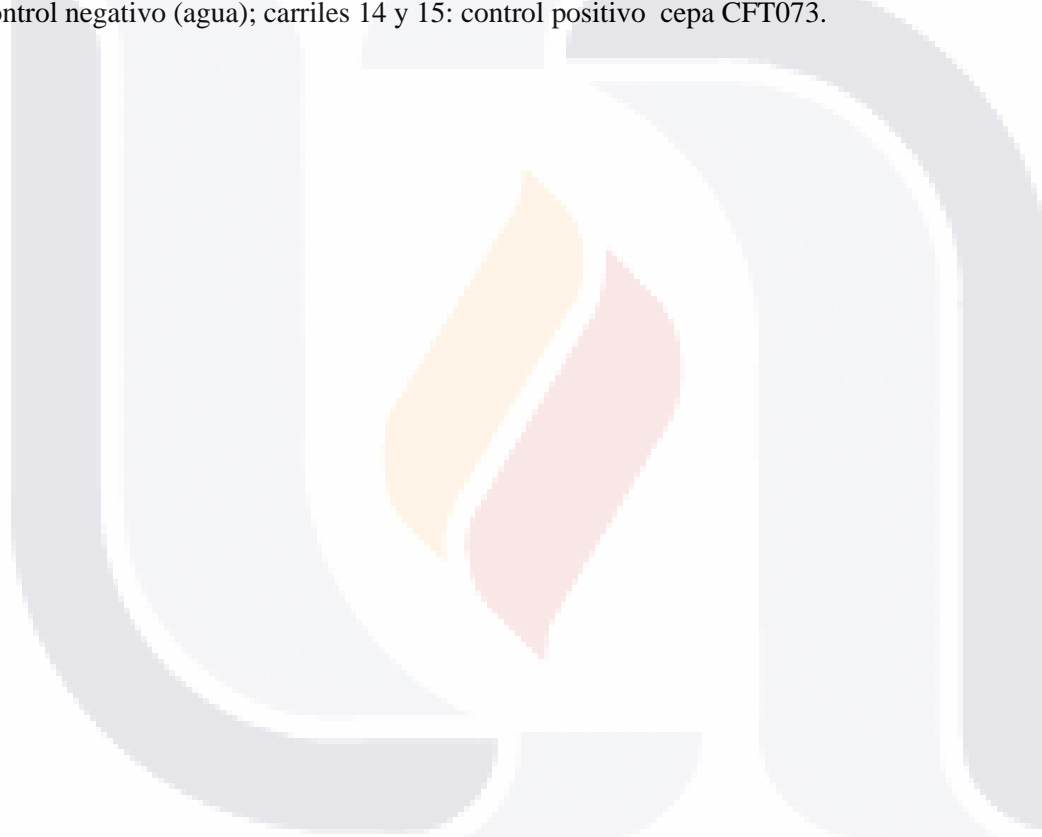


Tabla 5. Capacidad hemolítica de la cepa en placas de agar sangre suplementadas con 5% de sangre desfribinada.

Muestra	Tipo de hemólisis	Muestra	Hemólisis alfa
300	Hemólisis alfa	332	Hemólisis alfa
301	Hemólisis gamma	333	Hemólisis gamma
302	Hemólisis alfa	334	Hemólisis gamma
303	Hemólisis alfa	335	Hemólisis alfa
304	Hemólisis alfa	336	Hemólisis gamma
305	Hemólisis gamma	337	Hemólisis alfa
306	Hemólisis gamma	338	Hemólisis alfa
307	Hemólisis alfa	339	Hemólisis gamma
308	Hemólisis alfa	340	Hemólisis gamma
309	Hemólisis gamma	341	Hemólisis alfa
310	Hemólisis alfa	342	Hemólisis alfa
311	Hemólisis gamma	344	Hemólisis alfa
312	Hemólisis alfa	345	Hemólisis alfa
313	Hemólisis alfa	346	Hemólisis gamma
314	Hemólisis alfa	347	Hemólisis gamma
315	Hemólisis alfa	348	Hemólisis alfa
316	Hemólisis gamma	349	Hemólisis gamma
317	Hemólisis gamma	350	Hemólisis alfa
318	Hemólisis gamma	351	Hemólisis alfa
319	Hemólisis alfa	352	Hemólisis gamma
320	Hemólisis gamma	353	Hemólisis gamma
321	Hemólisis alfa	354	Hemólisis gamma
322	Hemólisis alfa	355	Hemólisis gamma
323	Hemólisis alfa	356	Hemólisis gamma
324	Hemólisis alfa	357	Hemólisis alfa
325	Hemólisis alfa	358	Hemólisis alfa
326	Hemólisis alfa	359	Hemólisis gamma
327	Hemólisis alfa	360	Hemólisis alfa
328	Hemólisis alfa	361	Hemólisis alfa
329	Hemólisis alfa	362	Hemólisis alfa
330	Hemólisis alfa	636	Hemólisis alfa
331	Hemólisis alfa		

