



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DEL HOMBRE Y SU AMBIENTE
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA**

**Informe del Servicio Social
(por Investigación)**

**"Caracterización de Proteobacterias Aislados de Muestras de Microbiota
Intestinal de Escolares de Secundaria de la CDMX"**

Que para obtener el título de Licenciada en Biología

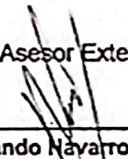
Presenta

**Laura Alejandra Zuñiga Acuña
(matrícula: 2172034438)**

Asesora Interna


Dra. María Teresa Núñez Cardona
Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco
Departamento de El Hombre y su Ambiente

Asesor Externo


Dr. Armando Navarro Ocaña
Universidad Nacional Autónoma de México
Laboratorio de Salud Pública
Torre de Investigación

Ciudad de México, septiembre 21 de 2023

Índice

Resumen.	1
I. Introducción	2
II. Objetivos.....	3
2.1.- General:	3
2.2.- Específicos:.....	3
III. Antecedentes	3
3.1 Microbiota intestinal normal.....	3
3.2 Microbiota intestinal y sobrepeso y obesidad	4
3.3 <i>Escherichia. coli</i> Diarreagénica	4
3.4 Grupos filogenéticos.....	5
3.5 Factores de virulencia.	6
3.6 La resistencia a los antimicrobianos	7
IV. Materiales y Métodos.	8
4.1- Origen de los cultivos	8
4.2.- Viabilidad y pureza de los cultivos bacterianos.....	8
4.3.- Preparación de antígenos somáticos (O).	8
4.4.- Antígenos flagelares (H).....	8
4.5.- Serotipificación de <i>E. coli</i>	9
4.6.- Prueba de sensibilidad a los antimicrobianos.....	10
4.7- Prueba de producción de β -lactamasas	10
4.8.-Extracción de ADN.....	11
4.9.- PCR para factores de virulencia.....	11
4.10.- PCR cuádruplex filogenia.....	13
V. Resultados	14
VI. Discusión.....	21
VII. Conclusiones.....	25
VIII. Referencias	26

Resumen

Escherichia coli se caracteriza por ser un microorganismo con gran plasticidad, por lo que puede encontrarse en ambientes diversos, como en la microbiota intestinal de mamíferos incluyendo a los humanos donde se ubica como un comensal. Sin embargo, se han encontrado algunas variedades patógenas (patotipos) que, por contar con genes específicos, producen enfermedades y daños intestinales (disbiosis). El tratamiento más prescrito es con antibióticos, no obstante, su uso indiscriminado ha generado multiresistencia a estos fármacos. El objetivo del presente estudio fue caracterizar fenotípica y genotípicamente la diversidad de las cepas de *E. coli* aisladas de muestras fecales de adolescentes con diferente composición corporal de una escuela secundaria del sur de la ciudad de México. Se incluyeron 53 cultivos identificados como *E. coli*, se tipificaron serológicamente con 188 sueros anti-O y 56 sueros anti-H del esquema antigénico de *E. coli* usando la metodología descrita por Orskov y Orskov (1984), así mismo, se determinó el perfil de resistencia a antibióticos por el método de difusión en agar (Kirby-Bauer), se extrajo ADN de las 53 cepas y mediante PCR múltiple se ubicaron en grupos filogenéticos (Clermont, 2013), así mismo, se determinó la presencia de factores de virulencia. Los resultados obtenidos mostraron que los serotipos más frecuentemente identificados fueron O48:H- (7.5%), O23:H15, O132:H-, O25:H34, O15:H2, O128ab:H- y O81:H- (5.7%). El 43.3% de las cepas se ubicaron en el filogrupo A, seguido del grupo D (15.1%), y los grupos B2 y B1 (13.2%), mientras que un 15.1% no se ubicó en algún grupo filogenético. El análisis de genes de virulencia mostró a *fimH*, *subAB*, *sat*, O25-ST131 y *ehxA* como los más frecuentes en la mayoría de las cepas. El 100% de las cepas presentó resistencia a clindamicina, lincomicina, oxacilina y eritromicina, mientras que el 81.1% fueron resistentes a la ampicilina y sulfametoxazol y 58.5% a azitromicina. Los resultados mostraron que la mayoría de las cepas analizadas de las muestras fecales, pertenecen a cepas comensales, ubicadas principalmente en el filogrupo A, en cuanto a la resistencia los antimicrobianos, se observó multirresistencia en un 92.5% de las cepas analizadas, observándose que las de los grupos filogenéticos D y B1 fueron resistentes a más de seis antimicrobianos en comparación con los grupos A y B2; en cuanto a los factores de virulencia el filogrupo B2 presentó un mayor número de genes, seguido del grupo A; estos resultados, muestran que *E. coli* intestinal porta factores de virulencia de diferentes patotipos, lo que sugiere que las cepas son híbridas (HyPEC) y potencialmente patógenas.

Palabras clave: *E. coli*, virulencia, patotipos, patógena.

I. Introducción

Escherichia coli es una *Proteobacteria* perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, gracias a su plasticidad, se adapta a cualquier ambiente y es habitual en tracto digestivo de los animales y humanos formando parte de su microbiota intestinal (MI) ocupando su función de tipo comensal (Fiallos et al., 2018; Rubab y Oh, 2020). Se han descrito que algunas cepas de *E. coli* (patotipos) causan enfermedades intestinales (DEC: *E. coli* diarreagénica) y extraintestinales (ExPEC: *E. coli* extraintestinal patogénica) de diferente gravedad.

Las cepas patógenas y comensales de *E. coli* se clasifican en ocho grupos filogenéticos (A, B1, B2, C, D, E, F y *Escherichia* clado 1) mediante PCR cuádruple y utilizando los iniciadores *chuA*, *yjaA*, *TspE4C2* y *arpA* (Cardozo, 2020); otra manera de clasificar las cepas es mediante la tipificación serológica de antígenos somáticos (O) y flagelares (H) (Paniagua-Contreras et al., 2015). Entre las cepas DEC se encuentran los patotipos: *E. coli* Enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) o *E. coli* productoras de toxina Shiga (STEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* adherente-invasiva (AIEC) y *E. coli* de adherencia difusa (DAEC) (Eslava et al., 2003; Águila et al., 2020; Rubab y Oh, 2020; Santos et al., 2020), por otro lado los tipo ExPEC son *E. coli* uropatógena (UPEC), *E. coli* necrotoxigénica (NTEC), *E. coli* patógena de aves (APEC), *E. coli* asociada a sepsis y meningitis (NMEC) y *E. coli* septicémica (SEPEC) (Cardozo, 2020; Santos et al., 2020).

Los diferentes patotipos que presenta *E. coli* se pueden diferenciar mediante factores de virulencia que están presentes en su genoma (Braz et al, 2020), algunos de estos factores pueden ser adhesinas, toxinas, sistemas de adquisición de hierro, biopelículas, entre otros (Adib et al, 2014; Canata et al., 2017). Sin embargo, debido a que los genes que poseen las cepas se encuentran en elementos transferibles, estas pueden intercambiar con facilidad entre las bacterias por medio de la transferencia horizontal de genes, permitiendo cambios en el genoma de *E. coli* lo que ha ocasionado la aparición de cepas híbridas (Braz et al., 2020). El tratamiento más común ante la presencia de estas cepas es la medicación con antibióticos, aunque el uso indiscriminado y la capacidad bacteriana para transmitir y adquirir genes que codifican para la resistencia antimicrobiana (Llenque-Díaz y Acevedo-Hurtado, 2012), ha dado lugar a la resistencia, principalmente a las cefalosporinas, aminoglucósidos y fluoroquinolonas, causando limitaciones en el tratamiento de estas enfermedades intestinales llegando a la muerte (Norouzian et al., 2019; Baldiris-Avila et al., 2020, Gupta et al., 2021; Mohammed et al., 2022). Por lo que se debería conocer las

características filogenéticas, serológicas, así como los factores de virulencia y resistencia a los antimicrobianos que presentes en *E. coli* para proponer soluciones a este problema de salud pública de nivel mundial.

II. Objetivos

2.1.- General.

Conocer la diversidad de cepas de *Escherichia coli* aisladas en muestras de heces en adolescentes de una escuela secundaria, por medio de la identificación fenotípica y genotípica.

2.2.- Específicos.

- Mediante el uso de sueros anti-O y anti-H del esquema antigénico de *E. coli* realizar la serotipificación de los antígenos de la superficie de las cepas de *E. coli*.
- Utilizando el método de Kirby-Bauer determinar los perfiles de resistencia a los antimicrobianos que presentan las cepas de *E. coli*.
- Ubicar en grupos filogenéticos las cepas de *E. coli* mediante la realización de PCR cuádruplex empleando una PCR múltiple.
- Utilizar la PCR punto final para conocer los factores de virulencia de las cepas de *E. coli*.
- Conocer la relación que existe entre los genes de virulencia, grupos filogenéticos, serotipos y resistencia antimicrobiana en los aislados de las cepas de *E. coli*.

