



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



INSTITUTO DE CIENCIAS

CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS

POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA

“Caracterización filogenética, clonal, genotípica y plasmídica en una colección de genomas de *Escherichia coli* O25:H4 y análisis del operón fimbrial *ucf*”

TESIS

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRÍA EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)

CON OPCIÓN EN: MICROBIOLOGÍA MÉDICA

PRESENTA:

Q.B.P. Nain Gabriela Pedroza Viveros

ASESOR DE TESIS:

D.C. Margarita María de la Paz Arenas Hernández

PUEBLA, PUE.

ENERO 2022



BUAP

Puebla, Pue. a 29 de noviembre 2021

**A LA ACADEMIA DEL POSGRADO
EN MICROBIOLOGÍA
CICM-ICUAP
P R E S E N T E.**

Por este conducto los abajo firmantes, integrantes del Comité revisor de Tesis de Maestría de la alumna **Nain Gabriela Pedroza Viveros**, les informamos que hemos revisado el escrito titulado:

“Caracterización filogenética, clonal, genotípica y plasmídica en una colección de genomas de *Escherichia coli* O25:H4 y análisis del operón fimbrial ucl”.

A nuestro juicio, la alumna **Nain Gabriela Pedroza Viveros** puede proceder a la digitalización de la tesis y a la presentación del examen de grado correspondiente.

Sin más que agregar, nos despedimos afectuosamente de ustedes.

Atentamente.
“Pensar Bien Para Vivir Mejor”

D.C. Sandra Raquel Reyes Carmona

D.C. Rosa del Carmen Rocha Gracia

D.C. Patricia Lozano Zarain

D.C. Claudia F. Martínez de la Peña



AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

- Al Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas (CICM) por permitirme realizar la maestría.
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para el desarrollo de este proyecto, con número de becario 990998.
- Al laboratorio de Biología Molecular de Enteropatógenos (LBME) por aceptarme en su equipo de trabajo y facilitarme los recursos necesarios.
- A la D.C. Margarita María de la Paz Arenas Hernández por integrarme a su laboratorio, por todo lo enseñado, la ayuda y la confianza.
- A la D.C. Claudia Fabiola Martínez de la Peña por todos los conocimientos en bioinformática, los consejos y la disposición para apoyarme.
- A las D.C. Patricia Lozano Zarain, D.C. Rosa del Carmen Rocha Gracia y D.C. Sandra Raquel Reyes Carmona por las aportaciones y recomendaciones a este proyecto.
- Se agradece a la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado por el apoyo otorgado para la conclusión de esta tesis dentro del programa IV. Investigación y posgrado. Apoyar a los programas de posgrado para lograr su incorporación al Padrón Nacional de Calidad. Indicador establecido en el Plan de Desarrollo Institucional 2017-2021.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

- A mis padres y hermanos, por todo el apoyo brindado antes y durante todo el proceso de maestría, por sus palabras de ánimo y por tener fe en mí, incluso cuando en ocasiones yo no la tenga.
- A Uriel, me alegra que ambos tuviéramos la oportunidad de estar aquí y poder seguir superándonos. Agradezco el tener a una persona con quien ir en la misma dirección, que siempre conserves la calma cuando yo no la tengo, que seas el que hace los trámites (porque yo soy malísima) y que veas lo bueno de cada situación.
- A Emi, espero un día tengas la curiosidad de preguntarme que significa todo lo que dice aquí.
- A mis amigos, los que están lejos y los que encontré durante este trayecto.
- A los chicos de LBME, gracias por enseñarme, por los consejos, la ayuda y los buenos momentos. Montse, me encantó encontrar a alguien de la FCQB y de Iguala, por supuesto; Elsy, gracias por la ayuda y paciencia cuando llegué y desconocía muchas cosas.
- A los profesores, gracias por todos los conocimientos, los consejos y la paciencia, me enseñaron tantas cosas nuevas, me motivaron a perder el miedo a esos temas que había evitado por no comprenderlos y a querer saber siempre un poco más.
- Al Q.B.P. Jesús Aponte. Siempre le agradeceré que iniciara esa curiosidad por saber qué hay del otro lado de un microscopio, a no temerle a los microorganismos (aunque fuera *M. tuberculosis* a campo lleno) y ganar confianza en mí. Gracias por las clases, las historias, los consejos, los regaños y por todas las horas de pláticas. Un día quiero ser tan sabia como usted.

INDICE

ÍNDICE DE TABLAS.....	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IV
ÍNDICE DE GRÁFICAS.....	V
ABREVIATURAS.....	VII
RESUMEN.....	VIII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Infección del tracto urinario (ITU).....	1
1.1.1. Clasificación.....	1
1.1.2. Etiología.....	3
1.2. <i>Escherichia coli</i>	3
1.2.1. Patotipos.....	4
1.2.2. Filogrupos.....	5
1.2.3. Cepas híbridas.....	6
1.3. UPEC.....	7
1.3.1. Metabolismo de UPEC.....	8
1.3.2. Patogénesis.....	9
1.3.3. Factores de virulencia.....	11
1.3.4. Virotipo.....	20
1.4. <i>E. coli</i> ST131.....	20
1.4.1. Estructura clonal.....	21
1.4.2. Epidemiología de ST131.....	21
1.4.3. Plasmidoma en ST131.....	22
1.5. Tratamiento de infecciones por UPEC.....	24
1.6. Resistencia a los antibióticos.....	25
1.6.1. Resistencia en <i>E. coli</i> ST131.....	26
1.6.2. Enzimas betalactamasas.....	27
1.6.3. Antibióticos no betalactámicos.....	30
1.7. Elementos genéticos móviles (MGE).....	34
1.7.1. Plásmidos.....	35
1.7.2. Islas de patogenicidad.....	36
1.7.3. Integrones/ cassettes de resistencia.....	38
1.7.4. Secuencias de inserción.....	38
2. ANTECEDENTES.....	40

2.1. Antecedentes generales	40
2.2. Antecedentes específicos	44
3. JUSTIFICACIÓN	47
4. OBJETIVOS	48
4.1. Objetivo particular.....	48
4.2. Objetivos específicos	48
5. DIAGRAMA DE TRABAJO	49
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	50
6.1. Sección de análisis experimental	50
6.1.1. Material biológico	50
6.1.2. Extracción de ADN plasmídico.....	51
6.1.3. Caracterización de genes <i>bla</i> _{CTX-M} por PCR.....	51
6.2. Sección de análisis bioinformático	52
6.2.1. Búsqueda de genomas secuenciados O25:H4	52
6.2.2. Identificación de las características del cepario de estudio.....	53
6.2.3. Confirmación de serotipo	53
6.2.4. Identificación de filogrupos	53
6.2.5. Identificación de secuencia tipo (ST).....	54
6.2.6. Identificación de las variantes alélicas en el gen <i>fimH</i>	54
6.2.7. Determinación de subclones	55
6.2.8. Búsqueda de determinantes de virulencia.....	55
6.2.9. Identificación de genes asociados con el patotipo UPEC	60
6.2.10. Identificación de virotipo	61
6.2.11. Determinación de cepas con patotipo híbrido ExPEC-DEC	62
6.2.12. Análisis del operón fimbrial <i>ucl</i>	63
6.2.13. Desarrollo de oligonucleótidos para la identificación de los genes <i>uclA</i> y <i>uclD</i>	64
6.2.14. Búsqueda de determinantes de resistencia.....	65
6.2.15. Identificación de mutaciones cromosomales en girasa y topoisomerasa IV	68
6.2.16. Búsqueda de variantes en genes <i>bla</i> _{CTX-M} , asociación con las secuencias de inserción IS 26 e IS <i>Ecp1</i> y determinación de grupo (1, 2, 8 y 9). 68	
6.2.17. Identificación y caracterización de plásmidos en los genomas de estudio.....	69
7. RESULTADOS	72

7.1. Sección de análisis experimental	72
7.1.1. Material biológico	72
7.1.2. Extracción de ADN plasmídico	72
7.1.3. Amplificación de genes <i>bla</i>_{CTX-M} por PCR	74
7.2. Sección de análisis bioinformático	74
7.2.1. Búsqueda de genomas secuenciados O25:H4	74
7.2.2. Identificación de las características del cepario de estudio	75
7.2.3. Confirmación de serotipo	77
7.2.4. Identificación de filogrupos	78
7.2.5. Identificación de secuencia tipo (ST)	79
7.2.6. Identificación de las variantes alélicas en el gen <i>fimH</i>	79
7.2.7. Determinación de subclones	80
7.2.8. Búsqueda de determinantes de virulencia	81
7.2.9. Identificación de genes asociados con el patotipo UPEC.	89
7.2.10. Identificación de virotipo	90
7.2.11. Determinación de cepas con patotipo híbrido ExPEC-DEC	90
7.2.12. Análisis del operón fimbrial <i>ucl</i> en cepas prototipo y genomas O25:H4 ST131	92
7.2.13. Desarrollo de oligonucleótidos para la identificación de las subunidades <i>uclA</i> y <i>uclD</i> en cepas clínicas.	105
7.2.14. Búsqueda de determinantes de resistencia	106
7.2.15. Identificación de mutaciones en girasa y topoisomerasa IV. ..	117
7.2.16. Búsqueda de variantes en genes <i>bla</i>_{CTX-M}, asociación con las secuencias de inserción IS 26 e IS <i>Ecp1</i> y determinación de grupo (1, 2, 8 y 9) 118	
7.2.17. Identificación y caracterización de plásmidos en los genomas de estudio	123
8. DISCUSIÓN	128
9. CONCLUSIONES	150
10. PERSPECTIVAS	152
11. ANEXOS	153
12. BIBLIOGRAFÍA	202

ÍNDICE DE TABLAS

Título	Página
Tabla 1. Clasificación de las ITU.	2
Tabla 2. Distribución de serogrupos y serotipos reportados en cepas de <i>E. coli</i> uropatógena y en cepas de <i>E. coli</i> híbridas (UPEC/DEC).	7
Tabla 3. Clasificación de las enzimas CTX-M con base en su origen.	29
Tabla 4. Mutaciones los genes <i>gyrA</i> , <i>gyrB</i> , <i>parC</i> y <i>parD</i> asociadas a la aparición de resistencia cromosómica a quinolonas.	31
Tabla 5. Principales mecanismos responsables de la resistencia hacia las quinolonas.	33
Tabla 6. Islas genómicas identificadas en la cepa prototipo CFT073.	37
Tabla 7. Características generales del cepario de estudio O25:H4	50
Tabla 8. Características generales de las cepas control utilizadas.	51
Tabla 9. Oligonucleótidos utilizados para la detección del gen <i>bla</i> _{CTX-M} .	52
Tabla 10. Oligonucleótidos utilizados para la detección de las cepas pertenecientes al serogrupo O25.	52
Tabla 11. Oligonucleótidos utilizados para la determinación de cepas pertenecientes al filogrupo G.	54
Tabla 12. Genes utilizados para diferenciar los subclones <i>H30-R</i> y <i>H30-Rx</i> .	55
Tabla 13. Genes identificados con VirulenceFinder 2.0 en 58 genomas de estudio.	55
Tabla 14. Genes de virulencia asociados a distintas funciones identificados por PCR <i>in silico</i> en 58 genomas de estudio.	57
Tabla 15. Oligonucleótidos utilizados para amplificar genes altamente asociados a UPEC.	60
Tabla 16. Esquema de virotipificación desarrollado por Blanco <i>et al.</i> , (2013).	61
Tabla 17. Genes utilizados para asignar virotipo a las cepas de estudio.	61
Tabla 18. Oligonucleótidos utilizados para la caracterización de cepas DEC.	62
Tabla 19. Oligonucleótidos para identificar las subunidades que conforman el operón <i>ucl</i> .	64
Tabla 20. Genes de resistencia identificados con ResFinder 4.1 en los genomas de estudio	65
Tabla 21. Oligonucleótidos para identificar genes de resistencia a quinolonas y nitrofuranos.	66
Tabla 22. Mutaciones en <i>NfsA</i> y <i>NfsB</i> asociadas con resistencia a nitrofurantoína.	68
Tabla 23. Oligonucleótidos utilizados para la identificación de <i>bla</i> _{CTX-M} , sus 4 grupos principales y las IS26 e <i>ISEcp1</i> .	69
Tabla 24. Oligonucleótidos utilizados para la identificación del gen <i>traT</i> y las relaxasas MOB.	70

Tabla 25. Características de tamaño, número de genes, %GC y número de plásmidos en genomas y grupos por aislamiento de los genomas <i>E. coli</i> O25:H4.	77
Tabla 26. Variantes alélicas de 7 genes de mantenimiento utilizados para realizar MLST (Atchman).	79
Tabla 27. Genes de virulencia asociados con la adhesión en los genomas de estudio.	Anexo 13
Tabla 28. Genes de virulencia asociados con sistemas de captación de hierro en los genomas de estudio.	Anexo 13
Tabla 29. Genes de virulencia codificantes de toxinas en los genomas de estudio.	Anexo 13
Tabla 30. Genes de virulencia asociados con evasión del sistema inmune en los genomas de estudio.	Anexo 13
Tabla 31. Genes de virulencia asociados con una invasina y misceláneos en los genomas de estudio.	Anexo 13
Tabla 32. Distribución de los virotipos en los genomas de estudio y subclones.	Anexo 13
Tabla 33. Porcentaje de identidad del gen <i>daaE</i> con respecto a SK1144, previamente reportada como ExPEC-DAEC.	91
Tabla 34. Distribución de genomas híbridos ExPEC-DAEC.	91
Tabla 35. Características de las cepas prototipo utilizadas para identificar el operón <i>ucl</i> .	92
Tabla 36. Tamaño y % de homología de los genes que forman el operón <i>ucl</i> en cepas prototipo con respecto a UT189.	94
Tabla 37. Búsqueda del operón <i>ucl</i> en cepario ST131.	97
Tabla 38. Características de los genes que forman el operón <i>ucl</i> en cepas clínicas con respecto a UT189.	98
Tabla 39. Análisis de los oligonucleótidos para la identificación de <i>uclA</i> .	105
Tabla 40. Análisis de los oligonucleótidos para la identificación de <i>uclD</i> .	105
Tabla 41. Genes de resistencia a betalactámicos, presentes en los genomas de estudio.	Anexo 13
Tabla 42. Genes de resistencia a quinolonas, presentes en los genomas de estudio.	Anexo 13
Tabla 43. Genes de resistencia a aminoglucósidos, presentes en los genomas de estudio.	Anexo 13
Tabla 44. Genes de resistencia a tetraciclinas, fenicoles, macrólidos, rifamicina, nitrofuranos, fosfonatos y polimixinas, presentes en los genomas de estudio.	Anexo 13
Tabla 45. Genes de resistencia a diaminopirimidinas y sulfonamidas, presentes en los genomas de estudio.	Anexo 13
Tabla 46. Distribución del genotipo de resistencia a 12 familias de antibióticos en los genomas de <i>E.coli</i> O25:H4 ST131.	114
Tabla 47. Distribución de genomas MDR y NMDR.	116

Tabla 48. Mutaciones en los genes de girasa y topoisomerasa IV.	117
Tabla 49. Mutaciones específicas en los genes de girasa y topoisomerasa IV.	117
Tabla 50. Variantes de <i>bla</i> _{CTX-M} identificadas en los genomas de estudio.	119
Tabla 51. Asociación entre <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{CTX-M-14} y <i>bla</i> _{CTX-M-27} con las secuencias de inserción IS26 e ISEcp1.	121
Tabla 52. Genes <i>bla</i> _{CTX-M} pertenecientes a los grupos 1, 2, 8 y 9 localizados en el genoma, cromosoma y plásmidos.	122
Tabla 53. Distribución de genomas portadores de 0-7 plásmidos.	Anexo 13
Tabla 54. Replicones de diversos grupos Inc detectados en los genomas de estudio y subclones.	Anexo 13
Tabla 55. Alelos reportados en los replicones IncF de los genomas de estudio.	Anexo 13
Tabla 56. Disposición del gen <i>traT</i> y las relaxasas MOB _F y MOB _Q en los genomas de estudio.	Anexo 13
Tabla 57. Caracterización de la movilidad plasmídica.	126

ÍNDICE DE FIGURAS

Título	Página
Figura 1. Factores de virulencia asociados al patotipo ExPEC.	5
Figura 2. Grupos y relaciones filogenéticas de <i>Escherichia coli</i> obtenidos a partir de la metodología de Clermont.	6
Figura 3. Evolución del clon ST131 principalmente a causa de ganancias y pérdidas de plásmidos tipo F.	23
Figura 4. Principales mecanismos de resistencia bacteriana a antibióticos.	26
Figura 5. Contexto genético de CTX-M-15, IS26 e ISEcp1.	39
Figura 6. Determinación de perfil plasmídico.	73
Figura 7. Determinación del gen <i>bla</i> _{CTX-M} .	74
Figura 8. País de origen y número de genomas <i>E. coli</i> O25:H4 identificados en cada uno.	76
Figura 9. Determinación de serotipo utilizando el programa SerotypeFinder 2.0.	78
Figura 10. Ejemplo del resultado obtenidos con el programa Clermon Typing para la asignación de filogrupo.	78
Figura 11. Identificación de los genes <i>fyuA</i> , <i>chuA</i> y <i>yfcV</i> en el genoma de la cepa ESBL94 por alineamiento de oligonucleótidos <i>in silico</i> .	89
Figura 12. Esquemas de los operones <i>ucl</i> en 6 cepas prototipo ExPEC (5 UPEC y una NMEC).	95
Figura 13. Esquemas de los operones <i>ucl</i> en 10 genomas de cepas clínicas O25:H4 ST131.	99
Figura 14. Predicción de la estructura secundaria de un segmento conservado de 69 aminoácidos mediante el servidor Jpred 4.	103
Figura 15. Otro método para la predicción de estructura secundaria en una secuencia de aminoácidos utilizando PsiPred.	104
Figura 16. Predicción de la estructura terciaria de la secuencia de 69 aminoácidos utilizando Phyre2.	104

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Título	Página
Gráfica 1. Cepario de <i>E. coli</i> O25:H4 de estudio.	72
Gráfica 2. Caracterización de bandas plasmídicas en el cepario de estudio.	73
Gráfica 3. Porcentaje de cepas portadoras y no portadoras de <i>bla</i> _{CTX-M} .	74
Gráfica 4. Genomas de <i>E. coli</i> en base de datos, selección de genomas del serotipo O25:H4 y su distribución por origen.	75
Gráfica 5. Distribución de los genomas de estudio por su origen de aislamiento.	76
Gráfica 6. ST identificadas en los genomas O25:H4.	79
Gráfica 7. Variantes alélicas del gen <i>fimH</i> determinadas en los genomas de estudio mediante el programa FimTyper 1.0.	80
Gráfica 8. Grupos clonales y subclones en los genomas de estudio.	81
Gráfica 9. Distribución de genes asociados a adherencia (<i>fimH-papF</i>).	83
Gráfica 10. Distribución de genes asociados a adherencia (<i>papGI-motB</i>).	84
Gráfica 11. Distribución de genes asociados a adherencia y motilidad (<i>fliC-nfaE</i>).	85
Gráfica 12. Distribución de genes asociados a adquisición de hierro.	86
Gráfica 13. Distribución de genes asociados a toxinas.	87
Gráfica 14. Distribución de genes asociados a evasión de las defensas del hospedero	88
Gráfica 15. Genes de virulencia asociados con funciones diversas.	89
Gráfica 16. Distribución de 4 genes (<i>fyuA</i> , <i>chuA</i> , <i>yfcV</i> y <i>vat</i>) asociados a cepas UPEC.	89
Gráfica 17. Distribución de los genomas de estudio por virotipo.	90
Gráfica 18. Distribución de genomas híbridos ExPEC-DAEC.	91
Gráfica 19. Búsqueda del operón <i>ucl</i> en cepas prototipo.	93
Gráfica 20. Prevalencia de <i>ucl</i> en los genomas de estudio y subclones.	98
Gráfica 21. Distribución de genes asociados a resistencia a betalactámicos (<i>bla</i> _{CTX-M-3} – <i>bla</i> _{OXA-9}).	108
Gráfica 22. Distribución de genes asociados a resistencia a betalactámicos (<i>bla</i> _{TEM-1A} – <i>bla</i> _{IMP-1}).	109
Gráfica 23. Distribución de genes asociados a resistencia a quinolonas.	110
Gráfica 24. Distribución de genes asociados a resistencia a aminoglucósidos.	111
Gráfica 25. Distribución genes asociados a resistencia a tetraciclinas, fenicoles, macrólidos, rifamicina y nitrofuranos.	112
Gráfica 26. Distribución genes asociados a resistencia a fosfonatos, polimixinas, diaminopirimidinas y sulfonamidas.	113
Gráfica 27. Distribución del perfil genotípico de resistencia a 12 familias de antibióticos en los genomas de estudio.	115

Gráfica 28. Distribución de genomas MDR y NMDR.	116
Gráfica 29. Porcentaje de cepas con mutaciones en girasa y topoisomerasa IV relacionadas con la resistencia a FQ.	117
Gráfica 30. Mutaciones específicas en los genes <i>gyrA</i> , <i>parC</i> y <i>parE</i> asociadas con resistencia a FQ.	118
Gráfica 31. Presencia de variantes de los genes <i>bla_{CTX-M}</i> y localización genómica, cromosómica y plasmídica.	120
Gráfica 32. Asociación entre <i>bla_{CTX-M-15}</i> , <i>bla_{CTX-M-14}</i> y <i>bla_{CTX-M-27}</i> con las secuencias de inserción IS26 e ISEcp1.	121
Gráfica 33. Distribución los grupos 1 y 9 de <i>bla_{CTX-M}</i> .	122
Gráfica 34. Distribución del número de plásmidos reportados en los genomas de estudio.	123
Gráfica 35. Prevalencia de replicones en el cepario de estudio.	124
Gráfica 36. Distribución de los alelos FAB asociados a plásmidos IncF en los genomas de estudio.	125
Gráfica 37. Distribución del gen <i>traT</i> y las relaxasas MOB _F y MOB _Q en los genomas de estudio.	126
Gráfica 38. Caracterización de la movilidad plasmídica	127

ABREVIATURAS

µg: Microgramo	MLST: Tipificación de secuencias multilocus
µl: Microlitro	NMDR: No multidrogoresistente
ABU: Bacteriuria asintomática	NMEC: <i>E. coli</i> asociada a meningitis neonatal
ADN: Ácido Desoxirribonucleico	Omp: Proteína de membrana externa
APEC: <i>E. coli</i> patógena aviar	ORF: Marco de lectura abierta
BET: Bromuro de Etidio	PAI: Isla de patogenicidad
BFP: Pili Formador de Haces (plásmido)	PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
BLEE: Betalactamasa de Espectro Extendido	PDR: Pandrogoresistente
CNF: Factor Citotóxico Necrotizante	PFGE: Electroforesis en gel de campos pulsados
DEC: <i>E. coli</i> diarreogénica	PMN: Polimorfonucleares
dhfr: Gen codificante de dihidrofolato reductasa	PMQR: Genes de resistencia a quinolonas mediadas por plásmidos.
dhps: Gen codificante de dihidropteroato sintasa	PTS: Sistema fosfotransferasa
E. coli: <i>Escherichia coli</i>	QIR: Reservorios quiescentes intracelulares
ExPEC: <i>E. coli</i> patógena extraintestinal	QRDR: Región determinante de resistencia a las quinolonas
FQ: Fluoroquinolona	RFLP: Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción
GI: Isla genómica	RTX: Proteína de repetición en toxina
HGT: Transferencia genética horizontal	Sat: Toxina autotransportadora secretada
HlyA: α-hemolisina	SMX: sulfametoxazol
HMWP2: Proteína 2 de alto peso molecular	SNP: Sustitución de un solo nucleótido
HPI: Isla de alta patogenicidad	SRA: Archivo de lectura de secuencia
IBC: Comunidades bacterianas intracelulares	ST: Secuencia tipo
IS: Secuencia de inserción	ST131: Secuencia tipo 131
ITU: Infección del tracto urinario	T3SS: Sistema de secreción de tipo III
ITUr: Infección del tracto urinario recurrente.	TGI: Tracto gastrointestinal
kb: Kilobases	TMP/SMX: Cotrimoxazol o trimetoprima-sulfametoxazol
LBME: Laboratorio de Biología Molecular de Enteropatógenos.	TMP: Trimetoprima
LIHC: Laboratorio de Infecciones Hospitalarias y de la Comunidad.	Tn: Transposón
LPS: Lipopolisacárido	UPEC: <i>E. coli</i> uropatógena
Mb: Megabases	Vat: toxina autotransportadora vacuolante
mcr-1.1: Gen móvil de resistencia a la colistina	WGS: Secuencia de genoma completa
MDR: Multidrogoresistente	XDR: Extremadamente resistente
MGE: Elementos genéticos móviles	Ybt: Yersiniobactina
MLEE: Electroforesis enzimática multilocus	

RESUMEN

E. coli patógena extraintestinal (ExPEC) es un patotipo asociado, entre otras patologías, al desarrollo de ITU, una de las infecciones bacterianas más comunes, con aproximadamente 150 millones de casos al año. En ocasiones no son diagnosticadas adecuadamente, provocando complicaciones o cronicidad, además de su adquisición nosocomial y comunitaria. Dentro de las ExPEC, el clon O25:H4-B2-ST131 se ha asociado a ITU y sepsis, principalmente por su posesión de genes tanto de virulencia como de resistencia y dentro de este complejo clonal, el subclón ST131-*H30*-Rx se considera pandémico. El objetivo del presente trabajo consistió en analizar las características de filogenia, clonalidad, patogenicidad y plásmidos en genomas de cepas *E. coli* O25:H4 obtenidos en bases de datos de libre acceso usando herramientas bioinformáticas para el análisis. Se recolectaron 58 genomas completos cerrados (2005-2018) de cepas aisladas principalmente de sangre (44.83%), orina (20.69%) y heces (22.41%). Todas pertenecieron al filogruppo B2 y CC131 (ST131). El alelo *fimH30* fue predominante (84.48%) y se subclasificó en los grupos *H30*-Rx (67.35%) y *H30*-R (32.65%). Los genomas No *H30* constituyeron un tercer subgrupo de estudio (15.52%). Se identificaron 58 genes de virulencia asociados a diversas funciones y los genes reportados en un porcentaje de 90-100% fueron *fimH*, *csgA*, *motA*, *motB*, *fliC*, *yfcV*, *iha*, *sitA*, *iucD*, *iutA*, *fyuA*, *chuA*, *tonB*, *sat*, *iss*, *ompT* y *kpsE*. En su mayoría se trató de genes con funciones de adherencia, movilidad y captación de hierro. También se observaron asociaciones específicas gen-subclón. Para conocer el potencial de causar una ITU, se identificaron 3 genes de virulencia altamente asociados a cepas UPEC, en todos los genomas, indicándonos la capacidad de los genomas ST131 para desencadenar una ITU pese a ser aislada de otras fuentes además de orina. Se realizó la determinación de virotipo de acuerdo con el esquema de Blanco *et al.*, predominando el virotipo C (74.14%), el virotipo principal en *H30*-Rx y *H30*-R fue C y en las No *H30* se trató del D. Se realizó la búsqueda de cepas híbridas, localizando 3 cepas (5.17%) con patotipo ExPEC-DAEC. Se analizó la presencia y estructura del operón *ucl*, codificante de una fimbria Ucl, localizándose en 6 cepas prototipo ExPEC B2 de distintos serogrupos y ST. El operón *ucl* también se identificó en genomas de estudio aislados de diversos países, principalmente los del subclón *H30*-Rx (63.64%). En su mayoría las cepas clínicas presentaron un operón similar al identificado en UTI89 y se identificó un segmento de origen viral, posiblemente parte de un profago encargado de la diseminación de los genes *ucl*. Se realizó la identificación de 67 determinantes de resistencia hacia 12 familias de antibióticos. Las familias con mayor incidencia fueron quinolonas (100%), betalactámicos (94.83%), aminoglucósidos (82.76%), sulfonamidas (58.62%), diaminopirimidinas (55.17%), fenicoles (53.45%) y tetraciclinas (51.72%). No se detectó resistencia

hacia rifamicina y nitrofurantoína. El 87.93% de las cepas fueron MDR, en *H30-Rx* este porcentaje fue de 93.94%. Todas las cepas presentaron al menos una mutación en los genes *gyrA*, *parC* o *parE*. No se identificaron mutaciones en *gyrB*. Se identificaron genes *bla*_{CTX-M} en 45 genomas (77.6%) de los grupos 1 (63.79%) y 9 (15.52%). El subclón *H30-Rx* presentó *bla*_{CTX-M-15} en 96.97% de los genomas. Se observó una asociación de *bla*_{CTX-M-27} con IS26 (100%) e *bla*_{CTX-M-14} en su mayoría con ISEcp1 (75%) y *bla*_{CTX-M-15} con IS26 (66.7%). 52 cepas (89.7%) albergaron al menos 1 plásmido (n=110) y los replicones más comunes pertenecieron al grupo IncF (51.82%), en su mayoría como multirreplicones. *H30-Rx* presentó el porcentaje más elevado de asociación con IncF (65.96%). Se realizó pMLST en los plásmidos IncF, siendo F2 (10.53%) el más reportado y distribuido en los 3 subclones. En *H30-Rx* se localizó un subconjunto de C2 altamente virulento mediado por F36:A4:B1 y F36:A4:B2. Se realizó identificación de relaxasas MOB_F y MOB_P. MOB_{F12} fue predominante (29.09%) y se asoció con cepas No *H30*. En conjunto con *traT* se identificaron 28 plásmidos conjugativos (25.45%), principalmente en No *H30* (42.86%). Con base en este análisis, podemos conocer algunos determinantes de resistencia y virulencia que distinguen a cepas de *E. coli* O25:H4-B2-ST131 hasta ahora secuenciadas, así como diferencias entre sus subclones y las tasas de prevalencia de acuerdo con su ubicación, ya sea cromosómica o plasmídica. También nos permitió conocer la diversidad presente entre cepas, pese a que todas pertenecen a la misma secuencia tipo, demostrando la amplia plasticidad genómica que caracteriza a este grupo clonal.

Palabras clave: ExPEC, ST131, subclones, virulencia, MDR, plásmidos.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Infección del tracto urinario (ITU)

Las infecciones del tracto urinario (ITU) son el segundo tipo de infección más frecuente, solo después de las asociadas al tracto respiratorio (Kass, 2002). Anualmente se reportan aproximadamente 150 millones de personas cursando una ITU (Stamm & Norrby, 2001). Estas infecciones pueden adquirirse intrahospitalariamente o en la comunidad, además de relacionarse con elevados índices de morbimortalidad (Daoud *et al.*, 2015; Foxman & Brown, 2003; Kot, 2019). Las ITU con tratamientos deficientes tienden a complicarse y desarrollar urosepsis, además que su persistencia la convierte en una enfermedad crónica (Arenas-Hernández *et al.*, 2012).

Las ITU se definen como la presencia de microorganismos patógenos en zonas normalmente estériles del aparato urinario y pueden estar o no asociadas a sintomatología, en el 80-90% de los casos el origen es bacteriano (Echevarria Zárate & Osorio Plenge, 2006). Clínicamente se diagnostican ante la presencia de $\geq 10^5$ bacterias/ml en urocultivo y el “estándar de oro” se basa en la detección del patógeno mediante cultivo junto a la presencia de síntomas clínicos conocidos como síndrome miccional (Brons *et al.*, 2020; Kass, 2002).

Epidemiológicamente, las infecciones urinarias se consideran una enfermedad asociada a mujeres, donde se estima que el 40% de mujeres presentará al menos una ITU en el transcurso de su vida y el 11% de ellas presentará una infección recurrente o ITUr (Foxman, 2014; Micali *et al.*, 2014). La prevalencia de la infección urinaria aumenta con la edad, y en mujeres mayores de 65 años es aproximadamente el doble de la tasa observada en la población femenina en general (Medina & Castillo-Pino, 2019). Del mismo modo en los grupos de mujeres que cursan un embarazo donde se ha demostrado que los cambios en sus niveles de estrógeno impiden un control adecuado por el sistema inmune innato de la vejiga, dejándolas susceptibles a ITUr (Raz, 2011; Sen *et al.*, 2021). Respecto a los varones, sólo 12% padecerá de ITU en el transcurso de su vida (Foxman & Brown, 2003).

1.1.1. Clasificación

Clínicamente las ITU son clasificadas en complicadas y no complicadas (Flores-Mireles *et al.*, 2015). Las infecciones no complicadas afectan a personas sin

anomalías estructurales o neurológicas del tracto urinario y se dividen en cistitis y pielonefritis (Hannan *et al.*, 2012; Hooton, 2012). Las infecciones complicadas están asociadas a anomalías anatómicas o fisiológicas que comprometen al tracto urinario (Levison & Kaye, 2013). **Tabla 1.**

Tabla 1. Clasificación de las ITU.

Clasificación de las ITU	
Trastorno	Definición
Bacteriuria asintomática	Urocultivo positivo ($\geq 10^5$ UFC/mL) en ausencia de signos y síntomas.
ITU no complicada	<p>Afecta a individuos aparentemente sanos, sin anomalías funcionales o anatómicas en el tracto urinario, sin deterioro relevante de función renal ni enfermedades concomitantes que promueven la ITU o son un riesgo para desarrollar complicaciones serias.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Cistitis aguda no complicada: ITU de vías inferiores. Sintomatología: urgencia para miccionar, disuria, poliuria y dolor alrededor del pubis (síndrome miccional). • Pielonefritis aguda no complicada: ITU de vías superiores. Sintomatología: síndrome miccional acompañado de dolor en los costados y/o fiebre mayor a 38°C. • ITU recurrente no complicada: Refiere a ≥ 2 episodios sintomáticos en 6 meses o ≥ 3 episodios sintomáticos en 12 meses.
ITU complicada	<p>Asociadas a factores estructurales o neurológicos que comprometen el tracto urinario:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Enfermedad neurológica • Obstrucción / retención urinaria • Inmunosupresión • Fístulas • Insuficiencia renal o cálculos • Embarazo • Presencia de cuerpos extraños, como catéter o dispositivos de drenaje

Modificado de Flores-Mireles *et al.*, 2015; Levison & Kaye, 2013; Medina & Castillo-Pino, 2019; Smelov *et al.*, 2016; Stamm *et al.*, 1982; Zalewska-Piątek & Piątek, 2020.

1.1.2. Etiología

Las ITU son causadas por bacterias Gram positivas y Gram negativas, así como algunas especies de hongos; sin embargo, *Escherichia coli* uropatógena (UPEC) es el principal agente causal en la mayoría de las ITU complicadas (65%), como en las no complicadas (75-90%) (Flores-Mireles *et al.*, 2015; Medina & Castillo-Pino, 2019; Zhang & Foxman, 2003). Asimismo UPEC se asocia con 70-80% de las infecciones urinarias adquiridas en la comunidad y 50% de las infecciones intrahospitalarias (Kot, 2019).

1.2. *Escherichia coli*

En 1885, Theodor Escherich, un pediatra alemán, aisló por primera vez a *Escherichia coli* (*E. coli*), clasificándola como un microorganismo saprófito, comúnmente encontrado en el tracto gastrointestinal de humanos y otros vertebrados (Desmarchelier & Fegan, 2016). *E. coli* pertenece a la familia de las enterobacterias, es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, catalasa positivo y oxidasa negativo, presentan un tamaño promedio de 1.1-1.5 μm de ancho por 2–6 μm de largo y en su mayoría con forma de bacilo. De acuerdo con las condiciones del medio, pueden ser no móviles o móviles, con expresión de flagelos peritricos. Muchas cepas tienen capacidad de producir fimbrias o pili, encargadas de la unión de la bacteria a las superficies que posteriormente colonizarán (Desmarchelier & Fegan, 2016; Jiménez *et al.*, 2012).

En 1947 Kaufmann estableció un sistema de clasificación para *E. coli* basado en los antígenos O, K y H, donde las combinaciones de estos antígenos (O:H:K) corresponden a un serotipo específico y el grado de virulencia de una cepa se puede determinar por la combinación de antígenos que presente (Dahbi, 2015; Kauffmann, 1947; Liu *et al.*, 2020). El lipopolisacárido O se encuentra en la pared celular y se han identificado cerca de 188 variedades, el antígeno H corresponde al flagelo y se conocen cerca de 53 tipos y el antígeno K forma parte del polisacárido capsular y se han reportado cerca de 103 variantes (Dahbi, 2015; Desmarchelier & Fegan, 2016). Generalmente sólo se toman en cuenta los grupos O y H pues su identificación se realiza por aglutinación, mientras que el antígeno K necesita de contraelectroforesis para su determinación (Dahbi, 2015). Otras técnicas de clasificación consisten en determinación de biotipo por pruebas bioquímicas; sin embargo no permite diferenciar entre cepas patógenas y las que no lo son (Dahbi, 2015). Posteriormente se ha implementado la tipificación del genoma, determinación de perfiles de virulencia, determinación de filogrupo y clasificación

por fagos, generalmente asociados a estudios con fines epidemiológicos (Desmarchelier & Fegan, 2016).

1.2.1. Patotipos

E. coli es una especie genéticamente diversa, en su mayoría compuesta por cepas comensales, las cuales habitan en simbiosis con su hospedero, generalmente carecen de factores de virulencia y sólo inducen daño ante eventos como la presencia de un cuerpo extraño, la ruptura de las barreras gastrointestinales normales (peritonitis) o un proceso de inmunosupresión (Russo & Johnson, 2000). Sin embargo, también abarca patógenos oportunistas, causantes de infecciones intestinales y extraintestinales en una variedad de hospederos, provocando morbilidad y mortalidad en todo el mundo (Croxen *et al.*, 2013).

Se ha establecido una clasificación en base a criterios clínicos, epidemiológicos, de interacción con su célula blanco y genéticos en variantes patogénicas de *E. coli* llamados patotipos, los cuales comprenden las cepas patógenas intestinales o diarreogénicas (DEC) y cepas patógenas extraintestinales (ExPEC) (Russo & Johnson, 2000). Las cepas DEC se clasifican en seis grupos: *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) y *E. coli* de adherencia difusa (DAEC) y los aislados pueden definirse por la presencia de uno o unos pocos genes de virulencia (Kaper *et al.*, 2004; Nataro & Kaper, 1998). Las cepas ExPEC son aquellas aisladas fuera del tracto intestinal, capaces de causar daño en esos sitios y en diversos hospederos, como aves de corral, animales de compañía y humanos (Smith *et al.*, 2007). Estas cepas se clasifican como *E. coli* uropatógena (UPEC), *E. coli* asociada a meningitis neonatal (NMEC) y *E. coli* patógena aviar (APEC) (Pitout, 2012; Robins-Browne *et al.*, 2016). Contrario a las cepas DEC, las ExPEC son difíciles de clasificar ya que se han reportado un mayor número de genes comunes en las 3 categorías (**figura 1**), clásicamente este se otorgaba de acuerdo al sitio de aislamiento de la cepa (Lu *et al.*, 2019).

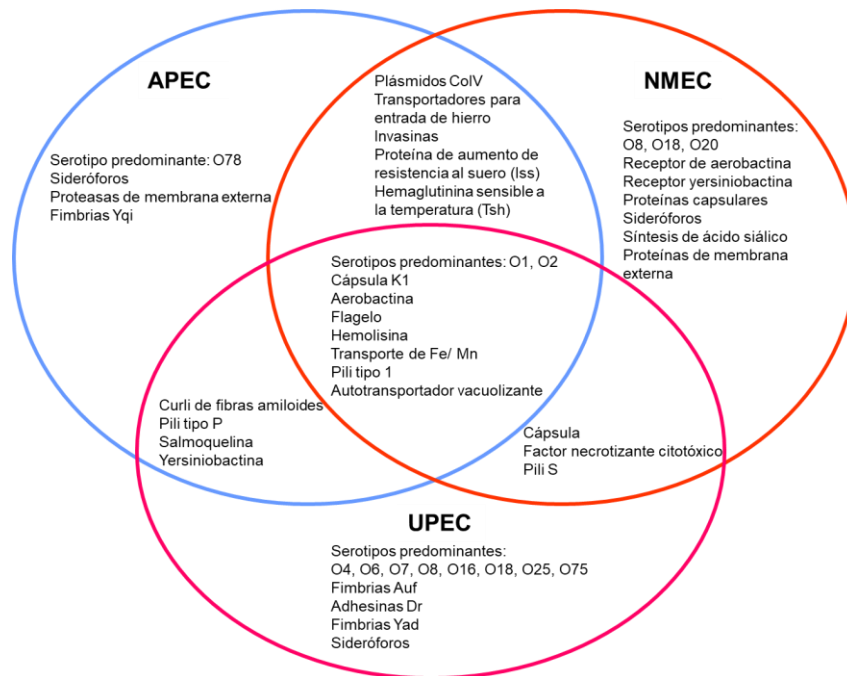


Figura 1. Factores de virulencia asociados al patotipo ExPEC. Modificado de Breland *et al.*, 2017.

1.2.2. Filogrupos

Mediante análisis filogenéticos, se ha demostrado que las cepas patógenas de *E. coli* no pertenecen a un solo linaje evolutivo, sino que a lo largo del tiempo algunos clones han adquirido determinantes de virulencia que les han permitido adaptarse a nuevos nichos y persistir hasta convertirse en diferentes patotipos, cada uno con un proceso característico (Kaper *et al.*, 2004; Pupo *et al.*, 1997).

La colección ECOR está formada por 72 cepas de referencia *E. coli*, obtenidas de diversos hospederos y regiones geográficas (1973-1983) (Ochman & Selander, 1984). Este cepario fue pionero en los estudios de filogenia, con técnicas como electroforesis enzimática multilocus (MLEE), polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), polimorfismos de ADN amplificados aleatoriamente, tipificación de secuencias multilocus, secuenciación del genoma completo (WGS) y reacción en cadena de polimerasa (PCR), esta última es la más utilizada en la actualidad y ha demostrado que *E. coli* está compuesta por 8 grupos filogenéticos: A, B1, B2, C, D, E, F y G (Clermont *et al.*, 2013, 2019; Jauregui *et al.*, 2008; Wirth *et al.*, 2006).

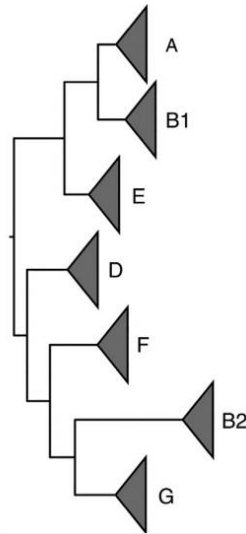


Figura 2. Grupos y relaciones filogenéticas de *Escherichia coli* obtenidos a partir de la metodología de Clermont. Se muestran los grupos filogenéticos hasta ahora reportados. Tomado de Clermont *et al.*, 2019.

La mayoría de las cepas comensales fecales, incluida la cepa K-12 MG1655, pertenecen al filogrupo A (Bidet *et al.*, 2007; Herzer *et al.*, 1990). Las cepas DEC generalmente se agrupan en los filogrupo B1, E y A (Toval *et al.*, 2014), mientras que los grupos B2, F y D abarcan casi en su totalidad a las cepas patógenas extraintestinales (Clermont *et al.*, 2019; Picard *et al.*, 1999), aunque se han reportado cepas UPEC que pertenecen al filogrupo B1, asociadas con cepas comensales causantes de ITU comunitarias (Mosquito *et al.*, 2015). En UPEC, el filogrupo B2 se ha asociado con cepas causantes de urosepsis y hospederos inmunocompetentes y portan mayor cantidad de genes de virulencia que otros filogrupos (Jauréguy *et al.*, 2007; Touchon *et al.*, 2009). Las cepas APEC se relacionan con los grupos C y F (Breland *et al.*, 2017). Finalmente, el filogrupo G ha sido el último en ser identificado, principalmente en aves de corral. Se considera un intermedio entre los grupos F y B2, aunque pocas cepas pertenecen a este linaje, se cree que destacan por sus altas tasas de virulencia y resistencia a antibióticos en cepas ExPEC (Clermont *et al.*, 2019).

1.2.3. Cepas híbridas

Los informes de cepas de *E. coli* que causan infecciones intestinales y extraintestinales en el mismo hospedero son poco frecuentes; sin embargo, en años recientes se ha comenzado a reportar la aparición de cepas “híbridas” de *E. coli* patógena, es decir cepas que portan genes de virulencia asociados a patovares específicos (DEC y/o ExPEC), algunas de ellas con la capacidad de provocar infecciones intestinales seguidas de infecciones del torrente sanguíneo. Estas

cepas híbridas representan nuevos ejemplos de la plasticidad genómica de este microorganismo (Müller *et al.*, 2007; Valiatti *et al.*, 2020).

En UPEC se han identificado combinaciones de este grupo junto con rasgos genéticos de EAEC y STEC en Alemania, UPEC/EPEC y EAEC/UPEC en Brasil y en México se han identificado los patovares UPEC/AIEC, UPEC/ETEC, UPEC/EIEC, UPEC/EPEC (Abe *et al.*, 2008; Ballesteros-Monrreal *et al.*, 2020; Barrios-Villa *et al.*, 2018; Lara *et al.*, 2017; Martínez-Gorgonio, 2019; Toval *et al.*, 2014; Valiatti *et al.*, 2020).

1.3. UPEC

Las cepas UPEC se asocian con serogrupos y serotipos específicos (**tabla 2**), O25:H4 es uno de los más reportados (Arenas-Hernández *et al.*, 2012; Molina-López *et al.*, 2011). Este serotipo en particular presenta diversos factores de virulencia, resistencia a antibióticos y mayor producción de biofilm en comparación con otros serogrupos, características que favorecen la supervivencia y crecimiento bacteriano en tracto urinario y otros ambientes extraintestinales (Noie Oskouie *et al.*, 2019; Wiles *et al.*, 2008). En México, los serotipos O15 y O8 también portan una variedad de factores de virulencia y resistencia (Paniagua-Contreras *et al.*, 2017). Se han asociado algunos serogrupos con personas que padecen alguna comorbilidad específica, por ejemplo, los serogrupos O75 y O21 han sido relacionados a pacientes con diabetes o daño renal, mientras que O25:H4 y O6:H1 se encuentran en cepas UPEC de mujeres embarazadas (Ballesteros-Monrreal *et al.*, 2020; Noie Oskouie *et al.*, 2019).

Tabla 2. Distribución de serogrupos y serotipos reportados en cepas de *E. coli* uropatógena y en cepas de *E. coli* híbridas (UPEC/DEC).

SEROGRUPOS Y SEROTIPOS REPORTADOS EN CEPAS UPEC Y UPEC/DEC		
Tipificación	Cepas UPEC	Cepas híbridas (UPEC/DEC)
SEROGRUPOS	O1, O2, O4, O6, O7, O8, O9, O11, O12, O14, O15, O16, O17, O18, O21, O22, O25, O50, O62, O75, O77, O81, O83, O85, O86, O101, O102.	UPEC/DAEC: O1, O2, O6, O11, O15, O17, O19, O21, O55, O75, O82, O175. UPEC/EAEC: O5, O6, O14, O18, O92, O166, O169.
SEROTIPOS	O1:H4, O1:H6, O1:H7, O1:H-, O2:H1, O2:H4, O4:H5, O6:H1, O7:H4, O7:H6, O7:H-, O18ac:H7, O18ac:H-, O22:H1,	UPEC/EPEC: O25:H4, O71: H40 UPEC/ STEC: O1:H-, O75:H- UPEC/DAEC: O2:H6 UPEC/AIEC: O25:H4

	O25:H4, O75:H5, O75:H7, O15:K52:H1.	UPEC/ETEC: O25:H4 UPEC/EIEC: O25:H4 UPEC/EAEC/EPEC: O15:H18
--	--	--

DEC=*E. coli* diarreogénica. Los serogrupos y serotipos marcados en color gris son los más reportados en México. Tomado de Abe *et al.*, 2008; Arenas-Hernández *et al.*, 2012; Ballesteros-Monreal *et al.*, 2020; Barrios-Villa *et al.*, 2018; Bidet *et al.*, 2007; Blanco *et al.*, 1994, 1997; Li *et al.*, 2010; Martínez-Gorgonio, 2019; Molina-López *et al.*, 2011; Noie Oskouie *et al.*, 2019; Nojoomi & Ghasemian, 2019; Paniagua-Contreras *et al.*, 2017; Valiatti *et al.*, 2020.

Las cepas UPEC suelen agruparse en los filogrupos B2 y D principalmente (Johnson *et al.*, 2002; Ochoa *et al.*, 2016; Xicohtencatl-Cortes *et al.*, 2019); sin embargo, también se ha reportado su asociación a los filogrupos A y B1, relacionados con cepas comensales fecales, sugiriendo que estos filogrupos han adquirido ciertos determinantes de virulencia, dando origen a una amplia diversidad de clones, divergentes tanto en serotipos como en secuencias tipo (ST) (Bidet *et al.*, 2007; Wirth *et al.*, 2006). Esto se ha demostrado comparando los genomas de algunas cepas prototipo UPEC (CFT073, 536 y J96), donde la disposición de los genes y elementos genéticos móviles (MGE) difirieron entre cepas (Brzuszkiewicz *et al.*, 2006; Welch *et al.*, 2002).

1.3.1. Metabolismo de UPEC

Las cepas UPEC tienen la capacidad de habitar dentro del tracto gastrointestinal de los seres humanos pero a diferencia de las cepas DEC o las comensales, UPEC posee determinantes que le permiten adaptarse rápidamente a un cambio de nicho mediante procesos de regulación metabólica (Lloyd *et al.*, 2007).

La proteína reguladora Crp es importante para el crecimiento y metabolismo de UPEC, los sistemas reguladores de doble componente QseBC y KguSR suelen asociarse con este patotipo; QseBC controla la expresión de 36 reguladores y KguSR enciende el metabolismo de α -cetoglutarato y energía bajo condiciones de anaerobiosis (Cai *et al.*, 2013; Donovan *et al.*, 2013; Hadjifrangiskou *et al.*, 2011). Se han descubierto nuevos reguladores UPEC en años recientes, así como la etapa de la infección en que se expresan, por ejemplo, aunque UPEC sea anaerobio facultativo, requiere de respiración aeróbica durante las infecciones urinarias agudas, utilizando el sistema ArcA/B para lograr este cambio (Breland *et al.*, 2017).

Otras adaptaciones metabólicas en UPEC son una mayor expresión de genes de proteínas ribosómicas, componentes de la traducción y transcripción, procesamiento de ARNt y proteínas asociadas a la división celular. En años recientes se ha propuesto el rápido crecimiento como un factor de virulencia

(Forsyth *et al.*, 2018; Reitzer & Zimmern, 2020). También se ha evaluado el papel que tiene la composición de la orina en el desarrollo de ITU. La concentración normal de urea (300 mM), junto a un pH ácido tiene efectos desnaturalizantes que funcionan como un mecanismo de defensa del hospedero (Reitzer & Zimmern, 2020).

El pH de la orina suele encontrarse a niveles de acidez elevada (6.0) por lo que también se han reportado sistemas asociados a la homeóstasis de pH. La lisina descarboxilasa puede participar en la tolerancia ácida al consumir protones y neutralizar los subproductos ácidos de la fermentación de carbohidratos (Brzuszkiewicz *et al.*, 2006). El catabolismo de D-serina en UPEC, llevado a cabo por un sistema de D-serina desaminasa, proporciona una ventaja de crecimiento en el tracto urinario murino además permite utilizar este componente como fuente de N y C en el tracto urinario (Roesch *et al.*, 2003). Otras cepas UPEC cuentan con sistemas para el uso de carbohidratos, dependientes o independientes del sistema fosfotransferasa (PTS) (Brzuszkiewicz *et al.*, 2006).

1.3.2. Patogénesis

La ITU suele iniciar por contaminación periuretral con cepas UPEC residentes en el tracto gastrointestinal (TGI), considerado el principal reservorio, seguida de la adhesión, colonización de la uretra y la posterior migración del patógeno a la vejiga (Flores-Mireles *et al.*, 2015). Estudios recientes han identificado características expresadas tanto en comensales como en cepas patógenas, destacando la expresión de pili traslocados por la vía chaperona-ayudador (CUP), entre ellas las fimbrias tipo 1 y Ucl, capaces de expresarse en TGI y tracto urinario (Klein & Hultgren, 2020).

Cuando se ha colonizado el área periuretral, UPEC asciende por la uretra hasta la vejiga, donde las condiciones de este sitio anatómico favorecen la expresión de pili tipo 1 para adherirse a restos de manosa en los receptores de uroplaquina que recubren las células epiteliales de transición (Kaper *et al.*, 2004), seguido de la liberación de toxinas y proteasas que liberan nutrientes de las células del hospedero, así como la obtención de hierro a través de la síntesis de sideróforos (Flores-Mireles *et al.*, 2015).

La unión entre la adhesina fimbrial FimH y uroplaquina desencadena apoptosis y exfoliación en el uroepitelio con la finalidad de eliminar las bacterias adheridas, mediante la secreción de citocinas proinflamatorias (TNF α) y antiinflamatorias (IL-10) por las células inmunitarias residentes, provocando reclutamiento de neutrófilos

al urotelio (TNF α) seguida de reclutamiento de monocitos y la inducción de muerte celular programada y exfoliación, lo que resulta en una disminución inicial de la carga bacteriana en la vejiga pero también expone el epitelio de transición subyacente (Klein & Hultgren, 2020; Sen *et al.*, 2021). Posteriormente se liberan citocinas antiinflamatorias, como IL-10, para reducir la inflamación local, inhibir la activación de macrófagos y la producción de citocinas evitando un proceso de hiperinflamación (Sen *et al.*, 2021), este paso es decisivo para el éxito en la colonización o la eliminación del uropatógeno, ya que UPEC adherido al urotelio puede ser hasta 100 veces más tolerante a los antibióticos (Flores-Mireles *et al.*, 2015; Zalewska-Piątek & Piątek, 2020).

Para evitar la eliminación, las bacterias pueden sobrevivir y persistir dentro de las células epiteliales de la vejiga, formando protuberancias en forma de vainas que luego se internalizan, originando comunidades bacterianas intracelulares (IBC) (Kaper *et al.*, 2004). Las IBC representan una etapa latente que se activa y se elimina cuando se suprime la inmunidad del hospedero, volviendo a emerger a la superficie con morfología filamentosa, causando las ITU recurrentes, siendo asociadas a la fase aguda de la infección. El proceso de invasión y formación de IBC proporciona a UPEC la capacidad de sobrevivir a los estrictos cuellos de botella en el tracto urinario, incluida la expulsión mediada por el receptor TLR-4, la exfoliación de células paraguas, el ascenso a los riñones, la micción y la inflamación (Flores-Mireles *et al.*, 2015; Hannan *et al.*, 2012). Las IBC están asociadas a la formación de biopelículas, las cuales dificultan el tratamiento de estas infecciones debido a la resistencia bacteriana a los antibióticos y dificultando su eliminación a través del sistema inmunológico del hospedero. Las pruebas de laboratorio destacan que las estructuras de la biopelícula pueden ser 1000 veces más resistentes a los antibióticos que las bacterias planctónicas (Zalewska-Piątek & Piątek, 2020).

UPEC también puede formar reservorios intracelulares quiescentes (QIR), los cuales están asociados a infección crónica inactiva o activa si se trata de un episodio de bacteriuria asintomática (ABU). Los QIR son conjuntos de 4-10 bacterias latentes que pueden permanecer viables durante meses y reactivarse, ocasionando ITUr (Flores-Mireles *et al.*, 2015; Hannan *et al.*, 2012).

Si la cepa UPEC tiene la capacidad de causar pielonefritis, en cierto momento se detendrá la expresión de este pili, lo cual causa la liberación de la cepa de los receptores en el urotelio, comenzará a expresar el flagelo el cual ayuda a la cepa a ascender a través de los uréteres hacia los riñones, donde se unirá con los receptores de digalactósido expresados en el epitelio renal gracias a la fimbria tipo P o Pap (pilus associated to pyelonephritis). En este sitio anatómico, comenzará a sintetizar hemolisina (HlyA), asociada a mayor producción de IL-6 e IL-8. HlyA y el

lipopolisacárido (LPS) provocan una respuesta inflamatoria aguda que conlleva al reclutamiento de células polimorfonucleares (PMN). Si la cepa causante de pielonefritis expresa, además, citotoxinas como Sat y Vat, tendrá capacidad de causar daño en glomérulos y epitelio circundante, pudiendo atravesar la barrera epitelial tubular para acceder al endotelio, seguido del torrente sanguíneo, iniciando un proceso de bacteriemia (Flores-Mireles *et al.*, 2015; Kaper *et al.*, 2004).

1.3.3. Factores de virulencia

La virulencia se define como la capacidad relativa de un microorganismo para causar daño en un hospedero susceptible y está determinada por los factores de virulencia que presente dicho organismo; éstos ejercen distintas funciones como ayudar a los organismos a evadir las defensas del hospedero, adherirse y colonizar sitios anatómicos clave, invadir y alterar la fisiología de un tejido determinado y/o activar una respuesta inflamatoria nociva del hospedero (Casadevall & Pirofski, 2003). En conjunto determinan la secuencia de eventos que conducirán al progreso de la enfermedad; por lo tanto, para conocer la capacidad patogénica de un organismo es necesario determinar la prevalencia de genes de virulencia y comparar estos entre cepas patógenas y no patógenas. Las cepas UPEC portan factores de virulencia especializados, como adhesinas, toxinas, sideróforos, cápsula e invasinas, la mayoría de ellos presentes en el cromosoma dentro de islas de patogenicidad (PAI) o fuera de este, en plásmidos y fagos que han sido adquiridos por HGT (Bauer *et al.*, 2002; Brons *et al.*, 2020; Johnson *et al.*, 2001; Lloyd *et al.*, 2007; Matinfar *et al.*, 2021).

1.3.3.1. Adhesinas

UPEC se adhiere a moléculas específicas (receptores) para facilitar la interacción con las células del portador (vejiga o riñón) y establecer infecciones exitosas. La adhesión es el primer paso necesario para colonizar y persistir dentro del hospedero y se lleva a cabo por adhesinas fimbriales (Holden *et al.*, 2007; Vo *et al.*, 2017). Las proteínas estructurales CsgA del curli, la adhesina FimH de las fimbrias tipo 1, SfaS en fimbrias tipo S, FocH en F1C, DrA en Dr y las variantes alélicas de *papG* (I a III) de las fimbrias P son las adhesinas fimbriales más importantes en el proceso de colonización y adherencia de UPEC en tracto urinario (Luna-Pineda *et al.*, 2018) y cada una de estas adhesinas reconoce un blanco específico y desencadena vías de señalización características, que contribuyen a la colonización de las células del uroepitelio (Lüthje & Brauner, 2014).

Las **fimbrias tipo 1** son fimbrias similares a pelos involucradas en la adhesión de UPEC a varias superficies mucosas mediante la interacción con receptores que contienen manosa como uroplaquina e integrinas en las células paraguas superficiales del uroepitelio o la proteína Tamm-Horsfall, secretada por la mucosa de la vejiga humana (Breland *et al.*, 2017; Buckles *et al.*, 2004). El operón *fimAICDFGH* es el encargado de la síntesis de esta fimbria y su expresión se encuentra regulada por un elemento invertible (*fimS*) que contiene el promotor responsable de la transcripción del gen de la subunidad estructural o pilina (*fimA*) y de otros genes accesorios necesarios para el ensamblaje. Estas fimbrias están presentes en 80-90% de todas las *E. coli*, tanto comensales como patógenas (Kuwahara *et al.*, 2010; Welch *et al.*, 2002; Werneburg & Thanassi, 2018). Dentro del complejo clonal ST131, las fimbrias tipo 1 se encuentran presentes casi en su totalidad. Este clon se ha dividido en 3 clados (A, B, C) coincidiendo con variaciones alélicas presentes en el gen *fimH*, siendo el clado C pandémico y asociado con cepas altamente resistentes y virulentas (Sarkar *et al.*, 2018).

El **pili tipo P** tiene una distribución variable en cepas UPEC (50%), asociándose con más frecuencia a aquellas con capacidad de causar pielonefritis aguda (81%) (Blanco *et al.*, 1997). Estas fimbrias son codificadas por un operón de 10 genes (*papBAHCDJKEFG*) y la expresión del promotor *pap* está finamente regulada por las proteínas PapI (que se transcribe divergentemente) y PapB, entre varios reguladores, localizados mayoritariamente en PAIs e insertados en el cromosoma dentro o adyacente a genes de ARNt *pheV* y *pheU* (Biggel *et al.*, 2020; Lane & Mobley, 2007; Werneburg & Thanassi, 2018). La adhesina fimbrial PapG participa en la colonización del riñón mediante la interacción con globoceramidas, que son expresadas en la superficie de las células renales, facilitando la colonización de la pelvis renal y la posterior invasión del parénquima renal (Blanco *et al.*, 1997). La diversidad de globoceramidas ha favorecido la aparición de 4 variantes alélicas del gen *papG*, caracterizadas en base a su capacidad de unión al receptor (Luna-Pineda *et al.*, 2018). El alelo PapGI fue el primero en ser descrito; sin embargo, es poco común en aislados humanos. PapGII se asocia con pielonefritis y bacteremia en humanos y se ha demostrado que las cepas que contienen este alelo suelen ser más invasivas debido a que la unión con las células renales desencadena la inflamación del tejido renal (Ambite *et al.*, 2019; Biggel *et al.*, 2020). PapGIII está relacionado con procesos de cistitis y bacteriuria asintomática en humanos e infecciones urinarias en perros y gatos, así como procesos bacterémicos sólo en casos de hospederos inmunocomprometidos y respecto a PapGIV, aún son desconocidos sus sitios de unión y el daño asociado (Lane & Mobley, 2007).

Las **fimbrias tipo S** están codificadas en el operón altamente conservado *sfaADEFSGH*, localizado en cromosoma y homólogo con los genes codificantes de la fimbria F1C (operón *focAICDFGH*) (Werneburg & Thanassi, 2018). Esta fimbria

fue identificada por primera vez en una cepa UPEC y posteriormente en aquellas causantes de meningitis y sepsis. Las adhesinas reconocen ácido siálico, eritrocitos, fibronectina humana y laminina. La orina posee mecanismos para inhibir la unión de estas fimbrias por lo que tienen mayor relevancia en la patogénesis de sitios como las meninges en comparación del tracto urinario (Blanco *et al.*, 1997; Werneburg & Thanassi, 2018).

Las **fimbrias Afa/Dr** están codificadas en el operón *afa(dra)BCDPE*. Son adhesinas afimbriales (AFA) que median la adhesión y la invasión en cepas DEC y UPEC. Estas fimbrias constan de una estructura flexible y delgada, compuestas por una única subunidad de proteína, AfaE (DraE), que también funciona como subunidad adhesiva, por lo que toda la fibra del pili puede actuar en adherencia. La variante Afa-VIII se ha asociado con cepas causantes de pielonefritis (Biggel *et al.*, 2020; Werneburg & Thanassi, 2018).

Las **fimbrias Ucl** están localizadas en PAIs (*leuX* y *selC*) y son homólogas a las fimbrias UCA (Adhesina de células uroepiteliales) de *Proteus mirabilis*. Está formada por el operón *uclABCD* y ayuda a la formación de biopelículas sobre superficies abióticas, así como la unión específica a células uroepiteliales humanas exfoliadas y a los O-glicanos en células epiteliales en las criptas inferiores del colon (Klein & Hultgren, 2020; Wurpel *et al.*, 2016).

La fimbria **curli** es una proteína de superficie fibrosa que reconoce y se une a las proteínas de la matriz del hospedero, como la fibronectina, la laminina y el plasminógeno (Cordeiro *et al.*, 2016). El gen *csgA* codifica la proteína CsgA del curli fimbrial (Luna-Pineda *et al.*, 2018). Se ha identificado en la mayoría ($\geq 95\%$) de las cepas de UPEC, y se caracteriza por participar en procesos de cistitis y urosepsis. La proteína CsgA ha sido considerada como una adhesina involucrada en la adherencia de UPEC a las células de la vejiga y la formación de biopelículas bacterianas (Cordeiro *et al.*, 2016; Luna-Pineda *et al.*, 2018).

YfcV es la subunidad principal de una fimbria de *E. coli*. El gen *yfcV* está codificado cromosómicamente y se encuentra altamente conservado en CFT073 y UTI89 (100% de identidad). En años recientes, *yfcV* se ha comenzado a utilizar como un marcador predictivo de cepas UPEC, aumentando las probabilidades de que una cepa sea UPEC en 99.5 veces si presenta este gen (Spurbeck *et al.*, 2012).

TosA es una adhesina no fimbrial, altamente antigénica y codificada en el operón *tosRCBDAEF*, en la PAI_{CFT073-aspv} (Lloyd *et al.*, 2007). Se une a los receptores de las células epiteliales en tracto urinario superior y están asociadas con un alto nivel de colonización del epitelio urinario, contribuyendo a la capacidad de UPEC para extenderse desde los riñones a órganos distantes (Vigil *et al.*, 2012; Xicohtencatl-Cortes *et al.*, 2019). La expresión de TosA es mayor en las cepas UPEC productoras

ESBL y portadoras de integrones, principalmente de clase 1. Se ha asociado a cerca del 25% de cepas UPEC y 11% de aislados fecales, principalmente pertenecientes al filogruppo B2. (Vigil *et al.*, 2011; Xicohtencatl-Cortes *et al.*, 2019).

También se ha reportado algunas proteínas con función de adhesinas, como **Iha**, una adhesina homóloga del gen regulado por hierro IrgA de *V. cholerae*, presente en la membrana externa de cepas EHEC y UPEC, especialmente aquellas causantes de cistitis en niños (74%), pielonefritis (56%) y urosepsis en adultos (57%) (Johnson *et al.*, 2005). **Hra** se caracteriza como una proteína hemaglutinante resistente al calor y a manosa con capacidad de adherirse a las células del uroepitelio en aproximadamente 50% de cepas UPEC. Se ha identificado en la PAI V de J96, así como en IS y transposones en otras cepas UPEC (Srinivasan *et al.*, 2003) y **Tsh** es una proteína autotransportadora con funciones de hemaglutinina y proteasa. Está codificada en un plásmido que prevalece en los aislados de APEC y UPEC presenta 78% de identidad con Vat. Se cree que su función es retrasar la infiltración de neutrófilos en el tracto urinario en respuesta a UPEC al escindir las glicoproteínas de superficie de los leucocitos que participan en la atracción y migración de neutrófilos (Spurbeck *et al.*, 2012).

1.3.3.2. Toxinas

Generalmente, UPEC carece del sistema de secreción de tipo III (T3SS), usado por algunos patógenos para inyectar moléculas efectoras en las células del hospedero y en su lugar suele presentar una variedad de toxinas como α -hemolisina (HlyA), toxina autotransportadora secretada (Sat) y el factor necrotizante citotóxico (CNF) los cuales contribuyen al aumento de la capacidad citotóxica en el TU por alteración de las vías de señalización en la célula eucariota blanco (Kaper *et al.*, 2004; Luna-Pineda *et al.*, 2018; Wiles *et al.*, 2008).

El **factor citotóxico necrotizante (CNF)** es una toxina tipo A-B, asociada a cepas UPEC y NMEC (Johnson *et al.*, 2001). Se divide en 3 variantes: CNF-1, producido por cepas de *E. coli* que causan infecciones extraintestinales en humanos y animales, provoca necrosis en conejos si se inyecta intradérmicamente y multinucleación celular. CNF-2 es producida por cepas aisladas de terneros y corderos con diarrea y CNF-3, detectada en cepas aisladas de corderos y cabras sanas, pero también en terneros, corderos y cabras con diarrea. Mientras CNF-1 y CNF-3 están codificados en el cromosoma bacteriano, los genes que codifican CNF-2 se localizan en un plásmido (Knust & Schmidt, 2010; Mamani, 2015). CNF se une a su receptor celular, posteriormente es endocitado y llevado al citosol, donde activa la vía de las RhoGTPasas (RhoA, Rac, Cdc42), induciendo cambios celulares

basado en reordenamientos del citoesqueleto de actina, además de alterar las vías de señalización que activan cascadas de cinasas que regulan la expresión génica, la endo y exocitosis, la proliferación celular y la apoptosis. El sustrato específico difiere entre los CNFs: CNF-2 preferentemente modifica RhoA y Rac, mientras que CNF-1 y CNF-3 desaminan RhoA, Rac y Cdc42 (Mamani, 2015).

La toxina **autotransportadora vacuolizante (Vat)** es un miembro de las proteínas autotransportadoras de serina proteasa (SPATE), codificadas cromosómicamente en UPEC y algunas APEC. Vat se ha identificado en 20-36% de UPEC y está presente en casi 68% de los aislados específicos de urosepsis. Esta toxina tiene un efecto citotóxico en el tejido endotelial de la vejiga y el riñón, induce la formación de vacuolas, la pérdida de contacto célula-célula en urotelio y cambios en la distribución de F-actina (Díaz *et al.*, 2020; Jahandeh *et al.*, 2015; Spurbeck *et al.*, 2012).

La **toxina autotransportadora secretada (Sat)** pertenece a la familia SPATE y ha sido identificada en el cromosoma de CFT073, dentro de la PAI II (Welch *et al.*, 2002). Sat desencadena un efecto citotóxico sobre la vejiga y el riñón, asociándose principalmente a pielonefritis (Jahandeh *et al.*, 2015). La expresión de Sat por CFT073 en un modelo murino induce daño renal, provocando la disolución de la membrana glomerular, la pérdida de células epiteliales tubulares y la vacuolización del tejido renal (Wiles *et al.*, 2008).

HlyA es una proteína codificante de **α -hemolisina**, una toxina de la familia RTX. Se inserta en las membranas del hospedero y forma poros que permiten la entrada de Ca^{2+} en las células del hospedero, alterando su fisiología o provocando la muerte celular, lo que genera la disponibilidad de nutrientes para los patógenos (Welch, 1991). Está codificada en ~ 50% de los aislados de UPEC y su expresión se asocia con una mayor gravedad clínica en pacientes con UTI (Wiles *et al.*, 2008). HlyA causa daño a las células uroteliales y tubulares renales e induce oscilaciones de Ca^{2+} en las células epiteliales de los túbulos renales, facilitando el ascenso y colonización de los uréteres y el parénquima renal. También desencadena la muerte celular proinflamatoria dependiente de caspasa-1/caspasa-4 en las células epiteliales de la vejiga, lo que da como resultado la exfoliación celular cambios inflamatorios, lisis celular y hemólisis (Jahandeh *et al.*, 2015; Terlizzi *et al.*, 2017). Parte de su expresión está regulada por el sistema de doble componente CpxR-CpxA el cual detecta el plegamiento incorrecto de las proteínas, desencadenando la producción de HlyA (Klein & Hultgren, 2020).

1.3.3.3. Sistemas para la captación de hierro

La adquisición de hierro es necesaria para la supervivencia de UPEC en un entorno limitado de este nutriente, como lo es el tracto urinario por lo que ha desarrollado múltiples sistemas de captación que le permiten tomar el hierro del medio y posteriormente concentrarlo en el citosol bacteriano, donde es liberado (Terlizzi *et al.*, 2017; Wiles *et al.*, 2008). UPEC tiene tres sistemas de captación de hierro: sideróforos, hemóforos y captación directa de hierro en su estado ferroso (Gonzales-Rodriguez *et al.*, 2020).

Los sideróforos son quelantes de hierro cuya función es unir al hierro férrico (Fe^{3+}) con alta afinidad. La adquisición de hierro consta de 5 pasos: síntesis del sideróforo en el citoplasma, exportación del sideróforo, recepción del complejo sideróforo-hierro, internalización y liberación del hierro en el citoplasma o almacenamiento para su uso posterior (Garénaux *et al.*, 2011; Mamani, 2015). En UPEC se han detectado 4 diferentes sideróforos: enterobactina y salmoquelina (sideróforos catecolatos), aerobactina y yersiniobactina (sideróforos de tipo hidroxamato), característica que refleja su adaptación al entorno del tracto urinario (Lloyd *et al.*, 2007).

Enterobactina es un sideróforo común expresado por cepas patógenas y comensales. Su presencia en *E. coli* K-12 le otorga la ventaja de colonizar nichos pobres en hierro, como el tracto urinario. La enterobactina está codificada por los genes *ent* (enzimas biosintéticas), *fep* (captación del complejo) y *fes* (liberación de hierro). FepA es el receptor de enterobactina (Lloyd *et al.*, 2007; Wiles *et al.*, 2008). La enterobactina compite con la transferrina por la unión del hierro; sin embargo, el sistema inmune del hospedero puede liberar lipocalina-2, molécula que se une específicamente a enterobactina, evitando que pueda adquirir hierro. Por lo tanto, las bacterias que expresan solo este sideróforo suelen eliminarse eficientemente en modelos murinos (Wiles *et al.*, 2008).

Aerobactina es un sistema de captación codificado en el locus *iuc*, que consta de seis genes (*shiF*, *iucA*, *iucB*, *iucC*, *iucD* e *iutA*), los primeros 5 se asocian a su síntesis y el gen *iutA* codifica para el receptor de la membrana externa (Garénaux *et al.*, 2011; Mamani, 2015). Generalmente los genes de este sideróforo están localizados en el plásmido pColV-K30, pero también pueden integrarse al cromosoma bacteriano (Mamani, 2015). Aerobactina se ha reportado con mayor frecuencia en cepas UPEC asociadas a pielonefritis (73%) frente a aquellas causantes de cistitis (36%) y ABU (48%) (Biggel *et al.*, 2020).

La **salmoquelina** es un sideróforo variante de enterobactina, el cual ha sido modificado por glucosilación para evitar ser inactivado por la lipocalina-2 (Wiles *et al.*, 2008). Está formado por los genes *iroN* (proteína receptora), *iroE*, *iroD* (proteína

degradadora), *iroC* (proteína asociada a exportación), *iroB* (proteína de biosíntesis) (Garénaux *et al.*, 2011). Suele encontrarse en cepas ExPEC. Los genes responsables para la biosíntesis y transporte generalmente se localizan en plásmidos ColV o ColBM, aunque también pueden ser codificados en PAIs (Mamani, 2015). El gen *iroN* codifica la síntesis de la proteína IroN, un receptor de sideróforo catecolato, más prevalente en *E. coli* aislada del tracto urinario y sangre que en cepas aisladas de heces (Russo *et al.*, 2002).

Yersiniobactina (Ybt) es otro sideróforo presente en cepas UPEC, especialmente durante la infección en vejiga y también asociado a desarrollo de septicemia (Klein & Hultgren, 2020). Además de su unión a hierro, se ha demostrado que Ybt tiene la capacidad de secuestrar iones de cobre, evitando el efecto tóxico hacia UPEC y usándolo para las funciones celulares dependientes de Cu (Klein & Hultgren, 2020; Robinson *et al.*, 2018). Para la síntesis de yersiniobactina, se necesita de la proteína 2 de alto peso molecular (HMWP2), codificada por el gen *irp2* y regulada por los niveles ambientales de hierro. La formación de Ybt es compleja e involucra la síntesis de 4 operones: dos operones son los encargados codificar las proteínas asociadas al transporte de la membrana externa e interna, FyuA e YbtPQ. Los otros dos operones codifican proteínas asociadas a la biosíntesis de Ybt y el factor de transcripción YbtA, que es necesario para la expresión de los cuatro operones (Robinson *et al.*, 2018). El gen *fyuA* es el encargado de codificar al receptor de yersiniobactina (Lloyd *et al.*, 2007). La proteína FyuA, una vez que ha captado hierro o cobre procederá a la internalización hacia el citoplasma con ayuda de las proteínas YbtP-YbtQ (Klein & Hultgren, 2020).

TonB es una proteína de membrana externa transportadora de hierro (Buckles *et al.*, 2004). Los receptores de sideróforos requieren el complejo TonB, localizado en la membrana citoplasmática, un sistema de adquisición de hierro de alta afinidad que permite la unión y la quelación del hierro en la superficie celular para promover su absorción (Terlizzi *et al.*, 2017; Wiles *et al.*, 2008). TonB es reclutado para transferir energía al receptor e inducir un cambio conformacional que permite la internalización de hierro-sideróforo en el periplasma (Mamani, 2015).

El operón **chu** está formado por ocho genes que codifica proteínas implicadas en el transporte de residuos hemo a la célula bacteriana y en su procesamiento posterior. ChuA es el receptor de hemo/hemoglobina, localizado en la membrana externa que forma parte de un mecanismo específicos para adquirir directamente el hierro del hospedero, que es dependiente de TonB. ChuA se unen al grupo hemo, directamente o después de su eliminación de las hemoproteínas, y lo transporta al periplasma, donde los transportadores ABC específicos lo transfieren al citoplasma (Hagan, 2009).

IreA es una proteína receptora de hierro presente en la membrana externa y principalmente asociada a cepas UPEC de los filogrupos B2 y D, así como en cepas APEC (Hagan, 2009; Yaxin Li *et al.*, 2016).

1.3.3.4. Evasión de la respuesta inmune

Iss es una proteína de incremento de supervivencia en suero, reportándose en aumentos de hasta 20 veces en la resistencia del complemento. El gen *iss* se localiza en cromosoma y plásmidos (ColV) de cepas ExPEC y comparte similitud con gen *bor* del bacteriófago λ , que se cree es el ancestro de las variantes alélicas de *iss* (Johnson *et al.*, 2008). **TraT** también ayuda en la resistencia al suero, gracias a la neutralización del efecto bactericida del suero humano (Valiatti *et al.*, 2020), además de asociarse con la disminución de la sensibilidad de *E. coli* a la fagocitosis por macrófagos a través del antagonismo con opsonización del complemento (Carattoli, 2009). Suele identificarse en cepas UPEC causantes de cistitis, pielonefritis y bacteriemia (Jahandeh *et al.*, 2015).

Las **proteínas de membranas externa (Omp)** tienen funciones importantes en UPEC. **OmpA** es necesaria para la maduración de IBC independientemente de la producción de pili de tipo 1, lo que sugiere que juega un papel en la agregación o supervivencia intracelular, además media la entrada en las células epiteliales gastrointestinales (Fagan & Smith, 2007; Nicholson *et al.*, 2009) y **OmpT** se relaciona con los procesos de ABU y UTI. Su función se centra en la activación del plasminógeno y la resistencia a los péptidos antimicrobianos en la orina humana y puede expresarse en ambientes altamente desnaturizantes (Hui *et al.*, 2010).

Las **cápsulas** son estructuras generalmente formadas de polisacáridos de alto peso molecular y adhesión firme que envuelven la superficie bacteriana, protegiendo a la célula de la opsofagocitosis y la muerte mediada por el complemento. Se han identificado aproximadamente 80 serotipos capsulares en *E. coli*, con vías de biosíntesis y ensamblaje comunes, subdivididas en 4 grupos, donde las cápsulas del grupo 1 y 4 son termoestables y comparten un sistema de ensamblaje común, diferente del que se usa para las cápsulas del grupo 2 y 3 (Whitfield, 2006). Los grupos 1 y 4 se asocian con cepas DEC, mientras que las cápsulas de los grupos 2 y 3 se encuentran en cepas ExPEC (Whitfield, 2006). La cápsula del grupo 2 se asocia con infecciones extraintestinales graves, ha demostrado tener capacidad termorreguladora, ya que a 20°C es transcripcionalmente silenciosa y se asemeja a glicoconjugados de vertebrados (K1, K4, K5) lo cual evita el desarrollo de una respuesta de anticuerpos fuerte por parte del sistema inmune del hospedero (Rowe *et al.*, 2000). Estas cápsulas se sintetizan en el loci *kps*, formado por 3 regiones,

donde 1 y 3 corresponden a genes *kps* conservados y la región 2 es específica de serotipo. El polímero capsular se exporta a través de la membrana interna por un transportador ABC, compuesto por KpsMT, mientras que la proteína KpsE se localiza en la región 1 y es la encargada del acoplamiento para los pasos de traslocación posteriores (Whitfield, 2006).

