



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO

UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**“RELACIÓN ENTRE LOS GRUPOS FILOGENÉTICOS Y FACTORES DE
VIRULENCIA EN *Escherichia coli* UROPATÓGENA EN DOS LOCALIDADES
EN MÉXICO”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

P R E S E N T A:
LAURA IVETH MIRANDA ESTRADA

DIRECTORES:

DRA. NATIVIDAD CASTRO ALARCÓN

DR. JOSÉ MOLINA LÓPEZ

CHILPANCINGO, GRO., OCTUBRE DEL 2014



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

APROBACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 30 días del mes de junio de dos mil catorce, se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado de la Maestría en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada "Relación entre los grupos filogenéticos y factores de virulencia en *Escherichia coli* uropatógena en dos localidades de México", presentada por la alumna Laura Iveth Miranda Estrada, para obtener el Grado de Maestría en Ciencias Biomédicas. Después del análisis correspondiente, los miembros del comité manifiestan su aprobación de la tesis, autorizan la impresión final de la misma y aceptan que, cuando se satisfagan los requisitos señalados en el Reglamento General de Estudios de Posgrado e Investigación Vigente, se proceda a la presentación del examen de grado.

El Comité Tutorial

Dra. Natividad Castro Alarcón
Dirección de tesis

Dra. Berenice Illades Aguiar

Dra. Isela Parra Rojas

Dr. Marco Antonio Leyva Vázquez

Dr. José Molina López

Vó. Bo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
 UAGro
Coordinadora del Posgrado en Ciencias Biomédicas

Dra. Isela Parra Rojas

Coordinadora del Posgrado en Ciencias Biomédicas

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
 UAGro
Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas

Vó. Bo

Dra. Amalia Vences Velázquez
Directora de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Investigación en Microbiología de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero.

Bajo la dirección de:

Dra. Natividad Castro Alarcón

Dr. José Molina López

Y la asesoría de:

Dra. Isela Parra Rojas

Dra. Berenice Illades Aguiar

Dr. Marco Antonio Leyva Vázquez

Con la colaboración del:

Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana del departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina de la UNAM.

Laboratorio de Patógenos Entéricos del departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina de la UNAM

M. en C. Armando Navarro Ocaña

AGRADECIMIENTOS

Principalmente agradezco a Dios por haberme dado la oportunidad de haber concluido otra etapa más en mi vida; y a todas aquellas personas que de alguna u otra manera me han ayudado para realizar mis estudios de maestría.

Agradezco a la Dra. Natividad Castro Alarcón por la orientación y supervisión brindada; al Dr. José Molina López por aceptar colaborar en este estudio y por las aportaciones hechas al mismo.

A mis padres Joel Miranda Salgado y Esmeralda Estrada Espinoza por su amor incondicional y todas sus enseñanzas.

Quisiera hacer extensiva mi gratitud a las familias Leyva Miranda y Castillo Sosa por la hospitalidad brindada, gracias por haberme recibido y tratado como una más de sus hijas; siempre lo tendré presente.

A mis amigos Marco, Tere, Romina y Laura gracias por el apoyo que me brindaron en todo momento.

Durante los estudios de maestría conté con el apoyo financiero de la beca CONACYT, la cual me permitió ocuparme de tiempo completo en la realización de mi trabajo de tesis. Cabe mencionar que para la realización de este trabajo se contó con el apoyo del proyecto “Fortalecimiento de los cuerpos Académicos del Área Biomédica para contribuir a la mejora de la Docencia, Investigación, Posgrado y Vinculación en la Universidad Autónoma de Guerrero” clave 204753 financiado por CONACYT.

Asimismo, parte de la realización de este trabajo fue gracias al financiamiento por parte del CONACYT al proyecto número 166004, titulado “Papel de plásmidos e integrones en la multirresistencia a antimicrobianos en cepas de *Escherichia coli* uropatógena y su posible asociación con adherencia e invasividad en células cultivadas”. Se agradece la colaboración de la química Graciela Martínez Arriaga de la Clínica número 61 del Instituto Mexicano del Seguro Social, por haber proporcionado las cepas de *Escherichia coli* utilizadas en este estudio.

ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
MATERIAL Y MÉTODOS.....	7
RESULTADOS.....	12
DISCUSIÓN.....	20
CONCLUSION.....	25
REFERENCIAS.....	26

RESUMEN

Introducción. *Escherichia coli* uropatógena (UPEC) es el principal agente causal de infecciones del tracto urinario (ITU) y sus factores de virulencia son los responsables de la gravedad de estas infecciones emergentes. El objetivo de este estudio fue evaluar la relación entre los determinantes de virulencia, susceptibilidad a antibióticos y los grupos filogenéticos de *Escherichia coli* uropatógena en dos localidades en México. **Métodos:** Se analizaron un total de 107 aislamientos de *Escherichia coli*, 50 pertenecientes a una localidad en el centro del país y 57 provenientes de una localidad al suroeste. Los aislamientos fueron caracterizados fenotípicamente (serotipificación, ensayos de adherencia, formación de biopelícula, producción de hemolisina y susceptibilidad antibióticos) y genotípicamente (grupos filogenéticos y genes de virulencia). **Resultados:** El serotipo O25:H4 (16.8%) fue el más frecuente en ambas localidades. En la localidad en el centro del país el grupo filogenético B2 (54%) fue el más predominante y presentó mayor frecuencia de los genes *fimH* (96%), *iutA* (66%) y *sat* (36%) en comparación con la localidad en el suroeste donde el grupo A (40.4%) fue el más frecuente y presentó menor cantidad de genes de virulencia. Se encontró una mayor prevalencia de cepas con un porcentaje de hemólisis alto y mayor producción de biopelícula en la localidad en el centro del país. La resistencia a ampicilina (92,5%), tetraciclina (76,6%) y trimetoprim/sulfametoxazol (70,1%) fueron los más comunes en ambos grupos. No se encontraron diferencias en las dos localidades respecto a los genes *papC*, *cnf1* y *hlyA*. **Conclusión:** Los aislamientos de UPEC pertenecen al grupo filogenético B2, seguido del grupo A, lo que confirma que cepas comensales pueden también ser causa de infecciones del tracto urinario. De las dos localidades evaluadas, los aislamientos en la localidad en el centro del país presentaron mayor cantidad de genes de virulencia. Se observó una alta resistencia a los antimicrobianos comúnmente usados para el tratamiento de las ITU, lo que complica y disminuye las opciones terapéuticas causando persistencia y diseminación de los microorganismos en la comunidad. **Palabras clave:** *Escherichia coli* uropatógena, infección del tracto urinario, grupos filogenéticos, factores de virulencia, resistencia a antibióticos.

ABSTRACT

Introduction. Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) is the major causative agent of urinary tract infections (UTI) and virulence factors are responsible for the severity of these emerging infections. The aim of this study was to evaluate the relationship between virulence determinants, antibiotic susceptibility and phylogenetic groups of uropathogenic *Escherichia coli* at two locations in Mexico. **Methods** A total of 107 isolates of *E. coli*, 50 belonging to a locality in the center of the country and 57 from a town southwest analyzed. The isolates were characterized phenotypic (serotyping assays, *in vitro* adhesion, biofilm formation, production of hemolysin and antibiotic susceptibility) and genotypic (phylogenetic groups and virulence genes). **Results:** Serotype O25: H4 (16.8%) was the most frequent in both locations. In the locality in center of the country the phylogenetic group B2 (54%) was the most prevalent and had a higher frequency of genes *fimH* (96%), *iutA* (66%), *sat* (36%) compared the southwest locality where the group A (40.4%) was the most frequent and present fewer virulence genes. A higher prevalence of strains found a high percentage of hemolysis and increased production of biofilm in the center of the country. Ampicillin resistance (92.5%), tetracycline (76.6%) and trimethoprim/sulfamethoxazole (70.1%) were the most common in both groups. No differences in the two locations regarding genes *papC*, *cnf1* and *hlyA* were found. **Conclusion:** UPEC isolates belonging to the phylogenetic group B2, followed by the group A, which confirms that commensal strains can also cause urinary tract infections, of the two localities evaluated; isolates in the center of the country had a higher number of virulence genes. High resistance to antimicrobials commonly used to treat UTIs was observed which complicates treatment options and decreases causing persistence and spread of microorganisms in the community.

Keywords: *uropathogenic Escherichia coli*, *urinary tract infection*, *phylogenetic groups*, *virulence factors*, *antibiotic resistance*.