III. Antecedentes

3.1 Microbiota intestinal normal.

Kim et al., (2017) señalan que la microbiota intestinal (MI) es importante dado que involucra la salud y enfermedades del hospedero. Sin embargo, el uso de antibióticos ha llevado a la resistencia bacteriana. Delbono (2020) menciona que las bacterias comensales que se encuentran en la MI ayudan a producir nutrientes como la vitamina K y varios componentes de la vitamina B. Icaza-Chávez (2013) resalta que a la alteración de la MI y la respuesta adversa que tiene el hospedero a dichos cambios, se le conoce como disbiosis.

3.2 Microbiota intestinal y sobrepeso y obesidad.

Santacruz (2012) menciona que en 36 cepas aisladas de adolescentes de entre 14-15 años con sobrepeso en Valencia (España), fueron sometidos a dieta restringida en calorías y actividad física por 10 semanas, se analizaron muestras fecales antes y después de la intervención y mediante PCR en tiempo real fueron analizadas encontrándose que los adolescentes que perdieron más peso presentaron aumentos en los valores de *Bacteroidetes* y *Lactobacillus*.

González-Gallegos et al., (2017) señalan que la MI tiene una profunda influencia en la mucosa intestinal mediante la expresión de genes, en donde se involucran las defensas del hospedero; por otro lado, Castañeda (2020) resalta que la dieta tiene un fuerte impacto (57%) en la composición de la microbiota intestinal (MI); una alimentación con alto contenido en grasas y carbohidratos simples incrementa la probabilidad de presentar obesidad, mientras que la genética influye solamente en un 13%. Murga-Garrido et al. (2023) en un estudio realizado en 45 niños de entre 6-12 años, determinaron cómo los parámetros y datos dietéticos de los niños estaban relacionados con factores de virulencia; registraron cinco categorías de factores de virulencia, que comprenden exotoxinas, sistemas de administración de efectores, adherencia, moduladores inmunes y factores nutricionales o metabólicos asociados con el Índice de Masa Corporal (IMC). Li et al., (2021) en su estudio compararon las características y cambios en los genes de microbianos intestinales en niños que genéticamente son propensos a obesidad y obesos simples para evaluar si la intervención dietética mejora el sistema inmune de estos niños, se concluyó que los factores de virulencia de las bacterias en especial los genes específicos de patógenos que se encuentran presentes en las heces de personas obesas se reducen en cuánto se les da una intervención dietética.

Por otro lado, Navarro et al., (2022) evaluaron la presencia de las bacterias comensales y virulentas en 18 muestras fecales de adolescentes encontrando bacterias patógenas como *Collinsella aerofaciens* y *Escherichia coli*.

3.3 *E. coli* Diarreagénica.

Paniagua-Contreras et al., (2015) señalaron que de 194 cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con infecciones urinarias de una comunidad, en México; solamente el 58.2% pertenecieron a 14 serogrupos seleccionados; de los cuales, los serogrupos O25, O15, O8 y O75 estuvieron presentes en 20.6%, 17%, 6.1% y 4.6% de las cepas, respectivamente. Johnson et al., (2006) indican que si bien la cepa de *E. coli* O157:H7 es la más estudiada y

clínicamente mejor conocida, existen otros serotipos que están tomando relevancia clínica ya que pueden ocasionar diversas patologías que van desde gastroenteritis leves hasta casos más extremos como la muerte, dichos serotipos son: O1, O8, O26, O55, O73, entre otras.

Momtaz et al., (2013) observaron que en 123 cepas *E. coli*, aisladas de pacientes con infección urinaria de un hospital en Irán, los serogrupos más frecuentes identificados en su estudio fueron O25 (26.01%) y O15 (21.13%). Sierra (2019) determinó los serotipos más frecuentes en niños atendidos en el Hospital Ramiro Priale en Huancayo, Perú, de 110 cepas El 46.4% fueron *E. coli* enterotoxigénica y el 37.3% fueron identificadas como *E. coli* enteroinvasiva.

3.4 Grupos filogenéticos.

Ahumada-Santos et al., (2019) exponen que de 70 cepas de *E. coli* aisladas de niños con y sin cuadros diarreicos, en Sinaloa, el filogrupo más frecuente fue el A con 42.9% seguido del grupo B2 con 15.7% y ND con 11.4%. Por otro lado, Millán et al., (2020) en un estudio realizado en Venezuela, con pacientes hospitalizados en dos instituciones de salud, aislaron 17 cepas de *E. coli* tipo UPEC; la clasificación de *E. coli* por grupos filogenéticos mostró, al grupo B2 como el más frecuente, seguido de los grupos A y F. Por otro lado, Ramírez et al., (2020) señalan que en 30 muestras de heces fecales aisladas de niños clínicamente sanos en el Centro Educativo de Cuidado Infantil de la Universidad Autónoma de Zacatecas, el grupo A presentó una mayor frecuencia y, siguiendo el orden, estuvo el grupo B1, B2 y el D. Staji et al. (2016) resaltaron que de 150 muestras urinarias en mujeres de 25-45 años de edad, con sospecha de tener infecciones urinarias, 93 fueron identificadas como *E. coli*, de las cuales, el grupo con mayor frecuencia, fue el A y el D, seguido del B2 y B1. Hernández (2015) menciona que dentro de sus muestras de orina de pacientes de una clínica del ISSSTE, en Chilpancingo-Guerrero, se recuperaron 131 aislamientos de *E. coli*, entre las cepas más frecuentes estuvieron las B2, seguido de A, D y B1. Norouzian et al. (2019) exponen que, de sus 261 aislamientos fecales y urinarios obtenidos de pacientes con recurrencia de enfermedades urinarias de un hospital en Tehran (Irán), el grupo más frecuente entre las cepas fue el B2, seguido del A, D y B1. Martínez (2017) menciona que de sus 95 cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con infecciones urinarias provenientes de un laboratorio particular y de un hospital público, en Puebla, el 44.2 % de las muestras fueron del grupo B2, seguido de los grupos F (23.2%) y C (17.9%). Adib et al., (2014) encontraron que de 137 cepas de *E. coli* aisladas de personas con infecciones urinarias

hospitales en Kerman (Irán); la mayoría fue del grupo filogenético A (45.99%), seguido del D (21.16%), B2 (19.71%) y el B1 (13.14%).

3.5 Factores de virulencia.

Miranda-Estrada et al., (2017) exponen que de 107 cultivos de *E. coli* aisladas en dos localidades de México, una del centro del país (CDMX: clínica 61 del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS)) y otra al suroeste (Chilpancingo, Guerrero: hospital Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSSTE)); los genes de virulencia que predominaron fueron, *fimH* con 96%, *iutA* con 66% y *sat* con 36%. Robledo (2017), en un estudio realizado una población de Aguascalientes se encontró que el *fimH* se presentó en el 95.16% de 64 muestras estudiadas en hombres y mujeres de entre 0-94 años, con infección en el tracto urinario.

Khairy et al., (2019) en el estudio que realizaron en pacientes (hombres y mujeres) que presentaban infecciones urinarias y cuadros de diarrea en hospitales ambulatorios de Egipto, de 173 cepas analizadas, 130 fueron identificadas como *E. coli* tipo UPEC Y el gen *fimH* fue el más frecuente. Por otro lado, Bölin et al., (2006) compararon la distribución relativa de los genes *sth* y *stp* en cepas ETEC aisladas de diferentes áreas geográficas (Centro Internacional de Investigación sobre Enfermedades Diarreicas en Bangladesh, la Unidad de Investigaciones Médicas Navales Núm. 3 en el Cairo, Egipto y en un pueblo cercano a la Ciudad de Guatemala, Santa María de Jesús), encontraron que las cepas productoras del gen *sth* fueron las más comunes tanto en Egipto como en Guatemala mientras que en Bangladesh también se observó que las cepas con el gen *stp* fueron considerablemente menos frecuentes. Aperador (2020) analizó 100 muestras obtenidas de carne cruda bovina de Pamplona (Colombia); 15 fueron *E. coli*, de las cuáles 13 presentan los genes *stx 1* y *2* pertenecen al patotipo STEC, mientras que las dos restantes pertenecieron al patotipo EPEC ya que estuvo presente el gen *eae*. Riveros et al., (2017) resaltan que, de un total de 70 cepas aisladas de muestras de sangre de niños menores de cinco años colectadas de 12 hospitales en Lima, Perú (40 de neonatos, 22 de infantes de entre 28 días a 1 año; ocho de niños mayores a un año), los genes asociados a fimbrias de tipo adhesinas, se encontraron en casi todas las cepas, excepto en aquéllas del patotipo EPEC; la adherencia agregativa-fimbria III (AAFIII) estuvo presente cepas del patotipo DAEC y en cepas tipo EAEC/DAEC; la presencia de biopelículas se encontró en cepas ETEC; la presencia del biofilm asociado al gen *shf* se identificó en cepas tipo ETEC, además de que se encontraron genes asociados a la dispersina en cepas tipo EAEC y en tres del

tipo EAEC/DAEC. Adib et al., (2014) señalan que la virulencia asociada a los genes se encuentra mayormente distribuida entre los filogrupos A y B2, en tanto que Vieira et al. (2020) mencionan que la presencia del gen *sat* es común entre las cepas tipo ETEC, EPEC, EAEC y DAEC.