1.3.3.5. Invasinas

IbeA es una invasina para el endotelio cerebral, pero también tiene papel en el desarrollo de ITU, específicamente en la invasión al uroepitelio, siendo característica de las cepas ExPEC del filogrupo B2 (Flécharde *et al.*, 2012; Johnson *et al.*, 2001).

1.3.3.6. Misceláneos

Los **flagelos** son organelos que confieren motilidad, formación de biofilm, colonización, ascenso y desencadenamiento de la activación de células inmunes innatas del hospedero, como macrófagos y neutrófilos (Jahandeh *et al.*, 2015; Kakkanat *et al.*, 2015). Tienen importancia durante la maduración y salida de UPEC de las IBC en vejiga, donde expresan el flagelo para lograr motilidad y posterior diseminación, así como en su ascenso por los túbulos renales para colonizar riñón. Suelen presentarse en 70% de cepas UPEC en mujeres con ITU agudas, asintomáticas o recurrentes (Wright *et al.*, 2005).

El **antígeno 43** es una proteína autotransportadora de superficie celular codificada cromosómicamente por el gen *agn43* y se involucra en la adhesión, autoagregación, formación de biopelículas en superficies abióticas y uroepitelio, la formación de IBC y la colonización mejorada del epitelio vesical murino. Su expresión se asocia a un decaimiento en la expresión de flagelos y con una mayor resistencia hacia agentes antimicrobianos (Biggel *et al.*, 2020; Ulett *et al.*, 2006; Wurpel *et al.*, 2016). Ag43 presenta variantes alélicas características de diferentes cepas de *E. coli*, como K12, EHEC O157:H7 EDL 933 y UPEC CFT073, en esta última como 2 variantes alélicas denominadas Ag43a y Ag43b (Klemm *et al.*, 2004).

Usp es una proteína específica uropatógena clasificada como una ADNasa inespecífica perteneciente a la familia de nucleasas HNH y también como una bacteriocina asociada a invasión e inflamación. Es prevalente en cepas UPEC causantes de ITU severa y localizada en el cromosoma, dentro de una PAI (Jahandeh *et al.*, 2015; Lai *et al.*, 2016; Östblom *et al.*, 2011). No ha sido detectada

en cepas fecales/comensales o DEC (Lloyd *et al.*, 2007). El segmento codificante de *Usp* presenta 3 marcos de lectura abierta (ORF): *orfU1*, *orfU2* y *orfU3*, de 98, 97 y 96 aminoácidos y se han reportado tres tipos de variación de tamaño para el gen *usp* (1, 2.5 y 3 kb), variantes en la región terminal 3'. El conjunto de *usp* y los ORF forman la PAI *usp*, dividida en 6 segmentos (B-G), donde a excepción del último, pueden variar en su ordenamiento o incluso estar ausentes, asociando la variación de tamaño a esta estructura de mosaico (Nakano *et al.*, 2001).

malX codifica la enzima II del sistema fosfotransferasa (PTS), y se utiliza como marcador de isla de patogenicidad de la cepa CFT073 (Valiatti *et al.*, 2020). La función del sistema PTS es el transporte activo de carbohidratos, catalizando la fosforilación de los sustratos de azúcares entrantes y translocándolos a través de la membrana celular. Este sistema está involucrado en el transporte de maltosa y puede transportar glucosa (Reidl & Boos, 1991). Se ha demostrado la presencia de *malX* en cepas UPEC persistentes, recurrentes y en cepas aisladas de TGI de bebés sanos (Östblom *et al.*, 2011; Valiatti *et al.*, 2020).

1.3.4. Virotipo

Se han desarrollado 2 esquemas de virotipificación, propuestos por distintos grupos de estudio. El primero, desarrollado por Blanco *et al.*, está basado en la amplificación mediante PCR de los genes: *afaFM955459* que codifica para la adhesina Afa/Dr, *iroN* para un receptor de catecolato, *ibeA* para una proteína de invasión endotelial y *sat* para una toxina autotransportadora secretada (Blanco *et al.*, 2013). Posteriormente, en 2019, Martínez-Gorgonio identificó la presencia de un quinto virotipo (E), estrechamente asociado a cepas ST131. Los virotipos A, B y C son más frecuentes entre los aislados O25:H4-ST131 (Blanco *et al.*, 2013; Martínez-Gorgonio, 2019).

El segundo esquema fue propuesto por Nicolás-Chanoine *et al.*, y se basa en la asignación de virotipo (A, B, C, D, E) mediante la amplificación de 10 genes: *afa/draBC*, *iroN*, *ibeA*, *sat*, *papGII*, *cnf-1*, *hlyA*, *PapGIII*, *cdtB*, *neuC-K1* y el operón fimbrial *afa*. Barrios-Villa *et al.*, añadieron 2 nuevos virotipos (F y G) (Barrios-Villa *et al.*, 2018; Nicolas-Chanoine *et al.*, 2014).

1.4. *E. coli* ST131

Algunas cepas ExPEC y UPEC han adquirido determinantes genéticos que les han permitido predominar sobre otras cepas y se han agrupado en ciertos grupos

clonales, como ST69, ST73, ST95, ST127 y ST131, siendo este último tan exitoso que hoy en día se considera pandémico (Biggel *et al.*, 2020; Croxall *et al.*, 2011; Johnson *et al.*, 2013; Matinfar *et al.*, 2021).

ST131 es un clon de alto riesgo, de extensa diseminación y productor de BLEE, además de apto para colonizar nuevos nichos como el tracto urinario (Banerjee & Johnson, 2014; Peirano & Pitout, 2010), por lo que está fuertemente asociada con infecciones en vejiga, infecciones renales, urosepsis e infecciones del torrente sanguíneo a nivel mundial (Kondratyeva *et al.*, 2020; Price *et al.*, 2013). Presenta resistencia a diversos antimicrobianos y está fuertemente asociado con el gen *bla*_{CTX-M} (Cantón & Coque, 2006; Ludden *et al.*, 2020). Generalmente las cepas de este clon pertenecen al filogrupo B2 y principalmente al serotipo O25:H4, seguido de O16:H5 (Blanc *et al.*, 2014).

1.4.1. Estructura clonal

ST131 se ha agrupado en 3 clados, en base a variaciones alélicas del gen que codifica la adhesina fimbrial tipo 1 específica de manosa, *fimH* (Johnson *et al.*, 2013). El clado A presenta la variante *fimH41*, el clado B *fimH22* y el clado C *fimH30*, asimismo, el clado C se subdivide en los subclones C1/H30-R si se trata de una cepa resistente a FQ debido a mutaciones puntuales en los genes *gyrA* y *parC* (Petty *et al.*, 2014), o en C1/H30-R-M27 si es portadora de *bla*_{CTX-M-27} (Fernandes *et al.*, 2020). Si además de dichos alelos, expresa *bla*_{CTX-M-15} se define como C2/H30-Rx, nombrado así por su resistencia más extensa (Price *et al.*, 2013).

1.4.2. Epidemiología de ST131

En el año 2008 fue identificado un nuevo grupo clonal de *E. coli* nombrado secuencia tipo 131 (ST131) en cepas pertenecientes a 8 países: Francia, Portugal, España, Suiza, Líbano, India, Corea y Canadá, confirmándose su diseminación pandémica (Nicolas-Chanoine *et al.*, 2008). El serotipo O16:H5 suele ser poco prevalente; sin embargo en China se reporta con mayor frecuencia (Li *et al.*, 2017; Zhong *et al.*, 2019). En México, se ha reportado a *E. coli* O25: H4 ST131 como el clon aislado con más frecuencia durante procesos de cistitis (Morales-Espinosa *et al.*, 2016).

Se sugiere que ST131 se ramificó en los clados A y el ancestro de los clados B y C hace ~130 años, en el sudeste asiático. Hace veinticinco años, el clado C emergió

del clado B en Norteamérica y fue seguido por la división entre los subclados C1/ *H30-R* y C2/ *H30-Rx* aproximadamente 25 años atrás, con el uso generalizado de FQ y cefalosporinas de espectro extendido. Posteriormente, los subclados se diseminaron en Europa y Asia (Stoesser *et al.*, 2016). En años recientes, el subclón *H30-R-M27* (clado C) comienza a tener gran importancia en regiones como Japón y Europa (Fernandes *et al.*, 2020; Peirano & Pitout, 2019).

ST131 productora de BLEE suele mantenerse como reservorio en ancianos y centros de atención a largo plazo (Ludden *et al.*, 2020). Generalmente, ST131 se asocia con producción de BLEE, especialmente CTX-M-15, en algunas zonas ST131 es BLEE negativo, pero presenta resistencia hacia FQ (Johnson *et al.*, 2013). Aunque ST131 se reportó por primera vez en el año 2008, se han identificado aislados ST131 que datan de 1967 y en un análisis de cepas aisladas en el periodo 1967-1999, solo se encontraron subclones susceptibles a FQ (FQ-S), predominantemente *H22* (clado B) y *H35* (Johnson *et al.*, 2012, 2013). Actualmente se ha reportado aislados ST131, tanto productores como no productores de enzimas BLEE en TGI en personas sanas; sin embargo, la mayoría de estudios tanto clínicos como epidemiológicos suelen enfocarse solamente en aquellos aislados pertenecientes a este grupo clonal asociados a la producción de BLEE, especialmente CTX-M-15 (López-Cerero *et al.*, 2014).

1.4.3. Plasmidoma en ST131

La mayoría de los plásmidos codificantes de BLEE en ST131 pertenecen al grupo de incompatibilidad IncF y poseen numerosos genes de resistencia a distintas familias de antibióticos como fluoroquinolonas, macrólidos y aminoglucósidos, dificultando el tratamiento. También portan genes de virulencia, de transferencia y sistemas toxina-antitoxina que garantizan su prevalencia para las generaciones siguientes. Otra característica importante de estos plásmidos es la capacidad de interactuar y regular factores patógenos codificados cromosómicamente (Whitmer *et al.*, 2019).

Un estudio del plasmidoma en secuencias ST131 mostró asociación de plásmidos IncF codificantes de CTX-M-27 con el clado C1 mientras que los plásmidos IncF, codificantes de CTX-M-15 se asociaron al clado C2, sugiriendo adaptaciones clado-plásmido. También se observó que estos plásmidos son de rango estrecho y limitados a *E. coli* (Kondratyeva *et al.*, 2020). Para lograr una caracterización clado-plásmido específica, Johnson *et al.*, realizaron análisis comparativos en ST131, encontrando diversos plásmidos IncF, relacionados con la evolución de los principales clados de ST131. Dentro de este proceso evolutivo, destaca la

secuencia de inserción IS26, relacionada a las pérdidas, ganancias y reordenamientos de genes de supervivencia y adaptación en enterobacterias (He *et al.*, 2015; Johnson *et al.*, 2016).

En los sublinajes de ST131, se cree que la variante alélica H22 (clado B) es un ancestro de las variantes H30 (clado C) y a su vez, H30-S fue predecesora de H30-R, de este clado se desprenden los clados hermanos H30-R1 y H30-Rx, este último posiblemente surgió por la adquisición de un plásmido que contiene *bla*_{CTX-M-15} y que posteriormente, gracias a IS se ha integrado en distintos sitios cromosómicos en algunas cepas (Peirano & Pitout, 2019).

También se han identificado combinaciones alélicas específicas de los replicones FIIA (F), FIA (A) y FIB (B), según el subclón. Las cepas H30-R1 presentan en su mayoría la combinación F1:A2:B20, los subclones H41, H22, H30S Y H35 compartieron en común los alelos F29:B10; sin embargo, también presentaron variaciones individuales, pudiendo deducir que la adquisición y pérdida de plásmidos F18 y F29:B10 están estrechamente relacionados con la evolución de los primeros subclados de ST131. Finalmente, como se puede observar en la **figura 3**, los subclones H30-R1 y H30-Rx presentan combinaciones alélicas distintas. Se propone que H30-R1 sufrió la pérdida del plásmido F2:A1:B20 y adquirió a F2:A1, el cual logró adaptarse a este subclón. Por otro lado, el subclón H30-Rx perdió el alelo B1 de FIB y probablemente adquirió un cassette de resistencia a antibióticos que contiene *bla*_{CTX-M-15} y posiblemente *catB*, *bla*_{OXA-1}, *aac(6')Ib-cr* y *tetA* a través de múltiples eventos de recombinación mediados por IS26, llevando a la pérdida del cassette de resistencia, integración cromosómica de *bla*_{CTX-M-15} o pérdida del plásmido con integración previa de los genes determinantes de resistencia en cromosoma (Johnson *et al.*, 2016; Price *et al.*, 2013).

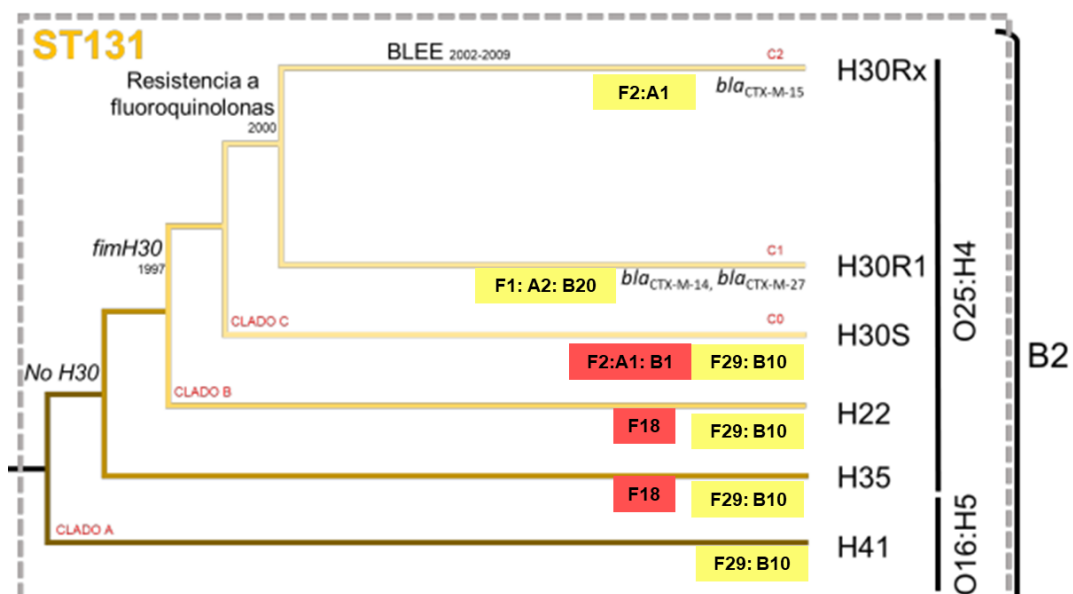


Figura 3. Evolución del clon ST131 principalmente a causa de ganancias y pérdidas de plásmidos tipo F. Se observan los alelos de los replicones FIIA (F), FIA (A) y FIB (B) y su distribución más prevalente en cada subclón. Se observa una prevalencia de F29:B10 en *H41*, *H35*, *H22* y *H30-S* además de otros plásmidos encontrados en el mismo subclón (recuadro naranja) así como variantes alélicas en *H30-R1* y *H30-Rx* pudiendo asociar este cambio con nuevas características presentes en estos subclones. Modificado de Price *et al*, 2013; Johnson *et al*, 2016; Martínez-Gorgonio, 2019.

1.5. Tratamiento de infecciones por UPEC

El tratamiento de ITU no complicadas, cuando se trata de un episodio de cistitis no complicada, consistirá en TMP/SMX, FQ, nitrofurantoína, fosfomicina y amoxicilina/ácido clavulánico (Barrios-Arnau *et al.*, 2019; Levison & Kaye, 2013), prevaleciendo el uso de nitrofurantoína sobre las FQ en el tratamiento empírico debido a las altas tasas de resistencia en *E. coli* (Gupta *et al.*, 2011). Si la ITU se localiza en tracto superior (pielonefritis), se recomienda iniciar el tratamiento con antibióticos parenterales, como FQ, cefalosporina de espectro extendido o piperacilina/tazobactam con o sin un aminoglucósido, o un carbapenémico (Gupta *et al.*, 2011). Si el paciente ha desarrollado pielonefritis intrahospitalaria y se conoce la microbiota resistente del lugar, se debe iniciar la terapia con antibióticos que probablemente sean efectivos para esos probables microorganismos (Levison & Kaye, 2013).

En caso de una ITU complicada, se debe sospechar de un organismo infeccioso resistente, así como alguna complicación (cálculos o anormalidades) al momento de iniciar la terapia. Estas infecciones se caracterizan por presentar concentraciones de UFC muy elevadas. Los antibióticos recomendados son FQ, nitrofurantoína y fosfomicina, pero asegurándose que el microorganismo es susceptible. Si la infección es grave, el tratamiento inicial deberá conformarse por FQ intravenosa junto con una cefalosporina de tercera generación, cefipime, piperacilina/tazobactam o un carbapenémico. Finalmente, si la cepa presenta resistencia a todos los compuestos anteriores, se recomienda el uso de colistina, tigeciclina o fosfomicina intravenosa (si está disponible) para infecciones graves. La duración del tratamiento también es importante, no debe ser menor de 14 días en pielonefritis y 7 días para cistitis (Barrios-Arnau *et al.*, 2019; Levison & Kaye, 2013; Nordmann *et al.*, 2009). Cuando el diagnóstico es urosepsis, se debe utilizar un antibiótico con una concentración sérica alta (Levison & Kaye, 2013).

Respecto al uso de ciertos antibióticos, las FQ se recomiendan como fármacos de segunda línea, para el tratamiento de pielonefritis y cistitis aguda no complicada y

complicada (Zalewska-Piątek & Piątek, 2020); sin embargo, su uso en altas dosis propicia el desarrollo de resistencia, principalmente debido a mutaciones cromosómicas en girasa y topoisomerasa IV (Matinfar *et al.*, 2021). La nitrofurantoína y la fosfomicina no alcanzan niveles tisulares efectivos en el riñón y no deben usarse en pacientes con cistitis que también pueden tener pielonefritis (Levison & Kaye, 2013) y finalmente, los carbapenémicos son el tratamiento de último recurso para tratar muchas infecciones debidas a bacilos gramnegativos multirresistentes pero sensibles a estos fármacos (Levison & Kaye, 2013).

1.6. Resistencia a los antibióticos

La resistencia a los antimicrobianos se produce cuando ciertos microorganismos se adaptan y son capaces de crecer en presencia de este, lo que dificulta el tratamiento de infecciones comunes y aumenta el riesgo de que dichas enfermedades se propaguen, los síntomas de los pacientes sean más graves y lleven a la muerte del portador (WHO, 2015, 2021). Frecuentemente, el desarrollo de la resistencia está asociado a un tratamiento empírico, uso excesivo o inadecuado del antibiótico y la falta de un cultivo previo (Barrios-Arnau *et al.*, 2019). Aproximadamente el 30% de todos los antibióticos recetados en los hospitales de cuidados intensivos en Estados Unidos son innecesarios o inapropiados (CDC, 2017). Muchas veces la resistencia a un antibiótico específico conlleva a desarrollarla en toda la familia a la que pertenece (WHO, 2015).

Las bacterias cuentan con varios mecanismos de resistencia a los antibióticos que trabajan en conjunto para conferir resistencia a un solo agente antimicrobiano, puesto que ningún mecanismo por si solo se considera totalmente responsable de la resistencia. Los mecanismos de resistencia más comunes son inactivación o alteración del fármaco por acción de enzimas como betalactamasas, enzimas modificadoras de aminoglucósidos o cloranfenicol acetiltransferasa. Otros mecanismos son: modificación de sitios de unión a fármacos, reducción de los niveles del fármaco acumulado intracelularmente gracias a una disminución de porinas o por efecto de bombas de expulsión y formación de biopelícula (CDC, 2020; Hazlehurst & Hacker, 2009; Santajit & Indrawattana, 2016).

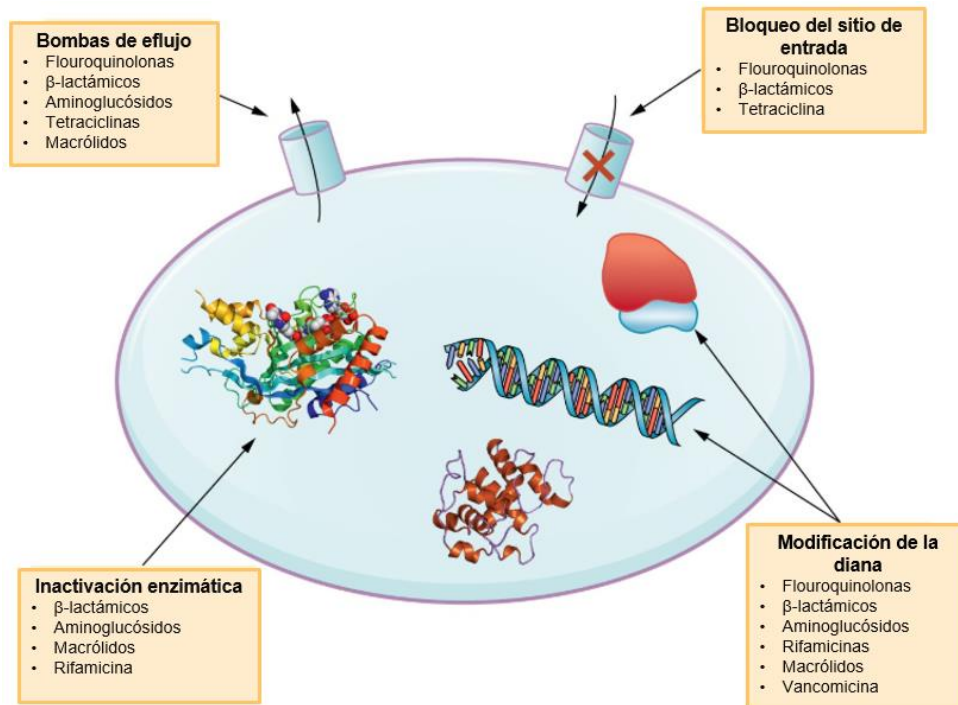


Figura 4. Principales mecanismos de resistencia bacteriana a antibióticos. Modificado de Hazlehurst & Hacker, 2009.

La preocupación más importante asociada a la resistencia a los antibióticos es que está superando al desarrollo de nuevos tratamientos. En promedio, desarrollar nuevos antibióticos representa costos mayores a \$500 millones de dólares y periodos de desarrollo cercanos a los 10 años, mientras que la resistencia generalizada hacia este antibiótico puede aparecer en lapsos menores a 3 años (Bethke *et al.*, 2020; O'Neill, 2016).

1.6.1. Resistencia en *E. coli* ST131

En la actualidad, *E. coli* es el principal microorganismo productor de BLEE, tanto en infecciones comunitarias como intrahospitalarias, así como en los centros de rehabilitación y centros de cuidados a largo plazo (Barrios-Arnau *et al.*, 2019). En UPEC, la resistencia ha incrementado, principalmente hacia antibióticos empíricos de primera línea como TMP/STX, llevando a un uso más frecuente de FQ como terapia de primera línea para la cistitis; sin embargo, el uso generalizado, especialmente de ciprofloxacino en pacientes ambulatorios, ha provocado un aumento continuo de la resistencia a estos fármacos (Gupta *et al.*, 2005; Kot, 2019). Las cepas UPEC pertenecientes al clon ST131 presentan altos niveles de resistencia contra un importante número de betalactámicos, cefalosporinas, quinolonas y sulfonamidas, principalmente por la adquisición de plásmidos de

resistencia portadores de genes BLEE junto con otros genes asociados a resistencia (Gupta *et al.*, 2005; Levison & Kaye, 2013).

1.6.2. Enzimas betalactamasas

Los betalactámicos son la familia de antibióticos más utilizados a nivel mundial; sin embargo, los bacilos Gram negativos son capaces de producir betalactamasas, enzimas capaces de hidrolizar los antimicrobianos betalactámicos, inactivándolos y haciéndolos inefectivos (Bonomo, 2017). Estas enzimas se han convertido en el factor más importante para la resistencia a esta familia de antibióticos y año tras año presentan incremento, principalmente a causa de la presión selectiva permanente junto a la capacidad de los genes de betalactamasa para instalarse en MGE, como transposones o plásmidos, llevando a la diversificación de los mecanismos de resistencia, permitiendo la prevalencia de las cepas mejor adaptadas (Bush, 2013; Rafael Cantón *et al.*, 2012; Roshani *et al.*, 2018).

Las enzimas **AmpC** confieren resistencia a penicilinas, cefalosporinas, incluidas las cefalosporinas de amplio espectro, cefamicinas y aztreonam. Estas betalactamasas no son inhibidas por inhibidores de betalactamasas como el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam. Los productores de AmpC suelen ser susceptibles a los carbapenémicos, siendo este el tratamiento actual contra dichos microorganismos; sin embargo algunas cepas presentan otros mecanismos de resistencia como disminución de la expresión de los canales de porina o el aumento del flujo de salida, provocando resistencia a los carbapenémicos (Levison & Kaye, 2013).

Las enzimas **carbapenemasas** se encuentran codificadas en su mayoría por plásmidos. Tienen la capacidad de hidrolizar penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenémicos. La mayoría son resistentes a los inhibidores de betalactamasas comercialmente viables (Livermore & Woodford, 2006; Nordmann & Poirel, 2002). Ninguna carbapenemasa que sea parte de un mecanismo innato de resistencia a los carbapenémicos se ha asociado con resistencia adquirida y se localizan casi en su totalidad en cromosoma (Nordmann & Poirel, 2002).

Pertencen a las clases moleculares A, B y D. Las enzimas de clase A y D tienen un mecanismo hidrolítico a base de serina, mientras que las enzimas de clase B son metalobetalactamasas que contienen zinc en el sitio activo. El grupo de carbapenemasas de clase A incluye miembros de las familias SME, IMI, NMC, GES y KPC. De estas, las carbapenemasas **KPC** son las más prevalentes y se encuentran principalmente en plásmidos en *K. pneumoniae*. Las carbapenemasas de clase D consisten en las enzimas **OXA** que se detectan con frecuencia en *A.*

baumannii y las metalobetalactamasas (MBL) pertenecen a las familias **IMP**, **VIM**, **SPM**, **GIM** y **SIM** y se han detectado principalmente en *P. aeruginosa*. Sin embargo, la presencia de estas enzimas en enterobacterias crece a nivel mundial (Nordmann & Poirel, 2002; Queenan & Bush, 2007). En el año 2009 se reportó el descubrimiento de una nueva MBL en Nueva Delhi, India. Fue nombrada **NDM-1** y se asocia con plásmidos de amplia diseminación, principalmente en *K. pneumoniae* y *E. coli* (Kumarasamy *et al.*, 2010).

1.6.2.1. BLEE

Las BLEE pueden localizarse en cromosoma y en plásmidos (Gupta & Bhadelia, 2014), aquellas que están codificadas en plásmidos pueden localizarse junto a genes de resistencia hacia otras familias de antibióticos como aminoglucósidos, quinolonas y sulfonamidas. La adquisición de estos plásmidos gracias a eventos de HGT en las bacterias resulta en la aparición y propagación de resistencias a múltiples fármacos (Gupta & Bhadelia, 2014; Zalewska-Piątek & Piątek, 2020).

Estas enzimas presentan actividad hidrolítica hacia penicilinas, cefalosporinas, incluidas las de 3° generación y monobactámicos incluido aztreonam (Doi *et al.*, 2017; Matinfar *et al.*, 2021), pero no afectan a los compuestos de cefamicina y carbapenémicos (Cantón *et al.*, 2008), además, son bloqueadas por inhibidores de betalactamasas como clavunato, sulbactam o tazobactam) (Levison & Kaye, 2013).

Las BLEE representan el grupo más diverso de las betalactamasas de clase A e incluyen tres tipos principales, **TEM**, **SHV** y **CTX-M** (Rivera *et al.*, 2014), además de otras con menos prevalencia como **OXA**, **TLA**, **VEB**, **PER**, **GES**, estas últimas son inhibidas por clavunato (Cantón *et al.*, 2008). Las primeras BLEE descritas fueron derivados de las enzimas TEM-1, TEM-2 y SHV-1 durante la década de 1980 en Europa, principalmente en aislados de *K. pneumoniae* y *E. coli* en infecciones comunitarias (Cantón *et al.*, 2008). El origen de las enzimas TEM parte de TEM-1 y TEM-2, ambas contenidas en plásmidos, mientras que las SHV tienen origen cromosómico (D'Andrea *et al.*, 2013; Rivera *et al.*, 2014). Las CTX-M, tienen actividad BLEE intrínseca y fueron originadas en el cromosoma de *Kluyvera spp* (D'Andrea *et al.*, 2013). Hasta el año 2018, se habían reportado 223 variantes TEM, 193 para SHV y 172 variantes CTX-M (Ramadan *et al.*, 2019).

1.6.2.1.1. Enzimas CTX-M

En 1989 se identificó una nueva familia de BLEE en países como Alemania, Argentina, Francia e Italia y se les nombró CTX-M por su capacidad de conferir resistencia predominantemente a cefotaxima (Bauernfeind *et al.*, 1990; Cantón *et al.*, 2008). Estas enzimas comprometen la eficacia de todos los betalactámicos, excepto los carbapenémicos y las cefamicinas. En lo que respecta a una patología, se encuentran fuertemente asociados a ITU (Cantón *et al.*, 2008; Cantón & Coque, 2006; Coque *et al.*, 2008).

Las BLEE de tipo CTX-M constituyen las betalactamasas más diseminadas en todo el mundo, es frecuente encontrarlas en aislamientos de *E. coli* y fueron detectadas en un inicio entre patógenos adquiridos en la comunidad y posteriormente dentro del entorno intrahospitalario, en pacientes sanos, animales de compañía y muestras ambientales como aguas superficiales y peces de agua dulce (Briñas *et al.*, 2003; Pallecchi *et al.*, 2004; Zurfluh *et al.*, 2015; Cortés-Cortés, 2016).

Algunas de las enzimas CTX-M tienen una elevada distribución en regiones específicas, como **CTX-M-3** en Europa del Este, **CTX-M-9** en España y **CTX-M-14** en España, China y Canadá, **CTX-M-1** en Italia y **CTX-M-2** en la mayoría de los países de América del Sur, Japón e Israel (Cantón *et al.*, 2008; Cantón & Coque, 2006; Stoesser *et al.*, 2016). La variante **CTX-M-27** está surgiendo en ciertas partes del mundo, especialmente en Japón y Europa, además de su reciente descubrimiento en Sudamérica (Fernandes *et al.*, 2020; Peirano & Pitout, 2019), mientras que, por su distribución global, las enzimas **CTX-M-15** se consideran pandémicas (Cantón & Coque, 2006).

Las enzimas CTX-M se dividen en 5 grupos, en base a su secuencia de aminoácidos y cada uno con variantes específicas y originadas en determinadas especies de *Kluyvera*, un microorganismo de la microbiota intestinal humana, además de patógeno saprofítico y oportunista en el que se identificaron estos genes cromosómicamente y que pudieron dar origen al grupo (**tabla 3**) (Cantón *et al.*, 2012; Coque *et al.*, 2008; D'Andrea *et al.*, 2013).

Tabla 3. Clasificación de las enzimas CTX-M con base en su origen.

Clasificación de las enzimas CTX-M		
Grupo	Variantes (CTX-M)	Origen (gen)
1	1, 3, 10-12, 15, 22, 23, 28-30, 32-34, 36, 42, 52-55, 57, 58, 60-62, 66, 68, 69, 71, 72, 79, 80, 82, 88, 96, 101, 103 107-109, 114, 116, 117, 133	<i>K. cryocrescens</i> (<i>kluC</i>)
2	2, 4-7, 20, 31, 43, 44, 56, 59, 92, 97, 124, 131 5, 76, 77, 95,124,	<i>K. ascorbata</i> (<i>kluA</i>)

8	8, 40, 63	<i>K. georgiana</i> (<i>kluG</i>)
9	9, 13, 14, 16-19, 21, 24, 27,38, 46-51, 65,67,81,83-87,90,93,98,99,102,104-106, 110-113, 121, 122, 126, 134	<i>K. georgiana</i> (<i>kluY</i>)
25	25, 26, 39, 41, 89, 91, 94,100	<i>K. georgiana</i> (<i>bla_{CTX-M-78}</i>)
Sin grupo	45, 64, 74, 75, 123, 132	

Tomado de Cantón *et al.*, 2012; D'Andrea *et al.*, 2013; Mamani, 2015.

1.6.2.1.1.1. CTX-M-15

El gen *bla_{CTX-M-15}* se reportó por primera vez en la India durante el año 2001 (Karim *et al.*, 2001). Actualmente es la BLEE dominante a nivel mundial y la principal causa de resistencia hacia cefalosporinas de 3^a generación en *Enterobacteriaceae* (Kumarasamy *et al.*, 2010). La enzima resultante deriva de CTX-M-3 por sustitución de 1 aminoácido en Asp240Gly, causando mayor actividad hidrolítica hacia ceftazidima, además de la reportada para cefotaxima (Lartigue *et al.*, 2006; Poirel *et al.*, 2002).

Se sugiere que el gen, residente en *Kluyvera* se insertó en un plásmido, lo cual ayudó a su diseminación. Los plásmidos portadores de *bla_{CTX-M-15}* suelen pertenecer al grupo IncFII solo o en asociación con los replicones FIA o FIB, son conjugativos y pueden ser parte de MGE (integrones, IS, Tn), además de estar asociado con otros genes que confieren resistencia, como *bla_{OXA-1}*, *aac (6')-Ib-cr* y *bla_{TEM-1}*. Estos plásmidos a su vez están relacionados a los clones ST131 y ST405, siendo ST131 uno de los principales grupos causante de ITU y bacteriemias (Cantón *et al.*, 2008; Coque *et al.*, 2008; Price *et al.*, 2013).

1.6.3. Antibióticos no betalactámicos

1.6.3.1. Aminoglucósidos

Los aminoglucósidos son antibióticos bactericidas de amplio espectro que inhiben la síntesis de proteínas bacterianas al unirse a la subunidad ribosómica 30S (Mosquito *et al.*, 2011). Son utilizados para el tratamiento de infecciones bacterianas graves, a menudo junto con antimicrobianos que tienen como blanco la pared celular

bacteriana. Los aminoglucósidos se excretan casi en su totalidad a través de los riñones por filtración glomerular (Soleimani *et al.*, 2016).

Hay tres mecanismos de resistencia a los aminoglucósidos: captación reducida y aumento de eflujo, alteración del ARN diana y modificación enzimática del aminoglucósido (Houghton *et al.*, 2010). La modificación enzimática es el tipo más común de resistencia a los aminoglucósidos (Soleimani *et al.*, 2016) y los genes que codifican las enzimas modificadoras de aminoglucósidos se clasifican en tres clases: acetiltransferasas (*aac*), nucleotidiltransferasas (*ant*) y fosfotransferasas (*aph*). Dentro de cada clase, las enzimas se agrupan de acuerdo con los sitios de las modificaciones de los aminoglucósidos (Ramirez & Tolmasky, 2010).

1.6.3.2. Quinolonas

Las quinolonas inhiben la actividad de las enzimas ADN girasa y topoisomerasa bacterianas, esenciales para la replicación (Namboodiri *et al.*, 2011). La resistencia cromosómica está mediada principalmente por mutaciones en la región determinante de resistencia a las quinolonas (QRDR), basada en polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en los genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* y *parE* encargados de codificar subunidades en ADN girasa, los dos primeros y topoisomerasa IV los 2 restantes. Dichos SNP inducen cambios conformacionales en la enzima, evitando la unión de las quinolonas al complejo ADN-sustrato, pero conservando la función enzimática (Hawkey, 2003; Namboodiri *et al.*, 2011).

Tabla 4. Mutaciones los genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* y *parD* asociadas a la aparición de resistencia cromosómica a quinolonas.

Mutaciones QRDR reportadas		
Gen	Sustitución	Nota
<i>gyrA</i>	Ala51 → Val	Mutación fuera de QRDR en cepas <i>in vitro</i> . Mostró reducción en el nivel de susceptibilidad a ciprofloxacina.
	Ala67 → Ser	
	Gly81 → Cys → Asp	Gly81→Asp asociado a bajos niveles de resistencia a FQ.
	Asp82 → Gly	Asociado a bajos niveles de resistencia a FQ. Asp82→Gly más Gly81→Asp confieren resistencia a FQ y ácido nalidíxico.
	Ser83 → Leu → Trp → Ala	Mutaciones más comunes encontradas en cepas clínicas. La sustitución por leucina confiere alto nivel de resistencia al ácido nalidíxico y menor susceptibilidad a las FQ.

	→ Val	La mutación Ser83→Ala se asocia con niveles más bajos de resistencia a FQ que Ser83→Leu.
	Ala84 → Pro → Val	
	Asp87 → Asn → Gly → Tyr → His → Val	Si esta mutación viene acompañada con otra en Ser83, la cepa presentará un elevado nivel de resistencia para ácido nalidíxico y FQ. Si el cambio es por Gly o Tyr, la resistencia a ciprofloxacina será menor que si se sustituye por Asn.
	Gln106 → His → Arg	Gln106→Arg asociado a un incremento de Resistencia a FQ y en menor grado para ácido nalidíxico.
	Ala196 → Glu	Única mutación fuera de QRDR en cepas clínicas.
<i>gyrB</i>	Asp426 → Asn	Asociada con menor susceptibilidad a FQ. Confirió resistencia hacia todas las quinolonas probadas.
	Lys447 → Glu	Brindó resistencia al ácido nalidíxico, pero hipersensibilidad a ciprofloxacina, pero si está acompañada por otro cambio en <i>gyrA</i> , puede revertirse la hipersensibilidad.
<i>parC</i>	Ala56 → Thr	Mutación fuera del QRDR de <i>parC</i> .
	Ser57 → Thr	Mutación fuera del QRDR de <i>parC</i> .
	Gly78 → Asp → Lys	Gly78→Asp aumenta la resistencia a las FQ, pero no al ácido nalidíxico.
	Ser80 → Arg → Ile	Ser80→Ile es la sustitución más común.
	Ser83 → Leu	
	Glu84 → Gly → Lys → Val	Glu84 a Gly, Lys o Val también son relativamente comunes. Glu84→Lys es diez veces más resistente a las FQ que una cepa <i>parC</i> de tipo salvaje.
	Ala108 → Val	
<i>parE</i>	Leu416 → Phe	Fuera de QRDR de <i>parE</i> .
	Ile444 → Phe	Mutación identificada en cepa UPEC.
	Leu445 → His	Resistencia al repeler el grupo piperazinilo de las FQ.
	Ser458 → Thr	Mutación identificada en cepa UPEC.
	Glu460 → Asp	Fuera de QRDR de <i>parE</i> .
	Ile464 → Phe	Fuera de QRDR de <i>parE</i> .
	Ile529 → Leu	Mutación identificada en cepa UPEC.

Modificado de Hopkins *et al.*, 2005.

La resistencia a quinolonas también puede ser causada por la presencia de genes de resistencia a quinolonas mediadas por plásmidos (**PMQR**), que confieren un nivel bajo de resistencia a las quinolonas, pero pueden diseminarse mediante HGT y

ayudar a la selección y prevalencia de cepas resistentes y que además cuenten con otros mecanismos de resistencia adicionales, causando que estas cepas adquieran MDR (Poirel *et al.*, 2012; Ramírez-Castillo *et al.*, 2018). Los genes *qnr* se encuentran en un entorno de tipo integrón ya que río arriba se localizan los genes *qacEΔ1* y *sul1* (Hopkins *et al.*, 2005).

Finalmente, el tercer mecanismo asociado se basa en la regulación ascendente de las **bombas de eflujo**, encargadas de expulsar quinolonas y otros antimicrobianos fuera de la célula bacteriana. Las mutaciones en el gen *acrR* que codifica un represor de los genes *acrAB* de la bomba de eflujo inducida por estrés ACRR, están asociados con la resistencia a quinolonas (Hopkins *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2001). En un ensayo, *AcrA* se sobreexpresó en 9/10 aislados clínicos de *E. coli* resistentes a las fluoroquinolonas en niveles elevados (CMI>32 mg/L) (Mazzariol *et al.*, 2000).

Tabla 5. Principales mecanismos responsables de la resistencia hacia las quinolonas.

Resistencia a quinolonas	
QRDR (Región determinante de la resistencia a las quinolonas)	PMQR (Resistencia a quinolonas mediada por plásmidos)
Mutaciones cromosómicas en: <ul style="list-style-type: none"> • Girasa: <i>gyrA</i> y <i>gyrB</i> • Topoisomerasa IV: <i>parC</i> y <i>parE</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • QnrA, QnrB, QnrS, QnrC y QnrD: Proteínas Qnr, inhiben la unión de las quinolonas a las proteínas diana. • <i>aac(6)-Ib-cr</i>: Variante de la enzima modificadora de aminoglucósido acetiltransferasa, codifica una enzima acetilante de FQ. • QepA y OqxAB: Bombas de eflujo.

Tomado de Martínez-Martínez *et al.*, 1998; Poirel *et al.*, 2012; Ramírez-Castillo *et al.*, 2018; Robicsek *et al.*, 2006.

1.6.3.3. Inhibidores de la vía del folato (sulfonamidas y diaminopirimidinas)

Las sulfonamidas son una familia de fármacos utilizados en el ámbito humano y veterinario desde los años 30's del siglo pasado y su uso descontrolado ha llevado al desarrollo de resistencia, principalmente hacia sulfametoxazol. Posteriormente se comenzó a introducir en conjunto con las diaminopirimidinas, grupo al que pertenece el trimetoprim (Mosquito *et al.*, 2011). Las sulfonamidas actúan inhibiendo la síntesis de la dihidropteroato sintasa (*dhps*), una enzima clave en la ruta del ácido fólico y el

trimetoprim actúa inhibiendo la enzima dihidrofolato reductasa (*dhfr*), otra enzima importante en la síntesis de ácido fólico (Ho *et al.*, 2009).

El trimetoprim-sulfametoxazol (TMP/SMX) se utiliza en el tratamiento de infecciones del tracto urinario, gastrointestinal y respiratorio (Huovinen, 1997) y a menudo es la primera opción en pacientes ambulatorios con ITU no complicadas. Es un antibiótico económico, generalmente se tolera bien y se toma dos veces al día (Wright *et al.*, 1999). Sin embargo, la resistencia codificada por plásmidos ha provocado un aumento en los últimos años a nivel mundial, principalmente en los países en desarrollo donde sigue utilizándose como un tratamiento empírico y muchas veces sin un control, propiciando ambientes de presión selectiva que contribuyen al incremento constante de estas tasas de resistencia (Wright *et al.*, 1999). En países europeos, la resistencia de UPEC oscila entre el 14,6% y el 60% (Kot, 2019).

1.6.3.4. Polimixinas

Familia de antibióticos desarrollada a finales de 1940, la polimixina B y colistina forman parte de esta familia y en los últimos años su prescripción ha resurgido gracias al incremento de bacterias resistentes. Estos fármacos tienen especificidad por los LPS de bacterias Gram negativas; sin embargo, su uso se asoció con un alto grado de nefrotoxicidad y neurotoxicidad, llevando a su reemplazo con el surgimiento de nuevos antibióticos (Peleg & Hooper, 2010).

En bacterias MDR, incluidas las portadoras de betalactamasas capaces de hidrolizar carbapenémicos, las polimixinas (colistina) son la última opción de tratamiento (Paterson & Lipman, 2007). Al ser fármacos antiguos, durante su desarrollo no se realizaron los procesos para caracterizar su perfil farmacocinético y es en años recientes que se realizan ensayos para establecer las dosificaciones óptimas acorde a los requerimientos del paciente. Cuando se ha observado algún indicio de toxicidad, esta es reversible al suspender el tratamiento (Li *et al.*, 2006; Paterson & Lipman, 2007; Peleg & Hooper, 2010).

1.7. Elementos genéticos móviles (MGE)

Los genomas bacterianos tienen la capacidad de modificar su contenido genético a una velocidad relativamente alta gracias a una variedad de procesos que implican la transferencia horizontal de genes (HGT). Estos procesos son los responsables de producir grandes cambios en periodos de tiempo considerados cortos (Hacker & Carniel, 2001; Ochman *et al.*, 2000) y se definen como la transferencia de material

genético entre células bacterianas sin división celular de por medio (Lawrence, 2005). Los MGE puede ser adquiridos por 3 procesos: transformación con ADN libre, transducción con fagos o la captación de plásmidos o fragmentos cromosómicos por conjugación. Estos procesos dan como resultado la generación de nuevas variantes de patógenos (Hacker *et al.*, 1997). Se ha demostrado, al comparar cepas patógenas y no patógenas de *E. coli*, que ambos grupos comparten aproximadamente 40% de todo su genoma, indicando que el resto se ha adquirido horizontalmente durante la evolución (Gal-Mor & Finlay, 2006; Welch *et al.*, 2002).

Los MGE también pueden integrar elementos de control como promotores río arriba de los determinantes de la resistencia, induciendo mayor expresión del gen (He *et al.*, 2015; Siguier *et al.*, 2014).

1.7.1. Plásmidos

Los plásmidos son moléculas de ADN extracromosomales, en su mayoría circulares, covalentemente cerrados y superenrollados. Se replican de forma autónoma, coexisten de manera estable con los cromosomas y se destacan como impulsores de la transferencia horizontal de genes (HGT) en la evolución bacteriana (Alvarado *et al.*, 2012; Rodríguez-Beltrán *et al.*, 2021). Presentan tamaños y contenido variable, desde aquellos con 1 kb de longitud y portadores de unos pocos genes asociados a replicación y movilidad, hasta mega plásmidos, mayores a 1 Mb, que pueden ser considerados cromosomas secundarios para la célula hospedera, por contener genes esenciales para este (Alvarado García & Andrés, 2016). Los plásmidos tienen sistemas que garantizan su replicación autónoma pero también tienen mecanismos que controlan su número de copias y aseguran una herencia estable durante la división celular (Carattoli, 2009).

Los plásmidos tienen un papel importante en la evolución bacteriana al transferir rasgos beneficiosos dentro y entre especies de bacterias, en un proceso conocido como conjugación, contribuyendo a la adaptación hacia nuevos nichos de la bacteria que lo porta, proveer de ventaja frente a competidores naturales o ayudarle a superar presiones selectivas artificiales (Alvarado *et al.*, 2012; Garcillán-Barcia *et al.*, 2009; Rodríguez-Beltrán *et al.*, 2021). En análisis de la microbiota humana se ha demostrado que la transferencia plasmídica se realiza incluso en ausencia de tratamiento con antibióticos (Gumpert *et al.*, 2017; Porse *et al.*, 2017).

La diversidad plasmídica permite que estos se clasifiquen mediante distintos criterios, como tamaño, número de copias, tipo de genes que contiene, el rango de hospedero, grupo de incompatibilidad (Inc), es decir, la incapacidad de 2 plásmidos

para coexistir dentro de la misma célula debido a interacciones en la replicación y por tipificación de replicones debido a que la relaxasa es el único elemento que siempre estará presente en los plásmidos movilizables y conjugativos (Alvarado *et al.*, 2012; Rafael Cantón *et al.*, 2012). Los plásmidos conjugativos codifican todas las funciones de transferencia, un *oriT* (origen de transferencia), una relaxasa, una proteína de acoplamiento T4CP y un sistema de secreción tipo 4 (T4SS), mientras que los plásmidos movilizables cuentan con un *oriT*, una relaxasa y proteínas accesorias, donde T4CP puede o no estar presente por lo que este tipo de plásmidos requiere de un plásmido conjugativo para ser movilizado (Alvarado García, 2016).

En las cepas ST131, los plásmidos se han asociado con diversificación de este grupo clonal (Rodríguez-Beltrán *et al.*, 2021). Los genes *bla*_{CTX-M} se han identificado en plásmidos de rango estrecho de hospedero: IncFI, IncFII, IncHI2 e IncI y de amplio rango: IncN, IncP, IncL/M e IncA/C (Carattoli, 2009; Carattoli *et al.*, 2014). La diseminación pandémica de *bla*_{CTX-M-15} se ha asociado a plásmidos del grupo IncF, en muchos casos como plásmidos multirreplicones (IncFII, IncFIA e IncFIB), además de los plásmidos IncI1 (Dimude & Amyes, 2012; Zurfluh *et al.*, 2015). Los genes *bla*_{CTX-M-9} se ha asociado a una diseminación por plásmidos de rango estrecho del grupo de incompatibilidad HI2, mientras que *bla*_{CTX-M-32} se ha propagado principalmente por plásmidos de amplio rango de hospederos, como IncP e IncN, respectivamente (Cantón & Coque, 2006). Los plásmidos asociados a *bla*_{CTX-M-15} también pueden presentar otras BLEE como *bla*_{TEM-1}, *bla*_{OXA-1} y el gen *aac(6')-Ib-cr*, que brinda resistencia hacia FQ (Dimude & Amyes, 2012).

1.7.2. Islas de patogenicidad

Las islas de patogenicidad (PAI) se definen como elementos genéticos que originalmente no formaban parte del cromosoma, pero gracias a procesos de HTG lograron insertarse en este, siendo identificados en una gran variedad de patógenos bacterianos (Gal-Mor & Finlay, 2006). Estas regiones pueden tener un tamaño desde 10 hasta 200 kb en donde almacenan una gran cantidad de genes de virulencia (Hacker *et al.*, 1997). Si el segmento adquirido tiene un tamaño de 1-10 kb, se denomina “islote de patogenicidad”. Algunas PAI presentan estructuras tipo mosaico, lo cual indica que se formaron a partir de material genético de distintos donantes (Gal-Mor & Finlay, 2006), causando variación genética en un menor periodo de tiempo y como consecuencia, la evolución en bacterias (Groisman & Ochman, 1996).

Las PAI suelen presentar ciertas características comunes: portar ≥ 1 genes de virulencia, tener un contenido de G/C y un uso de codones diferentes al resto del

genoma, insertarse preferentemente en un sitio de ARNt, éstas flanqueadas por secuencias de repetición directas (DR) y poseer genes que les ayudan en la movilización, como secuencias IS, integrasas, transposasas, genes de fagos y orígenes de replicación (Gal-Mor & Finlay, 2006).

Las cepas UPEC suelen albergar dos o más PAI, asociando su presencia con la diversidad de genes de virulencia que portan (Blum *et al.*, 1994; Guyer *et al.*, 1998; Swenson *et al.*, 1996), cuanto mayor sea el número de PAI que tiene una cepa UPEC, más probable será su persistencia (Östblom *et al.*, 2011). La cepa prototipo UPEC CFT073 tiene 10 islas genómicas o GI y 3 regiones profagos (Lloyd *et al.*, 2007; Xicohtencatl-Cortes *et al.*, 2019) (**tabla 6**). El genoma de CFT073 es particularmente rico en genes que codifican adhesinas fimbriales, autotransportadores, sistemas de adquisición de hierro y recombinasas de cambio de fase, asimismo, dentro de distintas cepas prototipo UPEC, como CFT073, J96 y 536 hay variaciones respecto a las PAIs que porta cada una de ellas (Welch *et al.*, 2002).

Tabla 6. Islas genómicas identificadas en la cepa prototipo CFT073.

Islas genómicas de CFT073					
No.	Nombre	ARNt	Tamaño (kb)	% G/C	Genes identificados
1	PAI-CFT073- <i>aspV</i> (PAI III _{CFT073})	<i>aspV</i>	100	47	<i>cdiA</i> y <i>picU</i>
2	φ-CFT073-b0847		33	50	Profago
3	PAI-CFT073- <i>serX</i>	<i>serX</i>	113	49	<i>mchBCDEF</i> , operón <i>Sfa/F1C</i> , <i>iroNEDCB</i> , <i>agn43</i>
4	φ-CFT073- <i>potB</i>		44	51	Profago
5	PAI-CFT073- <i>icdA</i>		54	50	Profago y <i>sitDCBA</i>
6	PAI-CFT073- <i>asnT</i> (HPI _{CFT073})	<i>asnT</i>	32	57	<i>fyuA</i>
7	GI-CFT073- <i>asnW</i>	<i>asnW</i>	54	53	
8	GI-CFT073- <i>cobU</i>		44	50	
9	φ-CFT073- <i>smpB</i>		48	49	Profago
10	PAI-CFT073- <i>metV</i>	<i>metV</i>	32	53	Proteínas Hcp y ClpB
11	PAI-CFT073- <i>pheV</i> (PAI I _{CFT073})	<i>pheV</i>	123	47	Operón <i>pap</i> , <i>hlyA</i> , <i>iha</i> , <i>sat</i> , <i>iutA</i> , <i>iucDCBA</i> , <i>agn43</i> y <i>kpsMT</i> .

12	GI-CFT073- <i>selC</i>	<i>selC</i>	68	47	
13	PAI-CFT073- <i>pheU</i> (PAI II _{CFT073})	<i>pheU</i>	52	48	Operón <i>pap</i>

Tomado de Lloyd *et al.*, 2007.

1.7.3. Integrones/ cassettes de resistencia

Los integrones son MGE, localizados en ubicaciones independientes y capaces de integrar casetes de genes de resistencia a antibióticos en diversas especies bacterianas (Hall, 2012; Nordmann & Poirel, 2002). Fueron identificados en 1989 y nombrados elementos de integración de ADN. Los elementos completos constan de dos segmentos conservados en los extremos y un segmento central de longitud y secuencia variable que incluye genes de resistencia a antibióticos insertados (Stokes & Hall, 1989). Como consecuencia de la adquisición de diferentes genes, los integrones se presentan en una variedad de formas que difieren en el número y la naturaleza de los genes insertados. Por tanto, los integrones contribuyen a la generación de diversidad en los genomas bacterianos, plásmidos, transposones y PAIs, facilitando un amplio intercambio de información entre bacterias (Hall, 2012).

Se conocen más de 100 tipos de integrones, la mayoría en cromosomas bacterianos (Hall, 2012), pero los integrones de clase 1, clase 2 y clase 3 se asocian con la diseminación reciente de genes de resistencia a antibióticos, en gran parte por su agrupación con transposones, lo que mejora su transporte en plásmidos (Hall, 2012). Todos los integrones presentan un gen codificante de una integrasa (*IntI*), un sitio específico de recombinación (sitio *attI*) que es reconocido por la integrasa y dentro del cual se inserta el cassette y un promotor, que dirige la transcripción de los genes codificados en el cassette (Hall *et al.*, 1999). Los casetes generalmente contienen solo un gen, potencialmente cualquier gen, y un sitio de recombinación (*attC*). En la actualidad, se conoce la secuencia de miles de casetes, que pueden ser reconocidos por una cantidad considerablemente menor de integrasas; sin embargo, la eficiencia de recombinación en diferentes tipos de *attC* varía, y los *IntI* individuales reconocen algunos tipos de sitios *attC* de manera más eficiente que otros (Hall, 2012).

1.7.4. Secuencias de inserción

Las secuencias de inserción (IS) son MGE pequeños, con un tamaño <2.5 kb, capaces de transponerse dentro y entre genomas procariontes. Están formados por

sitios de repeticiones invertidas, donde pueden llevarse a cabo procesos de recombinación homóloga, es decir, pueden participar como mediadores para incorporar MGE de mayor tamaño dentro del cromosoma, ayudando a la formación de PAI o a su eliminación (Hacker *et al.*, 1997; Roshani *et al.*, 2018).

IS *Ecp1* fue importante en los procesos de captura de genes *bla*_{CTX-M} de los cromosomas de *Kluyvera spp*, facilitando su movilidad hacia cepas de *E. coli*. (Lartigue *et al.*, 2006; Poirel *et al.*, 2005). Está implicada en la movilización, propagación y expresión de genes *bla*_{CTX-M} pertenecientes a los grupos 1, 2, 9 y 25, a menudo localizados ríos arriba del gen; sin embargo, el segmento entre el gen y la IS suele variar incluso dentro del mismo tipo de CTX-M, indicando que han ocurrido distintos eventos de inserción (Lartigue *et al.*, 2006; Rossolini *et al.*, 2008). Además de la función de movilización, IS *Ecp1* aporta secuencias promotoras para la expresión de alto nivel de los genes *bla*_{CTX-M-14}, *bla*_{CTX-M-17}, *bla*_{CTX-M-18} y *bla*_{CTX-M-19} (Lartigue *et al.*, 2006).

IS 26 se ha asociado con el reclutamiento y propagación de genes de resistencia a antibióticos en bacterias Gram negativas y con integrones clase 1 (Harmer *et al.*, 2014; Harmer & Hall, 2020). Dentro de ST131 *H30-Rx* los plásmidos F2:A1 contienen numerosas copias de IS 26 a lo largo del plásmido y están asociados a eventos de reordenamientos como fusiones de replicones, inversiones de ADN y deleciones, dando como resultado reorganizaciones en estos plásmidos (He *et al.*, 2015; Johnson *et al.*, 2016). En algunas cepas portadoras de *bla*_{CTX-M-15}, IS 26 se localiza río arriba, cercano a IS *Ecp1* y truncando su movilización y confinándolo a un genotipo específico (**figura 5**) (Dimude & Amyes, 2012).

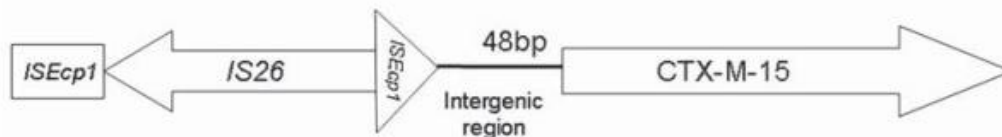


Figura 5. Contexto genético de CTX-M-15, IS26 e ISEcp1. Se han reportado cepas que portan *bla*_{CTX-M-15} junto con IS *Ecp1* e IS 26 truncándola y evitando su movilización, de esta manera el gen codificante de la BLEE puede confinarse a un clon específico. Tomado de Dimude & Amyes, 2012.

2. ANTECEDENTES

2.1. Antecedentes generales

Clermont *et al.*, (Francia, 2000) desarrollan una PCR para identificar los filogrupos A, B1, B2 y D mediante la amplificación de los genes *chuA*, *yjaA* y *TspE4.C2*. La PCR se prueba con 230 cepas previamente tipificadas, asociando las cepas ExPEC con B2 y D (Clermont *et al.*, 2000). Posteriormente, en el año 2013 se amplía la tipificación a 8 filogrupos: A, B1, B2, C, D, E, F y clado I mediante modificaciones en los oligonucleótidos para los 3 genes previos y la adición de nuevos oligonucleótidos para identificar *arpA* (Clermont *et al.*, 2013) y, en el año 2019 se añade la determinación del filogrupo G, mediante una PCR extra para las cepas B2 y F, identificando los genes *ybgD* y *cfaB* (Clermont *et al.*, 2019). En 2018, Beghain *et al.*, (Francia) desarrollan ClermonTyper, una interfaz que permite asignar 7 filogrupos *in silico* a WGS (Beghain *et al.*, 2018).

Se han diseñado 3 esquemas de tipificación de secuencias multilocus (MLST) en *E. coli*. Whittam *et al.*, (USA, 2000) utilizan 7 genes de mantenimiento, dirigido en un inicio a cepas EPEC, Atchman (Reino Unido) selecciona 7 genes, mientras que Brisse & Denamour (Francia) eligen 8 genes para su diseño, actualmente alojado en el Instituto Pasteur. Los dos últimos esquemas no se centraron en ningún grupo particular de *E. coli*. Wirth *et al.*, (Alemania, 2006) evalúan el esquema de Atchman con 462 aislados de diversas fuentes, coincidiendo con resultados MLEE previos (Wirth *et al.*, 2006).

Nicolas-Chanoine *et al.*, (Francia, 2008), identifican por primera vez a *E. coli* O25:H4 ST131. Aíslan 41 cepas de *E. coli* productoras BLEE de 8 países. Reportan 36 aislados (88%) con características en común: pertenecer al filogrupo B2, serotipo O25:H4, resistencia a ciprofloxacina y perfil ST131 mediante MLST, similitud del 68% en PFGE y también evalúan la presencia de 46 genes de virulencia, donde los más prevalentes (91-100%), son *fimH*, *sat*, *fyuA*, *usp* y *malX* (100%) y los reportados en menor medida (<12%) son *hlyF*, *iss* e *iroN* (Nicolas-Chanoine *et al.*, 2008).

Coque *et al.*, (España, 2008) analizan 43 cepas de *E. coli* productoras de CTX-M-15 y 6 plásmidos que codifican el gen *bla*_{CTX-M-15} en 7 países. Los filogrupos prevalentes son B2 (50%) y D (25%) y en todos los países se reporta la presencia de ST131. Determinan una asociación de ST131 y *bla*_{CTX-M-15} por adquisición de un plásmido IncF, principalmente IncFII, con un tamaño de 85-200 kb y que puede conferir multiresistencia a antibióticos por su capacidad de albergar los genes *bla*_{TEM-1}, *bla*_{OXA-1}, así como genes de resistencia a aminoglucósidos y quinolonas (Coque *et al.*, 2008).

Dimude & Amyes, (Escocia, 2012) analizan 62 cepas de *E. coli* aisladas de sangre, 7 cepas (11.3%) presentan *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{OXA-1} y *aac*(6')-*Ib-cr*. De estas, 4 cepas portan 7 plásmidos (57.1%), 2 cepas 4 plásmidos (28.6%) y 1 cepa 8 plásmidos (14.3%). Identifican IS *Ecp1* río arriba de *bla*_{CTX-M-15} en 5 aislados (71.4%) y en 2 cepas identificaron IS *Ecp1* e IS 26 (28.6%), esta última truncando a IS *Ecp1*. Todas las cepas portan plásmidos del grupo IncF en distintas combinaciones (multirreplicones) e IncN. La pMLST de IncF muestra 2 tipos: F2:A1:B (28.6%) y F33:A1:B26 (71.4%) (Dimude & Amyes, 2012).

Roshani *et al.*, (Irán, 2018) evalúan 56 cepas *E. coli* aisladas de orina (62.5%) y sangre (26.25%), principalmente. Prueban la resistencia hacia diversos antibióticos: ampicilina (100%), ciprofloxacino (44.64%), imipenem (7.14%), gentamicina (30.35%), ceftazidima (53.57%), cefotaxima (57.14%), amikacina (16.07%), levofloxacina (62.5%) y ceftriaxona (58.92%). Evalúan la presencia de los grupos de las enzimas CTX-M, reportando prevalencia del grupo 1 (89.28%), 2 (14.28%), 8 (7.14%) y 9 (25%) y de las IS 26 (100%), IS *Ecp1* (96.4%) e IS 903 (69.6%) (Roshani *et al.*, 2018).

Price *et al.*, (USA, 2013) trabajan con 524 secuencias ST131 para reconstruir su historia evolutiva, reportando que la resistencia a FQ y la producción de BLEE habían sido adquiridas por múltiples clones ST131 a través de eventos genéticos independientes. Relacionan la resistencia a FQ mediada por mutaciones en los genes cromosómicos *gyrA* y *parC* mayormente con el subclón H30-R y dentro de este subclón (anidado), identifican la presencia de otro, llamado H30-Rx (91%) cuyas cepas se caracterizan por presentar resistencia a FQ y la presencia del gen *bla*_{CTX-M-15} así como un incremento en el riesgo de provocar sepsis (Price *et al.*, 2013).

Petty *et al.*, (Australia, 2014) analizan 95 ST131 de 6 países durante 2000-2011, todas agrupadas en el filogrupo B2. Reportan que la estructura clonal se conforma por 3 clados principales (A, B y C) gracias a eventos de recombinación, HGT y SNP. Identifican una asociación del clado A con el serogrupo H5 y los clados B y C con H4 así como la introducción de alelos *fimH* específicos de clado, *fimH41* para el A, *fimH22* en el clado B y *fimH30* en el clado C, este último dividido en los subclados C1/H30-R y C2/H30-Rx (Petty *et al.*, 2014).

Stoesser *et al.*, (Reino Unido, 2016) analizan las secuencias de 215 genomas *E. coli* ST131 recolectadas en 3 continentes. Identifican los clones A (11.63%), B (23.72 %) y C (64.65%) así como los subclones C1 (41%) y C2 (59%). 105 cepas (48.84%) portan *bla*_{CTX-M}, variantes *bla*_{CTX-M-15}, 14, 27, 19, 24, 55. Predomina *bla*_{CTX-M-15} con el subclado C2 (94.2%), principalmente localizado en plásmidos (87.7%) y con una fuerte asociación con IS 26 e IS *Ecp1* (70.18%) e IS *Ecp1* sola (29.82%). Los genes *bla*_{CTX-M-14} se asocian con los clados A (40%) e IS *Ecp1* (100%) y el subclón C1

(40%) se relaciona con IS *Ecp1* (87.5%) sola o en combinación IS 26 e IS *Ecp1* (12.5%). *bla*_{CTX-M-27} se ubica en el clado A (25%) y C1 (75%) y se asocia en su totalidad con IS *Ecp1* (100%). También se asocian los plásmidos IncF (95.81%) con ST131, principalmente los replicones FII (92.56%), FIB (72%) y FIA (67.44%) con C2; los plásmidos tipo Col (88%), así como IncH con el clado B e IncI con el clado C1. Finalmente, establecen que la aparición de los subclados C1/H30-R y C2/H30-Rx data de aproximadamente 25 años (Norteamérica) debido a la presión de selección por el mal uso de FQ y cefalosporinas de espectro extendido (Stoesser *et al.*, 2016).

Blanco *et al.*, (España, 2013) diseñan un esquema de virotipificación basado en la amplificación por PCR de los genes *afaFM955459*, *iroN*, *ibeA* y *sat*. Los virotipos A, B y C son más frecuentes entre los aislados O25:H4-ST131 (Blanco *et al.*, 2013). Posteriormente, Martínez-Gorgonio (México, 2019) identifica la presencia de un quinto virotipo (E) en cepas ST131 (Martínez-Gorgonio, 2019).

Merino *et al.*, (España, 2017) tipifican 48 aislados ST131 del torrente sanguíneo. El 44% de las cepas portan BLEE, 98% pertenecen al serotipo O25 y 83% al patotipo ExPEC y se identifican los subclones H30-Rx (65%), H30-R (21%) o no-H30 (15%). Analizan la presencia de 49 genes de virulencia, *sat* (95%), *iha* (93%) y *malX* (100%) se agrupan en las cepas H30 e *ibeA* (83%) e *iss* (57%) lo hacen con las no-H30 y asignan puntajes de virulencia para H30-Rx (12), H30-R (10) y no H30 (11). Los virotipos predominantes (Esquema de Blanco *et al.*), son C (31%) y A (25%) (Merino *et al.*, 2017). Existe una amplia diversidad plasmídica y hay grupos Inc que no se conocen, por tanto, no es posible asignarlos dentro de un grupo de PBRT, esto ha llevado a la implementación de otros esquemas de replicación plasmídica, como el desarrollado por Alvarado *et al.*, (España, 2012) quienes diseñan cebadores para identificar relaxasas de 5 familias MOB, denominando al método “Tipificación MOB con Primers Degenerados” (DPMT). Analizan 2 ceparios, el primero de 135 enterobacterias productoras de BLEE (104/135 *E. coli*), identificando 237 relaxasas, principalmente MOB_{P5} (29.5%), MOB_{F12} (25.3%), MOB_{P12} (16.5%), MOB_{F11} (5.9%), MOB_{Qu} (4.6%). Un segundo cepario está formado por 49 cepas UPEC adquiridas en la comunidad que contienen 77 relaxasas, pertenecientes a los grupos MOB_{F12} (39%), MOB_{P5} (23.4%) y MOB_{Qu} (5.2%) (Alvarado *et al.*, 2012).

Johnson *et al.*, (USA, 2008) analizan 1047 aislados del patotipo ExPEC: UPEC (531), APEC (462) y NMEC (91). En general, el filogrupo predominante es B2 (90%). En cepas UPEC las prevalencias son de 62.7% para B2 y 22.7% para grupo D. Analizan 67 genes de virulencia asociados a estos patotipos, prevaleciendo en UPEC: *traT* (67.8%), *sitA* (83.4%), *iutA* (48.4%), *papA* (54.8%), *papC* (59.7%), *papE* (55.4%), *kpsII* (78.5%), *malX* (68.2%), *fyuA* (80.6%), *ompT* (81.5%). También

realizan PBRT para conocer los replicones con mayor frecuencia, identificando IncB/O (14.55%), IncFIIA (3%) e IncFIB (33.5%) (Johnson, *et al.*, 2008).

Molina *et al.*, (México, 2011) recolectan 119 cepas de *E. coli* en muestras de orina. Identifican el serotipo O25:H4 (21,2%) como predominante. Evalúan la susceptibilidad hacia diversos antibióticos obteniendo altas tasas de resistencia para ampicilina (83.7%); piperacilina (53.8%); fluoroquinolonas (55.5-60.6%) y trimetoprima/sulfametoxazol (TMP/SMX) (56.4%). Además, 36 (30.2%) aislamientos son MDR y 13 cepas se identifican como clones de *E. coli* O25-ST131. El análisis filogenético muestra que 15 de 17 aislamientos con serotipo O25:H4 pertenecen al grupo B2. Establecen una correlación entre el serotipo O25:H4 y la resistencia a múltiples fármacos en las cepas UPEC (Molina-López *et al.*, 2011).

Ostblom *et al.*, (Suecia, 2011) analizan muestras ExPEC de aislados fecales en 130 niños. Identifican la presencia de PAI asociadas a ExPEC y su relación con los genes *malX* y *usp*. Los resultados obtenidos ayudan a comprender los factores para la persistencia de las cepas: las cepas asociadas a colonizaciones a largo plazo (> 12 meses) portan PAI II_{CFT073}, PAI IV₅₃₆ y PAI II_{J96}, así como *malX* y *usp*, características que no poseen las cepas colonizadoras de duración intermedia (1 a 11 meses) y las cepas de los brotes transitorios (< 3 semanas). La acumulación de PAI se relaciona positivamente con el tiempo de persistencia en el colon. El grupo filogenético B2 representa el 69% de colonizadores a largo plazo, 46% de colonizadores intermedios y 14% de cepas transitorias (Östblom *et al.*, 2011).

Reyna-Flores (México, 2013) analiza características asociadas a *E. coli* O25-ST131. Obtiene 4,735 muestras de UPEC aisladas en México, reportando 483 cepas productoras de BLEE (10,2%), principalmente CTX-M-15 (96.4%), SHV-2a (3%) y TLA-1 (1%). Evalúa la presencia de genes PMQR (94.6%), *aac* (6')-Ib-cr (92.1%) y *qepA1* (7%). Identifica *E. coli* O25b-ST131 en 25% de los aislamientos, los cuales presentan un plásmido no conjugativo de 160 kb perteneciente al grupo IncFIA, portador del gen *bla*_{CTX-M-15}, y genes PMQR (Reyna-Flores *et al.*, 2013).

Paniagua-Contreras *et al.*, (México, 2017) trabajan con cepas UPEC adquiridas en la comunidad. Evalúan 24 genes de virulencia, obteniendo mayor prevalencia en *kpsMT* (92.2%), *usp* (87.1%), *irp2* (79.3%), *iha* (64.9%), *fimH* (61.3%), *sat* (36%), *astA* (33.5%), *pap* (24.7%) y *papGII* (21.1%). El serogrupo prevalente es O25 (20.6%), seguido de O15 (17%), O8 (6.1%) y O75 (4.6%). 97% de las cepas son MDR (3-11 antibióticos), con resistencia principalmente a cefalotina (97.9%), ampicilina (97.4%) y carbenicilina (97.4%) (Paniagua-Contreras *et al.*, 2017).

Abe *et al.*, (Brasil, 2008) trabajan con 225 cepas UPEC, buscando la presencia de varias propiedades asociadas a cepas híbridas DEC/UPEC. Identifican genes DEC y 16 cepas (7.1%) presentan fenotipo de adherencia agregativa y/o la

secuencia *aatA*, características de cepas EAEC, demostrando que una cepa de *E. coli* puede presentar características de 2 patotipos (Abe *et al.*, 2008).

Lara *et al.*, (Brasil, 2017) trabajan con 258 aislamientos UPEC (n=79). Buscan cepas híbridas EAEC/UPEC por identificación de 21 genes de virulencia, determinan filogrupos, ST y ensayos de adherencia para aquellas cepas con un fenotipo híbrido y evalúan la formación de biopelículas. Los genes UPEC más frecuentes son *chuA* (85%) y *fyuA* (78%) y para EAEC, *aatA* (3.4%) y *aggR* (3.4%). En todas las cepas híbridas (9/258) se presentan los genes *fyuA* y *pap*. Se analizan 2 cepas representativas (UTI y bacteremia), perteneciendo una de ellas al filogrupo D/ST69 y la segunda al filogrupo A/ST478 (Lara *et al.*, 2017).

Respecto a la identificación de cepas UPEC, estas suelen compartir una gran cantidad de genes de virulencia ExPEC, dificultando el diseño de un diagnóstico preciso basado en la identificación de algunos genes; sin embargo, Spurbeck *et al.*, (USA, 2012) diseñan una PCR basada en la presencia de 4 genes: *yfcV*, *chuA*, *vat* y *fyuA* que pueden ayudar en la identificación de UPEC. Analizan 202 cepas (57 cepas fecales humanas, 32 fecales animales, 37 cistitis y 76 cepas de pielonefritis) obteniendo bajo este esquema 113 cepas UPEC, lo cual coincide con el sitio de aislamiento (Spurbeck *et al.*, 2012). Posteriormente, Brons *et al.*, (Países Bajos, 2020) desarrollan otra PCR que utiliza 3 genes (C3509, *yrbH*, *chuA*) característicos de UPEC, permitiendo identificar cepas UPEC en un tiempo inferior a una hora, probándolo en 128 cepas clínicas (UTI) con una eficacia de 97.7% (Brons *et al.*, 2020).

Wurpel *et al.*, (Australia, 2016), realizan un análisis en el proteoma de cepas UPEC e identifican una nueva fimbria, denominada UCA-like (Ucl), codificada por el operón *uclABCD*, que pertenece a las fimbrias tipo CUP, está formada por 4 subunidades (principal, chaperona, usher y adhesina), se localiza en PAI y se asocia con cepas de los filogrupos B2 y D. En ensayos de adherencia, las cepas portadoras de fimbria Ucl promueven la formación de biopelícula en superficies abióticas y median la unión específica a células uroepiteliales humanas exfoliadas (Wurpel *et al.*, 2016).

2.2. Antecedentes específicos

El laboratorio de Biología Molecular de Enteropatógenos (LBME), a cargo de la DC Margarita María de la Paz Arenas Hernández y perteneciente al Instituto de Ciencias de la BUAP (ICUAP), se ha involucrado en los últimos años en el estudio de cepas patógenas de UPEC, obteniendo muestras clínicas durante el periodo 2009-2016. Las cepas pertenecen a 6 ceparios de distintos orígenes: hospitales públicos y privados de los estados de Puebla, México y Sonora. La incidencia de cepas UPEC

aisladas de mujeres respecto a hombres es de 9:1 y pertenecen a aproximadamente 52 serotipos diferentes, destacando O25:H4 (8-16%), además de diversos grupos filogenéticos: A, B1, B2, C, D y F, siendo B2 (36-92%) más prevalente.

Zarzoza-Mendoza (2016) analiza las características de virulencia de 65 cepas UPEC O25 pertenecientes a hombres (12.3%), mujeres (76.9%) y niños (10.8%). Mediante confirmación molecular por PCR determina el serotipo O25:H4 en 55 cepas (88%). El filogrupo predominante es B2, identificado en 60 cepas (92%), seguido de C en 3 cepas (5%), y el grupo A en 2 cepas (3%) todas O25:H4. Analiza la presencia de 10 genes de virulencia. El 96% de las cepas presenta de 1-9 genes, siendo los más prevalentes *fimH* (100%), *iha* (91%), *iucD* (89%) y *sat* (71%). El conjunto de genes *fimH+* *iha+* *iucD+* *sat* se encuentra en 49%. La PAI I_{CFT073} se detecta en 95% de las cepas, seguida de PAI II_{CFT073} en 63% mientras que PAI II_{J96} se presenta en 3% y ninguna cepa reporta PAI I_{J96}. 80% de las cepas presentan de 1-7 plásmidos, con tamaños de 1-127 kb. La mayor frecuencia de resistencia a antibióticos es para ampicilina y cefalotina (97%), ácido nalidíxico (85%), ciprofloxacino (83%), levofloxacino (82%) y norfloxacino (80%). La nitrofurantoína es el antibiótico con mayor porcentaje de sensibilidad (91%), pudiendo ser utilizada como la mejor opción de tratamiento. Todas las cepas presentan MDR de acuerdo con los criterios de Magiorakos *et al.*, y dentro de estas, predominaron las XDR (54%) sobre las PDR (28%) (Zarzoza-Mendoza, 2016).

Ixtepan-Tejero (2018) trabaja con dos ceparios UPEC, uno de ellos conformado por las 65 cepas O25 parcialmente analizadas por Zarzoza-Mendoza y el segundo cepario consiste en 51 cepas de *E. coli* aisladas de mujeres con ITU proporcionadas por el ISSSTE durante 2015-2016. Identifica genes de virulencia en el cepario ISSSTE, reporta presencia de los genes *fimH* (96%), *iucD* (65%), *iha* (35%), *hlyA* (19%) y *cnf-1* (11%). 98% de las cepas presenta de 1-9 genes. En el cepario O25 se evalúa resistencia a betalactámicos de 1ª generación (96.9%), quinolonas de 2º generación (81.1%), aminoglucósidos (53.8%), fosfomicina (12%), colistina (12%) y ertapenem (2%). Para el cepario ISSSTE también se realiza la determinación de resistencia a 12 familias de antibióticos, reportando altos índices para betalactámicos de 1º generación (95.2%), quinolonas (94.9%) y aminoglucósidos (52.2%). Se identifican genes codificados por BLEE: el cepario O25 presenta los genes *bla*_{TEM} (40%), *bla*_{OXA-1} (17%), *bla*_{CTX-M} (13%) y el cepario ISSSTE, a pesar de contener los mismos genes, difiere en la prevalencia, reportando *bla*_{TEM} (66%), *bla*_{CTX-M} (25%) y *bla*_{OXA-1} (9%). Finalmente detecta los genes *traT* y *MOBF12*. El cepario O25 presenta *traT* (100%) y *MOBF12* (40%), mientras que el cepario ISSSTE se asocia con *traT* (48%) y *MOBF12* (34.7%) (Ixtepan-Tejero, 2018).

Martínez-Gorgonio (2019), realiza un estudio con 55 cepas O25:H4 aisladas en un periodo de 4 años (2011-2015) de pacientes ambulatorios (9.09%), niños

hospitalizados (12.73%) y mujeres con displasia cervical (78.18%). Identifica ST131 en 44 cepas (80%), todas formando parte del clado C (*fimH30*) y 40 cepas son subclón *H30-Rx* (90.9%). Determina la presencia de MOB_{F12} (95%), *traT* (66%) y el conjunto MOB_{F12} y *traT* (61%) así como los genes asociados a virulencia *iroN* (75%), *kpsMII-K2* (72.7%), *iss* (54.5%), *ibeA* (43.1%), *cvaC* (38.6%) y *afaFM955459* (31.8%). Realiza virotipificación, reportando al grupo D (43%) como el más prevalente, seguido de C (20%), B (18%) y propone el E (14%). También determina la presencia de cepas híbridas UPEC/DEC donde el 60% presenta el patotipo UPEC/EIEC (*ipaH*), seguido de un 4% UPEC/EPEC (*escD*). La asociación de O25:H4-ST131-*H30Rx* con *bla_{CTX-M}* es de 95% (Martínez-Gorgonio, 2019).