INTRODUCCIÓN

La infección del tracto urinario (ITU) representa una de las enfermedades más comunes adquiridas en la población en general. Debido a diferencias anatómicas, las ITU son significativamente más frecuentes en mujeres que en hombres. Se estima que la mitad de las mujeres tendrán al menos un episodio de infección urinaria a lo largo de su vida. La alta incidencia de las ITU representa altos costos financieros, en los Estados Unidos se estima que el costo anual para el tratamiento de las ITU adquiridas en la comunidad aproximadamente es de \$1.6 billones de dólares (Foxman, 2003). *Escherichia coli* uropatógena (UPEC) es el agente causal más común de las ITU, incluyendo cistitis, uretritis, prostatitis y pielonefritis (Mao *et al.*, 2011; Hernández *et al.*, 2007). Normalmente, *E. coli* establece una relación simbiótica con su huésped y tiene una función importante en la promoción de la estabilidad de la microbiota normal intestinal, quedando confinado en el lumen intestinal y por lo tanto, raramente provocando enfermedad. Las cepas patógenas de *E. coli* se han clasificado en entéricas (diarrogénicas) y en extraintestinales (ExPEC), las infecciones extraintestinales causadas por *E. coli* son la mayor causa de morbilidad, mortalidad y altos costos asociados a la salud (Narciso *et al.*, 2011). Las infecciones urinarias son el resultado de la interacción entre factores de virulencia de los microorganismos y factores biológicos del individuo infectado (Hernández *et al.*, 2007), estos factores de virulencia en las cepas UPEC son de dos tipos principales: Aquellos expresados en la superficie celular y que desempeñan funciones de adhesión e invasión de tejidos además de formación de biopelículas e inducción de citocinas, y los producidos dentro de la célula bacteriana y que son exportados al sitio de infección (Emódy *et al.*, 2003). Los genes asociados a la virulencia se pueden encontrar codificados en islas de patogenicidad (PAIs), los aislamientos de UPEC pueden contener más de una PAIs (Smith *et al.*, 2008). Entre los factores de virulencia más importantes en la patogénesis de UPEC se encuentra la α -hemolisina (HlyA), el factor citotóxico necrotizante tipo 1 (CNF1), la adhesina FimH, la toxina secretada autotransportadora (Sat), la fimbria P y diversos sistemas de adquisición de hierro entre ellos la aerobactina (IutA) (Emódy *et al.*, 2003; Slavchev *et al.*, 2009).

Las diferencias entre *E. coli* patógenas y comensales se correlacionan con sus antecedentes filogenéticos, dividiendo a las cepas de *E. coli* en cuatro grupos: A, B1, B2 y D. Así, las cepas ExPEC, incluyendo las infecciones urinarias y la sepsis, derivan principalmente del grupo B2 y en menor proporción del grupo D, y poseen gran número de determinantes de virulencia que promueven funciones patogénicas (adherencia, evasión a los mecanismos de defensa del huésped, adquisición de hierro, invasión celular). Mientras que los comensales derivan de los grupos A y B1 y poseen pocos determinantes de virulencia (Moreno *et al.*, 2006).

El establecimiento de la infección por patógenos bacterianos requiere la adhesión a las células huésped, la colonización de los tejidos, y en ciertos casos, la invasión celular o la persistencia. La adhesión específica está mediada por la adhesina FimH, la cual se encuentra en el extremo distal del pili tipo 1 y media la adherencia de la bacteria a una serie de glucoproteínas del huésped y epítopes peptídicos no glicosilados, incluyendo IgA secretora, proteínas unidas a glicofosfatidilinositol CD48, miembros de la familia de moléculas de adhesión celular relacionados al antígeno carcinoembrionario (CEACAM), proteínas Tamm-Horsfall, moléculas de adhesión leucocitaria CD11b y CD18, $\alpha 3$ y $\beta 1$ integrinas, uroplaquina 1a (UP1a) y proteínas de la matriz extracelular, laminina y fibronectina (Weichhart *et al.*, 2008; Dhakal *et al.*, 2008). Esta fimbria es expresada en más de un 90% en todos los aislamientos de *E. coli*, incluyendo tanto cepas patógenas como comensales, distribuyéndose por toda la superficie de la bacteria. La unión de FimH a receptores uroplaquina manosilados en el epitelio de la vejiga conduce a la internalización de la bacteria, formando comunidades bacterianas intracelulares (CBI). Estudios recientes en modelos murinos han demostrado que UPEC en cistitis utiliza un ciclo patogénico multietapa, en el cual, la bacteria progresa a través del nicho intracelular dentro de las células epiteliales de la vejiga; este nicho intracelular conduce a la replicación de UPEC y a la formación de CBI (Anderson *et al.*, 2004; Rosen *et al.*, 2007). El pili P (pili asociado a pielonefritis) se ha encontrado aproximadamente en el 80% de los aislamientos causantes de ITU altas (Yamamoto, 2007), los genes que codifican las distintas subunidades estructurales de las fimbrias P, así como las proteínas que

participan en su ensamblaje se encuentran codificadas por el operón pap. PapC es una proteína de membrana externa que forma un poro a través del cual el pili es traslocado al exterior (Slavchev *et al.*, 2009).

Tres tipos de toxinas son producidas por UPEC, la α -hemolisina, el factor citotóxico necrotizante tipo 1 (CNF1) y la toxina secretada autotransportadora Sat. La α -hemolisina (HlyA), también denominada “toxina formadora de poros” se inserta dentro de la membrana celular del huésped provocando lisis celular, facilitando la liberación de hierro y nutrientes que son esenciales para el crecimiento bacteriano, es codificada por el operón hlyCABD y es activa contra muchos tipos celulares, incluyendo células uroepiteliales. Se ha demostrado que concentraciones subléxicas de HlyA pueden modular una variedad de vías de señalización en el huésped, incluyendo la estimulación transitoria de oscilaciones de calcio, la activación de MAP quinasa, y la alteración de la fosforilación de histonas y patrones de acetilación e inactivación de Akt, la cual tiene una función principal en la progresión del ciclo celular, metabolismo y tráfico vesicular (Wiles *et al.*, 2009). El CNF1 conduce a una activación constitutiva de los miembros de la familia Rho, resultado en el rearrreglo del citoesqueleto de la célula huésped, provocando apoptosis de las células de la vejiga estimulando su exfoliación *in vivo* (Mills *et al.*, 2000). La toxina Sat, es una serina proteasa que se encuentra clasificada dentro de la familia de las serina proteasa autotransportadora de Enterobacteriaceae (SPATE), la cual se encuentra predominantemente en cepas de UPEC y se caracteriza por tener efectos citopáticos en riñón y vejiga, esta toxina tiene la habilidad para inducir vacuolización dentro del citoplasma de células humanas del tracto urinario (Guyer *et al.*, 2000; Zalewska, 2011).

Una forma de clasificar a las cepas de *E. coli* se basa en la presencia de ciertos antígenos: antígeno O (somático), K (capsular) y H (flagelar). Diversos antígenos O se han asociado con cepas típicas de UPEC: CFT073 (O6), 536 (O6), UTI89 (O18), J96 (O4), y F11 (O6), (Wiles *et al.*, 2009). Asimismo se han asociado 10 serogrupos “O” de *E. coli* con cepas UPEC: O1, O2, O4, O6, O7, O8, O16, O18, O25 y O75 (Bidet *et al.*, 2007, Ananías y Yano, 2008).

El manejo clínico de las ITU es complicado debido al incremento en la incidencia de infecciones causadas por cepas de *E. coli* que son resistentes a los antibióticos comúnmente utilizados y son productores de biopelículas (Molina *et al.*, 2011; Ponnusamy *et al.*, 2012), el trimetoprim/sulfametoxazol, las fluoroquinolonas, los antibióticos del tipo betalactámico, la nitrofurantoína y la fosfomicina son los antibióticos más comunes usados en el tratamiento de las ITU (Moura *et al.*, 2009), es importante mencionar algunos factores que deberían ser considerados antes de seleccionar el tratamiento para una ITU no complicada como: la prevalencia de la resistencia entre uropatógenos, la farmacocinética, si el fármaco es activo a pH urinario y el efecto del uso del antibiótico sobre la microbiota fecal y vaginal. Recientemente una clona de *E. coli*, O25-ST131, productora de betalactamasas de espectro extendido, multirresistentes y con alta virulencia ha emergido a nivel mundial como una causa importante de las ITU adquiridas en la comunidad (Molina *et al.*, 2011).

A pesar de la identificación de múltiples genes asociados a la virulencia en cepas de UPEC, no ha sido posible determinar un perfil de urovirulencia; dado que la mitad de todos los aislamientos de UPEC no contienen ninguno o sólo uno de los determinantes de virulencia identificados (Marrs *et al.*, 2005; Moreno *et al.*, 2006; Alteri y Mobley, 2012; Jadhav *et al.*, 2011). El objetivo de este estudio fue evaluar la relación entre determinantes de virulencia (serotipificación, capacidad de adherencia, producción de biofilm y toxinas) y perfil de resistencia con los grupos filogenéticos de *E. coli* en aislamientos de infecciones del tracto urinario de pacientes ambulatorios en dos localidades en México.

MATERIAL Y MÉTODOS

Aislamientos bacterianos. Durante el periodo comprendido de Septiembre 2010 a Agosto 2011, se recuperaron 107 aislamientos clínicos de *E. coli* a partir de muestras de orina de pacientes con infecciones del tracto urinario adquiridas en la comunidad, provenientes de dos hospitales en México: el hospital del ISSSTE en Chilpancingo Guerrero y la clínica número 61 del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), ubicados en dos localidades al suroeste y centro del país respectivamente. Los urocultivos fueron procesadas por métodos convencionales y se incluyeron las muestras con cuenta viable $>10^5$ UFC/ml. Los aislamientos clínicos fueron identificados por el sistema semiautomatizado API20E y pruebas bioquímicas.