3.6 La resistencia a los antimicrobianos.

Valdés (2016) analizó 235 aislamientos de *E. coli* de pacientes y de alimentos en Sinaloa, principalmente resistentes a tetraciclina (72.7% y 38%, respectivamente), ampicilina (69.7% y 26.1%, respectivamente) y a trimetoprima-sulfametoxazol (64.6% y 19% respectivamente), mientras cultivos provenientes de agua fueron resistentes a ampicilina (44.8%), tetraciclinas (37.9%) y trimetoprima-sulfametoxazol (13.7%).

Johnson et al., (2004), en un estudio realizado en Estados Unidos, observaron que de 152 cepas de *E. coli*, aisladas del TRUST, pertenecientes a los grupos filogenéticos A, B1 y D, fueron menos virulentas, pero mostraron ser más resistentes a los antimicrobianos, esto podría deberse al uso indiscriminado constante, consecuencia de una presión selectiva de antibióticos. Así mismo, Haghighatpanah y Mojtahedi (2019) mencionan que el uso excesivo e inapropiado de antibióticos es un factor relevante para el aumento de la multiresistencia bacteriana. De igual forma, Curová et al., (2020) resaltan que la adquisición de resistencia o la virulencia, pueden representar una ventaja de supervivencia para los microorganismos, además de que muchos genes de resistencia a los antimicrobianos están contenidos en plásmidos que portan factores de virulencia y también pueden seleccionarse mediante presión selectiva de antibióticos; Adib et al., (2014) señalan que, en cuanto a resistencia a los antimicrobianos, estos se presentan en mayor medida en los grupos filogenéticos A y D y recalcan, que las cepas del filogrupo B2 fueron menos propensas a ser resistentes a los antimicrobianos que no pertenecen de este grupo.

Matta-Chuquisapon et al., (2022) indican que, en la mayoría de 70 cepas *E. coli*, aisladas de pacientes con cáncer hospitalizados en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN) en Perú; presentaron resistencia a antimicrobianos no betalactámicos como los aminoglucósidos en este caso la gentamicina, y la ciprofloxacina que pertenecen al grupo de las fluoroquinolonas, además de una gran frecuencia de beta-lactamasas de tipo CTX-M (grupo de β -lactamasas de la clase A de Ambler con propiedades de espectro extendido). Quiroz (2022) señala que de 39 cepas *E. coli* estudiadas y recuperadas de pacientes pediátricos hospitalizados del HIMFG, se presenta una multiresistencia a más de cinco categorías de antimicrobianos y que el 100% de las cepas fueron resistentes a

ampicilina, cefalotina y ciprofloxacina. Rojas et al., (2019) estudiaron 3,675 muestras de orina y *E. coli* fue aislada de 1,043 muestras de pacientes con sintomatología de infección en tracto urinario del Centro Médico Paso Real, en Venezuela, resaltaron que el perfil de resistencia de *E. coli* fue alto, ya que hubo resistencia al 100% a ampicilina y a cefalosporinas de 1era, 3era y 4ta generaciones.

IV. Materiales y Métodos.

4.1- Origen de los cultivos.

Los cultivos bacterianos se obtuvieron de muestras fecales de adolescentes de una escuela secundaria con diferente composición corporal. Para este estudio se realizó una revisión en la base de datos del laboratorio con la finalidad de seleccionar cultivos con características fenotípicas de *E. coli*. Los cultivos de *E. coli* están conservados en medios de Dorset en el laboratorio de Salud Pública ubicado en el 3er piso de la Torre de Investigación, Facultad de Medicina, UNAM.

4.2.- Viabilidad y pureza de los cultivos bacterianos.

Fueron seleccionados 53 cultivos con características fenotípicas de *E. coli*, para corroborar su pureza y viabilidad fueron inoculados en agar MacConkey e incubados a 37°C durante 18-24 h. Después de la incubación fueron seleccionadas colonias y resembradas en tubos con agar de soya tripticaseína (TSA) para usarlos como cultivo de ensayo.

4.3.- Preparación de antígenos somáticos (O).

Los cultivos para los ensayos fueron inoculados en tubos de ensaye (16x150mm) conteniendo agar de soya tripticaseína (TSA) inclinado, durante 18-24 horas a 37°C. Posterior a la incubación, se verificó el crecimiento bacteriano en todos los tubos, mismos a los que se les agregó solución salina (0.85% de NaCl) en el pico de flauta y se dejó reposar durante una hora. Después de homogenizar, perfectamente, se pasaron a tubos de ensaye limpios y rotulados para que, en la autoclave, someterlos a 110°C durante una hora. Una vez que se sacaron de la autoclave, se dejaron enfriar para agregarles formalina (0.6% de formaldehído en solución salina al 0.85%) para finalmente conservarlos hasta su empleo.

4.4.- Antígenos flagelares (H).

A partir de los tubos de trabajo, los cultivos se inocularon en tubos de 16x150mm con rosca y con tubos de Craigies que contenían medio semisólido (Colindale). Se incubaron a 30°C durante 15 días para favorecer el crecimiento flagelar, el cual se visualizó mediante la turbidez en el medio semisólido. Una vez que hubo crecimiento, se inocularon en caldo de biotriptasa, el cual se incubó a 30°C durante 24 h. Al final de la incubación se agregó formalina a cada tubo para al final sellarlos con Parafilm.

4.5.- Serotipificación de *E. coli*.

Se emplearon 188 sueros anti-O y 56 sueros anti-H del esquema antigénico de *E. coli*, ambos tipos de sueros se prepararon en conejo (SERUNAM) usando la metodología descrita por Orskov y Orskov (1984).

4.5.1.- Somáticos.

En tres microplacas con 96 pozos, en fondo en U, se distribuyeron 50 µL de cada uno de los 188 sueros anti-O de *E.coli* y 50 µL de antígeno somático; se incubaron a 50°C durante 18-24 h. Una vez que transcurrió el tiempo de incubación, se registraron las reacciones de aglutinación. Con los antígenos positivos (aglutinación con los antisueros) se les realizó titulaciones con los antisueros haciendo diluciones seriadas al doble desde 1:100 y hasta 1:12800. Para esto, en una microplaca de 96 pozos, en la primera fila de pozos de A1-A12 se distribuyó 100 µL de cada uno de antisuero, previamente en los pozos de B1-B12 y hasta H1-H12 se les agregó 50 µL de solución salina (0.85% de NaCl). Una vez realizadas las diluciones seriadas (al doble) se adicionó 50 µL de cada uno de los antígenos y las microplacas fueron incubadas a 50°C durante 18-24 h. Pasado el tiempo de incubación, se realizó la lectura de las reacciones antígeno-anticuerpo. En el caso, de la presencia de más de una reacción con los antisueros se realizó una titulación con sueros puros de *E. coli*, utilizando diluciones seriadas al doble de 1:50 hasta 1:6 400. Para esto, en las microplacas se colocaron 80 µL de solución fisiológica desde el A1 hasta el A12. y a los pozos se les adicionó 20 µL de suero puro y se realizaron diluciones seriadas al doble. A los pozos con las diluciones se les agregó 50 µL del antígeno, posteriormente, se incubaron a 50°C durante 24 horas, pasado este tiempo se hicieron las lecturas de las reacciones.

4.5.2- Flagelares.

En 1 microplaca de 96 pozos, se distribuyeron 50 µL de los 56 sueros anti-H de *E. coli*, a cada pozo se le agregó 50 µL de antígeno H, se incubaron a 50°C durante 2-2:30 horas,

una vez concluida la incubación, se registraron las reacciones de aglutinación. Los antígenos que tuvieron más de una reacción, se les realizaron titulaciones de los sueros anti-H de 1:100 a 1:12800, para ello, a la microplaca se le agregó 100 µL de antisuero en la primera fila de A1-A12, al mismo tiempo al resto de pozos, se les añadió 50 µL de solución salina. Una vez que se realizaron las diluciones se adicionaron 50 mL del antígeno H y las microplacas se incubaron a 50°C por 2-2:30 h. Después de la incubación, se realizó el registro de las reacciones de aglutinación; con aquellos antígenos que presentaron más de una reacción, se realizó una titulación con sueros puros de *E. coli*.