Cortez de la Puente (2020) continua con la caracterización del cepario ISSSTE (2015-2016), correspondiente a 51 aislados exclusivos de mujeres poblanas. Determina grupos filogenéticos, prevaleciendo B2 (37%), D (20%), A (16%) y C (16%). Identifica 13 genes de virulencia, siendo frecuentes *fimH* (98%), *iucD* (76%), *iha* (45%), *satA* (33%) y *papGII* (27%). Identifica PAI II_{CFT073} (33%), PAI II_{J96} (4%) y en 11 cepas el conjunto PAI I_{CFT073} + PAI II_{CFT073} (22%) y en una cepa las 3 (2%). Reporta 16 serotipos, O25:H4 es el más prevalente (22%), seguido de aquellas NT (16%) y O102:H6 (14%). Determina las variantes alélicas *fimH* de 36 cepas (secuenciación de *fimH*), siendo *fimH54* (25%) la más encontrada, seguida de *fimH30* (17%) y *fimH29* (11%). Respecto a la búsqueda de genes asociados con transferencia genética mediada por plásmidos, se identifican los genes *traT* (53%), MOB_{Q11} (2%), MOB_{Q12} (12%) y MOB_{Qu} (8%). Finalmente, selecciona 10 cepas para realizar transferencia, reportando la adquisición de resistencia hacia ampicilina (100%), cefalotina (100%), amoxicilina con ácido clavulánico (100%), ceftazidima (88%), cefotaxima (75%), tetraciclina (60%), cloranfenicol (57%) y gentamicina (56%) así como los genes de virulencia *iha* (100%), *iucD* (80%) y *satA* (70%) (Cortez de la Puente, 2020).

3. JUSTIFICACIÓN

Escherichia coli es un microorganismo que puede habitar como comensal o como patógeno, asociado a diarreas (DEC) y/o infecciones extraintestinales (ExPEC). Algunos linajes ExPEC se han vuelto resistentes a diversos antibióticos, principalmente por la adquisición de betalactamasas de espectro extendido (BLEE), destacando las enzimas CTX-M. Estos linajes son limitados, se asocian con los filogrupos B2 o D, principalmente, así como a una gran variedad de serotipos y serogrupos, siendo O25:H4 uno de los más prevalentes en la actualidad.

En años recientes, el serotipo O25:H4 perteneciente a la secuencia tipo 131 (ST131) ha comenzado a considerarse como un grupo clonal pandémico y de alto riesgo. Dichas cepas tienen la capacidad de portar gran diversidad de genes de virulencia y resistencia principalmente por diseminación en plásmidos IncF, dificultando el tratamiento e incrementando considerablemente los niveles de morbilidad y mortalidad, principalmente por ITU y sepsis, convirtiendo a O25:H4 ST131, en un problema de salud pública, tanto a nivel mundial como nacional.

Se sabe que, a pesar de tratarse de una misma secuencia tipo, las características de este grupo clonal difieren entre un país y otro, además sus perfiles de resistencia y virulencia también tienden a variar. En México, son pocos los estudios que se han realizado a cepas de *E. coli* O25:H4 ST131, en su mayoría aisladas durante episodios de ITU; sin embargo, es posible observar ciertas características propias de cepas aisladas en el país. Esta investigación se centra en analizar determinantes genómicos, tanto en cromosoma como en plásmido, de un conjunto de genomas de cepas clínicas O25:H4 aisladas de sangre, orina y heces en distintas partes del mundo, incluida una cepa mexicana, para conocer la caracterización genotípica del clon ST131, así como de 3 subclones que derivan de este grupo: H30-Rx, H30-R y No H30 con la finalidad de conocer los determinantes propios de cada ST131 y subclones que podrían ayudarnos a un diagnóstico más rápido, preciso y diferencial.

4. OBJETIVOS

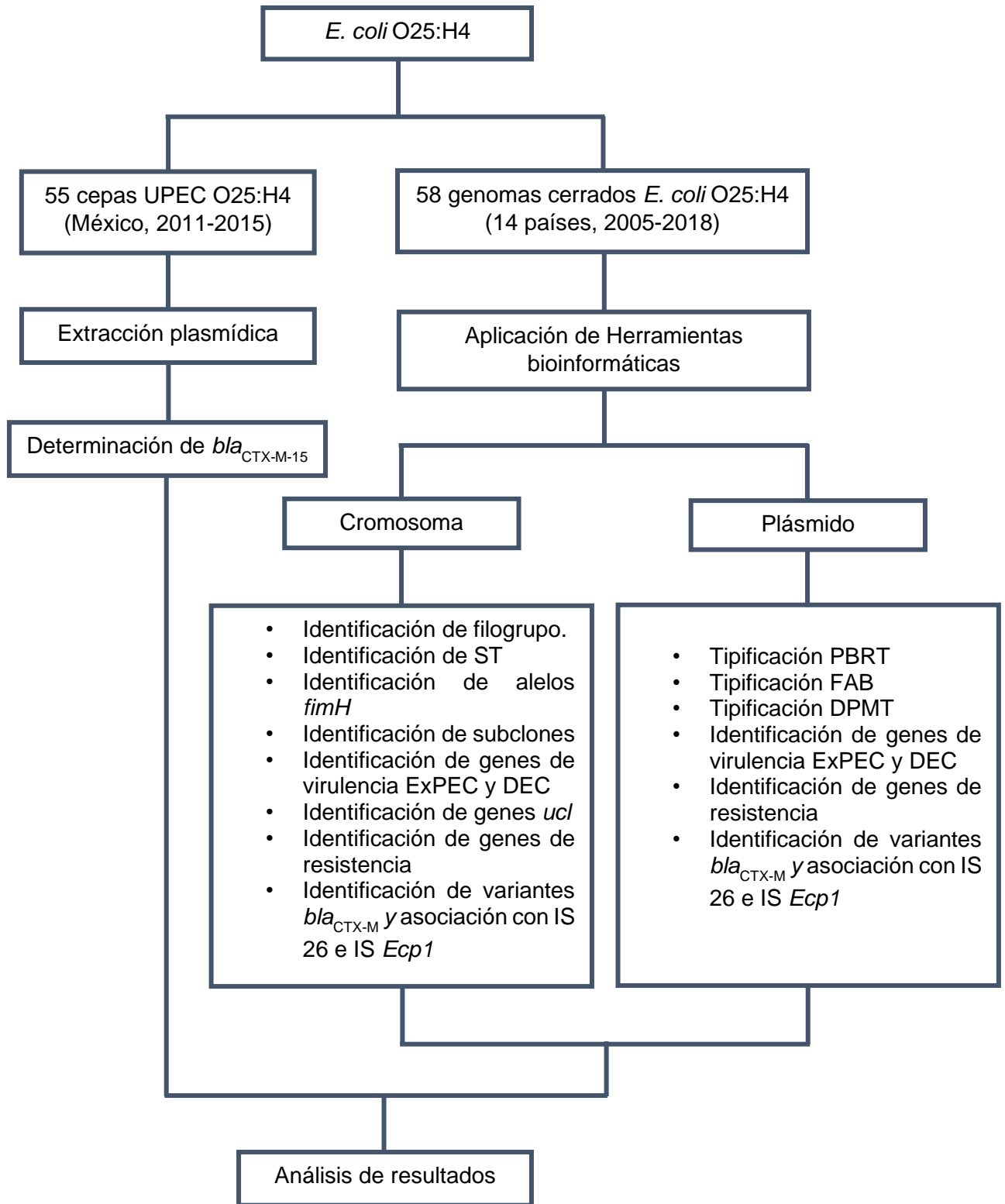
4.1. Objetivo particular

Determinar características filogenéticas, clonales, genotípicas, de virulencia, de resistencia y plasmídicas *in silico* en una colección de genomas de *E. coli* O25:H4.

4.2. Objetivos específicos

1. Determinar el perfil de bandas plasmídicas de 55 cepas UPEC O25:H4.
2. Determinar la presencia del gen *bla_{CTX-M}* en 55 cepas UPEC O25:H4.
3. Buscar y seleccionar genomas completos de *E. coli* reportadas como pertenecientes al serotipo O25:H4 en bases de datos de libre acceso.
4. Identificar los grupos filogenéticos en los genomas.
5. Asignar la secuencia tipo en los genomas.
6. Identificar los alelos *fimH* y los subclones *H30-Rx* y *H30-R*.
7. Identificar los perfiles de virulencia en los genomas O25:H4.
8. Identificar genes de virulencia asociados a cepas UPEC.
9. Identificar el virotipo de los genomas.
10. Analizar la presencia de genomas híbridos ExPEC-DEC.
11. Identificar los genes *ucl*, posición y entorno genético en el genoma de cepas prototipo y cepas O25:H4.
12. Diseñar oligonucleótidos para la identificación de los genes *uclA* y *uclD*.
13. Identificar genes de resistencia a antibióticos y las categorías de resistencia.
14. Identificar las variantes del gen *bla_{CTX-M}*, su asociación con IS26 e ISEcp1 y el grupo al que pertenecen.
15. Analizar la presencia, número, tamaño y grupo de incompatibilidad de plásmidos.

5. DIAGRAMA DE TRABAJO



6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Sección de análisis experimental

6.1.1. Material biológico

El cepario de estudio se conformó por 55 cepas UPEC O25:H4 aisladas de población mexicana durante los años 2011-2015. El serotipo se asignó por serotipificación con anticuerpos y por la presencia del alelo *pabB*, específico de cepas O25b diseñado por Clermont *et al.*, (Clermont *et al.*, 2009) y realizado por Zarzoza-Mendoza (Zarzoza-Mendoza, 2016). La edad de los donadores es desconocida. 44 de las 55 cepas pertenecen a ST131 y de estas, 40 pertenecen al subclon H30-Rx y 4 al H30-R (Martínez-Gorgonio, 2019). La **tabla 7** resume las características del cepario, mientras que la **tabla 8** presenta las características de las cepas utilizadas como control positivo.

Tabla 7. Características generales del cepario de estudio O25:H4

Cepario de estudio O25:H4	
No. de cepas y origen	55 cepas UPEC recolectadas de un Laboratorio de Salud Pública del Estado de Puebla, dos laboratorios clínicos particulares de la Ciudad de Puebla y del Departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina de la UNAM.
Donadores	43 mujeres con displasia cervical (78.18%), 7 niños (12.73%) y 5 varones (9.09%).
Filogrupos	A (1.8%), B2 (92.7%) y C (5.5%).
Virotipos	B (18.2%), C (20.45%), D (43.2%), E (13.64%) y ND (4.54%).
ST	44 cepas ST131 (80%) y 11 cepas no ST131 (20%)
Subclones ST131 (44 cepas)	40 cepas ST131-H30 Rx (90.9%) y 4 cepas ST131-H30 R (9.09%).
Factores de resistencia	55 cepas MDR (100%) AM (97%), CF (97%), CFX (76%), CFZ (67%), AMC (84%), AN (85%), LVX (82%), CIP (83%), OFX (81%), NOR (81%), AMK (78%), GM (75%).
Factores de virulencia	<i>fimH</i> (100%), PAI I _{CFT073} (95%), <i>iha</i> (91%), PAI II _{CFT073} , <i>iucD</i> (89%), <i>iroN</i> (74.55%), <i>kps</i> (74.55%), <i>sat</i> (71%), <i>traT</i> (65.45%), <i>sat</i> (65.45%), <i>iss</i> (50.9%), <i>ibeA</i> (40%), <i>cvaC</i> (34.55%) y <i>afa</i> (25.45%).

Tabla 8. Características generales de las cepas control utilizadas.

Cepas Control	
<i>E. coli</i> C7230	Cepa control para la detección de CTX-M-U aislada de paciente masculino de 52 años. Pertenece a O25:H4-B2-ST131. Porta el gen <i>bla</i> _{CTX-M-15} . Donada por el LMHyC.
<i>E. coli</i> 058I	Cepa control para extracción plasmídica y <i>traT</i> . Cepa aislada de ITU procedente de ISSSTE PUEBLA y parte del cepario de LBME.

Las cepas de trabajo se mantienen en crioconservación a -70°C. Cuando se requirió su uso se utilizaron 20 µl de los crioviales y se inoculó en medio líquido LB, a 37°C, a 220 rpm de 18-24 h.

6.1.2. Extracción de ADN plasmídico

El ADN plasmídico se obtuvo por el método de lisis alcalina de acuerdo con el protocolo de Sambrook (2001). Las alícuotas con 70 µl de ADN plasmídico obtenidas se almacenaron a -20 °C para su uso posterior. Una vez obtenido el material plasmídico, la concentración y pureza del ADN se midió en un equipo NanoDrop 2000c, a una absorbancia de 280 nm y con el fin de conocer el perfil plasmídico de las extracciones, se realizó un corrimiento electroforético en gel de agarosa al 0.7% utilizando 4 µl de cada una de las muestras problema, así como de la cepa 058I y un marcador de peso molecular (MPM) como controles, seguido de una tinción con bromuro de etidio (BET). El gel teñido se examinó bajo luz UV para encontrar la presencia de bandas plasmídicas y con el uso de los controles, determinar el peso molecular aproximado.

6.1.3. Caracterización de genes *bla*_{CTX-M} por PCR

Para identificar las cepas portadoras de *bla*_{CTX-M} se utilizó como templado DNA plasmídico y oligonucleótidos universales previamente diseñados a partir de una región conservada de todas las variantes del gen. Los oligonucleótidos fueron compartidos por el LIHC (**tabla 9**).

Tabla 9. Oligonucleótidos utilizados para la detección del gen *bla*_{CTX-M}.

Gen	Producto	Secuencia	Tamaño
<i>bla</i> _{CTX-M}	Gen codificante de una BLEE.	CTXM-UNI-F: CGATGTGCAGTACCAGTAA	566 pb (Batchelor <i>et al.</i> , 2005)
		CTXM-UNI-R: TTAGTGACCAGAATCAGCGG	

Posteriormente se realizó corrimiento electroforético en gel de agarosa al 1%, los geles se tiñeron con BET durante 15 minutos, seguido de 2 minutos en agua y se visualizaron mediante un transiluminador UV o un fotodocumentador MiniBIS Pro.

6.2. Sección de análisis bioinformático

6.2.1. Búsqueda de genomas secuenciados O25:H4

Se realizó la búsqueda de genomas de *E. coli* O25:H4 en la base de datos de libre acceso del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI), utilizando los filtros de búsqueda de la base de datos para obtener cepas patógenas humanas. Se eligieron los genomas de cepas en las que se pudiera acceder a la secuencia de nucleótidos con el programa SnapGene Viewer 5.2.4 así como la descarga del archivo en formato FASTA para los posteriores análisis.

Para ampliar el número de genomas a estudiar, se utilizaron oligonucleótidos diseñados para amplificar una región del gen *wzy* específica del serogrupo O25 (tabla 10) (Li *et al.*, 2010), con los cuales se obtuvo el amplicón de la cepa prototipo EC958 (No. acceso HG941718), obteniendo un fragmento de 230 pb que se sometió a BLASTn (NCBI). Se analizaron los genomas que presentaron el fragmento de interés, seleccionando los que cumplieran con las características de inclusión.

Tabla 10. Oligonucleótidos utilizados para la detección de las cepas pertenecientes al serogrupo O25.

Gen	Producto	Secuencia	Tamaño
<i>wzy</i>	Polimerasa, asociada con el procesamiento de las unidades O. Región alélica característica del serogrupo O25.	wl-14666: AGAGATCCGTCTTTTATTTGTTTCGC	230 pb (Li <i>et al.</i> , 2010)
		wl-14667: GTTCTGGATACCTAACGCAATACCC	

6.2.2. Identificación de las características del cepario de estudio

Una vez identificado y seleccionado el número total de genomas O25:H4 de NCBI y los genomas O25 aportados por BLASTn, las cepas seleccionadas fueron aquellas que cumplieron con los **criterios de inclusión** a saber: genoma cerrado, acceso a la secuencia completa de nucleótidos, descarga en formato FASTA, aislados de humanos, información de sitio anatómico, lugar y año de aislamiento entre 2005-2018. Los **criterios de exclusión** fueron aquellas cepas no O25:H4 u O25, aisladas de un hospedero distinto al hombre o sin acceso a su secuencia del genoma.

La plataforma NCBI proporcionó los números de acceso, tamaño del genoma, tipo de genoma (cerrado o abierto), cantidad de genes, número de plásmidos y el %GC en cromosoma y plásmidos. Si la información no estaba disponible en la base de datos, se cargó la secuencia de nucleótidos en la plataforma de Anotación Rápida usando Tecnología de Subsistemas (RAST) la cual permitió conocer estas características. La recopilación del sitio y año de aislamiento, país de origen, género y edad del hospedero se buscaron en los datos del aislamiento (BioSample) de cada genoma (NCBI). Cuando no estaba disponible dicha información, se realizó una búsqueda en los artículos de referencia.

6.2.3. Confirmación de serotipo

La confirmación de serotipo O25:H4 se realizó utilizando la herramienta SerotypeFinder 2.0 que forma parte de las aplicaciones para el análisis bioinformático, diseñado a través del Centro de epidemiología genómica (CGE) de la Universidad de Dinamarca (DTU) (Disponible en <https://cge.cbs.dtu.dk/services/SerotypeFinder/>). Las secuencias de los genomas se cargaron en la plataforma utilizando como parámetros un umbral de identidad de 85%, longitud mínima de 60% y una lectura para genoma ensamblado/borrador en formato FASTA.

6.2.4. Identificación de filogrupo

Para conocer el grupo filogenético se utilizó la plataforma ClermonTyping (Disponible en <http://clermontyping.iame-research.center/>) (Beghain *et al.*, 2018). Esta herramienta permite identificar los filogrupos A, B1, B2, C, D, E y F de *E. coli* mediante un análisis del genoma en formato FASTA.

El análisis se realizó en abril del 2021, fecha en la cual aún no estaba disponible la determinación del filogrupo G, por lo que se realizó la búsqueda de este grupo por PCR *in silico* del gen *ybgD* (Clermont *et al.*, 2019) a los genomas que pertenecieran a los filogrupos B2 y F. La visualización se realizó con SnapGene Viewer 5.2.4.

Tabla 11. Oligonucleótidos utilizados para la determinación de cepas pertenecientes al filogrupo G.

Gen	Producto	Secuencia	Tamaño
<i>ybgD</i>	Gen específico del filogrupo G. Codifica para una adhesina tipo fimbrial.	ybgD.1: TATGCGGCTGATGAAGGATC	177 pb (Clermont <i>et al.</i> , 2019)
		ybgD.2: GTTGACTAAGCGCAGGTCGA	

6.2.5. Identificación de secuencia tipo (ST)

La secuencia tipo se asignó utilizando el programa MLST 2.0 del CGE (Disponible en <https://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST/>). Se usaron los genomas de estudio en formato FASTA. Los parámetros para la determinación fueron configuración MLST de *Escherichia coli* #1 para el análisis alélico de 7 genes de mantenimiento basados en el esquema de Atchman y el tipo de lectura para genoma ensamblado/borrador en FASTA.

6.2.6. Identificación de las variantes alélicas en el gen *fimH*

Se utilizó la herramienta de CGE FimTyper 1.0 (Disponible en <https://cge.cbs.dtu.dk/services/FimTyper-1.0/>) para conocer las variantes alélicas del gen *fimH*, codificante de la adhesina fimbrial tipo 1. Los parámetros utilizados fueron umbral de identidad de 95% y una lectura de genoma ensamblado/contig. Posteriormente se asociaron algunas variantes alélicas con clados previamente definidos en ST131 (Petty *et al.*, 2014), el clado B con el alelo *fimH22*, el clado C *fimH30*, así como otras variantes alélicas menores relacionadas. El alelo *fimH41*, que da forma al clado A no se tomó en cuenta ya que se relaciona con el serotipo O16:H5.

6.2.7. Determinación de subclones

Se seleccionaron los genomas de las cepas portadoras del alelo *fimH30*, para la identificación de los subclones *H30-R* y *H30-Rx*. Se realizaron dos PCR *in silico* basadas en la detección de SNP específicos de cepas pertenecientes al subclón *H30-R* (90C, 96T en *fimH30*) (Colpan *et al.*, 2013) y *H30-Rx* (G723A en *ybbW*) (Banerjee *et al.*, 2013) (**tabla 14**).

Tabla 12. Genes utilizados para diferenciar los subclones *H30-R* y *H30-Rx*.

Gen	Producto	Secuencia	Tamaño
<i>fimH30</i>	Variante alélica del gen <i>fimH</i> que codifica una adhesina fimbrial tipo 1, propia del subclón <i>H30-R</i> .	fimHF-21: CCGCCAATGGTACCGCTATT	354 pb (Colpan <i>et al.</i> , 2013)
		fimHR-20: CAGCTTTAATCGCCACCCCA	
<i>ybbW</i>	Gen codificante de alantoína. En cepas ST131 <i>H30-Rx</i> presenta un SNP específico: G723A.	APfor63: GGTTGCGGTCTGGGCA	194 pb (Banerjee <i>et al.</i> , 2013)
		APrev66: CAATATCCAGCACGTTCCAGGTG	

6.2.8. Búsqueda de determinantes de virulencia

Los genes de virulencia en las cepas ExPEC pueden clasificarse por su papel en la adherencia, evasión del sistema inmune, invasinas, toxinas, adquisición de hierro y misceláneos. La determinación de genes que codifican los factores de virulencia se realizó por dos modalidades. La primera consistió en un análisis con la herramienta VirulenceFinder 2.0 (Disponible en <https://cge.cbs.dtu.dk/services/VirulenceFinder/>). Los parámetros utilizados fueron un umbral de identidad de 90%, longitud mínima de 60% y lectura de genoma ensamblado/ contig. Los genes reportados se muestran en la **tabla 18**.

Tabla 13. Genes identificados con VirulenceFinder 2.0 en 58 genomas de estudio.

Función	Gen	Producto
Adhesinas	<i>afaA</i>	Regulador transcripcional
	<i>afaB</i>	Chaperona periplasmática
	<i>afaC</i>	Usher
	<i>afaD</i>	Adhesina afimbrial

	<i>afaE</i>	Adhesina
	<i>papA-F43</i>	Subunidad principal de pilina F43
	<i>papC</i>	Usher
	<i>hra</i>	Hemaglutinina resistente al calor
	<i>iha</i>	Adhesina homóloga de IrgA
	<i>nfaE</i>	Adhesina afimbrial NFA
	<i>tsh</i>	Hemaglutinina sensible a la temperatura
	<i>yfcV</i>	Proteína fimbrial
Toxinas	<i>sat</i>	Toxina autotransportadora secretada
	<i>cnf1</i>	Factor citotóxico necrotizante
	<i>astA</i>	Enteroxina termoestable 1.
	<i>cvaC</i>	Microcina C
	<i>hlyF</i>	Hemolisina F
	<i>mcbA</i>	Microcina B17
	<i>senB</i>	Enterotoxina secretada TieB
Invasinas	<i>ibeA</i>	Proteína de invasión del endotelio cerebral
Adquisición de hierro	<i>sitA</i>	Transportador de hierro
	<i>iucC</i>	Síntesis de aerobactina
	<i>iutA</i>	Receptor de aerobactina
	<i>fyuA</i>	Receptor de yersiniobactina
	<i>chuA</i>	Receptor de hemo/hemoglobina
	<i>iroN</i>	Receptor del sideróforo salmoquelina/catecolato
	<i>ireA</i>	Receptor de hierro en la membrana externa
Evasión del sistema inmune	<i>iss</i>	Incremento de la supervivencia sérica
	<i>ompT</i>	Proteína de membrana externa
	<i>traT</i>	OMP, resistencia sérica.
	<i>cma</i>	Colicina M
	<i>kpsMII-K5</i>	Proteína de transporte de ácido polisálico. Cápsula del Grupo 2, serogrupo K5.
	<i>neuC</i>	Proteína de biosíntesis de cápsula de ácido polisálico.
	<i>kpsE</i>	Proteína membranal de exportación del polisacárido capsular.
Misceláneos	<i>usp</i>	Proteína uropatógena específica

Con la finalidad de ampliar la búsqueda de genes de virulencia asociados con cepas ExPEC O25:H4, se realizó una búsqueda bibliográfica para seleccionar

oligonucleótidos que permitieran realizar PCR *in silico* utilizando SnapGene Viewer 5.2.4. **Tabla 19.**

Tabla 14. Genes de virulencia asociados a distintas funciones identificados por PCR *in silico* en 58 genomas de estudio.

Gen	Producto	Secuencia	Tamaño replicón	
Adhesinas	<i>fimH</i>	FimH-F: CACTCAGGGAACCATTTCAGGCA	975 pb (Batchelor, <i>et al.</i> , 2005)	
		FimH-R: CTTATTGATAAACAAAAGTCAC		
	<i>papGI</i>	Alelo I de la adhesina de pili tipo P	PapGI-F: CAACCTGCTCTCAATCTTTACTG	692 pb (Tiba <i>et al.</i> , 2008)
			PapGI-R: CATGGCTGGTTGTTCTAAACAT	
	<i>papGII</i>	Alelo II de la adhesina de pili tipo P	PapGII-F: GGAATGTGGTGATTACTCAAAGG	562 pb (Tiba <i>et al.</i> , 2008)
			PapGII-R: TCCAGAGACTGTTCAAGAAGGAC	
	<i>papGIII</i>	Alelo III de la adhesina de pili tipo P	PapGIII-F: CATGGCTGGTTGTTCTAAACAT	421 pb (Tiba <i>et al.</i> , 2008)
			PapGIII-R: TCCAGAGACTGTGCAGAAGGAC	
	<i>papF</i>	Subunidad menor de pili tipo P	F-papF: GTTTTCTGTACCGCTCTCCG	500 pb (Luna-Pineda <i>et al.</i> , 2018)
			R-papF: CATGCTCATACTGGCCGTG	
<i>papC</i>	Usher de pili tipo P	papC-forward: GACGGCTGTACTGCAGGGTGTGGCG	350 pb (Blanco <i>et al.</i> , 1997)	
		papC-reverse: ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA		
<i>afaFM 955459</i>	Adhesina resistente a manosa específica de ST131	Afa-O25F: GAGTCACGGCAGTCGCGGCGG	207 pb (Blanco <i>et al.</i> , 2009)	
		Afa-O25R: TTCACCGGCGACCAGCCATCTCC		
<i>tosA</i>	Proteína RTX. Adhesina afimbrial	TosA-F: GCACAGCATAACGGGAAAAT	589 pb (Ochoa <i>et al.</i> , 2016)	
		TosA-R: CCAGCATGTTACCACGAATG		
<i>csgA</i>	Curlina, subunidad principal del curli	CsgA-F: GGCGGATCCATGGACATGAACTTTTA AAAGTAGCAGC	185 pb (Ochoa <i>et al.</i> , 2016)	
		CsgA-R: GCGAGCTCTTAGTACTGATGAGCGGT CG		
<i>motA</i>		F:		

		Subunidad A del motor flagelar	GCGGATTTTTACCGCACGC R: GGATCTGCTGGCTCTGC	632 pb (Luna-Pineda <i>et al.</i> , 2018)	
	<i>motB</i>	Subunidad B del motor flagelar	F: CCTCGGTTCCGGCTGATGG R: GCAGCACATGGATCGTGG	864 pb (Luna-Pineda <i>et al.</i> , 2018)	
	<i>fliC</i>	Flagelina	F: CCAGTCTGCGCTGTGCGAG R: CACGTTACGCCGTTGAAC	349 pb (Luna-Pineda <i>et al.</i> , 2018)	
	<i>sfaS</i>	Adhesina de fimbria S/F1C	SfaSf: GTGGATACGACGATTACTGTG SfaSr: CCGCCAGCATTCCCTGTATTG	240 pb (Johnson & Stell, 2000)	
	<i>afa/draBC</i>	Subunidades chaperona y proteína de anclaje de las adhesinas Afa/Dr	Afaf: GGCAGAGGGCCGGCAACAGGC Afar: CCCGTAACGCGCCAGCATCTC	559 pb (Johnson & Stell, 2000)	
	<i>yfcV</i>	Proteína fimbrial	yfcV-forward: ACATGGAGACCACGTTACC yfcV-reverse: GTAATCTGGAATGTGGTCAGG	292 pb (Spurbeck <i>et al.</i> , 2012)	
	<i>uclA</i>	Subunidad principal de fimbria Ucl.	uclA-F: CGCTCATTTTCAGGGTAAAGCA uclA-R: CCAGAAGAAAACAGGGCAGTA	817 (Este trabajo)	
	<i>uclD</i>	Adhesina de fimbria Ucl.	uclD-F: TCTCAGCTCGTTCCTGTTCTG uclD-R: GGAACACCGGCAATCAGCAAA	1226 (Este trabajo)	
	Toxinas	<i>sat</i>	Toxina autotransportadora secretada	SAT-F: ACTGGCGGACTCATGCTGT SAT-R: AACCTGTGAAGAAGACTGAGC	387 pb (Johnson <i>et al.</i> , 2003)
		<i>satA</i>	Toxina autotransportadora secretada	Sat-F: GTTGTCTCTGGCTGTTGC Sat-R: AATGATGTTCCCTCCAGAGC	501 pb (Ananias & Yano, 2008)
<i>hlyA</i>		Hemolisina A	HlyA-F: CGTGGACACAGCTGCCAGCA HlyA-R: TGCAGCGTGGCGGGCATCAT	789 pb (Tiba <i>et al.</i> , 2008)	
<i>cnf1</i>		Factor necrotizante citotóxico	Cnf1-F: GAACTTATTAAGGATAGT Cnf1-R:	543 pb (Tiba <i>et al.</i> , 2008)	

			CATTATTTATAACGCTG	
	<i>vat</i>	Toxina autotransportadora vacuolizante	Vat-forward: TCAGGACACGTTTCAGGCATTTCAGT Vat-reverse: GGCCAGAACATTTGCTCCCTTGTT	1100 pb (Vigil <i>et al.</i> , 2011)
Invasina	<i>ibeA</i>	Proteína de invasión del endotelio cerebral	ibe10 f: AGGCAGGTGTGCGCCGCGTAC	170 pb (Johnson & Stell, 2000)
			ibe10 r: TGGTGCTCCGGCAAACCATGC	
Captación de hierro	<i>iroN</i>	Receptor del sideróforo salmoquelina/catecolato	Ironec-f: AAGTCAAAGCAGGGGTTGCCCG	668 pb (Johnson <i>et al.</i> , 2000)
			Ironec-r: GACGCCGACATTAAGACGCAG	
	<i>fyuA</i>	Receptor de yersiniobactina.	F: GTAACAATCTTCCCGCTCGGCAT	850 pb (Vigil <i>et al.</i> , 2011)
			R: TGACGATTAACGAACCGGAAGGGA	
<i>iucD</i>	Síntesis de aerobactina.	A: TACCGGATTGTCATATGCAGACCGT	602 pb (Yamamoto <i>et al.</i> , 1995)	
		B: AATATCTTCTCCAGTCCGGAGAAG		
<i>tonB</i>	Transportador de hierro de membrana externa.	F: GCATTGAAGGGCAGGTAAAGTT	173 pb (Rahmani <i>et al.</i> , 2020)	
		R: GGATATTCACCACAATCCCACTG		
Evasión de las defensas	<i>iss</i>	Proteína de supervivencia sérica.	is-f: CAGCAACCCGAACCACTTGATG	325 pb (Rodriguez-Siek <i>et al.</i> , 2005)
			is-r: AGCATTGCCAGAGCGGCAGAA	
	<i>kpsMII-K2</i>	Transporte de ácido polisialico. Cápsula tipo 2, serogrupo K2.	KpsII f: GCGCATTTGCTGATACTGTTG KpsII-K2r: AGGTAGTTCAGACTCACACCT	578 pb (Johnson & O'Bryan, 2004)
<i>kpsMTII</i>	Dímero exportador del polímero capsular.	KpsMIIf: GCGCATTTGCTGATACTGTTG KpsMIIr: CATCCAGACGATAAGCATGAGCA	272 pb (Johnson & Stell, 2000)	
Misceláneos	<i>malX</i>	Marcador de PAI UPEC. Sistema PTS.	RPAi f: GGACATCCTGTTACAGCGCGCA	925 pb (Johnson & Stell, 2000)
			RPAi r: TCGCCACCAATCACAGCCGAAC	
<i>agn43</i>	Antígeno 43	agn43-F: CTGGAAACCGGTCTGCCCTT	433 (Restieri <i>et al.</i> , 2007)	
		agn43-R: CCTGAACGCCAGGGTGATA		

Se realizó la búsqueda de 58 genes de virulencia distintos en los genomas de estudio. En los genes que presentaron problemas tales como genomas sin anotar o

el alineamiento de solo uno de los dos oligonucleótidos, se identificaron las características del gen o la región sin alinear por 2 métodos. El primero consistió en copiar la secuencia del gen o región de interés y corroborar que se encontrara en dirección 5´- 3´ o que iniciara con ATG o el codón de inicio reportado, si no se encontraba de esta manera se utilizó la herramienta Sequence Utilities (Disponible en: http://molbiol.ru/eng/scripts/01_12.html) con la opción “display complementary sequence in 5´→ 3´direction” y se procedió a realizar un alineamiento con una secuencia del gen de interés previamente identificada en Clustal Omega localizando la similitud en la opción “Matriz de identidad porcentual”.

Si en el genoma no estaba anotado el gen en cuestión, se ubicó el segmento de interés con los oligonucleótidos, se copió la secuencia en dirección 5´- 3´ (ATG), posteriormente se tradujo con la herramienta “traslate” de la plataforma Expasy (Disponible en: <https://web.expasy.org/translate/>) y se llevó a cabo un alineamiento usando BLASTp (Disponible en: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) lo que permitió identificar la proteína codificante.

6.2.9. Identificación de genes asociados con el patotipo UPEC

La asignación de un probable patotipo UPEC se realizó de acuerdo con el esquema desarrollado por Spurbeck y cols (2012), basado en la presencia de ≥3 genes asociados a cepas uropatógenas (*vat*, *fyuA*, *chuA* y *yfcV*). Se utilizó el programa SnapGene Viewer 5.2.4 para realizar la identificación de oligonucleótidos *in silico* y localizar los amplicones correspondientes a los genes.

Tabla 15. Oligonucleótidos utilizados para amplificar genes altamente asociados a UPEC.

Gen	Producto	Secuencia	Tamaño
<i>vat</i>	Toxina autotransportadora vacuolizante.	F: TCAGGACACGTTTCAGGCATTTCAGT	1100 pb (Vigil <i>et al.</i> , 2011)
		R: GGCCAGAACATTTGCTCCCTTGTT	
<i>fyuA</i>	Receptor de yersiniobactina.	F: GTAAACAATCTTCCCGCTCGGCAT	850 pb (Vigil <i>et al.</i> , 2011)
		R: TGACGATTAACGAACCGGAAGGGA	
<i>chuA</i>	Receptor del grupo hemo.	F: CTGAAACCATGACCGTTACG	652 pb (Spurbeck <i>et al.</i> , 2012)
		R: TTGTAGTAACGCACTAAACC	
<i>yfcV</i>	Proteína fimbrial putativa.	F: ACATGGAGACCACGTTCCACC	292 pb (Spurbeck <i>et al.</i> , 2012)
		R: GTAATCTGGAATGTGGTCAGG	

6.2.10. Identificación de virotipo

Se utilizó el esquema de Blanco *et al.*, (Blanco *et al.*, 2013) el cual asigna un virotipo de acuerdo con la presencia o ausencia de 4 genes (*afaFM955459*, *iroN*, *ibeA* y *sat*) en cepas ST131. Inicialmente fueron propuestos 4 virotipos (A, B, C y D), pero en 2019, Martínez-Gorgonio (Martínez-Gorgonio, 2019) determinó el virotipo E (**tabla 15**), en aislados UPEC de población mexicana. Para la determinación de virotipos se utilizó SnapGene Viewer 5.2.4 para realizar PCR *in silico* usando los oligonucleótidos de la **tabla 16**.

Tabla 16. Esquema de virotipificación desarrollado por Blanco *et al.*, (2013).

Viotipo	<i>afaFM955459</i>	<i>iroN</i>	<i>ibeA</i>	<i>sat</i>
A	+	-	-	+/-
B	-	+	-	+/-
C	-	-	-	+
D	-	+/-	+	+/-
E	+	+	-	+

Este esquema identifica 5 virotipos basados en la presencia/ausencia de 4 genes. El virotipo E (amarillo) fue propuesto posteriormente por Martínez-Gorgonio (2019).

Tabla 17. Genes utilizados para asignar virotipo a las cepas de estudio.

Gen	Producto	Secuencia	Tamaño
<i>afaFM955459</i>	Adhesina específica de <i>afa/Dr</i> , de ST131.	AFA-O25F: GAGTCACGGCAGTCGCGGCGG	207 pb (Blanco <i>et al.</i> , 2009)
		AFA-O25R: TTCACCGGCGACCAGCCATCTCC	
<i>iroN</i>	Receptor catecolato/salmoquelina. de	IRON-F: AAGTCAAAGCAGGGGTTGCCCG	667 (Johnson <i>et al.</i> , 2000)
		IRON-R: GACGCCGACATTAAGACGCAG	
<i>ibeA</i>	Proteína de invasión endotelial.	IBEA 10F: AGGCAGGTGTGCGCCGCGTAC	170 (Johnson & Stell, 2000)
		IBEA 10R: TGGTGCTCCGGCAAACCATGC	
<i>sat</i>	Toxina autotransportadora secretada.	SAT-F: ACTGGCGGACTCATGCTGT	387 (Johnson <i>et al.</i> , 2003)
		SAT-R: AACCTGTAAGAAGACTGAGC	

6.2.11. Determinación de cepas con patotipo híbrido ExPEC-DEC

Se realizó la búsqueda de genes específicos para la identificación de los patotipos diarreogénicos mediante PCR *in silico* utilizando oligonucleótidos de diversos autores (**tabla 22**).

Tabla 18. Oligonucleótidos utilizados para la caracterización de cepas DEC.

Gen		Producto	Secuencia	Tamaño
EAEC	<i>aggR*</i>	Activador/ regulador transcripcional.	MP2-aggR-F ACGCAGAGTTGCCTGATAAAG	400 pb (Müller <i>et al.</i> , 2007)
			MP2-aggR-R AATACAGAATCGTCAGCATCAGC	
	<i>aatA*</i>	Proteína de membrana que ayuda en la traslocación de proteínas (sistema <i>aat</i> -PABCE).	CVD432-F: CTGGCGAAAGACTGTATCAT	630 pb (Panchalini <i>et al.</i> , 2012)
			CVD432-R: CAATGTATAGAAATCCGCTGTT	
	<i>aaiC</i>	Proteína criptica presente en GI portadora de T6SS.	AAIC-F: ATTGTCCTCAGGCATTTTAC	215 pb (Panchalini <i>et al.</i> , 2012)
			AAIC-R: ACGACACCCCTGATAAACAA	
EHEC	<i>hlyA</i>	Hemolisina	HEMOA727: GATGGGCTGGATGTTGTCTC	826 pb (LBME)
			HEMOA1553R: GCCTCTAAAAGCCCTCCATT	
	<i>stx1</i>	Toxina Shiga tipo 1	MP4-stx1A-F: CGATGTTACGGTTTGTACTGTGACAGC	244 pb (Müller <i>et al.</i> , 2007)
			MP4-stx1A-R: AATGCCACGCTTCCCAGAATTG	
	<i>stx2</i>	Toxina Shiga tipo 2	MP3-stx2A-F: GTTTTGACCATCTTCGTCTGATTATTGAG	324 pb (Müller <i>et al.</i> , 2007)
			MP3-stx2A-R: AGCGTAAGGCTTCTGCTGTGAC	
ETEC	<i>lt</i>	Toxina termolábil	LTb-1: TCTCTATGTGCATACGGAGC	322 pb (Tamanai-Shacoori <i>et al.</i> , 1994)
			LTL-2: CCATACTGATTGCCGCAAT	
	<i>st</i>	Toxina termoestable	ST-1: TTAATAGCACCCGGTACAAGCAGG	147 pb (Hornes <i>et al.</i> , 1991)

			ST-2: CTTGACTCTTCAAAGAGAAAATT AC	
EPEC	<i>escD</i>	Proteína de membrana en PAI LEE	29654f: CGCAACAATTTCCCCCTTTGGC	759 pb (LBME)
			USRLP1265: GCTTCATAGGGCGTGGGTTGCC ATCA	
	<i>bfpA*</i>	Subunidad estructural principal de BFP.	BFP-A-F: GGAAGTCAAATTCATGGGGG	367 pb (Panchalini <i>et al.</i> , 2012)
			BFP-A-R: GGAATCAGACGCAGACTGGT	
<i>bfpB</i>	Lipoproteína de membrana externa	MP3-bfpB-F: GACACCTCATTGCTGAAGTCG	910 pb (Müller <i>et al.</i> , 2007)	
		MP3-bfpB-R: CCAGAACACCTCCGTTATGC		
<i>eae</i>	Intimina	EAE-F: CCCGAATTCGGCACAAGCATAAG C	881 pb (Panchalini <i>et al.</i> , 2012)	
		EAE-R: CCCGGATCCGTCTCGCCAGTATT CG		
DAEC	<i>daaE</i>	Adhesina fimbrial (F1845)	daaE-F: GAACGTTGGTTAATGTGGGGTAA daaE-R: TATTCACCGGTCGGTTATCAGT	542 pb (Vidal <i>et al.</i> , 2005)
EIEC	<i>ipaH</i>	Regulador de invasina	ipaH-F: CTCGGCACGTTTTAATAGTCTGG	933 pb (Rúgeles <i>et al.</i> , 2010)
			ipaH-R: GTGGAGAGCTGAAGTTTCTCTGC	
<i>invE*</i>	Regulador intermediario de proteínas Ipa	de	MP2-invE-F: CGATAGATGGCGAGAAATTATAT CCCG	766 pb (Müller <i>et al.</i> , 2007)
			MP2-invE-R: CGATCAAGAATCCCTAACAGAAG AATCAC	

*Genes presentes en plásmido.

6.2.12. Análisis del operón fimbrial *ucl*

Se identificó la presencia del operón *uclABCD* en cepas prototipo de *E. coli*. Utilizando las bases de datos NCBI y UniProt, se seleccionaron cepas comensales,

DEC y ExPEC, incluyendo cepas UPEC. En cada una de las cepas prototipo se descargó el formato FASTA correspondiente (plásmido y cromosoma) e identificó el grupo filogenético (ClermonTyping), serotipo (SerotypeFinder 2.0) y ST (MLST 2.0). Se realizó una PCR *in silico* con el programa SnapGene Viewer 5.2.4, utilizando los oligonucleótidos desarrollados por Wurpel *et al.*, (Wurpel *et al.*, 2016) (**tabla 23**).

Tabla 19. Oligonucleótidos para identificar las subunidades que conforman el operón *ucl*.

Gen	Producto	Secuencia	Tamaño
<i>uclA- uclB</i>	Subunidades estructural y chaperona.	3377: AAGTTGTAGCTCAGACCTGC	1236 pb (Wurpel <i>et al.</i> , 2016)
		3378: CCAGAACAGATTCTCCTTGC	
<i>uclC</i>	Usher	3379: TAGTCATGGTAACCCTGTGC	1021 pb (Wurpel <i>et al.</i> , 2016)
		3380: TCCTGAAGCTGTGGTAAGAC	
<i>uclD</i>	Adhesina	3381: TATGTGCCTTCGCAGATAGC	966 pb (Wurpel <i>et al.</i> , 2016)
		3382: TCCAGGTGTAGTTGCATCAG	

En las cepas *ucl* positivas, se tomaron las secuencias de nucleótidos correspondientes a cada gen que conforma el operón, se realizó un alineamiento múltiple utilizando Clustal Omega para identificar el grado de homología y la presencia de alelos en las subunidades. Además, se esquematizó el contexto genómico del operón.

La presencia del operón *ucl* también se buscó en los genomas de estudio (n=58), analizando su distribución en los 3 subclones de estudio (*H30-Rx*, *H30-R* y *No H30*) y distribución geográfica. Se utilizó SnapGene Viewer 5.2.4 para identificar la presencia o ausencia de los genes *ucl*, posteriormente se determinó el grado de homología con un alineamiento múltiple y se esquematizó el contexto genético del operón.

6.2.13. Desarrollo de oligonucleótidos para la identificación de los genes *uclA* y *uclD*

Para continuar con la caracterización genotípica de los ceparios con que cuenta el LBME y con base en las revisiones bibliográficas que destacan la importancia de la fimbria Ucl, la carencia de reportes actuales sobre su prevalencia y la diversidad de secuencias de nucleótidos codificantes de las subunidades estructurales obtenidas de cepas prototipo y cepas clínicas O25:H4, se diseñaron oligonucleótidos que permitieran amplificar los genes *uclA* (subunidad estructural) y *uclD* (adhesina).

Estos oligonucleótidos, a diferencia de los diseñados por Wurpel *et al.*, comienzan y terminan aproximadamente 100 pb más allá de la longitud del gen, con la finalidad de obtener la secuencia completa para analizarla y conocer su homología respecto a las cepas prototipo y clínicas previamente reportadas en este trabajo.

Se utilizaron los programas SnapGene Viewer 5.2.4 para el análisis de la secuencia de nucleótidos, Sequence Utilities (Disponible en: http://molbiol.ru/eng/scripts/01_12.html) para obtener secuencias en dirección 5´-3´ y complementarias, Sequence massager para la obtención de la secuencia antiparalela complementaria 5´-3´ y OligoCalc (Disponible en: <http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>) para el análisis de los posibles oligonucleótidos. Finalmente se representó el segmento amplificado en el esquema del operón *ucl* de UTI89.

6.2.14. Búsqueda de determinantes de resistencia

Se evaluó la presencia de 67 genes asociados a la resistencia para 12 familias de antimicrobianos (**tabla 19**). La caracterización de estos genes se realizó utilizando la herramienta de análisis ResFinder 4.1 (Disponible en <https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>) que, al igual que otras herramientas de CGE, identifica segmentos de genes mediante alineamientos con secuencias almacenadas en su base de datos. Los parámetros para el análisis fueron *Escherichia coli* como especie de estudio, lectura de genomas ensamblados/ contig, mutaciones puntuales cromosómicas y genes adquiridos de resistencia antimicrobiana.

Tabla 20. Genes de resistencia identificados con ResFinder 4.1 en los genomas de estudio

Familia	Gen	Producto
Betalactámicos	<i>bla</i> _{CTX-M-3} , <i>bla</i> _{CTX-M-14} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{CTX-M-27} , <i>bla</i> _{CTX-M-32} , <i>bla</i> _{CTX-M-55}	Variantes de la enzima CTX-M (BLEE).
	<i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{OXA-9}	Variantes de la enzima OXA (BLEE).
	<i>bla</i> _{TEM-1A} , <i>bla</i> _{TEM-1B}	Variantes de la enzima TEM (BLEE).
	<i>bla</i> _{CMY-2} , <i>bla</i> _{CMY-6}	Variantes de la enzima CMY (AmpC).
	<i>bla</i> _{NDM-1}	Variante de la enzima NDM (MBL).
	<i>bla</i> _{KPC-2} , <i>bla</i> _{KPC-3}	Variantes de la enzima KPC (carbapenemasa).
	<i>bla</i> _{IMP-1}	Variante de la enzima IMP (MBL).
Quinolonas	<i>gyrA</i> , <i>gyrB</i>	Subunidad de ADN girasa.

	<i>parC, parE</i>	Subunidad de topoisomerasa IV.
	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	PMQR
Aminoglucósidos	<i>aac(6')-Ib-cr, aac(6')-Ib-Hangzhou, aac(3)-IIa, aac(3)-IId, aac(3)-IV</i>	Acetiltransferasas.
	<i>aadA1/ ant(3'')-Ia, aadA2, aadA5, aadB/ant(2'')-Ia</i>	Nucleotidiltransferasas.
	<i>aph(3')-Ia, aph(3')-VI, aph(4)-Ia, strA/aph(3'')-Ib, strB/aph(6)-Id</i>	Fosfotransferasas.
Sulfonamidas	<i>sul1, sul2, sul3</i>	Variantes del gen <i>sul</i> , mutante de <i>dhps</i> .
Diaminopirimidinas	<i>dfrA12, dfrA14, dfrA17, dfrB1, dfrB2</i>	Variantes del gen <i>dfr</i> , mutante de <i>dhfr</i> .
Tetraciclinas	<i>tet(A), tet(B)</i>	Genes de resistencia a la tetraciclina.
Fenicoles	<i>catB1, catB2, catB3</i>	Cloranfenicol acetiltransferasas.
	<i>cmlA1</i>	Exportador de cloranfenicol codificado por plásmido o Tn.
	<i>cml</i>	Gen de resistencia al cloranfenicol.
	<i>floR</i>	Gen de resistencia al florfenicol.
Polimixinas	<i>mcr-1.1</i>	Gen móvil de resistencia a la colistina.
Macrólidos	<i>mph(A)</i>	Macrólido 2'-fosfotransferasa.
	<i>mph(B)</i>	Macrólido 2'-fosfotransferasa II.
Fosfonatos	<i>fosA3</i>	Glutación S-transferasa.
Rifamicina	<i>arr-2, arr-4</i>	ADP-ribosil transferasas

El análisis se complementó con la búsqueda de genes de resistencia a quinolonas mediada por plásmidos (PMQR), genes asociados con las bombas de eflujo QepA y OqxAB y a nitrofurantoína. Se realizó por PCR *in silico*, utilizando oligonucleótidos previamente diseñados y probados. La visualización se realizó con el programa SnapGene Viewer 5.2.4. **Tabla 20.**

Tabla 21. Oligonucleótidos para identificar genes de resistencia a quinolonas y nitrofuranos.

Familia	Gen	Producto	Secuencia	Tamaño
Quinolonas	<i>qnrA</i>	PMQR	qnrA-forward: TCAGCAAGAGGATTTCTCA	605 pb (Maynard <i>et al.</i> , 2004)
			qnrA-reverse: GGCAGCACTATTACTCCCA	
	<i>qnrB</i>	PMQR	qnrB-forward:	469 pb

			GATCGTGAAAGCCAGAAAGG qnrB-reverse: ACGATGCCTGGTAGTTGTCC	(Robicsek <i>et al.</i> , 2006)
	<i>qnrC</i>	PMQR	qnrC-forward GGGTTGTACATTTATTGAATC qnrC-reverse TCCACTTTACGAGGTTCT	447 pb (Wang <i>et al.</i> , 2001)
	<i>qnrD</i>	PMQR	qnrD-forward CGAGATCAATTTACGGGGAATA qnrD-reverse AACAAAGCTGAAGCGCCTG	582 pb (Cavaco <i>et al.</i> , 2009)
	<i>qnrS</i>	PMQR	qnrS-forward ACGACATTCGTCAACTGCAA qnrS-reverse TAAATTGGCACCCCTGTAGGC	417 pb (Robicsek <i>et al.</i> , 2006)
	<i>qepA</i>	Bomba de eflujo.	qepA-forward CTGCAGGTA CTGCGTCATG qepA-reverse CGTGTTGCTGGAGTTCTTC	403 pb (Cattoir <i>et al.</i> , 2008)
	<i>oqxA</i>	Bomba de eflujo.	OqxA-F: CTCGGCGCGATGATGCT OqxA-R: CCACTCTTCACGGGAGACGA	392 pb (Kim <i>et al.</i> , 2009)
	<i>oqxB</i>	Bomba de eflujo.	OqxB-F: TTCTCCCCGGCGGGAAGTAC OqxB-R: CTCGGCCATTTTGGCGCGTA	512 pb (Kim <i>et al.</i> , 2009)
	Nitrofuranos	<i>nfsA*</i>	Nitroreductasa	nfsA-F1: ATTTTCTCGGCCAGAAGTGC
nfsA-R1: AGAATTTCAACCAGGTGACC				
<i>nfsB*</i>		Nitroreductasa	nfsB-F1: CAACAGCAGCCTATGATGAC	923 pb (Sandegren <i>et al.</i> , 2008)
			nfsB-R1: CTTCGCGATCTGATCAACG	

En la evaluación de resistencia a nitrofurantoína, perteneciente a la familia de nitrofuranos se siguió el protocolo de Sandegren *et al.*, (Sandegren *et al.*, 2008), quienes diseñaron oligonucleótidos para la amplificación de los genes *nfsA* y *nfsB* (con una longitud de 100-150 pb río arriba y río abajo de la secuencia codificante). Se identificó el inicio del gen (ATG), posteriormente se tradujo con la herramienta “traslate” (Expasy), eligiendo el marco de lectura que abarcara toda la secuencia

para identificar la presencia de cambios aminoacídicos determinados por Mottaghizadeh *et al.*, (Mottaghizadeh *et al.*, 2020) (**tabla 20**). Las proteínas NfsA y NfsB del genoma de la cepa 2/0 se utilizaron como control negativo.

Tabla 22. Mutaciones en NfsA y NfsB asociadas con resistencia a nitrofurantoína.

Proteína (aa, kDa)	Mutación	Fenotipo
NfsA (tamaño)	H11Y	NIT-R
	S33N	NIT-R
	S38Y	NIT-R
	W212R	NIT-R
NfsB (tamaño)	P45S	NIT-R
	F84S	NIT-R

Tomado de Mottaghizadeh *et al.*

6.2.15. Identificación de mutaciones cromosomales en girasa y topoisomerasa IV

Se identificaron las mutaciones presentes en los genes de girasa y topoisomerasa de las que se conoce el fenotipo resultante de acuerdo con el esquema de Hopkins *et al.*, (Hopkins *et al.*, 2005) utilizando los resultados obtenidos con la plataforma ResFinder 4.1.

6.2.16. Búsqueda de variantes en genes *bla*_{CTX-M}, asociación con las secuencias de inserción IS 26 e IS *Ecp1* y determinación de grupo (1, 2, 8 y 9).

Se utilizaron los resultados obtenidos con el programa ResFinder 4.1 para la identificación de las variantes de *bla*_{CTX-M}. Los resultados se corroboraron por identificación del gen en el genoma utilizando SnapGene Viewer 5.2.4 con la localización arrojada por ResFinder 4.1. Asimismo, para identificar la presencia de IS adyacentes a los genes *bla*_{CTX-M} se usaron los oligonucleótidos diseñados por Lartigue *et al.*, (Lartigue *et al.*, 2004) para la localización de IS*Ecp1* y los diseñados por Curiao *et al.*, (Curiao *et al.*, 2011) para IS26 (**tabla 21**).

Tabla 23. Oligonucleótidos utilizados para la identificación de *bla_{CTX-M}*, sus 4 grupos principales y las IS26 e *ISEcp1*.

Gen	Producto	Secuencia	Tamaño
ISEcp1	Secuencia de inserción.	F: GCAGGTCTTTTTCTGCTCC	526 pb (Lartigue <i>et al.</i> , 2004)
		R: TTTCCGCAGCACACCGTTTGC	
IS26	Secuencia de inserción.	F: AGCGGTAAATCGTGGAGTGA	134 pb (Curiao <i>et al.</i> , 2011)
		R: AGGCCGGCATTTCAGCGTG	

Las variantes de *bla_{CTX-M}* se asignaron a un grupo con base en los resultados reportados por Cantón *et al.*, 2012; D'Andrea *et al.*, 2013; Mamani, 2015 (**tabla 3**).

6.2.17. Identificación y caracterización de plásmidos en los genomas de estudio

Durante la caracterización de los genomas de estudio se identificó el número de plásmidos cerrados por cepa, posteriormente se realizó una búsqueda en NCBI y en los artículos de referencia para conocer las características (tamaño, %GC) y los números de acceso de cada uno, así como la descarga de la secuencia de nucleótidos en formato FASTA para análisis posteriores.

La caracterización de plásmidos se realizó utilizando esquemas de tipificación basados en replicones de diversos grupos Inc, en la asignación de alelos para los replicones del grupo IncF, así como las variantes de las relaxasas MOB.

6.2.17.1. Identificación de replicones

La caracterización de plásmidos en base a sus replicones se realizó utilizando la herramienta PlasmidFinder 2.1 (Disponible en: <https://cge.cbs.dtu.dk/services/PlasmidFinder/>) la cual realiza BLASTn para identificar homologías entre la base de datos del programa y las secuencias de interés. Los parámetros de análisis utilizados fueron la base de datos para *Enterobacteriaceae*, umbral de identidad de 95%, cobertura mínima de 60% y una lectura de genoma ensamblado/contig.

6.2.17.2. Asignación de secuencia tipo (pMLST)

La determinación de secuencia tipo se realizó sólo a los replicones de IncF, con la finalidad de determinar los alelos más frecuentes en el cepario de estudio. Se utilizó pMLST 2.0 (Disponible en: <https://cge.cbs.dtu.dk/services/pMLST/>). Las características de análisis fueron configuración pMLST IncF RST y una lectura de genoma ensamblado/contig.

6.2.17.3. Búsqueda de relaxasas MOB y *traT* en plásmidos

Se identificó la capacidad de movilidad plasmídica identificando el gen *traT* utilizando oligonucleótidos diseñados por el LBME. Mediante el uso de los cebadores degenerados diseñados por Alvarado *et al.*, (Alvarado *et al.*, 2012) identificamos relaxasas MOB asociadas a plásmidos que portan determinantes de resistencia hacia antibióticos de las familias MOB_F (MOB_{F11}, MOB_{F12}) y MOB_Q (MOB_{Q11}, MOB_{Q12} y MOB_{Qu}).

Tabla 24. Oligonucleótidos utilizados para la identificación del gen *traT* y las relaxasas MOB.

Gen	Función	Secuencia	Tamaño
<i>traT</i>	OMP que confiere resistencia al suero. Parte de operón asociado a la conjugación.	traT. F: TGATGATGGTTGCACTGGTCA	739 pb LBME
		traT. R: TCAGATCAGCCTCCTGACGA	
MOB _{F11}	Subfamilia de MOB _F . Relaxasa de plásmidos IncW e IncN.	F11-f: GCAGCGTATTACTTCTCTGCTGCCGAY GAYTAYTA	234 pb (Alvarado <i>et al.</i> , 2012)
		F1-r: ACTTTTGGGCGCGGARAABTGSAGRTC	
MOB _{F12}	Subfamilia de MOB _F . Relaxasa de plásmidos IncF.	F12-f: AGCGACGGCAATTATTACACCGACAAG GAYAAYTAYTA	234 pb (Alvarado <i>et al.</i> , 2012)
		F1-r: ACTTTTGGGCGCGGARAABTGSAGRTC	
MOB _{Q11}	Subfamilia del clado MOB _Q . Relaxasa de plásmidos IncQ1	Q11-f: CAATCGTCCAAGGCGAARGCNGAYTA	331 pb (Alvarado <i>et al.</i> , 2012)
		Q11-r: CGCTCGGAGATCATCAYYTGYCAYTG	

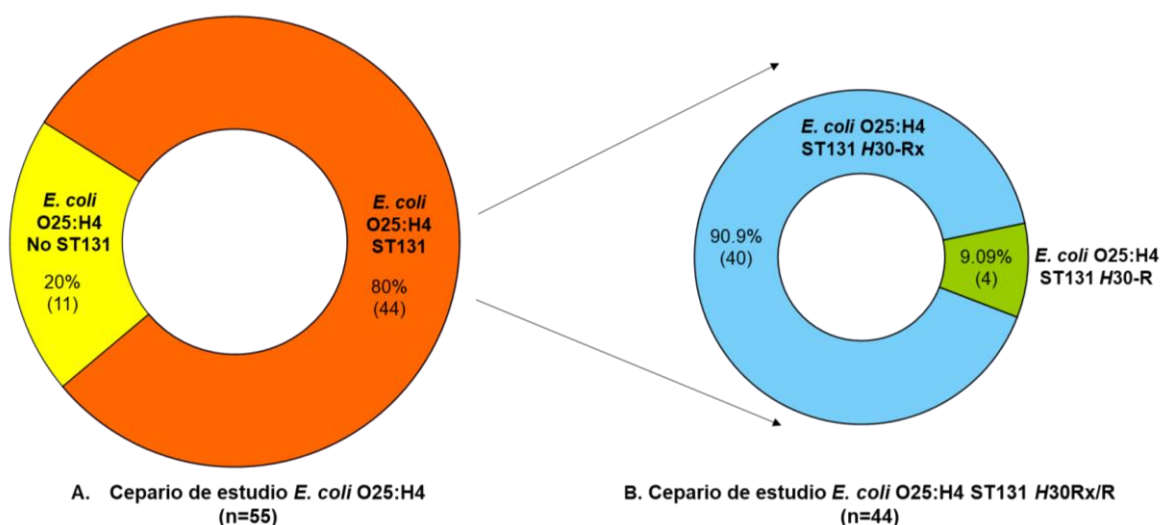
MOB_{Q12}	Subfamilia del clado MOB _Q	Q12-f: CTGGAATATACTGAACACGGNAAYATGCC	341 pb (Alvarado <i>et al.</i> , 2012)
		Q12-r: ATCCTTGGTGTTAGCACGTTTRAARWAYTG	
MOB_{Qu}	Subfamilia del clado MOB _{Qu}	Qu-f: AGCGCCGTGCTGTCCGCBGCNTAYCG	179 pb (Alvarado <i>et al.</i> , 2012)
		Qu-r: CTCCGCAGCCTCGRCSGCRTTCCA	

7. RESULTADOS

7.1. Sección de análisis experimental

7.1.1. Material biológico

El cepario de estudio consistió en 55 cepas UPEC serotipo O25:H4, 44 cepas pertenecen a ST131 (80%) y de estas, 40 cepas son *H30-Rx* (90.9%) y 4 *H30-R* (9.09%) (**Gráfica 1**).



Gráfica 1. Cepario de *E. coli* O25:H4 de estudio. (A) El cepario lo constituyen 55 cepas O25:H4, 44 pertenecientes al complejo ST131 (naranja) y 11 son no ST131 (amarillo). (B) Las ST131 pertenecen a los subclones *H30-R* (n=4) (verde) y *H30-Rx* (n=40) (azul) (Zarzoza-Mendoza, 2016; Martínez-Gorgonio, 2019).

7.1.2. Extracción de ADN plasmídico

Con el objeto de conocer la cantidad de cepas que poseen plásmidos, se realizó extracción plasmídica por el método de lisis alcalina a 47 cepas O25:H4. Las muestras de DNA plasmídico se sometieron a una electroforesis de agarosa al 0.7% (**figura 6**). La **gráfica 2** y **anexo 1** muestran la presencia de bandas plasmídicas en 35 cepas (74.47%), donde el tamaño aproximado de las bandas plasmídicas visualizadas osciló entre <0.5 a >3.5 kb, principalmente 3-3.5 kb (25%).

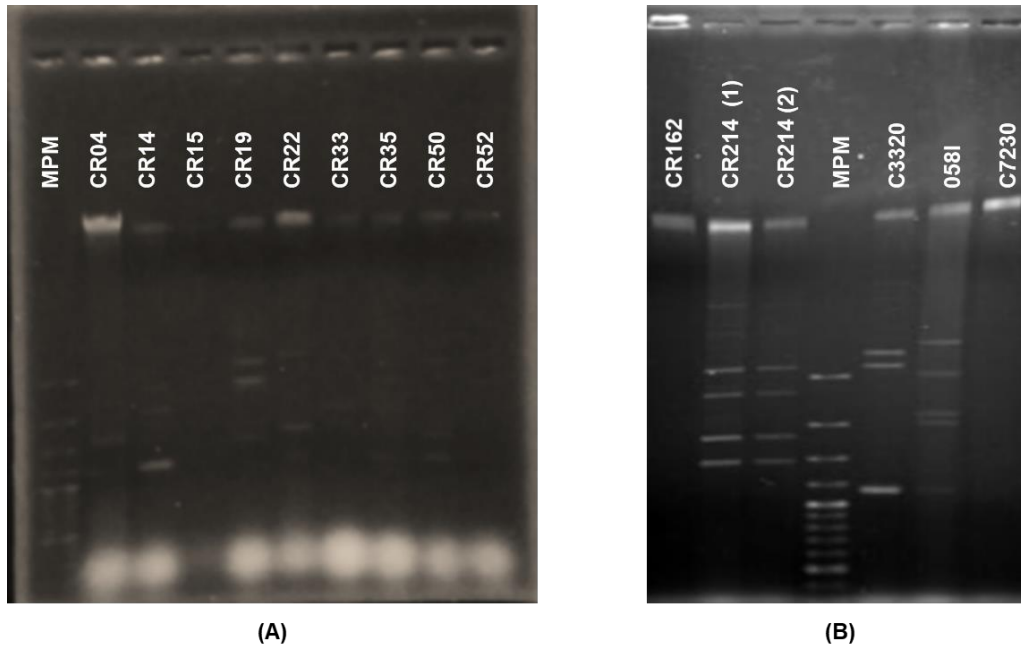
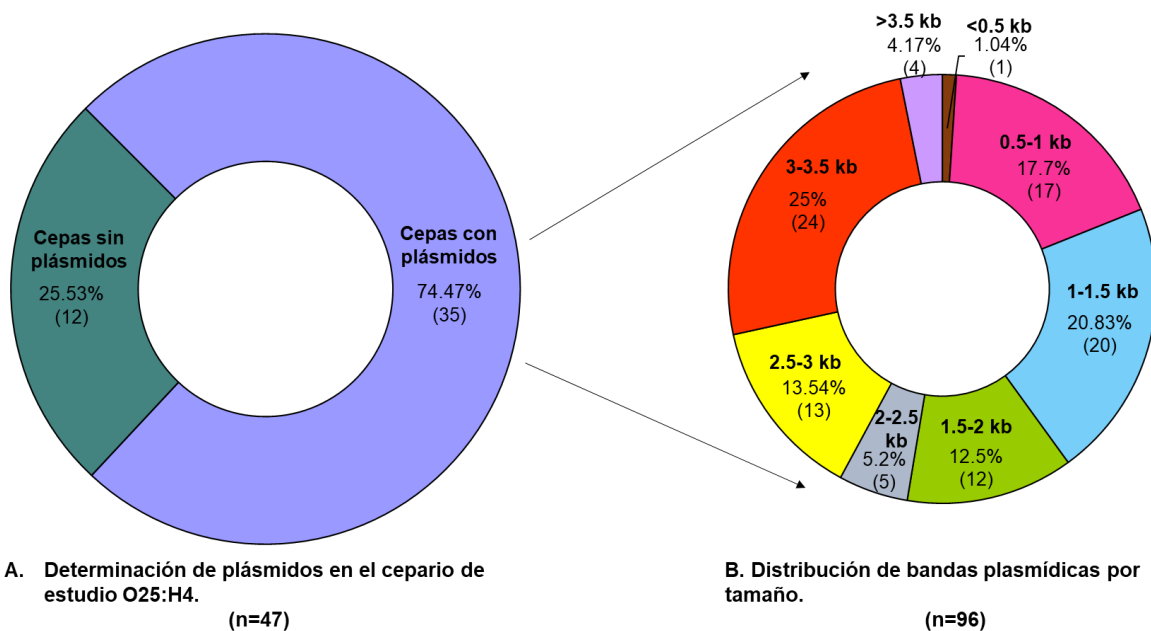


Figura 6. Determinación de perfil plasmídico. Geles de agarosa (0.7%) representativos de la electroforesis de extracciones plasmídicas. (A) Gel observado en un equipo transiluminador UV. Se observan las bandas plasmídicas y el marcador de peso molecular (MPM) de 100 pb en el primer carril. (B) Gel observado en un equipo fotodocumentador MiniBIS Pro. El cuarto carril corresponde a un MPM de 100 pb. El número de cada muestra es indicado para cada carril.



A. Determinación de plásmidos en el cepario de estudio O25:H4.

(n=47)

B. Distribución de bandas plasmídicas por tamaño.

(n=96)

Gráfica 2. Caracterización de bandas plasmídicas en el cepario de estudio. (A) Representación de las cepas portadoras y no portadoras de bandas plasmídicas. En azul 35 cepas (74.47%) albergaron aproximadamente de 1-6 bandas, dando un total de 96. (B). Distribución del tamaño de bandas plasmídicas. En colores se muestra los diferentes tamaños aproximados de bandas plasmídicas usando como referencia un MPM de 100 pb.

7.1.3. Amplificación de genes *bla*_{CTX-M} por PCR

Para determinar la presencia del gen *bla*_{CTX-M} en las cepas de trabajo, se realizó una PCR, utilizando como templado las extracciones plasmídicas previamente obtenidas. Se obtuvieron 21 (45%) cepas portadoras. La **figura 7** muestra el resultado de electroforesis en gel de agarosa representativo de los fragmentos amplificados obtenidos por PCR y en la **gráfica 3**, se observa el porcentaje de cepas portadoras y no portadoras de *bla*_{CTX-M}.

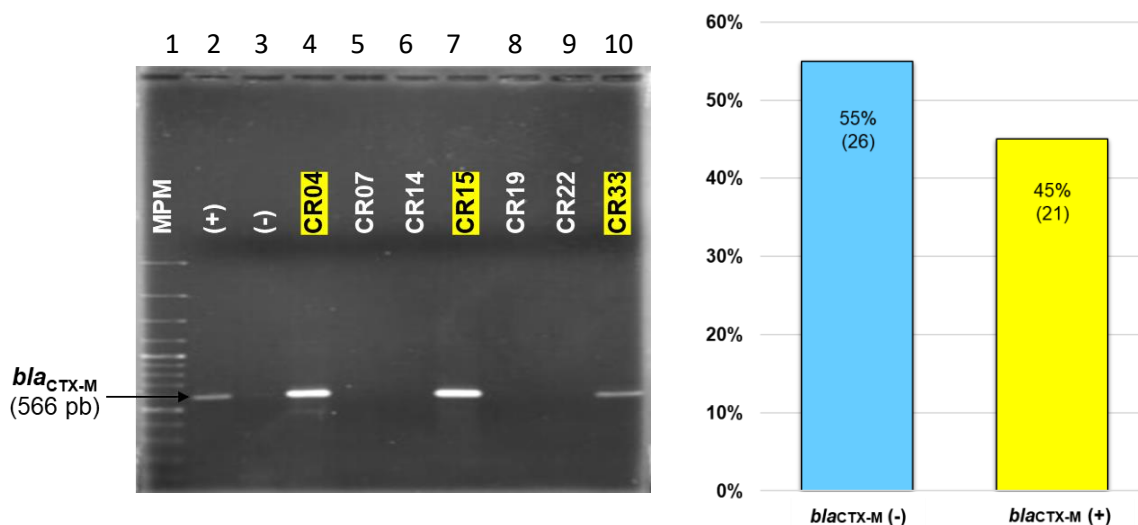


Figura 7. Determinación del gen *bla*_{CTX-M}. Electroforesis en gel de agarosa al 1% correspondiente a la detección de un amplicón de 566 pb correspondiente al gen *bla*_{CTX-M}. Carril 1. MPM. Carril 2. cepa C7230, utilizada como control positivo (+), Carril 3. control negativo. En amarillo cepas positivas a *bla*_{CTX-M}.

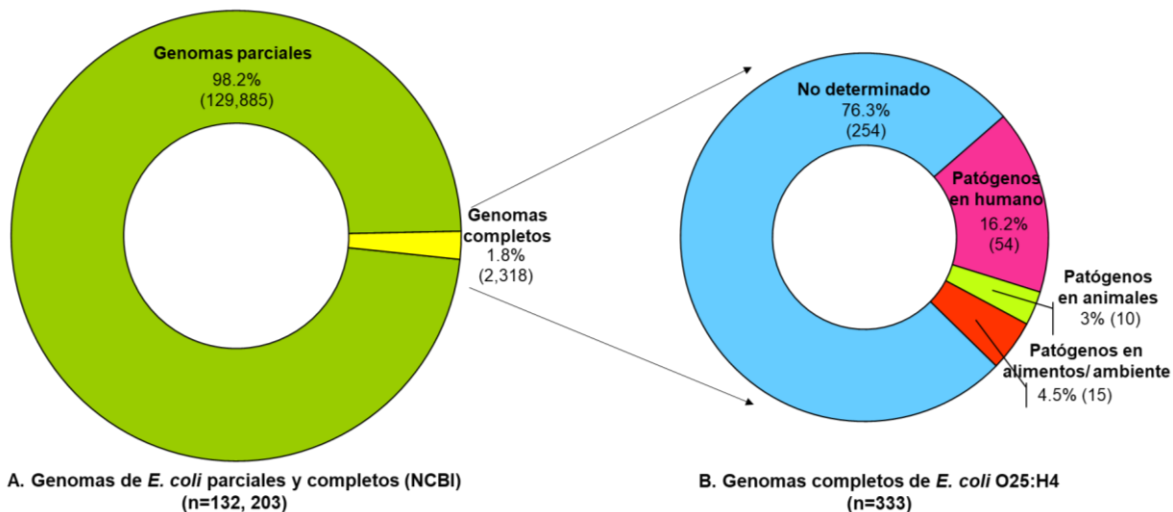
Gráfica 3. Porcentaje de cepas portadoras (amarillo) y no portadoras (azul) de *bla*_{CTX-M}.

7.2. Sección de análisis bioinformático

7.2.1. Búsqueda de genomas secuenciados O25:H4

Se realizó una búsqueda de genomas de *E. coli* en la base de datos de NCBI, encontrando 132,203 secuencias de genomas parciales y completos, con fecha de corte al 9 de abril del 2021. Posteriormente, utilizando los filtros de búsqueda, se identificaron 2,318 genomas completos de *E. coli* y de estos, 333 (14.37%) correspondían a secuencias del serotipo O25:H4. Se aplicó un filtro para obtener solo los aislados patógenos humanos, obteniendo 54 secuencias. Se encontró que

254 cepas no se encontraban clasificadas por su fuente de aislamiento y se procedió a realizar una revisión manual a las cepas sin origen determinado para incluirlas dentro de nuestro material de estudio (**gráfica 4**).



Gráfica 4. Genomas de *E. coli* en base de datos, selección de genomas del serotipo O25:H4 y su distribución por origen. Análisis de los genomas de *E. coli* disponibles en la base de datos NCBI (n= 132,203) y la posterior selección de aquellos genomas que pertenecen al serotipo O25:H4 divididos por su origen. Datos obtenidos a abril del 2021.

Utilizando la base de datos de NCBI, seleccionamos 32 cepas O25:H4 que cumplieran con los criterios de inclusión. Para complementar la selección de genomas, se realizó un BLASTn usando un fragmento específico del serogrupo O25 (alelo del gen *wzy*) diseñado por Li *et al.*, (Li *et al.*, 2010), aumentando los genomas de estudio a 58, con fecha de corte al 14 de abril del 2021.

7.2.2. Identificación de las características del cepario de estudio

Se seleccionaron 58 genomas completos (cromosoma y plásmido) y cerrados de cepas *E. coli* O25:H4 pertenecientes a 14 países de 4 continentes (**figura 8**).

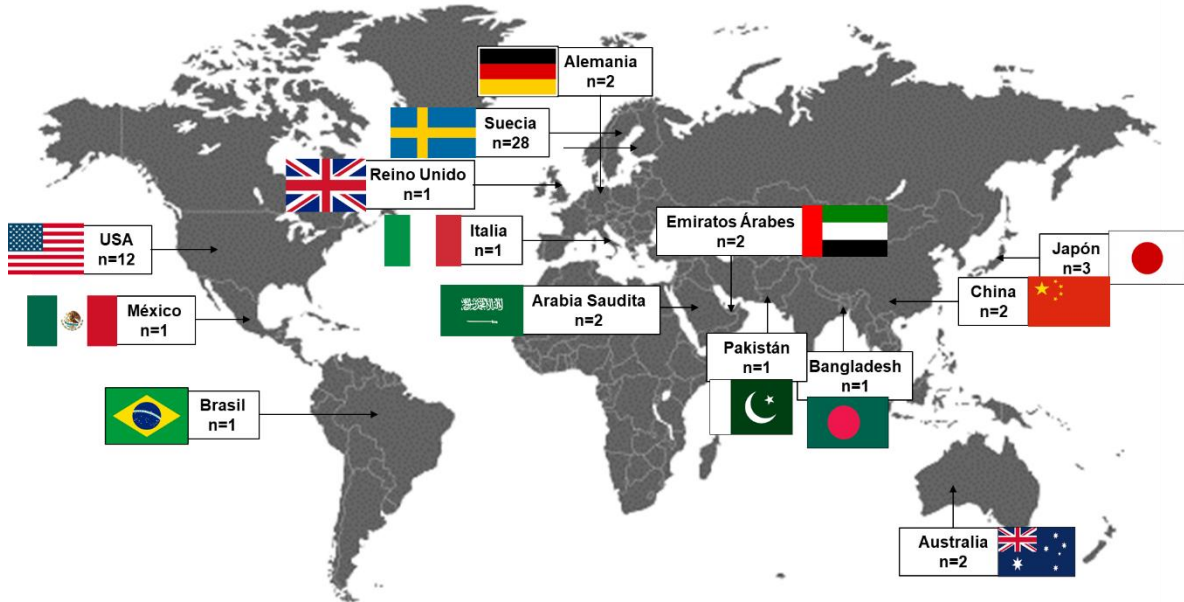
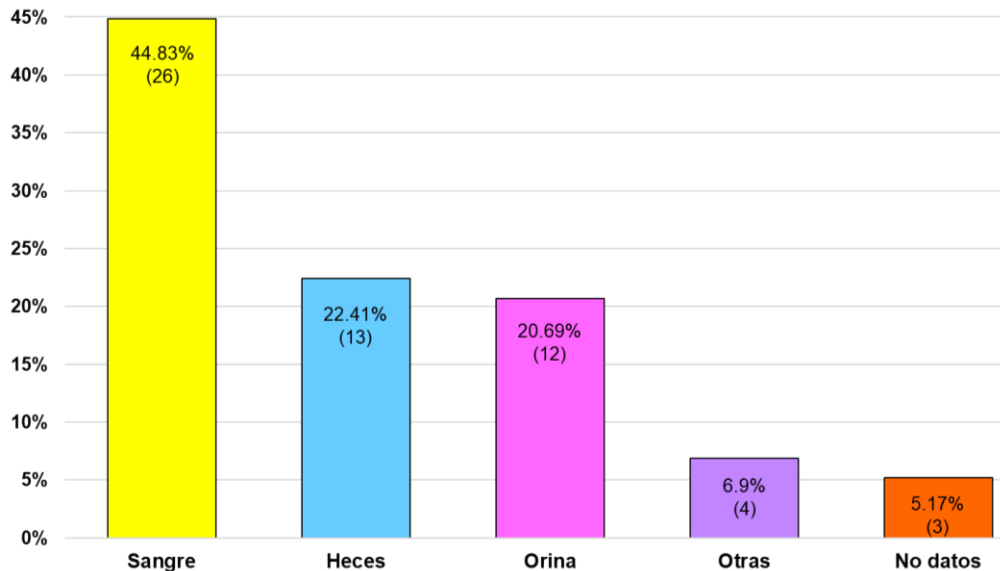


Figura 8. País de origen y número de genomas *E. coli* O25:H4 identificados en cada uno.

Las fuentes de aislamiento predominantes fueron sangre (44.83%), heces (22.41%) y orina (20.69%); sin embargo, también se identificaron cepas provenientes de otras fuentes (6.9%) como líquido peritoneal, esputo, hisopado vaginal y una cepa de un estudio de Astra Zeneca (gráfica 5).



Gráfica 5. Distribución de los genomas de estudio por su origen de aislamiento.

Se identificó el tamaño del genoma, número de genes, el porcentaje de guanina-citosina y la distribución de plásmidos en el cepario total (n=58) y en cada uno de los 3 principales grupos de aislamiento. Estas características fueron variables en cada grupo de aislados y se resumen en la tabla 25, donde se muestran los valores mínimos y máximos, así como el promedio. Se observa que los aislados de heces

presentan un tamaño de genoma, número de genes y %GC mayor que los genomas obtenidos de sangre y orina; sin embargo, los genomas obtenidos de orina mostraron el mayor número de plásmidos por cepa. El **anexo 2** presenta las características identificadas en los genomas de estudio.