Pruebas de susceptibilidad. Las pruebas de susceptibilidad a antibióticos se llevaron a cabo por el método de difusión en disco, siguiendo las indicaciones del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI). Se utilizaron discos con ampicilina (10 μ g/ml), amoxicilina/ácido clavulánico (20/10 μ g/ml), meropenem (10 μ g/ml), fosfomicina (200 μ g/ml), cefuroxima (30 μ g/ml), cefotaxima (30 μ g/ml), ceftriaxona (30 μ g/ml), ceftazidima (30 μ g/ml), cefepime (30 μ g/ml), amikacina (30 μ g/ml), tobramicina (10 μ g/ml), gentamicina (10 μ g/ml), ácido nalidíxico (30 μ g/ml), norfloxacin (10 μ g/ml), ciprofloxacina (5 μ g/ml), ofloxacina (5 μ g/ml), trimetoprim/sulfametoxazol (1.25/23.75 μ g/ml), tetraciclina y nitrofurantoína (30 μ g/ml). La cepa de *E. coli* ATCC 25922 fue utilizada como control de susceptibilidad. Los aislamientos con resistencia a tres o más clases de antibióticos fueron considerados multirresistentes.

Ensayo de hemolisina. La capacidad hemolítica de los aislamientos fue evaluada por el método propuesto por Scheffer *et al.*, (1988) con algunas modificaciones. Se inoculó cada uno de los aislamientos en 3 ml de caldo infusión cerebro corazón (BHI) y se incubaron a 37°C durante 24 horas a 150 rpm, posteriormente se tomaron 100 μ L del cultivo y se inocularon en 3 ml de caldo BHI hasta alcanzar una concentración de 6×10^8 células (estándar 2 de McFarland). Se incubaron 0.1 ml del cultivo con 0.9 ml de una suspensión de eritrocitos de carnero al 2% en buffer (20 mM 20 mM CaCl₂, 10 mM Tris y 140 mM NaCl, pH 7.4) durante 30 minutos a 37°C; transcurrido el tiempo, los tubos

fueron colocados 20 minutos en hielo y centrifugados a 3500 rpm durante 20 minutos. Finalmente se determinó la liberación de hemoglobina a 530 nm. Los resultados fueron expresados en porcentaje de lisis comparado con los eritrocitos lisados en agua destilada.

Producción de Biofilm. La capacidad de formación de biofilm fue determinada por el método cuantitativo en microplacas de poliestireno de 96 pocillos, según lo descrito por Danese y cols., (1990) con algunas modificaciones. De cultivos frescos se inocularon 5 colonias en 3 ml de caldo BHI y se incubaron durante 4 horas a 37°C. Se realizó la cuantificación del crecimiento microbiano a 630 nm y se inocularon nuevos caldos de BHI ajustando la concentración a una densidad óptica de 0,15 a 630 nm; posteriormente se incubaron durante 24 horas a 37°C. Para la técnica de microdilución, se tomaron 20 µl del cultivo y se agregaron a cada uno de los pocillos de la placa con 180 µl de medio Luria Bertoni (LB) suplementado con 5% de glucosa. La placa se incubó durante 24 horas a 30°C; se cuantificó el crecimiento bacteriano de cada pocillo con ayuda del lector de microplacas a 630 nm, se removió el sobrenadante de cultivo y se realizaron dos lavados con una solución 5 mM de buffer de fosfato (PBS) estéril. Se dejó secar por 30 minutos para posteriormente teñir con cristal violeta al 1% durante 15 minutos, agregando 200 µl del colorante a cada pocillo, se retiró el colorante con ayuda de una micropipeta y se realizaron dos lavados con PBS 5 mM, la placa se dejó secar por 20 minutos. Para desprender el colorante adherido a biofilm, se agregaron 200 µl de etanol al 96% y se dejó reposar durante 10 minutos. Las lecturas fueron realizadas a una densidad óptica de 570 nm en un lector de Elisa (Awareness Stat Fax 2100). Para cuantificar biofilm, se tomó en cuenta la densidad óptica del crecimiento (DOc) y la del cristal violeta (DOcv) (Niu y Gilbert, 2004).

Serotipificación. Se llevó a cabo por aglutinación en microplaca con antisueros preparados en conejo contra los 187 antígenos somáticos y 56 sueros monovalentes de antígenos flagelares. Los aislamientos fueron cultivados en medio agar soya tripticasa (TSA) para el antígeno somático y en medio semisólido de Craige para el antígeno flagelar (Orskov *et al.*, 1975).

Ensayos de adherencia. Para el ensayo de adherencia se utilizó la línea celular Vero. Las cepas se sembraron en 3 ml de triptona al 1% durante 18 horas, posteriormente se centrifugaron a 2000 rpm/15 minutos; se eliminó el sobrenadante de cultivo y se resuspendió el botón bacteriano en 1 ml de PBS. Se colocaron 850 µl del medio Medio Mínimo esencial de Eagle (MEM) sin antibiótico, 100 µl de D-manosa (1%) y 50 µl de la suspensión bacteriana (2.5×10^8) en tubo de ensayo para posteriormente ser agregado a la placa. En cada uno de los pozos de la placa se colocó un cubreobjetos de vidrio de 10 mm de diámetro, posteriormente se resuspendió la monocapa celular con tripsina y se sembraron 2.5×10^5 células en cada uno de los 24 pozos de la placa. Se eliminó el medio y se lavó con PBS 1x, a la monocapa celular se le agregó la suspensión bacteriana y se incubó a 37°C durante 3 horas, se realizaron 3 lavados con PBS para posteriormente fijar con metanol durante un minuto. Transcurrido el tiempo se realizó la tinción con Giemsa durante 20 minutos y se lavó 3 veces con agua destilada para quitar el exceso de colorante. Se agregó una mezcla acetona/xileno (50/50) durante un minuto. Para observar al microscopio se colocaron las lentes de cristal en un portaobjetos y se observaron en inmersión en un microscopio. Se consideró adhesión positiva cuando se encontró por lo menos el 10% de las células con más de 10 bacterias adheridas.

Extracción de DNA. Para la extracción de DNA, se utilizó el kit InstaGene Matrix™ (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Se adicionó 1 ml de agua destilada en un microtubo de 1.5 ml estéril, se colocaron de 2-3 colonias del cultivo y se mezcló con el agua en vórtex por 10s, se centrifugaron los tubos a 12 000 rpm, y se eliminó el sobrenadante. Se le adicionó 100 µl de la matriz de purificación InstaGene Matrix, los tubos se incubaron durante 20 minutos a 56°C y se mezcló durante 10 s en un vórtex. Posteriormente se colocaron los microtubos 8 minutos en ebullición. Se centrifugó a 12 000 rpm durante 3 minutos para finalmente separar el sobrenadante a un microtubo nuevo de 600 µl.

Determinación de grupos filogenéticos. Los grupos filogenéticos se determinaron por medio de la técnica de PCR multiplex utilizando tres marcadores de DNA (*chuA*, *yjaA* y el fragmento de DNA *TspE.4C2*); la

presencia combinada de los distintos fragmentos indicó el grupo filogenético al que pertenecen (Clermont *et al.*, 2000). La PCR fue realizada a un volumen de 20 μ l, conteniendo 2.5 μ l del buffer 10X, 20 pmol de cada primer, 1.5 mM de $MgCl_2$, 2mM de cada dNTPs, 2.5 U de Taq polimerasa (Life Technologies) y 200 ng de DNA genómico. La PCR fue realizada en un Termociclador Gene Amp® PCR System 2400 (Applied Biosystems, USA) bajo las siguientes condiciones: Desnaturalización por 5 minutos a 94°C, 30 ciclos de 30 segundos a 94°C 30 segundos a 55°C, y 30 segundos a 72°C y una extensión final de 7 minutos a 72°C.

Detección de genes de virulencia. Se utilizó una PCR múltiple para los genes *hlyA*, *fimH*, *papC*, *iutA* y PCR convencional simple para los genes *sat* y *cnf1*. Los oligonucleótidos utilizados se muestran en la tabla 1. La mezcla de reacción se realizó en un volumen final de 25 μ l conteniendo 2 μ l de ADN, 4 mM de $MgCl_2$, 0.08 mM de cada uno de los 4 dNTPs, 0.6 μ M de cada oligonucleótido y 2.5 U de Taq polimerasa (5 U/ μ l). Bajo las siguientes condiciones: Desnaturalización por 5 minutos a 94°C, 25 ciclos de 30 segundos a 94°C 63 °C/30 segundos y 68 °C/3 minutos; y una extensión final a 72°C /10 minutos. Para el gen *sat* se utilizó PCR convencional simple, la mezcla de reacción contuvo 3 μ l del buffer (10X), 0.9 μ l de $MgCl_2$ (50 mM), 0.6 μ l de dNTPs (2 mM), 3 μ l (10 μ M) de cada oligonucleótido, 0.15 μ l de Taq DNA polimerasa (5 U/ μ l), 3 μ l del templado de DNA y 16.35 μ l de H₂O para dar un volumen final de 25 μ l. Bajo las siguientes condiciones: Desnaturalización por 3 minutos a 94°C, 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, alineamiento a 58°C 1 minuto y una extensión final a 72° C /1minuto. Posteriormente se realizó la electroforesis en gel de agarosa (1.5%), a 100v durante 90 minutos. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y los amplificados fueron visualizados en un transiluminador ultra violeta.