4.6.- Prueba de sensibilidad a los antimicrobianos.

Se empleó el método Kirby-Bauer (difusión de agar) y siguiendo la recomendación del Comité Nacional de Estándares de Laboratorio Clínico (NCCLS). Para obtener un cultivo fresco, de las réplicas de trabajo de *E. coli*, así como la cepa *E. coli* ATCC 25922 que se utilizó como control, se inocularon en agar de soya tripticaseína (TSA) a 37°C durante 18-24 h. Después de la incubación, se tomó un inóculo del crecimiento bacteriano para preparar una suspensión bacteriana en tubos con 1.8 ml de solución salina estéril, mismo que se ajustó al 0.5 del nefelómetro de McFarland. Después del ajuste de la suspensión bacteriana, se sumergió un hisopo de algodón estéril en la solución y se sembró masivamente cada cultivo, por duplicado en cajas Petri conteniendo agar Mueller-Hinton Posteriormente, con ayuda de unas pinzas estériles, se colocaron los sensibilizadores de los antimicrobianos (ampicilina AMP 10 µg, amoxicilina AML 10 µg, oxacilina OX 1 µg, cefpodoxime CPD 10 µg, ceftiofur EFT 30 µg, cefovecina CVN 30 µg, clindamicina, DA 2 µg, lincomicina MY 10 µg, azitromicina AZM 15 µg, eritromicina E 15 µg, gentamicina CN 10 µg, amikacina AK 30 µg, doxicilina DO 30 µg y sulfametoxazol RL 25 µg) y se incubaron a 37°C durante 18-24 h. Una vez que transcurrió el tiempo de incubación, con un vernier se midieron los halos de inhibición y se anotaron en una base de datos en Excel 2010, donde se les interpretó como resistente, intermedio o sensible, dependiendo de los datos registrados del control.

4.7- Prueba de producción de β -lactamasas.

Se realizó el método de Kirby-Bauer, empleando lo recomendado por la NCCLS, para este fin se utilizaron los antimicrobianos cefuroxime (CXM), amoxicilina-ácido clavulánico (AMC) y ceftiaxona (CRO).

4.8.-Extracción de ADN.

El proceso para la extracción de ADN se realizó mediante el método de ebullición (Islam et al., 2006). Las cepas de *E. coli* fueron cultivadas en caldo Luria Both (LB) a 37°C por 24 h. Después de revisar que todos los caldos tenían crecimiento, se homogenizaron con vortex y se transfirieron 1.5 mL del caldo en microtubos, posteriormente se centrifugaron a 13,000 rpm durante cinco minutos. Se eliminó el sobrenadante y el sedimento bacteriano fue resuspendido con 200 µL de solución de agua ultrapura; con ayuda de un vortex se homogenizó durante 10 segundos (aproximadamente), hasta obtener una suspensión bacteriana uniforme. Enseguida, cada microtubo se hirvió durante 10 minutos. Luego fueron introducidos en frío durante cinco minutos para lisar a las células por shock térmico. Se volvieron a agitar con el vortex, para finalmente centrifugar a 13,000 rpm durante 10 minutos. Se conservaron 100 µL de sobrenadante de cada muestra y se mantuvieron en refrigeración o congelación hasta su uso.

4.9.- PCR para factores de virulencia.

En la realización de la PCR se utilizaron iniciadores y condiciones previamente reportadas (Tabla 1), en las pruebas se incluyeron genes de los grupos DEC de *E. coli*: ETEC (*lt*, *stx*, *stx2*), EPEC (*eae*, *bfp*), STEC (*stx1*, *stx2*, *subA*, *subAB*, *exhA*), EAEC (*aggR* y *sat*), UPEC (*fimH*) y para definir a la secuencia tipo ST131 (O16/O25). Con los productos de PCR se realizó electroforesis en geles de agarosa al 1%, posteriormente se tiñeron con GelRed para poder visualizarlo en un digitalizador de imágenes (Axygen).

Tabla 1. Secuencia de iniciadores utilizados para factores de virulencia y condiciones del termociclador para cada PCR. 1= Desnaturalización inicial, 2= Desnaturalización, 3= Hibridación, 4=Elongación y 5= Elongación final.

Gen	Iniciador	Secuencia de 5' a 3'	pb	1	2	3	4	5	Referencia
O16/O25	O25pabBsp e-F	TCCAGCAGGTGCTGGATCGT	347	94°C por 4 min	94°C/5 seg 58°C/10 seg 72°C/40 seg 30 ciclos			72°C por 5 min	Clermont (2009)
	O25pabBsp e-R	GCGAAATTTTTCGCCGTA CTGT							Johnson (2014)
	trpAST131-O16-F	AAAACCGCGCCGCGTTACCT	145						
	trpAST131-O16-F	CCAGAAATCGCGCCCGCATT							
sth	sth-F	CTTTCTGTATTATCTTTTTCACCTTT	185	94°C por 2 min	94°C/1 min 49°C/1 min 72°C/1 min 35 ciclos			72°C por 5 min	Savarino (2012)
	sth-R	CACCCGGTACAAGCAGGATTAC							

fimH	fimH-F	TGCAGAACGGATAAGCCGTGG	508	94°C por 2 min	94°C/1 min 63°C/1 min 72°C/1 min 35 ciclos	72°C por 2 min	Johnson (2000)
	fimH-R	GCAGTCACCTGCCCTCCGGTA					
subAB dúplex	subA-F	GTACGGACTAACAGGGAAGT	232	94°C por 2 min	94°C/30 seg 56°C/30 seg 72°C/45 seg 40 ciclos	72°C por 5 min	Paton (2004)
	subA-R	ATCGTCATATGCACCTCCG					
	subB-F	GTAGATAAAGTGACAGAAGGG					
	subB-R	GCAAAAGCCTTCGTGTAGTC					
subA triplex	subA-F	GTACGGACTAACAGGGAAGT	556	94°C por 5 min	95°C/1 min 53.3°C/2 min 72°C/90 seg 35 ciclos	72°C por 5 min	Paton (2005)
	subA-R	ATCGTCATATGCACCTCCG					
lt y stp dúplex	lt-F	ACGGCGTTACTATCCTCTC	273	94°C por 5 min	94°C/30 seg 54°C/30 seg 72°C/30 seg 40 ciclos	72°C 5 min	Sjöling (2007)
	lt-R	TGGTCTCGGTCAGATATGTG					
	stp-F	TCTTTCCCCTCTTTAGTCAG	166				
	stp-R	ACAGGCAGGATTACAACAAAG					
sat	sat-F	GGTGAGTCCGGTGCATGGGC	412	94°C por 2 min	94°C/1 min 60.5°C/1 min 72°C/5 min 35 ciclos	72°C por 2 min	Morales- Espinosa (2016)
	sat-R	CAAGTTCCGCCTGCGGCTCA					
bfp	bfp-F	GTCTGCGTCTGATTCCAATA	408	95°C por 5 min	72°C/2 min 96°C/30 seg 56°C/1 min 30 ciclos	72°C 8 min	Lacher (2007)
	bfp-R	TCAGCAGGAGTAATAGC					
ehxA	ehxA-F	CTCATAGGGGCCCCGATAAGC	495	94°C por 5 min	94°C/45 seg 57°C/30 seg 72°C/90 seg 35 ciclos	72°C por 10 min	Diseñado en laboratorio (no publicado)
	ehxA-R	TTCTCCTGGGGTAAATGTTGGTGT					
aggR	aggR-F	CTAATTGTACAATCGATGTA	308	94°C por 5 min	94°C/1 min 42°C/1 min 72°C/1 min 30 ciclos	72°C por 5 min	Czeczulin (1999)
	aggR-R	ATGAAGTAATTCTTGAAT					
vtx1	vtx1-F	GTACGGGGATGCAGATAAATCGC	209	94°C por 5 min	94°C/50 seg 56°C/40 seg 72°C/60 seg 35 ciclos	72°C por 5 min	Scheutz (2012)
	vtx1-R	AGCAGTCATTACATAAGAACYCC ACT					
vtx2	vtx2-F	GGAAGTGTCTGAACTGCTCCTGT ATTAACTGCACTTCAGCAAATCC	627				
	vtx2-R	CGCTGTCTGAGGCATCTCCGCT TAACTTCACCTGGCAAAGCC					
eae	eae-F	CCCGAATTCGGCACAAGCATAAGC	863	94°C por 5 min	94°C/30 seg 55°C/1 min 72°C/2 min 30 ciclos	72°C por 5 min	Schmidt (1994)
	eae-R	CCCGGATCCGTCTCGCCAGTATTC					

4.10.- PCR cuádruplex filogenia.