Tabla 25. Características de tamaño, número de genes, %GC y número de plásmidos en genomas y grupos por aislamiento de los genomas *E. coli* O25:H4.

Grupo	Característica	Valor mínimo	Valor máximo	Promedio
Genomas totales (n=58)	Tamaño del genoma	4.83 Mb	7.57 Mb	5.27 Mb
	Número de genes	4,890	6,448	5,311
	% GC	50%	50.9%	50.74%
	Plásmidos	0	7	1.88
Aislados de sangre (n=26)	Tamaño del genoma	5.01 Mb	5.65 Mb	5.32 Mb
	Número de genes	5,092	5,763	5,429
	% GC	50.6%	50.9%	50.75%
	Plásmidos	0	6	1.42
Aislados de orina (n=13)	Tamaño del genoma	4.83 Mb	5.3 Mb	5.06 Mb
	Número de genes	4,890	5,498	5,189
	% GC	50%	50.8%	50.7%
	Plásmidos	0	6	2.5
Aislados de heces (n=12)	Tamaño del genoma	5.03 Mb	7.57 Mb	5.45 Mb
	Número de genes	4,977	6,448	5,481
	% GC	50.6%	50.9%	50.76%
	Plásmidos	0	5	1.54

7.2.3. Confirmación de serotipo

Para confirmar que las cepas pertenecieran al serotipo O25:H4, previamente identificado en la revisión del filtro de inclusión, se utilizó SerotypeFinder 2.0 (CGE). El programa reportó que las 58 cepas (100%) pertenecen al serotipo O25:H4. Como ejemplo la **figura 9** muestra el formato de reporte de resultados para la cepa B36 en la que se observa la presencia y ubicación en el genoma de los genes codificantes de flipasas del antígeno O *wzx* y *wxy*, utilizados en la determinación de este serogrupo y el gen *fliC*, codificante de una subunidad flagelar que permite identificar la variante de antígeno H.

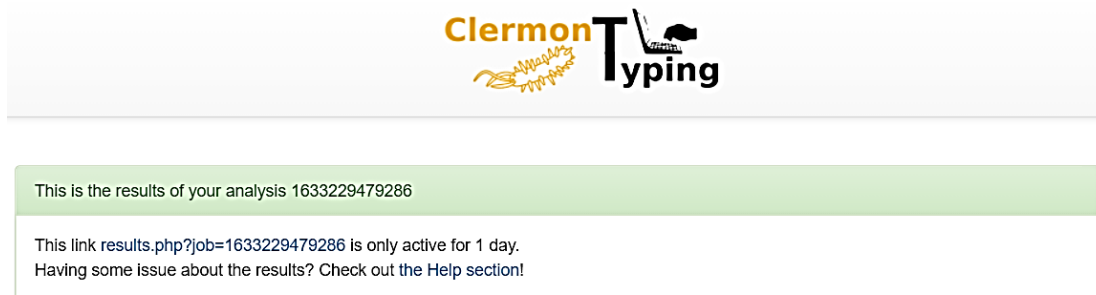
Database for H type genes						
Gene	Serotype	Identity	Template / HSP length	Contig	Position in contig	Accession number
fliC	H4	100	1050 / 1050	LR130545.1 Escherichia coli strain B36 genome assembly, chromosome: 1	2801190..2802239	AJ605764

Database for O type genes						
Gene	Serotype	Identity	Template / HSP length	Contig	Position in contig	Accession number
wzx	O25	96.03	1260 / 1260	LR130545.1 Escherichia coli strain B36 genome assembly, chromosome: 1	3012374..3013633	GU014554
wzy	O25	95.67	1063 / 1062	LR130545.1 Escherichia coli strain B36 genome assembly, chromosome: 1	3009159..3010221	GU014554

Figura 9. Determinación de serotipo utilizando el programa SerotypeFinder 2.0. Se observa el gen utilizado para la asignación de serogrupo (O:H), el porcentaje de identidad de acuerdo con el resultado de un alineamiento entre la base de datos del programa y la secuencia de estudio, así como la longitud del segmento, el contig donde se ubica y la posición dentro de este y finalmente el número de acceso. El genoma de la cepa B36 presenta los genes *wzx* y *wzy* en posiciones cercanas entre ellos.

7.2.4. Identificación de filogrupo

Para conocer el grupo filogenético se utilizó el programa ClermonTyping. Todas las cepas (100%) se agruparon en el filogrupo B2. Posteriormente se realizó la búsqueda del gen *ybgD* (asociado a cepas del filogrupo G) pero no se encontró para ninguna cepa. La **figura 10** muestra, como ejemplo, el reporte de resultados aportado por el programa para la cepa ESBL41.



ClermonTyping Report

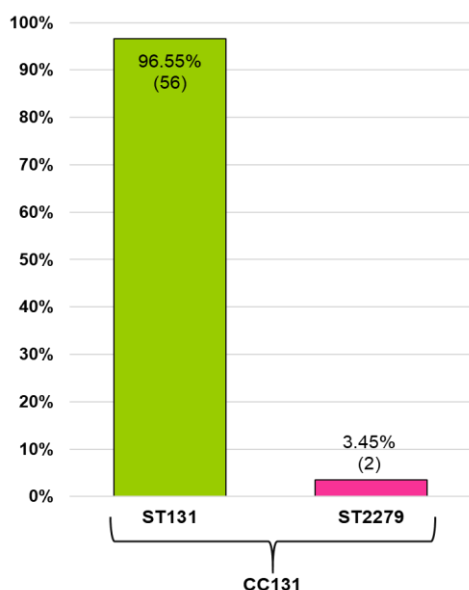
Date: Sun Oct 3 04:53:23 2021

file	quadruplex	supp	phylogroup	mash_group
ESBL41.fasta	- + + +	trpAgpC	B2	B2

Figura 10. Ejemplo del resultado obtenidos con el programa Clermon Typing para la asignación de filogrupo. La primera columna corresponde al nombre del archivo que se cargó, la segunda muestra el resultado de la presencia(+) /ausencia(-) de los genes *arpA*, *chuA*, *yjaA* y *TspE4.C2* en ese orden. La tercera columna indica variantes alélicas específicas, la cuarta el filogrupo asignado y la quinta la confirmación por Mash, un método de detección de filogrupo alternativo.

7.2.5. Identificación de secuencia tipo (ST)

Se identificó la secuencia tipo (ST), utilizando el programa MLST 2.0, con los parámetros correspondientes al esquema de Atchman, 56 cepas (96.55%) se agruparon en la secuencia tipo 131 (ST131) y 2 cepas (3.45%) en ST2279 (**anexo 2**), ambas pertenecientes al complejo clonal (CC) 131 (Umene *et al.*, 2015) (**gráfica 6**). La **tabla 26** muestra las variantes alélicas obtenidas con MLST 2.0 en una cepa representativa de cada ST identificado.



Gráfica 6. ST identificadas en los genomas O25:H4. Las dos ST reportadas pertenecen al CC131.

Locus	ESBL94	EcPF7
	ST131 (alelos)	ST2279 (alelos)
<i>adk</i>	adk_53	adk_53
<i>fumC</i>	fumC_40	fumC_40
<i>gyrB</i>	gyrB_47	gyrB_47
<i>icd</i>	icd_13	icd_13
<i>mdh</i>	mdh_36	mdh_36
<i>purA</i>	purA_28	purA_8
<i>recA</i>	recA_29	recA_29

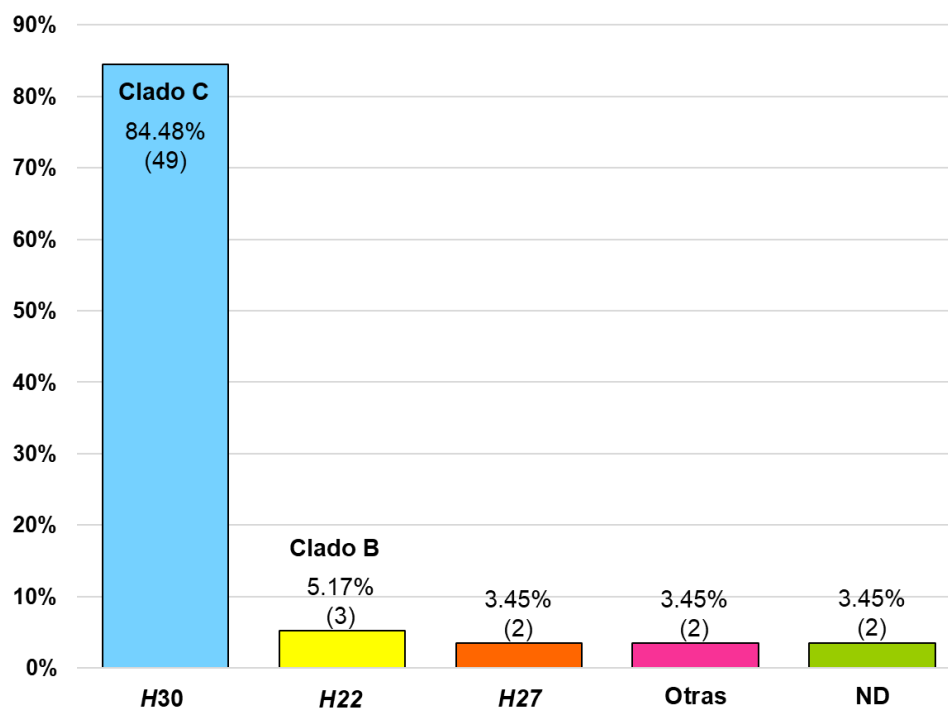
Tabla 26. Variantes alélicas de 7 genes de mantenimiento utilizados para realizar MLST (Atchman). Se tomaron los resultados de la cepa ESBL94 (ST131) y EcPF7 (ST2279). Ambos ST pertenecen al CC131, con solo un cambio de alelo en *purA* (amarillo).

Con los datos del segmento de análisis para el locus *purA* (478 pb) en los genomas ESBL94 y EcPF7, se realizó un alineamiento, observando que en el nucleótido 263, el alelo *purA_28* (ST131) presenta una T y el alelo *purA_8* (ST2279), una G.

7.2.6. Identificación de las variantes alélicas en el gen *fimH*

Se utilizó el programa FimTyper 1.0 para conocer las variantes alélicas de *fimH* en los genomas de estudio, siendo predominante H30 (84.48%) o clado C, seguido de H22 (5.17%) o clado B, de acuerdo a la clasificación de Petty *et al.*, (Petty *et al.*,

2014). También se identificaron los alelos *H27* (3.45%), alelos poco comunes como *H1196* (1.72%) y *H161* (1.72%). En 2 cepas no se identificó la presencia del gen *fimH* (3.45%). **Gráfica 7.**



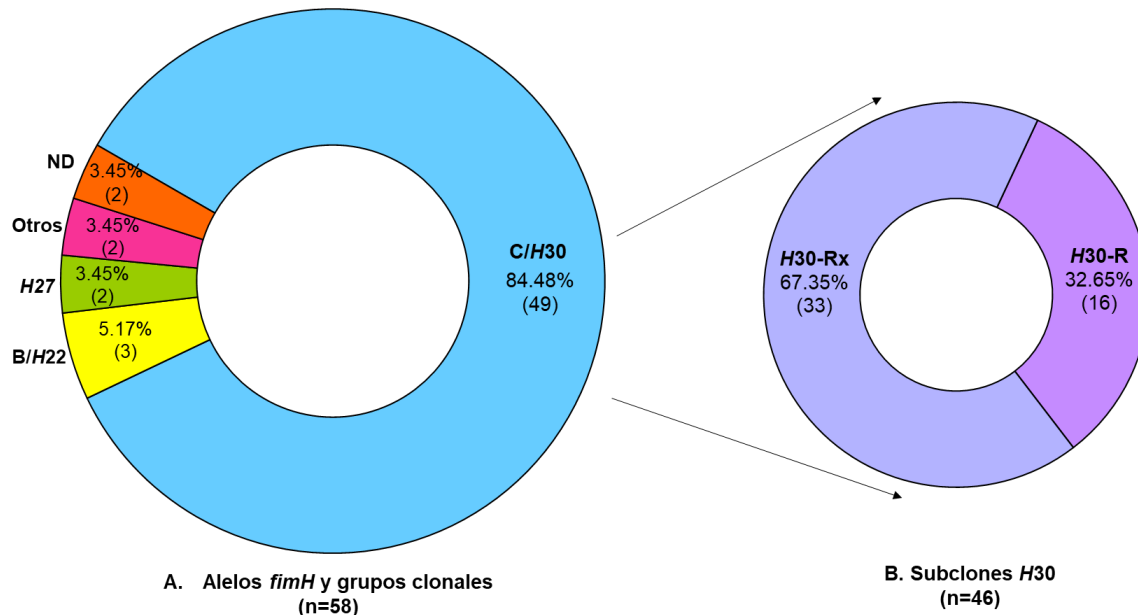
Gráfica 7. Variantes alélicas del gen *fimH* determinadas en los genomas de estudio mediante el programa FimTyper 1.0. En la columna “Otras” se encuentran *H1196* y *H161*.

Con el programa BLASTn, se hizo un alineamiento con las secuencias de los alelos *H1196* y *H161* para conocer hacia que variantes alélicas presentaban mayor similitud. *H161* difiere en un nucleótido con *H22* y *H1196* lo hace con *H30*.

7.2.7. Determinación de subclones

Se seleccionaron los genomas de las cepas con el alelo *fimH30* para identificar los subclones *H30-R* y *H30-Rx* mediante 2 PCR *in silico* de SNP específicos de cada subclón, 90C, 96T en *fimH30* (*H30-R*) y G723A en *ybbW* para *H30-Rx*.

Los 58 genomas se clasificaron en los grupos clonales C/*H30* (n=49), B/*H22* (n=3), las variantes *H27* (n=2) y 2 alelos poco frecuentes, *H161* y *H1196*. Dentro del grupo clonal C se anidaron los subclones *H30-R* (n=16) y *H30-Rx* (n=33). El conjunto de resultados se observa en la **gráfica 8.**



Gráfica 8. Grupos clonales y subclones en los genomas de estudio. (A) Los 58 genomas se ubicaron en los grupos C/H30 (azul), B/H22 (amarillo), así como las variantes H27 (verde) y derivados mutacionales de estas (rojo y naranja). (B) Dentro del grupo C se anidaron los subclones H30-R (morado) y H30-Rx (violeta).

El **anexo 3** presenta los genomas analizados, con los cuales se formaron 3 grupos de estudio, cepas H30-Rx, H30-R y no H30. A partir de aquí, los resultados se representarán globalmente como grupo ST131 (n=58) y los 3 subclones mencionados.

7.2.8. Búsqueda de determinantes de virulencia

Para caracterizar los genomas de estudio, se realizó la identificación de 58 genes de virulencia utilizando los programas VirulenceFinder 2.0 y SnapGene Viewer 5.2.4. Los resultados se reportaron agrupando los genes por su función en la adherencia (n=27), evasión del sistema inmune (n=9), invasinas (n=9), toxinas (n=9), adquisición de hierro (n=9) y misceláneos (n=4). La identificación se realizó en plásmido y cromosoma. Los **anexos 4** y **5** presentan mapas de la distribución de los genes de virulencia. El **anexo 13** incluye las **tablas 27-31** con los valores reportados en cada gen analizado y agrupados de acuerdo con su función.

Las **gráficas 9, 10 y 11** muestran los genes asociados con la adherencia y motilidad. Se observó que, aunque los genes *sfaS* y *tosA* se han asociado con cepas ExPEC y O25:H4, no se identificaron en los genomas analizados, al igual que *papGI*. *tsh* sólo se localizó en el plásmido de una cepa (1.72%). Los genes *motA*, *motB*, *fliC* y *yfcV* se identificaron en todos los genomas (100%), seguido de *fimH* y *csgA*

(96.55%), *iha* (91.38%), *papA_F43* (89.66%), *papC*, *papF* y *hra* (43.1%), *papGII* (41.38%), *uclA* y *uclD* (39.66%), *afaA*, *afaC*, *afaD* (20.69%), *nfaE* (15.52%), *afaFM955459* y *afa/draBC* (12.07%), *afaE* (6.9%), *afaB* (5.17%) y *papGIII* (1.72%).

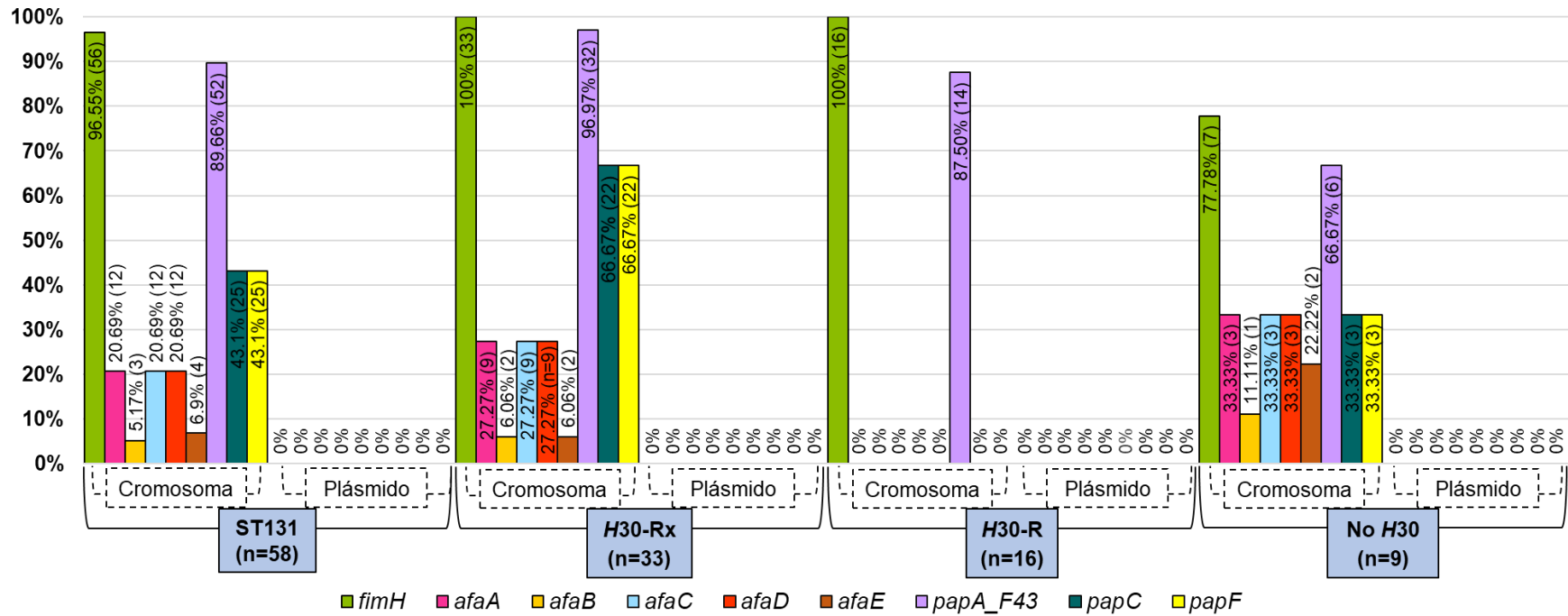
La **gráfica 12** presenta los genes relacionados con la adquisición de hierro. Los genes prevalentes en cromosoma fueron *fyuA* y *chuA* (100%), continuando con *sitA* (96.55%), *tonB* (94.83%), *iucD* e *iutA* (91.38%), *iucC* (89.66%), *iroN* (3.45%) e *ireA* (1.72%). En plásmido se identificaron los genes *sitA* e *iutA* (5.17%), *iroN* (3.45%) e *iucC* (1.72%).

La **gráfica 13** indica la disposición de genes codificantes de toxinas. En cromosoma se reportaron los genes *sat* (91.38%), seguido de *hlyA* (25.86%), *cnf1* (24.14%), *astA* (12.07%) y *senB* (6.9%). En plásmido se identificaron *senB* (15.52%), *hlyF*, *cvaC* y *mcbA* (5.17%).

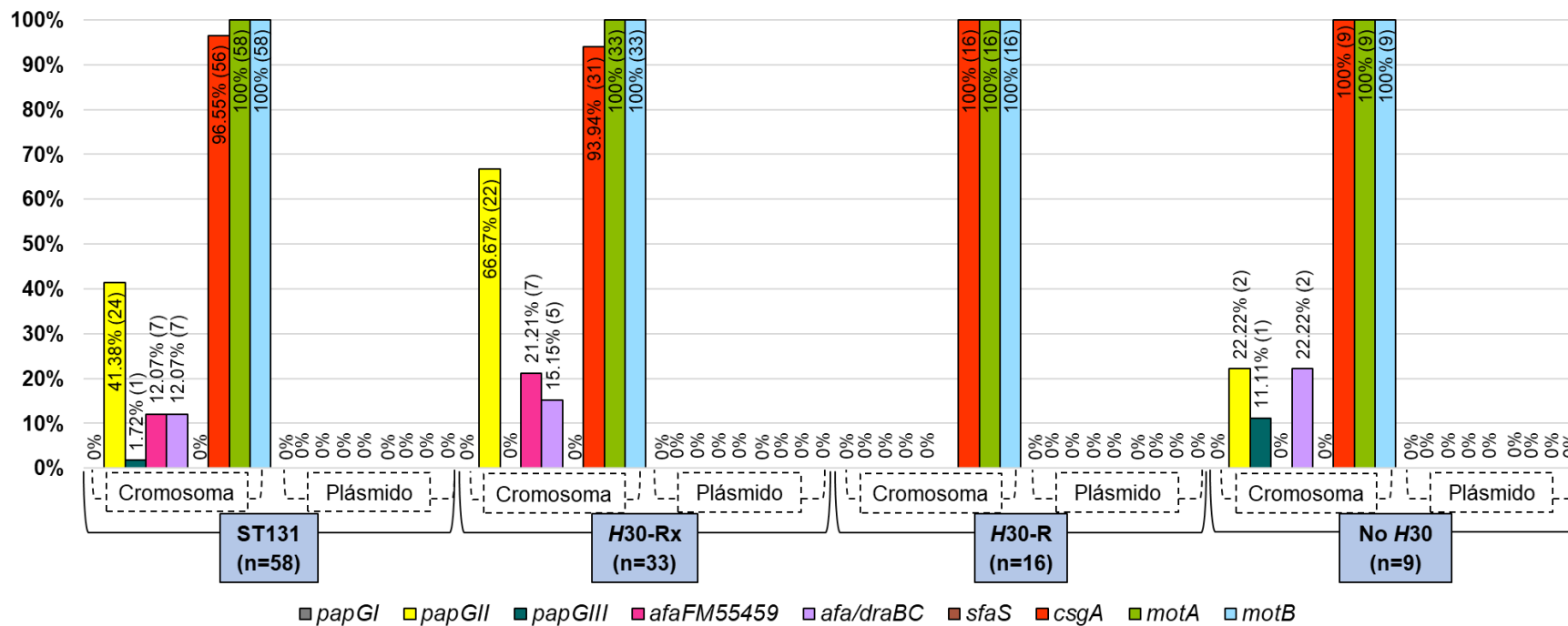
La **gráfica 14** muestra los genes con un papel en la evasión de las defensas del huésped, reportando incidencias para *kpsE* (96.55%), *ompT* (94.83%), *iss* (93.1%), *kpsMII-K5* (60.34%), *kpsMTII* (43.1%), *kpsMII-K2* (27.59%), *traT* (13.79%) y *neuC* (1.72%) con localización cromosómica. Los genes *traT* (43.1%), *cma* (6.9%) e *iss* y *ompT* (5.17%) se localizaron en plásmidos.

Finalmente, la **gráfica 15** presenta genes con función en la invasión y otras, todos los genes se identificaron en cromosoma. Los genes *malX* y *agn43* estuvieron presentes en todos los genomas de estudio (100%), seguido por *usp* (98.28%) e *ibeA* (8.62%).

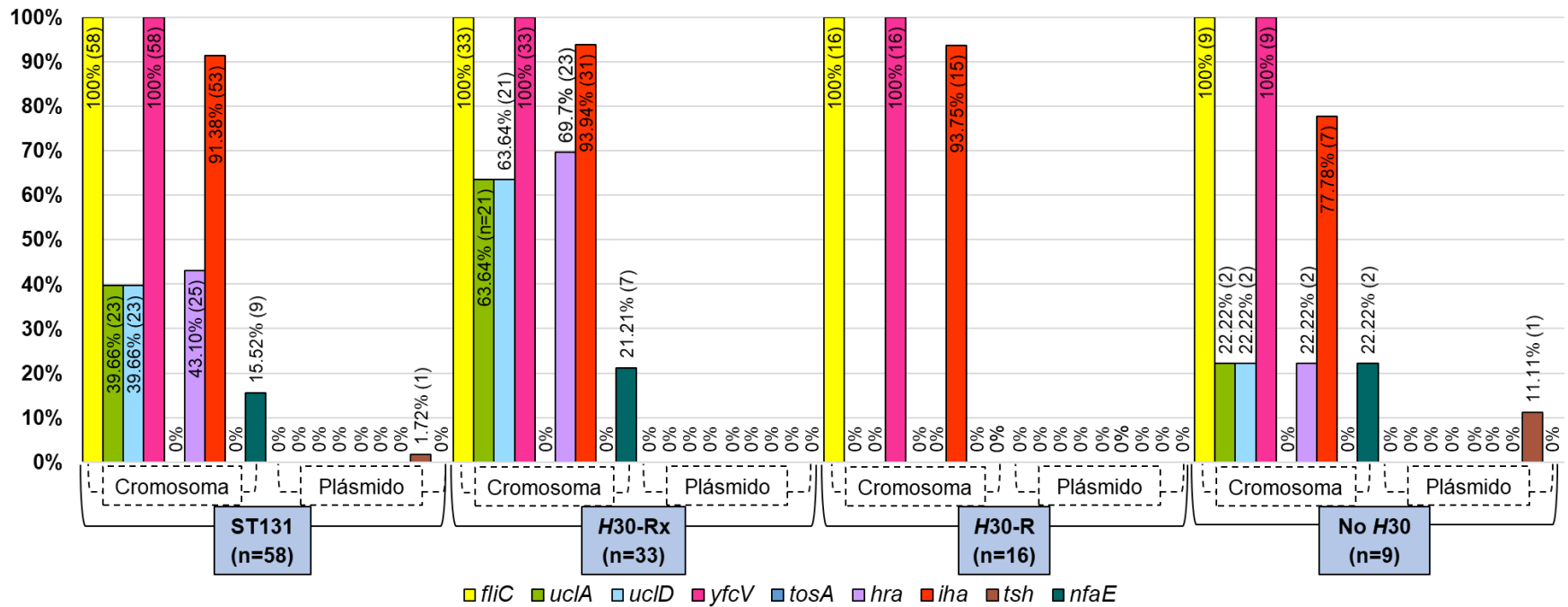
Genes de adherencia



Gráfica 9. Distribución de genes asociados a adherencia (*fimH-papF*).

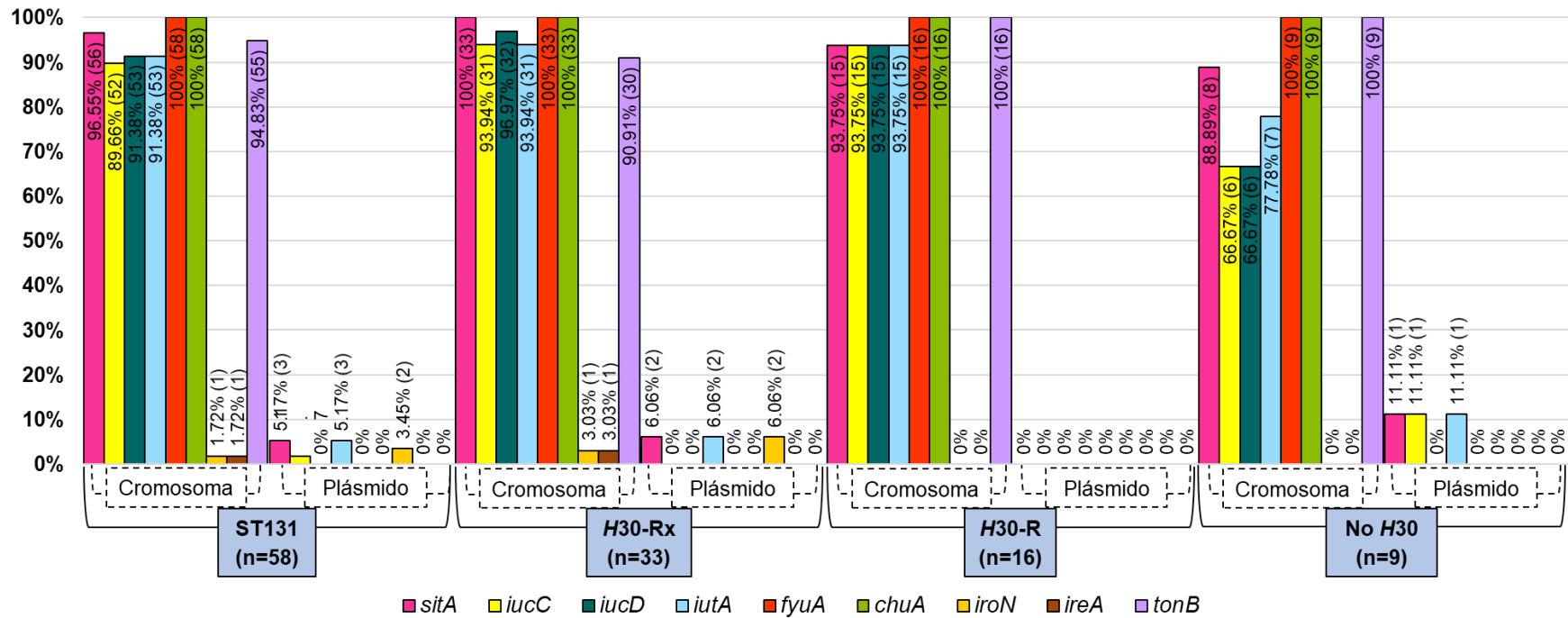


Gráfica 10. Distribución de genes asociados a adherencia (*papGI-motB*).



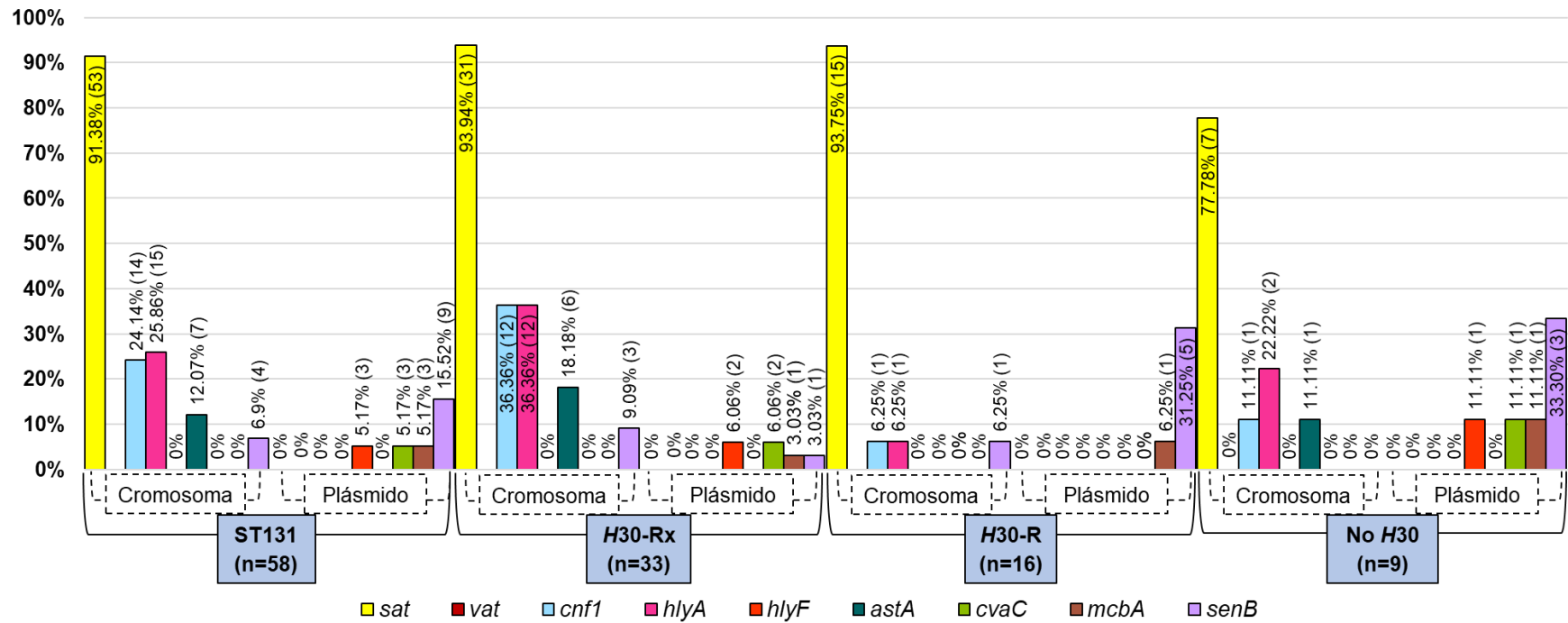
Gráfica 11. Distribución de genes asociados a adherencia y motilidad (*fliC-nfaE*).

Genes de adquisición de hierro



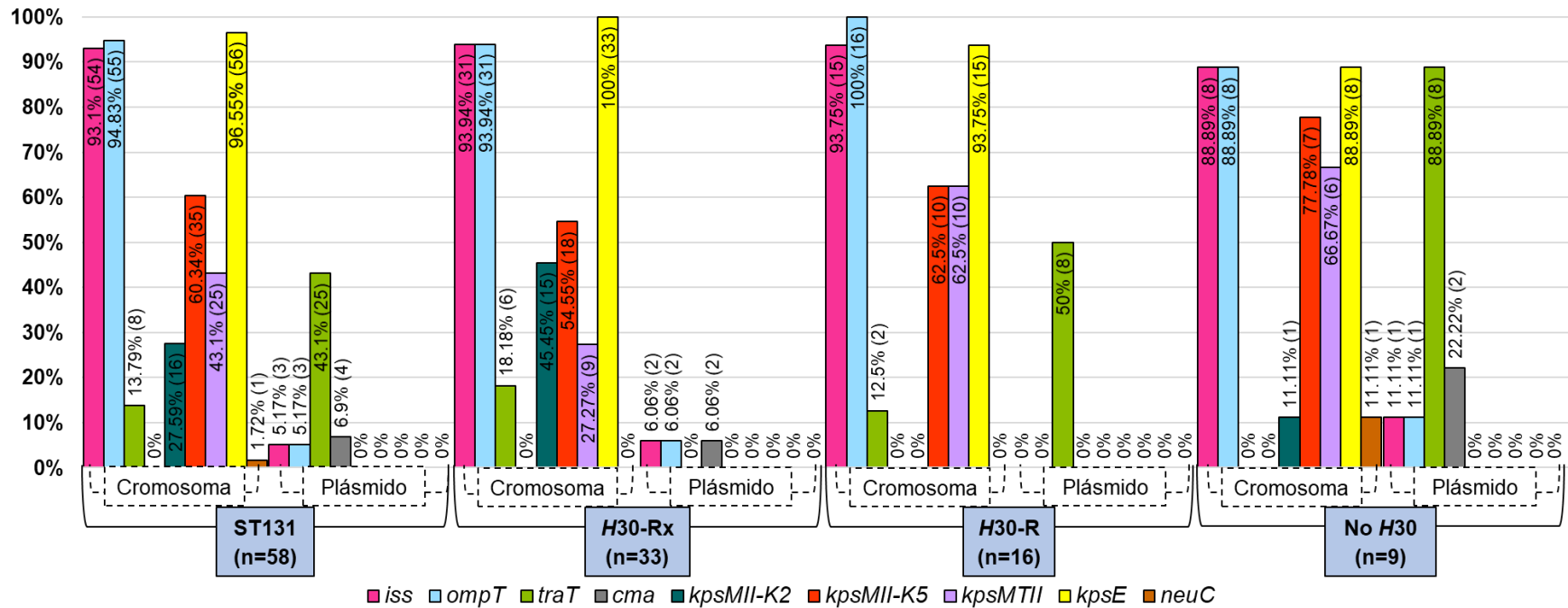
Gráfica 12. Distribución de genes asociados a adquisición de hierro.

Genes de toxinas

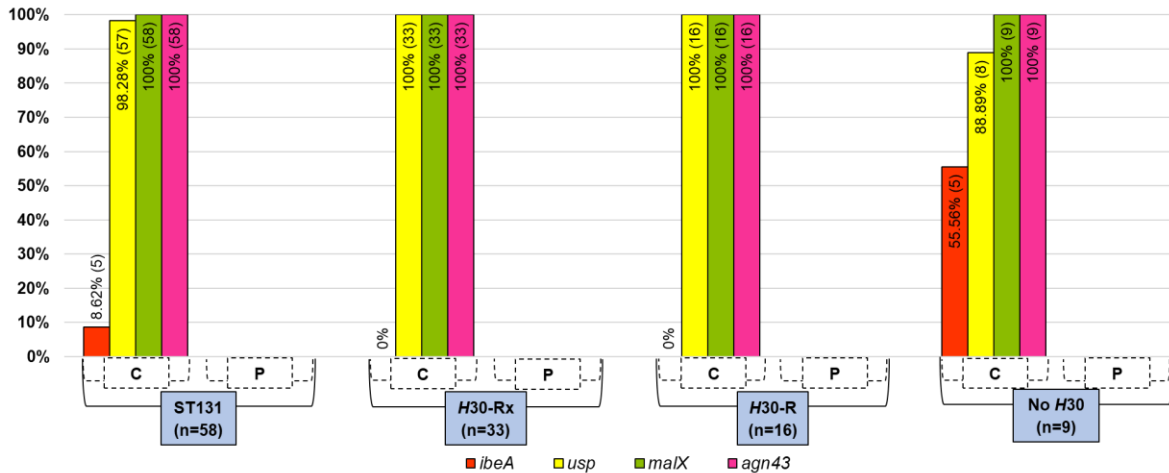


Gráfica 13. Distribución de genes asociados a toxinas.

Genes de evasión de las defensas del hospedero



Gráfica 14. Distribución de genes asociados a evasión de las defensas del hospedero.



Gráfica 15. Genes de virulencia asociados con funciones diversas.

7.2.9. Identificación de genes asociados con el patotipo UPEC.

Se realizaron PCR *in silico* con el programa SnapGene Viewer 5.2.4 para identificar 4 genes altamente asociados a cepas uropatógenas (≥ 3 genes), de acuerdo con el trabajo de Spurbeck *et al.* Todas las cepas (100%) presentaron los genes *fyuA*, *chuA* y *yfcV* y ninguna cepa portó el gen *vat* (**gráfica 16**). La **figura 11** muestra la ubicación de los oligonucleótidos dentro de un genoma de estudio.

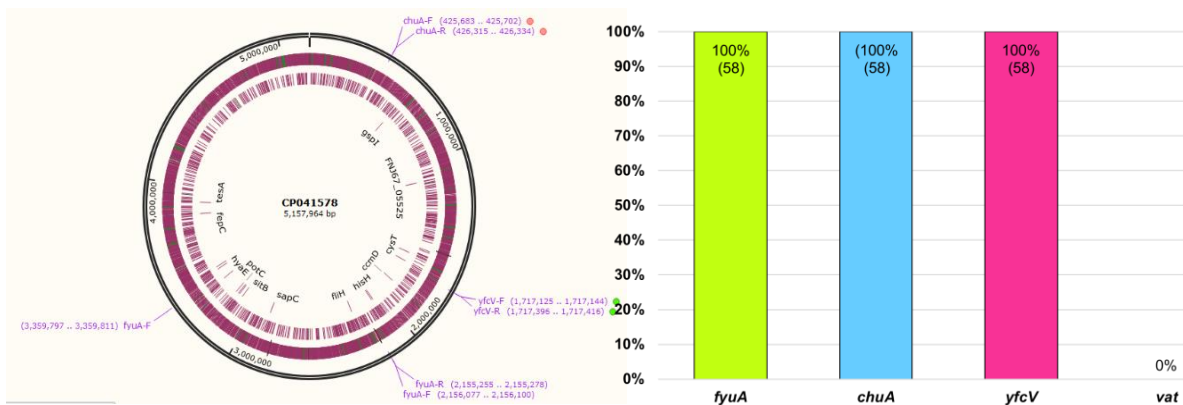
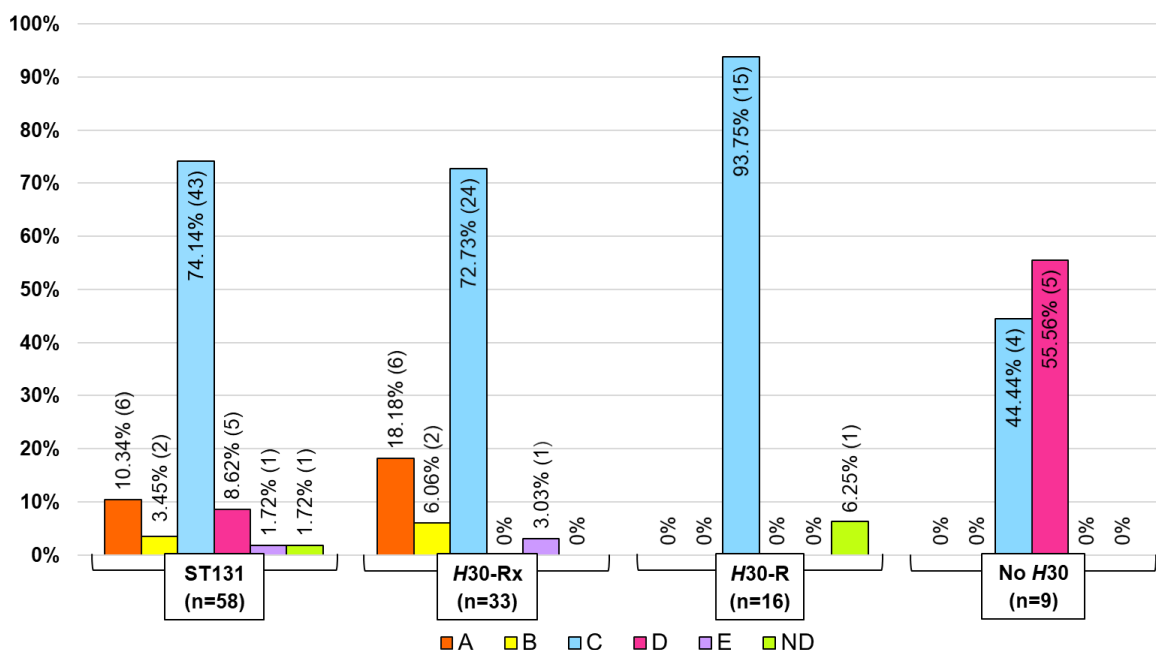


Figura 11. Identificación de los genes *fyuA*, *chuA* y *yfcV* en el genoma de la cepa ESBL94 por alineamiento de oligonucleótidos *in silico*. Imagen obtenida con SnapGene Viewer 5.2.4.

Gráfica 16. Distribución de 4 genes (*fyuA*, *chuA*, *yfcV* y *vat*) asociados a cepas UPEC. Se consideran cepas uropatógenas aquellas que presentan ≥ 3 genes (100%).

7.2.10. Identificación de virotipo

Con el objeto de conocer la distribución de virotipos altamente asociados a cepas O25:H4 ST131, se utilizó el esquema de virotipificación de Blanco *et al.*, con modificaciones de Martínez-Gorgonio (**tabla 16**). La distribución en cada grupo se muestra en los **anexos 6** y en la **tabla 32/anexo 13**. La **gráfica 17** muestra que, en general predominó el virotipo C (74.14%), seguido del A (10.34%), D (8.62%), B (3.45%), finalmente una cepa se asoció con el virotipo E (1.72%) y otra no presentó ningún gen de virulencia (1.72%). A nivel de subclones, el virotipo C fue dominante en *H30-Rx* y *H30-R*, pero en el grupo No *H30*, el virotipo D (55.56%) prevaleció sobre el C (44.44%).



Gráfica 17. Distribución de los genomas de estudio por virotipo. Los virotipos se asignaron de acuerdo con la presencia/ausencia de los genes *afaFM955459*, *iroN*, *ibeA* y *sat*. La categoría ND se refiere a las cepas que no presentaron ninguno de los 4 genes de estudio.

7.2.11. Determinación de cepas con patotipo híbrido ExPEC-DEC

En la revisión bibliográfica previa se reportó la presencia de genes *daa* (fimbria F1845), en el genoma de la cepa de estudio SK1144 (O25:H4 ST131, No *H30*), presentando un patotipo ExPEC/DAEC (Tanimoto *et al.*, 2019). En el análisis de este genoma se obtuvo el amplicón perteneciente a *afa/draBC*, así como a *daaE*, ambos marcadores para las fimbrias Afa/Dr. En la búsqueda del gen *daaE*,

característicos de las cepas DAEC, se identificaron 3 genomas, además de SK1144, pero sólo se alinearon en el oligonucleótido forward *daaE*-F. Para determinar que se tratara de un gen *daaE*, se utilizó a SK1144 (DAEC confirmada) como control positivo, se tomó un segmento de 800 pb desde el inicio del oligonucleótido *daaE*-F en las 3 cepas problema (B1370-PB_2012, B1194-PB_2012 y SCU-479) y se procedió a realizar un alineamiento múltiple en Clustal Omega para conocer el porcentaje de identidad respecto a SK1144 (tabla 33).

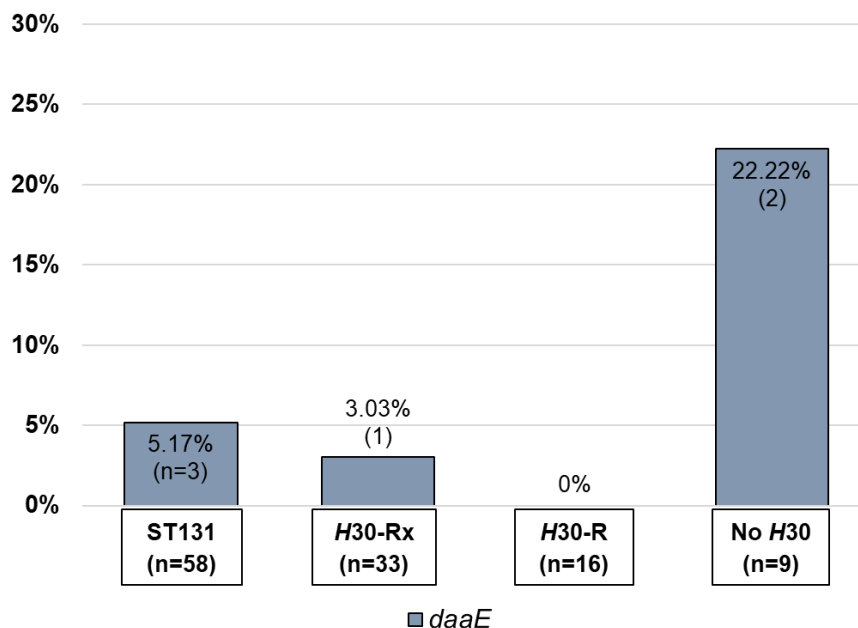
Tabla 33. Porcentaje de identidad del gen *daaE* con respecto a SK1144, previamente reportada como ExPEC-DAEC.

	SK1144	SCU-479	B1194-PB_2012	B1370-PB_2012
SK1144	100%	99.5%	99.75%	53.64%

Con el resultado obtenido se estableció que los genomas de las cepas SK1144, SCU-479 y B1194-PB_2012 portan genes codificantes de la fimbria F1845, responsable de la adherencia celular difusa característica de cepas DAEC (Servin, 2005) (tabla 34, gráfica 18).

Tabla 34. Distribución de genomas híbridos ExPEC-DAEC.

ExPEC-DAEC	ST131 n=58 (%)	H30-Rx n=33 (%)	H30-R n=16 (%)	No H30 n=9 (%)
	3 (5.17)	1 (3.03)	0 (0)	2 (22.22)



Gráfica 18. Distribución de genomas híbridos ExPEC-DAEC.

No se identificaron genes de virulencia asociados a los patotipos EPEC, ETEC, EHEC, EAEC y EIEC.

7.2.12. Análisis del operón fimbrial *ucl* en cepas prototipo y genomas O25:H4 ST131

En trabajos recientes, como los publicados por Wurpel *et al.*, y Klein & Hultgren, destaca el papel de ciertos determinantes de virulencia capaces de expresarse en TGI y en sitios extraintestinales, entre ellas se encuentra la fimbria Ucl, codificada por el operón *uclABCD* e identificada en cepas UPEC que presentan exclusivamente los filogrupos B2 y D.

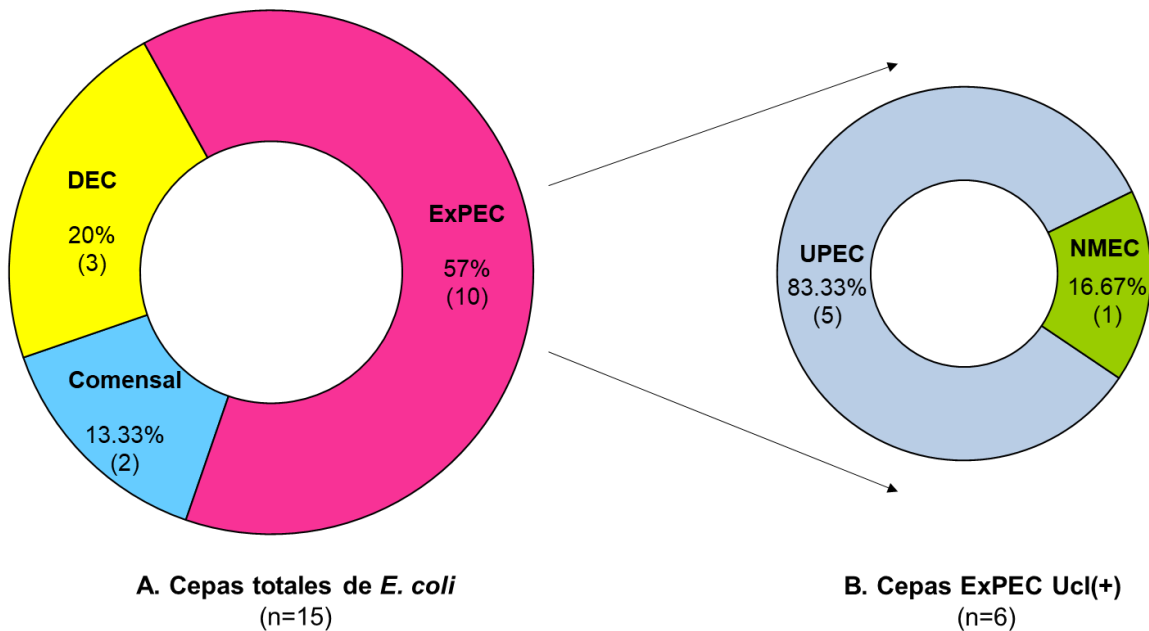
Para corroborar que estas fimbrias son exclusivas de cepas UPEC, se realizó la búsqueda de genomas de 15 cepas prototipo de *E. coli*. Se seleccionaron cepas en las que el programa SnapGene Viewer pudiera visualizar su secuencia de nucleótidos. Se incluyeron 15 cepas previamente clasificadas como comensales (n=2), DEC (n=3) y ExPEC (n=10). Se identificó su filogrupo, serotipo y ST, así como la presencia de plásmidos para realizar la búsqueda del operón *ucl* en todo el genoma. El operón se localizó en el cromosoma de 6 cepas (40%), todas ExPEC y pertenecientes a los filogrupos B2 (83.33%) y una no determinada (16.67%).

Tabla 35. Características de las cepas prototipo utilizadas para identificar el operón *ucl*.

Grupo	Genoma/Cepa (No. acceso)	Patotipo	Filogrupo	Serotipo	ST	Ucl (+)
Comensales	K-12/ MG 1665 (U00096)	Comensal	A	O16:H48	ST10	-
	Plásmido F* (AP001918)					
	K-12/ W3110 (AP009048)	Comensal	A	O16:H48	ST10	-
DEC	55989 (CU928145)	EAEC	B1	O104:H4	ST678	-
	55989p* (CU928159)					
	2348/69 (FM180568)	EPEC	B2	O127:H6	ST15	-
	pMar2* (FM180569)					
	pe2348-2* (FM180570)					
	O157:H7/ EC4115 (CP001164)	EHEC	E	O157:H7	ST11	-

	pO157* (CP001165)					
ExPEC	O1 (NC_008563)	APEC	B2	O1:H7	ST95	-
	O2-211 (CP006834)	APEC	G	O2:H4	ST117	-
	RS218 (CP007149)	NMEC	B2	O18:H7	ST95	+
	pRS218* (CP007150)					
	UMN026 (NC_011751.1)	UPEC	D	O17/O44/ O77:H18	ST597	-
	p1ESCUM* (CU928148)					
	CFT073 (AE014075)	UPEC	B2	O6:H1	ST73	-
	UMEA 3121-1 (AWBG01000000)	UPEC	ND	ND	ND	+
	ABU83972 (CP001671)	UPEC	B2	O25:H1	ST73	+
	F11 (AAJU02000003)	UPEC	B2	O6:H31		+
	UTI89 (NC_007946.1)	UPEC	B2	O18:H7	ST95	+
	pUTI89* (CP000244)					
	536 (CP000247)	UPEC	B2	O6:H31	ST127	+

*Plásmido



Gráfica 19. Búsqueda del operón *ucl* en cepas prototipo. A. Distribución de las cepas prototipo utilizadas en este estudio. B. Todas las cepas Ucl (+) pertenecieron al patotipo ExPEC, incluyendo cepas UPEC y NMEC.

Se identificaron 6 genomas positivos para el operón *Ucl* en 5 cepas UPEC (83.33%) y 1 NMEC (16.67%). En todas se analizó el tamaño, contenido genético del operón y el entorno genético. Se encontró variación de tamaño únicamente en el gen *ucIA*, codificante de la subunidad principal o pilina. La **tabla 36** muestra los tamaños y la homología de cada gen constituyente del operón en comparación con UTI89. Se observa que la subunidad *ucIA* presenta menor homología con respecto a las otras subunidades analizadas.

Tabla 36. Tamaño y % de homología de los genes que forman el operón *ucl* en cepas prototipo con respecto a UTI89.

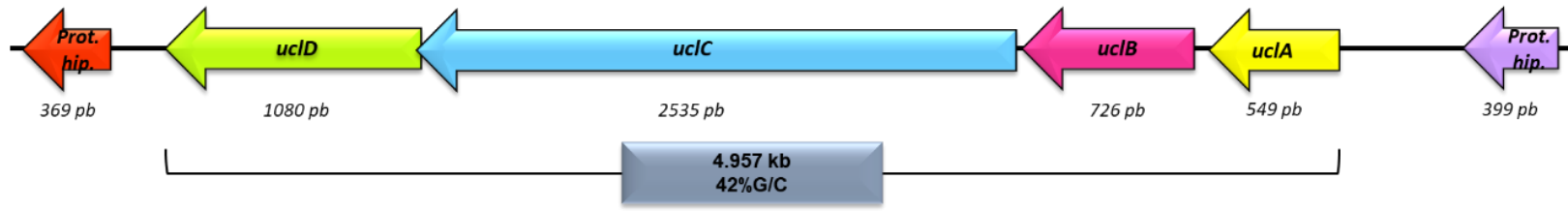
Cepa prototipo	<i>ucIA</i> (subunidad principal) pb	% homología*	<i>uc/B</i> (Chaperona) pb	% homología*	<i>uc/C</i> (Usher) pb	% homología*	<i>uc/D</i> (Adhesina) pb	% homología*
UPEC								
UTI89	549	100	726	100	2535	100	1080	100
536	552	73.22	726	99.45	2535	99.64	1080	99.81
ABU83972	306	99.67	726	99.45	2535	99.64	1080	99.63
F11	549	100	726	100	2535	100	1080	100
UMEA 3121-1	552	73.22	726	99.31	2535	99.61	1080	99.72
NMEC								
RS218	549	100	726	100	2535	99.96	1080	100

*% de homología respecto a UTI89.

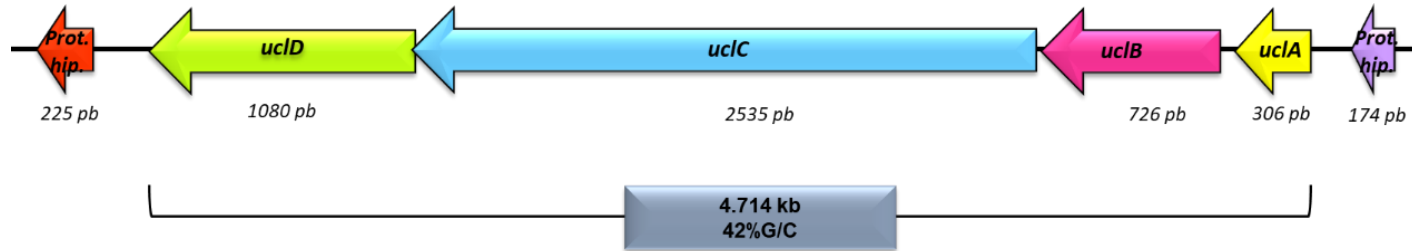
Se realizó un esquema comparativo de los 6 operones de estudio de los diferentes genomas de cepas prototipo, como se observa en la **figura 12**. Los 6 genomas presentaron los 4 genes que conforman el operón *ucl*, se encuentran flanqueados a los extremos por proteínas aún no caracterizadas y el contenido de G/C es más bajo (42%) en comparación con el resto del genoma.

Composición y entorno genético del operón *ucl* en cepas prototipo de *E. coli*

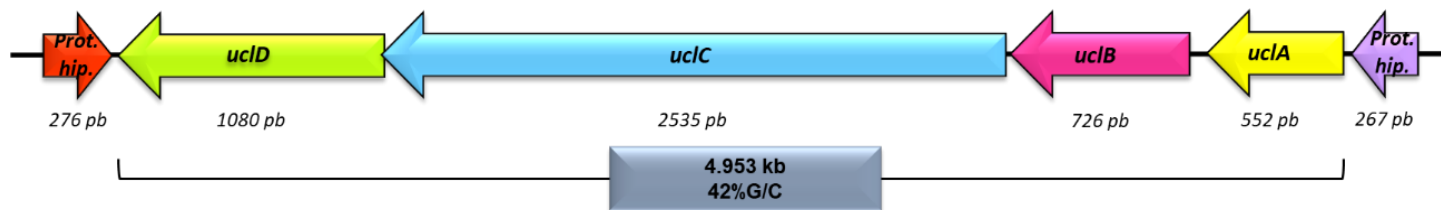
UPEC UTI89



UPEC ABU83972



UPEC 536



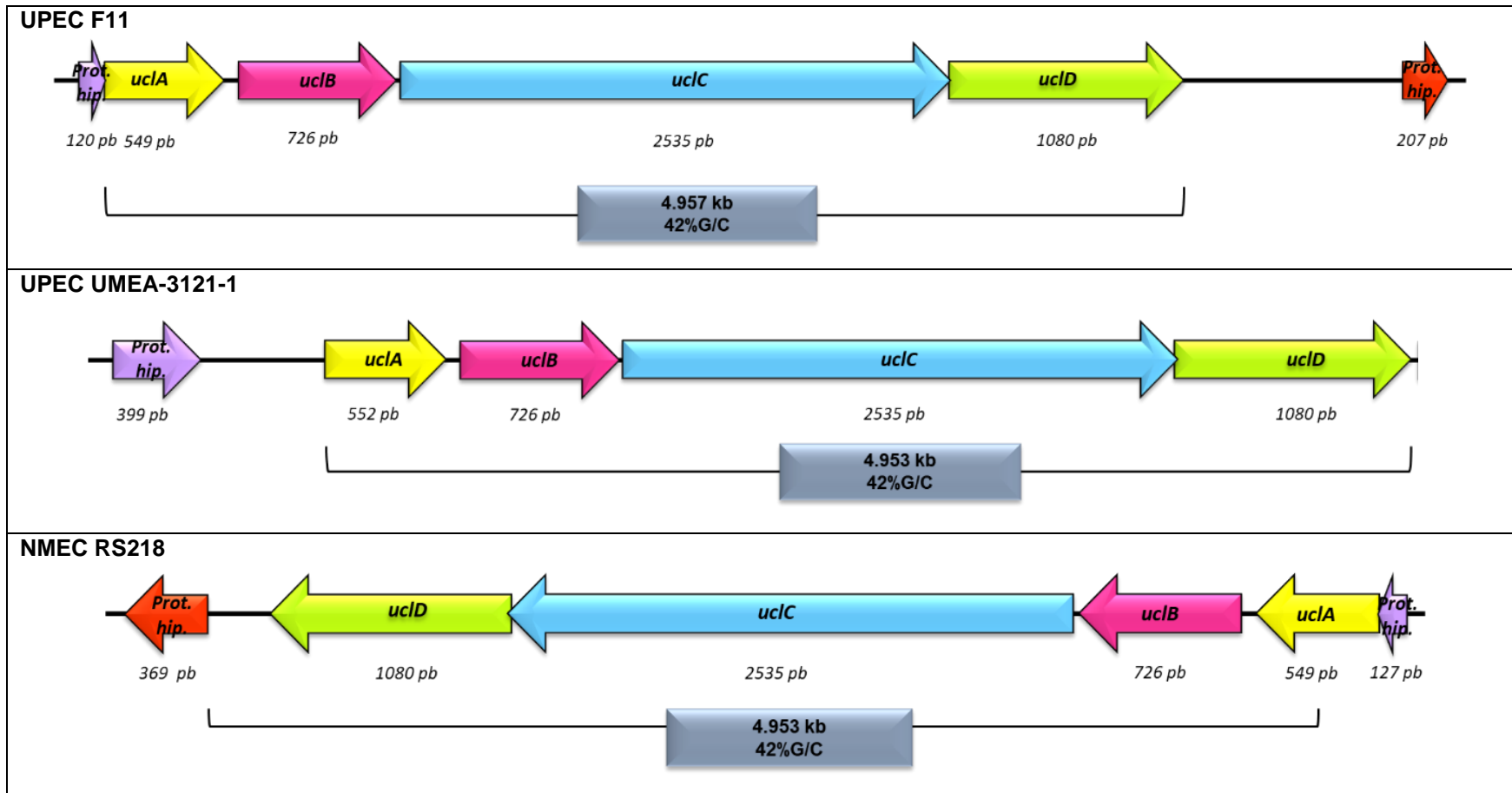


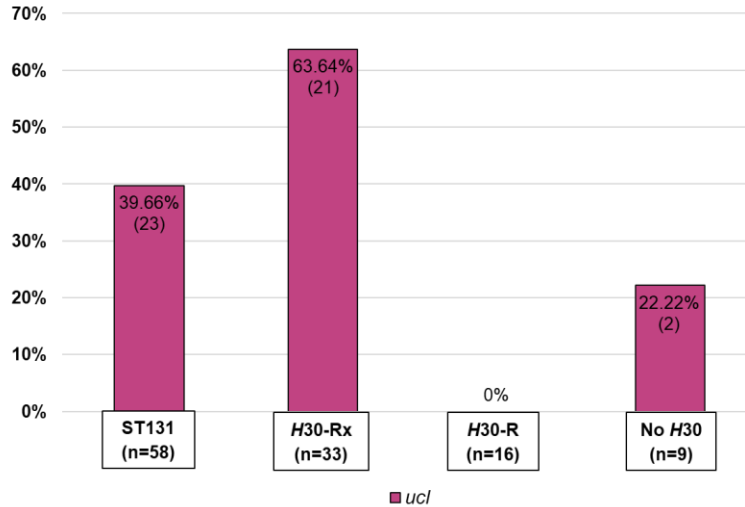
Figura 12. Esquemas de los operones *ucl* en 6 cepas prototipo ExPEC (5 UPEC y una NMEC).

También se realizó este análisis en los genomas que conforman el cepario de estudio. Se identificó el operón mediante PCR *in silico* utilizando los oligonucleótidos de Wurpel *et al.* La **tabla 37** presenta las cepas portadoras, el subclón al que pertenecen y su país de origen y la **gráfica 20** muestra la presencia del operón *ucl* en los genomas de estudio y su distribución por subclones.

Tabla 37. Búsqueda del operón *ucl* en cepario ST131.

Grupo clonal	Cepas portadoras del operón Ucl	País de origen	Continente
H30-Rx 63.64% (n=21)	B1370-PB_2012	Suecia	Europa
	C0134-PB_2013	Suecia	
	B1131-PB_2011	Suecia	
	B1033-PB_2012	Suecia	
	C0107-PB_2013	Suecia	
	B1017-PB_2011	Suecia	
	B1323-PB_2011	Suecia	
	B1316-PB_2011	Suecia	
	B1320-PB_2011	Suecia	
	C0014-PB_2012	Suecia	
	C4435*	México	América
	4/0*	Suecia	Europa
	TO217*	Alemania	Asia
	55989*	Pakistán	Asia
	ESBL41*	USA	América
	ESBL94	USA	
	p11A	USA	
	p4A	USA	
	S65EC*	Australia	Oceanía
	Ecol_AZ146*	Italia	Europa
RH-048-CS*	Bangladesh	Asia	
H30-R	NP		
No H30 22.22% (n=2)	Hera_General_1*	Arabia Saudita	Asia
	Z247*	China	

* Cepas seleccionadas para un análisis comparativo con la cepa UTI89



Gráfica 20. Prevalencia de *ucl* en los genomas de estudio y subclones.

El operón *ucl* prevalece en el subclón *H30-Rx* (63.64%), solo en 2 de los 9 genomas *No H30* (22.22%) y no se encontró en ninguno de los 16 genomas de *H30-R*. Las cepas portadoras fueron aisladas en países pertenecientes a los 4 continentes de estudio.

Del total de genoma positivos para el operón *ucl* (n=23), se eligieron 10, cada uno de un país distinto para comparar el % de homología utilizando el genoma de la cepa UTI89 como referencia (**tabla 38**), así como la esquematización de sus entornos genéticos (**figura 13**).

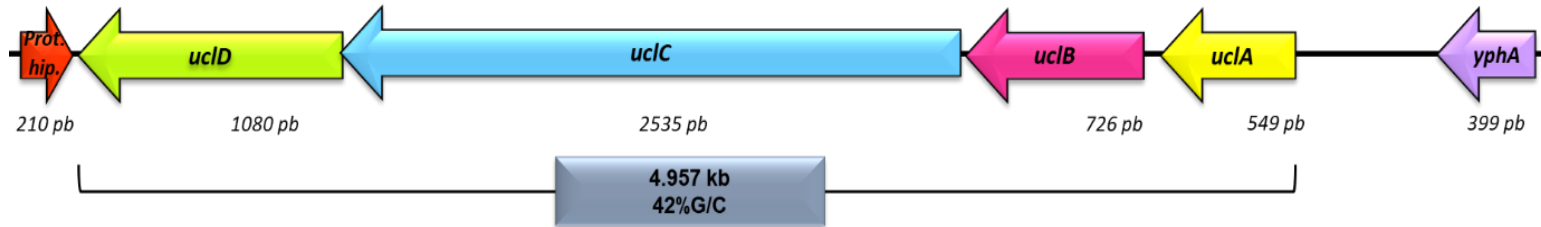
Tabla 38. Características de los genes que forman el operón *ucl* en cepas clínicas con respecto a UTI89.

Genoma/Cepa O25:H4 ST131	<i>uc/A</i> (subunidad principal) pb	% homología*	<i>uc/B</i> (Chaperona) pb	% homología*	<i>uc/C</i> (Usher) pb	% homología*	<i>uc/D</i> (Adhesina) pb	% homología*
UTI89*	549	100	726	100	2535	100	1080	100
C4435	549	100	726	100	2535	100	1080	100
4/0	549	100	726	100	2535	100	1080	100
TO217	549	100	726	100	2535	100	1080	100
55989	549	100	726	100	2535	100	1080	100
ESBL41	549	100	726	100	2535	100	1080	100
S65EC	549	100	726	100	2535	100	1080	100
Ecol_AZ146	549	100	726	100	2535	100	1080	100
RH-048-CS	549	100	726	100	2535	100	1080	100
Hera_Gral_1	549	100	726	100	2535	100	1080	100
Z247	549	99.45	726	99.45	2535	99.64	1080	99.63

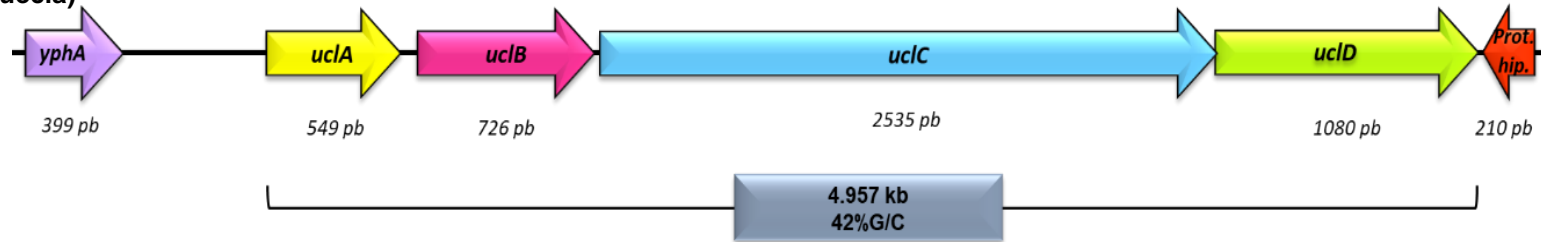
*% de homología respecto a UTI89.

Composición y entorno genético del operón *ucl* en cepas prototipo de *E. coli*

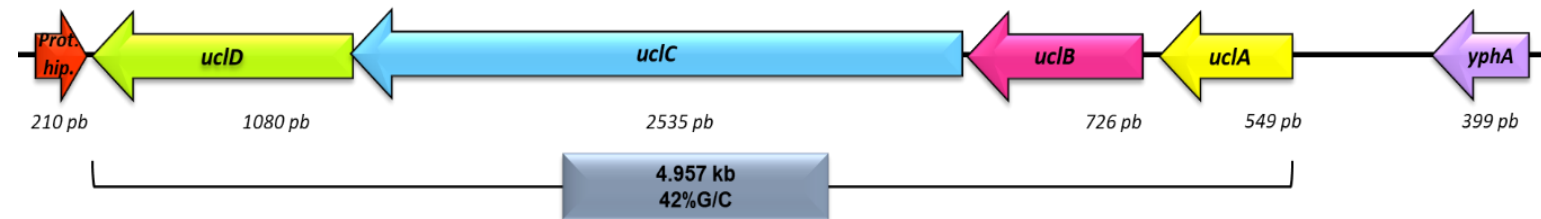
C4435 (México)



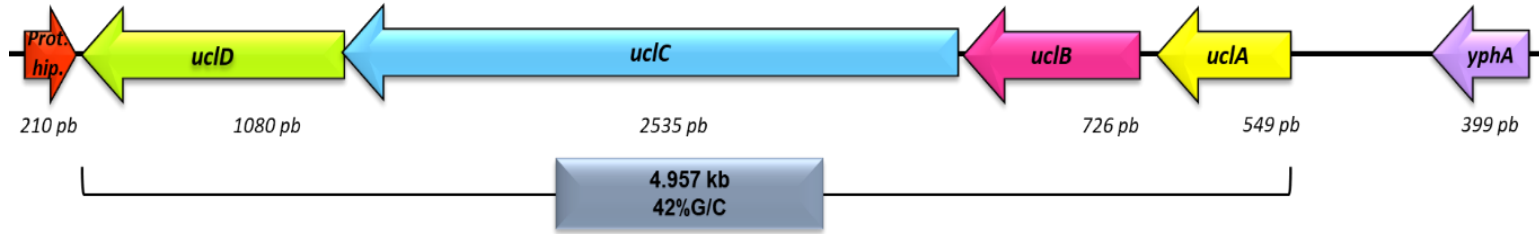
4/0 (Suecia)



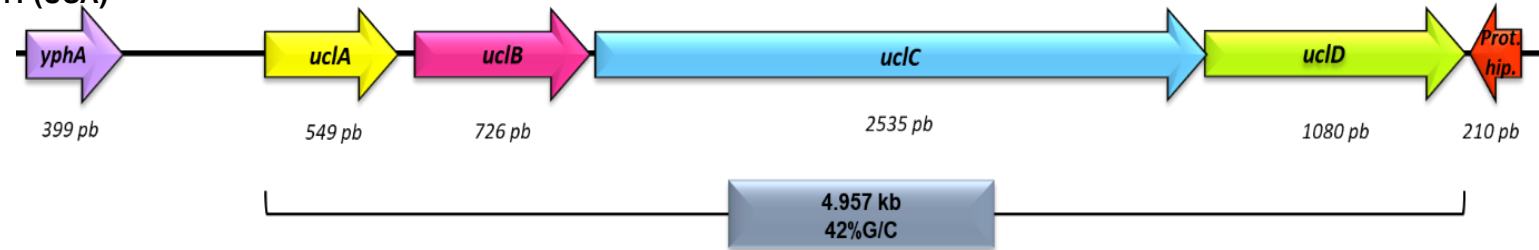
TO217 (Alemania)



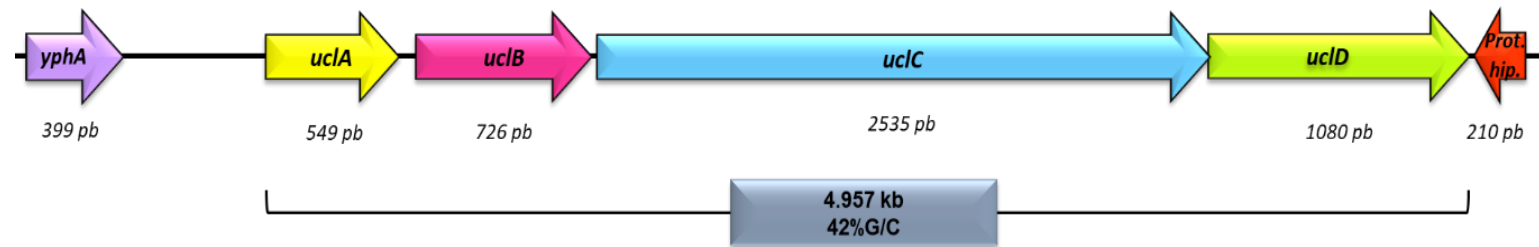
55989 (Pakistán)

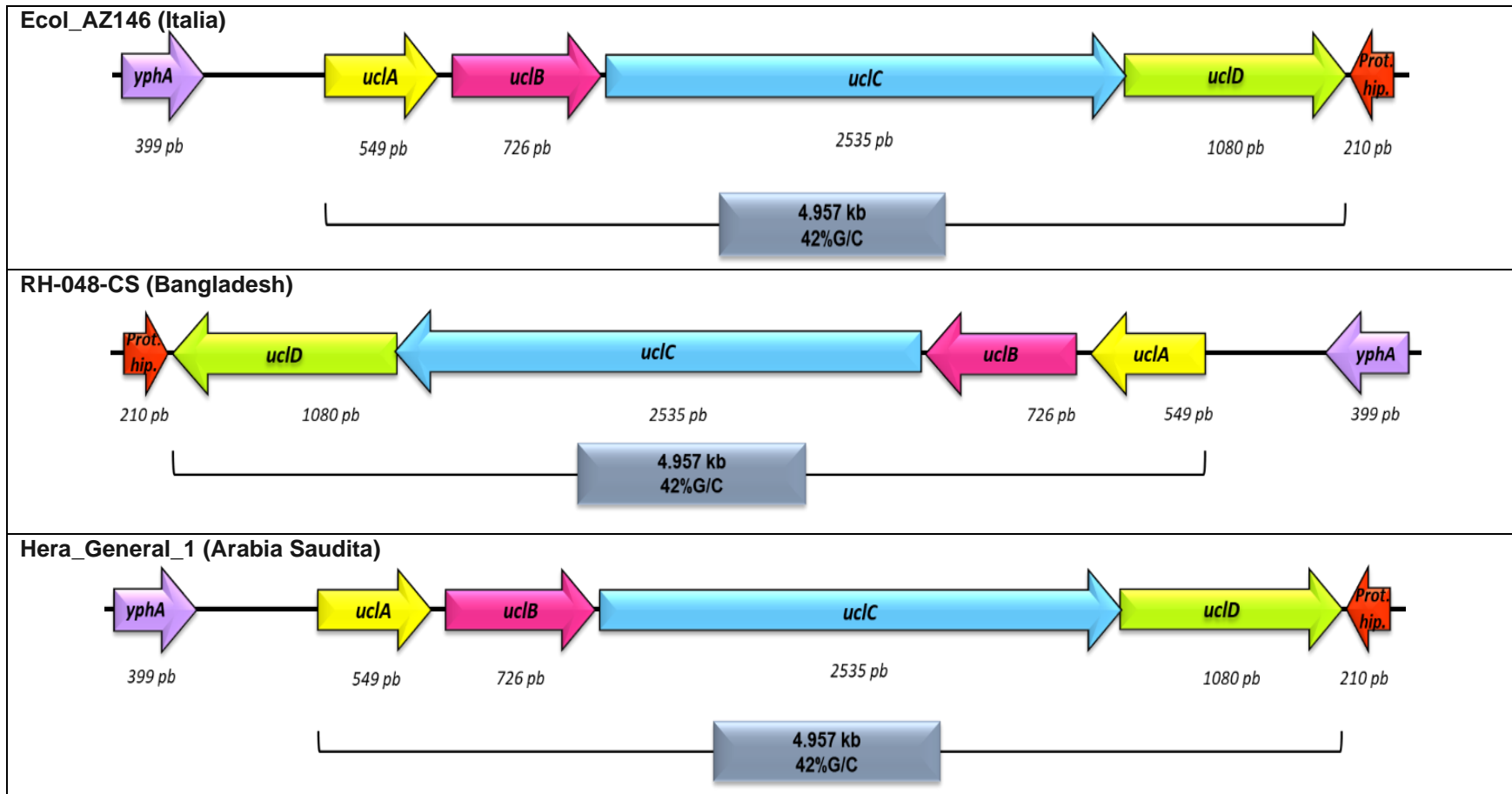


ESBL41 (USA)



S65EC (Australia)





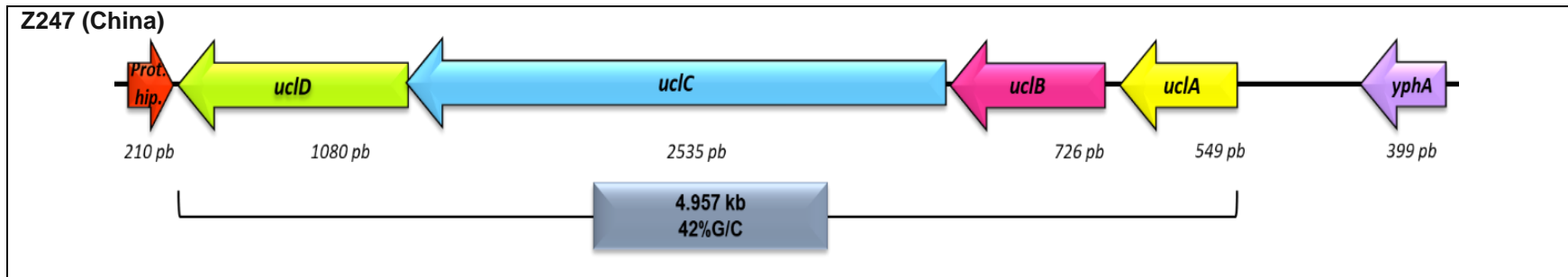


Figura 13. Esquemas de los operones *ucl* en 10 genomas de cepas clínicas O25:H4 ST131.