Tabla 1. Oligonucleótidos para la identificación de factores de virulencia

Gen	Oligonucleótidos	Temperatura de alineamiento	Tamaño del producto amplificado	Referencia
<i>hlyA</i>	5'- AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT -3' 5'- ACCATATAAGCGGTCATTCCCGTCA -3'	63	1177	Johnson y cols., 2000
<i>fimH</i>	5'- TGCAGAACGGATAAGCCGTGG -3' 5'- GCAGTCACCTGCCCTCCGTA -3'	63	508	Johnson y cols., 2000
<i>papC</i>	5 GTGGCAGTATGAGTAATGACCGTTA-3' 5'- ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA-3'	63	200	Johnson y cols., 2000
<i>iutA</i>	5'-GGCTGGACATCATGGGAAGTGG-3' 5'-CGTCGGGAACGGGTAGAATCG-3'	63	302	Johnson y cols., 2000
<i>cfn1</i>	5'- AAGATGGAGTTTCCTATGCAGGAG-3' 5'- CATTGAGAGTCCTGCCCTCATTATT-3'	63	498	Johnson y cols., 2000
<i>sat</i>	5'- ACTGGCGGACTCATGCTGT--3' 5'- AACCTGTAAGAAGACTGAGC-3	55	387	Ruiz y cols., 2002

Análisis estadístico. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el paquete estadístico STATA v.11.0. La distribución de las variables se reportó en base a sus frecuencias de aparición; las comparaciones de la producción de biofilm se realizaron con la prueba U de Mann-Whitney. Para comparar las frecuencias obtenidas de los genes de virulencia, adherencia y hemolisina se utilizó el test de chi cuadrado (χ^2) y la prueba exacta de Fisher según su aplicabilidad. Se consideraron como significativos los valores de $p \leq 0.05$.

RESULTADOS

Características fenotípicas

Del total de aislamientos de *E. coli* causantes de infecciones urinarias, 57(53.3%) pertenecieron a una localidad en el suroeste de México y 50 aislamientos (46.7%) a una localidad en el centro del país. Las características fenotípicas evaluadas fueron: capacidad lítica, producción de biofilm, adherencia, y resistencia antimicrobiana (Tabla 2).

Tabla 2. Características fenotípicas de los aislamientos de *E.coli* en dos localidades en México

Características	No.(%) de aislamientos			Valor P ^a
	Total N=107	Suroeste N=57	Centro N=50	
Hemólisis (% lisis)				
Bajo	35(32.7)	7(12.3)	28(56)	<0.001
Moderado	37(34.6)	30(52.6)	7(14)	
Alto	35(32.7)	20(35.1)	15(30)	
Producción de Biofilm*	1.04(0.17)	1.4(0.3)	0.71(0.15)	<0.001[†]
Adherencia				0.152
Negativa	43(40.2)	18(31.6)	25(50)	
Positiva	59(55.1)	36(63.2)	23(46)	
Desprendimiento celular	5(4.7)	3(5.3)	2(4)	
Resistencia				
Ampicilina	99(92.5)	49(86)	50(100)	0.006
Amoxicilina/Ácido clavulánico	47(43.9)	24(42.1)	23(46)	0.685
Cefuroxima	67(62.6)	32(56.1)	35(70)	0.139
Cefotaxima	19(17.8)	14(24.6)	5(10)	0.049
Ceftriaxona	20(18.7)	14(24.6)	6(12)	0.096
Ceftazidima	61(57)	14(24.6)	47(94)	<0.001
Cefepime	17(15.9)	12(21)	5(10)	0.119
Amikacina	15(14)	11(19.3)	4(8)	0.093
Tobramicina	30(28)	16(28.1)	14(28)	0.994
Gentamicina	35(32.7)	23(40.4)	12(24)	0.072
Ácido nalidíxico	68(63.5)	30(52.6)	38(76)	0.012
Norfloxacin	40(37.4)	17(29.8)	23(46)	0.084
Ciprofloxacina	49(45.8)	24(42.1)	25(50)	0.413
Ofloxacina	31(29)	17(29.8)	14(28)	0.836
Fosfomicina	9(8.4)	4(7)	5(10)	0.579
Trimetoprim/sulfametoxazol	75(70.1)	43(75.4)	32(64)	0.197
Tetraciclina	82(76.6)	48(84.2)	34(68)	0.048
Nitrofurantoína	14(13.1)	12(21.1)	2(4)	0.009

^aPrueba de χ^2 . [†] Prueba de U de Mann-Whitney; *Media geométrica (Error estándar).

Al tomar en consideración la localidad de origen, los aislamientos en la localidad al suroeste, presentaron significativamente mayor capacidad lítica y producción de biofilm ($p < 0.001$) en comparación con los aislamientos en la localidad en el centro del país.

Los ensayos de adherencia en células Vero en cultivo mostraron que 59 cepas (55.1%) fueron positivas, 43 aislamientos (40.2) resultaron negativos y 5 aislamientos (4.7%) ocasionaron desprendimiento celular. El patrón de adherencia en general fue de tipo agregativo (Figura 1).

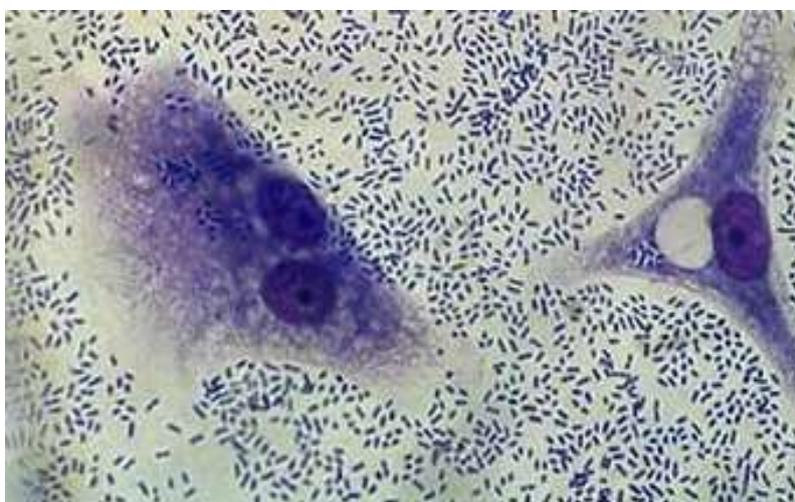


Figura 1. Adherencia de *E. coli* a células Vero. Microscopía óptica. Bacterias adheridas a la membrana plasmática (Objetivo 100X).

El mayor porcentaje de resistencia se detectó frente a ampicilina (92.5%), tetraciclina (76.6%) y trimetoprim/sulfametoxazol (70.1%). Al evaluar localidad y resistencia se encontró una diferencia estadísticamente significativa en la resistencia a ampicilina, cefotaxima, ceftazidima, ácido nalidíxico, tetraciclina y nitrofurantoína entre las dos localidades. La mayor resistencia a ampicilina, ceftazidima y ácido nalidíxico la presentaron los aislamientos provenientes de la localidad en el centro del país, en comparación con la localidad al suroeste que presentó mayor resistencia a tetraciclina y nitrofurantoína (Tabla 2).

Tipificación serológica

Los resultados serológicos mostraron para el antígeno “O” que de 107 aislamientos analizados, 77 (72%) fueron tipificables, 21 (19.6%) fueron no tipificables y 9 aislamientos (8.4%) presentaron un fenotipo rugoso. Los aislamientos “O” tipificables se distribuyeron en 43 serotipos diferentes, entre los cuales el serotipo más frecuente fue el O25:H4 con 18 aislamientos (16.8%), 6 (10.5%) en la localidad al suroeste y 12 (24%) en la localidad en el centro del país. Para el antígeno “H” se encontró que 70 aislamientos (65.4%) fueron tipificables, 10 (9.3%) fueron no móviles y 27 aislamientos (25.2%) fueron no tipificables. Se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre serotipo y localidad (P=0.002).