Para la tipificación de *E. coli*, se utilizó el método de Clermont et al., (2013), el cual consiste en la amplificación del ADN mediante una PCR cuádruplex. Los *primers* (Invitrogen) que se utilizaron para la PCR cuádruplex se presentan en la tabla 2. El volumen final de cada ensayo fue de 15 µL, conteniendo 6 µL de agua para PCR, 1.5 µL de buffer, 0.45 µL de MgCl₂, 0.45 µL de dNTP's, 0.6 µL de los iniciadores *chuA-F*, *chuA-R*, *yjaA-F*, *yjaA-R*, *TspE4C2-F*, *TspE4C2-R*, *arpA-R* y *Acek-F*, 0.15 µL de Taq Polimerasa y 0.6 µL del ADN extraído anteriormente. Los productos de PCR se evaluaron mediante la realización de electroforesis en geles de agarosa al 1.8%, posteriormente se tiñeron con GelRed para visualizarlos en un digitalizador de imágenes (Axygen). La asignación de cada grupo filogenético se llevó a cabo mediante a los patrones de bandas que se observaron y se interpretaron considerando (+) como presencia y (-) como ausencia.

Tabla 2. Secuencia de iniciadores utilizados para asignación de grupos filogenéticos y condiciones del termociclador para cada PCR. 1= Desnaturalización inicial, 2= Desnaturalización, 3= Hibridación, 4=Elongación y 5= Elongación final.

Gen	Iniciador	Secuencia de 5' a 3'	pb	1	2	3	4	5	Referencia
<i>chuA</i> , <i>yjaA</i> , <i>ArpA</i> , <i>TspE4C2</i> Filogenia	<i>chuA-F</i>	ATGGTACCGGACGAACCAAC	288	94°C por 4 min	94°C/5 seg 58°C/20 seg 72°C/40 seg 30 ciclos			72°C por 5 min	Clermont (2013)
	<i>chuA-R</i>	TGCCGCCAGTACCAAAGACA							
	<i>yjaA-F</i>	CAAACGTGAAGTCTCAGGAG	211						
	<i>yjaA-R</i>	AATGCGTTCCTCAACCTGTG							
	<i>TspE4C2-F</i>	CACTATTTCGTAAGGTCATCC	152						
	<i>TspE4C2-R</i>	AGTTTATCGCTGCGGGTCGC							
	<i>acek-F</i>	AACGCTATTGCGCCAGCTTGC	400						
	<i>arpA-R</i>	TCTCCCCATACCGTACGCTA							
<i>arpA</i> Grupo E	<i>arpAgpE-F</i>	GATTCCATCTTGTCAAAATATGCC	301						
	<i>arpAgpE-R</i>	GAAAAGAAAAGAATTCCCAAGAG							
<i>trpA</i> Grupo C	<i>trpAgpC-F</i>	AGTTTTATGCCCAGTGCGAG	219						
	<i>trpAgpC-R</i>	TCTGCGCCGGTCACGCC							
Control interno	<i>trpBA-F</i>	CGGCGATAAAGACATCTTCAC	489						
	<i>trpBA-R</i>	GCAACGCGGCCTGGCGGAAG							

V. Resultados

5.1 Tipificación serológica.

Los resultados de tipificación serológica mostraron que los serotipos más frecuentes fueron O48:H- con 4 (7.5%), O23:H15, O132:H-, O25:H34, O15:H2, O128ab:H35 y O81:H- con 3 (5.7%); los serotipos O25:H34, 64474:H-, O159:H4, O82ab:H-, O86:H24, O25:H1 y O48:H18 con dos (3.8%) cepas, el resto de los 22 serotipos (1.9%), con una cepa (Figura 1).

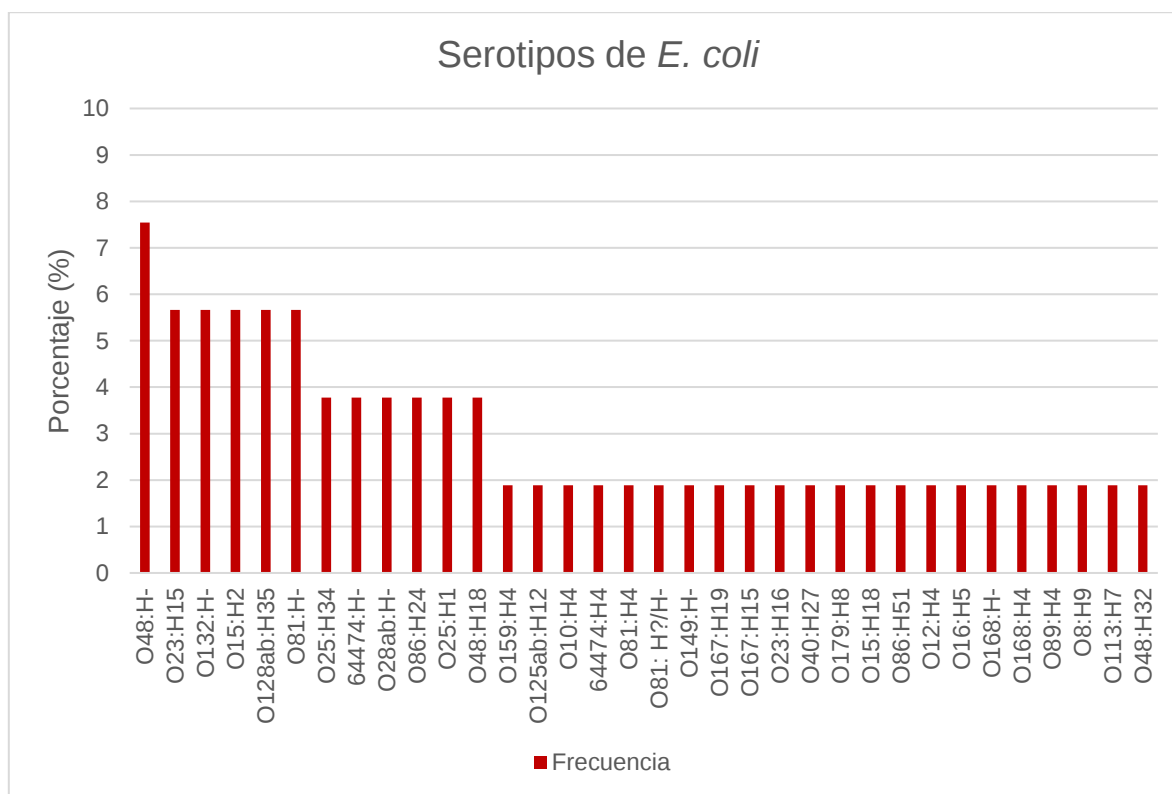


Figura 1. Frecuencia de serotipos de los aislamientos de *E. coli*.

5.2 Grupo filogenético por PCR multiplex.

De las 53 cepas analizadas, 23 (43.4%) fueron ubicadas en el grupo filogenético A, 8 (15.1%) pertenecieron al filogrupo D; 7 (13.2%) correspondieron al filogrupo B1 y B2, mientras que 8 (15.1%) no tiene grupo filogenético determinado. (Figura 2).

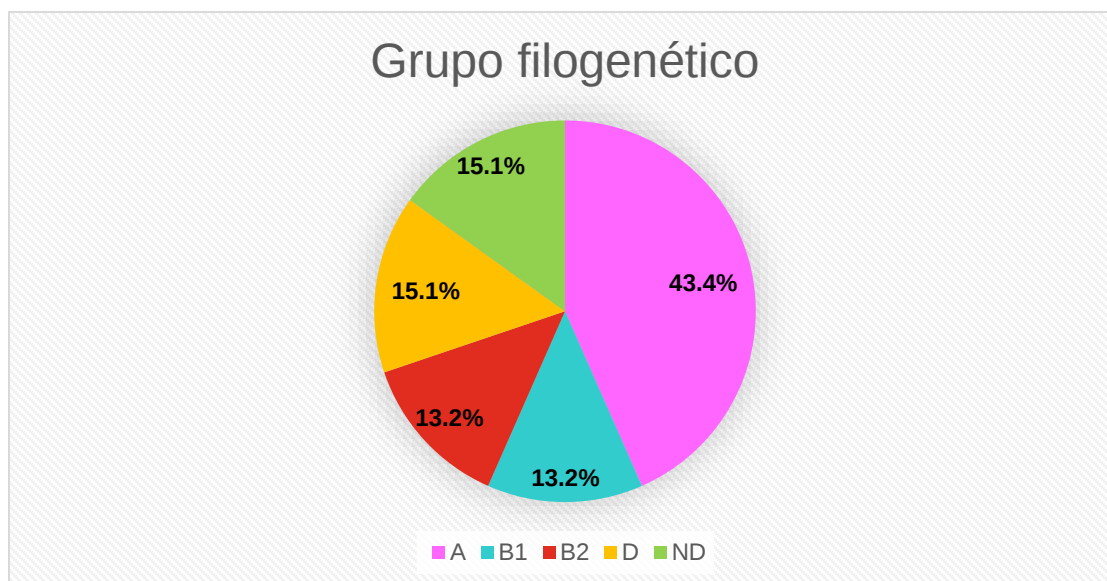


Figura 2. Frecuencia de los grupos filogenéticos en cepas de *E. coli*.