A excepción de la cepa Z247, todas las cepas clínicas evaluadas presentan 100% de homología con UTI89. Para conocer si las sustituciones de nucleótidos en Z247 modifican el marco de lectura, se obtuvo la secuencia de aminoácidos de las subunidades en UTI89 y Z247 y se realizó un alineamiento con Clustal Omega. La subunidad UclA mostró un cambio único de **A20T**, la subunidad UclB un cambio de **R117G**, UclC arrojó 4 cambios **A51V**, **R131S**, **S182N** y **L324I** y finalmente UclD presentó la sustitución **I259T**. Se necesitaría una mayor cantidad de cepas clínicas secuenciadas para conocer la prevalencia de estas dos variantes identificadas en las cepas de estudio, así como ensayos que nos permitan determinar si las mutaciones están involucradas en cambios en el fenotipo.

En el esquema comparativo para todos los genomas analizados se observa, que a 575 pb río arriba del inicio de *uclA*, se encuentra un gen que codifica para una proteína de 399 pares de bases, anotada como parte de la familia DoxX. Se realizó un alineamiento con BLASTp identificando esta secuencia como perteneciente al gen *ypfA* (flecha en morado), codificante de una proteína de membrana interna. En el otro extremo del operón, a una distancia de 18 pb de *uclD*, se puede apreciar que todas las cepas clínicas presentan una proteína hipotética de 210 pb. Se identificó esta secuencia en todas las cepas prototipo, pese a que no se encontraba anotada en algunos genomas. Se realizó un alineamiento múltiple, indicando un % de homología en este segmento respecto a UTI89 en un rango de 97.14%-100%.

Se obtuvo la secuencia de aminoácidos de la proteína hipotética de 210 pb (69 aminoácidos) y se sometió a BLASTp y a Pfam pero no se reportaron resultados que pudieran indicarnos una función asociada. Debido a su presencia en todos los genomas analizados y el %CG menor que el resto del genoma tanto en el operón *ucl* como en este segmento (42%) se cree que este podría tratarse de un MGE responsable de la inserción del operón en el cromosoma. Por otra parte, se utilizaron herramientas bioinformáticas de libre acceso para predecir la estructura secundaria de la secuencia de estudio (69 aminoácidos), basándose en estructuras similares reportadas (**figuras 14 y 15**).

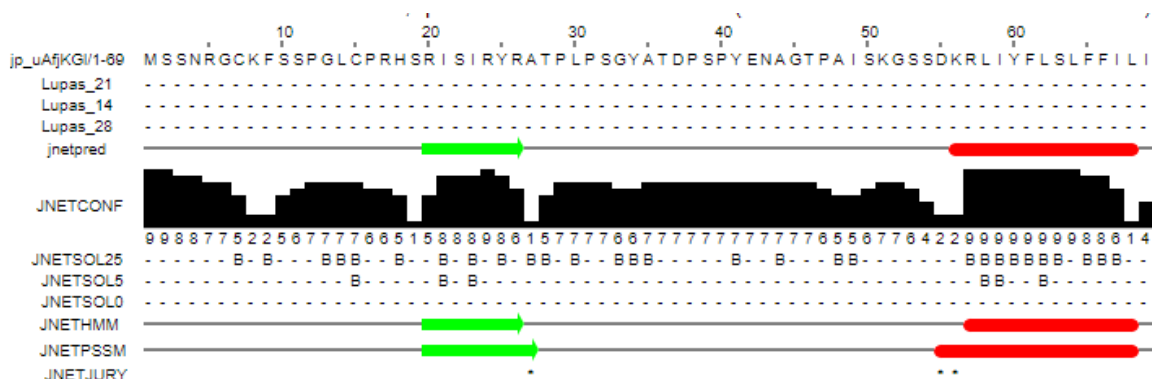


Figura 14. Predicción de la estructura secundaria de un segmento conservado de 69 aminoácidos mediante el servidor Jpred 4. En verde se observa una posible estructura β-plegada y en rojo, α-hélices.

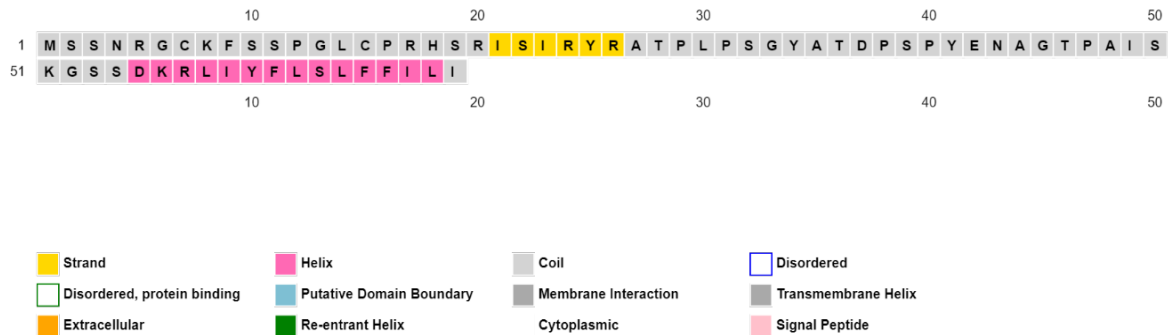


Figura 15. Otro método para la predicción de estructura secundaria en una secuencia de aminoácidos utilizando PsiPred. Se observan dos regiones asociadas a estructura de hebra (amarillo) y hélice (rosa).

La herramienta Cello nos indicó una posible localización en citoplasma y Phyre2 predijo una estructura terciaria realizando una comparación con las secuencias almacenadas en PDB (figura 16).

#	Template	Alignment Coverage	3D Model	Confidence	% i.d.	Template Information
1	c5wx8B			29.7	56	<p>PDB header: dna binding protein Chain: B; PDB Molecule: immediate-early protein 2; PDBTitle: human herpesvirus 6a immediate early protein 2 c-terminal domain PDB Entry: PDB RCSB PDB</p>
2	c3kbhE			21.0	42	<p>PDB header: hydrolase Chain: E; PDB Molecule: spike glycoprotein; PDBTitle: crystal structure of nCoV2019 respiratory coronavirus receptor-binding2 domain complexed with its human receptor PDB Entry: PDB RCSB PDB</p>
3	c1cl4A			20.1	78	<p>PDB header: viral protein Chain: A; PDB Molecule: protein (gag polyprotein); PDBTitle: nucleocapsid protein from mason-pfizer monkey virus (mpmv) PDB Entry: PDB RCSB PDB</p>

Figura 16. Predicción de la estructura terciaria de la secuencia de 69 aminoácidos utilizando Phyre2. Se muestran los 3 primeros resultados (mayor % de identidad) reportados por el programa, todos correspondientes a proteínas de origen viral.

Se observa que los 3 resultados principales presentan un puntaje de confianza muy bajo; sin embargo, los resultados indican identidad con diversas proteínas de origen viral. Esto nos podría indicar que el operón *ucl* pudo haber sido insertado por un elemento profago en el cromosoma de cepas ExPEC.

7.2.13. Desarrollo de oligonucleótidos para la identificación de las subunidades *uclA* y *uclD* en cepas clínicas.

Se diseñaron oligonucleótidos para la identificación de *uclA* (subunidad estructural) y *uclD* (adhesina). Se realizó un alineamiento múltiple entre UTI89 (cepa prototipo UPEC) y los 23 genomas de estudio portadores del operón para identificar las regiones conservadas que nos permitieran el diseño de los oligonucleótidos. Se obtuvo la región correspondiente al segmento intergénico de 100 pb río arriba y río abajo de *uclA* y *uclD* en dirección 5'-3' utilizando SnapGene Viewer 5.2.4 y se usaron otras herramientas como Sequence Utilities y Sequence messenger para obtener las cadenas complementaria y antiparalela complementaria 5'-3'. El análisis de las características se realizó con OligoCalc (tablas 39 y 40).

Tabla 39. Análisis de los oligonucleótidos para la identificación de *uclA*.

Características de los oligonucleótidos para identificar <i>uclA</i>		
Característica	Forward	Reverse
Secuencia (5'-3')	<i>uclA</i> -F: CGCTCATTTCAGGGTAAAGCA	<i>uclA</i> -R: CCAGAAGAAAACAGGGCAGTA
Tamaño	21 pb	21 pb
% GC	47.6%	47.6%
T _m	52.4 °C	52.4 °C
T _m (sales)	59.5 °C	59.5 °C
Horquillas	No	No
Autoalineamiento	No	No
Complementarias	No	No
Ubicación		

Tabla 40. Análisis de los oligonucleótidos para la identificación de *uclD*.

Características de los oligonucleótidos para identificar <i>uclD</i>		
Característica	Forward	Reverse
Secuencia (5'-3')	<i>uclD</i> -F: TCTCAGCTCGTTCCTGTTCTG	<i>uclD</i> -R: GGAACACCGGCAATCAGCAA
Tamaño	21 pb	21 pb
% GC	52.4%	52.4%
T _m	54.4	54.4
T _m (sales)	61.2	61.2

Horquillas	No	No
Autoalineamiento	No	No
Complementarias	No	No
Ubicación		

Los oligonucleótidos se probaron mediante PCR *in silico* en las cepas prototipo y las cepas clínicas en donde previamente se había determinado el operón *ucl*, obteniendo un resultado positivo.

7.2.14. Búsqueda de determinantes de resistencia

Para conocer los genes de resistencia y la frecuencia de estos en los genomas de estudio, se identificaron 67 determinantes de resistencia (genes y mutaciones específicas) hacia 12 familias de antibióticos utilizando las plataformas ResFinder y SnapGene Viewer 5.2.4. Los resultados se presentan agrupando los genes que confieren resistencia a una misma familia de antibióticos, disponibles en las tablas **41-45 (anexo 13)**.

Las **gráficas 21 y 22** indican los genes de resistencia hacia betalactámicos, siendo los más presentes *bla*_{CTX-M-15} en cromosoma (31.03%) y plásmido (39.66%), *bla*_{OXA-1} en cromosoma (18.97%) y plásmido (37.93%) y *bla*_{TEM-1B} en cromosoma (6.9%) y plásmido (31.03%). En menor porcentaje se reportaron los genes *bla*_{CTX-M-27} en plásmido (10.34%) y *bla*_{CTX-M-14} en cromosoma (5.17%) y plásmido (1.72%), *bla*_{TEM-1A} en plásmido (5.17%), *bla*_{CMY-2} y *bla*_{CMY-6} en cromosoma (1.72%), *bla*_{NDM-1} en plásmido (1.72%), *bla*_{KPC-2} en cromosoma (1.72%) y plásmido (1.72%), *bla*_{KPC-3} en plásmido (1.72%) y *bla*_{IMP-1} solo en cromosoma (1.72%).

La **gráfica 23** muestra los genes de resistencia para las quinolonas. Se reportó la presencia de mutaciones cromosomales en *gyrA* (91.38%), *parC* (87.93%) y *parE* (96.55%), *aac(6')-Ib-cr* se localizó en cromosoma (24.14%) y plásmido (34.48%) y *qnrS* se presentó en 1 plásmido (1.72%).

La **gráfica 24** muestra la distribución de los genes que confieren resistencia a los aminoglucósidos, los genes más prevalentes fueron *aac(6')-Ib-cr* en cromosoma (24.14%) y plásmido (34.48%), *aac(3)-IIa* en cromosoma (20.69%) y plásmido (12.07%), *aadA5* en cromosoma (6.9%) y plásmido (44.83%), *strA* y *strB* en

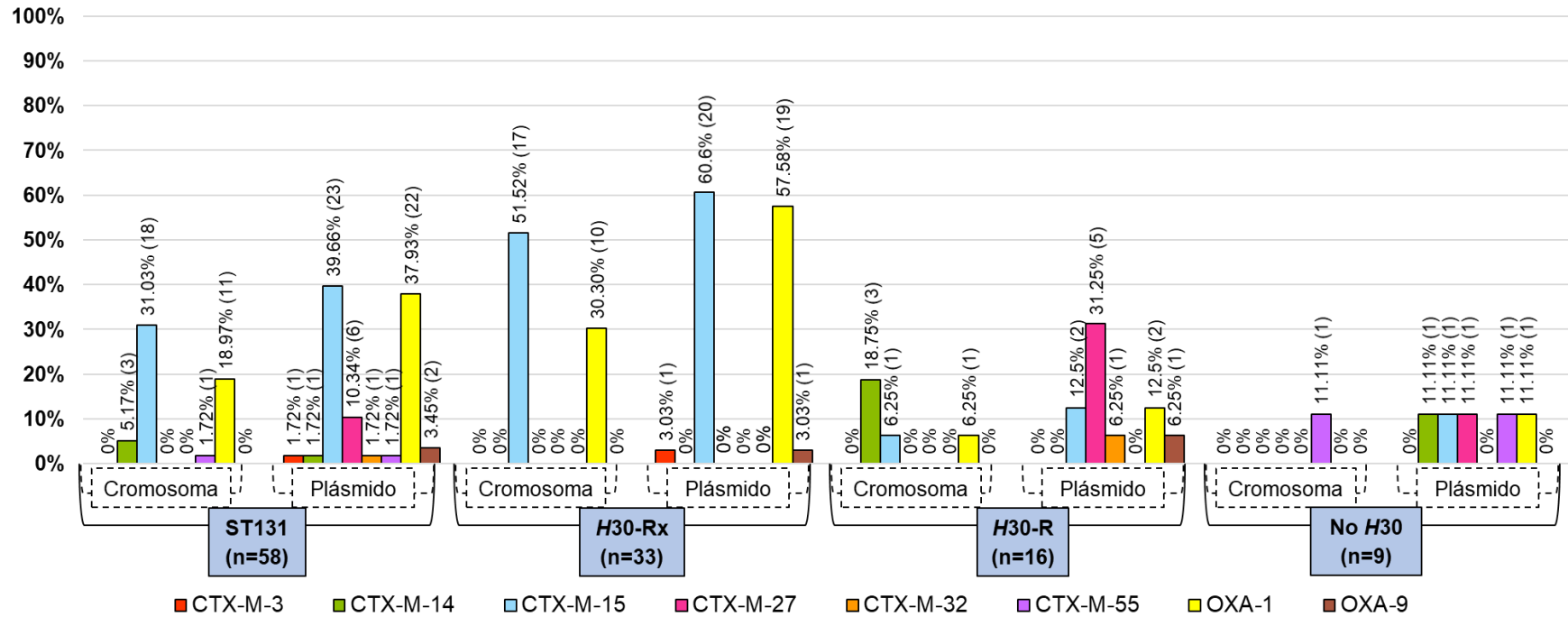
cromosoma (5.17%) y plásmido (24.14%) y *aac(3)-IId* en cromosoma (1.72%) y plásmido (8.62%).

La **gráfica 25** presenta genes asociados con resistencia para tetraciclinas, *tet(A)* se presentó en cromosoma (8.62%) y plásmido (46.55%) y *tetB* en plásmido (1.72%). También se analizaron genes de resistencia a fenicoles, localizando los genes *catB3* en cromosoma (22.41%) y plásmido (36,21%), *cmIA1* se identificó en cromosoma y plásmido (1.72%) y *cml* y *floR* se identificaron únicamente en plásmidos (1.72% y 3.45%). Para la resistencia a macrólidos, se localizó el gen *mph(A)* en cromosoma (10.34%) y plásmido (41.38%) y no se identificaron determinantes de resistencia para rifamicina y nitrofuranos.

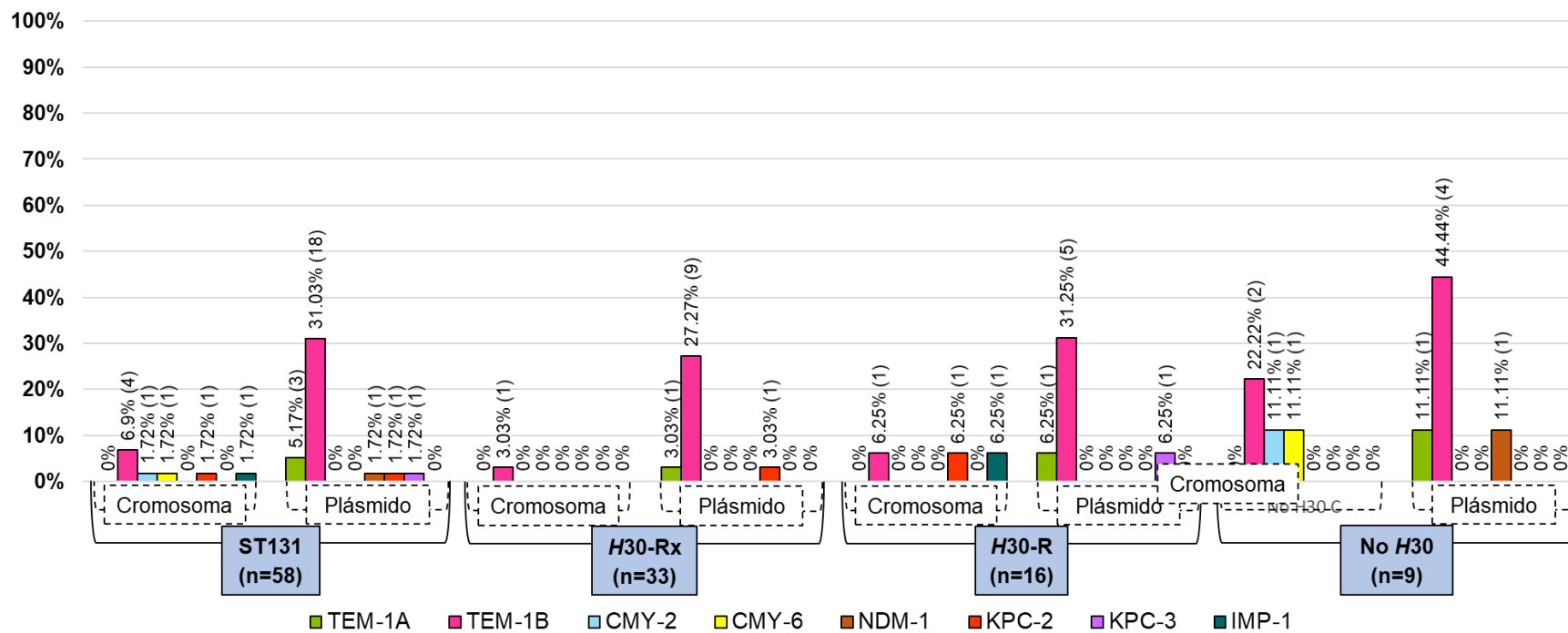
La **gráfica 26** muestra genes de resistencia para fosfonatos, donde el gen *fosA3* se identificó solo en 1 plásmido (1.72%), el gen de *mcr-1.1* que confiere resistencia hacia polimixinas se localizó en 2 plásmidos (3.45%). Para la resistencia hacia diaminopirimidinas y sulfonamidas se reportaron principalmente los genes *dfrA17* en cromosoma (6.9%) y plásmido (43.1%), *dfrA14* en plásmido (5.17%), *sul1* en cromosoma (8.62%) y plásmido (46.55%) y *sul2* en cromosoma (5.17%) y plásmido (24.14%).

El mapa de distribución de los genes se presenta en los **anexos 7 y 8**.

Genes de resistencia a betalactámicos

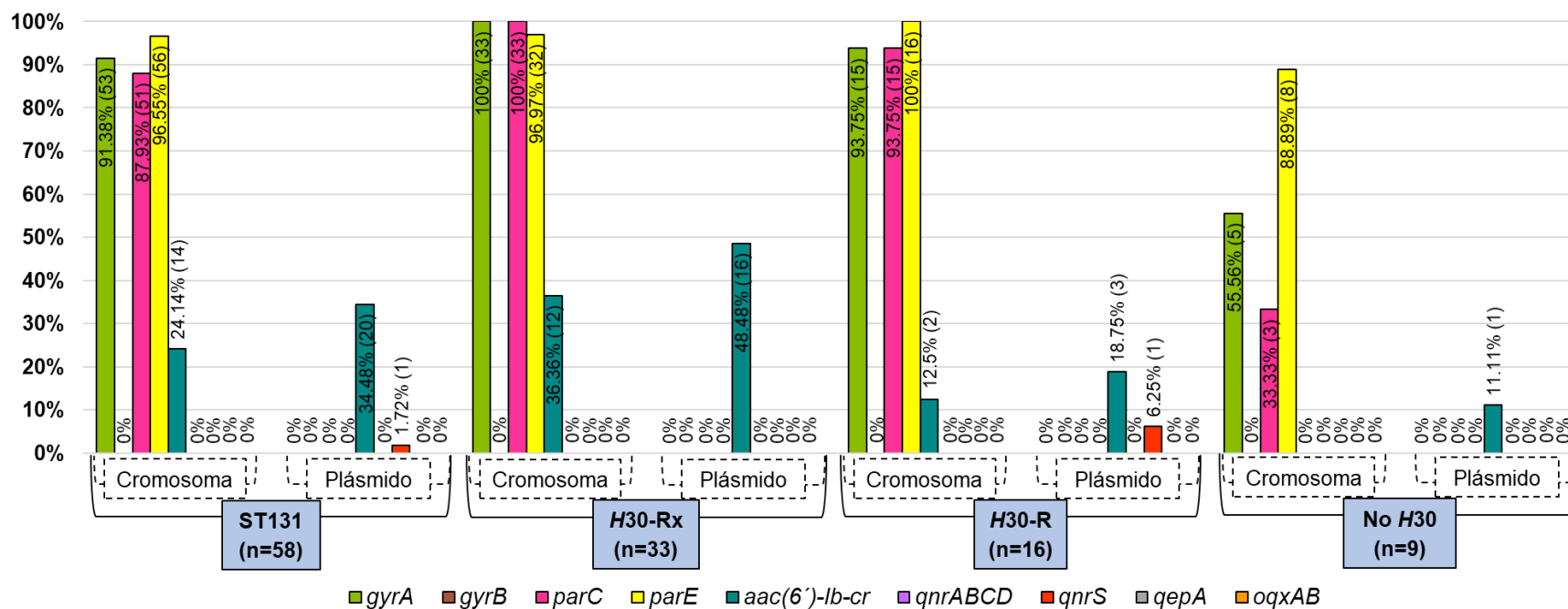


Gráfica 21. Distribución de genes asociados a resistencia a betalactámicos (*bla*_{CTX-M-3}–*bla*_{OXA-9}).



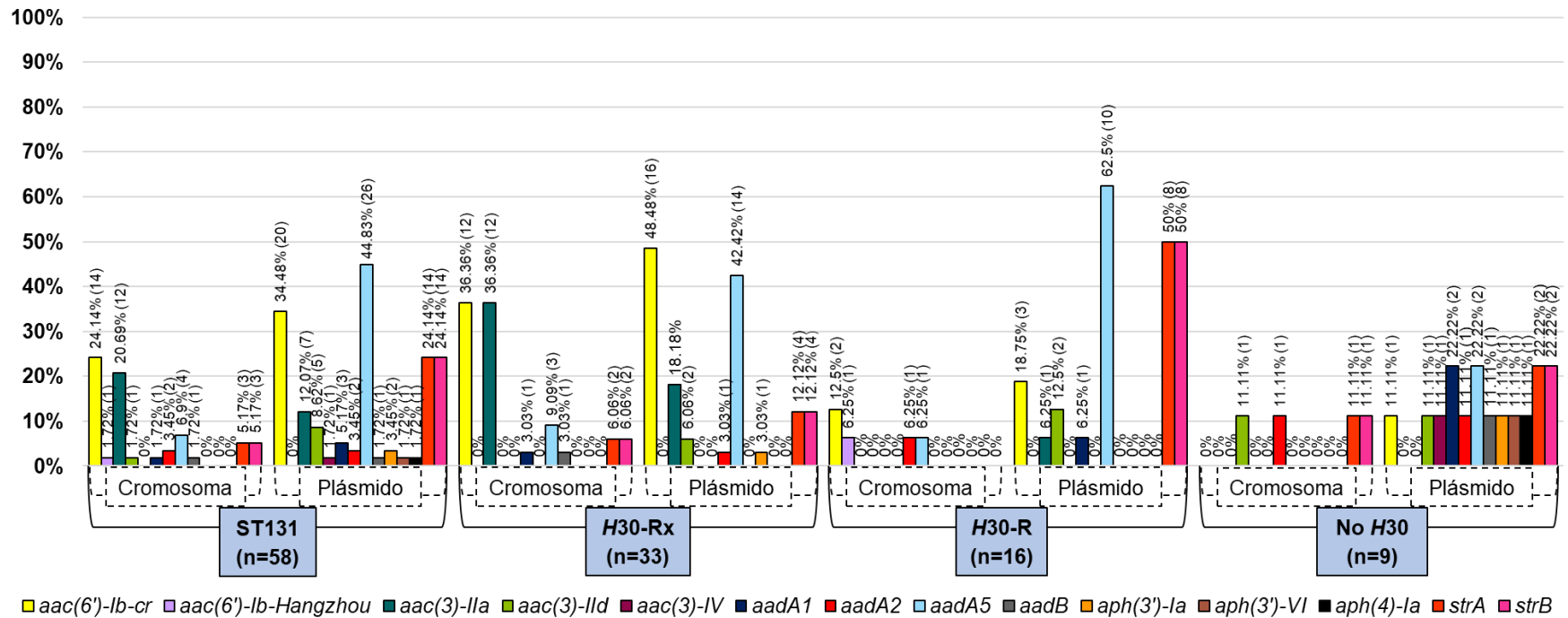
Gráfica 22. Distribución de genes asociados a resistencia a betalactámicos ($bla_{TEM-1A} - bla_{IMP-1}$).

Genes de resistencia a quinolonas



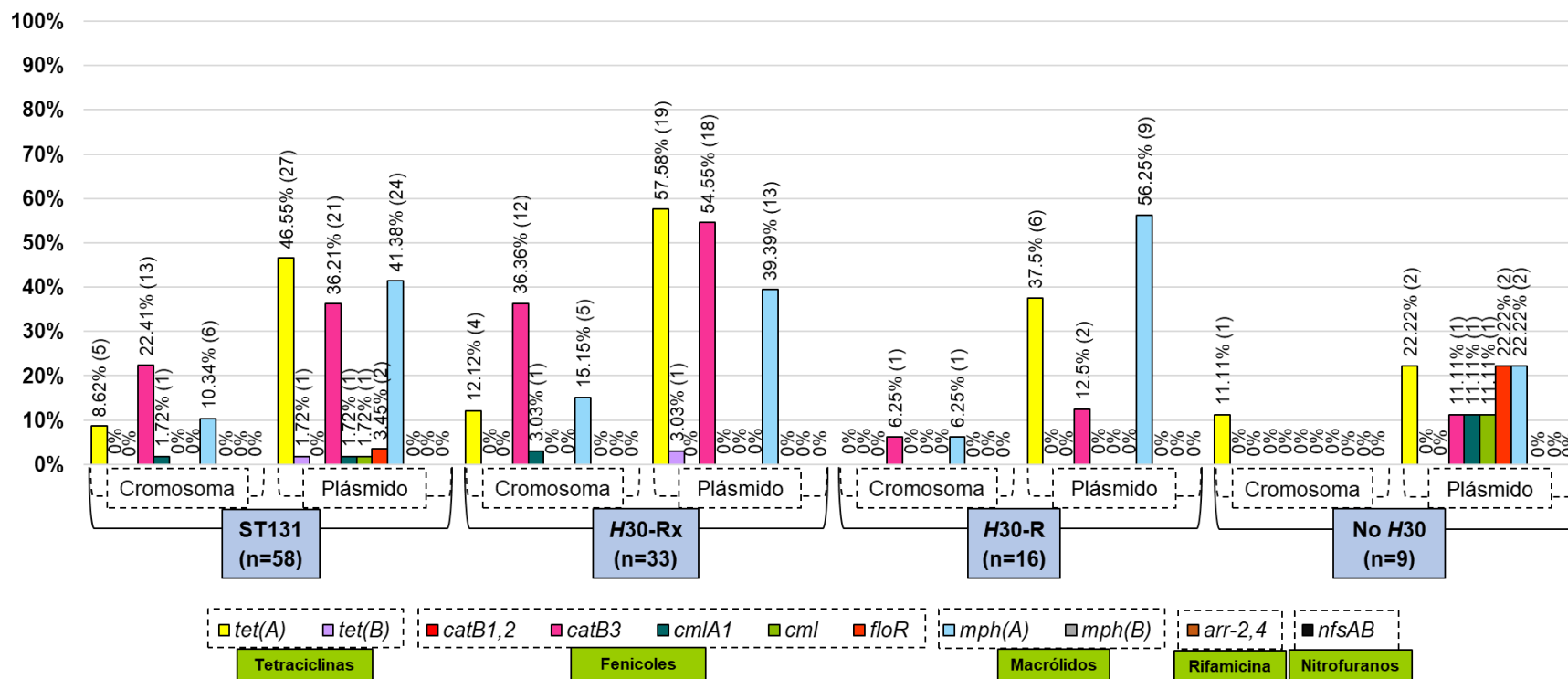
Gráfica 23. Distribución de genes asociados a resistencia a quinolonas.

Genes de resistencia a aminoglucósidos



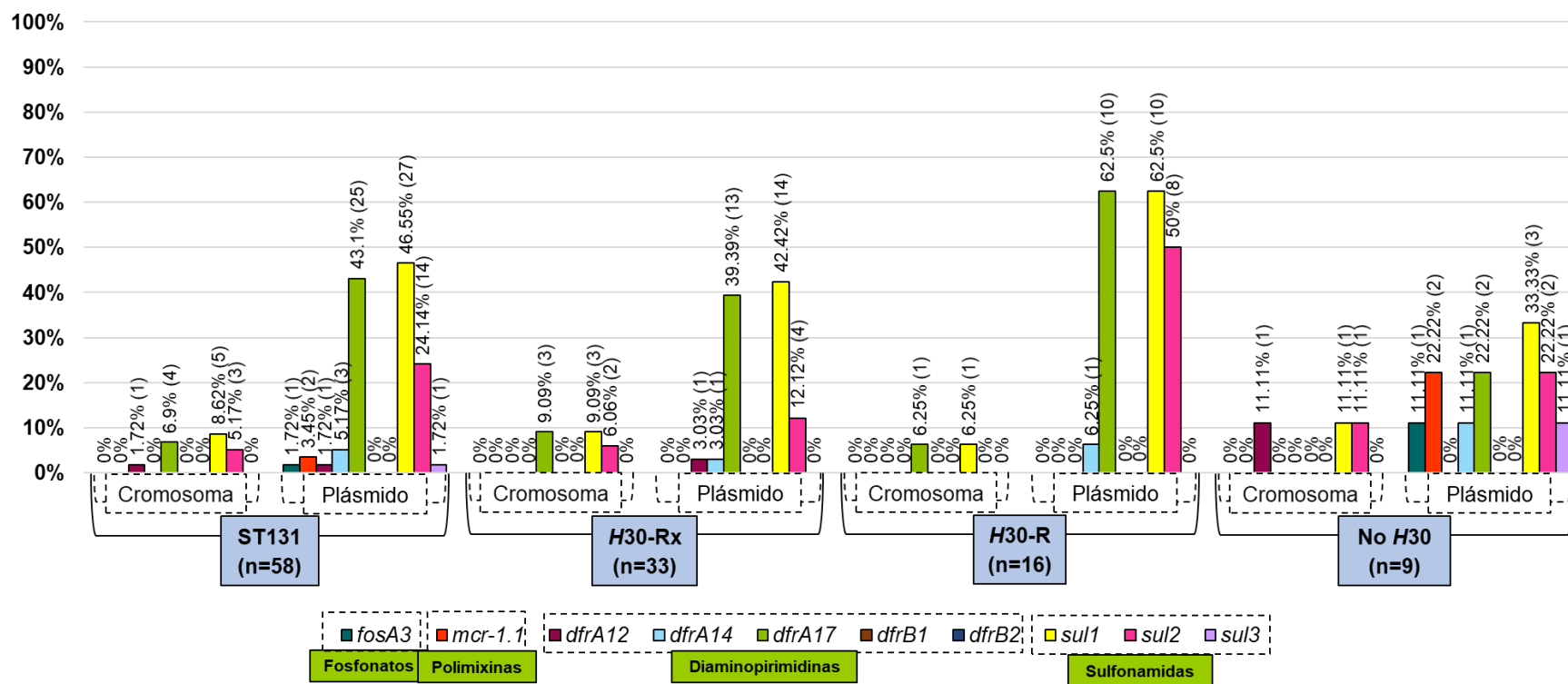
Gráfica 24. Distribución de genes asociados a resistencia a aminoglucósidos.

Genes de resistencia a tetraciclinas, fenicoles, macrólidos, rifamicina y nitrofuranos.



Gráfica 25. Distribución genes asociados a resistencia a tetraciclinas, fenicoles, macrólidos, rifamicina y nitrofuranos.

Genes de resistencia a fosfonatos, polimixinas, diaminopirimidinas y sulfonamidas.

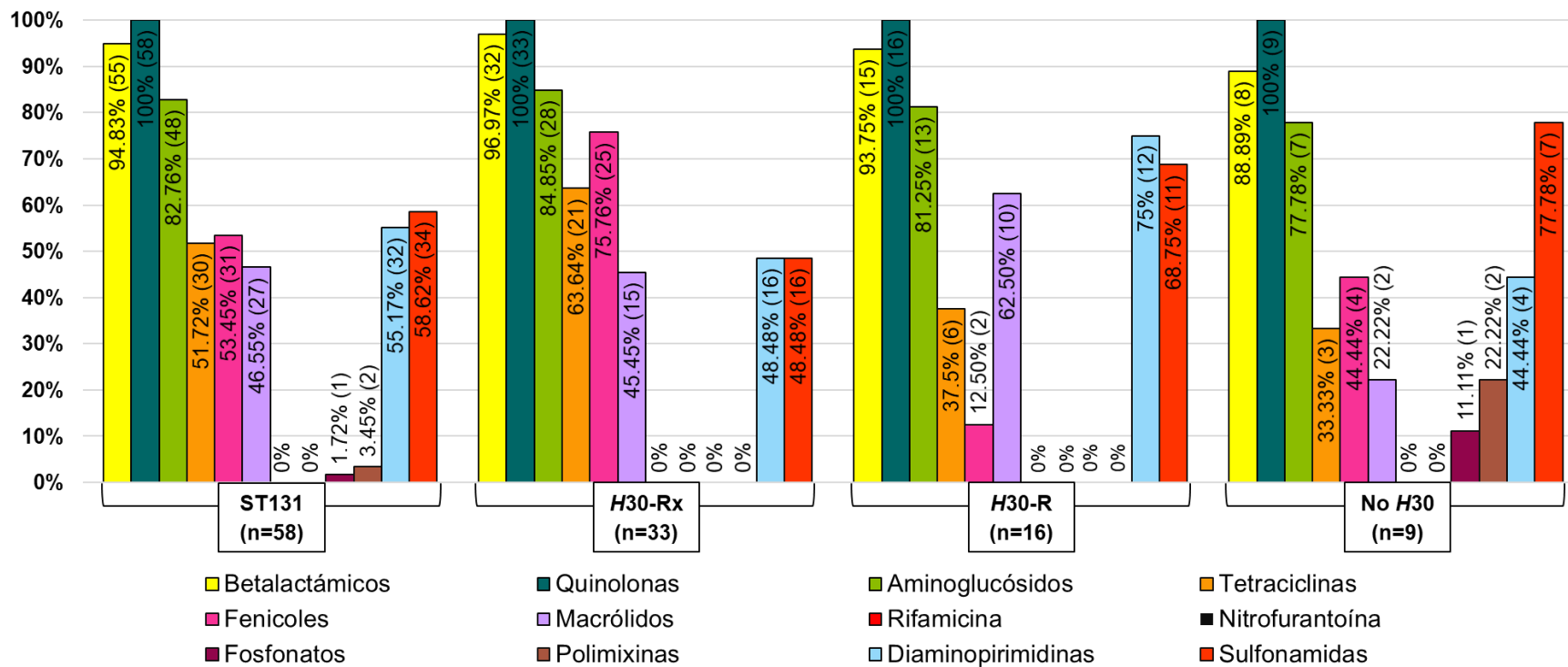


Gráfica 26. Distribución genes asociados a resistencia a fosfonatos, polimixinas, diaminopirimidinas y sulfonamidas.

Se identificó en número de familias a las que presentaba resistencia cada uno de los genomas. El **anexo 9** muestra las familias de antibióticos evaluadas (12) y la presencia/ausencia de resistencia hacia ellas. La **tabla 46** y **gráfica 27** indican la distribución de las familias por categorías.

Tabla 46. Distribución del genotipo de resistencia a 12 familias de antibióticos en los genomas de *E.coli* O25:H4 ST131.

Familia de antibióticos	ST131 n=58 (%)	H30-Rx n=33 (%)	H30-R n=16 (%)	No H30 n=9 (%)
Betalactámicos	55 (94.83)	32 (96.97)	15 (93.75)	8 (88.89)
Quinolonas	58 (100)	33 (100)	16 (100)	9 (100)
Aminoglucósidos	48 (82.76)	28 (84.85)	13 (81.25)	7 (77.78)
Tetraciclinas	30 (51.72)	21 (63.64)	6 (37.5)	3 (33.33)
Fenicoles	31 (53.45)	25 (75.76)	2 (12.5)	4 (44.44)
Macrólidos	27 (46.55)	15 (45.45)	10 (62.5)	2 (22.22)
Rifamicina	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Nitrofurantoína	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Fosfonatos	1 (1.72)	0 (0)	0 (0)	1 (11.11)
Polimixinas	2 (3.45)	0 (0)	0 (0)	2 (22.22)
Diaminopirimidinas	32 (55.17)	16 (48.48)	12 (75)	4 (44.44)
Sulfonamidas	34 (58.62)	16 (48.48)	11 (68.75)	7 (77.78)



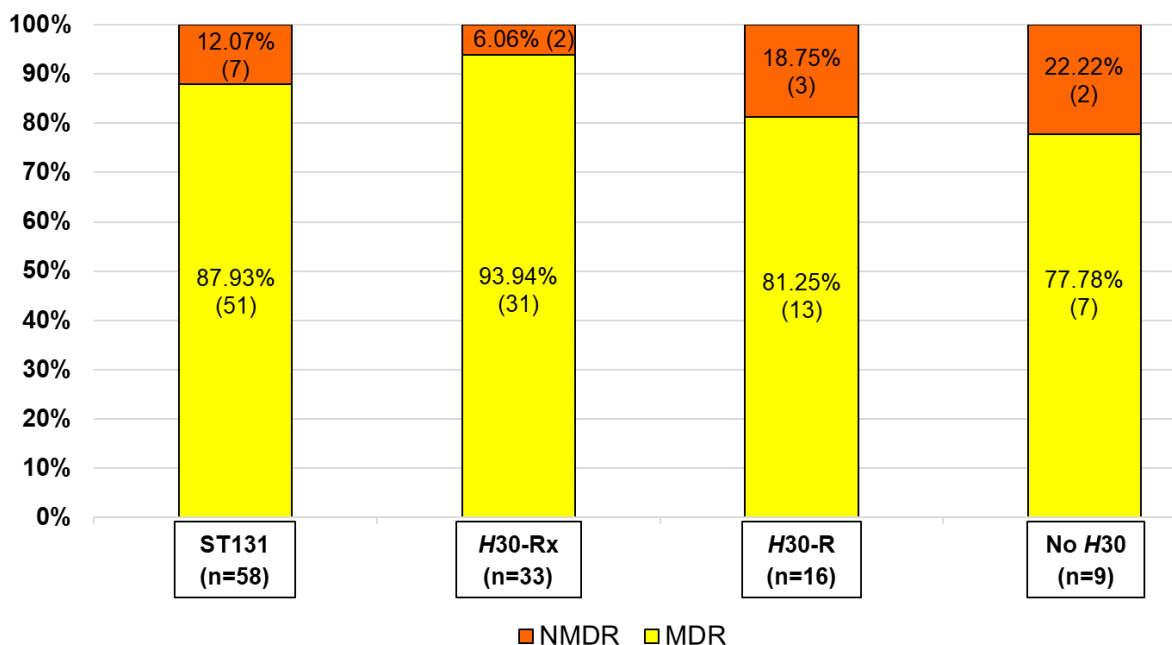
Gráfica 27. Distribución del perfil genotípico de resistencia a 12 familias de antibióticos en los genomas de estudio.

La clasificación por perfil de resistencia se realizó de acuerdo con las categorías propuestas por Magiorakos *et al.* La mayoría de genomas ST131 se agrupó dentro de las MDR (87.93%). Dentro de los subclones de estudio, *H30-Rx* presentó el porcentaje más elevado de MDR (93.94%). Los genomas **SK1144** (Japón, No *H30*) y **55989** (Pakistán, *H30-Rx*) presentaron resistencia únicamente hacia quinolonas mientras que **SA186** (Arabia Saudita, No *H30*) portaba determinantes que le permitieron asociarse con resistencia hacia 9 familias, siendo la mayor cantidad reportada (**anexo 9**). Ningún genoma presentó genes o mutaciones que le confirieran resistencia a rifamicinas o nitrofuranos por lo que no se reportaron genomas dentro de las categorías XDR o PDR. La **tabla 47** y **gráfica 28** muestran la distribución de cepas NMDR y MDR.

Tabla 47. Distribución de genomas MDR y NMDR.

Categorías de Magiorakos	ST131 n=58 (%)	<i>H30-Rx</i> n=33 (%)	<i>H30-R</i> n=16 (%)	No <i>H30</i> n=9 (%)
NMDR	7 (12.07)	2 (6.06)	3 (18.75)	2 (22.22)
MDR	51 (87.93)	31 (93.94)	13 (81.25)	7 (77.78)

MDR=multidrogoresistente, NMDR=no multidrogoresistente.



Gráfica 28. Distribución de genomas MDR y NMDR. La clasificación se realizó utilizando los criterios propuestos por Magiorakos *et al.*, y no se tomaron en cuenta las clasificaciones XDR y PDR debido a que todos los genomas carecieron de genes de resistencia para rifamicina y nitrofuranos.

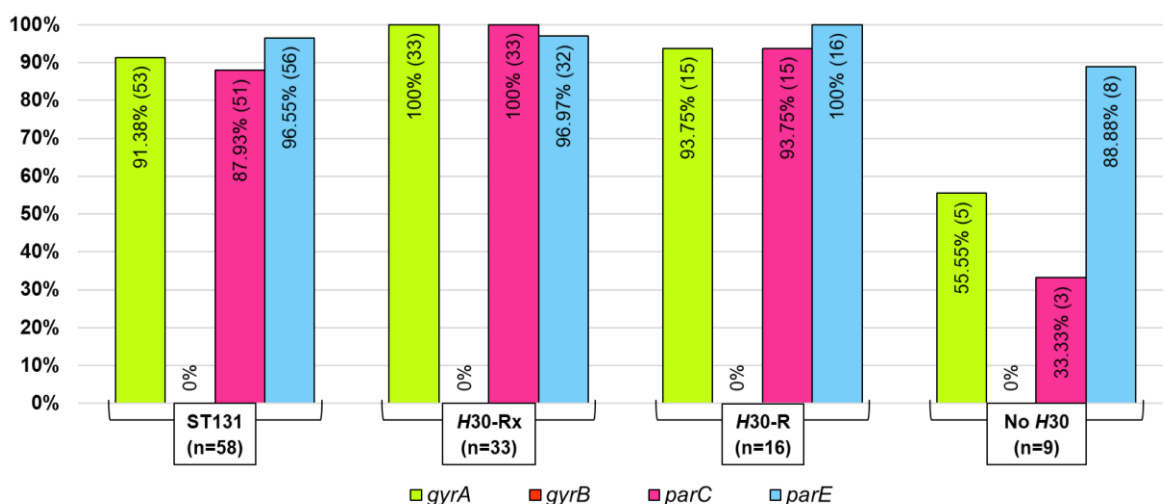
7.2.15. Identificación de mutaciones en girasa y topoisomerasa IV

La plataforma ResFinder 4.1 permitió identificar los genomas que presentaron mutaciones en los genes *gyrA* (91.38%), *gyrB* (0%), *parC* (87.93%) y *parE* (96.55%) causantes de resistencia a FQ (**tabla 48, gráfica 29**). Posteriormente se localizaron las sustituciones de aminoácidos específicas y la frecuencia de estas en cada subclón de estudio (**tabla 49, gráfica 30**). Los datos de las sustituciones en cada genoma se muestran en el **anexo 10**.

Tabla 48. Mutaciones en los genes de girasa y topoisomerasa IV.

Gen	ST131 n=58 (%)	H30-Rx n=33 (%)	H30-R n=16 (%)	No H30 n=9 (%)
<i>gyrA</i>	53 (91.38)	33 (100)	15 (93.75)	5 (55.55)
<i>gyrB</i>	-	-	-	-
<i>parC</i>	51 (87.93)	33 (100)	15 (93.75)	3 (33.33)
<i>parE</i>	56 (96.55)	32 (96.97)	16 (100)	8 (88.88)

El gen *gyrB* no presentó mutaciones asociadas con resistencia hacia FQ.

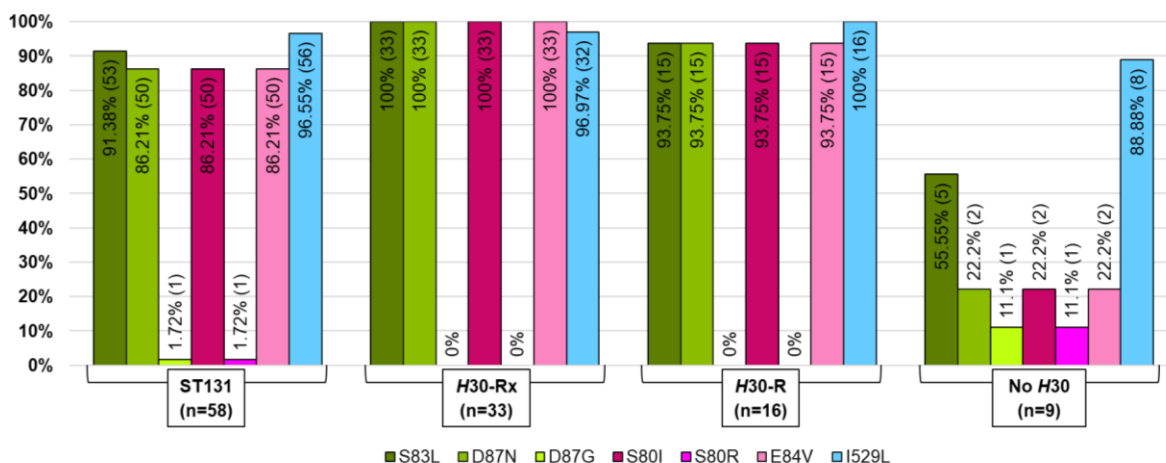


Gráfica 29. Porcentaje de cepas con mutaciones en girasa y topoisomerasa IV relacionadas con la resistencia a FQ. No se reportaron cambios en el gen *gyrB*. Se utilizó el programa ResFinder 4.1.

Tabla 49. Mutaciones específicas en los genes de girasa y topoisomerasa IV.

Gen	Mutaciones	ST131 n=58 (%)	H30-Rx n=33 (%)	H30-R n=16 (%)	No H30 n=9 (%)
<i>gyrA</i>	S83L	53 (91.38)	33 (100)	15 (93.75)	5 (55.55)
	D87N	50 (86.21)	33 (100)	15 (93.75)	2 (22.22)

	D87G	1 (1.72)	0 (0)	0 (0)	1 (11.11)
<i>gyrB</i>	-	-	-	-	-
<i>parC</i>	S80I	50 (86.21)	33 (100)	15 (93.75)	2 (22.22)
	S80R	1 (1.72)	0 (0)	0 (0)	1 (11.11)
	E84V	50 (86.21)	33 (100)	15 (93.75)	2 (22.22)
<i>parE</i>	I529L	56 (96.55)	32 (96.97)	16 (100)	8 (88.88)



Gráfica 30. Mutaciones específicas en los genes *gyrA*, *parC* y *parE* asociadas con resistencia a FQ.

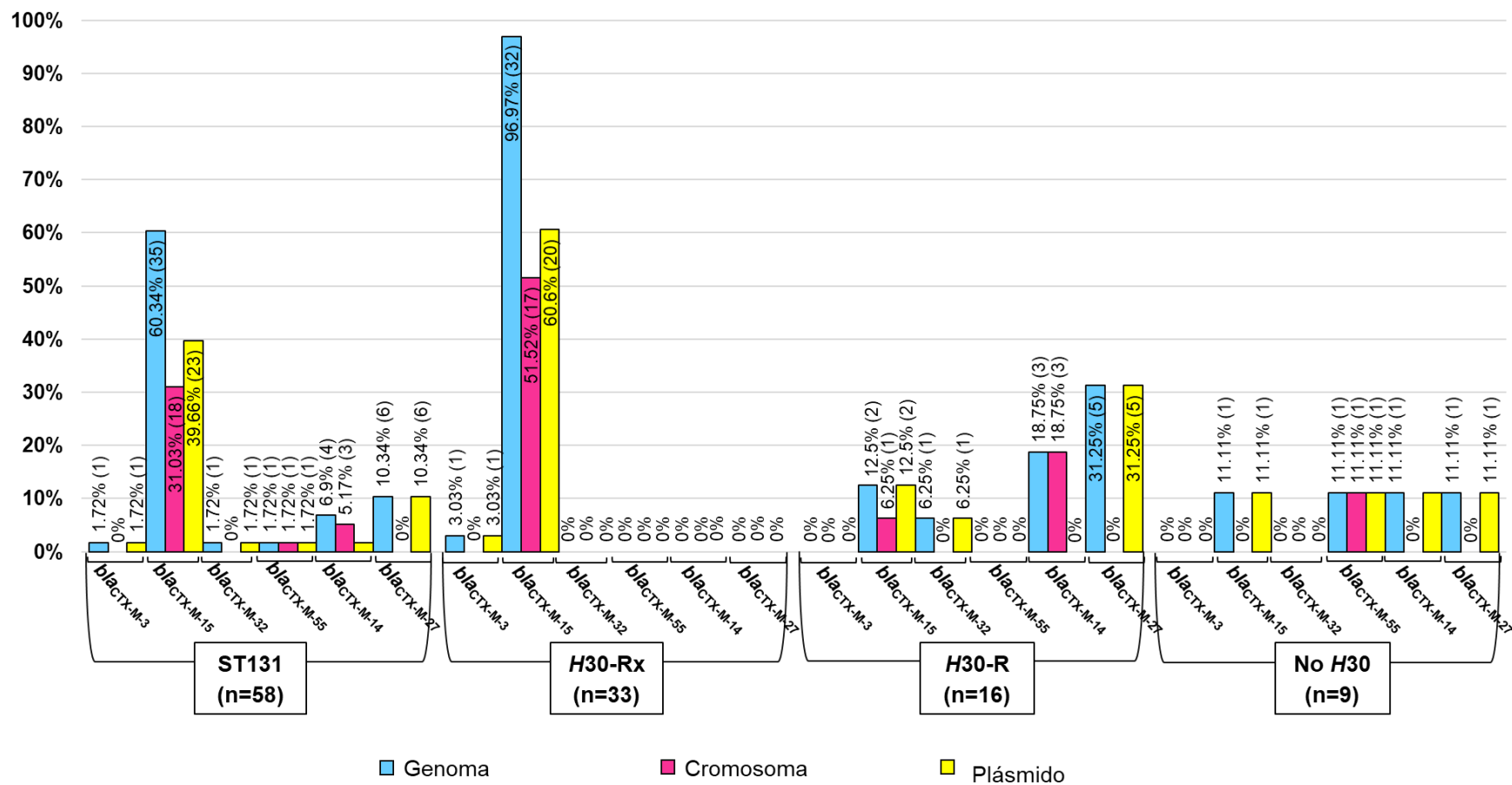
7.2.16. Búsqueda de variantes en genes *bla*_{CTX-M}, asociación con las secuencias de inserción IS 26 e IS *Ecp1* y determinación de grupo (1, 2, 8 y 9)

Con los resultados obtenidos mediante ResFinder 4.1, se identificaron las variantes *bla*_{CTX-M} y se visualizó su ubicación en el genoma con SnapGene Viewer 5.2.4, los resultados se muestran en la **tabla 50** y **gráfica 31**. El gen *bla*_{CTX-M-15} fue el más prevalente (60.34%), en las ubicaciones cromosómica (31.03%) y plasmídica (39.66%), seguido de *bla*_{CTX-M-27} (10.34%), localizado sólo en plásmido y *bla*_{CTX-M-14} (6.9%) en cromosoma (5.17%) y plásmido (1.72%). El gen *bla*_{CTX-M-15} se presentó en 96.97% de los genomas que forman el subclón *H30-Rx* y *bla*_{CTX-M-27} en 31.25% de los genomas *H30-R*.

Tabla 50. Variantes de *bla*_{CTX-M} identificadas en los genomas de estudio.

Variante <i>bla</i> _{CTX-M}	ST131 n=58 %			H30-Rx n=33 %			H30-R n=16 %			No H30 n=9 %		
	G	C	P	G	C	P	G	C	P	G	C	P
CTX-M-3	1 1.72	0 0	1 1.72	1 3.03	0 0	1 3.03	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
CTX-M-15	35 60.34	18 31.03	23 39.66	32 96.97	17 51.52	20 60.6	2 12.5	1 6.25	2 12.5	1 11.11	0 0	1 11.11
CTX-M-32	1 1.72	0 0	1 1.72	0 0	0 0	0 0	1 6.25	0 0	1 6.25	0 0	0 0	0 0
CTX-M-55	1 1.72	1 1.72	1 1.72	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	1 11.11	1 11.11	1 11.11
CTX-M-14	4 6.9	3 5.17	1 1.72	0 0	0 0	0 0	3 18.75	3 18.75	0 0	1 11.11	0 0	1 11.11
CTX-M-27	6 10.34	0 0	6 10.34	0 0	0 0	0 0	5 31.25	0 0	5 31.25	1 11.11	0 0	1 11.11

G=genoma, C=cromosoma, P=plásmido



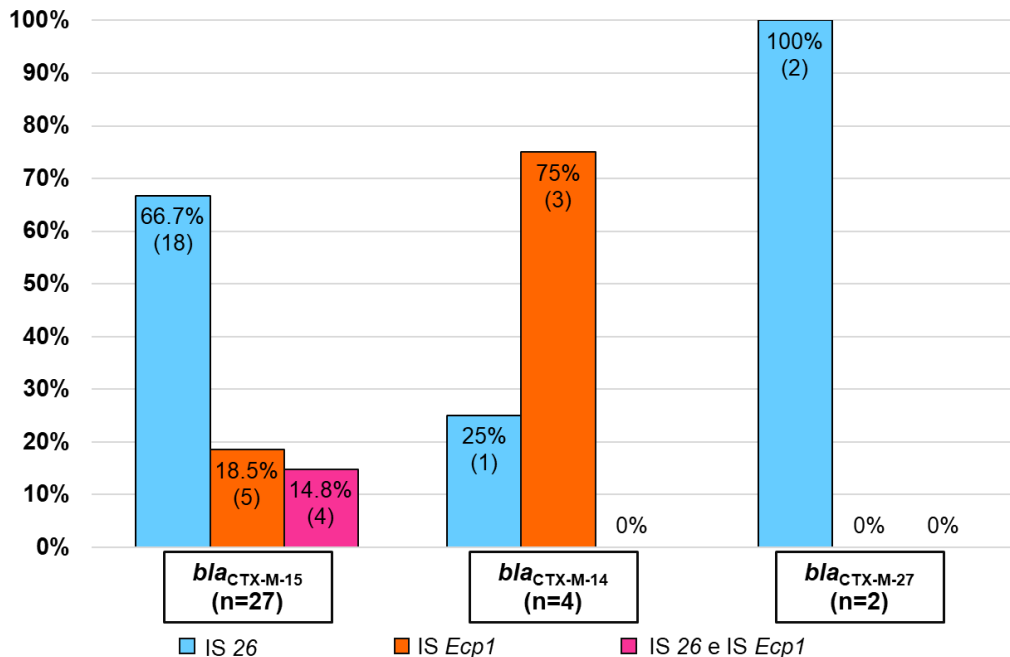
Gráfica 31. Presencia de variantes de los genes *bla*_{CTX-M} y localización genómica, cromosómica y plasmídica. Se evaluó la presencia de 6 genes *bla*_{CTX-M} en todos los genomas/ST131 (n=58), así como en los 3 subclones de estudio, los resultados se reportaron por su ubicación en el genoma, así como en cromosoma y plásmido.

Posteriormente, se analizó la asociación que presentaron los genes *bla*_{CTX-M} más reportadas en este trabajo (*bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{CTX-M-14} y *bla*_{CTX-M-27}) con las secuencias de inserción IS 26 e IS *Ecp1*. Previamente se identificó la ubicación de los genes *bla*_{CTX-M} con los resultados reportados con ResFinder 4.1 y se utilizaron oligonucleótidos específicos para identificar las IS en una distancia de hasta 2 kb río arriba y río abajo. Se analizó el contexto genómico existente entre ambos elementos en 27 genes *bla*_{CTX-M-15}, 4 genes *bla*_{CTX-M-14} y 2 genes *bla*_{CTX-M-27} en los que se visualizó su secuencia de nucleótidos con SnapGene Viewer 5.2.4 (**tabla 51, gráfica 32**). Se observó una fuerte relación de *bla*_{CTX-M-15} con IS 26 (66.7%), *bla*_{CTX-M-14} con IS *Ecp1* (75%) y *bla*_{CTX-M-27} con IS 26 (100%).

Tabla 51. Asociación entre *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{CTX-M-14} y *bla*_{CTX-M-27} con las secuencias de inserción IS26 e IS*Ecp1*.

IS	<i>bla</i> _{CTX-M-15} n=27 (%)	<i>bla</i> _{CTX-M-14} n=4 (%)	<i>bla</i> _{CTX-M-27} n=2 (%)
IS26	18 (66.7%)	1 (25%)	2 (100%)
IS <i>Ecp1</i>	5 (18.5%)	3 (75%)	0 (0%)
IS26 e IS <i>Ecp1</i>	4 (14.8%)	0 (0%)	0 (0%)

IS=secuencias de inserción



Gráfica 32. Asociación entre *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{CTX-M-14} y *bla*_{CTX-M-27} con las secuencias de inserción IS26 e IS*Ecp1*. Se muestra la distribución de los genes codificantes de CTX-M-15, CTX-M-14 y CTX-M-27. La asociación de cada variante con una IS sola o en combinación se marca con los colores azul, si se trata de IS26, naranja si es IS*Ecp1* y rosa si se presentan ambas IS.

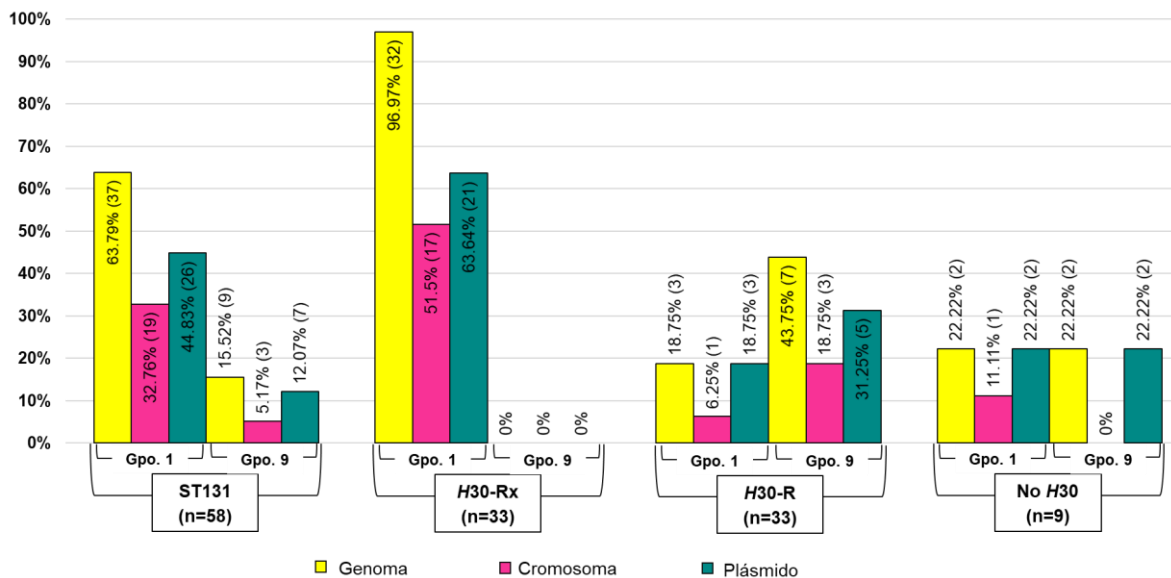
Se identificaron los grupos a los cuales pertenecen las variantes *bla*_{CTX-M} reportadas de acuerdo con la **tabla 3**, realizada en base a lo publicado por Cantón *et al.*, 2012; D'Andrea *et al.*, 2013; Mamani, 2015, donde los genes *bla*_{CTX-M-3}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{CTX-M-32} y *bla*_{CTX-M-55} pertenecieron al grupo 1 y *bla*_{CTX-M-14} junto con *bla*_{CTX-M-27} al grupo 9. No se identificaron genes pertenecientes a los grupos 2 y 8.

Los resultados se identificaron en genoma, plásmido y cromosoma (**tabla 52**, **gráfica 33**). Se encontró que el subclón *H30-Rx* porta únicamente genes del grupo 1 (96.97%) mientras que *H30-R* presenta genes del grupo 9 (43.75%) y 1 (18.75%) y el No *H30* también reporta genomas con las variantes 1 y 9 (22.22% cada una).

Tabla 52. Genes *bla*_{CTX-M} pertenecientes a los grupos 1, 2, 8 y 9 localizados en el genoma, cromosoma y plásmidos.

Grupo	ST131 n=58 %			<i>H30-Rx</i> n=33 %			<i>H30-R</i> n=16 %			No <i>H30</i> n=9 %		
	G	C	P	G	C	P	G	C	P	G	C	P
1	37 63.79	19 32.76	26 44.83	32 96.97	17 51.5	21 63.64	3 18.75	1 6.25	3 18.75	2 22.22	1 11.11	2 22.22
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	9 15.52	3 5.17	7 12.07	0 0	0 0	0 0	7 43.75	3 18.75	5 31.25	2 22.22	0 0	2 22.22

G=genoma, C=cromosoma, P=plásmido



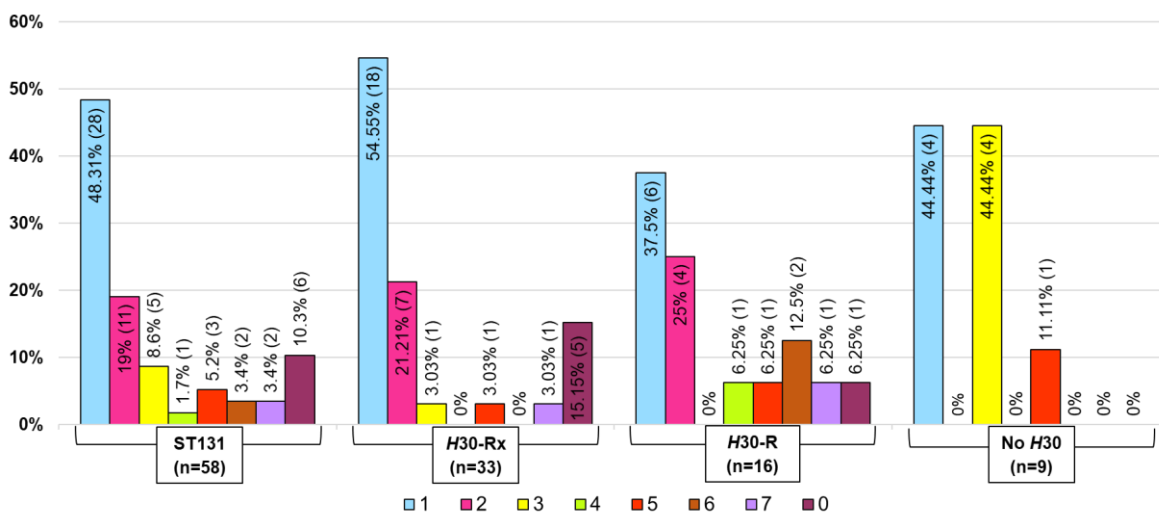
Gráfica 33. Distribución los grupos 1 y 9 de *bla*_{CTX-M}. Se muestran los resultados de la identificación en el genoma (amarillo), así como los porcentajes asociados con la ubicación en

cromosoma (rosa) y plásmido (turquesa). No se reportaron variantes asociadas con los grupos 2 y 8, por lo que se omiten en la gráfica.

El **anexo 11** muestra todos los datos reportados en esta sección.

7.2.17. Identificación y caracterización de plásmidos en los genomas de estudio

Se determinó la cantidad de plásmidos albergados en los genomas de estudio (**tabla 53/anexo 13, gráfica 34**), reportando la presencia de 110 plásmidos cerrados en 52 genomas (89.7%), con cantidades de 1-7 plásmidos por cepa, principalmente aquellas con 1 (48.1%) y 2 (19%). Respecto a los subclones, en todos se mantuvieron predominantes los genomas con 1 plásmido (37.5-54.55%) y para las No *H30* también aquellos con 3 (44.44%). Las cepas no portadoras se agruparon principalmente en *H30*-Rx (15.15%).

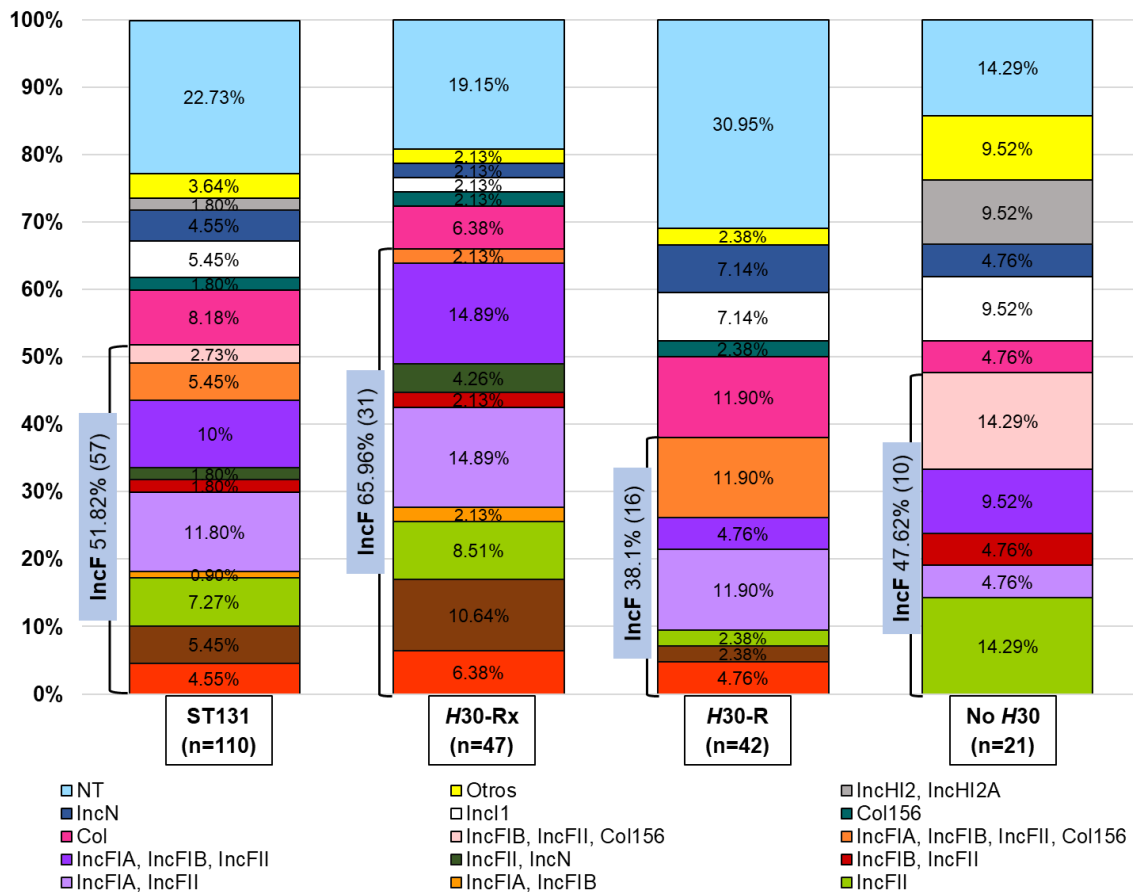


Gráfica 34. Distribución del número de plásmidos reportados en los genomas de estudio.

7.2.17.1. Identificación de replicones

La caracterización de plásmidos en base a replicones se realizó con el programa PlasmidFinder 2.1. Los genomas de estudio portadores de plásmido (n=52) albergaron un total de 110 elementos, distribuidos en los subclones *H30*-Rx (n=47), *H30*-R (n=42) y No *H30* (n=21). El grupo de incompatibilidad predominante fue IncF (51.82%), generalmente en las composiciones de multirreplicones IncFIA, IncFII

(11.8%), IncFIA, IncFIB, IncFII (10%) e IncFII como el replicón único predominante (7.27%). También se detectaron replicones del tipo Col (10%), Incl1 (5.45%) y 25 plásmidos (22.73%) no fueron tipificables. IncF también predominó en el subclón *H30-Rx* (65.96%), en *H30-R* (38.1%) y no *H30* (62%). *H30-R* fue el subclón que presentó la mayor cantidad de plásmidos no tipificables (30.95%) (tabla 54/anexo 13, gráfica 35).

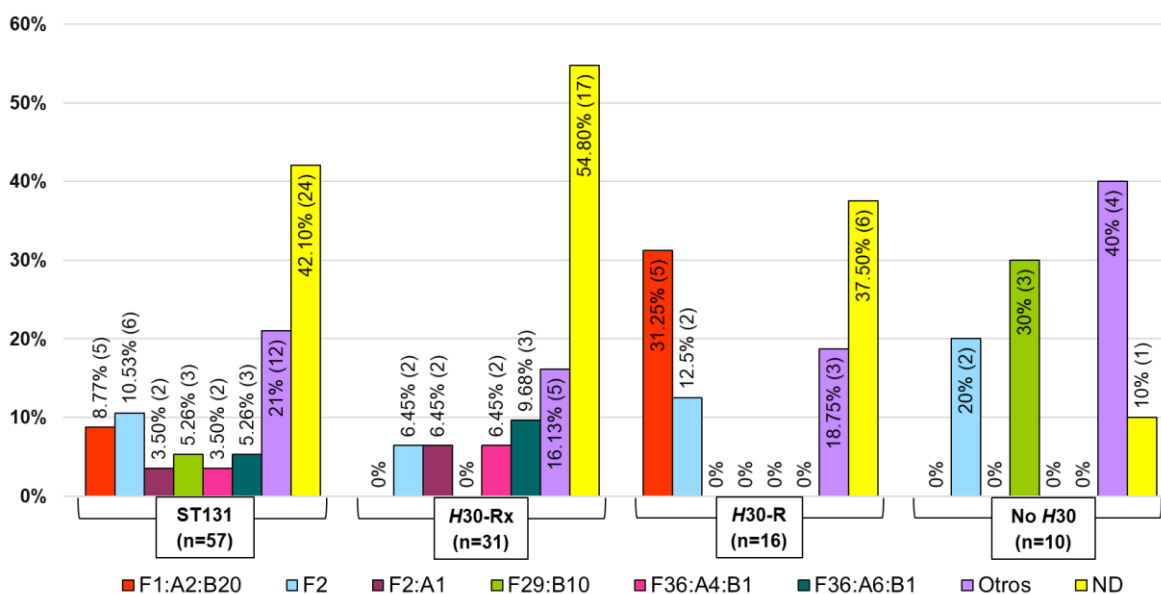


Gráfica 35. Prevalencia de replicones en el cepario de estudio. Se identificaron 110 plásmidos cerrados en los genomas ST131 (n=58), con replicones del grupo IncF como los más reportados (51.82%). IncF también predominó en el subclón *H30-Rx*, en *H30-R* y no *H30*. *H30-R* también presentó la mayor cantidad de plásmidos no tipificables (NT).

7.2.17.2. Determinación de la secuencia tipo plasmídica (pMLST)

El uso de PlasmidFinder 2.1 permitió seleccionar los plásmidos que pertenecen al grupo IncF en el total de genomas analizados/ST131 (n=57), así como los subclones de estudio *H30-Rx* (n=31), *H30-R* (n=16) y No *H30* (n=10).

La determinación de secuencia tipo o ST para los plásmidos IncF se realizó identificando los alelos más prevalentes de los replicones FIIA (F), FIA (A) y FIB (B) (tipificación FAB) en las cepas ST131, así como en subclones, con la finalidad de conocer la prevalencia de plásmidos con combinaciones alélicas específicas en cada uno de los grupos de estudio (**tabla 55/anexo 13, gráfica 36**). El alelo predominante fue F2 (10.53%), presente en los 3 subclones, con mayor porcentaje en No *H30* (20%). El subclón *H30-Rx* mostró una asociación específica con F2:A1 (6.45%), F36:A4:B1 (6.45%) y F36:A6:B1 (9.68%), por su parte *H30-R* se asoció con todos los alelos F1:A2:B20 (31.25%) y las No *H30* con F29:B10 (30%).



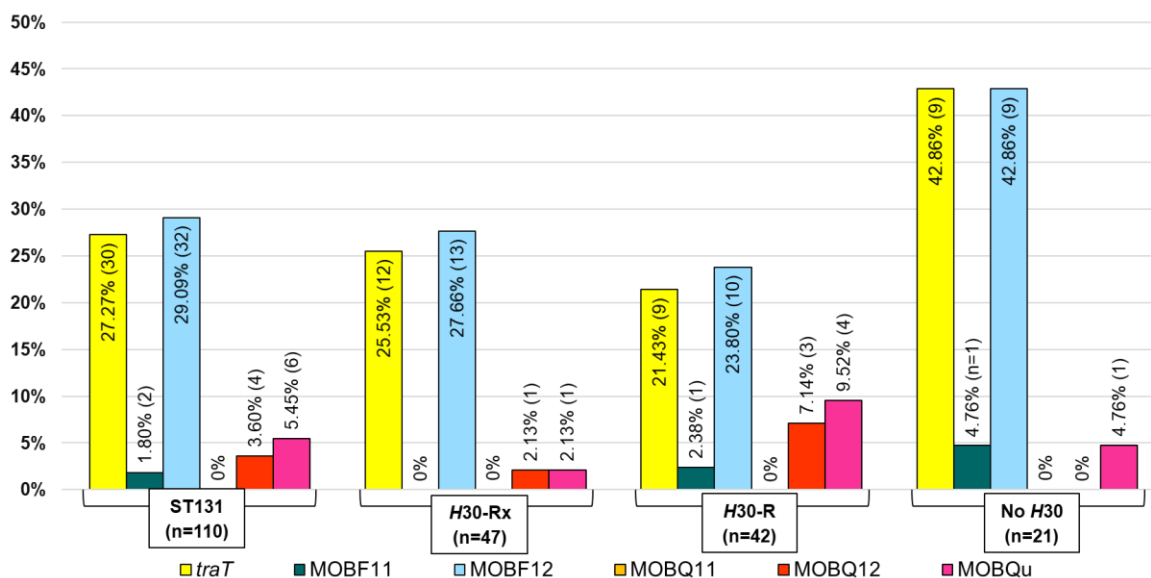
Gráfica 36. Distribución de los alelos FAB asociados a plásmidos IncF en los genomas de estudio. La categoría “Otros” agrupa los alelos reportados en solo 1 plásmido y “ND” a los que no lograron tipificarse con el programa.

7.2.17.3. Búsqueda de relaxasas MOB y *traT* en plásmidos

Conocer la posible capacidad de conjugación y movilidad plasmídica en los plásmidos de estudio se determinó identificando la presencia del gen *traT* y las relaxasas MOB de las familias MOB_F (MOB_{F11}, MOB_{F12}) y MOB_Q (MOB_{Q11}, MOB_{Q12} y MOB_{Qu}), asociadas a plásmidos grandes (>60 kb) y pequeños (<5 kb) en *E. coli*, respectivamente. En la **tabla 56/anexo 13** y **gráfica 37** se observa la presencia y distribución de estos genes.

El gen *traT* fue determinado en 30 plásmidos (27.27%), con mayor presencia en No *H30* (42.86%) y en menor medida en *H30-Rx* (25.53%) y *H30-R* (21.43%). En el análisis de relaxasas MOB_F, la relaxasa MOB_{F12} fue la más reportada (29.09%) y se identificó en los 3 subclones con porcentaje variable (23.8-42.86%) y la relaxasa

MOB_{F11} (1.8%) se agrupó en *H30-R* (2.38%) y No *H30* (4.76%). Referente a la familia MOB_Q, MOB_{Qu} (5.45%) se presentó en los 3 grupos, con mayor presencia en plásmidos *H30-R* (9.52%), MOB_{Q12} (3.6%) se asoció con *H30-R* (7.14%) y *H30-Rx* (2.13%) y MOB_{Q11} no se reportó.

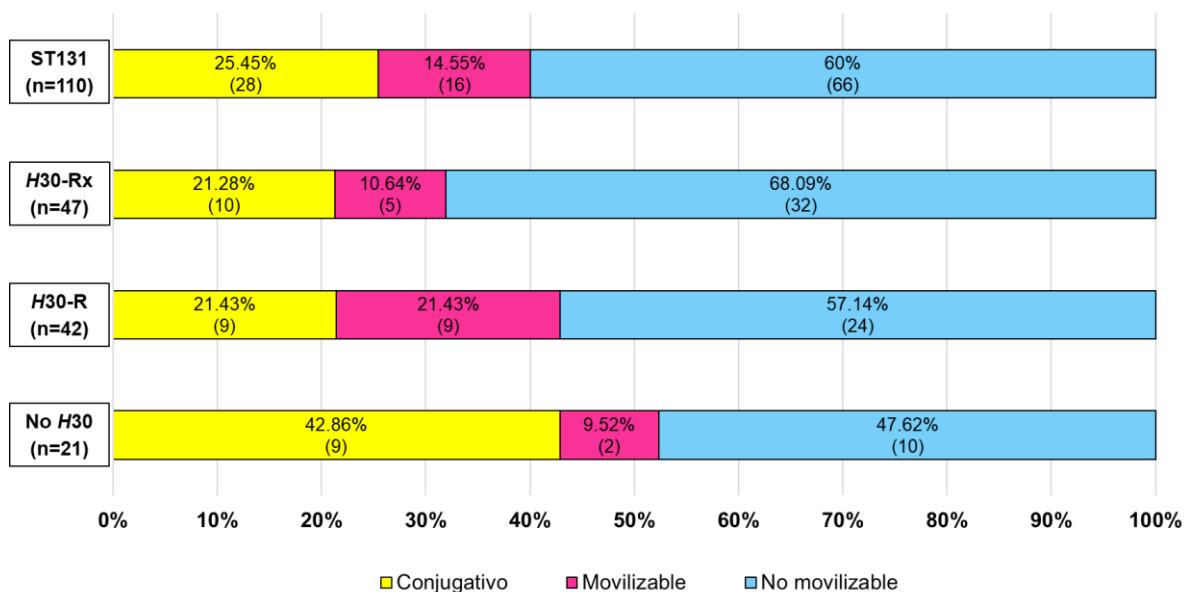


Gráfica 37. Distribución del gen *traT* y las relaxasas MOB_F y MOB_Q en los genomas de estudio.