Grupos filogenéticos

Del total de aislamientos el grupo B2 (36.5%) fue el más predominante comparado con los otros grupos. Se encontró una mayor frecuencia de aislamientos pertenecientes al grupo A (40.4%) en la localidad al suroeste, en contraste con la localidad en el centro del país donde el grupo filogenético B2 fue el más frecuente con un 54% (Tabla 3). No hubo diferencia significativa entre las localidades y el grupo D (P=0.192)

Tabla 3. Distribución de los grupos filogenéticos en dos localidades en México

Grupos filogenéticos	No. (%) de aislamientos de <i>E.coli</i>			P
	Total (N=107)	Suroeste (N=57)	Centro (N=50)	
A	33(30.8)	23(40.4)	10(20)	0.023*
B1	13(12.2)	13(22.8)	-	<0.001†
B2	39(36.5)	12(21.1)	27(54)	<0.001*
D	22(20.6)	9(15.8)	13(26)	0.192

* Prueba de χ^2 , † Prueba exacta de Fisher

Genes de virulencia

Los genes de virulencia más frecuentes independiente de la localización geográfica fueron *fimH* (86%) seguido por *iutA* (54.2%) y *sat* (26.2%); 4 aislamientos (3.7%) fueron positivos a los seis genes evaluados. La Figura 2 muestra la distribución de los genes de virulencia entre las cepas UPEC analizadas en las dos localidades en el país, los seis genes evaluados fueron encontrados en las dos localidades. Sin embargo, la carga de genes fue mayor en los aislamientos en la localidad al suroeste en comparación con los aislamientos en la localidad en el centro del país (U-test, $P=0.0152$). Cabe resaltar que en 8 aislamientos (7.5%) no se encontró ninguno de los seis genes de virulencia evaluados. En el ensayo de hemólisis todos los aislamientos positivos para *hlyA* presentaron actividad hemolítica. No se encontró asociación entre la presencia de genes de virulencia y la producción de biopelícula (datos no mostrados). Sin embargo, *papC* y *sat* se asociaron de manera significativa con la adherencia a células Vero en cultivo ($p<0.001$, $p=0.010$ respectivamente).

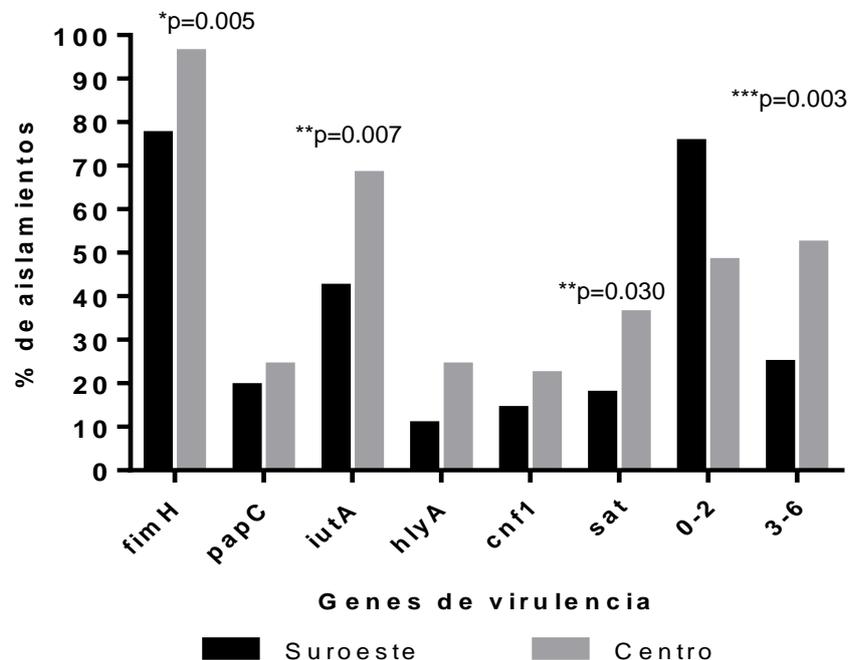


Figura 2. Frecuencia de genes de virulencia en cepas de *Escherichia coli* uropatógena en dos localidades en México. *Prueba exacta de Fisher; **Prueba de χ^2 . Únicamente se muestran los valores de p estadísticamente significativos ($p\leq 0.05$). ***Relación entre los grupos conteniendo de 0-2 genes y de 3-6 genes de virulencia.

Factores de virulencia, grupo filogenético y resistencia antimicrobiana

Al evaluar los determinantes fenotípicos de virulencia con los grupos filogenéticos se encontró que de los 35 aislamientos (32.7%) con un porcentaje de hemólisis alto, 18(46.1%) pertenecieron al grupo B2, 12 a los grupos A y D (18.2% y 27.3% respectivamente) y 5 (38.5%) al grupo B1. Los ensayos de adherencia mostraron que 59 aislamientos (55.1%) fueron capaces de adherirse a células Vero, de los aislamientos con fenotipo positivo, 36 (63.2%) se localizaron en la localidad al suroeste del país; el 64.4% se distribuyeron en los grupos B2 y A, 10 aislamientos (16.9 %) en el grupo B1 y 11 aislamientos (18.6%) en el grupo D.

Cuando la relación entre filogenia y genes de virulencia fue evaluada los aislamientos con mayor cantidad de genes pertenecieron al grupo filogenético B2, seguido del grupo D (Tabla 4). El gen *fimH* se distribuyó en todos los grupos (A 78.8%, B1 84.6%, B2 89.7%, D 90.9%). Se encontró mayor frecuencia de los genes *papC* y *sat* en el grupo D en comparación con los grupos A/B1. Los genes *iutA* y *cnf1* fueron significativamente más frecuentes en el grupo B2 en comparación al grupo D. Al comparar el grupo A con el B1 se encontró que los genes de *lutA* y *hlyA* se encontraron únicamente en los aislamientos pertenecientes al grupo A. No hubo diferencias significativas entre los grupos respecto al gen *fimH* ($p=0.505$).

Tabla 4. Distribución de genes de virulencia entre los grupos filogenéticos de *E.coli* uropatógena

Genes de virulencia	No. (%) de aislamientos			Valor P ^a		
	A/B1 (N=46)	B2 (N=39)	D (N=22)	A vs B1	A/B1 vs D	B2 vs D
<i>papC</i>	2(6.5)	15(38.5)	6(27.3)	0.485	0.006	0.320
<i>iutA</i>	14(25.9)	34(82.2)	10(45.5)	0.005	0.225	0.001
<i>cnf1</i>	1(4.3)	16(41)	2(9.1)	0.107	0.194	0.007
<i>Sat</i>	3(8.7)	19(48.7)	6(27.3)	0.840	0.018	0.079
<i>hlyA</i>	1(4.3)	14(35.9)	3(13.6)	0.526	0.060	0.051
<i>fimH</i>	37(80.4)	35(89.7)	20(90.9)	0.654	0.272	0.841

^a Prueba exacta de Fisher.

Los genes asociados a la virulencia se distribuyeron en 26 distintos perfiles. De los 8 aislamientos que no presentaron ningún gen de virulencia, 5 (15.1%) pertenecieron al grupo filogenético A, los tres restantes se distribuyeron en los grupos B1, B2 y D. En la localidad al suroeste los perfiles más frecuentes fueron *fimH* (31.6%), seguido por la combinación de *iutA* y *fimH* (19.3%); mientras que en la localidad en el centro del país los perfiles más frecuentes fueron *fimH* (24%) seguido por la presencia simultánea de *iutA*, *fimH* y *sat* (22%) (Datos no mostrados), se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre los perfiles de virulencia y el grupo filogenético B2 ($p < 0.001$). Del total de aislamientos, 92 (86%) fueron resistentes a más de tres clases antibióticos (beta-lactámicos, quinolonas, trimetoprim/sulfametoxazol, aminoglucósidos) fueron clasificados como multirresistentes (MDR). No se encontró asociación significativa entre MDR y grupos filogenéticos (Tabla 5). Al evaluar la producción de biofilm con la multirresistencia se observó que el 86% de los aislamientos productores de biofilm fueron multirresistentes. De los aislamientos MDR 35 (38%) pertenecieron al grupo filogenético B2, 28 (30.4%) al grupo A, 18 (19.6%) al grupo D y 11 (12%) al grupo B1. Cabe mencionar que el serotipo O25:H4 fue el más frecuente entre los aislamientos MDR con el 16.3%.

Tabla 5. Relación entre grupo filogenético, perfil de virulencia y multirresistencia en cepas UPEC

Grupo filogenético	Perfil de virulencia	Valor P ^a	MDR	NO MDR	Grupo filogenético vs MDR Valor P ^a
A	- <i>fimH</i> <i>sat</i> <i>iutA</i> <i>fimH, hlyA</i> <i>iutA, fimH</i> <i>iutA, fimH, papC</i> <i>iutA, fimH, sat</i>	0.051	28(30.4)	5(33.3)	0.822
B1	- <i>fimH</i> <i>papC</i> <i>fimH, cnf1</i> <i>fimH, sat</i>	0.087	11(12)	2(13.3)	0.880
B2	- <i>fimH</i> <i>papC</i> <i>fimH, papC</i> <i>iutA, cnf1</i> <i>iutA, fimH</i> <i>fimH, hlyA, cnf1</i> <i>iutA, fimH, cnf1</i> <i>iutA, fimH, sat</i> <i>iutA, sat, cnf1</i> <i>fimH, hlyA, cnf1</i> <i>iutA, fimH, sat, cnf1</i> <i>iutA, fimH, cnf1, papC</i> <i>iutA, fimH, hlyA, cnf1</i> <i>iutA, fimH, hlyA, papC</i> <i>iutA, fimH, hlyA, sat</i>	<0.001	35(38)	4(26.7)	0.396
D	- <i>fimH</i> <i>iutA, fimH</i> <i>iutA, fimH, papC</i> <i>iutA, fimH, sat</i> <i>fimH, hlyA, cnf1</i> <i>fimH, sat, papC</i> <i>hlyA, sat, papC</i> <i>iutA, fimH, sat, papC</i> <i>iutA, fimH, hlyA, sat</i>	0.433	18(19.6)	4(26.7)	0.528

^a Prueba exacta de Fisher.