5.3 Factores de virulencia.

En cuanto a los genes de virulencia, el más frecuente fue el *fimH* presente en 44 cepas (83.0%), seguido de *subAB*, *O25*, *sat*, y *exhA* con 36 (67.9%), 28 (52.8%), 25 (47.2%) y 23 (43.4%), respectivamente; los genes menos frecuentes fueron *stx2* con 52 cepas negativas (98.1%), seguido de *bfp* con 50 (94.3%), *lt* con 49 (92.5%), *eae* con 48 (90.6%), *O16* y *stx1* con 47 (88.6%), *stp* y *sth* con 45 (84.9%) y *subA* con 42 (79.2%). (Figura 3)

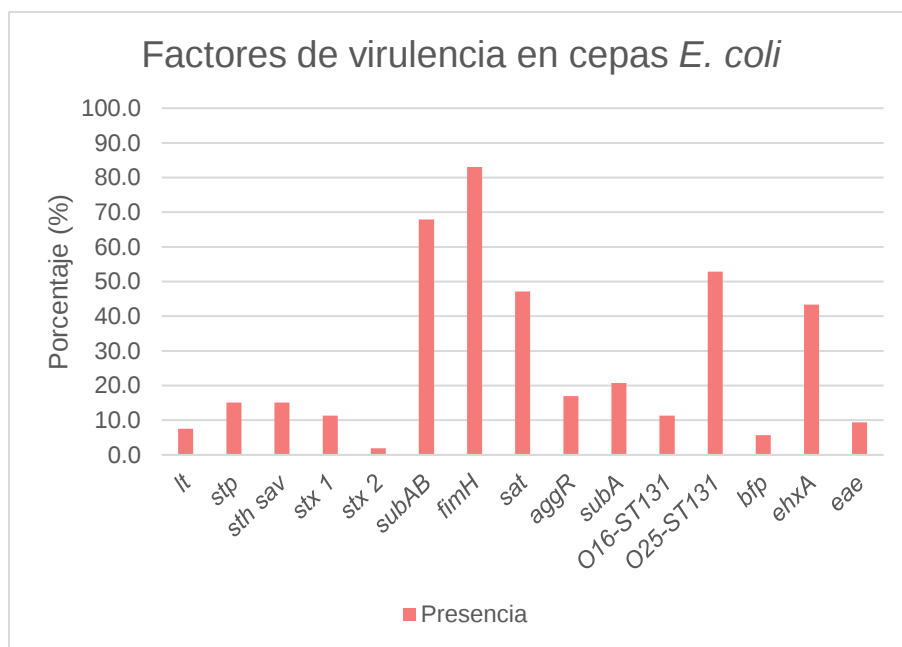


Figura 3. Presencia de genes de virulencia expresados en porcentaje presentes en los 53 aislamientos de *E. coli*

El gen *fimH* fue el de mayor frecuencia en el grupo filogenético A (19 cepas positivas), seguido de *subAB* con 17, *sat* con 14, *ehxA* con 13 y O25-ST131 con 12, y 64474:H- FUE el serotipo que presentó más genes (ocho genes), Seguido de O132:H- y O48:H18 con siete genes (ambos), con seis genes le siguen O48:H- y O16:H5; O25:H1, O10:H4 y O89:H4 con 5 genes.

Del grupo filogenético B1, el gen más frecuente fue el *fimH* con siete cepas positivas, seguido de *subAB* con seis y los serotipos que presentaron mayor presencia de genes fueron O23:H16 con cinco, con cuatro genes están O128ab:H35, O167:H19 y O113:H7. Del filogrupo B2, *fimH* y *exhA* fueron los genes con más presencia con 7 cepas positivas, seguido de O25-ST131 con 6, mientras que el gen *sat* presentó 5 cepas, el serotipo que mayor presencia tuvo de genes fue el O84:H- con 12, seguido de los serotipos O25:H34 y O81:H- con 6 genes. Dentro del grupo D, al igual que los demás anteriores, el *fimH* fue el gen que más presencia tuvo con 8 cepas positivas, seguido del *subAB* igual con 8 y O25-ST131 con 5, O15:H2 con 7 genes fue el serotipo que más presencia de genes tuvo, siguiendo el O23:H15 con 5. Finalmente, para las cepas clasificadas en ND, O16-ST131 y *sth* tuvo la mayor presencia de genes con 5 positivas, seguido de *fimH* con 3. El serotipo que tiene la mayor cantidad de genes fue el O167:H15 con 4, seguido de los serotipos 64474:H4, O149:H- y O15:H18 con 3. (Tabla 3).

Tabla 3. Frecuencia de genes de virulencia asociados a serotipos y grupo filogenético de cepas *E. coli*.

Serotipos	Cepas	Grupo filogenético	Factores de virulencia															Grupo DEC
			<i>lt</i>	<i>stp</i>	<i>sth sav</i>	<i>eae</i>	<i>bfp</i>	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>subA*B</i>	<i>sub A</i>	<i>ehxA</i>	<i>sat</i>	<i>aggR</i>	<i>fim H</i>	O16 ST131	O25 ST131	
O48:H-	2	A	-	1	-	-	-	-	-	1	1	1	2	-	2	-	1	ETEC/STEC/EAEC/UPEC/ST131
O132:H-	3		-	-	-	-	-	-	-	3	3	3	3	1	3	-	3	STEC/EAEC/UPEC/ST131
O15:H2	1		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	
64474:H-	2		-	2	-	-	-	-	-	2	1	2	2	1	2	-	1	ETEC/STEC/EAEC/UPEC/ST131
O159:H4	1		1	-	-	-	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	ETEC/EPEC/STEC
O28ab:H-	2		-	1	-	-	-	-	-	-	-	2	2	-	-	-	1	ETEC/STEC/EAEC/ST131
O25:H1	2		-	-	-	1	-	-	-	2	-	1	-	-	2	-	2	EPEC/STEC/UPEC/ST131
O48:H18	2		-	2	-	1	-	-	-	2	1	-	2	-	2	-	2	ETEC/EPEC/STEC/EAEC/UPEC/ST131
O125ab:H12	1		-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1	-	1	-	-	STEC/EAEC/UPEC
O10:H4	1		-	1	-	-	-	-	-	1	1	-	-	1	-	-	1	ETEC/STEC/EAEC/ST131
O40:H27	1		-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	1	-	-	STEC/UPEC
O16:H5	1		-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	1	1	1	1	-	STEC/EAEC/UPEC/ST131
O168:H-	1		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	
O168:H4	1		-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1	-	-	STEC/UPEC
O89:H4	1		-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	1	1	-	1	STEC/EAEC/UPEC/ST131
O48:H32	1		-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1	-	1	-	-	STEC/EAEC/UPEC
O128ab:H35	2	B1	-	-	-	-	-	-	-	2	-	2	-	-	2	-	1	STEC/UPEC/ST131
O167:H19	1		-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	1	-	1	STEC/UPEC/ST131
O23:H16	1		-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	-	-	1	-	1	STEC/UPEC/ST131
O179:H8	1		-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1	-	1	-	-	STEC/EAEC/UPEC
O8:H9	1		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	
O113:H7	1		-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	1	-	1	-	-	STEC/EAEC/UPEC
O25:H34	2	B2	-	-	2	-	-	-	1	2	-	2	-	-	2	-	2	ETEC/STEC/UPEC/ST131
O81:H-	3		-	1	1	1	1	1	-	1	1	3	3	2	3	-	3	ETEC/EPEC/STEC/EAEC/UPEC/ST131
O81:H4	1		-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	1	-	1	-	-	STEC/EAEC/UPEC

O81: H7/H-	1		-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	1	1	1	-	1	STEC/EAEC/UPEC/ST131
O23:H15	3	D	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	2	1	3	-	3	STEC/EAEC/UPEC/ST131
O48:H-	2		-	-	-	-	-	-	-	2	-	1	-	-	2	-	1	STEC/UPEC/ST131
O15:H2	2		2	-	-	-	1	-	-	2	1	1	-	-	2	-	1	ETEC/EPEC/STEC/UPEC/ST131
O128ab:H35	1		-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1	-	1	-	-	STEC/EAEC/UPEC
O86:H24	2	ND	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	ETEC/ST131
64474:H4	1		-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1	-	1	-	-	STEC/EAEC/UPEC
O149:H-	1		1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	ETEC/UPEC/ST131
O167:H15	1		-	-	-	1	-	-	-	1	-	-	-	-	1	-	1	EPEC/STEC/UPEC/ST131
O15:H18	1		-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	ETEC/EAEC/ST131
O86:H51	1		-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	ETEC/ST131
O12:H4	1		-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	ETEC/ST131
N=53 (%)			7.5%	15.1%	15.1%	9.4%	5.7%	11.3%	1.9%	67.9%	20.8%	43.4%	47.2%	17.0%	83.0%	11.3%	52.8%	

5.4 Sensibilidad a los antimicrobianos

El análisis de la resistencia a los antimicrobianos mostró que la mayoría de las cepas presentaron multirresistencia con el 92.5%, observando que fue principalmente ante ampicilina, oxacilina, cefpodoxima, clindamicina, lincomicina, azitromicina, eritromicina y sulfametoxazol.