Con los datos obtenidos identificamos los plásmidos con probable capacidad de conjugación (relaxasa y *traT*), movilizables (relaxasa) y no movilizables (no relaxasa). Los resultados se muestran en la **tabla 57** y **gráfica 38**. El cepario O25:H4 se constituyó por 28 plásmidos con capacidad de conjugación (25.45%), presentes en proporción similar para *H30-Rx* (21.28%) y *H30-R* (21.43%) pero mayores en No *H30* (42.86%). 16 plásmidos se catalogaron como movilizables (14.55%), en su mayoría agrupados en *H30-R* (21.43%) y 66 plásmidos no movilizables (60%), presentes principalmente en *H30-Rx* (68.09%).

Tabla 57. Caracterización de la movilidad plasmídica.

Característica	ST131 n=110 (%)	H30-Rx n=47 (%)	H30-R n=42 (%)	No H30 n=21 (%)
Conjugativo	28 (25.45)	10 (21.28)	9 (21.43)	9 (42.86)
Movilizable	16 (14.55)	5 (10.64)	9 (21.43)	2 (9.52)
No movilizable	66 (60)	32 (68.09)	24 (57.14)	10 (47.62)



Gráfica 38. Caracterización de la movilidad plasmídica.

Todos los resultados referentes a plásmidos se encuentran en el **anexo 12**.

8. DISCUSIÓN

Este trabajo se enfocó en el estudio de cepas O25:H4 ST131. Debido las condiciones actuales provocadas por la pandemia de COVID-19 se realizó en 2 secciones, la primera nombrada de análisis experimental y la segunda de análisis bioinformático. En cada una de ellas se utilizaron ceparios y la búsqueda de características distintas.

La sección experimental consistió en 55 cepas UPEC O25:H4 aisladas de pacientes mexicanos. A 47 cepas se le realizó una extracción de plásmidos, identificando cepas no portadoras (25.53%) y portadoras (74.47%), estas últimas presentaron de 1-6 bandas plasmídicas con tamaños de <0.5 kb (1.4%) a >3.5 kb (4.17%), predominando aquellos con un tamaño de 3-3,5 kb (25%). Mukherjee & Mukherjee realizaron un estudio similar con cepas UPEC, reportando 1-7 plásmidos, con tamaños de 1-12 kb y con un plásmido de 12 kb en todas las cepas. Posteriormente se realizó una PCR para determinar la presencia del gen *bla*_{CTX-M}, identificándose en el 45% de las cepas; sin embargo, los porcentajes de prevalencia son variables dependiendo de la región geográfica, como lo mostraron Dimude & Amyes., Reyna-Flores *et al.*, y Stoesser *et al.*, en trabajos realizados en Escocia (11.3%), Reino Unido (48.84%) y México (96.43%).

Para realizar el análisis bioinformático fue necesario crear un cepario de estudio con genomas de *E.coli* O25:H4. Basándonos en los criterios de selección, se eligieron 58 genomas de cepas aisladas en 14 países y 4 continentes, diversidad similar a la reportada por Nicolas-Chanoine *et al.*, quienes trabajaron con *E. coli* productora de BLEE aislada de 8 países de 3 continentes y Petty *et al.*, que realizaron un análisis en cepas O25 ST131 de 6 países pertenecientes a 4 continentes. Suecia fue el país que presentó la mayoría de los genomas, con 28 (48.28%), seguido de EUA con 12 (20.69%).

Los sitios de aislamiento principales fueron sangre (44.83%), seguido de heces (22.41%) y orina (20.69%), difiriendo con los reportes de Coque *et al.*, Li *et al.*, y Petty *et al.*, donde la orina es el principal origen (53.5-77%), seguido de sangre (14.5-21.2%) y heces (11.11%). Sin embargo, los estudios de Brzuszkiewicz *et al.*, Mao *et al.*, y Vimont *et al.*, han demostrado que las cepas *E. coli* O25:H4 se asocian a diversas patologías que van desde cistitis no complicadas hasta sepsis, siendo los agentes causales más comunes de las ITU, también se sabe que estas cepas tienen la capacidad de habitar en TGI, considerado el principal reservorio para las cepas UPEC.

Se identificaron los valores mínimos (4.83 Mb) y máximos (7.57 Mb) del tamaño del cromosoma, con un promedio de 5.27 Mb. Estos resultados son similares a lo reportado por Desmarchelier & Fegan, quienes mostraron que las cepas *E. coli* patógenas poseen genomas con un tamaño cercano a 5.4 Mb, en comparación de las comensales (4.5 Mb), principalmente por adquisición de material genético que les ha permitido adaptarse a nuevos nichos.

Se realizó la confirmación de serotipo (SerotypeFinder), coincidiendo con los datos previos (100%). Las interacciones entre el antígeno O y el sistema inmunológico son importantes para determinar la ventaja selectiva de cada clon ya que está sujeto a una intensa selección por parte del sistema inmunológico del huésped, llevando a la selección de solo unas pocas variantes (Reeves, 1995). En los estudios realizados por Ciesielczuk *et al.*, y Rosenberg *et al.*, el serogrupo O25 es uno de los más prevalentes en cepas ExPEC, mientras que el serotipo H4 tiene un papel en el aumento de la adherencia e invasión de las células de la vejiga y la estimulación de IL-10 (Kakkanat *et al.*, 2015). Además, las cepas de *E. coli* que ingresan al tracto urinario, se enfrentan a obstáculos durante la colonización que causan cuellos de botella poblacionales, reduciendo la diversidad y seleccionando clones aptos, entre ellos O25:H4 (Hannan *et al.*, 2012), el cual se sabe porta diversos genes para la adhesión, evasión de la defensas y adquisición de hierro.

Todos los genomas de estudio pertenecieron al filogrupo B2 (100%). Trabajos anteriores realizados por Biggel *et al.*, Carattoli *et al.*, y Ochoa *et al.*, coinciden en la asociación de cepas ExPEC y/o O25:H4 con los filogrupos B2 (39-96.4%); sin embargo, el filogrupo D también suele reportarse en estas cepas (3.6-54.9%). La nula detección de genomas del filogrupo G concuerda con resultados que lo han asociado más a ciertos serotipos específicos (O24:H4, O33:H4, O114:H4, O119:H4 y O143:H4) (Clermont *et al.*, 2019).

La tipificación de secuencias multilocus (MLST) proporciona información complementaria y útil, ya que nos permite caracterizar las cepas en complejos clonales y secuencias tipo (Beghain *et al.*, 2018). En este trabajo se identificaron 56 cepas (96.55%) ST131 y 2 cepas (3.45%) ST2279. Hertz *et al.*, reportaron que ST2279 se ha relacionado con cepas no productoras de BLEE (7%) y se diferencia de ST131 en el locus *purA*, portando el alelo *purA*_8, mientras que ST131 contiene el alelo *purA*_28; sin embargo, ambas ST pertenecen al CC131, es decir están estrechamente emparentadas (Deshpande *et al.*, 2021).

Diversos estudios se han enfocado en la relación existente entre el serotipo O25:H4 y ST131. Nicolas-Chanoine *et al.*, aislaron 41 cepas, donde 36 aislados (88%) mostraron un perfil genético similar perteneciendo al filogrupo B2, serotipo O25:H4 y perfil MLST ST131; Blanco *et al.*, recolectaron 1021 cepas, reportando 195 (19%)

agrupadas en el serotipo O25:H4 y ST131; Mamani, 2015 analizó 94 cepas, en su mayoría aislada de pacientes cursando una ITU (72%) determinando el serotipo O25:H4 como el más común (32%) y asociado el filogrupo B2 y ST131 en todas las cepas, además trabajó con otro cepario de 500 muestras ExPEC, donde 59 cepas (12%) pertenecieron al serotipo O25:H4 y todas fueron ST131. Todos estos estudios se realizaron en cepas de *E. coli* productora de betalactamasas en diversas regiones geográficas evidenciando que la prevalencia general de ST131 varía de acuerdo con la región de aislamiento, pero se encuentra estrechamente relacionada con el serotipo O25:H4 y el filogrupo B2. En nuestro equipo de trabajo, Martínez-Gorgonio reportó 55 cepas UPEC O25:H4 donde 80% pertenecieron a ST131.

ST131 tiene una estructura basada en clados, caracterizada por haber presentado múltiples eventos de recombinación. Petty *et al.*, identificaron genes codificantes de adhesinas fimbriales y motilidad dentro de fragmentos recombinantes, coincidiendo con las variantes alélicas asociadas a clado. Dentro del clado A, el alelo *fliC* corresponde al serogrupo H5 mientras que los clados B y C poseen el alelo H4, adyacente a una región de inserción de un profago (Phi5). El gen *fimH* también se encuentra dentro de otro fragmento recombinante característico de ST131, explicando la diversidad de alelos específicos de clado (*fimH41* en el clado A, *fimH22* en el clado B y *fimH30* en el clado C).

De acuerdo con lo reportado por Petty *et al.*, los genomas *H30* también pueden clasificarse como subgrupo C y los *H22*, subgrupo B. En este trabajo se utilizó FimTyper 1.0 para identificar las variantes alélicas de *fimH* en los genomas ST131, predominando *H30/C* (84.48%), seguido por *H22/B* (5.17%) y en menor proporción *H27* (3.45%), *H1196* (1.72%) y *H161* (1.72%). Trabajos realizados por Li *et al.*, Mamani y Stoesser *et al.*, reportaron el subgrupo C en menor porcentaje (64%) pero en el subgrupo B fue más prevalente (24-30%). Mediante BLAST se encontró relación del alelo *H161* con *H22* y *H1196* con *H30*, coincidiendo con lo reportado por Liu *et al.*

Posteriormente se eligieron los genomas *H30/C* (n=49) para identificar la presencia de 2 subclones anidados dentro de este grupo. 33 genomas pertenecieron al subclón *H30-Rx* (67.35%) y 16 a *H30-R* (32.65%). Estos valores difieren de lo reportado por Li *et al.*, Mamani, Martínez-Gorgonio y Stoesser *et al.*, en China, donde la incidencia de *H30-Rx* es mayor (75.47%) frente a *H30-R* (24.53%), en España se han reportado cifras de 46.9% para *H30-Rx* y 53.1% para *H30-R*; en México el subclón *H30-Rx* predominó (90.9%) frente a *H30-R* (9.1%) y en Reino Unido, 59% para *H30-Rx* y 41% para *H30-R*. Estos resultados indican que la incidencia está ligada a la región donde se ha realizado el aislamiento.

Price *et al.*, realizó un análisis evolutivo en cepas ST131, asociando el subclón *H30-R* con resistencia a FQ por mutaciones en los genes cromosómicos *gyrA* y *parC* y el subclón *H30-Rx* con la posterior adquisición de *bla*_{CTX-M-15}, incrementando el riesgo de provocar sepsis.

Una vez definidos los clados y subclones, los genomas de estudio se nombraron como grupo ST131 (n=58), además, para conocer las diferencias entre los principales subclones que lo conforman, se analizaron 3 subgrupos de estudio, denominados *H30-Rx* que incluye 33 genomas (56.9%), *H30-R* con 16 genomas (27.59%) y No *H30* (15.52%), donde se han agrupado 7 genomas no *H30* y 2 cepas ST131 que no presentan el gen *fimH*. Nuestros porcentajes son similares a lo reportado por Merino *et al.*, con valores de 65% para *H30-Rx*, 21% en *H30-R* y el 15% No *H30*.

Las cepas de *E. coli* ST131 se caracterizan por presentar diversos genes de virulencia comúnmente compartidos entre las ExPEC. Es probable que las diferencias en el contenido de genes de virulencia contribuyan al potencial de virulencia variable de ST131 (Petty *et al.*, 2014). En este trabajo se analizó la presencia de 58 genes de virulencia asociados a funciones de adherencia, evasión del sistema inmune, invasinas, toxinas, adquisición de hierro y misceláneos con la finalidad de conocer aquellos altamente presentes, así como la asociación gen de virulencia-subclón. El análisis se realizó en plásmido y cromosoma, haciendo uso del programa VirulenceFinder 2.0 así como PCR *in silico*.

Analizamos 27 genes asociados a la adherencia. Los genes *motA*, *motB*, *fliC* y *yfcV* se identificaron en todos los genomas (100%), seguido de *fimH* y *csgA* (96.55%), *iha* (91.38%), *papA_F43* (89.66%), *papC*, *papF* y *hra* (43.1%), *papGII* (41.38%), *uclA* y *uclD* (39.66%), *afaA*, *afaC*, *afaD* (20.69%) y los genes *nfaE*, *afaFM955459*, *afa/draBC*, *afaE*, *afaB*, *papGIII* y *tsh* (<20%). En trabajos realizados por Biggel *et al.*, Blanco *et al.*, Coelho *et al.*, Cordeiro *et al.*, Dadi *et al.*, Johnson *et al.*, Mamani, Merino *et al.*, Nicolas-Chanoine *et al.*, Paniagua-Contreras *et al.*, Srinivasan *et al.*, y Wurpel *et al.*, el gen *fimH* se reportó con un porcentaje de prevalencia de 61.3-100%, otros genes con presencia variable según el país de aislamiento son *afa* (2%), *papA* (33-54.8%), *papC* (24.7-74.8%), *papF* (35-77%), *papGII* (15.4-64%), *papGIII* (2%), *afaFM955459* (31.8-33%), *afa/draBC* (22-33%), *csgA* (100%), *ucl* (29%), *hra* (35-55%) e *iha* (64.9-91%).

Los genes *papGI*, *sfaS* y *tosA* no se encontraron en los genomas de estudio, coincidiendo con el trabajo de Mamani en cepas ST131 españolas quien tampoco identificó cepas portadoras de *papGI* y *sfaS*. Li *et al.*, en China, tampoco encontraron el gen *papGI*, pero si a *sfaS* (8.4%) y a diferencia de este trabajo, no

identificaron el gen *nfaE*. Vigil *et al.*, asoció la presencia de *tosA* con cepas UPEC (25%); sin embargo, en este trabajo no se identificó el gen, aún en cepas O25:H4 ST131 aisladas de orina.

En lo referente a genes asociados a subclón en porcentajes de 90-100% para *H30-Rx* fueron *fimH*, *papA_F43*, *csgA*, *motA*, *motB*, *fliC*, *yfcV* e *iha*, en el subclón *H30-R* se presentaron los genes *fimH*, *csgA*, *motA*, *motB*, *fliC*, *yfcV* e *iha* y en las *No H30* los genes *csgA*, *motA*, *motB*, *fliC* y *yfcV*, demostrando que la capacidad de adhesión es importante en O25:H4 ST131, independientemente del subclón al que pertenece, además son varias las vías para lograr la adherencia, lo cual se observó en la diversidad de genes presentes. El gen *afaFM955459* se agrupó solo con el subclón *H30-Rx* y los genes *papGIII* y *tsh* lo hicieron con las *No H30*, coincidiendo con lo reportado por Merino *et al.* El gen *tsh* solo se identificó en 1 plásmido, coincidiendo con lo reportado por Coelho *et al.*, quienes asociaron a *tsh* con cepas ExPEC no ST131. Su baja presencia (1.72%) podría indicarnos que proviene de un plásmido no ST131.

Se identificaron 9 genes codificantes de sistemas de captación de hierro, localizando en todos los genomas a *fyuA* y *chuA*, además de *sitA* (96.55%), *tonB* (94.83%), *iucD* e *iutA* (91.38%), *iucC* (89.66%), *iroN* (3.45%) e *ireA* (1.72%). En trabajos realizados por Campos *et al.*, Johnson *et al.*, Mamani, Martínez-Gorgonio, Merino *et al.*, Nicolas-Chanoine *et al.*, y Zarzoza-Mendoza, reportaron los genes *fyuA* en un rango de 78-100%, predominando aquellos con la presencia del gen en todas sus cepas, *chuA* (85-100%), *sitA* (83.4%), *tonB* (98.13%), *iucD* (89-93%), *iutA* (48.4-97%), *iroN* (11-75%). Johnson *et al.*, mostraron que *ireA* no suele asociarse con ST131, coincidiendo con nuestros resultados.

Los subclones *H30-Rx* y *H30-R* presentaron porcentajes de 90-100% en *sitA*, *iucC*, *iucD*, *iutA*, *fyuA*, *chuA* y *tonB*, mientras que las *No H30* lo hicieron solo con *fyuA*, *chuA* y *tonB*. Estos resultados son similares a los reportados en España y China por Li *et al.*, y Merino *et al.* En relación con genes específicos de subclón, *iroN* e *ireA* se agruparon solo con los genomas *H30-Rx*; Merino *et al.*, reportaron la presencia de *iroN* en los subclados *H30-Rx* y *No H30*. Los resultados obtenidos nos permiten asociar la presencia de mayor cantidad de sistemas de captación de hierro con cepas *H30*, específicamente las cepas *H30-Rx*.

La búsqueda de genes codificantes de toxinas incluyó 9 variables, principalmente *sat* (91.38%), seguido de *hlyA* (25.86%), *cnf1* (24.14%), *senB* (15.52%) y *astA* (12.07%). En estudios realizados por Dadi *et al.*, Merino *et al.*, Nicolas-Chanoine *et al.*, y Paniagua-Contreras *et al.*, la presencia de estos genes es variable, *sat* (36-100%), *hlyA* (19-51.5%), *cnf1* (11-29%), *cvaC* (38.6-8%), *hlyF* (8-15%) y *astA*

(33.5%). En esta trabajo no se identificó la presencia de *vat*, coincidiendo con los datos de Johnson *et al.* En la asociación gen-subclón, *sat* se agrupó con *H30-Rx* y *H30-R* (90-100%), en contraste con los resultados de Merino *et al.*, quienes asociaron *sat* con los 3 subclones.

Se buscaron 9 genes con función en la evasión de las defensas del huésped, principalmente *kpsE* (96.55%), *ompT* (94.83%), *iss* (93.1%), *kpsMIII-K5* (60.34%), *kpsMTII* y *traT* (43.1%) y *kpsMIII-K2* (27.59%). Estudios similares realizados por Johnson *et al.*, Mamani, Merino *et al.*, Mohammed & Ibrahim y Nicolas-Chanoine *et al.*, identificaron los genes *ompT* (81.5-100%), *iss* (8-54.5%), *kpsMIII-K5* (2-56.6%), *kpsMIII-K2* (39-72.7%), *kpsMT* (80%) y *neuC* (10%). El gen *cma* sólo se identificó en plásmidos (6.9%) y esta baja frecuencia se debe a su asociación más frecuente en cepas ST95 (Chen *et al.*, 2021). El gen *kpsE* codifica una proteína que acopla el transportador ABC para la posterior translocación a la superficie celular (síntesis capsular) (Whitfield, 2006) y sin embargo, no se identificaron reportes de la prevalencia de este gen en cepas ST131.

Los genes *iss*, *ompT*, y *kpsE* se localizaron en un rango de 90-100% en los subclones *H30-Rx* y *H30-R* y *neuC* se asoció solo en los genomas No *H30*. Merino *et al.*, identificaron *iss* en los 3 subclones, principalmente No *H30* (57%), pero reportó porcentajes de prevalencia menores. También identificó *ompT* con valores en los subclones cercanos a los identificados en este trabajo.

Finalmente se identificaron genes codificantes de diversas funciones. Los genes *malX* y *agn43* estuvieron presentes en todos los genomas de estudio (100%). Los trabajos de Cordeiro *et al.*, Johnson *et al.*, y Nicolas-Chanoine *et al.*, presentaron valores similares para *malX* (68-100%) pero menores para *agn43* (19.4%). La incidencia menor de *agn43* puede deberse a la presencia de 2 variantes del gen asociadas a cepas UPEC y el uso de primers específicos de un solo alelo (Klemm *et al.*, 2004), por el contrario, este estudio identificó la presencia de todo el gen sin importar el alelo al que perteneciera. El gen *usp* (98.28%) se encontró en todas las cepas *H30-Rx* y *H30-R* e *ibeA* (8.62%) solo se presentó en las cepas No *H30*. Los reportes de Martínez-Gorgonio, 2019; Merino *et al.*, y Paniagua-Contreras *et al.*, difieren en la prevalencia de *usp* (87-100%) e *ibeA* (12.5-43.1%). También se compararon los resultados de este trabajo con los reportados por Li *et al.*, en cepas UPEC para *malX* (66%) y *usp* (57%). Los valores más bajos en cepas UPEC podrían indicarnos que estos genes están más asociados a cepas O25:H4 ST131.

De los 58 genes analizados, 50 genes (86.2%) se detectaron en al menos 1 genoma, cifra mayor que la reportada por Nicolas-Chanoine *et al.*, quienes evaluaron 46 genes de virulencia en cepas ST131, identificando sólo 16 (35%) en

al menos 1 cepa. Este estudio identificó genes en cromosoma y plásmidos, localizando la mayoría en cromosoma. Las cepas de *E. coli* extraintestinales portan en su mayoría (93%) al menos una PAI, elementos genéticos que contribuyen a la virulencia y diversidad en cepas UPEC (Moreno *et al.*, 2006). La mayoría de las adhesinas están codificadas en PAI, excepto las fimbrias conservadas, como el pili tipo 1; sin embargo, la expresión de esta se encuentra regulada por genes localizados en estos fragmentos, al igual que los genes del operón *pap* y *tos*. Las fimbrias F1C/S se encuentran con frecuencia en PAI de NMEC, pero raramente en cepas UPEC y/o ST131, coincidiendo con la ausencia de genes codificantes de estas fimbrias en el presente trabajo. Otros genes, como *tsh*, *vat*, *sat* y aquellos con papel en la captación de hierro forman parte de islas localizadas en cepas ExPEC. Finalmente, algunos serotipos capsulares (K1, K4, K5) también están codificados en PAI (Desvaux *et al.*, Lane & Mobley, 2007; Lloyd *et al.*, 2007, 2009; Whitfield, 2006).

Banerjee *et al.*, trabajaron con cepas ST131 y determinaron que el subclón *H30*-Rx a menudo tienen una virulencia más alta en comparación con otros subclones. Totsika *et al.*, analizaron la cepa EC958 ST131, identificando diversos MGE no presentes en cepas no ST131, entre ellos siete elementos de profago (Phi 1-7) y cuatro islas genómicas (*GI-pheV*, *GI-selC*, *GI-leuX* y *GI-thrW*). Posteriormente, Petty *et al.*, identificaron estos determinantes en 95 cepas ST131, en su mayoría conservadas en cepas *H30*, pero total o parcialmente ausentes en las cepas *H22* y *H41*. Ben Zakour *et al.*, relacionaron las toxinas HlyA y CNF-1 y el antígeno 43 (*agn43*) con una *GI-pheV* adquirida por cepas del *fimH30* ST131. Estos resultados coinciden con los reportados en este trabajo, donde las cepas *H30* presentaban porcentajes mayores de presencia de los genes de virulencia identificados y dentro de estos genomas, los pertenecientes a *H30*-Rx portaban una mayor cantidad.

Las cepas ExPEC suelen presentar una gran variedad de genes de virulencia entre los distintos patotipos que las conforman (UPEC, APEC, NMEC). Spurbeck *et al.*, identificaron 4 genes asociados con la capacidad de *E. coli* para causar una ITU, independientemente del sitio de aislamiento, es decir, pese a que una cepa sea aislada de sangre o heces, si presenta estos genes tiene una alta probabilidad de colonizar el TU y llegar a desarrollar una ITU. Todos los genomas de estudio cumplieron con los criterios para presentar la capacidad de desarrollar una ITU. Los trabajos realizados por Mamani *et al.*, y Merino *et al.*, obtuvieron resultados similares utilizando este esquema en aislados ST131 (90.2-98%).

La virotipificación se realizó basado en la presencia de 4 genes de virulencia que permiten la clasificación en 5 virotipos (Blanco *et al.*, 2013; Martínez-Gorgonio, 2019). En el grupo ST131 predominó el virotipo C (74.14%), seguido del A (10.34%),

D (8.62%), B (3.45%), finalmente una cepa se asoció con el virotipo E (1.72%) y otra no presentó ninguno de los 4 genes de virulencia (1.72%). Estos resultados se compararon con los de Mamani, que trabajó con cepas ST131 españolas e internacionales, coincidiendo en el virotipo C como predominante (31.5-65%) pero diferenciándose en el segundo virotipo prevalente, siendo para las cepas españolas el B (30.77%) y para las internacionales el A (17.1%). En México, Martínez-Gorgonio reportó el virotipo D como principal (43%), seguido del C (20%) y en Francia, Blanc *et al.*, reportaron el grupo A (72.73%) y C (27.27%).

Este estudio también analizó por primera vez los virotipos predominantes en los subclones de ST131. Los genomas *H30*-Rx se agruparon mayoritariamente en el virotipo C (72.73%), seguido del A (18.18%) y B (6.06%). El grupo *H30*-R se asoció casi en su totalidad con el grupo C (93.75%) y las No *H30* pertenecieron a los grupos D (55.56%) y C (44.44%). Mora *et al.*, analizaron los virotipos cepas ST131 españolas y realizaron una asociación por alelos, donde las *fimH30* se agrupó en los virotipos A, B, C y E mientras que *fimH22* lo hizo con D, coincidiendo con los resultados obtenidos en este trabajo, al igual que lo reportado Olesen *et al.*, quienes analizaron 128 aislados ST131 de 16 países y reportaron asociación virotipo-subclón, donde las no *H30* se relacionó con virotipo D (52%), *H30*-R con virotipo C (76%) y *H30*-Rx con el A (67%).

La presencia de cepas híbridas, es decir, que pueden actuar como DEC y ExPEC había sido poco frecuente, hasta hace algunos años que se ha comenzado a reportar *E. coli* capaz de causar infecciones intestinales seguidas de infecciones del torrente sanguíneo (Valiatti *et al.*, 2020). En el presente estudio realizamos la búsqueda de determinantes de virulencia utilizados para categorizar los 6 patotipos diarreogénicos (ETEC, EPEC, EHEC, EAEC, DAEC y EIEC). Sólo se localizaron cepas ExPEC/DAEC (5.17%) por identificación del gen *daaE*, codificante de una adhesina fimbrial (F1845). Las cepas híbridas se agruparon en los subclones No *H30* (22.22%) y *H30*-Rx (3.03%). Nuestros resultados contrastan con otros trabajos de cepas ExPEC/DEC en ST131, como el realizado por Mandomando *et al.*, quienes identificaron las fimbrias AggR y AAFV (EAEC) en cepas *fimH27* (No *H30*), además de los genes propios de ExPEC. Martínez-Gorgonio identificó, en cepas UPEC O25:H4 mexicanas, los patotipos híbridos UPEC/EIEC (60%), UPEC/EPEC (4%), UPEC/EAEC (1.8%) y UPEC/EHEC (1.8%).

En el subclón *H30*-Rx, el genoma B1194-PB-2012 presentó genes de resistencia a 8 familias de antibióticos (MDR), se identificó *bla*_{CTX-M-15} en cromosoma y plásmido, diversos genes con función en adhesión, captación de hierro y evasión de las defensas y un plásmido IncF. En el subclón No *H30*, se identificaron 2 cepas híbridas, la cepa SCU-479 fue MDR, portó los genes *bla*_{CMY-2}, *bla*_{CMY-6} y *bla*_{TEM-1} pero no presentó *bla*_{CTX-M} y se identificó un plásmido conjugativo IncF de 112 kb portando

sólo el gen *senB* y la cepa SK1144 se clasificó como NMDR (sólo presentó resistencia a FQ por la mutación I529L de *parE*), pero albergó diversos genes con función de adhesión, captación de hierro y evasión de las defensas. Se identificó un plásmido conjugativo IncF de 169 kb conteniendo *mcbA* y *senB*.

Los factores de virulencia no están, en general, restringidos a un grupo de patógenos, también pueden ocurrir en otros patotipos, mejorando las características de virulencia del portador; sin embargo, hay indicios de que no todas las combinaciones de factores de virulencia llegan a ser exitosas, ya que ciertos factores necesitan de un trasfondo genético específico (Müller *et al.*, 2007), este podría ser el caso de la baja incidencia en cepas híbridas ExPEC-DEC ST131.

Recientemente se ha informado que el TGI es el principal reservorio de cepas UPEC y ciertos sistemas de adhesión como los pili tipo 1 y la fimbria Ucl, cuya función ayuda a UPEC a adherirse en las criptas de las células epiteliales del colon e invadir este sitio anatómico (Klein & Hultgren, 2020). Las fimbrias Ucl presentan la vía de secreción chaperona-ayudador (CU) en la que es necesaria una proteína chaperona periplásmica y una proteína ayudadora/usher de membrana externa, además de la subunidad principal, constituida por aproximadamente 500-3000 monómeros y la subunidad de adhesina en la punta distal (Phan *et al.*, 2011). La presencia de estas fimbrias ha sido reportada en 4 cepas UPEC B2 y D, presentando un alto grado de conservación en los genes que la codifican, a excepción del gen *uclA* (Wurpel *et al.*, 2016).

En este trabajo se realizó la búsqueda del operón *uclABCD* en diversas cepas prototipo de *E. coli*, con la finalidad de identificar su asociación hacia un grupo específico, localizándola en el cromosoma de 6 cepas ExPEC, en su mayoría conformado por cepas UPEC (83.33%) y una NMEC (16.67%) y todas fueron parte del filogrupo B2. Se identificó el porcentaje de homología en base a UTI89, localizándose un grupo, formado por UTI89, RS218 y F11 portadoras de subunidades con la misma secuencia. Un segundo grupo (UMEA 3121-1, ABU83972 y 536) mostró divergencia en comparación con UTI89; sin embargo, los porcentajes de homología siguieron siendo elevados (>99%) a excepción de *uclA* (73.22-99.67%), la única subunidad que no conservó la misma longitud en todas las cepas (306-552 pb).

Posteriormente, identificamos el operón *ucl* en los genomas O25:H4 ST131. El operón se localizó en 23 genomas (39.66%), principalmente en el subclón H30-Rx seguido de No H30. Los genomas portadores del operón provenían de 10 países de 4 continentes, mostrando la presencia de esta fimbria en aislados distantes geográficamente. Se seleccionó 1 cepa representativa de cada país para determinar

el % de homología en relación con UTI89, observando que, en todos los genomas clínicos, excepto Z247 (China, No H30) se ha conservado la similitud de secuencia con la presente en UTI89, pero presentando distinta orientación del operón e inserción en distintos sitios del genoma

Se analizaron las diferencias entre UTI89 y Z247 identificando sustituciones de aminoácidos en los 4 genes del operón; sin embargo, no se conocen que alteraciones en el fenotipo podrían estar asociadas. También se esquematizó el contexto genético del operón *ucl* en los genomas O25:H4, identificando genes conservados en los extremos. El gen *yphA*, colindó a *uclA* y codificó una proteína de membrana interna y a 18 pb de *uclD* se identificó una secuencia de 210 pb conservada, incluso en las cepas prototipo. Dicha secuencia no se encontraba anotada en todos los genomas, pese a estar presente y mostró un porcentaje de identidad de 97.14-100% con ITU89 como referencia y un %GC bajo, pudiendo tratarse de un MGE asociado en la diseminación de la fimbria Ucl. Se analizó la secuencia de aminoácidos en bases de datos, pero no se obtuvo información por lo que se utilizaron herramientas bioinformáticas para el análisis de proteínas que nos indicaron similitud con proteínas de origen viral. Esto nos podría indicar que el operón *ucl* pudo ser insertado por un elemento profago en el cromosoma de cepas ExPEC, dada la elevada plasticidad genómica que se sabe presentan y posteriormente haber eliminado los elementos encargados de la movilidad genética de ese segmento, pero conservando un remanente, es decir, el segmento analizado.

Para conocer el perfil de resistencia en los genomas estudiados, se analizó la presencia de 67 determinantes de resistencia, incluidos genes y mutaciones específicas. Los genes se agruparon en 12 familias de antibióticos y la búsqueda se realizó en plásmido y cromosoma. En la familia de antibióticos betalactámicos, los genes prevalentes fueron *bla*_{CTX-M-15} en cromosoma (31.03%) y plásmido (39.66%), *bla*_{CTX-M-27} en plásmido (10.34%), *bla*_{CTX-M-14} en cromosoma (5.17%) y plásmido (1.72%), *bla*_{OXA-1} en cromosoma (18.97%) y plásmido (37.93%), *bla*_{TEM-1B} en cromosoma (6.9%) y plásmido (31.03%) y *bla*_{TEM-1A} en plásmido (5.17%). También se reportaron en menor proporción los genes *bla*_{CTX-M-3}, *bla*_{CTX-M-32}, *bla*_{CTX-M-55}, *bla*_{OXA-9}, *bla*_{CMY-2}, *bla*_{CMY-6}, *bla*_{NDM-1}, *bla*_{KPC-2}, *bla*_{KPC-3} y *bla*_{IMP-1}. Valores distintos han sido reportados en otros países. En Reino Unido, Hopkins *et al.*, trabajaron con cepas de *E. coli* codificantes de los genes *bla*_{CTX-M} y *bla*_{CMY}. Identificaron cepas portadoras de *bla*_{CTX-M} (52.94%), variantes *bla*_{CTX-M-15} (88.88%), *bla*_{CTX-M-2} (5.56%) y *bla*_{CTX-M-40} (5.56%). También reportaron cepas que presentaron *bla*_{CMY} (47.06%), variantes *bla*_{CMY-2} (25%) y *bla*_{CMY-6} (75%). En Italia, Carattoli *et al.*, identificaron aislados de *E. coli* BLEE, siendo prevalentes *bla*_{CTX-M-15} (92.86%), *bla*_{TEM-1} (79%), *bla*_{OXA-1} (75%) y en menor medida *bla*_{SHV-11} (7.14%), *bla*_{CTX-M-14} (3.57%) y *bla*_{SHV-12}

(3.57%) y en España, Mamani, trabajó con 94 cepas *E. coli* BLEE, reportando *bla*_{CTX-M-14} (46%), *bla*_{CTX-M-15} (26%) y *bla*_{SHV-12} (18%).

En la asociación con subclones, *H30-Rx* albergó a *bla*_{CTX-M-3}, *bla*_{CTX-M-15} y *bla*_{OXA-1}, *H30-R* se relacionó con *bla*_{CTX-M-14}, *bla*_{CTX-M-27} y *bla*_{CTX-M-32}, *bla*_{KPC-3} y *bla*_{IMP-1}. Por su parte, el subclón No *H30* se asoció con *bla*_{CTX-M-55}, *bla*_{CMY-2}, *bla*_{CMY-6} y *bla*_{NDM-1}.

Los genes *bla*_{CTX-M} fueron los más reportados en los genomas de estudio, actualmente son los más diseminados a nivel mundial, generalmente se encuentran en *E. coli*, codifican BLEE y confieren resistencia hacia diversos betalactámicos, principalmente a la cefotaxima, pero también brindan resistencia hacia ampicilina y ticarcilina y sensibilidad reducida para las cefalosporinas de 3° generación (excepto ceftazidima), cefepime y ceftriaxona y aztreonam (Cantón *et al.*, 2008). Distintos estudios han relacionado la presencia de variantes *bla*_{CTX-M} con la zona geográfica (Cantón *et al.*, 2008; Cantón & Coque, 2006; Stoesser *et al.*, 2016). Este trabajo demostró una asociación de variantes con subclones específicos.

Dentro de *bla*_{CTX-M}, la variante *bla*_{CTX-M-15} ha presentado un incremento de incidencia en las últimas décadas. Hernández *et al.*, realizaron un estudio de cepas BLEE en el año 2000, reportando 0.5% de cepas *E. coli* BLEE, predominando *bla*_{CTX-M-9} (27.3%), *bla*_{SHV-12} (23.9%) y *bla*_{CTX-M-14} (20.5%) pero no hubo reportes de la presencia de cepas *E. coli* portadoras de *bla*_{CTX-M-15}. En 2006 Díaz *et al.*, realizaron un estudio similar, encontrando que la prevalencia de *E. coli* BLEE había aumentado a 4.04%, principalmente por *bla*_{CTX-M} (72%), incluida *bla*_{CTX-M-15} (14.56%), seguidas de *bla*_{SHV} (26.8%). En nuestro trabajo, las cepas portadoras de *bla*_{CTX-M-15} a menudo se asociaron con la presencia de *bla*_{OXA-1} (78%), similar a lo reportado en España por Blanco *et al.*, y Coelho *et al.* En este trabajo también se identificó a *bla*_{CTX-M-27} con frecuencia, coincidiendo con los trabajos de Fernandes *et al.*, y Peirano & Pitout, ha han localizado este gen en distintas partes del mundo y asociado al subclón *H30-R*. En los genomas de estudio también identificamos la presencia del gen *bla*_{NDM-1} insertado en un plásmido y cromosoma. Este gen codifica una MBL descubierta en Nueva Delhi (2009), asociada a plásmidos de amplia diseminación, principalmente en *K. pneumoniae* y *E. coli* (Kumarasamy *et al.*, 2010). En nuestros resultados, también identificamos la presencia de *bla*_{KPC-2} y *bla*_{IMP-1}, ambas codificantes de carbapenemasas. Wang *et al.*, reportaron la presencia de *bla*_{KPC-2} en algunos clones de *E. coli*, incluido ST131, aunque su incidencia en general es muy baja y Nordmann & Poirel, reportaron que *bla*_{IMP-1} encuentran a menudo en plásmidos de gran tamaño transferibles entre enterobacterias.

La resistencia hacia la familia de quinolonas está mediada principalmente por mutaciones en QRDR (*gyrA*, *gyrB*, *parC* y *parE*) y los determinantes PMQR

(Hawkey, 2003; Namboodiri *et al.*, 2011). Identificamos 13 determinantes de resistencia, reportando la presencia de mutaciones cromosomales en *gyrA* (91.38%), *parC* (87.93%) y *parE* (96.55%). No se identificó SNP en el gen *gyrB*. Por lo que estas mutaciones no se asocian con ST131 en los genomas estudiados. Las mutaciones en los genes codificantes de girasa y topoisomerasa IV son importantes en los subclones de ST131, como lo han reportado Stoesser *et al.*, quienes relacionaron el grupo No H30 con una o ninguna mutación en las regiones QRDR de *gyrA* y *parC* mientras que la mayoría de las cepas H30 (95%) tienen una mutación en ambos genes lo que le confiere resistencia a FQ en niveles elevados. Esta mutación doble se cree apareció hace aproximadamente 25-30 años, cuando comenzaron a introducirse el uso de FQ en la práctica clínica. En contraste, nuestro trabajo identificó mutaciones de *gyrA*, *parC* y *parE* en los 3 subclones de estudio, con porcentajes >95% para H30-Rx, >90% en H30-R y de 30-90% en las No H30.

En este trabajo, el gen *aac(6')-Ib-cr* se reportó en cromosoma (24.14%) y plásmido (34.48%), también encontramos la presencia de este gen en el 73.1% de las cepas que portan *bla_{CTX-M-15}*. Estos porcentajes son menores a los reportados por Coelho *et al.*, quienes identificaron *aac(6')-Ib-cr* en 60% de cepas ST131 españolas, y en el 95% de las portadoras de *bla_{CTX-M-15}*. En los genomas de estudio también se buscaron genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD* y *qnrS*, localizando sólo al último en 1 plásmido (1.72%). También se buscó la presencia de genes *qepA*, *oqxA* y *oqxB*, codificantes de bombas de eflujo, sin resultados. En estudios similares como el realizado por Robicsek *et al.*, se reportó la presencia de *qnrA* y *aac(6')-Ib-cr* y su asociación con elevada resistencia a ciprofloxacina en comparación con la sola presencia de *aac(6')-Ib-cr*. Reyna-Flores *et al.*, analizaron cepas UPEC en México, encontrando presencia de *aac(6')-Ib-cr* (92.1%) y *qepA1* (7%) y los genomas con determinantes PMQR también contenían *bla_{CTX-M-15}*. En China, Li *et al.*, identificaron la presencia de genes *qnr* en porcentajes bajos (4.8%) y asociados a los subclones H30-R y No H30 y Matinfar *et al.*, detectaron genes *qnrB*, *qnrC* y *qnrA* en cepas UPEC BLEE, sobre todo en presencia de *bla_{CTX-M}*, indicando una asociación entre cepas UPEC resistentes a betalactámicos y FQ. Los resultados de Matinfar *et al.*, difieren con nuestro trabajo, realizado con cepas O25:H4 ST131 pero coinciden con los resultados de Rogers *et al.*, quienes concluyeron que los genes *qnr* están poco representados en el clon ST131. Finalmente, la presencia de un gen *qnrS* en un plásmido movilizable (MOB_{F11}) y con un tamaño de 75 kb, coincide con lo reportado por Carattoli, que asoció este gen con plásmidos pequeños movilizables.

La resistencia hacia aminoglucósidos se identificó en base a 14 genes. Los genes codificantes de acetiltransferasas (*aac*) prevalentes fueron *aac(6')-Ib-cr* en cromosoma (24.14%) y plásmido (34.48%) y *aac(3)-IIa* en cromosoma (20.69%) y plásmido (12.07%). En menor proporción se presentaron *aac(6')-Ib-Hangzhou*,

aac(3)-II y *aac(3)-IV*. Los codificantes de nucleotidiltransferasas (*ant*) fueron *aadA5* en cromosoma (6.9%) y plásmido (44.83%), principalmente y con menor incidencia *aadA1*, *aadA2* y *aadB*. También se localizaron genes que codifican fosfotransferasas (*aph*), principalmente *strA* y *strB* en cromosoma (5.17%) y plásmido (24.14%), además de *aph(3')-Ia*, *aph(3')-VI* y *aph(4)-Ia*. Los resultados obtenidos en este trabajo son similares a los reportados por Tsukamoto *et al.*, en estudio realizado en Japón con cepas O25:H4 ST131 donde identificaron los genes *aac(3')-II* (24.14%) y *aadB* (1.15%), estos resultados son similares a los presentados aquí, añadiendo que ambos genes se asociaron principalmente con el subclón *H30-Rx* en nuestro trabajo. En China, Huang *et al.*, identificaron el gen *aadA5* (26.5%) en cepas ST131, una incidencia menor a los resultados de este estudio, donde además, se asoció con *H30-Rx* y *H30-R*. Sundin & Bender, indicaron que los genes *strA* y *strB* están ampliamente diseminados en enterobacterias por plásmidos y se han localizado en cepas de humanos, plantas y animales, coincidiendo con nuestro trabajo, donde se identificó la presencia de ambos genes juntos en la misma cepa, con mayor incidencia en plásmidos y principalmente dentro del subclón *H30-R*. En general, los genes de resistencia hacia aminoglucósidos fueron detectados en plásmidos, con porcentajes bajos (<45%), similar al trabajo de Rogers *et al.*, quienes detectaron genes de resistencia para aminoglucósidos con poca incidencia.

La resistencia a tetraciclinas se identificó por la presencia de los genes *tet(A)* en cromosoma (8.62%) y plásmido (46.55%) y *tetB* en plásmido (1.72%), principalmente en el subclón *H30-Rx*. La elevada prevalencia de *tet(A)*, coincide con lo reportado por Kallonen *et al.*, que asocian su presencia en ST131 principalmente por plásmidos IncF, que además presentan otros genes de resistencia. Nuestros resultados son menores a los reportados por Nicolas-Chanoine *et al.*, quienes trabajaron con 36 cepas ST131, identificando resistencia a tetraciclinas en 83% y Mbelle *et al.*, que reportaron la presencia de *tet(A)* en 80% de cepas ST131 (n=10), además, la presencia de *tet(B)* se asoció con ST744, ST617 y ST10. Rogers *et al.*, analizaron dos plásmidos del subclón *H30-Rx*, identificando *tet(A)* en ambos.

Se identificaron genes que confieren resistencia a fenicoles. El más reportado fue *catB3* en cromosoma (22.41%) y plásmido (36,21%), además se asoció en mayor proporción con el subclón *H30-Rx*. Otros genes identificados en porcentajes menores fueron *cmlA1*, *cml* y *floR*, principalmente en plásmidos y en los subclones *H30-Rx* y No *H30*. Mbelle *et al.*, reportaron la presencia del gen *catB3* con una incidencia mayor en cepas ST131 aisladas en Sudáfrica.

La resistencia a macrólidos se asoció con el gen *mph(A)* en cromosoma (10.34%) y plásmido (41.38%), distribuidos en los 3 subclones de estudio. Dos análisis realizados en Australia por Dmitriy *et al.*, y Rogers *et al.*, identificaron a *mph(A)* en

46% de cepas ST131 y dentro del subclón H30-Rxen *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y enterobacterias (Mandell *et al.*, 2015).

La resistencia a fosfonatos se determinó por la presencia del gen *fosA3*, localizado sólo en 1 plásmido (1.72%) del subclón No H30. Demirci-Duarte *et al.*, Li *et al.*, y Sardar *et al.*, también identificaron la presencia de este gen, reportando valores de 0-7.8% indicando que aún es poco diseminado; sin embargo, se considera como un gen asociado a plásmidos, existiendo el riesgo de diseminación en años posteriores. Ito *et al.*, indicaron que *fosA3* incrementa la resistencia hacia fosfomicina en plásmidos, se asocia con enterobacterias y se cree que se movilizó del cromosoma de *K. georgiana* por un evento mediado por IS 26 similar a lo ocurrido con *bla_{CTX-M}*.

Se localizó el gen *mcr-1.1*, que brinda resistencia a colistina, en 2 plásmidos (3.45%), del subclón No H30. Ambos plásmidos portan los replicones IncHI2, IncHI2A, demostrando una asociación gen-plásmido, coincidiendo con un estudio realizado en España por Migura-Garcia *et al.*, que caracterizó plásmidos portadores de *mcr-1.1* con los replicones IncX4, IncHI2 e IncI2. En EUA, McGann *et al.*, reportaron por primera, vez en 2016, una *E. coli* resistente a la colistina que albergaba los genes *mcr-1* y *bla_{CTX-M}*. En la actualidad, la colistina es el antibiótico de último recurso para tratar enterobacterias MDR y la reciente aparición de genes *mcr* provoca preocupación ante la posibilidad de no tener más opciones para combatir la MDR (Migura-Garcia *et al.*, 2019).

La resistencia a diaminopirimidinas y sulfonamidas estuvo mediada principalmente por la presencia de los genes *dfrA17* en cromosoma (6.9%) y plásmido (43.1%), *sul1* en cromosoma (8.62%) y plásmido (46.55%) y *sul2* en cromosoma (5.17%) y plásmido (24.14%). En bajos porcentajes se reportó la presencia de *dfrA12*, *dfrA14* y *sul3*. Estos resultados coinciden con lo reportado por Jouini *et al.*, y Dmitriy *et al.*, en Túnez y Australia donde los genes *dfrA12* (18-55%), *dfrA17* (38-55%) y *sul1* (55-69%) presentaron mayor prevalencia. Mbelle *et al.*, identificaron los genes *dfrA17* (50%), *dfrA14* (20%), *sul1* (40%) y *sul2* (60%) en cepas ST131 de Sudáfrica. Kot, indicó que la resistencia a trimetoprim en ExPEC causantes de ITU oscila entre 54-82%.

Identificamos los porcentajes de resistencia hacia cada una de las 12 familias evaluadas. Todos los genomas de estudio presentaron al menos 1 mutación en los genes de girasa y topoisomerasa IV que confieren resistencia a las quinolonas (100%), seguido del grupo de betalactámicos (94.83%), principalmente por la presencia de genes *bla_{CTX-M}*, aminoglucósidos (82.76%) donde *aac(6')-Ib-cr*, *aac(3)-IIa* y *aadA5* fueron los principales mediadores, sulfonamidas (58.62%) y diaminopirimidinas (55.17%), con *dfrA17* y *sul1* como los genes prevalentes, fenicoles (53.45%) con *catB3*, tetraciclinas (51.72%) con *tet(A)*, macrólidos

(46.55%) con *mph(A)*, polimixinas (3.45%) con *mcr-1.1* y fosfonatos (1.72%) con *fosA3*. En los grupos rifamicina y nitrofurantoína no se identificaron determinantes que les brindaran resistencia.

El clon ST131 se ha caracterizado por poseer determinantes de resistencia consistentes que incluyen BLEE y los genes *mph(A)*, *catB4*, *tetA*, *dfrA7*, *aadA5* y *sul1*, presentando tasas elevadas de resistencia a cefalosporinas, monobactámicos, fluoroquinolonas, trimetropim-sulfametoxazol, aminoglucósidos y tetraciclinas, coincidiendo con lo reportado en este trabajo. Además, algunos genes codificantes de betalactamasas, como *bla_{TEM-1/-2}*, *bla_{SHV-1}* y *bla_{OXA-1}* se encuentran con frecuencia asociados con *bla_{CTX-M}* dentro de plásmidos IncF y estas mismas cepas suelen ser resistentes a FQ (Cantón & Coque, 2006; Mathers *et al.*, 2015; Nicolas-Chanoine *et al.*, 2014). Generalmente, los genes asociados con resistencia a múltiples fármacos se reportan en plásmidos (Matinfar *et al.*, 2021), nuestros resultados muestran que estos genes se encuentran distribuidos tanto en plásmidos como en cromosoma.

El subclón *H30-Rx* mostró porcentajes de genes de resistencia para betalactámicos, quinolonas, aminoglucósidos, tetraciclinas y fenicoles mayores a los registrados para todo el clon ST131. El subclón *H30-R* presentó esta asociación con el grupo de macrólidos, diaminopirimidinas y sulfonamidas. La resistencia en fosfonatos y polimixinas se asoció solo con el subclón No *H30*. Este es el primer trabajo que evalúa la resistencia por familia en los subclones que conforman ST131.

Utilizamos la clasificación desarrollada por Magiorakos en los genomas de estudio. Todos los genomas presentaron genes de resistencia hacia 1-9 familias de 12, por lo que no se identificaron cepas XDR o PDR. La mayoría se agrupó dentro de las MDR (87.93%) seguido de No MDR (12.07%). Estos resultados coinciden con los reportados España, Brasil y México por Campos *et al.*, Mamani y Martínez-Gorgonio donde las cepas ST131 MDR se han reportado en, en un rango de 62-100%. Johnson *et al.*, determinaron que las cepas ST131 representan >50% de los aislamientos de *E. coli* MDR por lo que se considera una característica de este clon, complicando los tratamientos. En el presente trabajo también se identificó la tasa de MDR en cada subclón de estudio, siendo más alta en los genomas *H30-Rx* (93.94%), seguido de *H30-R* (81.25%) y No *H30* (77.78%).

Dentro de la resistencia a quinolonas, los resultados obtenidos con ResFinder 4.1 mostraron la presencia de al menos una mutación cromosomal en los genes *gyrA*, *parC* y *parE*. Esta distribución fue diferente en los subclones de estudio. En *H30-Rx*, todos los genomas presentaron mutaciones en *gyrA* y *parC* y todos los genomas *H30-R* presentaron mutaciones en el gen *parE*. Posteriormente, se localizaron los cambios aminoacídicos específicos de acuerdo con el esquema de Hopkins *et al.*,

identificando en *gyrA* las mutaciones S83L (91.38%), D87N (86.21%) y D87G (1.72%), en *parC* se identificaron las mutaciones S80I (86.21%), S80R (1.72%) y E84V (86.21%) mientras que *parE* presentó I529L (96.55%). Estos resultados son similares con los reportados por Li *et al.*, en China, quienes trabajaron con cepas ST131 en donde identificaron las mutaciones S83L, D87N y S80I en todas las cepas de estudio, mientras que E84V e I529L no se localizaron en todas las cepas. En conjunto, estas mutaciones se asociaron con las cepas H30 y el serogrupo O25. En Australia, Rogers *et al.*, reportaron las mutaciones S83L, D87N, D87G, S80I y E84V en cepas ST131. Hopkins *et al.*, y Paltansing *et al.*, analizaron las mutaciones frecuentes en ST131, donde S83L es uno de los cambios más comunes encontradas en cepas clínicas y la sustitución por leucina brinda alto nivel de resistencia al ácido nalidíxico y menor susceptibilidad a las FQ. La mutación D87N presenta un elevado nivel de resistencia para ácido nalidíxico y FQ si viene acompañada con otra en S83 pero si el cambio es por G o Y, la resistencia a ciprofloxacina será menor, S80I es la sustitución más común en *parC*, aunque también se ha informado la presencia de S80R y E84V y finalmente, I529L también está asociada con cepas UPEC ST131.

Se analizó la presencia de las variantes alélicas de los genes *bla*_{CTX-M} debido a su importancia en la diseminación de ST131. Los genes con mayor incidencia fueron *bla*_{CTX-M-15} (60.34%), *bla*_{CTX-M-27} (10.34%) y *bla*_{CTX-M-14} (6.9%). En menor porcentaje se encontraron *bla*_{CTX-M-3}, *bla*_{CTX-M-32} y *bla*_{CTX-M-55} (<1.72%). En contraste, Flament-Simon *et al.*, identificaron, en cepas ST131 españolas y francesas los genes *bla*_{CTX-M-1} (7.6% y 20.8%, respectivamente), *bla*_{CTX-M-15} (44.6% y 50%), *bla*_{CTX-M-32} (2.2% y 0%), *bla*_{CTX-M-55} (0% y 1%), *bla*_{CTX-M-14} (31.5% y 10.4%) y *bla*_{CTX-M-27} (6.15% y 15.6%), Osawa *et al.*, en Japón, determinaron la presencia de *bla*_{CTX-M-1} (1.4%), *bla*_{CTX-M-15} (12.5%), *bla*_{CTX-M-55} (13.9%), *bla*_{CTX-M-2} (41.7%), *bla*_{CTX-M-14} (45.9%) y *bla*_{CTX-M-27} (19.4%). Carattoli *et al.*, en Italia reportaron a *bla*_{CTX-M-15} (92.86%) y *bla*_{CTX-M-14} (3.57%); en Reino Unido, Hopkins *et al.*, encontraron los genes *bla*_{CTX-M-15} (80%), *bla*_{CTX-M-2} (5%) y *bla*_{CTX-M-40} (5%). Un análisis realizado por Stoesser *et al.*, con cepas ST131 de 3 continentes, identificó a *bla*_{CTX-M-15} (34.42%), *bla*_{CTX-M-55} (0.46%), *bla*_{CTX-M-14} (9.3%), *bla*_{CTX-M-27} (3.72%), *bla*_{CTX-M-19} (0.46%) y *bla*_{CTX-M-27} (0.46%).

En este trabajo, el subclón H30-Rx se asoció con *bla*_{CTX-M-15} (96.97%), H30-R con *bla*_{CTX-M-14} (18.75%) y *bla*_{CTX-M-27} (31.25%) y No H30 presentó *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{CTX-M-55}, *bla*_{CTX-M-14} y *bla*_{CTX-M-27} en proporciones bajas (11.11%). Nuestros resultados coinciden con los trabajos realizados por Fernandes *et al.*, Kondratyeva *et al.*, y Price *et al.*, enfocados en la estructura clonal de ST131, integrada por los subclones H30-R/C1, generalmente asociada con *bla*_{CTX-M-14}, H30-R-M27/C1 si es portadora de *bla*_{CTX-M-27} y H30-Rx/C2 cuando alberga a *bla*_{CTX-M-15}. Además, los genes *bla*_{CTX-}

M pueden localizarse en cromosoma (mediado por IS), o a través de plásmidos IncF, mostrando una asociación entre subclón, plásmido y variante *bla*_{CTX-M}.

En este estudio, 13/58 genomas (22.41%) no presentaron genes *bla*_{CTX-M}, en su mayoría dentro del subclón No H30 (66.66%), seguido de H30-R (37.5%) y sólo 1 genoma H30-Rx (3.03%) no portó en gen. Estudios anteriores realizados por Carattoli *et al.*, Mamani y Stoesser *et al.*, reportaron cepas ST131 no portadoras de *bla*_{CTX-M} en un rango de 3.57-51.52%. Johnson *et al.*, determinaron que la presencia de cepas ST131 BLEE negativo suele presentarse en mayor medida en ciertas regiones, pero estas cepas son resistentes hacia las FQ. López-Cerero *et al.*, reportó aislados ST131, tanto productores como no productores de enzimas BLEE en TGI en personas sanas; sin embargo, la mayoría de los estudios, tanto clínicos como epidemiológicos suelen enfocarse solamente en aquellos aislados que presentan BLEE, principalmente mediadas por *bla*_{CTX-M-15}.

Se determinó la relación de *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{CTX-M-14} y *bla*_{CTX-M-27} con IS 26 e IS *Ecp1*. El gen *bla*_{CTX-M-15} se relacionó con IS26 (66.7%), ISEcp1 (18.5%) e IS26 + ISEcp1 (14.8%). El gen *bla*_{CTX-M-14} con IS26 (25%) e ISEcp1 (75%) y *bla*_{CTX-M-27} solo se asoció con IS26 (100%). Los resultados de este trabajo son similares a los realizados por Cantón & Coque y Roshani *et al.*, quienes han informado la fuerte asociación de ISEcp1 en los genes *bla*_{CTX-M-14}, *bla*_{CTX-M-1} y *bla*_{CTX-M-9}. Coque *et al.*, Jouini *et al.*, y Ludden *et al.*, identificaron a *bla*_{CTX-M-15} en cromosoma, donde se cree que ISEcp1 es el MGE principal que participa para integrarse a un plásmido o transponerse. En ocasiones, *bla*_{CTX-M-15} está flanqueado por una ISEcp1 parcialmente truncada, río arriba de IS 26 y la presencia de ambas IS puede afectar la movilización y expresión del gen *bla*_{CTX-M-15}. Stoesser *et al.*, identificaron la estructura IS *Ecp1-bla*_{CTX-M-15}-ORF477 dentro de ST131, además de asociar a *bla*_{CTX-M-27} sólo con ISEcp1, contrario a lo reportado aquí. Respecto a IS 26, He *et al.*, y Johnson *et al.*, han relacionado este elemento con los plásmidos F2:A1 del subclón H30-Rx, los cuales contienen numerosas copias de IS 26 a lo largo del plásmido y están asociados a eventos de reordenamientos como fusiones de replicones, inversiones de ADN y deleciones, dando como resultado reorganizaciones en estos plásmidos que llevan a la adaptación del subclón.

La importancia de las IS radica en su papel en los procesos de inserción y eliminación de elementos genéticos más grandes en el cromosoma bacteriano, ayudando a la adaptación del microorganismo (Roshani *et al.*, 2018). ISEcp1 se cree que ayudó en la captura de genes *bla*_{CTX-M} de los cromosomas de *Kluyvera spp*, facilitando su movilidad hacia cepas de *E. coli*. También aporta secuencias promotoras para la expresión de alto nivel de los genes *bla*_{CTX-M-14}, *bla*_{CTX-M-17}, *bla*_{CTX-M-18} y *bla*_{CTX-M-19} (Lartigue *et al.*, 2006; Poirel *et al.*, 2005) e IS26 está

involucrado con el reclutamiento y propagación de genes de resistencia a antibióticos en gram negativas (Harmer *et al.*, 2014; Harmer & Hall, 2020).

Las variantes *bla*_{CTX-M} se reportan en 5 grupos de acuerdo con su secuencia de aminoácidos y su ancestro común, pues derivan de distintas especies de *Kluyvera*. Los grupos más reportados son 1, 2, 8 y 9 (Cantón *et al.*, 2012; D'Andrea *et al.*, 2013). En este trabajo se realizó la identificación de los genes *bla*_{CTX-M} (previamente identificada la variante alélica) en su grupo. Reportamos la presencia de los grupos 1 (63.79%) y 9 (15.52%). El grupo 1 abarcó las variantes *bla*_{CTX-M-3}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{CTX-M-32} y *bla*_{CTX-M-55} y el grupo 9 a *bla*_{CTX-M-14} y *bla*_{CTX-M-27}. No se identificaron genes *bla*_{CTX-M} de los grupos 2 y 8. Estudios similares realizados por Flament Simon *et al.*, quienes trabajaron con cepas *E. coli* BLEE en España y Francia, reportaron que las cepas españolas portadoras de *bla*_{CTX-M} pertenecieron a los grupos 1 (54.3%) y 9 (38%), difiriendo en porcentaje con las cepas francesas, pertenecientes a los grupos 1 (71.8%) y 9 (26%). En Reino Unido, Hopkins *et al.*, identificaron genes *bla*_{CTX-M} en, de los grupos 1 (80%), 2 (5%), 8 (5%) y 9 (10%); en Italia, Caratolli *et al.*, aislaron cepas *E. coli* productoras de BLEE, identificando las enzimas CTX-M asociadas con el grupo 1 (92.86%) y grupo 9 (3.57%). Dos estudios españoles realizados con aislados ST131 en diferentes hospitales por Mamani, reportaron la presencia de los grupos 1 (63.33% y 79.24%) y 9 (10% y 16.16%). En Japón, Osawa *et al.*, reportaron los grupos 1 (30.6%), 2 (4.2%) y 9 (65.3%). Stoesser *et al.*, trabajaron con ST131 de Asia, Europa y Norteamérica. Identificaron la presencia de los grupos 1 (34.88%) y 9 (13.97%). Con estos resultados se observa que los grupos 1 y 9 son los más reportados en cepas *E. coli* a nivel mundial, mientras que el grupo 2 se asocia con países específicos y las tasas de prevalencia cambian dependiendo el país de aislamiento; sin embargo, un mayor porcentaje del grupo 1 sobre el 9 es constante. El análisis de asociación grupo-subclón reveló que el subclón H30-Rx se relacionó sólo con el grupo 1 (96.9%), H30-R englobó la mayoría de los genes del grupo 9 (73.7%) y No H30 albergó genes de ambos grupos en porcentajes bajos (<22.22%).

La última parte de esta investigación consistió en un análisis basado en distintos métodos de tipificación plasmídica. Los plásmidos son moléculas de ADN circulares o lineales de doble hebra, capaces de replicarse autónomamente y transferirse entre diferentes especies y clones confiriendo a su huésped fenotipos que le brindan ventaja sobre otros microorganismos, como genes de virulencia o resistencia hacia antimicrobianos; alterando la prevalencia de la cepa o clon portador (Carattoli *et al.*, 2014). La presencia de plásmidos tiene un papel importante en los mecanismos de HGT y promueve la transferencia de material genético entre entornos intrahospitalarios y en la comunidad (Villa *et al.*, 2010)

Como parte de los criterios de inclusión, se realizó la búsqueda de plásmidos cerrados en los genomas de estudio, para análisis posteriores. 52 genomas (89.7%), reportaron de 1-7 plásmidos por cepa, principalmente 1 (48.1%) y 2 (19%). En los 3 subclones de este estudio, prevaleció la presencia de genomas con 1 plásmido (37.5-54.55%) y para las No *H30* también aquellos con 3 (44.44%). Estos resultados difieren de los reportados en México por Zarzoza-Mendoza y Martínez-Gorgonio, quienes trabajaron con cepas ST131 donde predominaron genomas con 3 plásmidos (25.5%), 1 (17%) y 2 (15%).

52 genomas presentaron un total de 110 plásmidos en los que se caracterizaron sus replicones utilizando el programa PlasmidFinder 2.1. (CGE). El grupo de incompatibilidad más reportado fue IncF, en 57 plásmidos (51.82%), generalmente en las composiciones de multirreplicones IncFIA, IncFII (11.8%), IncFIA, IncFIB, IncFII (10%) e IncFII como el replicón único predominante (7.27%). También se detectaron replicones del tipo Col (10%), IncI1 (5.45%) y 25 plásmidos (22.73%) no fueron tipificables. Estos resultados difieren en porcentaje con los reportados por Zurfluh *et al.*, en Suiza, quienes localizaron plásmidos IncF (37.5%), IncI1 (25%) y no tipificables (25%), Kondratyeva *et al.*, en Israel donde 90% de sus replicones se agruparon en IncF y Col, solos o combinados y Carattoli *et al.*, en Italia quienes reportaron plásmidos IncF en la totalidad de sus cepas y todas con el replicón FII (100%), la mayoría como multireplicones, principalmente en las combinaciones FIA, FIB, FII (50%) y FIA, FII (35.7%), mientras que la presencia de solo el replicón FII (10.7%) fue baja, indicando que el plasmidoma, aún entre cepas similares es variable.

El análisis de los subclones mostró que *H30*-Rx presentó un índice mayor de replicones IncF (65.96%) en comparación con *H30*-R (38.1%) y No *H30* (47.62%). Los replicones Col fueron predominantes en *H30*-R (14.28%), seguido de *H30*-Rx (8.51%) y en menor medida en las No *H30* (4.76%). Se presentaron combinaciones de replicones específicas de subclón; en *H30*-Rx los replicones IncFIA, IncFIB (2.13%) e IncFII, IncN (4.26%) y en No *H30* los replicones IncFIB, IncFII, Col156 (14.29%) e IncHI2, IncHI2A (9.52%). *H30*-R no mostró replicones específicos de subclón, además del porcentaje más alto de replicones no tipificables (30.95%).

La base de datos PlasmidFinder 2.1 incluye actualmente 133 secuencias de replicones de plásmido únicas y está en constante actualización; sin embargo, la diversidad plasmídica es muy grande por lo que una cantidad considerable no puede ser tipificada (Carattoli & Hasman, 2020), además muchos plásmidos contienen varios replicones, lo que dificulta la clasificación. Por ejemplo, los plásmidos IncF albergan hasta tres replicones, algunos de ellos presentando recombinación (Garcillán-Barcia *et al.*, 2009). Coque *et al.*, recabaron secuencias

plasmídicas de ST131 en distintos países (Canadá, Francia, España y Reino Unido) coincidiendo en que la mayoría de ellos pertenece al grupo IncF (IncFII). Villa *et al.*, caracterizaron a los plásmidos IncF como elementos de bajo número de copias, >100 kb de tamaño y, a menudo con más de un replicón, esto último como un medio por el cual los plásmidos con un rango estrecho de hospederos pueden lograr una replicación de rango amplio y permitir la adquisición de plásmidos que portan replicones incompatibles cuando la replicación es impulsada por uno compatible, demostrando gran capacidad de adaptación mediada por la evolución de las secuencias reguladoras de los replicones, además, de acuerdo con Johnson & Nolan y Villa *et al.*, estos plásmidos se encuentran con frecuencia en cepas de enterobacterias clínicas asociadas con la diseminación de genes de virulencia específicos, como bacteriocinas, sideróforos, citotoxinas y factores de adhesión, así como de resistencia a diversos antimicrobianos principalmente por genes BLEE.

Se analizaron los plásmidos IncF, identificando combinaciones alélicas específicas de los replicones FIIA (F), FIA (A) y FIB (B), también llamada tipificación FAB. Se utilizó la herramienta pMLST 2.0. (CGE) para el estudio de los 57 plásmidos previamente reportados como IncF, obteniendo 18 combinaciones de alelos FAB distintas, de las cuales sólo 6 se presentaron en 2 o más replicones, agrupando los 12 restantes en un solo grupo (21%), además, 24 plásmidos (42.1%) no tipificables. Se observó que el alelo predominante fue F2 (10.53%), en los 3 subclones de estudio, lo cual podría fundamentarse en la presencia de un plásmido antiguo F2:A1:B20 común en ST131 que posiblemente perdió los alelos A1:B20 pero continuó transmitiéndose en algunas cepas de esta ST. En este trabajo se observó una asociación de alelos con subclones, donde H30-Rx mostró una asociación específica con F2:A1 (6.45%), F36:A4:B1 (6.45%) y F36:A6:B1 (9.68%). Por su parte H30-R se asoció con todos los alelos F1:A2:B20 (31.25%) y las No H30 con F29:B10 (30%). Estos datos coinciden con los reportados por Johnson *et al.*, que realizaron una asociación subclón-plásmido, relacionando a H30-Rx con F2:A1, H30-R con F1:A2:B20 y F29:B10 y No H30-R (H41, H22, H30S y H35), con F18. Los trabajos realizados por Johnson *et al.*, Price *et al.*, y Stoesser *et al.*, analizaron los subclones de ST131. Las cepas H30-Rx con frecuencia portan el alelo F2:A1, que posiblemente proviene de F2:A1:B20, un plásmido ancestral en ST131 el cuál perdió el alelo B20, pero adquirió genes de resistencia y logró su estabilización gracias a IS 26. El subclón H30-R eliminó la presencia del plásmido antiguo (F1:A2:B20) y adquirió uno con el alelo F1:A2:B20 que logró integrarse de manera estable y prevalecer en este subclón. Por su parte, el alelo F29:B10 se relaciona con las primeras cepas ST131. Pajand *et al.*, identificaron, en cepas H30-Rx, plásmidos F36:A4:B1 y F36:A6:B1. Al caracterizarlos los asociaron con mayor resistencia y virulencia en comparación con cepas del clado H30-R/C1. La aparición

de estos alelos demuestra el potencial de diversificación en ST131 y el surgimiento de subpoblaciones con mayor potencial de supervivencia

Se realizó un tercer esquema de tipificación plasmídica basado en las relaxasas MOB_F y MOB_Q (DPMT). En el análisis de relaxasas MOB_F, la relaxasa MOB_{F12} fue la más reportada (29.09%) y se identificó en los 3 subclones con porcentaje variable (23.8-42.86%), la relaxasa MOB_{F11} se agrupó en H30-R y No H30. Referente a la familia MOB_Q, MOB_{Qu} (5.45%) se presentó en los 3 grupos y MOB_{Q12} (3.6%) se asoció con H30-R y H30-Rx. Estos resultados son similares a los reportados por Alvarado García en un análisis de cepas UPEC españolas donde presentó las relaxasas MOB_{F12} (39%), MOB_{P5} (23.4%) y MOB_{Qu} (5.2%) y un segundo estudio español, enfocado en ST131 mostró resultados similares reportando la presencia de las relaxasas MOB_{F12} (28.21%), MOB_{F11} (10.26%), MOB_{Qu} (10.26%), MOB_{Q12} (10.26%) y la ausencia de relaxasas MOB_{Q11}, además de reportar plásmidos con relaxasas de la familia MOB_P (35.9%). La presencia de las relaxasas MOB_F como uno de los grupos predominantes en ST131 y UPEC se debe a que estas se encuentran en plásmidos clínicamente relevantes en enterobacterias (Alvarado *et al.*, 2012), predominantemente en conjugativos grandes (Garcillán-Barcia *et al.*, 2009). También se han asociado algunas relaxasas con grupos de incompatibilidad, MOB_{F12} está compuesto por plásmidos IncF, con frecuencia, responsables de la diseminación de los determinantes de resistencia a los antibióticos y factores de virulencia y MOB_{F11} se asocia con plásmidos IncW e IncN, este último relacionado con la diseminación de MDR (Alvarado *et al.*, 2012; Garcillán-Barcia *et al.*, 2009; Lanza *et al.*, 2014). La familia MOB_Q se asocia con plásmidos pequeños movilizables, que pueden conjugarse con ayuda de plásmidos auxiliares lo cual les ayuda a diseminarse en un gran número de huéspedes. Se ha reportado movilización de plásmidos MOB_Q gracias a funciones de genes *tra* localizados cromosómicamente (Francia *et al.*, 2004).

Para determinar los plásmidos conjugativos, se identificó el gen *traT*, que codifica una proteína de membrana con función en la conjugación (transferencia). El gen *traT* fue determinado en 30 plásmidos (27.27%), con mayor presencia en No H30 (42.86%). Estos resultados fueron menores a los presentados por Martínez-Gorgonio, que analizó la presencia de la relaxasa MOB_{F12} (95%) y *traT* (65%) en ST131.

Los plásmidos conjugativos son los principales responsables de la diseminación mundial de determinantes genéticos de importancia clínica, como la resistencia a los antimicrobianos o los rasgos de virulencia (Alvarado *et al.*, 2012; Douarre *et al.*, 2020). Los genomas analizados en este trabajo presentaron 28 plásmidos con una posible capacidad de conjugación (25.45%), presentes en proporción similar para H30-Rx (21.28%) y H30-R (21.43%) pero mayores en No H30 (42.86%). 16

plásmidos se catalogaron como movilizables (14.55%), en su mayoría agrupados en H30-R (21.43%) y 66 plásmidos no movilizables (60%), presentes principalmente en H30-Rx (68.09%). Redondo & Alonso trabajaron con cepas *E. coli* MDR; encontraron plásmidos conjugativos en 41.67% mientras que Thingholm *et al.*, y Martínez-Gorgonio determinaron tasas de conjugación de 33.33% y 61% respectivamente en ST131.

9. CONCLUSIONES

En la primera parte de este estudio se analizó la presencia de material plasmídico y presencia del gen *bla*_{CTX-M} en cepas UPEC O25:H4 aisladas de pacientes mexicanos, mostrando que la presencia de plásmidos es característica de este grupo. Algunas cepas pueden carecer del gen *bla*_{CTX-M} pero causar una ITU debido a la elevada cantidad de genes de virulencia que portan.

La segunda parte identificó genomas completos O25:H4 de 14 países, demostrando la estrecha asociación que hay entre este serotipo, la ST131 y el filogrupo B2 a nivel mundial. ST 131 se formó por los alelos *fimH30*, *fimH22* y *fimH27*, principalmente y dentro de *fimH30* el subclón *H30-Rx* prevaleció sobre *H30-R*. Se evaluaron determinantes de virulencia y resistencia en ST131 y 3 subclones de estudio, observando una gran diversidad de genes de virulencia asociados con los procesos de adhesión, adquisición de hierro y evasión de las defensas del hospedero. El subclón *H30-Rx* presentó los porcentajes más altos en la prevalencia de estos genes, incluida la fimbria Ucl, que recientemente ha comenzado a tener importancia por su papel como factor de virulencia, probablemente adquirido por HGT. En el subclón No *H30* se identificó mayor diversidad de genes presentes, principalmente localizados en plásmidos. La presencia de cepas híbridas fue escasa, posiblemente porque estas combinaciones no llegan a ser exitosas en ST131, además de su capacidad para permanecer en el TGI del hospedero como reservorio.

También se evaluaron genes de resistencia, asociando la presencia el gen *bla*_{CTX-M-15} casi en su totalidad con el subclón *H30-Rx*, además de tasas elevadas de resistencia para betalactámicos, aminoglucósidos y quinolonas, pero observando nuevamente mayor diversidad de genes en el subclón No *H30*. Se localizaron genes *bla*_{CTX-M} solo pertenecientes a los grupos 1 y 9. Se identificó la relación entre las *bla*_{CTX-M} más detectadas y las IS 26 e IS *Ecp1* donde la variante *bla*_{CTX-M-27} se asoció específicamente con IS 26. Los genomas *H30-Rx* presentaron mayores índices de MDR.

En el análisis del plasmidoma se observó la prevalencia de los plásmidos IncF, principalmente multirreplicones. Estos se encontraron en mayor proporción en *H30-Rx*; sin embargo, el subclón No *H30* presentó mayor cantidad de plásmidos conjugativos.

Estos resultados sugieren que dentro de ST131, el subclón *H30-Rx* presenta mayor homogeneidad en su composición de determinantes de virulencia y resistencia, adquiridos principalmente por eventos de HGT, observándose en la presencia de IS y plásmidos, principalmente IncF, lo que les confiere un elevado potencial de daño; sin embargo, el subclón No *H30* muestra mayor diversidad de genes así como la presencia de patotipos híbridos, abriendo la posibilidad de que ST131 continúe

diversificándose, adquiriendo nuevos determinantes de virulencia, resistencia y adaptándose a nuevos nichos, elevando el nivel de daño al que se asocia actualmente.

10. PERSPECTIVAS

1. Secuenciar el genoma completo de cepas UPEC O25:H4 ST131.
2. Identificar al filogrupo G en ceparios de UPEC mexicanas.
3. Identificar la presencia de CTX-M en cromosoma y plásmido.
4. Determinar la presencia de los grupos CTX-M en el cepario O25:H4 ST131, incluyendo los subclones *H30-Rx* y *H30-R*.
5. Determinar los genes *usp*, *malX* y *agn43* en el cepario O25:H4 ST131.
6. Diseñar primers que abarquen la totalidad del gen *agn43* para conocer la variante a la que pertenecen.
7. Determinar PAI en los genomas.
8. Identificar la presencia de integrones clase I, II y III en los genomas de estudio O25:H4 ST131.
9. Identificar otros mecanismos de resistencia que puedan conferir resistencia a rifamicina y nitrofuranos.
10. Identificar otras familias de relaxasas en plásmidos O25:H4 ST131.
11. Identificar las cepas portadoras del operón *Ucl* en los ceparios UPEC y UPEC O25:H4 ST131.
12. Secuenciar las subunidades *uclA* y *uclD* para conocer el tipo de variante.
13. Realizar la caracterización bioinformática en cepas O16:H4 ST131.

11. ANEXOS

Anexo 1. Número y tamaño de plásmidos encontrados en el cepario O25:H4 (LBME) (n=47).

Genoma/ Cepa	Plásmidos	Tamaño aproximado (pb)							
		<500	501-1000	1001-1500	1501-2000	2001-2500	2501-3000	3001-3500	>3500
CR04	3			1100	1700	2500			
CR07	2							3130	3800
CR14	3			1300/ 1500			2600		
CR15	1			1200					
CR19	3				1700		3000	3150	
CR22	3				1700			3260/ 3052	
CR33	1						2506		
CR35	2			1200			2700		
CR50	3			1300	1700		3000		
CR51	1			1200					
CR52									
CR53	3			1500	1800			3200	
CR59									
CR69									
CR70									
CR72	1			1400					
CR93									
CR98	1						2800		
CR99	3			1500	1800		2800		
CR115	1			1300					
CR117	1							3200	
CR122	1							3217	
CR141									
CR150	2		850		2000				
CR152	2		1000	1100					
CR153	3	450	650		1700				
CR156	4		600	1200/ 1500		2500			
CR159	4		600					3187/ 3375	3750
CR162									
CR182									
CR185	2		1000					3100	
CR192	5		800/ 1000		1900	2300	3000		
CR193	2		800/						

			1000						
CR204									
CR210	2		800	1200					
CR211	3		800				2788	3138	
CR214	6			1500	1900		2815	3092	3692/ 3800
CR222									
003I	3		700					3375/ 3281	
018I									
019I	4		1000	1300				3375/ 3200	
030I	3		1000					3375/ 3300	
052I	6		1000	1300		2100	3000	3187/ 3375	
070I									
079I	5		850		1700		2600	3184/ 3092	
07H	4			1200	1600		2785	3086	
12H	3			1500		2500		3086	
Total	96	1	17	20	12	5	13	24	4

Nota: Las cepas resaltadas en amarillo no presentaron bandas plasmídicas.

Anexo 2. Características de los genomas de estudio (n=58).