Hemólisis gamma: cepa no hemolítica.

Tabla 6: Características de las cepas de los filogrupos B2 y D por su capacidad para formar biopelículas mediante la evaluación de los ensayos de Rojo Congo, Calcoflúor, motilidad y cristal violeta.

Muestra	Filogrupo	Ensayo de motilidad	Ensayo de Rojo Congo	Ensayo de Calcoflúor	Cristal Violeta
301	B2	Móvil	1	0	Poco adherente
302	B2	Móvil	1	1	Poco adherente
303	B2	Móvil	1	1	Poco adherente
304	B2	No móvil	1	1	Poco adherente
311	D	No móvil	0	0	Poco adherente
312	B2	Móvil	1	0	Moderadamente adherente
315	B2	Móvil	1	0	Poco adherente
325	B2	Móvil	1	0	Poco adherente
326	B2	Móvil	1	0	Poco adherente
327	B2	No móvil	1	0	Poco adherente
328	D	No móvil	0	0	Poco adherente
330	D	Móvil	1	0	Poco adherente
332	B2	No móvil	1	0	Poco adherente
333	B2	No móvil	1	0	Poco adherente
335	B2	Móvil	1	0	Poco adherente
336	D	No móvil	1	0	Poco adherente
342	B2	No móvil	1	0	Poco adherente
345	B2	No móvil	1	0	Poco adherente
348	B2	Móvil	0	0	No adherente
350	B2	Móvil	1	0	Poco adherente
351	D	No móvil	1	1	Poco adherente
352	B2	No móvil	1	0	Poco adherente
354	D	No móvil	1	0	Poco adherente
355	B2	Móvil	1	0	Poco adherente
361	D	Móvil	1	0	Poco adherente
363	D	No móvil	0	0	Poco adherente

Ensayo de motilidad: evaluación de motilidad dependiente de flagelo; **Ensayo de Rojo Congo:** evaluación de la presencia de curli; **Ensayo de Calcoflúor:** evaluación de la presencia de celulosa; **Ensayo de Cristal Violeta:** evaluación de la presencia de la adhesina fimbrial tipo I. **0:** ausencia; **1:** presencia.

Tabla 7: Clasificación y actividad de los antibióticos utilizados en este estudio.

Antibiótico	Sigla	Clasificación	Actividad
Gentamicina	GE	Aminoglucósidos	Alteración de la síntesis de proteínas
Tobramicina	TOB		
Cefazolina	CZ		
Cefoxitima	FOX	Beta-lactámicos	Inhibición de la síntesis de la pared celular
Ceftazidima	CAZ		
Ceftriaxona	CRO		
Cefepima	FEP		
Ampicilina	AM		
Amikacina	AK		
Ampicilina/Sulbactam	SAM		
Piperacilina/Tazobactam	TZP		
Ertapenem	ETP		
Imipinem	IPM		
Levofloxacin	LEV	Quinolonas	ADN girasa y topoisomerasa IV (inhibición de síntesis y replicación del ADN)
Ciprofloxacino	CIP		
Trimetoprima/sulfametoxazol	TMP-SMX	Sulfonamidas	Bloqueo de la síntesis de ácido fólico bacteriano
Nitrofurantoína	NF	Nitrofuronas	Inhibición de síntesis y replicación del ADN

Tabla 8: Criterio para la interpretación de la susceptibilidad antimicrobiana.