En cuanto a la relación de los antibióticos con los grupos filogenéticos, del grupo filogenético a, 1 (4.3%) cepa mostró resistencia a nueve de los 14 antibióticos empleados, 4 (17.4%) cepas son resistentes a ocho antibióticos, nueve cepas (39.1%) lo son a siete y nueve (39.1) cepas a seis. Mientras que dentro del filogrupo B1 al igual que el filogrupo A, 1 (14.3%) cepa fue resistente a nueve antibióticos, dos (28.6%) cepas mostraron resistencia a ocho, tres (42.9%) cepas lo fueron a siete y una (14.3%) cepa a seis.

En el grupo B2, tres cepas (42.9%) presentaron resistencia a nueve antibióticos, tres (42.9%) cepas a siete y una (14.3%) cepa a seis. Para el filogrupo D, dos (25%) cepas mostraron resistencia a doce, dos (25%) cepas a once y cuatro (50%) cepas a nueve antimicrobianos. Las cepas que no se pudieron clasificar, una (12.5%) presentó resistencia a once antibióticos, seguido de una (12.5%) cepa que mostró resistencia a nueve, cinco (62.5%) son resistentes a ocho antibióticos y una (12.5%) es resistente a siete (Tabla 4).

Tabla 4. Resistencia a los antimicrobianos de las cepas *E.coli*.

Serotipos	Cepas	Grupo filogenético	Antibióticos													
			AMP	AML	OX	CPD	EFT	CVN	DA	MY	AZM	E	CN	AK	DO	RL
O48:H-	2	A	1	-	2	-	-	-	2	2	1	2	-	-	-	1
O132:H-	3		1	-	3	-	-	-	3	3	-	3	-	-	-	2
O15:H2	1		1	1	1	1	-	-	1	1	-	1	-	-	1	1
64474:H-	2		2	-	2	-	-	-	2	2	1	2	-	-	-	2
O159:H4	1		1	-	1	-	-	-	1	1	-	1	-	-	-	1
O28ab:H-	2		-	-	2	-	-	-	2	2	1	2	-	-	2	-
O25:H1	2		2	-	2	1	-	-	2	2	1	2	-	-	-	2
O48:H18	2		-	-	2	-	-	-	2	2	2	2	-	-	-	1
O125ab:H12	1		1	1	1	-	-	-	1	1	1	1	-	-	-	1
O10:H4	1		1	-	1	1	-	-	1	1	-	1	-	-	-	1
O40:H27	1		1	-	1	-	-	-	1	1	1	1	-	-	-	1
O16:H5	1		1	1	1	-	-	-	1	1	-	1	-	-	-	1
O168:H-	1		1	-	1	1	-	-	1	1	-	1	-	-	1	1
O168:H4	1		1	-	1	1	-	-	1	1	-	1	-	-	-	1

O89:H4	1		1	-	1	-	-	-	1	1	1	1	-	-	-	1
O48:H32	1		1	-	1	-	-	-	1	1	-	1	-	-	-	1
O128ab:H35	2	B1	2	2	2	-	-	-	2	2	2	2	-	-	-	2
O167:H19	1		1	-	1	-	-	-	1	1	1	1	-	-	-	1
O23:H16	1		1	-	1	-	-	-	1	1	1	1	-	-	-	1
O179:H8	1		1	-	1	-	-	-	1	1	1	1	-	-	-	1
O8:H9	1		-	-	1	1	-	-	1	1	-	1	-	-	-	1
O113:H7	1		1	-	1	1	1	-	1	1	-	1	-	-	1	1
O25:H34	2	B2	2	1	2	-	-	-	2	2	1	2	-	-	2	2
O81:H-	3		1	-	3	-	-	-	3	3	1	3	-	-	-	1
O81:H4	1		1	1	1	1	1	-	1	1	1	1	-	-	-	-
O81: H7/H-	1		1	-	1	-	-	-	1	1	1	1	-	-	-	-
O23:H15	3	D	3	3	3	-	-	-	3	3	1	3	-	-	2	3
O48:H-	2		2	1	2	1	-	1	2	2	2	2	-	2	-	2
O15:H2	2		2	2	2	2	-	-	2	2	2	2	1	1	2	2
O128ab:H35	1		1	1	1	1	-	-	1	1	1	1	-	-	-	1
O86:H24	2	ND	2	-	2	2	-	-	2	2	2	2	-	-	-	2
64474:H4	1		1	1	1	1	1	-	1	1	1	1	-	-	1	1
O149:H-	1		1	1	1	1	1	1	1	1	-	1	-	-	-	-
O167:H15	1		1	-	1	-	-	-	1	1	1	1	-	-	-	1
O15:H18	1		1	-	1	1	-	-	1	1	1	1	-	-	-	1
O86:H51	1		1	-	1	1	-	-	1	1	1	1	-	-	-	1
O12:H4	1		1	-	1	1	-	-	1	1	1	1	-	-	-	1
N=53 (%)			81.1%	30.2%	100%	35.8%	7.5%	3.8%	100%	100%	58.5%	100%	1.9%	5.7%	22.6%	81.1%

AMP=Ampicilina, AML=Amoxicilina, OX=Oxacilina, CFP=Cefpodoxima, EFT=Ceftiofour, CVN=Cefovecina, DA=Clindamicina, MY=Lincomicina, AZM=Azitromicina, E=Eritrocimicina, CN=Gentamicina, AK=Amikacina, DO=Doxiciclina, y RL=Sulfametoxazol.

Los resultados del análisis mostraron que 53 cepas (100%) presentaron resistencia a clindamicina, lincomicina, oxacilina y eritromicina. Seguido en orden de frecuencia, la ampicilina y sulfametoxazol con 43 (81.1%) y la azitromicina con 31 (58.5%) cepas. En cuanto a la sensibilidad se mostró que 36 (67.9%) de las cepas fueron sensibles a cefovecina, seguido de la doxiciclina con 34 (64.2%), el ceftiofur con 30 (56.6%) y la amoxicilina con 29 (54.7%) cepas respectivamente (Figura 4). En relación con la producción de β -lactamasa solo dos cepas fueron productoras.