Genoma/ cepa (No. acceso)	Serogrupo	Filogrupo	Secuencia tipo (ST)	Tamaño genoma (Mb)	No. genes	%GC	Plásmidos	Sitio del aislado	Año	País	Género	Edad
B1370-PB_2012 SEVB00000000.1	O25:H4	B2	131	5.65	5,763	50.7	1	Sangre	2012	Suecia	ND	ND
C0134-PB_2013 SEVN00000000.1	O25:H4	B2	131	5.62	5,777	50.7	NP	Heces	2013	Suecia	ND	ND
B1131-PB_2011 SEVJ01000001.1	O25:H4	B2	131	5.58	5,738	50.7	1	Sangre	2011	Suecia	ND	ND
B1033-PB_2012 SEVL01000002.1	O25:H4	B2	131	5.51	5,628	50.8	NP	Sangre	2012	Suecia	ND	ND
C0107-PB_2013 SEVQ00000000.1	O25:H4	B2	131	5.40	5,475	50.8	1	Heces	2013	Suecia	ND	ND
B1194-PB_2012 SEVI00000000.1	O25:H4	B2	131	5.48	5,562	50.7	1	Sangre	2012	Suecia	ND	ND
B1017-PB_2011 SEVM00000000.1	O25:H4	B2	131	5.57	5,681	50.7	2	Sangre	2011	Suecia	ND	ND
B1118-PB_2011 SEVK00000000.1	O25:H4	B2	131	5.39	5,485	50.8	NP	Sangre	2011	Suecia	ND	ND
B1323-PB_2011 SEVD01000001.1	O25:H4	B2	131	5.24	5,251	50.7	1	Sangre	2011	Suecia	ND	ND
B1316-PB_2011 SEVF01000002.1	O25:H4	B2	131	5.28	5,293	50.7	1	Sangre	2011	Suecia	ND	ND
B1320-PB_2011 SEVE01000003.1	O25:H4	B2	131	5.26	5,263	50.7	1	Sangre	2011	Suecia	ND	ND
B1041-PB_2011 SEVU01000007.1	O25:H4	B2	131	5.43	5,586	50.7	1	Sangre	2011	Suecia	ND	ND
B1360-PB_2012 SEVT01000005.1	O25:H4	B2	131	5.38	5,506	50.7	2	Sangre	2012	Suecia	ND	ND

B1351-PB_2012 SEVC01000002.1	O25:H4	B2	131	5.34	5,397	50.9	1	Sangre	2012	Suecia	ND	ND
B1527-PB_2012 SEVA01000001.1	O25:H4	B2	131	5.33	5,370	50.9	1	Sangre	2012	Suecia	ND	ND
B1522-PB_2012 SEVV01000003.1	O25:H4	B2	131	5.23	5,258	50.8	1	Sangre	2012	Suecia	ND	ND
C0064-PB_2013 SEVR01000002.1	O25:H4	B2	131	5.34	5,396	50.9	1	Heces	2013	Suecia	ND	ND
C0114-PB_2013 SEVP01000003.1	O25:H4	B2	131	5.22	5,250	50.8	1	Heces	2013	Suecia	ND	ND
B1483-PB_2012 SEVX01000001.1	O25:H4	B2	131	5.22	5,241	50.8	1	Sangre	2012	Suecia	ND	ND
B1439-PB_2012 SEVY01000001.1	O25:H4	B2	131	5.11	5,092	50.8	1	Sangre	2012	Suecia	ND	ND
B1212-PB_2012 SEVH01000007.1	O25:H4	B2	131	5.32	5,384	50.8	1	Sangre	2012	Suecia	ND	ND
B1250-PB_2011 SEVG01000002.1	O25:H4	B2	131	5.40	5,488	50.8	2	Sangre	2011	Suecia	ND	ND
C0014-PB_2012 SEVS01000006.1	O25:H4	B2	131	5.46	5,553	50.8	1	Heces	2012	Suecia	ND	ND
B1137-PB_2011 SEVV01000015.1	O25:H4	B2	131	5.40	5,455	50.7	1	Sangre	2011	Suecia	ND	ND
C0129-PB_2013 SEVO01000002.1	O25:H4	B2	131	5.29	5,345	50.9	1	Heces	2013	Suecia	ND	ND
SA186 CP022730.1	O25:H4	B2	131	4.83	5,415	50.8	5	Orina	2012	Arabia Saudita	F	2
18044 AP022326.1	O25:H4	B2	131	5.04	5,163	50.8	5	Heces (norovirus)	2018	Japón	ND	ND
C4435 CP027851.1	O25:H4	B2	131	5.20	5,554	50.8	1	Líquido peritoneal	2010	México/Puebla	F	1 mes
EcPF7 CP054232.1	O25:H4	B2	2279	4.99	5,002	50.7	3	Orina	2018	USA	F	>40
EcPF18 CP054219.1	O25:H4	B2	131	5.01	5,098	50.7	4	Orina	2018	USA	F	>40
SCU-479 CP054317.1	O25:H4	B2	2279	5.19	5,149	50.6	1	Heces	2018	USA	ND	>20
E302	O25:H4	B2	131	5.24	5,374	50.8	NP	Heces	2015	Japón	ND	ND

AP022362.1												
CCUG 73778 CP041337.1	O25:H4	B2	131	5.08	5,393	50.8	6	Sangre	2008	Suecia	M	4 m
GN02545 CP041544.1	O25:H4	B2	131	5.23	5,361	50.8	1	Sangre	2007	USA	ND	ND
GN02448 CP041546.1	O25:H4	B2	131	5.16	5,500	50.7	3	Sangre	2006	USA	ND	ND
3385 CP029420.1	O25:H4	B2	131	4.91	5,336	50.9	2	Espuito (neumonía)	2017	China	ND	ND
2/0 CP023853.1	O25:H4	B2	131	5.17	5,553	50.7	5	Heces	2009	Suecia	ND	ND
4/0 CP023849.1	O25:H4	B2	131	5.24	5,792	50.7	3	Heces	2009	Suecia	ND	ND
SK1144 AP018784.1	O25:H4	B2	131	5.03	4,977	50.7	1	Heces (DAEC)	2007	Japón	ND	ND
AR_0086 CP032201.1	O25:H4	B2	131	5.11	5,607	50.8	2	ND	2015	USA	ND	ND
U15A CP035720.1	O25:H4	B2	131	4.93	4,973	50.8	6	Orina	2015	USA	F	78
BR43-DEC CP035377.1	O25:H4	B2	131	5.12	5,243	50.7	2	Orina	2015	Brasil	ND	ND
TO217 LS992192.1	O25:H4	B2	131	5.30	5,484	50.6	2	ND	2018	Alemania	ND	ND
B36 LR130545.1	O25:H4	B2	131	5.15	5,212	50.8	2	Sangre	2018	Australia	ND	ND
AR_451 CP030337.1	O25:H4	B2	131	4.99	5,031	50.8	7	ND	2017	USA	ND	ND
55989 CP028304.1	O25:H4	B2	131	4.99	4,890	50.8	NP	Orina	2016	Pakistán	ND	ND
H105 CP021454.1	O25:H4	B2	131	4.98	5,325	50.7	1	Hisopado vaginal	2010	Alemania	F	55
81009 CP021179.1	O25:H4	B2	131	5.01	4,987	50.8	1	Orina	2009	Emiratos Árabes	M	76
uk_P46212 CP013658.1	O25:H4	B2	131	5.11	5,267	50.8	1	Orina	2005	Reino Unido	ND	ND
ESBL41 CP041581.1	O25:H4	B2	131	5.12	5,442	50.8	2	Orina	2014	USA	ND	ND

ESBL94 CP041578.1	O25:H4	B2	131	5.16	5,498	50.8	2	Orina	2014	USA	ND	ND
p11A CP049077.2	O25:H4	B2	131	5.30	5,492	50.7	2	Sangre (bacteriemia recurrente/ cáncer)	2015	USA	ND	ND
p4A CP049085.2	O25:H4	B2	131	5.26	5,129	50.7	NP	Sangre (bacteriemia recurrente/ cáncer)	2015	USA	ND	ND
S65EC CP036245.1	O25:H4	B2	131	5.19	5,265	50.7	1	Orina	2009	Australia	ND	ND
EcoI_AZ146 CP018991.1	O25:H4	B2	131	5.43	6,264	50.6	7	Estudio Astra Zeneca	2012	Italia	ND	ND
Hera_General_1 CP015085.1	O25:H4	B2	131	5.29		50	3	Orina	2014	Arabia Saudita	M	ND
RH-048-CS CP050205.1	O25:H4	B2	131	7.57	6,448	50.7	NP	Heces	2017	Bangladesh	ND	ND
Z247 CP021207.1	O25:H4	B2	131	5.01	5,622	50.6	3	Sangre	2015	China	ND	ND

NP= no presenta, m= meses

Anexo 3. Asignación de alelos *fimH* y subclones (n=58).

Genoma/Cepa	Alelo FimH (FimTyper1.0)	PCR de SNP in silico para determinar subclón		Clado	Subclón
		<i>H30</i> (<i>H30-R</i>)	<i>γbbW</i> (<i>H30-Rx</i>)		
B1370-PB_2012	<i>H30</i>	+	+	C	<i>H30-Rx</i> 56.9% (n=33)
C0134-PB_2013					
B1131-PB_2011					
B1033-PB_2012					
C0107-PB_2013					
B1194-PB_2012					
B1017-PB_2011					
B1118-PB_2011					
B1323-PB_2011					
B1316-PB_2011					
B1320-PB_2011					
B1351-PB_2012					
B1527-PB_2012					
C0064-PB_2013					
C0114-PB_2013					
B1212-PB_2012					
B1250-PB_2011					
C0014-PB_2012					
C0129-PB_2013					
C4435					
2/0					
4/0					
TO217					
B36					
55989					
uk_P46212					
ESBL41					
ESBL94					
p11A					
p4A					
S65EC					
Ecol_AZ146					
RH-048-CS					
B1041-PB_2011	<i>H30</i>	+	-	C	<i>H30-R</i> 27.59% (n=16)
B1360-PB_2012					
B1522-PB_2012					
B1483-PB_2012					
B1439-PB_2012					
18044					
EcPF18					
E302					
CCUG 73778					

3385					
AR_0086					
U15A					
BR43-DEC					
AR_451					
H105					
81009					
SA186	<i>H22</i>	-	-	B	No H30 15.52% (n=9)
GN02545		-	-		
GN02448					
EcPF7	<i>H27</i>	-	-	-	
SCU-479					
Hera_General_1	<i>H1196</i>	-	-	-	
Z247	<i>H161</i>	-	-	-	
B1137-PB_2011	ND	-	-	-	
SK1144					

**H161* es un derivado mutacional de *H22* y *H1196* deriva de *H30*.

Anexo 4. Caracterización de 27 genes de adherencia en genomas de *E. coli* O25:H4 ST131 (n=58).

Grupo clonal	Genoma/Cepa	Adhesinas																										
		<i>fimH</i>	<i>afaA</i>	<i>afaB</i>	<i>afaC</i>	<i>afaD</i>	<i>afaE</i>	<i>papA-F43</i>	<i>papC</i>	<i>papF</i>	<i>papG</i>	<i>papGII</i>	<i>papGIII</i>	<i>afaFM955459</i>	<i>afa/draBC</i>	<i>sfaS</i>	<i>csgA</i>	<i>motA</i>	<i>motB</i>	<i>fliC</i>	<i>uclA</i>	<i>uclD</i>	<i>yfcV</i>	<i>tosA</i>	<i>hra</i>	<i>lha</i>	<i>tsh</i>	<i>nfaE</i>
H30-Rx	B1370-PB_2012																											
	p1																											
	C0134-PB_2013																											
	NP																											
	B1131-PB_2011																											
	p1																											
	B1033-PB_2012																											
	p1																											
	C0107-PB_2013																											
	p1																											
	B1194-PB_2012																											
	p1																											
	B1017-PB_2011																											
	p1																											
	p2																											
	B1118-PB_2011																											
	NP																											
	B1323-PB_2011																											
	p1																											
	B1316-PB_2011																											
	p1																											
	B1320-PB_2011																											
	p1																											
	B1351-PB_2012																											
	p1																											
	B1527-PB_2012																											
	p1																											
	C0064-PB_2013																											
	p1																											
	C0114-PB_2013																											
	p1																											
	B1212-PB_2012																											
	p1																											
	B1250-PB_2011																											
	p1																											
	p2																											
	C0014-PB_2012																											
	p1																											
	C0129-PB_2013																											
	p1																											
C4435																												
130																												
2/0																												
p2_0.1																												
p2_0.2																												
p2_0.3																												
p2_0.4																												
p2_0.5																												
4/0																												
p4_0.1																												

Anexo 6. Asignación de virotipo por PCR *in silico* (n=58).

Grupo clonal	Genoma/ Cepa	PCR <i>in silico</i> para determinar virotipo				Virotipo
		<i>afaFM</i> 955459	<i>iroN</i>	<i>ibeA</i>	<i>sat</i>	
ST131 H30-Rx 56.9% (n=33)	B1370-PB_2012	+	+	-	+	E
	C0134-PB_2013	-	-	-	+	C
	B1131-PB_2011	-	-	-	+	C
	B1033-PB_2012	-	-	-	+	C
	C0107-PB_2013	-	-	-	+	C
	B1194-PB_2012	-	-	-	+	C
	B1017-PB_2011	-	-	-	+	C
	B1118-PB_2011	-	-	-	+	C
	B1323-PB_2011	-	-	-	+	C
	B1316-PB_2011	-	-	-	+	C
	B1320-PB_2011	-	-	-	+	C
	B1351-PB_2012	-	-	-	+	C
	B1527-PB_2012	+	-	-	+	A
	C0064-PB_2013	+	-	-	+	A
	C0114-PB_2013	-	-	-	+	C
	B1212-PB_2012	+	-	-	+	A
	B1250-PB_2011	-	-	-	+	C
	C0014-PB_2012	-	-	-	+	C
	C0129-PB_2013	-	-	-	+	C
	C4435	-	-	-	+	C
	2/0	+	-	-	+	A
	4/0	-	-	-	+	C
	TO217	-	-	-	+	C
	B36	+	-	-	+	A
	55989	-	-	-	+	C
	uk_P46212	+	-	-	+	A
	ESBL41	-	+	-	-	B
	ESBL94	-	+	-	-	B
p11A	-	-	-	+	C	
p4A	-	-	-	+	C	
S65EC	-	-	-	+	C	
Ecol_AZ146	-	-	-	+	C	
RH-048-CS	-	-	-	+	C	
ST131 H30-R 27.59%	B1041-PB_2011	-	-	-	+	C
	B1360-PB_2012	-	-	-	+	C
	B1522-PB_2012	-	-	-	+	C
	B1483-PB_2012	-	-	-	+	C
	B1439-PB_2012	-	-	-	+	C
	18044	-	-	-	+	C
	EcPF18	-	-	-	+	C
	E302	-	-	-	+	C
	CCUG 73778	-	-	-	+	C
	3385	-	-	-	-	ND

(n=16)	AR_0086	-	-	-	+	C
	U15A	-	-	-	+	C
	BR43-DEC	-	-	-	+	C
	AR_451	-	-	-	+	C
	H105	-	-	-	+	C
	81009	-	-	-	+	C
ST131 No H30 15.52% (n=9)	SA186	-	-	+	-	D
	GN02545	-	-	+	+	D
	GN02448	-	-	+	+	D
	EcPF7	-	-	-	+	C
	SCU-479	-	-	+	+	D
	Hera_General_1	-	-	-	+	C
	Z247	-	-	+	-	D
	B1137-PB_2011	-	-	-	+	C
SK1144	-	-	-	+	C	

Anexo 8. Caracterización de 36 genes de resistencia para aminoglucósidos, fenicoles, diaminopirimidinas, sulfonamidas, macrólidos, rifamicina, nitrofuranos, fosfonatos y polimixinas en genomas de *E. coli* O25:H4 ST131 (n=58).

Grupo clonal	Genoma/ Cepa	Genes de resistencia hacia 9 familias de antibióticos																																							
		aac(6)-Ib-cr	aac(6)-Ib-Hangzhou	aac(3)-IIa	aac(3)-IIId	aac(3)-IV	aacA1	aacA2	aacA5	aacB	aph(3)-Ia	aph(3)-VI	aph(4)-Ia	strA	strB	catB1	catB2	catB3	cmiA1	cmi	floR	dhfrA12	dhfrA14	dhfrA17	dhfrB1	dhfrB2	sul1	sul2	sul3	mph(A)	mph(B)	arr-2	arr-4	nfsA	nfsB	fosA3	mcr-1.1				
H30-Rx	B1370	■	■	■														■																							
	p1	■	■	■														■																							
	C0134	■	■	■														■																							
	NP																																								
	B1131	■	■	■															■																	■					
	p1														■	■								■					■												
	B1033									■			■										■																		
	p1								■			■											■																		
	C0107	■	■	■					■										■						■			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■			
	p1	■	■	■					■										■						■			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■			
	B1194	■	■	■					■										■						■			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■			
	p1	■	■	■					■										■						■			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■			
	B1017	■	■	■					■										■						■			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■			
	p1	■	■	■					■										■						■			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■			
	p2									■																	■			■											
	B1118																																								
	NP																																								
	B1323																																								
	p1	■																	■																						
	B1316	■																	■																						
	p1	■																	■																						
	B1320	■																	■																						
	p1	■																	■																						
	B1351	■		■															■																						
	p1	■		■															■																						
	B1527	■																	■									■													
	p1	■																	■									■													
	C0064	■																	■																						
	p1	■																	■																						
	C0114	■																	■																						
p1	■																	■																							
B1212	■																	■																							
p1	■																	■										■													
B1250	■																	■																							
p1	■			■														■																							
p2																																									

Anexo 9. Resistencia hacia 12 familias de antibióticos en los genomas de estudio en genomas de *E. coli* O25:H4 ST131 (n=58).

Grupo clonal.	Genoma/Cepa	Betalactámicos	Quinolonas	Aminoglucósidos	Tetraciclina	Fenicoles	Macrólidos	Rifamicina	Nitrofurantóina	Fosfonatos	Polimixinas	Diaminopirimidinas	Sulfonamidas	Total
H30-Rx	B1370-PB_2012													5
	C0134-PB_2013													4
	B1131-PB_2011													7
	B1033-PB_2012													7
	C0107-PB_2013													8
	B1194-PB_2012													8
	B1017-PB_2011													8
	B1118-PB_2011													2
	B1323-PB_2011													5
	B1316-PB_2011													5
	B1320-PB_2011													5
	B1351-PB_2012													5
	B1527-PB_2012													8
	C0064-PB_2013													5
	C0114-PB_2013													5
	B1212-PB_2012													8
	B1250-PB_2011													3
	C0014-PB_2012													8
	C0129-PB_2013													7
	C4435													4
	2/0													7
	4/0													8
	TO217													4
	B36													8
	55989													1
	uk_P46212													8
	ESBL41													3
	ESBL94													3
	p11A													8
	p4A													4
S65EC													3	
EcoI_AZ146													8	
RH-048-CS													4	
H30	B1041-PB_2011													5
	B1360-PB_2012													5

	B1522-PB_2012												6
	B1483-PB_2012												6
	B1439-PB_2012												6
	18044												7
	EcPF18												2
	E302												6
	CCUG 73778												7
	3385												2
	AR_0086												7
	U15A												6
	BR43-DEC												2
	AR_451												4
	H105												7
	81009												7
	No H30	SA186											
GN02545													2
GN02448													5
EcPF7													5
SCU-479													5
Hera_General_1													8
Z247													7
B1137-PB_2011													5
SK1144													1

Nota. Las marcas amarillas indican genomas NMDR, de acuerdo con los criterios de Magiorakos.

Anexo 10. Mutaciones en las subunidades de girasa y topoisomerasa IV en genomas de *E. coli* O25:H4 ST131 (n=58).

Grupo clonal	Genoma/Cepa	Genes codificantes para girasa y topoisomerasa IV			
		<i>gyrA</i>	<i>gyrB</i>	<i>parC</i>	<i>parE</i>
H30-Rx	B1370-PB_2012	S83L D87N		E84V S80I	I529L
	C0134-PB_2013	S83L D87N		E84V S80I	I529L
	B1131-PB_2011	S83L D87N		E84V S80I	I529L
	B1033-PB_2012	S83L D87N		S80I E84V	I529L
	C0107-PB_2013	S83L D87N		S80I E84V	I529L
	B1194-PB_2012	S83L D87N		E84V S80I	I529L
	B1017-PB_2011	S83L D87N		E84V S80I	I529L
	B1118-PB_2011	D87N S83L		S80I E84V	I529L
	B1323-PB_2011	D87N S83L		S80I E84V	I529L
	B1316-PB_2011	S83L D87N		S80I E84V	I529L
	B1320-PB_2011	D87N S83L		S80I E84V	I529L
	B1351-PB_2012	S83L D87N		E84V S80I	I529L
	B1527-PB_2012	S83L D87N		E84V S80I	I529L
	C0064-PB_2013	S83L D87N		S80I E84V	I529L
	C0114-PB_2013	D87N S83L		S80I E84V	I529L
	B1212-PB_2012	S83L D87N		E84V S80I	I529L
	B1250-PB_2011	S83L D87N		S80I E84V	I529L
	C0014-PB_2012	D87N S83L		E84V S80I	I529L
	C0129-PB_2013	S83L D87N		S80I E84V	I529L
	C4435	D87N S83L		E84V S80I	I529L
2/0	S83L D87N		S80I E84V	I529L	
4/0	S83L D87N		E84V S80I	I529L	
TO217	D87N S83L		E84V S80I	I529L	

	B36	D87N S83L		E84V S80I	I529L
	55989	S83L D87N		S80I E84V	I529L
	uk_P46212	S83L D87N		E84V S80I	
	ESBL41	D87N S83L		S80I E84V	I529L
	ESBL94	D87N S83L		S80I E84V	I529L
	p11A	S83L D87N		S80I E84V	I529L
	p4A	S83L D87N		S80I E84V	I529L
	S65EC	S83L D87N		S80I E84V	I529L
	Ecol_AZ146	D87N S83L		S80I E84V	I529L
	RH-048-CS	S83L D87N		E84V S80I	I529L
H30-R	B1041-PB_2011	D87N S83L		S80I E84V	I529L
	B1360-PB_2012	D87N S83L		S80I E84V	I529L
	B1522-PB_2012	D87N S83L		S80I E84V	I529L
	B1483-PB_2012	D87N S83L		S80I E84V	I529L
	B1439-PB_2012	S83L D87N		S80I E84V	I529L
	18044	S83L D87N		E84V S80I	I529L
	EcPF18	D87N S83L		S80I E84V	I529L
	E302	S83L D87N		E84V S80I	I529L
	CCUG 73778				I529L
	3385	D87N S83L		E84V S80I	I529L
	AR_0086	S83L D87N		S80I E84V	I529L
	U15A	S83L D87N		E84V S80I	I529L
	BR43-DEC	S83L D87N		E84V S80I	I529L
	AR_451	S83L D87N		E84V S80I	I529L
	H105	D87N S83L		E84V S80I	I529L
81009	S83L D87N		S80I E84V	I529L	

No H30	SA186	S83L			
	GN02545				I529L
	GN02448				I529L
	EcPF7	D87G S83L		S80R	I529L
	SCU-479				I529L
	Hera_General_1	D87N S83L		E84V S80I	I529L
	Z247	S83L			I529L
	B1137-PB_2011	S83L D87N		S80I E84V	I529L
	SK1144				I529L

Anexo 11. Variantes alélicas de *bla*_{CTX-M} reportadas en los genomas, grupo CTX-M al que pertenecen y presencia de IS26 e *ISEcp1*, tanto río arriba como río abajo (n=58).

Grupo clonal	Genoma/ Cepa	Grupo 1				Grupo 9			
		Cromosoma	IS	Plásmido	IS	Cromosoma	IS	Plásmido	IS
H30-Rx	B1370	CTX-M-15	IS26↗	CTX-M-15	ND				
	C0134	CTX-M-15	IS26↗						
	B1131	CTX-M-15	IS26↗	CTX-M-3	ND				
	B1033	CTX-M-15	ISEcp1→						
	C0107	CTX-M-15	IS26→ ISEcp1←	CTX-M-15	ND				
	B1194	CTX-M-15 (2)	ISEcp1→ IS26←	CTX-M-15	ND				
	B1017	CTX-M-15 (2)	ISEcp1←	CTX-M-15 (2)	ND				
	B1118	CTX-M-15	ISEcp1←						
	B1323			CTX-M-15	ND				
	B1316			CTX-M-15	ND				
	B1320			CTX-M-15	ND				
	B1351	CTX-M-15	ISEcp1←						
	B1527			CTX-M-15 (5)	IS26→				
	C0064			CTX-M-15	ND				
	C0114			CTX-M-15	ND				
	B1212			CTX-M-15	ND				
	B1250			CTX-	ND				

				M-15					
	C0014	CTX-M-15	IS26→						
	C0129			CTX-M-15	ND				
	C4435			CTX-M-15	ND				
	2/0	CTX-M-15	ISEcp1→						
	4/0			CTX-M-15	IS26↔ ISEcp1→				
	TO217	CTX-M-15	IS26→						
	B36			CTX-M-15	IS26↔				
	55989								
	uk_P46212			CTX-M-15	IS26↔				
	ESBL41			CTX-M-15	IS26↔				
	ESBL94			CTX-M-15	IS26↔				
	p11A	CTX-M-15	IS26←	CTX-M-15	IS26↔				
	P4A	CTX-M-15	IS26↔						
	S65EC	CTX-M-15	ISEcp1→ IS26←						
	Ecol_AZ146	CTX-M-15	IS26↔						
	RH-048-CS	CTX-M-15	IS26↔						
H30-R	B1041	CTX-M-15	ISEcp1→ IS26←	CTX-M-15	ND				
	B1360			CTX-M-32	ND				
	B1522					CTX-M-14	ISEcp1→	CTX-M-27	ND
	B1483							CTX-M-27	ND
	B1439							CTX-M-27	ND
	18044					CTX-M-14 (2)	ISEcp1←		
	EcPF18								
	E302								
	CCUG73778			CTX-	IS26↔				

				M-15	ISEcp1→				
	3385				IS26				
	AR_0086					CTX-M-14 (3)	ISEcp1→ ISEcp1←		
	U15A				IS26				
	BR43_DEC								
	AR-451				IS26				
	H105							CTX-M-27	IS26↔
	81009							CTX-M-27	IS26↔
No H30	SA186								
	GN02545								
	GN02448				IS26				
	EcPF7				IS26				
	SCU479								
	Hera_Gral_1			CTX-M-15	IS26↔				
	Z247	CTX-M-55	ISEcp1→	CTX-M-55	ISEcp1→			CTX-M-14	IS26↔
	B1137							CTX-M-27	ND
	SK1144				IS26				

Nota: ↔ (localización río arriba y río abajo), → (sólo río arriba), ← (sólo río abajo), (n) (indican el número de inserciones). Los genomas marcados en amarillo no presentaron BLEE y dentro de estos, las secuencias de inserción color rojo indican que estas se encontraron en el genoma.

Anexo 12. Características de los plásmidos pertenecientes a los genomas de *E. coli* O25:H4 ST131 (genomas=58, plásmidos=110).

Gpo. clonal	Genoma /Cepa	Plásmido (No. acceso)	Tamaño (Kb)	% GC	Replicación		Transferencia						
					Replicón	pMLST	<i>traT</i>	MOB _{F11}	MOB _{F12}	MOB _{Q11}	MOB _{Q12}	MOB _{Qu}	
H30-Rx	B1370	p1	ND	ND	IncFIA	ND							
	C0134	NP											
	B1131	p1	ND	ND	IncN								
	B1033	p1			IncFII	ND							
	C0107	p1	ND	ND	IncFIA, IncFIB, IncFII	ND							
	B1194	p1	ND	ND	IncFIA, IncFIB	ND							
	B1017	p1	ND	ND	NT								
		p2	ND	ND	IncFIA	ND							
	B1118	NP											
	B1323	p1	ND	ND	IncFIB	ND							
	B1316	p1	ND	ND	IncFIB	ND							
	B1320	p1	ND	ND	IncFIB	ND							
	B1351	p1	ND	ND	IncFIA, IncFII	ND							
	B1527	p1	ND	ND	IncFIA, IncFII	ND							
	C0064	p1	ND	ND	IncFIA, IncFII	ND							
	C0114	p1	ND	ND	IncFIA, IncFIB, IncFII	ND							
	B1212	p1	ND	ND	IncFIA, IncFII	ND							
	B1250	p1	ND	ND	IncI1								
		p2	ND	ND	IncFII	ND							
	C0014	p1	ND	ND	NT								
	C0129	p1	ND	ND	IncFIA	ND							
	C4435	130	130	ND	IncFIB	ND							
	2/0	p2_0.1	135.05	51.4	IncFIA, IncFIB, IncFII	F48:A1:B49							
4.06			51.5	NT									
2.33			-	NT									
2.10			-	Col									
1.55			-	NT									
4/0	p4_0.1	138.67	53.0	IncFIA, IncFII	F2:A1:B-								

H30-		p4_0.2	110.45	46.5	IncFIB	ND									
		p4_0.3	10.61	54.7	Col										
		TO217	plasmid:2	128.95	51.6	IncFIA, IncFIB, IncFII	F36:A4:B1								
			plasmid:3	86.37	51.0	IncFII	F35:A-B-								
		B36	plasmid:2	112.59	53.4	IncFIA, IncFII	F2:A6:B-								
			plasmid:3	1.55	-	Col									
		55989	NP												
		uk_P46212	puk_P46212	143.75	52.8	IncFIA, IncFII	F2:A1:B-								
		ESBL41	p41-1	121.45	48.4	IncFIA, IncFIB, IncFII	F36:A6:B1								
			p41-2	119.79	51.8	IncN, IncFII	F2:A-B-								
		ESBL94	p94-1	119.18	51.8	IncN, IncFII	F2:A-B-								
			p94-2	121.44	48.4	IncFIA, IncFIB, IncFII	F36:A6:B1								
		p11A	p11A_p1	70.74	51.9	IncFII	F10:A-B-								
			p11A_p2	180.96	52.0	IncFIA, IncFIB, IncFII, Col156	F36:A6:B1								
		P4A	NP												
		S65EC	pS65EC	146.79	50.8	IncFIB, IncFII	F1:A-B23								
		Ecol_AZ146	pECAZ_1	150.99	52.7	IncFIA, IncFIB, IncFII	F36:A4:B1								
			pECAZ_KP C	85.87	54.5	IncR									
			pECAZ_3	34.53	48.5	NT									
			pECAZ_4	6.99	47.5	NT									
	pECAZ_5		6.08	49.3	Col156										
	pECAZ_6		5.63	47.4	NT										
	pECAZ_7		2.57	-	NT										
	RH-048-CS	NP													
	B1041	p1	ND	ND	IncFIA, IncFII	ND									
		B1360	p1	ND	ND	IncN									

	p2	ND	ND	IncFIA	ND								
B1522	p1	ND	ND	IncFIA, IncFII	ND								
B1483	p1	ND	ND	IncFIA, IncFII	ND								
B1439	p1	ND	ND	IncFIA, IncFII	ND								
18044	P18044_1	139.4 5	52. 0	IncFIA, IncFIB, IncFII, Col156	F1:A2:B20								
	P18044_2	67.92	51. 5	NT	-								
	P18044_3	5.17	47. 5	NT									
	P18044_4	4.06	51. 5	NT									
	P18044_5	1.55	-	Col									
EcPF18	p1	128.9 5	50. 9	IncFIA, IncFIB, IncFII, Col156	F1:A2:B20								
	p2	86.74	50. 1	Inc1									
	p3	5.17	47. 5	Col156									
	p4	1.5	50. 2	Col									
E302	NP												
CCUG737 78	pSUH-1	161.3 7	51. 7	IncFIA, IncFIB, IncFII	F22:A1:B2 0								
	pSUH-2	79.95	51. 6	IncFIA, IncFII	F2:A-:B-								
	pSUH-3	5.63	47. 0	Col									
	pSUH-4	5.17	47. 6	Col									
	pSUH-5	5.06	49. 1	Col									
	pSUH-6	1.72	-	NT									
3385	unnamed1	101.3 4	46. 3	IncFIB	ND								
	unnamed2	89.32	50. 5	IncFIA, IncFIB, IncFII	F1:A2:B20								
AR_0086	unnamed1	140.5	52. 0	IncFIA, IncFIB, IncFII, Col156	F2:A2:B20								
	unnamed2	41.87	51. 1	IncN									

No H30	U15A	pU15A_A	109.02	51.7	Incl1								
		pU15A_B	69.54	50.7	IncFII	F2:A-B-							
		pU15A_C	5.21	48.6	NT								
		pU15A_D	8.17	49.4	NT								
		pU15A_E	5.63	47.4	NT								
		pU15A_F	1.51	-	NT								
	BR43_DE C	unnamed1	5.78	47.5	NT								
		unnamed2	33.1	41.3	IncX4								
	AR-451	unnamed1	75.28	52.7	IncN								
		unnamed2	34.93	48.6	Incl1								
		unnamed3	35.51	50.9	IncFIA	F-A2:B-							
		unnamed4	16.9	49.0	NT								
		unnamed5	1.55	-	NT								
		unnamed6	4.08	49.5	NT								
		unnamed7	7.59	45.0	NT								
	H105	pH105	134.9	51.9	IncFIA, IncFIB, IncFII, Col156	F1:A2:B20							
	81009	p81009	135.72	51.9	IncFII, IncFIA, IncFIB, Col156	F1:A2:B20							
	SA186	p186MCR1	241.60	46.2	IncHI2, IncHI2 A								
		p186_2	198.75	49.4	IncFIB, IncFII	F18:A-B1							
		p186_3	113.16	50.7	IncFII	F16:A-B-							
		p186_4	96.66	48.1	p0111								
p186_5		106.94	49.9	Incl1									
GN02545		p2545-1	78.6	51.4	IncFII	F2:A-B-							
GN02448	p2448-1	124.09	53.4	IncFIA, IncFIB, IncFII	F2:A1:B23								

		p2448-2	54.24	51.8	IncN																	
		p2448-3	97.94	48.0	p0111																	
	EcPF7	p1	129.63	51.5	IncFIB, IncFII, Col156	F29:A-:B10																
		p2	4.07	51.5	NT																	
		p3	1.55	51.1	Col																	
	SCU479	pSCU479	112.17	51.0	IncFIB, IncFII, Col156	F29:A-:B10																
	Hera_Gral_1	P1	130	52.6	IncFIA, IncFIB, IncFII	F1:A1:B16																
		P2	32	52.1	NT																	
		P3	29.5	51.3	NT																	
	Z247	p2474-NDM1	75.55	50.8	IncFII	F2:A-:B-																
		p2474-MCR1	223.98	45.8	IncHI2, IncHI2A																	
		p2474-3	86.73	49.5	IncI1																	
	B1137	p1	ND	ND	IncFIA, IncFII	ND																
	SK1144	pSK1144	169.56	51.1	IncFII, IncFIB, Col156	F29:A-:B10																

Nota: Los genomas resaltados en amarillo no presentaron plásmidos. NP=No presenta.

Anexo 13. Tablas de resultados

Tabla 27. Genes de virulencia asociados con la adhesión en los genomas de estudio.

Genes asociados a adhesión								
Gen	ST131 n=58 %		H30-Rx n=33 %		H30-R n=16 %		No H30 n=9 %	
	*C	*P	*C	*P	*C	*P	*C	*P
<i>fimH</i>	56 (96.55)	0 (0)	33 (100)	0 (0)	16 (100)	0 (0)	7 (77.78)	0 (0)
<i>afaA</i>	12 (20.69)	0 (0)	9 (27.27)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (33.33)	0 (0)
<i>afaB</i>	3 (5.17)	0 (0)	2 (6.06)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (11.11)	0 (0)
<i>afaC</i>	12 (20.69)	0 (0)	9 (27.27)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (33.33)	0 (0)
<i>afaD</i>	12 (20.69)	0 (0)	9 (27.27)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (33.33)	0 (0)
<i>afaE</i>	4 (6.9)	0 (0)	2 (6.06)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (22.22)	0 (0)
<i>papA_F4 3</i>	52 (89.66)	0 (0)	32 (96.97)	0 (0)	14 (87.5)	0 (0)	6 (66.67)	0 (0)
<i>papC</i>	25 (43.1)	0 (0)	22 (66.67)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (33.33)	0 (0)
<i>papF</i>	25 (43.1)	0 (0)	22 (66.67)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (33.33)	0 (0)
<i>papGI</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>papGII</i>	24 (41.38)	0 (0)	22 (66.67)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (22.22)	0 (0)
<i>papGIII</i>	1 (1.72)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (11.11)	0 (0)
<i>afa FM95545 9</i>	7 (12.07)	0 (0)	7 (21.21)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>afa/draB C</i>	7 (12.07)	0 (0)	5 (15.15)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (22.22)	0 (0)
<i>sfaS</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>csgA</i>	56 (96.55)	0 (0)	31 (93.94)	0 (0)	16 (100)	0 (0)	9 (100)	0 (0)
<i>motA</i>	58 (100)	0 (0)	33 (100)	0 (0)	16 (100)	0 (0)	9 (100)	0 (0)
<i>motB</i>	58 (100)	0 (0)	33 (100)	0 (0)	16 (100)	0 (0)	9 (100)	0 (0)
<i>fliC</i>	58 (100)	0 (0)	33 (100)	0 (0)	16 (100)	0 (0)	9 (100)	0 (0)

<i>uclA</i>	23 (39.66)	0 (0)	21 (63.64)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (22.22)	0 (0)
<i>uclD</i>	23 (39.66)	0 (0)	21 (63.64)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (22.22)	0 (0)
<i>yfcV</i>	58 (100)	0 (0)	33 (100)	0 (0)	16 (100)	0 0%	9 (100)	0 (0)
<i>tosA</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>hra</i>	25 (43.1)	0 (0)	23 (69.7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (22.22)	0 (0)
<i>iha</i>	53 (91.38)	0 (0)	31 (93.94)	0 (0)	15 (93.75)	0 (0)	7 (77.78)	0 (0)
<i>tsh</i>	0 (0)	1 (1.72)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (11.11)
<i>nfaE</i>	9 (15.52)	0 (0)	7 (21.21)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (22.22)	0 (0)

*C=cromosoma, *P=plásmido.

Tabla 28. Genes de virulencia asociados con sistemas de captación de hierro en los genomas de estudio.

Genes asociados a sistemas de captación de hierro								
Gen	ST131 n=58 %		H30-Rx n=33 %		H30-R n=16 %		No H30 n=9 %	
	*C	*P	*C	*P	*C	*P	*C	*P
<i>sitA</i>	56 (96.55)	3 (5.17)	33 (100)	2 (6.06)	15 (93.75)	0 (0)	8 (88.89)	1 (11.11)
<i>iucC</i>	52 (89.66)	1 (1.72)	31 (93.94)	0 (0)	15 (93.75)	0 (0)	6 (66.67)	1 (11.11)
<i>iucD</i>	53 (91.38)	0 (0)	32 (96.97)	0 (0)	15 (93.75)	0 (0)	6 (66.67)	0 (0)
<i>iutA</i>	53 (91.38)	3 (5.17)	31 (93.94)	2 (6.06)	15 (93.75)	0 (0)	7 (77.78)	1 (11.11)
<i>fyuA</i>	58 (100)	0 (0)	33 (100)	0 (0)	16 (100)	0 (0)	9 (100)	0 (0)
<i>chuA</i>	58 (100)	0 (0)	33 (100)	0 (0)	16 (100)	0 (0)	9 (100)	0 (0)
<i>iroN</i>	1 (1.72)	2 (3.45)	1 (3.03)	2 (6.06)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>ireA</i>	1 (1.72)	0 (0)	1 (3.03)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>tonB</i>	55 (94.83)	0 (0)	30 (90.91)	0 (0)	16 (100)	0 (0)	9 (100)	0 (0)

*C=cromosoma, *P=plásmido.

Tabla 29. Genes de virulencia codificantes de toxinas en los genomas de estudio.

Genes asociados a toxinas								
Gen	ST131 n=58 %		H30-Rx n=33 %		H30-R n=16 %		No H30 n=9 %	
	*C	*P	*C	*P	*C	*P	*C	*P
<i>sat</i>	53 (91.38)	0 (0)	31 (93.94)	0 (0)	15 (93.75)	0 (0)	7 (77.78)	0 (0)
<i>vat</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>cnf1</i>	14 (24.14)	0 (0)	12 (36.36)	0 (0)	1 (6.25)	0 (0)	1 (11.11)	0 (0)
<i>hlyA</i>	15 (25.86)	0 (0)	12 (36.36)	0 (0)	1 (6.25)	0 (0)	2 (22.22)	0 (0)
<i>hlyF</i>	0 (0)	3 (5.17)	0 (0)	2 (6.06)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (11.11)
<i>astA</i>	7 (12.07)	0 (0)	6 (18.18)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (11.11)	0 (0)
<i>cvaC</i>	0 (0)	3 (5.17)	0 (0)	2 (6.06)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (11.11)
<i>mcbA</i>	0 (0)	3 (5.17)	0 (0)	1 (3.03)	0 (0)	1 (6.25)	0 (0)	1 (11.11)
<i>senB</i>	4 (6.9)	9 (15.52)	3 (9.09)	1 (3.03)	1 (6.25)	5 (31.25)	0 (0)	3 (33.3)

*C=cromosoma, *P=plásmido.

Tabla 30. Genes de virulencia asociados con evasión del sistema inmune en los genomas de estudio.

Genes asociados a evasión del sistema inmune								
Gen	ST131 n=58 %		H30-Rx n=33 %		H30-R n=16 %		No H30 n=9 %	
	*C	*P	*C	*P	*C	*P	*C	*P
<i>iss</i>	54 (93.1)	3 (5.17)	31 (93.94)	2 (6.06)	15 (93.75)	0 (0)	8 (88.89)	1 (11.11)
<i>ompT</i>	55 (94.83)	3 (5.17)	31 (93.94)	2 (6.06)	16 (100)	0 (0)	8 (88.89)	1 (11.11)
<i>traT</i>	8 (13.79)	25 (43.1)	6 (18.18)	0 (0)	2 (12.5)	8 50%	0 (0)	8 (88.89)
<i>cma</i>	0 (0)	4 (6.9)	0 (0)	2 (6.06)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (22.22)
<i>kpsMII-K2</i>	16 (27.59)	0 (0)	15 (45.45)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (11.11)	0 (0)
<i>kpsMII-K5</i>	35 (60.34)	0 (0)	18 (54.55)	0 (0)	10 (62.5)	0 (0)	7 (77.78)	0 (0)

<i>kpsMTII</i>	25 (43.1)	0 (0)	9 (27.27)	0 (0)	10 (62.5)	0 (0)	6 (66.67)	0 (0)
<i>kpsE</i>	56 (96.55)	0 (0)	33 (100)	0 (0)	15 (93.75)	0 (0)	8 (88.89)	0 (0)
<i>neuC</i>	1 (1.72)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 0%	1 (11.11)	0 (0)

*C=cromosoma, *P=plásmido.

Tabla 31. Genes de virulencia asociados con una invasina y misceláneos en los genomas de estudio.

Genes asociados a invasinas y misceláneos								
Gen	ST131 n=58 %		H30-Rx n=33 %		H30-R n=16 %		No H30 n=9 %	
	*C	*P	*C	*P	*C	*P	*C	*P
<i>ibeA</i>	5 (8.62)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	5 (55.56)	0 (0)
<i>usp</i>	57 (98.28)	0 (0)	33 (100)	0 (0)	16 (100)	0 (0)	8 (88.89)	0 (0)
<i>malX</i>	58 (100)	0 (0)	33 (100)	0 (0)	16 (100)	0 (0)	9 (100)	0 (0)
<i>agn43</i>	58 (100)	0 (0)	33 (100)	0 (0)	16 (100)	0 (0)	9 (100)	0 (0)

*C=cromosoma, *P=plásmido.

Tabla 32. Distribución de los virotipos en los genomas de estudio y subclones.

Viotipo	ST131 n=58 (%)	H30-Rx n=33 (%)	H30-R n=16 (%)	No H30 n=9 (%)
A	6 (10.34)	6 (18.18)	0 (0)	0 (0)
B	2 (3.45)	2 (6.06)	0 (0)	0 (0)
C	43 (74.14)	24 (72.73)	15 (93.75)	4 (44.44)
D	5 (8.62)	0 (0)	0 (0)	5 (55.56)
E	1 (1.72)	1 (3.03)	0 (0)	0 (0)
ND	1 (1.72)	0 (0)	1 (6.25)	0 (0)

Tabla 41. Genes de resistencia a betalactámicos, presentes en los genomas de estudio.

Genes asociados a resistencia hacia betalactámicos								
Gen	ST131 n=58 %		H30-Rx n=33 %		H30-R n=16 %		No H30 n=9 %	
	*C	*P	*C	*P	*C	*P	*C	*P
<i>bla</i> _{CTX-M-3}	0 (0)	1 (1.72)	0 (0)	1 (3.03)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>bla</i> _{CTX-M-14}	3 (5.17)	1 (1.72)	0 (0)	0 (0)	3 (18.75)	0 (0)	0 (0)	1 (11.11)
<i>bla</i> _{CTX-M-15}	18 (31.03)	23 (39.66)	17 (51.52)	20 (60.6)	1 (6.25)	2 (12.5)	0 (0)	1 (11.11)
<i>bla</i> _{CTX-M-27}	0 (0)	6 (10.34)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	5 (31.25)	0 (0)	1 (11.11)
<i>bla</i> _{CTX-M-32}	0 (0)	1 (1.72)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (6.25)	0 (0)	0 (0)
<i>bla</i> _{CTX-M-55}	1 (1.72)	1 (1.72)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (11.11)	1 (11.11)
<i>bla</i> _{OXA-1}	11 (18.97)	22 (37.93)	10 (30.3)	19 (57.58)	1 (6.25)	2 (12.5)	0 (0)	1 (11.11)
<i>bla</i> _{OXA-9}	0 (0)	2 (3.45)	0 (0)	1 (3.03)	0 (0)	1 (6.25)	0 (0)	0 (0)
<i>bla</i> _{TEM-1A}	0 (0)	3 (5.17)	0 (0)	1 (3.03)	0 (0)	1 (6.25)	0 (0)	1 (11.11)
<i>bla</i> _{TEM-1B}	4 (6.9)	18 (31.03)	1 (3.03)	9 (27.27)	1 (6.25)	5 (31.25)	2 (22.22)	4 (44.44)
<i>bla</i> _{CMY-2}	1 (1.72)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (11.11)	0 (0)
<i>bla</i> _{CMY-6}	1 (1.72)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (11.11)	0 (0)
<i>bla</i> _{NDM-1}	0 (0)	1 (1.72)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (11.11)
<i>bla</i> _{KPC-2}	1 (1.72)	1 (1.72)	0 (0)	1 (3.03)	1 (6.25)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>bla</i> _{KPC-3}	0 (0)	1 (1.72)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (6.25)	0 (0)	0 (0)
<i>bla</i> _{IMP-1}	1 (1.72)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (6.25)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

*C=cromosoma, *P=plásmido.

Tabla 42. Genes de resistencia a quinolonas, presentes en los genomas de estudio.

Genes asociados a resistencia hacia quinolonas								
Gen	ST131 n=58 %		H30-Rx n=33 %		H30-R n=16 %		No H30 n=9 %	
	*C	*P	*C	*P	*C	*P	*C	*P
<i>gyrA</i>	53 (91.38)	0 (0)	33 (100)	0 (0)	15 (93.75)	0 (0)	5 (55.56)	0 (0)
<i>gyrB</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>parC</i>	51 (87.93)	0 (0)	33 (100)	0 (0)	15 (93.75)	0 (0)	3 (33.33)	0 (0)
<i>parE</i>	56 (96.55)	0 (0)	32 (96.97)	0 (0)	16 (100)	0 (0)	8 (88.89)	0 (0)
<i>aac(6')- lb-cr</i>	14 (24.14)	20 (34.48)	12 (36.36)	16 (48.48)	2 (12.5)	3 (18.75)	0 (0)	1 (11.11)
<i>qnrA</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>qnrB</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>qnrC</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>qnrD</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>qnrS</i>	0 (0)	1 (1.72)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (6.25)	0 (0)	0 (0)
<i>qepA</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>oqxA</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>oqxB</i>	-	-	-	-	-	-	-	-

*C=cromosoma, *P=plásmido.

Tabla 43. Genes de resistencia a aminoglucósidos, presentes en los genomas de estudio.

Genes asociados a resistencia hacia aminoglucósidos								
Gen	ST131 n=58 %		H30-Rx n=33 %		H30-R n=16 %		No H30 n=9 %	
	*C	*P	*C	*P	*C	*P	*C	*P
<i>aac(6')-lb- cr</i>	14 (24.14)	20 (34.48)	12 (36.36)	16 (48.48)	2 (12.5)	3 (18.75)	0 (0)	1 (11.11)
<i>aac(6')-lb- Hangzhou</i>	1 (1.72)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (6.25)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>aac(3)-IIa</i>	12 (20.69)	7 (12.07)	12 (36.36)	6 (18.18)	0 (0)	1 (6.25)	0 (0)	0 (0)
<i>aac(3)-IIId</i>	1 (1.72)	5 (8.62)	0 (0)	2 (6.06)	0 (0)	2 (12.5)	1 (11.11)	1 (11.11)
<i>aac(3)-IV</i>	0 (0)	1 (1.72)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (11.11)
<i>aadA1</i>	1 (1.72)	3 (5.17)	1 (3.03)	0 (0)	0 (0)	1 (6.25)	0 (0)	2 (22.22)

<i>aadA2</i>	2 (3.45)	2 (3.45)	0 (0)	1 (3.03)	1 (6.25)	0 (0)	1 (11.11)	1 (11.11)
<i>aadA5</i>	4 (6.9)	26 (44.83)	3 (9.09)	14 (42.42)	1 (6.25)	10 (62.5)	0 (0)	2 (22.22)
<i>aadB</i>	1 (1.72)	1 (1.72)	1 (3.03)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (11.11)
<i>aph(3')-Ia</i>	0 (0)	2 (3.45)	0 (0)	1 (3.03)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (11.11)
<i>aph(3')-VI</i>	0 (0)	1 (1.72)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (11.11)
<i>aph(4)-Ia</i>	0 (0)	1 (1.72)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (11.11)
<i>strA</i>	3 (5.17)	14 (24.14)	2 (6.06)	4 (12.12)	0 (0)	8 (50)	1 (11.11)	2 (22.22)
<i>strB</i>	3 (5.17)	14 (24.14)	2 (6.06)	4 (12.12)	0 (0)	8 (50)	1 (11.11)	2 (22.22)

*C=cromosoma, *P=plásmido.

Tabla 44. Genes de resistencia a tetraciclinas, fenicoles, macrólidos, rifamicina, nitrofuranos, fosfonatos y polimixinas, presentes en los genomas de estudio.

Genes asociados a resistencia hacia tetraciclinas, fenicoles, macrólidos, rifamicina, nitrofuranos, fosfonatos y polimixinas								
Gen	ST131 n=58 %		H30-Rx n=33 %		H30-R n=16 %		No H30 n=9 %	
	*C	*P	*C	*P	*C	*P	*C	*P
<i>tet(A)</i>	5 (8.62)	27 (46.55)	4 (12.12)	19 (57.58)	0 (0)	6 (37.5)	1 (11.11)	2 (22.22)
<i>tet(B)</i>	0 (0)	1 (1.72)	0 (0)	1 (3.03)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>catB1</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>catB2</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>catB3</i>	13 (22.41)	21 (36.21)	12 (36.36)	18 (54.55)	1 (6.25)	2 (12.5)	0 (0)	1 (11.11)
<i>cmlA1</i>	1 (1.72)	1 (1.72)	1 (3.03)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (11.11)
<i>cml</i>	0 (0)	1 (1.72)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (11.11)
<i>floR</i>	0 (0)	2 (3.45)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (22.22)
<i>mph(A)</i>	6 (10.34)	24 (41.38)	5 (15.15)	13 (39.39)	1 (6.25)	9 (56.25)	0 (0)	2 (22.22)
<i>mph(B)</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>arr-2</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>arr-4</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>nfsA*</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>nfsB*</i>	-	-	-	-	-	-	-	-

<i>fosA3</i>	0 (0)	1 (1.72)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (11.11)
<i>mcr-1.1</i>	0 (0)	2 (3.45)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (22.22)

. *C=cromosoma, *P=plásmido.

Tabla 45. Genes de resistencia a diaminopirimidinas y sulfonamidas, presentes en los genomas de estudio.

Genes asociados a resistencia hacia inhibidores de la vía del folato (diaminopirimidinas y sulfonamidas)								
Gen	ST131 n=58 %		H30-Rx n=33 %		H30-R n=16 %		No H30 n=9 %	
	*C	*P	*C	*P	*C	*P	*C	*P
<i>dfrA12</i>	1 (1.72)	1 (1.72)	0 (0)	1 (3.03)	0 (0)	0 (0)	1 (11.11)	0 (0)
<i>dfrA14</i>	0 (0)	3 (5.17)	0 (0)	1 (3.03)	0 (0)	1 (6.25)	0 (0)	1 (11.11)
<i>dfrA17</i>	4 (6.9)	25 (43.1)	3 (9.09)	13 (39.9)	1 (6.25)	10 (62.5)	0 (0)	2 (22.22)
<i>dfrB1</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>dfrB2</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>sul1</i>	5 (8.62)	27 (46.55)	3 (9.09)	14 (42.42)	1 (6.25)	10 (62.5)	1 (11.11)	3 (33.3)
<i>sul2</i>	3 (5.17)	14 (24.14)	2 (6.06)	4 (12.12)	0 (0)	8 (50)	1 (11.11)	2 (22.22)
<i>sul3</i>	0 (0)	1 (1.72)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (11.11)

*C=cromosoma, *P=plásmido.

Tabla 53. Distribución de genomas portadores de 0-7 plásmidos.

No. de plásmidos/cepa	ST131 n=58 (%)	H30-Rx n=33 (%)	H30-R n=16 (%)	No H30 n=9 (%)
1	28 (48.31)	18 (54.55)	6 (37.5)	4 (44.44)
2	11 (19)	7 (21.21)	4 (25)	0 (0)
3	5 (8.6)	1 (3.03)	0 (0)	4 (44.44)
4	1 (1.7)	0 (0)	1 (6.25)	0 (0)
5	3 (5.2)	1 (3.03)	1 (6.25)	1 (11.11)
6	2 (3.4)	0 (0)	2 (12.5)	0 (0)
7	2 (3.4)	1 (3.03)	1 (6.25)	0 (0)
0	6 (10.3)	5 (15.15)	1 (6.25)	0 (0)
Total	110 (100)	47 (42.73)	42 (38.18)	21 (19.09)

Tabla 54. Replicones de diversos grupos Inc detectados en los genomas de estudio y subclones.

Replicón	ST131 n=110 (%)	H30-Rx n=47 (%)	H30-R n=42 (%)	No H30 n=21 (%)
IncFIA	5 (4.55)	3 (6.38)	2 (4.76)	0 (0)
IncFIB	6 (5.45)	5 (10.64)	1 (2.38)	0 (0)
IncFII	8 (7.27)	4 (8.51)	1 (2.38)	3 (14.29)
IncFIA, IncFIB	1 (0.9)	1 (2.13)	0 (0)	0 (0)
IncFIA, IncFII	13 (11.8)	7 (14.89)	5 (11.9)	1 (4.76)
IncFIB, IncFII	2 (1.8)	1 (2.13)	0 (0)	1 (4.76)
IncFII, IncN	2 (1.8)	2 (4.26)	0 (0)	0 (0)
IncFIA, IncFIB, IncFII	11 (10)	7 (14.89)	2 (4.76)	2 (9.52)
IncFIA, IncFIB, IncFII, Col156	6 (5.45)	1 (2.13)	5 (11.9)	0 (0)
IncFIB, IncFII, Col156	3 (2.73)	0 (0)	0 (0)	3 (14.29)
Col	9 (8.18)	3 (6.38)	5 (11.9)	1 (4.76)
Col156	2 (1.8)	1 (2.13)	1 (2.38)	0 (0)
Incl1	6 (5.45)	1 (2.13)	3 (7.14)	2 (9.52)
IncN	5 (4.55)	1 (2.13)	3 (7.14)	1 (4.76)
IncHI2, IncHI2A	2 (1.8)	0 (0)	0 (0)	2 (9.52)
Otros	4 (3.64)	1 (2.13)	1 (2.38)	2 (9.52)
NT	25 (22.73)	9 (19.15)	13 (30.95)	3 (14.29)

Tabla 55. Alelos reportados en los replicones IncF de los genomas de estudio.

Replicones IncF	ST131 n=57 (%)	H30-Rx n=31 (%)	H30-R n=16 (%)	No H30 n=10 (%)
F-:A2:B-	1 (1.75)	0 (0)	1 (6.25)	0 (0)
F1:A-:B23	1 (1.75)	1 (3.23)	0 (0)	0 (0)
F1:A1:B16	1 (1.75)	0 (0)	0 (0)	1 (10)
F1:A2:B20	5 (8.77)	0 (0)	5 (31.25)	0 (0)
F2:A-:B-	6 (10.53)	2 (6.45)	2 (12.5)	2 (20)
F2:A1:B-	2 (3.5)	2 (6.45)	0 (0)	0 (0)
F2:A1:B23	1 (1.75)	0 (0)	0 (0)	1 (10)
F2:A2:B20	1 (1.75)	0 (0)	1 (6.25)	0 (0)
F2:A6:B-	1 (1.75)	1 (3.23)	0 (0)	0 (0)
F10:A-:B-	1 (1.75)	1 (3.23)	0 (0)	0 (0)
F16:A-:B-	1 (1.75)	0 (0)	0 (0)	1 (10)
F18:A-:B1	1 (1.75)	0 (0)	0 (0)	1 (10)
F22:A1:B20	1 (1.75)	0 (0)	1 (6.25)	0 (0)
F29:A-:B10	3 (5.26)	0 (0)	0 (0)	3 (30)

F35:A-:B-	1 (1.75)	1 (3.23)	0 (0)	0 (0)
F36:A4:B1	2 (3.5)	2 (6.45)	0 (0)	0 (0)
F36:A6:B1	3 (5.26)	3 (9.68)	0 (0)	0 (0)
F48:A1:B49	1 (1.75)	1 (3.23)	0 (0)	0 (0)
ND	24 (42.1)	17 (54.8)	6 (37.5)	1 (10)

Los resultados marcados en amarillo fueron seleccionados para el reporte de resultados por presentarse en más de 2 plásmidos.

Tabla 56. Disposición del gen *traT* y las relaxasas MOB_F y MOB_Q en los genomas de estudio.

Gen	ST131 n=110 (%)	H30-Rx n=47 (%)	H30-R n=42 (%)	No H30 n=21 (%)
<i>traT</i>	30 (27.27)	12 (25.53)	9 (21.43)	9 (42.86)
MOB_{F11}	2 (1.8)	0 (0)	1 (2.38)	1 (4.76)
MOB_{F12}	32 (29.09)	13 (27.66)	10 (23.8)	9 (42.86)
MOB_{Q11}	-	-	-	-
MOB_{Q12}	4 (3.6)	1 (2.13)	3 (7.14)	0 (0)
MOB_{Qu}	6 (5.45)	1 (2.13)	4 (9.52)	1 (4.76)

12. BIBLIOGRAFÍA

- Abe, C. M., Salvador, F. A., Falsetti, I. N., Vieira, M. A. M., Blanco, J., Blanco, J. E., Blanco, M., Machado, A. M. O., Elias, W. P., Hernandez, R. T., & Gomes, T. A. T. (2008). Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) strains may carry virulence properties of diarrhoeagenic *E. coli*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, *52*(3). <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2008.00388.x>
- Alvarado, A., Garcillán-Barcia, M. P., & Cruz, F. de la. (2012). A Degenerate Primer MOB Typing (DPMT) Method to Classify Gamma-Proteobacterial Plasmids in Clinical and Environmental Settings. *PLoS ONE*, *7*(7), 40438. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0040438>
- Alvarado García, A., & Andrés. (2016). *Clasificación de plásmidos por relaxasas*. <https://repositorio.unican.es/xmlui/handle/10902/8234>
- Ambite, I., Butler, D. S. C., Stork, C., Grönberg-Hernández, J., Köves, B., Zdziarski, J., Pinkner, J., Hultgren, S. J., Dobrindt, U., Wullt, B., & Svanborg, C. (2019). Fimbriae reprogram host gene expression – Divergent effects of P and type 1 fimbriae. *PLoS Pathogens*, *15*(6), e1007671. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1007671>
- Ananias, M., & Yano, T. (2008). Serogroups and virulence genotypes of *Escherichia coli* isolated from patients with sepsis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, *41*(10). <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2008001000008>
- Ballesteros-Monrreal, M. G., Arenas-Hernández, M. M. P., Enciso-Martínez, Y., Martínez-De la Peña, C. F., Rocha-Gracia, R. D. C., Lozano-Zaraín, P., Navarro-Ocaña, A., Martínez-Laguna, Y., & de la Rosa-López, R. (2020). Virulence and resistance determinants of uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from pregnant and non-pregnant women from two states in Mexico. *Infection and Drug Resistance*, *13*. <https://doi.org/10.2147/IDR.S226215>
- Banerjee, R., & Johnson, J. R. (2014). A new clone sweeps clean: The enigmatic emergence of *Escherichia coli* sequence type 131. In *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (Vol. 58, Issue 9). <https://doi.org/10.1128/AAC.02824-14>
- Banerjee, R., Robicsek, A., Kuskowski, M. A., Porter, S., Johnston, B. D., Sokurenko, E., Tchesnokova, V., Price, L. B., & Johnson, J. R. (2013). Molecular Epidemiology of *Escherichia coli* Sequence Type 131 and Its H30 and H30-Rx Subclones among Extended-Spectrum- β -Lactamase-Positive and -Negative *E. coli* Clinical Isolates from the Chicago Region, 2007 to 2010. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *57*(12), 6385. <https://doi.org/10.1128/AAC.01604-13>
- Barrios-Arnau, L., Sánchez-Llopis, A., Ponce-Blasco, P., Gomila Sard, B., Monsonis Usó, R., Barrios-Arnau, M., & Di Capua-Sacoto, C. (2019). Urinary tract infections caused by extended spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* at a Spanish tertiary care hospital Infecciones del tracto urinario producidas por *Escherichia coli* resistentes a betalactamasas en un hospital terciario de España. *Artículo Original Revista Mexicana de Urología ISSN*, *79*(2), 1–8.
- Barrios-Villa, E., Cortés-Cortés, G., Lozano-Zaraín, P., Arenas-Hernández, M. M. D. L. P., Martínez De La Peña, C. F., Martínez-Laguna, Y., Torres, C., & Rocha-Gracia, R. D. C. (2018). Adherent/invasive *Escherichia coli* (AIEC) isolates from asymptomatic people: New *E. coli* ST131 O25:H4/H30-Rx virotypes. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, *17*(1). <https://doi.org/10.1186/s12941-018-0295-4>
- Bauer, R. J., Zhang, L., Foxman, B., Siitonen, A., Jantunen, M. E., Saxen, H., & MARRS, C. F. (2002). Molecular epidemiology of 3 putative virulence genes for *Escherichia coli* urinary tract infection - *usp*, *iha*, and *iroNE*. *Journal of Infectious Diseases*, *185*(10). <https://doi.org/10.1086/340206>

- Bauernfeind, A., Schweighart, S., & Grimm, H. (1990). A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Infection* 1990 18:5, 18(5), 294–298. <https://doi.org/10.1007/BF01647010>
- Beghain, J., Bridier-Nahmias, A., Nagard, H. Le, Denamur, E., & Clermont, O. (2018). ClermonTyping: An easy-to-use and accurate in silico method for *Escherichia coli* genus strain phylotyping. *Microbial Genomics*, 4(7). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000192>
- Ben Zakour, N. L., Alsheikh-Hussain, A. S., Ashcroft, M. M., Khanh Nhu, N. T., Roberts, L. W., Stanton-Cook, M., Schembri, M. A., & Beatson, S. A. (2016). Sequential acquisition of virulence and fluoroquinolone resistance has shaped the evolution of *Escherichia coli* ST131. *MBio*, 7(2). <https://doi.org/10.1128/mBio.00347-16>
- Bethke, J. H., Davidovich, A., Cheng, L., Lopatkin, A. J., Song, W., Thaden, J. T., Fowler, V. G., Xiao, M., & You, L. (2020). Environmental and genetic determinants of plasmid mobility in pathogenic *Escherichia coli*. *Science Advances*, 6(4). <https://doi.org/10.1126/sciadv.aax3173>
- Bidet, P., Mahjoub-Messai, F., Blanco, J., Blanco, J., Dehem, M., Aujard, Y., Bingen, E., & Bonacorsi, S. (2007). Combined multilocus sequence typing and O serogrouping distinguishes *Escherichia coli* subtypes associated with infant urosepsis and/or meningitis. *Journal of Infectious Diseases*, 196(2). <https://doi.org/10.1086/518897>
- Biggel, M., Xavier, B. B., Johnson, J. R., Nielsen, K. L., Frimodt-Møller, N., Matheeussen, V., Goossens, H., Moons, P., & Van Puyvelde, S. (2020). Horizontally acquired papGII-containing pathogenicity islands underlie the emergence of invasive uropathogenic *Escherichia coli* lineages. *Nature Communications* 2020 11:1, 11(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19714-9>
- Blanc, V., Leflon-Guibout, V., Blanco, J., Haenni, M., Madec, J. Y., Rafignon, G., Bruno, P., Mora, A., Lopez, C., Dahbi, G., Dunais, B., Anastay, M., Branger, C., Moreau, R., Pradier, C., & Nicolas-Chanoine, M. H. (2014). Prevalence of day-care centre children (France) with faecal CTX-M-producing *Escherichia coli* comprising O25b: H4 and O16: H5 ST131 strains. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(5). <https://doi.org/10.1093/jac/dkt519>
- Blanco, J., Mora, A., Mamani, R., López, C., Blanco, M., Dahbi, G., Herrera, A., Marzoa, J., Fernández, V., De La Cruz, F., Martínez-Martínez, L., Alonso, M. P., Nicolas-Chanoine, M. H., Johnson, J. R., Johnston, B., López-Cerero, L., Pascual, Á., & Rodríguez-Baño, J. (2013). Four Main Virotypes among Extended-Spectrum-β-Lactamase-Producing Isolates of *Escherichia coli* O25b:H4-B2-ST131: Bacterial, Epidemiological, and Clinical Characteristics. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(10), 3358. <https://doi.org/10.1128/JCM.01555-13>
- Blanco, M., Blanco, J. E., Alonso, M. P., & Blanco, J. (1994). Virulence factors and O groups of *Escherichia coli* strains isolated from cultures of blood specimens from urosepsis and non-urosepsis patients. In *Microbiología (Madrid, Spain)* (Vol. 10, Issue 3).
- Blanco, M., Blanco, J. E., Alonso, M. P., Mora, A., Balsalobre, C., Muñoz, F., Juárez, A., & Blanco, J. (1997). Detection of pap, sfa and afa adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains: Relationship with expression of adhesins and production of toxins. *Research in Microbiology*, 148(9). [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(97\)82450-3](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(97)82450-3)
- Blanco, M., Alonso, M. P., Nicolas-Chanoine, M.-H., Dahbi, G., Mora, A., Blanco, J. E., López, C., Cortés, P., Llagostera, M., Leflon-Guibout, V., Puentes, B., Mamani, R., Herrera, A., Coira, M. A., García-Garrote, F., Pita, J. M., & Blanco, J. (2009). Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing extended-spectrum β-lactamases in Lugo (Spain): dissemination of clone O25b:H4-ST131 producing CTX-M-15. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63(6), 1135–1141. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKP122>
- Blum, G., Ott, M., Lischewski, A., Ritter, A., Imrich, H., Tschape, H., & Hacker, J. (1994). Excision of large DNA regions termed pathogenicity islands from tRNA-specific loci in the chromosome of

- an *Escherichia coli* wild-type pathogen. *Infection and Immunity*, 62(2). <https://doi.org/10.1128/iai.62.2.606-614.1994>
- Bonomo, R. A. (2017). β -Lactamases: A focus on current challenges. In *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* (Vol. 7, Issue 1). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025239>
- Breland, E. J., Eberly, A. R., & Hadjifrangiskou, M. (2017). An Overview of Two-Component Signal Transduction Systems Implicated in Extra-Intestinal Pathogenic *E. coli* Infections. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(MAY), 162. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2017.00162>
- Briñas, L., Moreno, M. A., Zarazaga, M., Porrero, C., Sáenz, Y., García, M., Dominguez, L., & Torres, C. (2003). Detection of CMY-2, CTX-M-14, and SHV-12 β -Lactamases in *Escherichia coli* Fecal-Sample Isolates from Healthy Chickens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(6), 2056. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.6.2056-2058.2003>
- Brons, J. K., Vink, S. N., de Vos, M. G. J., Reuter, S., Dobrindt, U., & van Elsas, J. D. (2020). Fast identification of *Escherichia coli* in urinary tract infections using a virulence gene based PCR approach in a novel thermal cycler. *Journal of Microbiological Methods*, 169. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2019.105799>
- Brzuszkiewicz, E., Brüggemann, H., Liesegang, H., Emmerth, M., Ölschläger, T., Nagy, G., Albermann, K., Wagner, C., Buchrieser, C., Emody, L., Gottschalk, G., Hacker, J., & Dobrindt, U. (2006). How to become a uropathogen: Comparative genomic analysis of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(34). <https://doi.org/10.1073/pnas.0603038103>
- Buckles, E. L., Bahrani-Mougeot, F. K., Molina, A., Lockatell, C. V., Johnson, D. E., Drachenberg, C. B., Burland, V., Blattner, F. R., & Donnenberg, M. S. (2004). Identification and characterization of a novel uropathogenic *Escherichia coli*-associated fimbrial gene cluster. *Infection and Immunity*, 72(7). <https://doi.org/10.1128/IAI.72.7.3890-3901.2004>
- Bush, K. (2013). Proliferation and significance of clinically relevant β -lactamases. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1277(1). <https://doi.org/10.1111/nyas.12023>
- Cai, W., Wannemuehler, Y., Dell'Anna, G., Nicholson, B., Barbieri, N. L., Kariyawasam, S., Feng, Y., Logue, C. M., Nolan, L. K., & Li, G. (2013). A Novel Two-Component Signaling System Facilitates Uropathogenic *Escherichia coli*'s Ability to Exploit Abundant Host Metabolites. *PLoS Pathogens*, 9(6). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003428>
- Campos, A. C. C., Andrade, N. L., Ferdous, M., Chlebowicz, M. A., Santos, C. C., Correal, J. C. D., Lo Ten Foe, J. R., Rosa, A. C. P., Damasco, P. V., Friedrich, A. W., & Rossen, J. W. A. (2018). Comprehensive Molecular Characterization of *Escherichia coli* Isolates from Urine Samples of Hospitalized Patients in Rio de Janeiro, Brazil. *Frontiers in Microbiology*, 9(FEB), 243. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.00243/BIBTEX>
- Cantón, R., Novais, A., Valverde, A., Machado, E., Peixe, L., Baquero, F., & Coque, T. M. (2008). Prevalence and spread of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Clinical Microbiology and Infection*, 14(SUPPL. 1), 144–153. <https://doi.org/10.1111/J.1469-0691.2007.01850.X>
- Cantón, R., & Coque, T. M. (2006). The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Current Opinion in Microbiology*, 9(5).
- Cantón, R., González-Alba, J. M., & Galán, J. C. (2012). CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion. *Frontiers in Microbiology*, 3(APR). <https://doi.org/10.3389/FMICB.2012.00110>
- Carattoli, A. (2009). Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(6), 2227–2238. <https://doi.org/10.1128/AAC.01707-08>
- Carattoli, A., García-Fernández, A., Varesi, P., Fortini, D., Gerardi, S., Penni, A., Mancini, C., &

- Giordano, A. (2008). Molecular epidemiology of escherichia coli producing extended-spectrum β -lactamases isolated in Rome, Italy. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(1), 103–108. <https://doi.org/10.1128/JCM.01542-07>
- Carattoli, A., & Hasman, H. (2020). PlasmidFinder and In Silico pMLST: Identification and Typing of Plasmid Replicons in Whole-Genome Sequencing (WGS). *Methods in Molecular Biology*, 2075, 285–294. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9877-7_20
- Carattoli, A., Zankari, E., García-Fernández, A., Larsen, M. V., Lund, O., Villa, L., Aarestrup, F. M., & Hasman, H. (2014). In Silico Detection and Typing of Plasmids using PlasmidFinder and Plasmid Multilocus Sequence Typing. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(7), 3895. <https://doi.org/10.1128/AAC.02412-14>
- Casadevall, A., & Pirofski, L. A. (2003). The damage-response framework of microbial pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology*, 1(1). <https://doi.org/10.1038/nrmicro732>
- Cattoir, V., Poirel, L., & Nordmann, P. (2008). Plasmid-mediated quinolone resistance pump QepA2 in an Escherichia coli isolate from France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(10). <https://doi.org/10.1128/AAC.00638-08>
- Cavaco, L. M., Hasman, H., Xia, S., & Aarestrup, F. M. (2009). qnrD, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in Salmonella enterica serovar Kentucky and Bovismorbificans strains of human origin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(2). <https://doi.org/10.1128/AAC.00997-08>
- CDC. (2020). *How Antibiotic Resistance Happens | Antibiotic/Antimicrobial Resistance | CDC*. <https://www.cdc.gov/drugresistance/about/how-resistance-happens.html>
- CDC. (2017). Antibiotic Use in the United States, 2017: Progress and Opportunities. *US Department of Health and Human Services*, 1–40. <https://www.cdc.gov/antibiotic-use/stewardship-report/pdf/stewardship-report.pdf>
- Chen, F., Lv, T., Xiao, Y., Chen, A., Xiao, Y., & Chen, Y. (2021). Clinical Characteristics of Patients and Whole Genome Sequencing-Based Surveillance of Escherichia coli Community-Onset Bloodstream Infections at a Non-tertiary Hospital in CHINA. *Frontiers in Microbiology*, 12, 2925. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.748471/BIBTEX>
- Ciesielczuk, H., Jenkins, C., Chattaway, M., Doumith, M., Hope, R., Woodford, N., & Wareham, D. W. (2016). Trends in ExPEC serogroups in the UK and their significance. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 35(10), 1661. <https://doi.org/10.1007/S10096-016-2707-8>
- Clermont, O., Bonacorsi, S., & Bingen, E. (2000). Rapid and simple determination of the Escherichia coli phylogenetic group. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(10). <https://doi.org/10.1128/AEM.66.10.4555-4558.2000>
- Clermont, O., Christenson, J. K., Denamur, E., & Gordon, D. M. (2013). The Clermont Escherichia coli phylo-typing method revisited: Improvement of specificity and detection of new phylogroups. *Environmental Microbiology Reports*, 5(1). <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12019>
- Clermont, O., Dhanji, H., Upton, M., Gibreel, T., Fox, A., Boyd, D., Mulvey, M. R., Nordmann, P., Ruppé, E., Sarthou, J. L., Frank, T., Vimont, S., Arlet, G., Branger, C., Woodford, N., & Denamur, E. (2009). Rapid detection of the O25b-ST131 clone of Escherichia coli encompassing the CTX-M-15-producing strains. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64(2), 274–277. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKP194>
- Clermont, O., Dixit, O. V. A., Vangchhia, B., Condamine, B., Dion, S., Bridier-Nahmias, A., Denamur, E., & Gordon, D. (2019). Characterization and rapid identification of phylogroup G in Escherichia coli, a lineage with high virulence and antibiotic resistance potential. *Environmental Microbiology*, 21(8), 3107–3117. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14713>

- Coelho, A., Mora, A., Mamani, R., López, C., González-López, J. J., Larrosa, M. N., Quintero-Zarate, J. N., Dahbi, G., Herrera, A., Blanco, J. E., Blanco, M., Alonso, M. P., Prats, G., & Blanco, J. (2011). Spread of *Escherichia coli* O25b:H4-B2-ST131 producing CTX-M-15 and SHV-12 with high virulence gene content in Barcelona (Spain). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(3). <https://doi.org/10.1093/jac/dkq491>
- Colpan, A., Johnston, B., Porter, S., Clabots, C., Anway, R., Thao, L., Kuskowski, M. A., Tchesnokova, V., Sokurenko, E. V., Johnson, J. R., Investigators, on behalf of the V. (Veterans I. of C. T. on R. Y. 2011), Allen, B. L., Baracco, G. J., Bedimo, R., Bessesen, M., Bonomo, R. A., Brecher, S. M., Brown, S. T., Castellino, L., ... Swiatlo, E. (2013). *Escherichia coli* Sequence Type 131 (ST131) Subclone H30 as an Emergent Multidrug-Resistant Pathogen Among US Veterans. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 57(9), 1256. <https://doi.org/10.1093/CID/CIT503>
- Coque, T. M., Novais, Â., Carattoli, A., Poirel, L., Pitout, J., Peixe, L., Baquero, F., Cantón, R., & Nordmann, P. (2008). Dissemination of Clonally Related *Escherichia coli* Strains Expressing Extended-Spectrum β -Lactamase CTX-M-15. *Emerging Infectious Diseases*, 14(2), 195. <https://doi.org/10.3201/EID1402.070350>
- Cordeiro, M. A., Werle, C. H., Milanez, G. P., & Yano, T. (2016). Curli fimbria: an *Escherichia coli* adhesin associated with human cystitis. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(2), 414–416. <https://doi.org/10.1016/J.BJM.2016.01.024>
- Cortez-De la Puente, I. (2020). Estudio de la virulencia y características de transferencia de material genético en cepas de *E. coli* aislada de infección de tracto urinario. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Croxall, G., Hale, J., Weston, V., Manning, G., Cheetham, P., Achtman, M., & McNally, A. (2011). Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolates from a regional cohort of elderly patients highlights the prevalence of ST131 strains with increased antimicrobial resistance in both community and hospital care settings. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(11), 2501–2508. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKR349>
- Croxen, M. A., Law, R. J., Scholz, R., Keeney, K. M., Wlodarska, M., & Finlay, B. B. (2013). Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 26, Issue 4). <https://doi.org/10.1128/CMR.00022-13>
- Curiao, T., Cantón, R., Garcillán-Barcia, M. P., De La Cruz, F., Baquero, F., & Coque, T. M. (2011). Association of Composite IS26-sul3 Elements with Highly Transmissible Inc11 Plasmids in Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* Clones from Humans. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(5), 2451. <https://doi.org/10.1128/AAC.01448-10>
- D'Andrea, M. M., Arena, F., Pallecchi, L., & Rossolini, G. M. (2013). CTX-M-type β -lactamases: A successful story of antibiotic resistance. In *International Journal of Medical Microbiology* (Vol. 303, Issues 6–7). <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.02.008>
- Dadi, B. R., Abebe, T., Zhang, L., Mihret, A., Abebe, W., & Amogne, W. (2020). Distribution of virulence genes and phylogenetics of uropathogenic *Escherichia coli* among urinary tract infection patients in Addis Ababa, Ethiopia. *BMC Infectious Diseases*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/S12879-020-4844-Z>
- Dahbi, G. (2015). *Epidemiología molecular y virulencia de cepas de "Escherichia coli" del grupo clonal ST131: los subclones 016:H5 H41 y 025b:H4 H30/H30-Rx*. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=137010&info=resumen&idioma=SPA>
- Daoud, Z., Sokhn, E. S., Masri, K., Cheaito, K., Haidar-Ahmad, N., Matar, G. M., & Doron, S. (2015). *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections of Lebanese patients between 2005 and 2012: Epidemiology and profiles of resistance. *Frontiers in Medicine*, 2(APR). <https://doi.org/10.3389/fmed.2015.00026>