Antibiótico	Concentración (µg)	Diámetro de la zona de inhibición (mm)		
		Sensible	Intermedio	Resistente
Gentamicina	10	≤ 12	13-14	≥ 15
Tobramicina	10	≤12	13-14	≥15
Cefazolina	30	≤14	15-17	≥18
Cefoxitima	30	≤14	15-17	≥18
Ceftazidima	30	≤14	15-17	≥18
Ceftriaxona	30	≤ 13	14-20	≥21
Cefepima	30	≤14	15-17	≥18
Ampicilina	10	≤13	14-16	≥17
Amikacina	30	≤14	15-16	≥17
Ampicilina/Sulbactam	10/10	≤11	12-14	≥15
Piperacilina/Tazobactam	100/10	≤17	18-20	≥21
Ertapenem	10	≤13	14-15	≥16
Imipinem	10	≤13	14-15	≥16
Levofloxacin	5	≤13	14-16	≥17
Ciprofloxacino	5	≤15	16-20	≥21
Trimetoprima/sulfametoxazol	25	≤10	11-15	≥16
Nitrofurantoína	300	≤14	15-16	≥17

Tabla 9: Susceptibilidad antimicrobiana de los aislados clínicos.

Muestra	Antibiótico																	S	I	R	MDR
	AM	SAM	TZP	CZ	FOX	CAZ	CRO	FEP	ETP	IPM	AK	GE	TOB	CIP	LEV	NIF	TMP-SMX				
300	R	S	S	R	S	R	R	R	S	S	S	R	S	R	R	I	R	7	1	9	MDR
301	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	16	0	1	R
302	R	R	S	R	S	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	S	S	7	0	10	MDR
303	R	R	S	R	S	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	S	S	7	0	10	MDR
304	R	R	S	R	S	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	S	S	7	0	10	MDR
305	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	17	0	0	S
306	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	I	R	11	2	4	MDR
307	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	15	1	1	R
308	R	S	S	R	I	R	R	R	S	S	S	S	S	R	R	I	S	8	2	7	MDR
309	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	14	1	2	R
310	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	14	1	2	R
311	R	I	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	R	S	S	8	1	8	MDR
312	R	S	S	R	S	R	R	R	S	S	S	R	I	R	R	S	R	7	1	9	MDR
313	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	14	0	3	MDR
314	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	17	0	0	S
315	R	R	S	R	S	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	S	R	6	0	11	MDR
316	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	16	0	1	R
317	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	14	0	3	MDR
318	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	R	13	0	4	MDR
319	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	14	1	2	R
320	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	S	R	13	0	4	MDR
321	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	I	S	5	1	11	MDR
322	R	R	S	R	I	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R	4	1	12	MDR
323	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	17	0	0	S
324	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	17	0	0	S

Muestra	Antibiótico																	S	I	R	MDR
	AM	SAM	TZP	CZ	FOX	CAZ	CRO	FEP	ETP	IPM	AK	GE	TOB	CIP	LEV	NIF	TMP-SMX				
325	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	S	S	10	0	7	MDR
326	R	R	S	R	S	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	S	R	6	0	11	MDR
327	R	R	S	R	S	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	S	S	7	0	10	MDR
328	R	R	I	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	R	S	R	5	1	11	MDR
329	R	R	S	R	S	R	R	R	S	S	S	R	I	R	R	S	R	6	1	10	MDR
330	0	R	0	0	S	S	S	0	0	0	S	0	0	S	0	0	R	8	0	2	R
331	R	R	S	R	S	R	R	R	S	S	S	S	R	R	R	S	S	8	0	9	MDR
332	R	R	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	14	1	2	R
333	R	R	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	R	10	1	6	MDR
334	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	R	13	2	2	R
335	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	14	0	3	MDR
336	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	17	0	0	S
337	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	17	0	0	S
338	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	14	1	2	R
339	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	14	1	2	R
340	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	14	1	2	R
341	R	R	S	R	S	R	R	R	S	S	S	S	R	R	R	S	S	8	0	9	MDR
342	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	S	S	R	R	R	S	S	7	0	10	MDR
344	R	S	S	R	S	R	R	R	S	S	S	R	I	R	R	S	S	8	1	8	MDR
345	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	15	0	2	R
346	R	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	13	1	3	MDR
347	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	15	1	1	R
348	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	11	0	6	MDR
349	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	14	0	3	MDR
350	R	R	S	R	R	R	R	R	I	S	S	S	S	S	S	I	R	7	2	8	MDR
351	R	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	11	1	5	MDR
352	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	14	0	3	MDR