La tabla 6 muestra la relación entre resistencia antimicrobiana y genes de virulencia. Se encontró una relación significativa entre la resistencia a norfloxacina y la presencia de la toxina *sat* ($p=0039$). La frecuencia del gen *fimH* fue significativamente mayor en los aislamientos resistentes a ampicilina, ceftazidima y tetraciclina 87.8%, 91.8% y 81.7% respectivamente, en comparación con los aislamientos susceptibles; el gen *iutA* se asoció con la resistencia a amoxicilina/ácido clavulánico, ceftazidima, ácido nalidíxico y norfloxacina. Cuando se analizó la producción de biofilm con la resistencia

antimicrobiana se encontró una diferencia estadísticamente significativa con la resistencia a ampicilina, ceftazidima, y ácido nalidíxico.

Tabla 6. Relación entre factores de virulencia y resistencia a antimicrobianos

Antibióticos	Factores genotípicos de virulencia (Valor <i>P</i> *)						Biofilm †
	<i>fimH</i>	<i>papC</i>	<i>iutA</i>	<i>sat</i>	<i>cnf1</i>	<i>hlyA</i>	
Ampicilina	0.047	0.252	0.085	0.329	0.197	0.597	0.019
Amoxicilina/Ácido clavulánico	0.741	0.065	0.003	0.101	0.004	0.033	0.595
Fosfomicina	0.793	0.080	0.433	0.433	0.029	0.174	0.174
Cefuroxima	0.169	0.771	0.140	0.832	0.321	0.497	0.597
Cefotaxima	0.330	0.959	0.879	0.576	0.679	0.587	0.100
Ceftriaxona	0.117	0.305	0.283	0.895	0.347	0.081	0.904
Ceftazidima	0.046	0.597	0.020	0.365	0.551	0.364	0.009
Cefepime	0.218	0.824	0.343	0.383	0.647	0.420	0.682
Amikacina	0.472	0.599	0.942	0.962	0.524	0.272	0.260
Tobramicina	0.622	0.416	0.106	0.574	0.705	0.261	0.602
Gentamicina	0.516	0.214	0.991	0.941	0.133	0.086	0.083
Ácido nalidíxico	0.758	0.429	0.004	0.055	0.572	0.190	0.008
Norfloxacin	0.727	0.771	0.003	0.039	0.957	0.885	0.228
Ciprofloxacina	0.627	0.801	0.180	0.603	0.879	0.900	0.858
Ofloxacina	0.688	0.488	0.073	0.667	0.782	0.309	0.888
Trimetoprim/sulfametoxazol	0.366	0.564	0.156	0.857	0.706	0.140	0.139
Tetraciclina	0.021	0.445	0.507	0.778	0.120	0.345	0.355
Nitrofurantoína	0.105	0.161	0.813	0.665	0.240	0.271	0.217

*Prueba de χ^2 ; † Prueba de U de Mann-Whitney

Al evaluar resistencia y grupo filogenético se encontró que los aislamientos pertenecientes al grupo filogenético B2 fueron más resistentes a ceftazidima ($p=0.009$) y norfloxacina ($p=0.031$).

DISCUSIÓN

En el presente estudio se evaluó la relación entre determinantes de virulencia, grupos filogenéticos y resistencia antimicrobiana de cepas UPEC en dos localidades en México. Se ha reportado que las cepas de *E. coli* causantes de ITU pertenecen en su gran mayoría a los grupos filogenéticos B2 y D, y poseen mayor cantidad de determinantes de virulencia en comparación con las cepas comensales pertenecientes a los grupos filogenéticos A y B1 (Clermont *et al.*, 2000; Duriez *et al.*, 2001). De las dos poblaciones estudiadas, los aislamientos de la localidad en el centro del país presentaron mayor cantidad de determinantes de virulencia, de los cuales el 54% pertenecieron al grupo filogenético B2; en comparación con la localidad al suroeste del país donde el grupo filogenético A fue el más frecuente (40.4%) y presentó menor cantidad de genes de virulencia; estos resultados no concuerdan con estudios previos realizados en México donde se encontró que la mayoría de los aislamientos asociados con ITU pertenecen al grupo filogenético B2 y en menor proporción al grupo D (López-Banda *et al.*, 2014). En un estudio realizado en la región de Faisalabad en Pakistán, se reportó que el 50% de los aislamientos de UPEC pertenecen al grupo B2, seguido de los grupos A y B1 (19%) (Bashir *et al.*, 2012); estos resultados confirman que cepas comensales pueden ocasionar ITU, consistente con la hipótesis que afirma que los aislamientos pertenecientes al grupo A adquieren genes de virulencia en el tracto gastrointestinal por transferencia horizontal y de esta manera pueden ser capaces de colonizar el tracto urinario (Moreno *et al.*, 2006; López-Banda *et al.*, 2014), además de que su prevalencia puede ser diferente en cada población dependiendo de las condiciones geográficas, dieta, uso de antibióticos y factores genéticos (Duriez *et al.*, 2001). Cabe resaltar que no se encontraron diferencias significativas en las dos poblaciones respecto al grupo filogenético D.

Se ha demostrado que el número de genes de virulencia en una cepa es proporcional a su potencial patógeno (Bien *et al.*, 2012; Wiles *et al.*, 2009); los genes *fimH*, *iutA* y *sat* fueron más frecuentes en la localidad en el centro del país con el 96%, 68% y 36% respectivamente. Del total de aislamientos el 7.5% no presentó ninguno de los seis genes de virulencia analizados, la carencia en

la carga de genes de virulencia en los aislamientos causantes de ITU ya ha sido reportada en otros estudios (Oliveira *et al.*, 2011), lo que refleja las complejas características de virulencia en cepas de UPEC. En general el 86% de todos los aislamientos presentaron el gen de *fimH*, su alta frecuencia indica su importancia en la etapa inicial de la infección; FimH reconoce a los receptores uroplaquina manosilados sobre la superficie de las células de la vejiga, facilitando la colonización bacteriana, invasión y formación de comunidades bacterianas intracelulares (Chen *et al.*, 2009). El pilus P asociado a pielonefritis media la adherencia de la adhesina PapG a los receptores sobre la célula huésped que contienen residuos Gal (α 1-4) Gal; PapC es una proteína de membrana externa esencial para la biogénesis del pilus P; en nuestro estudio no se encontraron diferencias significativas entre las dos poblaciones respecto a *papC*, el porcentaje observado fue del 21.5%, menor a lo reportado por López-Banda y cols., (2014) donde encontraron la presencia de *papC* en el 62% de los aislamientos. Nuestros resultados muestran que el 55.1% de los aislamientos fueron capaces de adherirse a células Vero, con una diferencia no significativa entre los aislamientos provenientes del centro y suroeste del país, el patrón de adherencia observado de manera general fue de tipo agregativo, el cual es característico de *E.coli* enteroagregativa (EAEC), Abe y cols., (2008) reportaron este fenotipo en el 6.9% de las cepas UPEC adherentes, los autores mencionan que es posible que algunos aislamientos de EAEC causen ITU, por lo que sería importante determinar características de virulencia de patotipos diarrogénicos en cepas UPEC. Diversos estudios realizados en otros países reportan a la α -hemolisina como la toxina más prevalente (Oliveira *et al.*, 2011; Ananías y Yano, 2008). En este estudio, Sat fue la más frecuente con un 26.2%. La toxina Sat, es una serina proteasa perteneciente a la familia de las SPATE que exhibe actividad citopática sobre células HEp-2 y Vero; a nivel renal se ha caracterizado por provocar vacuolización y daño glomerular (Bien *et al.*, 2012), la mayor frecuencia de la toxina en los aislamientos en el centro del país puede ser indicativo de infecciones en vías urinarias altas. Experimentos realizados en cultivo celular han mostrado que altos niveles de HlyA pueden causar la lisis osmótica de la célula huésped, mientras que concentraciones sublíticas de la toxina pueden modular las rutas de sobrevivida (Wiles *et al.*, 2008). Se ha demostrado que la HlyA tiene una función importante en el daño