- Demirci-Duarte, S., Unalan-Altintop, T., Koseoglu Eser, O., Cakar, A., Altun, B., Sancak, B., & Gur, D. (2020). Prevalence of O25b-ST131 clone and fosfomycin resistance in urinary *Escherichia coli* isolates and their relation to CTX-M determinant. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 98(1), 115098. <https://doi.org/10.1016/J.DIAGMICROBIO.2020.115098>
- Deshpande, L. M., Collingworth, T., Davis, A., Castanheira, M., & Mendes, R. E. (n.d.). *Prevalence of CC131 and the Emergence of Other Sequence Types among Escherichia coli Isolates Causing Urinary Tract Infections from Asia-Pacific, Europe, and Latin America*. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.UTI-0015-2012>
- Desmarchelier, P., & Fegan, N. (2016). Pathogens in Milk: *Escherichia coli*. In *Reference Module in Food Science*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100596-5.00989-6>
- Desvaux, M., Dalmasso, G., Beyrouthy, R., Barnich, N., Delmas, J., & Bonnet, R. (2020). Pathogenicity Factors of Genomic Islands in Intestinal and Extraintestinal *Escherichia coli*. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 11). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.02065>
- Díaz, J. M., Dozois, C. M., Avelar-González, F. J., Hernández-Cuellar, E., Pokharel, P., de Santiago, A. S., & Guerrero-Barrera, A. L. (2020). The Vacuolating Autotransporter Toxin (Vat) of *Escherichia coli* Causes Cell Cytoskeleton Changes and Produces Non-lysosomal Vacuole Formation in Bladder Epithelial Cells. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 0, 299. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2020.00299>
- Díaz, M. A., Hernández-Bello, J. R., Rodríguez-Baño, J., Martínez-Martínez, L., Calvo, J., Blanco, J., & Pascual, A. (2010). Diversity of *Escherichia coli* strains producing extended-spectrum β -lactamases in Spain: Second nationwide study. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(8), 2840–2845. <https://doi.org/10.1128/JCM.02147-09>
- Dimude, J. U., & Amyes, S. G. B. (2012). Molecular diversity associated with the dissemination of CTX-M-15 beta-lactamase gene in blood culture isolates of *Escherichia coli* from Edinburgh. *Http://Dx.Doi.Org/10.3109/00365548.2012.708781*, 45(1), 32–37. <https://doi.org/10.3109/00365548.2012.708781>
- Doi, Y., Iovleva, A., & Bonomo, R. A. (2017). The ecology of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) in the developed world. *Journal of Travel Medicine*, 24(suppl_1), S44–S51. <https://doi.org/10.1093/JTM/TAW102>
- Donovan, G. T., Paul Norton, J., Bower, J. M., & Mulvey, M. A. (2013). Adenylate cyclase and the cyclic AMP receptor protein modulate stress resistance and virulence capacity of uropathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 81(1). <https://doi.org/10.1128/IAI.00796-12>
- Douarre, P.-E., Mallet, L., Radomski, N., Felten, A., & Mistou, M.-Y. (2020). Analysis of COMPASS, a New Comprehensive Plasmid Database Revealed Prevalence of Multireplicon and Extensive Diversity of IncF Plasmids. *Frontiers in Microbiology*, 0, 483. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.00483>
- Echevarría Zárate, J. I., & Osorio Plenge, F. L. (2006). Infección del tracto urinario y manejo antibiótico. *Acta Médica Peruana*, 23(1).
- Fagan, R. P., & Smith, S. G. J. (2007). The Hek outer membrane protein of *Escherichia coli* is an auto-aggregating adhesin and invasins. *FEMS Microbiology Letters*, 269(2), 248–255. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6968.2006.00628.X>
- Fernandes, M. R., Sellera, F. P., Cunha, M. P. V., Lopes, R., Cerdeira, L., & Lincopan, N. (2020). Emergence of CTX-M-27-producing *Escherichia coli* of ST131 and clade C1-M27 in an impacted ecosystem with international maritime traffic in South America. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 75(6), 1647. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKAA069>
- Flament-Simon, S. C., García, V., Duprilot, M., Mayer, N., Alonso, M. P., García-Meniño, I., Blanco, J. E., Blanco, M., Nicolas-Chanoine, M. H., & Blanco, J. (2020). High Prevalence of ST131

- Subclades C2-H30Rx and C1-M27 Among Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* Causing Human Extraintestinal Infections in Patients From Two Hospitals of Spain and France During 2015. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00125>
- Fléchar, M., Cortes, M. A. M., Répérant, M., & Germon, P. (2012). New role for the *ibaA* gene in H₂O₂ stress resistance of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 194(17). <https://doi.org/10.1128/JB.00089-12>
- Flores-Mireles, A. L., Walker, J. N., Caparon, M., & Hultgren, S. J. (2015). Urinary tract infections: Epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 13, Issue 5). <https://doi.org/10.1038/nrmicro3432>
- Forsyth, V. S., Armbruster, C. E., Smith, S. N., Pirani, A., Springman, A. C., Walters, M. S., Nielubowicz, G. R., Himpsl, S. D., Snitkin, E. S., & Mobley, H. L. T. (2018). Rapid growth of uropathogenic *Escherichia coli* during human urinary tract infection. *MBio*, 9(2). <https://doi.org/10.1128/mBio.00186-18>
- Foxman, B. (2014). Urinary tract infection syndromes. Occurrence, recurrence, bacteriology, risk factors, and disease burden. In *Infectious Disease Clinics of North America* (Vol. 28, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.idc.2013.09.003>
- Foxman, B., & Brown, P. (2003). Epidemiology of urinary tract infections: Transmission and risk factors, incidence, and costs. In *Infectious Disease Clinics of North America* (Vol. 17, Issue 2). [https://doi.org/10.1016/S0891-5520\(03\)00005-9](https://doi.org/10.1016/S0891-5520(03)00005-9)
- Francia, M. V., Varsaki, A., Garcillán-Barcia, M. P., Latorre, A., Drainas, C., & de la Cruz, F. (2004). A classification scheme for mobilization regions of bacterial plasmids. *FEMS Microbiology Reviews*, 28(1), 79–100. <https://doi.org/10.1016/J.FEMSRE.2003.09.001>
- Gal-Mor, O., & Finlay, B. B. (2006). Pathogenicity islands: A molecular toolbox for bacterial virulence. In *Cellular Microbiology* (Vol. 8, Issue 11). <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00794.x>
- Garcillán-Barcia, M. P., Francia, M. V., & de La Cruz, F. (2009). The diversity of conjugative relaxases and its application in plasmid classification. *FEMS Microbiology Reviews*, 33(3), 657–687. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6976.2009.00168.X>
- Garénaux, A., Caza, M., & Dozois, C. M. (2011). The Ins and Outs of siderophore mediated iron uptake by extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Veterinary Microbiology*, 153(1–2), 89–98. <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2011.05.023>
- Gonzales-Rodriguez, A. O., Infante Varillas, S. F., Barrón Pastor, H. J., Llimpe Mitma, Y., Huerta Canales, D., Wong Chero, P. A., Gutierrez, C., Suarez Cunza, S., Gonzales-Rodriguez, A. O., Infante Varillas, S. F., Barrón Pastor, H. J., Llimpe Mitma, Y., Huerta Canales, D., Wong Chero, P. A., Gutierrez, C., & Suarez Cunza, S. (2020). Respuesta inmunológica y bioquímica de ancianos con infección urinaria frente factores de virulencia en *Escherichia coli* uropatógenas. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 37(3), 527–531. <https://doi.org/10.17843/RPMESP.2020.373.4918>
- Groisman, E. A., & Ochman, H. (1996). Pathogenicity islands: Bacterial evolution in quantum leaps. In *Cell* (Vol. 87, Issue 5). [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81985-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81985-6)
- Gumpert, H., Kubicek-Sutherland, J. Z., Porse, A., Karami, N., Munck, C., Linkevicius, M., Adlerberth, I., Wold, A. E., Andersson, D. I., & Sommer, M. O. A. (2017). Transfer and persistence of a multi-drug resistance plasmid in situ of the infant gut microbiota in the absence of antibiotic treatment. *Frontiers in Microbiology*, 8(SEP). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01852>
- Gupta, K., & Bhadelia, N. (2014). Management of urinary tract infections from multidrug-resistant organisms. In *Infectious Disease Clinics of North America* (Vol. 28, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.idc.2013.10.002>

- Gupta, K., Hooton, T. M., Naber, K. G., Wullt, B., Colgan, R., Miller, L. G., Moran, G. J., Nicolle, L. E., Raz, R., Schaeffer, A. J., & Soper, D. E. (2011). International Clinical Practice Guidelines for the Treatment of Acute Uncomplicated Cystitis and Pyelonephritis in Women: A 2010 Update by the Infectious Diseases Society of America and the European Society for Microbiology and Infectious Diseases. *Clinical Infectious Diseases*, 52(5), e103–e120. <https://doi.org/10.1093/CID/CIQ257>
- Gupta, K., Hooton, T. M., & Stamm, W. E. (2005). Isolation of fluoroquinolone-resistant rectal *Escherichia coli* after treatment of acute uncomplicated cystitis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56(1), 243–246. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKI169>
- Guyer, D. M., Kao, J. S., & Mobley, H. L. T. (1998). Genomic analysis of a pathogenicity island in uropathogenic *Escherichia coli* CFT073: Distribution of homologous sequences among isolates from patients with pyelonephritis, cystitis, and catheter-associated bacteriuria and from fecal samples. *Infection and Immunity*, 66(9). <https://doi.org/10.1128/iai.66.9.4411-4417.1998>
- Hacker, J., Blum-Oehler, G., Mühldorfer, I., & Tschäpe, H. (1997). Pathogenicity islands of virulent bacteria: Structure, function and impact on microbial evolution. In *Molecular Microbiology* (Vol. 23, Issue 6). <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.3101672.x>
- Hacker, Jörg, & Carniel, E. (2001). Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity: A Darwinian view of the evolution of microbes. *EMBO Reports*, 2(5), 376. <https://doi.org/10.1093/EMBO-REPORTS/KVE097>
- Hadjifrangiskou, M., Kostakioti, M., Chen, S. L., Henderson, J. P., Greene, S. E., & Hultgren, S. J. (2011). A central metabolic circuit controlled by QseC in pathogenic *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 80(6). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07660.x>
- Hagan, E. (2009). *Iron acquisition by uropathogenic Escherichia coli: ChuA and Hma heme receptors as virulence determinants and vaccine targets*. <http://deepblue.lib.umich.edu/handle/2027.42/63718>
- Hall, R. M. (2012). Integrons and gene cassettes: hotspots of diversity in bacterial genomes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1267(1), 71–78. <https://doi.org/10.1111/J.1749-6632.2012.06588.X>
- Hall, R. M., Collis, C. M., Kim, M. J., Partridge, S. R., Recchia, G. D., & Stokes, H. W. (1999). Mobile gene cassettes and integrons in evolution. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 870, 68–80. <https://doi.org/10.1111/J.1749-6632.1999.TB08866.X>
- Hannan, T. J., Totsika, M., Mansfield, K. J., Moore, K. H., Schembri, M. A., & Hultgren, S. J. (2012). Host-pathogen checkpoints and population bottlenecks in persistent and intracellular uropathogenic *Escherichia coli* bladder infection. In *FEMS Microbiology Reviews* (Vol. 36, Issue 3). <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00339.x>
- Harmer, C. J., & Hall, R. M. (2020). IS 26 Family Members IS 257 and IS 1216 Also Form Cointegrates by Copy-In and Targeted Conservative Routes. *MSphere*, 5(1). <https://doi.org/10.1128/MSPHERE.00811-19>
- Harmer, C. J., Moran, R. A., & Hall, R. M. (2014). Movement of IS26-Associated antibiotic resistance genes occurs via a translocatable unit that includes a single IS26 and preferentially inserts adjacent to another IS26. *MBio*, 5(5). <https://doi.org/10.1128/MBIO.01801-14>
- Hawkey, P. M. (2003). Mechanisms of quinolone action and microbial response. In *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (Vol. 51, Issue SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1093/jac/dkg207>
- He, S., Hickman, A. B., Varani, A. M., Siguier, P., Chandler, M., Dekker, J. P., & Dyda, F. (2015). Insertion Sequence IS26 Reorganizes Plasmids in Clinically Isolated Multidrug-Resistant Bacteria by Replicative Transposition. *MBio*, 6(3). <https://doi.org/10.1128/MBIO.00762-15>

- Hernández, J. R., Martínez-Martínez, L., Cantón, R., Coque, T. M., Pascual, A., Michaus, L., Martínez Peinado, C., Yagüe, A., Torreblanca, A., Fleites, A., Moreno, J. J., Gil, J., Domínguez, M. A., Marco, F., Del Valle, O., Corcoy, F., Ojeda, E., Marín, P., Fernández, C., ... García Moya, J. (2005). Nationwide study of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamases in Spain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(5), 2122–2125. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.5.2122-2125.2005>
- Hertz, F. B., Nielsen, J. B., Schønning, K., Littauer, P., Knudsen, J. D., Løbner-Olesen, A., & Frimodt-Møller, N. (2016). "Population structure of drug-susceptible,—resistant and ESBL-producing *Escherichia coli* from community-acquired urinary tract." *BMC Microbiology*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/S12866-016-0681-Z>
- Herzer, P. J., Inouye, S., Inouye, M., & Whittam, T. S. (1990). Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 172(11). <https://doi.org/10.1128/jb.172.11.6175-6181.1990>
- Ho, P. L., Wong, R. C., Chow, K. H., & Que, T. L. (2009). Distribution of integron-associated trimethoprim–sulfamethoxazole resistance determinants among *Escherichia coli* from humans and food-producing animals. *Letters in Applied Microbiology*, 49(5), 627–634. <https://doi.org/10.1111/J.1472-765X.2009.02717.X>
- Holden, N., Totsika, M., Dixon, L., Catherwood, K., & Gally, D. L. (2007). Regulation of P-fimbrial phase variation frequencies in *Escherichia coli* CFT073. *Infection and Immunity*, 75(7). <https://doi.org/10.1128/IAI.01989-06>
- Hooton, T. M. (2012). Uncomplicated Urinary Tract Infection. [Http://Dx.Doi.Org/10.1056/NEJMcp1104429](http://Dx.Doi.Org/10.1056/NEJMcp1104429), 366(11), 1028–1037. <https://doi.org/10.1056/NEJMCP1104429>
- Hopkins, K. L., Davies, R. H., & Threlfall, E. J. (2005). Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: Recent developments. In *International Journal of Antimicrobial Agents* (Vol. 25, Issue 5, pp. 358–373). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2005.02.006>
- Hopkins, K. L., Liebana, E., Villa, L., Batchelor, M., Threlfall, E. J., & Carattoli, A. (2006). Replicon typing of plasmids carrying CTX-M or CMY β -lactamases circulating among *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(9), 3203–3206. <https://doi.org/10.1128/AAC.00149-06>
- Houghton, J. L., Green, K. D., Chen, W., & Garneau-Tsodikova, S. (2010). The Future of Aminoglycosides: The End or Renaissance? *ChemBioChem*, 11(7), 880–902. <https://doi.org/10.1002/CBIC.200900779>
- Huang, J., Lan, F., Lu, Y., & Li, B. (2020). Characterization of Integrons and Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* Sequence Type 131 Isolates. The Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology = Journal Canadien Des Maladies Infectieuses et de La Microbiologie Médicale, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/3826186>
- Hui, C.-Y., Guo, Y., He, Q.-S., Peng, L., Wu, S.-C., Cao, H., & Huang, S.-H. (2010). *Escherichia coli* outer membrane protease OmpT confers resistance to urinary cationic peptides. *Microbiology and Immunology*, 54(8), 452–459. <https://doi.org/10.1111/J.1348-0421.2010.00238.X>
- Huovinen, P. (1997). Increases in Rates of Resistance to Trimethoprim. *Clinical Infectious Diseases*, 24(Supplement_1), S63–S66. https://doi.org/10.1093/CLINIDS/24.SUPPLEMENT_1.S63
- Ito, R., Pacey, M. P., Mettus, R. T., Sluis-Cremer, N., & Doi, Y. (2018). Origin of the plasmid-mediated fosfomycin resistance gene *fosA3*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(2), 373–376. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKX389>

- Ixtepan-Tejero, C. (2018). Características de virulencia, resistencia y transferencia del material genético en cepas de *E. coli* uropatógena. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Jahandeh, N., Ranjbar, R., Behzadi, P., & Behzadi, E. (2015). Uropathogenic *Escherichia coli* virulence genes: invaluable approaches for designing DNA microarray probes. *Central European Journal of Urology*, *68*(4), 452. <https://doi.org/10.5173/CEJU.2015.625>
- Jauréguy, F., Carbonnelle, E., Bonacorsi, S., Clec'h, C., Casassus, P., Bingen, E., Picard, B., Nassif, X., & Lortholary, O. (2007). Host and bacterial determinants of initial severity and outcome of *Escherichia coli* sepsis. *Clinical Microbiology and Infection*, *13*(9). <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01775.x>
- Jaureguy, F., Landraud, L., Passet, V., Diancourt, L., Frapy, E., Guigon, G., Carbonnelle, E., Lortholary, O., Clermont, O., Denamur, E., Picard, B., Nassif, X., & Brisse, S. (2008). Phylogenetic and genomic diversity of human bacteremic *Escherichia coli* strains. *BMC Genomics*, *9*. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-560>
- Jiménez, N., Senchenkova, S. N., Knirel, Y. A., Pieretti, G., Corsaro, M. M., Aquilini, E., Regué, M., Merino, S., & Tomás, J. M. (2012). Effects of Lipopolysaccharide Biosynthesis Mutations on K1 Polysaccharide Association with the *Escherichia coli* Cell Surface. *Journal of Bacteriology*, *194*(13), 3356. <https://doi.org/10.1128/JB.00329-12>
- Johnson, J. R., Delavari, P., & O'Bryan, T. T. (2001). *Escherichia coli* O18:K1:H7 isolates from patients with acute cystitis and neonatal meningitis exhibit common phylogenetic origins and virulence factor profiles. *Journal of Infectious Diseases*, *183*(3). <https://doi.org/10.1086/318086>
- Johnson, J. R., Gajewski, A., Lesse, A. J., & Russo, T. A. (2003). Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* as a Cause of Invasive Nonurinary Infections. *Journal of Clinical Microbiology*, *41*(12), 5798. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.12.5798-5802.2003>
- Johnson, J. R., Jelacic, S., Schoening, L. M., Clabots, C., Shaikh, N., Mobley, H. L. T., & Tarr, P. I. (2005). The IrgA Homologue Adhesin Iha Is an *Escherichia coli* Virulence Factor in Murine Urinary Tract Infection. *Infection and Immunity*, *73*(2), 965. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.2.965-971.2005>
- Johnson, J. R., Johnston, B., Clabots, C., Kuskowski, M. A., & Castanheira, M. (2010). *Escherichia coli* Sequence Type ST131 as the Major Cause of Serious Multidrug-Resistant *E. coli* Infections in the United States. *Clinical Infectious Diseases*, *51*(3), 286–294. <https://doi.org/10.1086/653932>
- Johnson, J. R., Johnston, B., Clabots, C., Kuskowski, M. A., Pendyala, S., DeBroy, C., Nowicki, B., & Rice, J. (2010). *Escherichia coli* sequence type ST131 as an emerging fluoroquinolone-resistant uropathogen among renal transplant recipients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *54*(1), 546–550. <https://doi.org/10.1128/AAC.01089-09>
- Johnson, J. R., Kuskowski, M. A., O'Bryan, T. T., & Maslow, J. N. (2002). Epidemiological correlates of virulence genotype and phylogenetic background among *Escherichia coli* blood isolates from adults with diverse-source bacteremia. *Journal of Infectious Diseases*, *185*(10). <https://doi.org/10.1086/340506>
- Johnson, J. R., Nicolas-Chanoine, M. H., Deb Roy, C., Castanheira, M., Robicsek, A., Hansen, G., Weissman, S., Urban, C., Platell, J., Trott, D., Zhanel, G., Clabots, C., Johnston, B. D., & Kuskowski, M. A. (2012). Comparison of *Escherichia coli* ST131 pulsotypes, by epidemiologic traits, 1967-2009. *Emerging Infectious Diseases*, *18*(4). <https://doi.org/10.3201/eid1804.111627>
- Johnson, J. R., & O'Bryan, T. T. (2004). Detection of the *Escherichia coli* Group 2 Polysaccharide Capsule Synthesis Gene *kpsM* by a Rapid and Specific PCR-Based Assay. *Journal of Clinical Microbiology*, *42*(4), 1773. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.4.1773-1776.2004>
- Johnson, J. R., Russo, T. A., Tarr, P. I., Carlino, U., Bilge, S. S., Vary, J. C., & Stell, A. L. (2000).

- Molecular epidemiological and phylogenetic associations of two novel putative virulence genes, *iha* and *iron*(*E. coli*), among *Escherichia coli* isolates from patients with urosepsis. *Infection and Immunity*, 68(5). <https://doi.org/10.1128/IAI.68.5.3040-3047.2000>
- Johnson, J. R., & 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(1). <https://doi.org/10.1086/315217>
- Johnson, J. R., Tchesnokova, V., Johnston, B., Clabots, C., Roberts, P. L., Billig, M., Riddell, K., Rogers, P., Qin, X., Butler-Wu, S., Price, L. B., Aziz, M., Nicolas-Chanoine, M.-H., DebRoy, C., Robicsek, A., Hansen, G., Urban, C., Platell, J., Trott, D. J., ... Sokurenko, E. V. (2013). Abrupt Emergence of a Single Dominant Multidrug-Resistant Strain of *Escherichia coli*. *The Journal of Infectious Diseases*, 207(6), 919. <https://doi.org/10.1093/INFDIS/JIS933>
- Johnson, T. J., Danzeisen, J. L., Youmans, B., Case, K., Llop, K., Munoz-Aguayo, J., Flores-Figueroa, C., Aziz, M., Stoesser, N., Sokurenko, E., Price, L. B., & Johnson, J. R. (2016). Separate F-Type Plasmids Have Shaped the Evolution of the H30 Subclone of *Escherichia coli* Sequence Type 131. *MSphere*, 1(4). <https://doi.org/10.1128/MSPHERE.00121-16>
- Johnson, T. J., & Nolan, L. K. (2009). Pathogenomics of the Virulence Plasmids of *Escherichia coli*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 73(4), 750. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00015-09>
- Johnson, T. J., Wannemuehler, Y., Johnson, S. J., Stell, A. L., Doetkott, C., Johnson, J. R., Kim, K. S., Spanjaard, L., & Nolan, L. K. (2008). Comparison of Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* Strains from Human and Avian Sources Reveals a Mixed Subset Representing Potential Zoonotic Pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(22), 7043. <https://doi.org/10.1128/AEM.01395-08>
- Johnson, T. J., Wannemuehler, Y. M., & Nolan, L. K. (2008). Evolution of the *iss* Gene in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(8), 2360. <https://doi.org/10.1128/AEM.02634-07>
- Jouini, A., Klibi, A., Elarbi, I., Chaabene, M. Ben, Hamrouni, S., Souiai, O., Hanachi, M., Ghram, A., & Maaroufi, A. (2021). First detection of human st131-ctx-m-15-o25-b2 clone and high-risk clonal lineages of *esbl/pampc*-producing *e. coli* isolates from diarrheic poultry in tunisia. *Antibiotics*, 10(6), 670. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS10060670/S1>
- Kakkanat, A., Totsika, M., Schaale, K., Duell, B. L., Lo, A. W., Phan, M.-D., Moriel, D. G., Beatson, S. A., Sweet, M. J., Ulett, G. C., & Schembri, M. A. (2015). The role of H4 flagella in *Escherichia coli* ST131 virulence. *Scientific Reports*, 5. <https://doi.org/10.1038/SREP16149>
- Kallonen, T., Brodrick, H. J., Harris, S. R., Corander, J., Brown, N. M., Martin, V., Peacock, S. J., & Parkhill, J. (2017). *Systematic longitudinal survey of invasive Escherichia coli in England demonstrates a stable population structure only transiently disturbed by the emergence of ST131*. <https://doi.org/10.1101/gr.216606.116>
- Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. T. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), 123–140. <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>
- Karim, A., Poirel, L., Nagarajan, S., & Nordmann, P. (2001). Plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase (CTX-M-3 like) from India and gene association with insertion sequence ISEcp1. *FEMS Microbiology Letters*, 201(2), 237–241. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6968.2001.TB10762.X>
- Kass, E. H. (2002). Asymptomatic infections of the urinary tract. 1956. *The Journal of Urology*, 167(2 Pt 2). [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(02\)80328-7](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(02)80328-7)
- Klein, R. D., & Hultgren, S. J. (2020). Urinary tract infections: microbial pathogenesis, host–pathogen interactions and new treatment strategies. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 18, Issue 4).

<https://doi.org/10.1038/s41579-020-0324-0>

- Klemm, P., Hjerrild, L., Gjermansen, M., & Schembri, M. A. (2004). Structure-function analysis of the self-recognizing Antigen 43 autotransporter protein from *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 51(1), 283–296. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2958.2003.03833.X>
- Knust, Z., & Schmidt, G. (2010). Cytotoxic necrotizing factors (CNFs)-a growing toxin family. *Toxins*, 2(1), 116–127. <https://doi.org/10.3390/TOXINS2010116>
- Kondratyeva, K., Salmon-Divon, M., & Navon-Venezia, S. (2020). Meta-analysis of Pandemic *Escherichia coli* ST131 Plasmidome Proves Restricted Plasmid-clade Associations. *Scientific Reports 2020 10:1*, 10(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56763-7>
- Kot, B. (2019). Antibiotic Resistance among Uropathogenic *Escherichia coli*. In *Polish Journal of Microbiology* (Vol. 68, Issue 4). <https://doi.org/10.33073/PJM-2019-048>
- Kumarasamy, K. K., Toleman, M. A., Walsh, T. R., Bagaria, J., Butt, F., Balakrishnan, R., Chaudhary, U., Doumith, M., Giske, C. G., Irfan, S., Krishnan, P., Kumar, A. V., Maharjan, S., Mushtaq, S., Noorie, T., Paterson, D. L., Pearson, A., Perry, C., Pike, R., ... Woodford, N. (2010). Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *The Lancet Infectious Diseases*, 10(9), 597. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(10\)70143-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(10)70143-2)
- Kuwahara, H., Myers, C. J., & Samoilov, M. S. (2010). Temperature Control of Fimbriation Circuit Switch in Uropathogenic *Escherichia coli*: Quantitative Analysis via Automated Model Abstraction. *PLOS Computational Biology*, 6(3), e1000723. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PCBI.1000723>
- Lai, Y. M., Zaw, M. T., Shamsudin, S. B., & Lin, Z. (2016). Evaluation of PALusp subtyping to characterize uropathogenic *E. Coli* isolates. *Journal of Infection in Developing Countries*, 10(10). <https://doi.org/10.3855/jidc.6944>
- Lane, M. C., & Mobley, H. L. T. (2007). Role of P-fimbrial-mediated adherence in pyelonephritis and persistence of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) in the mammalian kidney. *Kidney International*, 72(1), 19–25. <https://doi.org/10.1038/SJ.KI.5002230>
- Lanza, V. F., de Toro, M., Garcillán-Barcia, M. P., Mora, A., Blanco, J., Coque, T. M., & de la Cruz, F. (2014). Plasmid Flux in *Escherichia coli* ST131 Sublineages, Analyzed by Plasmid Constellation Network (PLACNET), a New Method for Plasmid Reconstruction from Whole Genome Sequences. *PLoS Genetics*, 10(12). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1004766>
- Lara, F. B. M., Nery, D. R., Oliveira, P. M. de, Araujo, M. L., Carvalho, F. R. Q., Messias-Silva, L. C. F., Ferreira, L. B., Faria-Junior, C., & Pereira, A. L. (2017). Virulence Markers and Phylogenetic Analysis of *Escherichia coli* Strains with Hybrid EAEC/UPEC Genotypes Recovered from Sporadic Cases of Extraintestinal Infections. *Frontiers in Microbiology*, 8(FEB), 146. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2017.00146>
- Lartigue, M.-F., Poirel, L., Aubert, D., & Nordmann, P. (2006). In Vitro Analysis of ISEcp1B-Mediated Mobilization of Naturally Occurring β -Lactamase Gene blaCTX-M of *Kluyvera ascorbata*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(4), 1282. <https://doi.org/10.1128/AAC.50.4.1282-1286.2006>
- Lartigue, M. F., Poirel, L., Aubert, D., & Nordmann, P. (2006). In vitro analysis of ISEcp1B-mediated mobilization of naturally occurring β -lactamase gene blaCTX-M of *Kluyvera ascorbata*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(4). <https://doi.org/10.1128/AAC.50.4.1282-1286.2006>
- Lartigue, M. F., Poirel, L., & Nordmann, P. (2004). Diversity of genetic environment of bla(CTX-M) genes. *FEMS Microbiology Letters*, 234(2), 201–207.

<https://doi.org/10.1016/J.FEMSLE.2004.01.051>

- Lawrence, J. G. (2005). Horizontal and Vertical Gene Transfer: The Life History of Pathogens. *Contributions to Microbiology*, 12, 255–271. <https://doi.org/10.1159/000081699>
- Levison, M. E., & Kaye, D. (2013). Treatment of complicated urinary tract infections with an emphasis on drug-resistant gram-negative uropathogens. *Current Infectious Disease Reports*, 15(2), 109–115. <https://doi.org/10.1007/S11908-013-0315-7>
- Li, B., Lu, Y., Lan, F., He, Q., Li, C., & Cao, Y. (2017). Prevalence and characteristics of ST131 clone among unselected clinical *Escherichia coli* in a Chinese university hospital. *Antimicrobial Resistance & Infection Control* 2017 6:1, 6(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/S13756-017-0274-0>
- Li, Dan, Liu, B., Chen, M., Guo, D., Guo, X., Liu, F., Feng, L., & Wang, L. (2010). A multiplex PCR method to detect 14 *Escherichia coli* serogroups associated with urinary tract infections. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.04.008>
- Li, D., Reid, C. J., Kudinha, T., Jarocki, V. M., & Djordjevic, S. P. (2020). Genomic analysis of trimethoprim-resistant extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* and recurrent urinary tract infections. *Microbial Genomics*, 6(12), 1–19. <https://doi.org/10.1099/MGEN.0.000475>
- Li, J., Nation, R. L., Turnidge, J. D., Milne, R. W., Coulthard, K., Rayner, C. R., & Paterson, D. L. (2006). Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. In *Lancet Infectious Diseases* (Vol. 6, Issue 9). [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(06\)70580-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(06)70580-1)
- Li, Y., Zheng, B., Li, Y., Zhu, S., Xue, F., & Liu, J. (2015). Antimicrobial Susceptibility and Molecular Mechanisms of Fosfomycin Resistance in Clinical *Escherichia coli* Isolates in Mainland China. *PLOS ONE*, 10(8), e0135269. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0135269>
- Li, Y., Dai, J., Zhuge, X., Wang, H., Hu, L., Ren, J., Chen, L., Li, D., & Tang, F. (2016). Iron-regulated gene *ireA* in avian pathogenic *Escherichia coli* participates in adhesion and stress-resistance. *BMC Veterinary Research* 2016 12:1, 12(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/S12917-016-0800-Y>
- Liu, B., Furevi, A., Perepelov, A. V., Guo, X., Cao, H., Wang, Q., Reeves, P. R., Knirel, Y. A., Wang, L., & Widmalm, G. (2020). Structure and genetics of *Escherichia coli* O antigens. *FEMS Microbiology Reviews*, 44(6), 655–683. <https://doi.org/10.1093/FEMSRE/FUZ028>
- Liu, C. M., Stegger, M., Aziz, M., Johnson, T. J., Waits, K., Nordstrom, L., Gauld, L., Weaver, B., Rolland, D., Statham, S., Horwinski, J., Sariya, S., Davis, G. S., Sokurenko, E., Keim, P., Johnson, J. R., & Price, L. B. (2018). *Escherichia coli* ST131-H22 as a foodborne uropathogen. *MBio*, 9(4). https://doi.org/10.1128/MBIO.00470-18/SUPPL_FILE/MBO004184016SD2.XLSX
- Livermore, D. M., & Woodford, N. (2006). The β -lactamase threat in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *Trends in Microbiology*, 14(9), 413–420. <https://doi.org/10.1016/J.TIM.2006.07.008>
- Lloyd, A. L., Henderson, T. A., Vigil, P. D., & Mobley, H. L. T. (2009). Genomic islands of uropathogenic *Escherichia coli* contribute to virulence. *Journal of Bacteriology*, 191(11), 3469–3481. <https://doi.org/10.1128/JB.01717-08>
- Lloyd, A. L., Rasko, D. A., & Mobley, H. L. T. (2007). Defining genomic islands and uropathogen-specific genes in uropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 189(9), 3532–3546. <https://doi.org/10.1128/JB.01744-06>
- López-Cerero, L., Navarro, M. D., Bellido, M., Martín-Peña, A., Viñas, L., Cisneros, J. M., Gómez-Langley, S. L., Sánchez-Monteseirín, H., Morales, I., Pascual, A., & Rodríguez-Baño, J. (2014). *Escherichia coli* belonging to the worldwide emerging epidemic clonal group o25b/ST131: Risk factors and clinical implications. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(3). <https://doi.org/10.1093/jac/dkt405>

- Lori H. & Miles H. (2009). *Drug Resistance | Microbiology*. <https://courses.lumenlearning.com/microbiology/chapter/drug-resistance/>
- Lu, S., Jin, D., Wu, S., Yang, J., Lan, R., Bai, X., Liu, S., Meng, Q., Yuan, X., Zhou, J., Pu, J., Chen, Q., Dai, H., Hu, Y., Xiong, Y., Ye, C., & Xu, J. (2019). Insights into the evolution of pathogenicity of *Escherichia coli* from genomic analysis of intestinal *E. coli* of *Marmota himalayana* in Qinghai-Tibet plateau of China. *https://doi.org/10.1038/Emi.2016.122*, 5(12), 122. <https://doi.org/10.1038/Emi.2016.122>
- Ludden, C., Decano, A. G., Jamrozny, D., Pickard, D., Morris, D., Parkhill, J., Peacock, S. J., Cormican, M., & Downing, T. (2020). Genomic surveillance of *Escherichia coli* ST131 identifies local expansion and serial replacement of subclones. *Microbial Genomics*, 6(4). <https://doi.org/10.1099/MGEN.0.000352>
- Luna-Pineda, M., Ochoa, S., Cruz-Córdova, A., Cázares-Domínguez, V., Vélez-González, F., Hernández-Castro, R., Xicohtencatl-Cortes, J., De Revisión, A., & Víctor, *. (2018). *Infecciones del tracto urinario, inmunidad y vacunación Boletín Médico del Hospital Infantil de México* *Urinary tract infections, immunity, and vaccination*. <https://doi.org/10.24875/BMHIM.M18000011>
- Lüthje, P., & Brauner, A. (2014). Virulence Factors of Uropathogenic *E. coli* and Their Interaction with the Host. In *Advances in Microbial Physiology* (Vol. 65). <https://doi.org/10.1016/bs.ampbs.2014.08.006>
- Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D. L., Rice, L. B., Stelling, J., Struelens, M. J., Vatopoulos, A., Weber, J. T., & Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(3), 268–281. <https://doi.org/10.1111/J.1469-0691.2011.03570.X>
- Mamani, R. (2015). *Caracterización molecular de cepas de Escherichia Coli del grupo clonal O25b:H4-B2-ST131 y de otros clones causantes de infecciones extraintestinales en seres humanos: Genes de virulencia y de resistencia*. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=123158&info=resumen&idioma=SPA>
- Mamani, R., Flament-Simon, S. C., García, V., Mora, A., Alonso, M. P., López, C., García-Meniño, I., Díaz-Jiménez, D., Blanco, J. E., Blanco, M., & Blanco, J. (2019). Sequence types, clonotypes, serotypes, and virotypes of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* causing bacteraemia in a Spanish Hospital over a 12-Year Period (2000 to 2011). *Frontiers in Microbiology*, 10(JULY), 1530. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.01530/BIBTEX>
- Mandomando, I., Vubil, D., Boisen, N., Quintó, L., Ruiz, J., Sigaúque, B., Nhampossa, T., Garrine, M., Massora, S., Aide, P., Nhacolo, A., Pons, M. J., Bassat, Q., Vila, J., Macete, E., Scheutz, F., Levine, M. M., Ruiz-Perez, F., Nataro, J. P., & Alonso, P. L. (2020). *Escherichia coli* ST131 clones harbouring AggR and AAF/V fimbriae causing bacteremia in Mozambican children: Emergence of new variant of fimH27 subclone. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 14(5), e0008274. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0008274>
- Mao, B. H., Chang, Y. F., Scaria, J., Chang, C. C., Chou, L. W., Tien, N., Wu, J. J., Tseng, C. C., Wang, M. C., Chang, C. C., Hsu, Y. M., & Teng, C. H. (2012). Identification of *Escherichia coli* Genes Associated with Urinary Tract Infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(2), 449. <https://doi.org/10.1128/JCM.00640-11>
- Martínez-Gorgonio, E. (2019). Búsqueda de la Secuencia Tipo 131 de UPEC O25:H4 aisladas de población mexicana: características de virulencia y resistencia. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Martínez-Martínez, L., Pascual, A., & Jacoby, G. A. (1998). Quinolone resistance from a transferable

plasmid. *Lancet*, 351(9105). [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(97\)07322-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)07322-4)

- Mathers, A. J., Peirano, G., & Pitout, J. D. D. (2015). The Role of Epidemic Resistance Plasmids and International High-Risk Clones in the Spread of Multidrug-Resistant Enterobacteriaceae. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(3), 565. <https://doi.org/10.1128/CMR.00116-14>
- Matinfar, S., Ahmadi, M., Sisakht, A. M., Sadeghi, J., & Javedansirat, S. (2021). Phylogenetic and antibiotics resistance in extended-spectrum B-lactamase (ESBL) Uropathogenic Escherichia coli: An update review. *Gene Reports*, 23, 101168. <https://doi.org/10.1016/J.GENREP.2021.101168>
- Maynard, C., Bekal, S., Sanschagrín, F., Levesque, R. C., Brousseau, R., Masson, L., Larivière, S., & Harel, J. (2004). Heterogeneity among virulence and antimicrobial resistance gene profiles of extraintestinal Escherichia coli isolates of animal and human origin. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(12). <https://doi.org/10.1128/JCM.42.12.5444-5452.2004>
- Mazzariol, A., Tokue, Y., Kanegawa, T. M., Cornaglia, G., & Nikaido, H. (2000). High-level fluoroquinolone-resistant clinical isolates of Escherichia coli overproduce multidrug efflux protein AcrA. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(12), 3441–3443. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.12.3441-3443.2000>
- Mbelle, N. M., Feldman, C., Osei Sekyere, J., Maningi, N. E., Modipane, L., & Essack, S. Y. (2019). The Resistome, Mobilome, Virulome and Phylogenomics of Multidrug-Resistant Escherichia coli Clinical Isolates from Pretoria, South Africa. *Scientific Reports* 2019 9:1, 9(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52859-2>
- McGann, P., Snesrud, E., Maybank, R., Corey, B., Ong, A. C., Clifford, R., Hinkle, M., Whitman, T., Lesho, E., & Schaecher, K. E. (2016). Escherichia coli Harboring mcr-1 and blaCTX-M on a Novel IncF Plasmid: First Report of mcr-1 in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(7), 4420. <https://doi.org/10.1128/AAC.01103-16>
- Medina, M., & Castillo-Pino, E. (2019). An introduction to the epidemiology and burden of urinary tract infections. *Therapeutic Advances in Urology*, 11. <https://doi.org/10.1177/1756287219832172>
- Merino, I., Porter, S. B., Johnston, B., Clabots, C., Thuras, P., Ruiz-Garbajosa, P., Cantón, R., & Johnson, J. R. (2020). Molecularly defined extraintestinal pathogenic Escherichia coli status predicts virulence in a murine sepsis model better than does virotype, individual virulence genes, or clonal subset among E. coli ST131 isolates. *Virulence*, 11(1), 327. <https://doi.org/10.1080/21505594.2020.1747799>
- Merino, I., Porter, S. B., Johnston, B. D., Clabots, C., Shaw, E., Horcajada, J. P., Cantón, R., Ruiz-Garbajosa, P., & Johnson, J. R. (2017). Virulence genes and subclone status as markers of experimental virulence in a murine sepsis model among Escherichia coli sequence type 131 clinical isolates from Spain. *PLoS ONE*, 12(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188838>
- Micali, S., Isgro, G., Bianchi, G., Miceli, N., Calapai, G., & Navarra, M. (2014). Cranberry and Recurrent Cystitis: More than Marketing? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(8). <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.625574>
- Migura-García, L., González-López, J. J., Martínez-Urtaza, J., Sánchez, J. R. A., Moreno-Mingorance, A., Rozas, A. P. de, Höfle, U., Ramiro, Y., & Gonzalez-Escalona, N. (2019). mcr-Colistin Resistance Genes Mobilized by IncX4, IncHI2, and IncI2 Plasmids in Escherichia coli of Pigs and White Stork in Spain. *Frontiers in Microbiology*, 10, 3072. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.03072>
- Molina-López, J., Aparicio-Ozores, G., Ribas-Aparicio, R. M., Gavilanes-Parra, S., Chávez-Berrocál, M. E., Hernández-Castro, R., & Ángel Manjarrez-Hernández, H. (2011). Drug resistance, serotypes, and phylogenetic groups among uropathogenic Escherichia coli including O25-ST131 in Mexico City. In *Journal of Infection in Developing Countries* (Vol. 5, Issue 12).

<https://doi.org/10.3855/jidc.1703>

- Mora, A., Dahbi, G., López, C., Mamani, R., Marzoa, J., Dion, S., Picard, B., Blanco, M., Alonso, M. P., Denamur, E., & Blanco, J. (2014). Virulence Patterns in a Murine Sepsis Model of ST131 *Escherichia coli* Clinical Isolates Belonging to Serotypes O25b:H4 and O16:H5 Are Associated to Specific Virotypes. *PLOS ONE*, 9(1), e87025. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0087025>
- Morales-Espinosa, R., Hernández-Castro, R., Delgado, G., Mendez, J. L., Navarro, A., Manjarrez, Á., & Cravioto, A. (2016). UPEC strain characterization isolated from Mexican patients with recurrent urinary infections. *Journal of Infection in Developing Countries*, 10(4). <https://doi.org/10.3855/jidc.6652>
- Moreno, E., Andreu, A., Pérez, T., Sabaté, M., Johnson, J. R., & Prats, G. (2006). Relationship between *Escherichia coli* strains causing urinary tract infection in women and the dominant faecal flora of the same hosts. *Epidemiology and Infection*, 134(5). <https://doi.org/10.1017/S0950268806005917>
- Mosquito, S., Pons, M. J., Riveros, M., Ruiz, J., & Ochoa, T. J. (2015). Diarrheagenic *Escherichia coli* phylogroups are associated with antibiotic resistance and duration of diarrheal episode. *Scientific World Journal*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/610403>
- Mosquito, S., Ruiz, J., Luis Bauer, J., Ochoa, T. J., Humboldt, von, & Peruana Cayetano Heredia Lima, U. (2011). MECANISMOS MOLECULARES DE RESISTENCIA ANTIBIÓTICA EN *Escherichia coli* ASOCIADAS A DIARREA MOLECULAR MECHANISMS OF ANTIBIOTIC RESISTANCE IN *Escherichia coli*-ASSOCIATED DIARRHEA Instituto de Medicina Tropical Alexander Institut d'investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, 28(4), 648–656.
- Mottaghizadeh, F., Mohajjel Shoja, H., Haeili, M., & Darban-Sarokhalil, D. (2020). Molecular epidemiology and nitrofurantoin resistance determinants of nitrofurantoin-non-susceptible *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 21, 335–339. <https://doi.org/10.1016/J.JGAR.2019.10.002>
- Mukherjee, S. K., & Mukherjee, M. (2019). Characterization and Bio-Typing of Multidrug Resistance Plasmids From Uropathogenic *Escherichia coli* Isolated From Clinical Setting. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2913. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.02913/BIBTEX>
- Müller, D., Greune, L., Heusipp, G., Karch, H., Fruth, A., Tschäpe, H., & Schmidt, M. A. (2007). Identification of Unconventional Intestinal Pathogenic *Escherichia coli* Isolates Expressing Intermediate Virulence Factor Profiles by Using a Novel Single-Step Multiplex PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(10), 3380. <https://doi.org/10.1128/AEM.02855-06>
- Nakano, M., Yamamoto, S., Terai, A., Ogawa, O., Makino, S., Hayashi, H., Nair, G. B., & Kurazono, H. (2001). Structural and sequence diversity of the pathogenicity island of uropathogenic *Escherichia coli* which encodes the USP protein. *FEMS Microbiology Letters*, 205(1), 71–76. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6968.2001.TB10927.X>
- Namoodiri, S. S., Opintan, J. A., Lijek, R. S., Newman, M. J., & Okeke, I. N. (2011). Quinolone resistance in *Escherichia coli* from Accra, Ghana. *BMC Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-44>
- Nataro, J. P., & Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 11, Issue 1). <https://doi.org/10.1128/cmr.11.1.142>
- Nicholson, T. F., Watts, K. M., & Hunstad, D. A. (2009). OmpA of Uropathogenic *Escherichia coli* Promotes Postinvasion Pathogenesis of Cystitis. *Infection and Immunity*, 77(12), 5245. <https://doi.org/10.1128/IAI.00670-09>
- Nicolas-Chanoine, M. H., Blanco, J., Leflon-Guibout, V., Demarty, R., Alonso, M. P., Caniça, M. M.,

- Park, Y.-J., Lavigne, J.-P., Pitout, J., & Johnson, J. R. (2008). Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61(2), 273–281. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKM464>
- Nicolas-Chanoine, M. H., Bertrand, X., & Madec, J. Y. (2014). *Escherichia coli* ST131, an Intriguing Clonal Group. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(3), 543. <https://doi.org/10.1128/CMR.00125-13>
- Noie Oskouie, A., Hasani, A., Ahangarzadeh Rezaee, M., Soroush Bar Haghi, M. H., Hasani, A., & Soltani, E. (2019). A Relationship between O-Serotype, Antibiotic Susceptibility and Biofilm Formation in Uropathogenic *Escherichia coli*. *Microbial Drug Resistance*, 25(6). <https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0330>
- Nojoomi, F., & Ghasemian, A. (2019). The relation of phylogroups, serogroups, virulence factors and resistance pattern of *Escherichia coli* isolated from children with septicemia. *New Microbes and New Infections*, 29. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2019.100517>
- Nordmann, P., & Poirel, L. (2002). Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clinical Microbiology and Infection*, 8(6), 321–331. <https://doi.org/10.1046/J.1469-0691.2002.00401.X>
- Nordmann, Patrice, Cuzon, G., & Naas, T. (2009). The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. In *The Lancet Infectious Diseases* (Vol. 9, Issue 4). [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(09\)70054-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70054-4)
- O'Neill, J. (2016). Antimicrobial Resistance : Tackling a crisis for the health and wealth of nations. In *Review on Antimicrobial Resistance* (Issue December).
- Ochman, H., & Selander, R. K. (1984). Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations. *Journal of Bacteriology*, 157(2), 690. [/pmc/articles/PMC215307/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/abstract/PMC215307/)
- Ochman, Howard, Lawrence, J. G., & Groisman, E. A. (2000). Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* 2000 405:6784, 405(6784), 299–304. <https://doi.org/10.1038/35012500>
- Ochoa, S. A., Cruz-Córdova, A., Luna-Pineda, V. M., Reyes-Grajeda, J. P., Cázares-Domínguez, V., Escalona, G., Sepúlveda-González, M. E., López-Montiel, F., Arellano-Galindo, J., López-Martínez, B., Parra-Ortega, I., Giono-Cerezo, S., Hernández-Castro, R., de la Rosa-Zamboni, D., & Xicohtencatl-Cortes, J. (2016). Multidrug- and extensively drug-resistant uropathogenic *Escherichia coli* clinical strains: Phylogenetic groups widely associated with integrons maintain high genetic diversity. *Frontiers in Microbiology*, 7(DEC). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02042>
- Olesen, B., Frimodt-Møller, J., Leihof, R. F., Struve, C., Johnston, B., Hansen, D. S., Scheutz, F., Kroghfelt, K. A., Kuskowski, M. A., Clabots, C., & Johnson, J. R. (2014). Temporal trends in antimicrobial resistance and virulence-associated traits within the *Escherichia coli* sequence type 131 clonal group and its H30 and H30-Rx Subclones, 1968 to 2012. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(11). <https://doi.org/10.1128/AAC.03679-14>
- Osawa, K., Shigemura, K., Shimizu, R., Kato, A., Kusuki, M., Jikimoto, T., Nakamura, T., Yoshida, H., Arakawa, S., Fujisawa, M., & Shirakawa, T. (2015). Molecular Characteristics of Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* in a University Teaching Hospital. <https://Home.Liebertpub.Com/Mdr>, 21(2), 130–139. <https://doi.org/10.1089/MDR.2014.0083>
- Östblom, A., Adlerberth, I., Wold, A. E., & Nowrouzian, F. L. (2011). Pathogenicity Island Markers, Virulence Determinants malX and usp, and the Capacity of *Escherichia coli* To Persist in Infants' Commensal Microbiotas. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(7), 2303. <https://doi.org/10.1128/AEM.02405-10>
- Pajand, O., Rahimi, H., Darabi, N., Roudi, S., Ghassemi, K., Aarestrup, F. M., & Leekitcharoenphon, P. (2021). Arrangements of Mobile Genetic Elements among Virotype E Subpopulation of

Escherichia coli Sequence Type 131 Strains with High Antimicrobial Resistance and Virulence Gene Content. *MSphere*, 6(4). https://doi.org/10.1128/MSPHERE.00550-21/SUPPL_FILE/MSPHERE.00550-21-SD001.XLSX

- Pallecchi, L., Malossi, M., Mantella, A., Gotuzzo, E., Trigoso, C., Bartoloni, A., Paradisi, F., Kronvall, G., & Rossolini, G. M. (2004). Detection of CTX-M-Type β -Lactamase Genes in Fecal Escherichia coli Isolates from Healthy Children in Bolivia and Peru. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(12), 4556. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.12.4556-4561.2004>
- Paltansing, S., Kraakman, M. E. M., Ras, J. M. C., Wessels, E., & Bernards, A. T. (2013). Characterization of fluoroquinolone and cephalosporin resistance mechanisms in Enterobacteriaceae isolated in a Dutch teaching hospital reveals the presence of an Escherichia coli ST131 clone with a specific mutation in parE. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(1), 40–45. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKS365>
- Panchalingam, S., Antonio, M., Hossain, A., Mandomando, I., Ochieng, B., Oundo, J., Ramamurthy, T., Tamboura, B., Zaidi, A. K. M., Petri, W., Houpt, E., Murray, P., Prado, V., Vidal, R., Steele, D., Strockbine, N., Sansonetti, P., Glass, R. I., Robins-Browne, R. M., ... Nataro, J. P. (2012). Diagnostic Microbiologic Methods in the GEMS-1 Case/Control Study. *Clinical Infectious Diseases*, 55(suppl_4), S294–S302. <https://doi.org/10.1093/CID/CIS754>
- Paniagua-Contreras, G. L., Monroy-Pérez, E., Rodríguez-Moctezuma, J. R., Domínguez-Trejo, P., Vaca-Paniagua, F., & Vaca, S. (2017). Virulence factors, antibiotic resistance phenotypes and O-serogroups of Escherichia coli strains isolated from community-acquired urinary tract infection patients in Mexico. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 50(4), 478–485. <https://doi.org/10.1016/J.JMII.2015.08.005>
- Paterson, D. L., & Lipman, J. (2007). Returning to the pre-antibiotic era in the critically ill: The XDR problem. In *Critical Care Medicine* (Vol. 35, Issue 7). <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000269352.39174.A4>
- Peirano, G., & Pitout, J. D. D. (2010). Molecular epidemiology of Escherichia coli producing CTX-M β -lactamases: the worldwide emergence of clone ST131 O25:H4. In *International Journal of Antimicrobial Agents* (Vol. 35, Issue 4). <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.11.003>
- Peirano, G., & Pitout, J. D. D. (2019). Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae: Update on Molecular Epidemiology and Treatment Options. *Drugs* 2019 79:14, 79(14), 1529–1541. <https://doi.org/10.1007/S40265-019-01180-3>
- Peleg, A. Y., & Hooper, D. C. (2010). Hospital-Acquired Infections Due to Gram-Negative Bacteria. *New England Journal of Medicine*, 362(19). <https://doi.org/10.1056/nejmra0904124>
- Petty, N. K., Zakour, N. L. Ben, Stanton-Cook, M., Skippington, E., Totsika, M., Forde, B. M., Phan, M.-D., Moriel, D. G., Peters, K. M., Davies, M., Rogers, B. A., Dougan, G., Rodriguez-Baño, J., Pascual, A., Pitout, J. D. D., Upton, M., Paterson, D. L., Walsh, T. R., Schembri, M. A., & Beatson, S. A. (2014). Global dissemination of a multidrug resistant Escherichia coli clone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(15), 5694. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1322678111>
- Phan, G., Remaut, H., Wang, T., Allen, W. J., Pirker, K. F., Lebedev, A., Henderson, N. S., Geibel, S., Volkan, E., Yan, J., Kunze, M. B. A., Pinkner, J. S., Ford, B., Kay, C. W. M., Li, H., Hultgren, S. J., Thanassi, D. G., & Waksman, G. (2011). Crystal structure of the FimD usher bound to its cognate FimC–FimH substrate. *Nature* 2011 474:7349, 474(7349), 49–53. <https://doi.org/10.1038/nature10109>
- Picard, B., Garcia, J. S., Gouriou, S., Duriez, P., Brahimi, N., Bingen, E., Elion, J., & Denamur, E. (1999). The link between phylogeny and virulence in Escherichia coli extraintestinal infection? *Infection and Immunity*, 67(2). <https://doi.org/10.1128/iai.67.2.546-553.1999>
- Pitout, J. D. D. (2012). Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli: A Combination of Virulence with

- Poirel, L., Cattoir, V., & Nordmann, P. (2012). Plasmid-mediated quinolone resistance; interactions between human, animal, and environmental ecologies. *Frontiers in Microbiology*, 3(FEB). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00024>
- Poirel, L., Gniadkowski, M., & Nordmann, P. (2002). Biochemical analysis of the ceftazidime-hydrolysing extended-spectrum β -lactamase CTX-M-15 and of its structurally related β -lactamase CTX-M-3. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 50(6), 1031–1034. <https://doi.org/10.1093/JAC/DFK240>
- Poirel, L., Lartigue, M. F., Decousser, J. W., & Nordmann, P. (2005). ISEcp1B-mediated transposition of blaCTX-M in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(1). <https://doi.org/10.1128/AAC.49.1.447-450.2005>
- Porse, A., Gumpert, H., Kubicek-Sutherland, J. Z., Karami, N., Adlerberth, I., Wold, A. E., Andersson, D. I., & Sommer, M. O. A. (2017). Genome dynamics of *Escherichia coli* during antibiotic treatment: Transfer, loss, and persistence of genetic elements in situ of the infant gut. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(APR). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00126>
- Price, L. B., Johnson, J. R., Aziz, M., Clabots, C., Johnston, B., Tchesnokova, V., Nordstrom, L., Billig, M., Chattopadhyay, S., Stegger, M., Andersen, P. S., Pearson, T., Riddell, K., Rogers, P., Scholes, D., Kahl, B., Keim, P., & Sokurenko, E. V. (2013). The epidemic of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* ST131 is driven by a single highly pathogenic subclone, H30-Rx. *MBio*, 4(6). <https://doi.org/10.1128/MBIO.00377-13>
- Pupo, G. M., Karaolis, D. K. R., Lan, R., & Reeves, P. R. (1997). Evolutionary relationships among pathogenic and nonpathogenic *Escherichia coli* strains inferred from multilocus enzyme electrophoresis and mdh sequence studies. *Infection and Immunity*, 65(7). <https://doi.org/10.1128/iai.65.7.2685-2692.1997>
- Queenan, A. M., & Bush, K. (2007). Carbapenemases: the Versatile β -Lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 20(3), 440. <https://doi.org/10.1128/CMR.00001-07>
- Rahmani, H. K., Tabar, G. H., Badouei, M. A., & Khoramian, B. (2020). Development of three multiplex-PCR assays for virulence profiling of different iron acquisition systems in *Escherichia coli*. *Iranian Journal of Microbiology*, 12(4), 281. <https://doi.org/10.18502/IJM.V12I4.3930>
- Ramadan, A. A., Abdelaziz, N. A., Amin, M. A., & Aziz, R. K. (2019). Novel blaCTX-M variants and genotype-phenotype correlations among clinical isolates of extended spectrum beta lactamase-producing *Escherichia coli*. *Scientific Reports* 2019 9:1, 9(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39730-0>
- Ramírez-Castillo, F. Y., Moreno-Flores, A. C., Avelar-González, F. J., Márquez-Díaz, F., Harel, J., & Guerrero-Barrera, A. L. (2018). An evaluation of multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates in urinary tract infections from Aguascalientes, Mexico: Cross-sectional study. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12941-018-0286-5>
- Ramirez, M. S., & Tolmasky, M. E. (2010). Aminoglycoside Modifying Enzymes. *Drug Resistance Updates: Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy*, 13(6), 151. <https://doi.org/10.1016/J.DRUP.2010.08.003>
- Raz, R. (2011). Urinary tract infection in postmenopausal women. *Korean Journal of Urology*, 52(12). <https://doi.org/10.4111/kju.2011.52.12.801>
- Redondo, C., & Alonso, G. (2007). Plásmidos conjugativos aislados de cepas multirresistentes de pacientes de cuatro centros de salud del área metropolitana de Caracas. *Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología*, 27(2), 100–107. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-

- Reeves, P. (1995). Role of O-antigen variation in the immune response. *Trends in Microbiology*, 3(10), 381–386. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(00\)88983-0](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(00)88983-0)
- Reidl, J., & Boos, W. (1991). The malX malY operon of Escherichia coli encodes a novel enzyme II of the phosphotransferase system recognizing glucose and maltose and an enzyme abolishing the endogenous induction of the maltose system. *Journal of Bacteriology*, 173(15), 4862–4876. <https://doi.org/10.1128/JB.173.15.4862-4876.1991>
- Reitzer, L., & Zimmern, P. (2020). Rapid growth and metabolism of uropathogenic escherichia coli in relation to urine composition. *Clinical Microbiology Reviews*, 33(1). <https://doi.org/10.1128/CMR.00101-19>
- Restieri, C., Garriss, G., Locas, M. C., & Dozois, C. M. (2007). Autotransporter-encoding sequences are phylogenetically distributed among Escherichia coli clinical isolates and reference strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(5), 1553–1562. https://doi.org/10.1128/AEM.01542-06/SUPPL_FILE/AUTOTRANSPORTER_PAPER_SUPP_FIG1.PDF
- Reyna-Flores, F., Barrios, H., Garza-Ramos, U., Sánchez-Pérez, A., Rojas-Moreno, T., Uribe-Salas, F. J., Fagundo-Sierra, R., & Silva-Sanchez, J. (2013). Molecular epidemiology of Escherichia coli O25b-ST131 isolates causing community-acquired UTIs in Mexico. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 76(3), 396–398. <https://doi.org/10.1016/J.DIAGMICROBIO.2013.03.026>
- Rivera, A., Larrosa, N., Mirelis, B., & Navarro, F. (2014). Importancia de los controles de calidad para la detección de la resistencia a antibióticos β -lactámicos en enterobacterias. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 32(SUPPL.1). [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(14\)70147-8](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(14)70147-8)
- Robicsek, A., Strahilevitz, J., Sahm, D. F., Jacoby, G. A., & Hooper, D. C. (2006). qnr prevalence in ceftazidime-resistant Enterobacteriaceae isolates from the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(8). <https://doi.org/10.1128/AAC.01647-05>
- Robins-Browne, R. M., Holt, K. E., Ingle, D. J., Hocking, D. M., Yang, J., & Tauschek, M. (2016). Are Escherichia coli pathotypes still relevant in the era of whole-genome sequencing? In *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (Vol. 6, Issue NOV). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00141>
- Robinson, A. E., Lowe, J. E., Koh, E.-I., & Henderson, J. P. (2018). Uropathogenic enterobacteria use the yersiniabactin metallophore system to acquire nickel. *The Journal of Biological Chemistry*, 293(39), 14953. <https://doi.org/10.1074/JBC.RA118.004483>
- Rodríguez-Beltrán, J., DelaFuente, J., León-Sampedro, R., MacLean, R. C., & San Millán, Á. (2021). Beyond horizontal gene transfer: the role of plasmids in bacterial evolution. In *Nature Reviews Microbiology*. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00497-1>
- Rodriguez-Siek, K. E., Giddings, C. W., Doetkott, C., Johnson, T. J., Fakhr, M. K., & Nolan, L. K. (2005). Comparison of Escherichia coli isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis. *Microbiology*, 151(6), 2097–2110. <https://doi.org/10.1099/MIC.0.27499-0/CITE/REFWORKS>
- Roesch, P. L., Redford, P., Batchelet, S., Moritz, R. L., Pellett, S., Haugen, B. J., Blattner, F. R., & Welch, R. A. (2003). Uropathogenic Escherichia coli use D-serine deaminase to modulate infection of the murine urinary tract. *Molecular Microbiology*, 49(1). <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03543.x>
- Rogers, B. A., Sidjabat, H. E., & Paterson, D. L. (2011). Escherichia coli O25b-ST131: a pandemic, multiresistant, community-associated strain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(1), 1–

14. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKQ415>

- Rosenberg, S., Bonten, M., Haazen, W., Spiessens, B., Abbanat, D., Go, O., Wagenlehner, F., Shore, N., Hagiwara, Y., Ibarra de Palacios, P., Geurtsen, J., Hermans, P., & Poolman, J. (2021). Epidemiology and O-Serotypes of Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli Disease in Patients Undergoing Transrectal Ultrasound Prostate Biopsy: A Prospective Multicenter Study. *The Journal of Urology*, 205(3), 826–832. <https://doi.org/10.1097/JU.0000000000001425>
- Roshani, M., Goudarzi, H., Hashemi, A., Ardebili, A., Erfanimanesh, S., & Bahramian, A. (2018). Detection of IS903, IS26 and ISEcp1 Elements in CTX-M-Producing Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli Isolates From Patients with Leukemia in Iran. *Jundishapur Journal of Microbiology* 2018 11:12, 11(12). <https://doi.org/10.5812/JJM.58929>
- Rossolini, G. M., D'Andrea, M. M., & Mugnaioli, C. (2008). The spread of CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases. In *Clinical Microbiology and Infection* (Vol. 14, Issue SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01867.x>
- Rowe, S., Hodson, N., Griffiths, G., & Roberts, I. S. (2000). Regulation of the Escherichia coli K5 Capsule Gene Cluster: Evidence for the Roles of H-NS, BipA, and Integration Host Factor in Regulation of Group 2 Capsule Gene Clusters in Pathogenic E. coli. *Journal of Bacteriology*, 182(10), 2741. <https://doi.org/10.1128/JB.182.10.2741-2745.2000>
- Rúgeles, L. C., Bai, J., Martínez, A. J., Vanegas, M. C., & Gómez-Duarte, O. G. (2010). Molecular characterization of diarrheagenic Escherichia coli strains from stools samples and food products in Colombia. *International Journal of Food Microbiology*, 138(3), 282. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2010.01.034>
- Russo, T. A., & Johnson, J. R. (2000). Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of Escherichia coli: ExPEC. In *Journal of Infectious Diseases* (Vol. 181, Issue 5). <https://doi.org/10.1086/315418>
- Russo, T. A., McFadden, C. D., Carlino-MacDonald, U. B., Beanan, J. M., Barnard, T. J., & Johnson, J. R. (2002). IroN Functions as a Siderophore Receptor and Is a Urovirulence Factor in an Extraintestinal Pathogenic Isolate of Escherichia coli. *Infection and Immunity*, 70(12), 7156. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.12.7156-7160.2002>
- Sandegren, L., Lindqvist, A., Kahlmeter, G., & Andersson, D. I. (2008). Nitrofurantoin resistance mechanism and fitness cost in Escherichia coli. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62(3), 495–503. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKN222>
- Santajit, S., & Indrawattana, N. (2016). Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *BioMed Research International*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/2475067>
- Sardar, A., Basireddy, S. R., Navaz, A., Singh, M., & Kabra, V. (2017). Comparative Evaluation of Fosfomycin Activity with other Antimicrobial Agents against E.coli Isolates from Urinary Tract Infections. *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR*, 11(2), DC26–DC29. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2017/23644.9440>
- Sarkar, S., Hutton, M. L., Vagenas, D., Ruter, R., Schüller, S., Lyras, D., Schembri, M. A., & Totsika, M. (2018). Intestinal Colonization Traits of Pandemic Multidrug-Resistant Escherichia coli ST131. *The Journal of Infectious Diseases*, 218(6), 979. <https://doi.org/10.1093/INFDIS/JIY031>
- Sen, A., Kaul, A., & Kaul, R. (2021). Estrogen receptors in human bladder cells regulate innate cytokine responses to differentially modulate uropathogenic E. coli colonization. *Immunobiology*, 226(1). <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2020.152020>
- Servin, A. L. (2005). Pathogenesis of Afa/Dr Diffusely Adhering Escherichia coli. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(2), 264. <https://doi.org/10.1128/CMR.18.2.264-292.2005>
- Siguier, P., Gourbeyre, E., & Chandler, M. (2014). Bacterial insertion sequences: their genomic

- impact and diversity. *FEMS Microbiology Reviews*, 38(5), 865. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12067>
- Smelov, V., Naber, K., & Bjerklund Johansen, T. E. (2016). Improved Classification of Urinary Tract Infection: Future Considerations. In *European Urology, Supplements* (Vol. 15, Issue 4). <https://doi.org/10.1016/j.eursup.2016.04.002>
- Smith, J. L., Fratamico, P. M., & Gunther, N. W. (2007). Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli. *https://Home.Liebertpub.Com/Fpd*, 4(2), 134–163. <https://doi.org/10.1089/FPD.2007.0087>
- Soleimani, N., Derakhshan, S., & Memariani, M. (2016). Plasmid Profile Analysis of Aminoglycoside-Resistant Escherichia coli Isolated From Urinary Tract Infections. *Int J Enteric Pathog*, 4(2), 33806. <https://doi.org/10.17795/ijep33806>
- Spurbeck, R. R., Dinh, P. C., Walk, S. T., Stapleton, A. E., Hooton, T. M., Nolan, L. K., Kim, K. S., Johnson, J. R., & Mobley, H. L. T. (2012). Escherichia coli isolates that carry vat, fyua, chua, and yfcv efficiently colonize the urinary tract. *Infection and Immunity*, 80(12). <https://doi.org/10.1128/IAI.00752-12>
- Srinivasan, U., Foxman, B., & Marrs, C. F. (2003a). Identification of a gene encoding heat-resistant agglutinin in Escherichia coli as a putative virulence factor in urinary tract infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(1), 285–289. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.1.285-289.2003>
- Srinivasan, U., Foxman, B., & Marrs, C. F. (2003b). Identification of a Gene Encoding Heat-Resistant Agglutinin in Escherichia coli as a Putative Virulence Factor in Urinary Tract Infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(1), 285. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.1.285-289.2003>
- Stamm, W. E., Counts, G. W., Running, K. R., Fihn, S., Turck, M., & Holmes, K. K. (1982). Diagnosis of Coliform Infection in Acutely Dysuric Women. *New England Journal of Medicine*, 307(8). <https://doi.org/10.1056/nejm198208193070802>
- Stamm, W. E., & Norrby, S. R. (2001). Urinary tract infections: Disease panorama and challenges. *Journal of Infectious Diseases*, 183. <https://doi.org/10.1086/318850>
- Stoesser, N., Sheppard, A. E., Pankhurst, L., de Maio, N., Moore, C. E., Sebra, R., Turner, P., Anson, L. W., Kasarskis, A., Batty, E. M., Kos, V., Wilson, D. J., Phetsouvanh, R., Wyllie, D., Sokurenko, E., Manges, A. R., Johnson, T. J., Price, L. B., Peto, T. E. A., ... Crook, D. W. (2016). Evolutionary history of the global emergence of the Escherichia coli epidemic clone ST131. *MBio*, 7(2). <https://doi.org/10.1128/MBIO.02162-15>
- Stokes, H. W., & Hall, R. M. (1989). A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Molecular Microbiology*, 3(12), 1669–1683. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.1989.TB00153.X>
- Sundin, G. W., & Bender, C. L. (1996). Dissemination of the strA-strB streptomycin-resistance genes among commensal and pathogenic bacteria from humans, animals, and plants. *Molecular Ecology*, 5(1), 133–143. <https://doi.org/10.1111/J.1365-294X.1996.TB00299.X>
- Swenson, D. L., Bukanov, N. O., Berg, D. E., & Welch, R. A. (1996). Two pathogenicity islands in uropathogenic Escherichia coli J96: Cosmid cloning and sample sequencing. *Infection and Immunity*, 64(9). <https://doi.org/10.1128/iai.64.9.3736-3743.1996>
- Tanimoto, Y., Tamai, S., Matsuzaki, T., Takeuchi, N., Noju, T., Yanagida, S., Kage-Nakadai, E., Yamaguchi, Y., Kodama, T., Nakamura, S., Motooka, D., Iida, T., & Nishikawa, Y. (2019). Diffusely Adherent Escherichia coli Strains Isolated from Healthy Carriers Suppress Cytokine Secretions of Epithelial Cells Stimulated by Inflammatory Substances. *Infection and Immunity*, 87(1). <https://doi.org/10.1128/IAI.00683-18>
- Terlizzi, M. E., Griboudo, G., & Maffei, M. E. (2017). UroPathogenic Escherichia coli (UPEC) infections: Virulence factors, bladder responses, antibiotic, and non-antibiotic antimicrobial

- strategies. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 8, Issue AUG). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01566>
- Thingholm, K. R., Hertz, F. B., Løbner-Olesen, A., Frimodt-Møller, N., & Nielsen, K. L. (2019). *Escherichia coli* belonging to ST131 rarely transfers blactx-m-15 to fecal *Escherichia coli*. *Infection and Drug Resistance*, 12, 2429. <https://doi.org/10.2147/IDR.S208536>
- Tiba, M. R., Yano, T., & Leite, D. D. S. (2008). Genotypic characterization of virulence factors in *Escherichia coli* strains from patients with cystitis. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 50(5). <https://doi.org/10.1590/S0036-46652008000500001>
- Totsika, M., Beatson, S. A., Sarkar, S., Phan, M. D., Petty, N. K., Bachmann, N., Szubert, M., Sidjabat, H. E., Paterson, D. L., Upton, M., & Schembri, M. A. (2011). Insights into a Multidrug Resistant *Escherichia coli* Pathogen of the Globally Disseminated ST131 Lineage: Genome Analysis and Virulence Mechanisms. *PLoS ONE*, 6(10). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0026578>
- Touchon, M., Hoede, C., Tenailon, O., Barbe, V., Baeriswyl, S., Bidet, P., Bingen, E., Bonacorsi, S., Bouchier, C., Bouvet, O., Calteau, A., Chiapello, H., Clermont, O., Cruveiller, S., Danchin, A., Diard, M., Dossat, C., El Karoui, M., Frapy, E., ... Denamur, E. (2009). Organised genome dynamics in the *Escherichia coli* species results in highly diverse adaptive paths. *PLoS Genetics*, 5(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000344>
- Toval, F., Köhler, C.-D., Vogel, U., Wagenlehner, F., Mellmann, A., Fruth, A., Schmidt, M. A., Karch, H., Bielaszewska, M., & Dobrindt, U. (2014). Characterization of *Escherichia coli* Isolates from Hospital Inpatients or Outpatients with Urinary Tract Infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(2), 407. <https://doi.org/10.1128/JCM.02069-13>
- Tsukamoto, N., Ohkoshi, Y., Okubo, T., Sato, T., Kuwahara, O., Fujii, N., Tamura, Y., & Yokota, S. I. (2013). High prevalence of cross-resistance to aminoglycosides in fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* clinical isolates. *Chemotherapy*, 59(5), 379–384. <https://doi.org/10.1159/000361011>
- Ulett, G. C., Webb, R. I., & Schembri, M. A. (2006). Antigen-43-mediated autoaggregation impairs motility in *Escherichia coli*. *Microbiology*, 152(7), 2101–2110. <https://doi.org/10.1099/MIC.0.28607-0>
- Umene, Y. D., Wong, L. K., Satoh, T., Yamane, K., Matsui, M., Riley, L. W., Arakawa, Y., & Suzuki, S. (2015). Molecular Epidemiological Characterization of Uropathogenic *Escherichia coli* from an Outpatient Urology Clinic in Rural Japan. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(2), 681. <https://doi.org/10.1128/JCM.03068-14>
- Valiatti, T. B., Santos, F. F., Santos, A. C. M., Nascimento, J. A. S., Silva, R. M., Carvalho, E., Sinigaglia, R., & Gomes, T. A. T. (2020). Genetic and Virulence Characteristics of a Hybrid Atypical Enteropathogenic and Uropathogenic *Escherichia coli* (aEPEC/UPEC) Strain. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 0, 492. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2020.00492>
- Vidal, M., Kruger, E., Durán, C., Lagos, R., Levine, M., Prado, V., Toro, C., & Vidal, R. (2005). Single multiplex PCR assay to identify simultaneously the six categories of diarrheagenic *Escherichia coli* associated with enteric infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(10), 5362–5365. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.10.5362-5365.2005/ASSET/D5E02BA7-F054-4918-9C6D-A2BCC5EFBE41/ASSETS/GRAPHIC/ZJM0100558910001.JPEG>
- Vigil, P. D., Stapleton, A. E., Johnson, J. R., Hooton, T. M., Hodges, A. P., He, Y., & Mobley, H. L. T. (2011). Presence of putative repeat-in-toxin gene *tosA* in *Escherichia coli* predicts successful colonization of the urinary tract. *MBio*, 2(3). <https://doi.org/10.1128/mBio.00066-11>
- Vigil, P. D., Wiles, T. J., Engstrom, M. D., Prasov, L., Mulvey, M. A., & Mobley, H. L. T. (2012). The repeat-in-toxin family member *TosA* mediates adherence of uropathogenic *Escherichia coli* and survival during bacteremia. *Infection and Immunity*, 80(2). <https://doi.org/10.1128/IAI.05713-11>

- Villa, L., García-Fernández, A., Fortini, D., & Carattoli, A. (2010). Replicon sequence typing of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(12), 2518–2529. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKQ347>
- Vimont, S., Boyd, A., Bleibtreu, A., Bens, M., Goujon, J. M., Garry, L., Clermont, O., Denamur, E., Arlet, G., & Vandewalle, A. (2012). The CTX-M-15-Producing Escherichia coli Clone O25b: H4-ST131 Has High Intestine Colonization and Urinary Tract Infection Abilities. *PLoS ONE*, 7(9). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0046547>
- Vo, J. L., Martínez Ortiz, G. C., Subedi, P., Keerthikumar, S., Mathivanan, S., Paxman, J. J., & Heras, B. (2017). Autotransporter Adhesins in Escherichia coli Pathogenesis. In *Proteomics* (Vol. 17, Issues 23–24). <https://doi.org/10.1002/pmic.201600431>
- Wang, D., Mu, X., Chen, Y., Zhao, D., Fu, Y., Jiang, Y., Zhu, Y., Quan, J., Hua, X., Mao, G., Li, X., & Yu, Y. (2020). Emergence of a Clinical Escherichia coli Sequence Type 131 Strain Carrying a Chromosomal blaKPC-2 Gene. *Frontiers in Microbiology*, 11, 2893. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.586764/BIBTEX>
- Wang, H., Dzink-Fox, J. L., Chen, M., & Levy, S. B. (2001). Genetic characterization of highly fluoroquinolone-resistant clinical Escherichia coli strains from China: Role of acrR mutations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(5). <https://doi.org/10.1128/AAC.45.5.1515-1521.2001>
- Welch, R. A. (1991). Pore-forming cytolysins of Gram-negative bacteria. In *Molecular Microbiology* (Vol. 5, Issue 3). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1991.tb00723.x>
- Welch, R. A., Burland, V., Plunkett, G., Redford, P., Roesch, P., Rasko, D., Buckles, E. L., Liou, S. R., Boutin, A., Hackett, J., Stroud, D., Mayhew, G. F., Rose, D. J., Zhou, S., Schwartz, D. C., Perna, N. T., Mobley, H. L. T., Donnenberg, M. S., & Blattner, F. R. (2002). Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic Escherichia coli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(26). <https://doi.org/10.1073/pnas.252529799>
- Werneburg, G. T., & Thanassi, D. G. (2018). Pili Assembled by the Chaperone/Usher Pathway in Escherichia coli and Salmonella. *EcoSal Plus*, 8(1). <https://doi.org/10.1128/ECOSALPLUS.ESP-0007-2017>
- Whitfield, C. (2006). Biosynthesis and Assembly of Capsular Polysaccharides in Escherichia coli. <http://Dx.Doi.Org/10.1146/Annurev.Biochem.75.103004.142545>, 75, 39–68. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.BIOCHEM.75.103004.142545>
- Whitmer, G. R., Moorthy, G., & Arshad, M. (2019). The pandemic Escherichia coli sequence type 131 strain is acquired even in the absence of antibiotic exposure. *PLoS Pathogens*, 15(12). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1008162>
- WHO. (2015). WHO Library Cataloguing-in-Publication Data Global Action Plan on Antimicrobial Resistance. *Microbe Magazine*, 10(9), 354–355. www.paprika-annecy.com
- WHO. (2021). *Antimicrobial resistance*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
- Wiles, T. J., Kulesus, R. R., & Mulvey, M. A. (2008). Origins and virulence mechanisms of uropathogenic Escherichia coli. In *Experimental and Molecular Pathology* (Vol. 85, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2008.03.007>
- Wirth, T., Falush, D., Lan, R., Colles, F., Mensa, P., Wieler, L. H., Karch, H., Reeves, P. R., Maiden, M. C. J., Ochman, H., & Achtman, M. (2006). Sex and virulence in Escherichia coli: An evolutionary perspective. *Molecular Microbiology*, 60(5). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05172.x>

- Wright, K. J., Seed, P. C., & Hultgren, S. J. (2005). Uropathogenic *Escherichia coli* Flagella Aid in Efficient Urinary Tract Colonization. *Infection and Immunity*, 73(11), 7657. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.11.7657-7668.2005>
- Wright, S. W., Wrenn, K. D., & Haynes, M. L. R. (1999). Trimethoprim-Sulfamethoxazole Resistance Among Urinary Coliform Isolates. *Journal of General Internal Medicine*, 14(10), 606. <https://doi.org/10.1046/J.1525-1497.1999.10128.X>
- Wurpel, D. J., Totsika, M., Allsopp, L. P., Webb, R. I., Moriel, D. G., & Schembri, M. A. (2016). Comparative proteomics of uropathogenic *Escherichia coli* during growth in human urine identify UCA-like (UCL) fimbriae as an adherence factor involved in biofilm formation and binding to uroepithelial cells. *Journal of Proteomics*, 131. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.11.001>
- Xicohtencatl-Cortes, J., Cruz-Córdova, A., Cázares-Domínguez, V., Escalona-Venegas, G., Zavala-Vega, S., Arellano-Galindo, J., Romo-Castillo, M., Hernández-Castro, R., Ochoa, S. A., & Luna-Pineda, V. M. (2019). Uropathogenic *Escherichia coli* strains harboring *tosA* gene were associated to high virulence genes and a multidrug-resistant profile. *Microbial Pathogenesis*, 134. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103593>
- Yamamoto A-B, S., Terai, A., Yuri ', K., Kurazono, H., Takeda B-D, Y., & Yoshida, O. (1995). Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. In *FEMS Immunology and Medical Microbiology* (Vol. 12). <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.1995.tb00179.x>
- Zalewska-Piątek, B., & Piątek, R. (2020). Phage therapy as a novel strategy in the treatment of urinary tract infections caused by *e. Coli*. In *Antibiotics* (Vol. 9, Issue 6). <https://doi.org/10.3390/antibiotics9060304>
- Zarzoza-Mendoza, I. (2016). Análisis de determinantes de virulencia de cepas de *Escherichia coli* uropatógena serogrupo O25. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Zhang, L., & Foxman, B. (2003). Molecular epidemiology of *Escherichia coli* mediated urinary tract infections. In *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library* (Vol. 8). <https://doi.org/10.2741/1007>
- Zhong, Y.-M., Liu, W.-E., Meng, Q., & Li, Y. (2019). *Escherichia coli* O25b-ST131 and O16-ST131 causing urinary tract infection in women in Changsha, China: molecular epidemiology and clinical characteristics. *Infection and Drug Resistance*, 12, 2693. <https://doi.org/10.2147/IDR.S212658>
- Zurfluh, K., Glier, M., Hächler, H., & Stephan, R. (2015). Replicon typing of plasmids carrying blaCTX-M-15 among Enterobacteriaceae isolated at the environment, livestock and human interface. *Science of The Total Environment*, 521–522, 75–78. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2015.03.079>