Muestra	Antibiótico																	S	I	R	MDR
	AM	SAM	TZP	CZ	FOX	CAZ	CRO	FEP	ETP	IPM	AK	GE	TOB	CIP	LEV	NIF	TMP-SMX				
353	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	16	0	1	R
354	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	14	1	2	R
355	R	I	S	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	S	R	5	1	11	MDR
356	R	R	S	R	S	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	S	S	7	0	10	MDR
357	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	12	0	5	MDR
358	R	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	R	I	R	R	I	R	7	2	8	MDR
359	R	I	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	14	2	1	R
360	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	R	14	0	3	MDR
361	R	R	S	R	R	I	S	S	S	S	S	R	I	R	R	S	R	7	2	8	MDR
362	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	14	1	2	R
363	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	17	0	0	S

GE: Gentamicina; **TOB:** Tobramicina; **CZ:** Cefazolina; **FOX:** Cefoxitima; **CAZ:** Ceftazidim; **CRO:** Ceftriaxona, **FEP:** Cefepima; **AM:** Ampicilina; **AK:** Amikacina; **SAM:** Ampicilina/Sulbactam; **TZP:** Piperacilina/Tazobactam; **ETP:** Ertapenem; **IPM:** Imipinim; **LEV:** Levofloxacin; **CIP:** Ciprofloxacino; **SXT:** Trimetoprima/sulfametoxazol; **NF:** Nitrofurantoína. **S:** sensible; **R:** resistente; **I:** intermedio. **MDR:** Resistencia a tres o más antibióticos distintos.



Figura 9: Ensayo de susceptibilidad antimicrobiana, cepa *E. coli* ATCC 25922.

Tabla 10: Características genotípicas de las cepas resistentes a ciprofloxacino y levofloxacino.

Muestra	Genes adquiridos por mutación				Genes adquiridos por transferencia							
	<i>gyra</i>	<i>parc</i>	<i>parE</i>	<i>aacIb</i>	<i>qnrA</i>	<i>qnrB</i>	<i>qnrC</i>	<i>qnrD</i>	<i>qnrS</i>	<i>oqxA</i>	<i>oqxB</i>	<i>qepA</i>
300	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1
302	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
303	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
304	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
306	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1
308	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1
311	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1
312	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1
315	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1
318	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1
320	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0
321	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0
322	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1
325	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
326	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1
327	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1
328	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1
329	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1
331	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1
333	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1
341	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1
342	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1
347	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1
350	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1
354	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1
355	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1
356	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0
357	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
359	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1
360	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1

Tabla 11: Ensayo de Rojo Congo de los aislados clínicos de los filogrupos B2 y D.


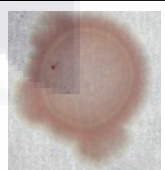
301	302	303	304	311
				
Colonia rosa, rugosa y móvil	Colonia rosa, rugosa y móvil	Colonia rosa, rugosa y móvil	Colonia rosa, lisa y móvil	Colonia gris y lisa
312	315	325	326	327
				
Colonia rosa, rugosa y móvil	Colonia rosa, rugosa y móvil	Colonia rosa, rugosa y móvil	Colonia rosa, y lisa	Colonia rosa, y lisa
328	330	332	333	335
				
Colonia gris, rugosa y móvil	Colonia rosa y rugosa	Colonia roja, rugosa y móvil	Colonia roja, rugosa y móvil	Colonia rosa, rugosa y móvil
336	342	345	348	350
				
Colonia rosa, lisa y móvil	Colonia rosa, lisa y móvil	Colonia roja y rugosa	Colonia gris, lisa y móvil	Colonia rosa y lisa
351	352	354	355	361
				
Colonia roja, rugosa y móvil	Colonia roja, lisa y móvil	Colonia rosa, lisa y móvil	Colonia rosa, rugosa y móvil	Colonia rosa, rugosa y móvil
		363		
				
		Colonia gris, rugosa y móvil		

Tabla 12: Determinación de la concentración de los extractos crudo de la toxina alfa hemolisina.