al uroepitelio causando hemorragia en la vejiga durante las primeras etapas de la cistitis en modelos murinos (Smith *et al.*, 2008). La frecuencia de *hlyA* y *cnf1* (16.8% y 17.8% respectivamente) fue mayor en nuestro estudio en comparación a reportes previos en México realizados por López-Banda y cols., (2014) en donde la prevalencia registrada no alcanzó el 10% (7.4% y 6.5% respectivamente). La frecuencia de aislamientos con un porcentaje de hemólisis alto pertenecieron al grupo filogenético B2; además, no se encontraron diferencias significativas entre el gen *hlyA* y los grupos filogenéticos, lo que sugiere que la presencia de HlyA podría estar asociada con la severidad de las ITU (Bien *et al.*, 2012). La presencia combinada de *papC*, *cnf1* y *hlyA* es evidencia de la isla de patogenicidad II_{J96}, la cual ya ha sido reportada en cepas de *Escherichia coli* causantes de infecciones urinarias (Amanda *et al.*, 2009); en nuestro estudio la presencia simultánea de *papC*, *cnf1* y *hlyA* fue observada en nueve aislamientos; esta frecuencia es mayor a la reportada en otros países, la cual va de 2 a 4 aislamientos (Bashir *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2011). Se ha demostrado a través de modelos murinos que IutA es el receptor hidroxamato más importante durante la infección del tracto urinario por su contribución durante la colonización de la vejiga, por lo que es indispensable en la patogénesis de UPEC (García *et al.*, 2011). En México se encontró que de 108 aislamientos, 52 (48.1%) presentaron el gen *iutA* (López-Banda *et al.*, 2014). En nuestro estudio la aerobactina (*iutA*) fue encontrada en el 54.2% de todos los aislamientos; con mayor frecuencia en la localidad del centro del país pertenecientes al grupo filogenético B2, seguido por el grupo A.

El tratamiento antimicrobiano para las ITU generalmente es empírico, los antimicrobianos más comúnmente utilizados son: Fluoroquinolonas, trimetoprim/sulfametoxazol, cefalosporinas y penicilinas con o sin inhibidores de betalactamasas (López-Banda *et al.*, 2014; Oliveira *et al.*, 2011). La resistencia a ampicilina, tetraciclina, trimetoprim/sulfametoxazol y ácido nalidíxico fueron las más prevalentes (92.5%, 76.6%, 70.1% y 63.5% respectivamente), la resistencia observada fue mayor a lo reportado en México y otros países con frecuencias del 55% al 74% para ampicilina, del 61.3% al 74% para tetraciclina, del 44% al 60.1% para trimetoprim/sulfametoxazol y del 21% para ácido nalidíxico (Arredondo y Amábile, 2008; Oliveira *et al.*, 2011;

Jadhva *et al.*, 2011; Ponnusamy *et al.*, 2012; López-Banda *et al.*, 2014). Al evaluar resistencia y localidad se encontró que la resistencia a ampicilina, ceftazidima y ácido nalidíxico fue mayor en los aislamientos provenientes de la localidad en el centro del país, en comparación con los aislamientos en la localidad al suroeste, que presentaron mayor resistencia a tetraciclina, nitrofurantoína y cefotaxima. Se ha documentado que las bacterias formadoras de biofilm presentan un incremento en la resistencia a antimicrobianos y a la cronicidad de la infección, además de estar asociado con ITU recurrentes (Vollmerhausen y Katouli, 2014; Ejrnaes *et al.*, 2011); en nuestro estudio se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre la producción de biofilm y la resistencia a ampicilina, ceftazidima y ácido nalidíxico, la cual fue mayor en la localidad del centro del país, lo que puede indicar que la producción de biofilm puede estar involucrada en la resistencia a cefalosporinas de tercera generación y quinolonas (Soto *et al.*, 2006; Ponnusamy *et al.*, 2012). En México no se ha reportado una alta resistencia a nitrofurantoína. Sin embargo, en nuestro estudio se encontró que el 13.1% de los aislamientos fueron resistentes; este resultado no coincide con lo reportado por otros investigadores con porcentajes de resistencia que van del 5.1% al 7.4% (Arredondo y Amábile, 2008; Molina *et al.*, 2014). Los aislamientos en la localidad al centro del país fueron más susceptibles a nitrofurantoína (96%) y amikacina (92%); a diferencia de la localidad en el suroeste donde los aislamientos fueron más susceptibles a fosfomicina (93%). En lo que se refiere a las fluoroquinolonas (ciprofloxacina, norfloxacina y ofloxacina), la resistencia varió del 29 al 45.8%; en el caso de ciprofloxacina el porcentaje de resistencia fue de 45.8% menor a lo reportado anteriormente en México con un 62.3% (López-Banda *et al.*, 2014). Se ha documentado una asociación entre el grupo filogenético B2 y la resistencia a quinolonas y fluoroquinolonas (Basu *et al.*, 2013), en nuestro estudio se encontró un mayor porcentaje de aislamientos resistentes a norfloxacina en el grupo filogenético B2 ($P=0.031$). El 16.3% de los aislamientos MDR pertenecieron al serotipo O25:H4, el cual se ha relacionado con producción de betalactamasas de espectro extendido alrededor del mundo (Jadhav *et al.*, 2011), por lo que es necesario realizar estudios en el futuro para la determinación de enzimas betalactamasas y grupo clonal ST131.

Los resultados de resistencia indican que el tratamiento empírico inicial con ampicilina, quinolonas/fluoroquinolonas, cefalosporinas, tetraciclina y trimetoprim/sulfametoxazol pudieran no ser apropiados en las poblaciones estudiadas en México. Las cepas UPEC pertenecen principalmente a los siguientes serogrupos O1, O2, O4, O6, O8, O18, O25 y O75 (Ananías y Yano, 2008), los cuales en nuestro estudio fueron más frecuentes en un 42.1% frente a un 57.9% de otros serogrupos. El serotipo más frecuente fue el O25:H4 (16.8%), el cual ya ha sido reportado en México, indicando que este serotipo ha logrado extenderse en el país (Molina *et al.*, 2011). El serotipo O25:H4 se ha relacionado con la producción de betalactamasas de espectro extendido y resistencia a fluoroquinolonas en la comunidad (Molina *et al.*, 2011; Hussain *et al.*, 2012; Basu *et al.*, 2013). En nuestro estudio el 63.5% de los aislamientos fue resistente a ácido nalidíxico, por lo que decidimos evaluar la relación entre genes de virulencia y resistencia a ácido nalidíxico; se encontró una baja frecuencia de los genes *fimH*, *cnf1*, *papC* y *hlyA* (50% al 64.1%) en cepas resistentes; a diferencia de los genes *iutA* y *sat* (75.9% y 78.6% respectivamente), lo que concuerda con los determinantes de virulencia que han sido reportados en aislamientos resistentes a ácido nalidíxico (Basu *et al.*, 2013; Oliveira *et al.*, 2011), esto podría explicarse dado que la *hlyA*, *papC* y *cnf1* son usualmente codificadas en la misma isla de patogenicidad (Yamamoto, 2007). La adquisición de resistencia a quinolonas y la baja prevalencia de factores de virulencia se puede deber al hecho de que las quinolonas inducen el sistema SOS, y esta inducción puede favorecer la liberación de islas de patogenicidad, lo que sugiere que la adquisición de resistencia a quinolonas puede generar cepas de *E. coli* con baja virulencia (Basu *et al.*, 2013). Estos resultados reflejan la heterogeneidad en la distribución de genes de virulencia entre las cepas UPEC, si bien no ha sido posible establecer una asociación entre virulencia, resistencia y grupos filogenéticos; es importante describir las características que definen a los aislamientos de UPEC dentro del país.

CONCLUSION

En esta investigación se encontró que los aislamientos asociados a ITU en la comunidad en el centro del país pertenecen en su gran mayoría al grupo filogenético B2, el cual presentó un mayor perfil de genes de virulencia; en contraste con los aislamientos en la localidad en el suroeste, donde el grupo filogenético A fue el más prevalente y presentó menor cantidad de genes de virulencia, esto confirma que cepas comensales pueden ocasionar ITU. De acuerdo a nuestros resultados los aislamientos en la localidad al suroeste de México presentaron mayor capacidad lítica, producción de biofilm y adherencia. Sin embargo, los genes *iutA*, *hlyA* y *cnf1* fueron más prevalentes en los aislamientos del grupo B2 y D pertenecientes a la localidad en el centro del país, además de presentar mayor resistencia a ampicilina, ceftazidima y ácido nalidíxico. Se observó que la MDR está presente en los cuatro grupos filogenéticos lo que complica y disminuye las opciones terapéuticas en pacientes con ITU causando persistencia y diseminación de los microorganismos en la comunidad.

REFERENCIAS

Abe C., Salvador F., Falsetti I., Vieira M., Blanco J., et al. Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) strains may carry virulence properties of diarrhoeagenic *E. coli*. *Immunol Med Microbiol* 2008; 52(3): 397-406

Alteri J., Moble L. *Escherichia coli* physiology and metabolism dictates adaptation to diverse host microenvironments. *Curr Opin Microbiol* 2012; 15:3-9

Amanda L., Rasko D., Harry L. Defining genomic islands and uropathogen-specific genes in uropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2007; 189(9): 3532-3546.