Muestra	[] ug/mL	Muestra	[] ug/mL	Muestra	[] ug/mL
300	12.41	321	20.67	342	4.33
301	4.37	322	4.27	344	22.24
302	4.3	323	15.97	345	4.15
303	6.07	324	21.92	346	7.31
304	2.54	325	6.69	347	8.48
305	4.51	326	3.84	348	2.6
306	2.41	327	6.88	349	10.08
307	4.5	328	6.23	350	3.84
308	4.25	329	13.84	351	5.02
309	4.73	330	18.39	352	4.2
310	3.75	331	11.33	353	4.95
311	2.73	332	3.48	354	23.75
312	4.89	333	11.46	355	3.94
313	2.37	334	25.22	356	3.88
314	4.69	335	4.33	357	2.44
315	14.43	336	8.68	358	18.55
316	10.9	337	2.67	359	16.98
317	6.65	338	0.48	360	4.5
318	15.93	339	11.75	361	4.12
319	13.25	340	5.12	362	3.75
320	17.8	341	4.01	363	3.94

Tabla 13: Determinación de la actividad hemolítica del extracto crudo de la toxina alfa hemolisina sobre glóbulos rojos al 2.5%.

Muestra	% Hemólisis	Muestra	[] ug/mL	Muestra	% Hemólisis
300	4.34	321	7.32	342	4.34
301	4.61	322	4.74	344	6.10
302	4.61	323	9.89	345	4.07
303	5.42	324	11.79	346	13.41
304	3.66	325	3.79	347	5.56
305	4.51	326	5.15	348	4.47
306	4.47	327	6.91	349	5.69
307	4.34	328	3.66	350	7.32
308	3.52	329	8.94	351	5.01
309	4.20	330	6.23	352	7.45
310	8.27	331	5.15	353	5.83
311	4.20	332	4.61	354	7.99
312	4.61	333	4.47	355	5.56
313	1.27	334	5.01	356	4.07
314	4.74	335	5.28	357	5.28
315	4.88	336	4.88	358	7.86
316	4.61	337	4.07	359	5.42
317	5.28	338	3.39	360	5.56
318	4.88	339	4.74	361	4.07
319	4.61	340	4.74	362	4.34
320	7.59	341	3.79	363	4.34

Tabla 14: Determinación de la actividad citotóxica del extracto crudo de la toxina alfa-hemolisina sobre células endoteliales.

Muestra	% Citotoxicidad	Muestra	% Citotoxicidad	Muestra	% Citotoxicidad
300	0.05	321	13.79	342	1.2
301	0.03	322	3.45	344	2.60
302	3.95	323	43.35	345	0.03
303	0.02	324	4.43	346	3.94
304	0.04	325	2.96	347	0.02
305	12.99	326	18.72	348	0.06
306	63.58	327	0.99	349	23.65
307	0.01	328	3.45	350	0.04
308	20.63	329	15.76	351	0.01
309	9.85	330	30.54	352	5.91
310	1.20	331	14.29	353	1.30
311	0.06	332	3.57	354	0.06
312	23.38	333	6.49	355	0.03
313	6.03	334	49.03	356	0.02
314	0.03	335	1.62	357	25.00
315	10.07	336	1.62	358	16.88
316	87.49	337	1.48	359	9.74
317	4.93	338	0.97	360	4.09
318	54.19	339	8.44	361	17.71
319	27.09	340	12.01	362	4.90
320	13.30	341	0.02	363	2.45

Tabla 15: Características de las cepas ambientales.

Muestra	Factor de virulencia										Clasificación	Formadora de biopelícula
	<i>kpsMII</i>	<i>sfaS</i>	<i>afa/Dr</i>	<i>vat</i>	<i>yfcV</i>	<i>fyuA</i>	<i>hlyA</i>	<i>fimH</i>	<i>cnfI</i>	<i>papC</i>		
1c	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	NP	0
1d	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	NP	0
1f	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	NP	0
2e	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	ExPEC	0
3e	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	UPEC	0
4d	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	UPEC	0
6a	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	NP	0
6b	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	ExPEC	0
9d	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	NP	0
9e	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	UPEC	0
10d	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	UPEC	0
11d	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	UPEC	0
12b	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	UPEC	0
12e	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	NP	0
13b	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	NP	0
15b	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	ExPEC	1
15d	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	NP	0
17c	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	NP	1
17e	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	NP	1
20d	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	NP	1
24a	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	NP	1
24b	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	NP	1
24d	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	NP	0
24e	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	NP	0
25a	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	NP	0
26a	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	NP	0

Muestra	Factor de virulencia										Clasificación	Formadora de biopelícula
	<i>kpsMII</i>	<i>sfaS</i>	<i>afa/Dr</i>	<i>vat</i>	<i>yfcV</i>	<i>fyuA</i>	<i>hlyA</i>	<i>fimH</i>	<i>cnfI</i>	<i>papC</i>		
26b	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	NP	1
26c	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	NP	1
26e	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	NP	0
30e	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	NP	0

1: presencia; 0: ausencia. NP: no patógeno. Tomado de (Ramírez-Castillo *et al.*, 2013).

Tabla 16: Prevalencia de los patrones de virulencia de los aislados ambientales.

Gen	Total de aislados	Porcentaje
<i>kpsMTII</i>	4	13.79
<i>fyuA</i>	6	20.69
<i>papC</i>	7	24.14
<i>sfaS</i>	7	24.14
<i>yfcv</i>	4	13.79
<i>cnfI</i>	1	3.45
<i>fimH</i>	20	68.97
<i>Afa/Dra</i>	8	27.59
<i>fimH-fuyA</i>	1	3.45
<i>fimH-kpsMTII</i>	3	10.34
<i>fimH-papC</i>	4	13.79
<i>fimH-sfaS</i>	4	13.79
<i>fimH-yfcv</i>	4	13.79
<i>fimH-cnfI</i>	1	3.45
<i>*fimH-afa/Dr</i>	5	17.24

El patrón de virulencia más frecuente para 2 genes fue *fimH-afa/Dra* (17.24%).

Tabla 14: Susceptibilidad antimicrobiana de los aislados ambientales.

Muestra	Antibiótico								S	I	R	MDR	Clasificación
	AM	AK	CAZ	CRO	LEV	NF	GE	TMP-SMX					
1c	S	S	S	S	S	S	S	S	10	0	0	0	S
1d	R	S	I	S	S	S	S	S	7	1	2	0	R
2e	S	S	S	S	S	S	S	S	10	0	0	0	S
3e	S	S	S	S	S	S	S	S	10	0	0	0	S
4d	S	S	S	S	S	S	S	S	10	0	0	0	S
6a	S	S	S	S	S	S	S	S	10	0	0	0	S
6b	S	S	S	S	S	S	S	S	10	0	0	0	S
9d	R	S	S	I	S	S	S	R	6	1	3	0	MDR
9e	S	S	I	S	S	S	S	S	9	1	0	0	S
10d	S	S	S	S	S	S	S	S	10	0	0	0	S
11d	R	S	I	S	R	I	R	R	4	2	4	1	MDR
12b	R	S	I	S	S	S	S	R	6	1	3	0	MDR
12e	S	S	S	S	S	I	S	S	9	1	0	0	S
13b	I	S	S	S	S	S	S	S	9	1	0	0	R
15b	R	R	R	S	S	S	S	R	5	0	5	1	MDR
15d	R	S	S	S	S	S	S	S	9	0	1	0	R
17c	R	S	I	S	S	S	S	R	6	1	3	0	MDR
17e	R	S	I	S	S	R	R	R	4	1	5	1	MDR
20d	R	S	I	S	S	S	S	R	7	1	2	0	R
24a	R	S	S	S	S	R	S	R	7	0	3	0	MDR
24b	S	S	S	S	S	S	S	S	10	0	0	0	S
24d	S	S	S	I	S	S	S	S	9	1	0	0	S
24e	R	S	I	S	S	S	S	R	7	1	2	0	R
25a	S	S	S	S	S	S	S	S	10	0	0	0	S
26a	S	S	S	S	S	S	S	S	10	0	0	0	S

Muestra	Antibiótico								S	I	R	MDR	Clasificación
	AM	AK	CAZ	CRO	LEV	NF	AM	AK					
26b	S	S	S	S	S	S	S	S	10	0	0	0	S
26c	S	S	S	S	S	R	S	I	7	1	2	0	R
26e	S	S	I	S	S	S	S	I	7	2	1	0	R
30e	S	S	I	S	S	S	S	S	9	1	0	0	S

GE: Gentamicina; **CAZ:** Ceftazidima; **CRO:** Ceftriaxona; **AM:** Ampicilina; **AK:** Amikacina; **LEV:** Levofloxacino; **TMP-SMX:** Trimetoprima/sulfametoxazol; **NF:** Nitrofurantoína. **S:** sensible; **R:** resistente; **I:** intermedio. **MDR:** Resistencia a tres o más antibióticos distintos. Tomado de (Ramírez-Castillo *et al.*, 2013).