Ananias M. Yano T. Serogroups and virulence genotypes of *Escherichia coli* isolated from patients with sepsis. *Braz J Med Biol Res* 2008; 41(10): 877-883.

Anderson G., Dodson K., Hooton T., Hultgren J. Intracellular bacterial communities of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract pathogenesis. *Elsevier* 2004; 12(9): 424-430.

Arredondo J., Amábile C. High resistance prevalence towards ampicillin, co-trimoxazole and ciprofloxacin, among uropathogenic *Escherichia coli* isolates in Mexico City. *J Infect Dev Ctries* 2008; 2(5): 350-353.

Bashir S., Haque A., Sarwar Y., Ali A. Virulence profile of different phylogenetic groups of locally isolated community acquired uropathogenic *E. coli* from Faisalabad region of Pakistan. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2012; 11:1-6

Basu S., Kumar S., Hazra A. (2013). Molecular characterization of uropathogenic *Escherichia coli*: Nalidixic acid and Ciprofloxacin resistance, virulent factors and phylogenetic background. *J Clin Diagn Res* 2013; 7(12): 2727-2731.

Bidet P., Mahjoub-Messai F, Blanco J, Blanco J, Dehem M, Aujard Y, Bingen E, Bonacorsi S. Combined multilocus sequence typing and O serogrouping distinguishes *Escherichia coli* subtypes associated with infant urosepsis and/or meningitis 2007; *J Infect Dis.* 196(2):297-303.

Bien J., Sokolova O., Bozko P. Role of uropathogenic *Escherichia coli* virulence factors in development of urinary tract infection and kidney damage. *Int J Nephrol*, Article ID 681473, 2012.

Chen Swaine L., Hung Chia S., Pinkner Jerome S. Positive selection identifies an in vivo role for FimH during urinary tract infection in addition to mannose binding. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106(52): 22439–22444.

Clermont O., Bonacorsi S., Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl. Environ. Microbiol* 2000; 66(10): 4555–4558

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test. Table 2A Enterobacteriaceae M02 and M07. 2012.

Croxen A., Finlay B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat Rev Microbiol* 2010; 8(1):26-38

Dhakal B., Kulesus R., Mulvey M. Mechanisms and consequences of bladder cell invasion by uropathogenic *Escherichia coli*. *Eur J Clin Invest* 2008; 38 (S2): 2–11.

Duriez P., Clermont O., Bonacorsi S. Commensal *Escherichia coli* isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human populations. *Microbiology* 2001; 147(6):1671–1676.

Ejrnaes K., Stegger M., Reisner A., Ferry S., Monsen T., Holm S. Characteristics of *Escherichia coli* causing persistence or relapse of urinary tract infections. *Virulence* 2011; 2(6):528-537

Emődy L., Kerényi M., Nagy G. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli*. *Int J Antimicrob Agents* 2003; 22(1): 29-33.

Foxman B. Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity and economic costs. *Am J Med* 2002; 113(1):5-13.

García E., Brumbaugh A. Mobley H. Redundancy and specificity of *Escherichia coli* iron acquisition systems during urinary tract infection. *Infect Immun* 2011; 79(3): 1225-1235.

Guyer D., Henderson I., Nataro J. Identification of Sat, an autotransporter toxin produced by uropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 2000; 38(1): 53-66

Hernández J., Mohamed O., Aliaga M. Infecciones del aparato urinario. *Med Clin (Barc)* 2007; 129(18):707-715

Hussain B., Ewers C., Nandanwar N. Multiresistant uropathogenic *Escherichia coli* from a region in India where urinary tract infections are endemic: genotypic and fenotypic characteristics of sequence type 131 isolates of the CTX-M-15 extended-espectrum- β -lactamase-producing-lineage. *Antimicrob. Agents Chemother* 2012; 56(12):6358-6365.

Jadhav S., Hussain A., Devi S. Virulence characteristics and genetic affinities of multiple drug resistant uropathogenic *Escherichia coli* from a semi urban locality in India. Plos one 2011; 6(3): e18063.

Johnson James R., Stell Adam L. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. J Infect Dis 2000; 181(1):261–272

López-Banda D., Carrillo-Casas E., Leyva-Leyva M., Orozco-Hoyuela G., Manjarrez-Hernández A., Arroyo-Escalante S. (2014). Identification of virulence factors genes in *Escherichia coli* isolates from women with urinary tract infection in Mexico. Biomed Res Int, Article ID 959206, 2014.

Mao B., Yung-Fu C., Joy S. Identification of *Escherichia coli* genes associated with urinary tract infections. J Clin Microbiol 2011; 50(2): 449-456.

Marrs C., Zhang L., Foxman B. *Escherichia coli* mediated urinary tract infections: are there distinct uropathogenic *E. coli* (UPEC) pathotypes? FEMS Microbiol Lett 2005; 252 (2): 183-190.

Mills M., Meysick K., Brien A. Cytotoxic necrotizing factor type 1 of uropathogenic *Escherichia coli* kills cultured human uroepithelial 5637 cells by an apoptotic mechanism. Infect Immun 2000; 68(10):5869–5880.

Molina L., Aparicio G., Ribas R., Gavilanes S., Manjarrez A. Drug resistance, serotypes, and phylogenetic groups among uropathogenic *Escherichia coli* including O25-ST131 in Mexico City. J Infect Dev Ctries 2011; 5(12):840-849.

Moreno E., Prats G., Planelles M., Pérez T. Caracterización de *Escherichia coli* de los grupos filogenéticos A y B1 causantes de infección extraintestinal. Enferm Infec Microbiol Clin 2006; 24(8):483-489.

Moura A., Nicolau A., Hooton T., Azeredo J. Antibiotherapy and pathogenesis of uncomplicated UTI: difficult relationships. J Appl Microbiol 2009; 106(6): 1779-1791.

Narciso A., Nunes F., Amores T., Lito L., Duarte A. Persistence of uropathogenic *Escherichia coli* strains in the host for long periods of time: relationship between phylogenetic groups and virulence factors. Eur J. Clin Microbiol Infect Dis 2011; 31(6):1211-1217

Niu C. Gilbert E. Colorimetric method for identifying plant essential oil components that affect biofilm formation and structure. Appl Environ Microbiol 2004; 70(12): 6951–6956.

Oliveira F., Paludo K., Arend L., Farah S., Pedroza F., Souza E. Virulence characteristics and antimicrobial susceptibility of uropathogenic *Escherichia coli* strains. Genet Mol Res 2011; 10(4): 4114-4125.

Orskov I., Orskov F., Birth A., Kanamore M., Svanborg C. O, K, H and fimbrial antigen in *Escherichia coli* serotypes associated with pyelonephritis and cystitis. Scand J Infect Dis Suppl 1982; 33:18-25.

Ponnusamy P., Natarajan V., Sevanan M. In vitro biofilm formation by uropathogenic *Escherichia coli* and their antimicrobial susceptibility pattern. Asian Pac J Trop Med 2012; 210-213.

Rosen D., Hooton T., Stamm W., Humphrey P., Hultgren S. Detection of intracellular bacterial communities in human urinary tract Infection. PLoS Med 2007; 4(12):1949-1958.

Ruiz, J., M. M. Navia, J. Vila, and J. Gascón. Prevalence of *sat* gene among clinical isolates of *Shigella spp.* causing traveler's diarrhea: geographical and specific differences. J. Clin. Microbiol. 2002; 40 (4):1565–1566.

Scheffer J., König W., Braun V. Comparison of four hemolysin-producing organisms (*Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Aeromonas hydrophila*, and *Listeria monocytogenes*) for release of inflammatory mediators from various cells. J Clin Microbiol 1988; 26(3): 544-551.

Slavchev G., Pisareva E., Markova N. Virulence of uropathogenic *Escherichia coli*. Journal of culture collections 2009; 6(1):61-68.

Smith Y., Rasmussen B., Grande K. Hemolysin of uropathogenic *Escherichia coli* evokes extensive shedding of the uroepithelium and hemorrhage in bladder tissue within the first 24 hours after intraurethral inoculation of mice. Infect. Immun 2008; 76(7): 2978–2990.

Soto S., Smithson A., Horcajada J., Martinez J., Mensa J., Vila J. Implication of biofilm formation in the persistence of urinary tract infection caused by uropathogenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Infect 2006; 12(10): 1034–1036

Vollmerhausen T., Katouli M. Molecular characterisation of *Escherichia coli* isolated from hospitalised children and adults with urinary tract infection. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2014; 33(6): 975-982

Weichhart T., Haidinger M., Hörl W. and Säemann M. Current concepts of molecular defense mechanisms operative during urinary tract infection. Eur J Clin Invest 2008; 38(S2): 29–38

Wiles J., Kulesus R., Mulvey M. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Exp Mol Pathol* 2009; 85(1): 11–19.

Yamamoto S. Molecular epidemiology of uropathogenic *Escherichia coli*. *J Infect Chemother* 2007; 13(2):68–73

Zalewska M. Urinary tract infections of *Escherichia coli* strains of chaperone-ushe system. *Pol J Microbiol* 2011; 60(4):27-285.