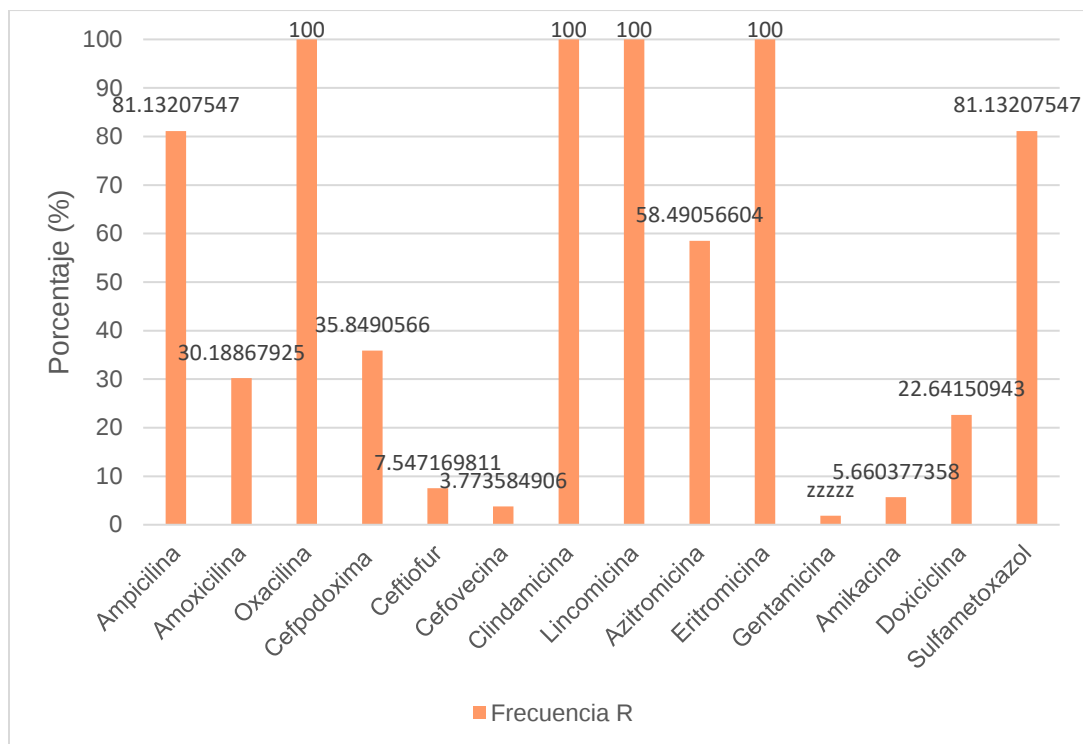


Figura 4. Número (%) de serotipos de *E. coli* resistentes a los antimicrobianos

VI. Discusión.

E. coli es uno de los microorganismos más estudiados a nivel mundial debido a su gran plasticidad para adaptarse rápidamente a cualquier ambiente, teniendo la capacidad de adquirir genes de virulencia y resistencia a los antimicrobianos, lo que hace que sea un microorganismo altamente patógeno.

En el presente estudio se analizaron 53 cepas de *E. coli*, aisladas de muestras fecales de adolescentes, de las cuáles los serotipos O48:H-, O23:H15, O132:H-, O25:H34, O15:H2, O128ab:H35 y O84:H-, fueron los más frecuentes, resultados que solamente el serogrupo O25 concuerda con Momtaz et al., (2013), Paniagua-Contreras et al., (2015), Miranda-Estrada et al., (2017) y Martínez (2017) que lo reportan como el más frecuente, sin embargo, este serogrupo contrasta con lo reportado por Norouzian et al., (2022) en donde los serogrupos O8, O6, O18 y O75 fueron los más frecuentes.

Comparando los estudios reportados por Aguilar (2019) y Cortez de la Puente (2020) se observó que reportan diferentes serotipos, siendo O25:H4 el más frecuente en ambos estudios. Por otro lado, Michelli et al. (2016), concluyeron que los serogrupos O86, O119, O127 y O88 fueron los más frecuentes y que el serogrupo O25 estuvo presente en la mayoría de las muestras analizadas.

La amplificación de los genes *arpA*, *chuA*, *yjaA* y *TspE* permitió la clasificación por grupo filogenético, el presente estudio el 43.4% de serotipos de *E. coli* pertenecen al filogrupo A, seguido del grupo D (15.1%), los filogrupos B1 y B2 (13.2%) y el 15.1% fue no determinado (ND), lo que reveló que la diversidad genética fue similar a lo expuesto por Stoppe et al., (2017) en donde el grupo A y D fueron los más frecuentes (48.3% y 30.2% respectivamente), de igual forma, Ramírez et al., (2020) obtuvieron resultados semejantes en su estudio con la clasificación filogenética en los grupos A, B1 y B2, difiriendo en el grupo D.

Ahumada-Santos et al., (2019) exponen que el grupo A fue el más frecuente (42.1%), seguido del grupo B2 (15.7%), resultados similares a los de Carrasco (2022) QUIEN obtuvo que los grupos A y B1 fueron los más frecuentes. Sin embargo, Lee et al., (2015) obtuvo que el filogrupo B2 fue el más frecuente, seguido de los grupos D, A y B1, resultados que comparten con los expuestos por Miranda-Estrada et al., (2016), Norouzian et al., (2019), Millán et al., (2020) y Matta-Chuquisapon et al., (2022).

La clasificación de las cepas analizadas en el presente estudio, se agruparon como comensales pertenecientes al grupo A y B1 y en menor medida a los filogrupos B2 y D, que son formas patógenas (Lee et al., 2015; Carrasco, 2022), además de que el grupo B2, si bien es poco frecuente en la microbiota intestinal (MI), cuando está presente, las cepas son muy virulentas (Navidinia et al., 2014).

En cuanto a los factores de virulencia, los genes que más se presentaron fueron el *fimH*, *subAB*, O25-ST131, *sat* y *ehxA*, resultados que concuerdan con Miranda-Estrada et al., (2016), con 86% y 26.2% para los genes *fimH* y *sat*, respectivamente. Yun et al., (2015), Robledo (2017), Haghighatpanah y Mojtahedi (2019), Dadi et al., (2022), Mohammed et al., (2022) y Halaji et al., (2022) presentan resultados similares para *fimH*. Contrario a lo reportado por Paniagua-Contreras et al., (2015) que, en cepas aisladas de pacientes con infecciones urinarias de una comunidad, señalan que el gen que prevaleció fue el *iha*. Rivera (2018) señalan que el gen *sat* presenta una alta frecuencia correspondiendo a un 94.87%, resultado que concuerda con el presente estudio.

Para el caso del O25-ST131, Miranda-Estrada et al., (2016) indican que el la clona O25-ST131 estuvo presente en un 21.5%; por otro lado, Luna-Pineda et al.,(2018) señalan que en su estudio la clona O25-ST131 tuvo una prevalencia del 20.2% en aislados de *E. coli*, mientras que Abdelrahim et al., (2021) mencionan que la detección de la clona O25-ST131 tuvo una presencia del 84.8% de los aislamientos urinarios y 47% en los aislamientos

intestinales en su estudio en pacientes externos de Hospitales Universitarios en Egipto, resultados que se asemejan a la presente investigación.

El gen *fimH* estuvo presente en todos los grupos filogenéticos, la alta frecuencia de este gen podría indicar que las cepas de *E. coli* pueden expresar un número de estructuras que facilitan la adherencia a la células del hospedero, además de que esta adhesina fimbrial está involucrada en el desarrollo de comunidades bacterianas intracelulares y formación de biopelículas en soportes biológicos y se ha observado que está presente en cepas que producen cistitis y pielonefritis (Flores-Mireles et al., 2015; Robledo, 2017; Pérez, 2018). Su presencia podría indicar que las cepas pertenecen a los patotipos UPEC o DEC (Khairy et al., 2019). La presencia y alta frecuencia del gen *subAB*, podría sugerir que puede exacerbar los síntomas de las infecciones por STEC, además de que inhibe la respuesta inmunitaria del huésped (Tsutsiki et al., 2022).

Los patrones de resistencia son variables, sin embargo, entre las cepas estudiadas se presentó multirresistencia a más de dos grupos de antibióticos, en donde se revela que en la clindamicina, lincomicina, oxacilina y eritromicina hay un 100% de resistencia bacteriana, resultados que difieren con lo registrado por Rojas et al., (2019) quienes encontraron total resistencia a la ampicilina, cefalotina, cefepime, ceftazidima, ceftriaxona, cefuroxima sódica, cefuroxime axetil, ciprofloxacino, levofloxacina y norfloxacina.

La ampicilina y el sulfametoxazol fueron los antimicrobianos a los que el mayor número de serotipos de *E. coli* fueron resistentes (81.1% para ambos antibióticos), resultados similares que reportaron Guerra et al., (2014) con 67.5% de las cepas tienen resistencia alta a ampicilina y 55.0% a sulfametoxazol. Paniagua-Contreras et al., (2015) obtuvieron resultados similares, con un 97.4% de resistencia para la ampicilina, así mismo, El-baz et al., (2022) encontraron que el 98% de las cepas que estudiaron fueron resistentes a ampicilina.

En cuanto a la susceptibilidad a los antibióticos, las cepas analizadas en el presente estudio mostraron sensibilidad alta ante la cefovecina, doxiciclina y ceftiofur, lo que contrasta con Allami et al., (2022) quienes señalan que la doxiciclina fue uno de los antibióticos a los que fueron más resistentes las cepas que estudiaron. La susceptibilidad intermedia, fue ante la gentamicina, amikacina y cefpodoxima, con 77.4%, 66.0% y 45.3%, respectivamente, resultados que difieren de los reportados por Yazdanpour et al., (2020) y Matta-Chuquisapon et al., (2022), ya que mencionan susceptibilidad intermedia ante gentamicina y la amikacina. Los antibióticos pertenecientes a los grupos de las penicilinas, lincosamidas, macrólidos, y sulfonamidas fueron los antimicrobianos a los que el mayor número de

serotipos fueron resistentes, sin embargo, se ha demostrado que hay una fuerte resistencia de bacteriana a cefalosporinas, aminoglucósidos, fluoroquinolonas, tetraciclinas y β -lactámicos en cepas tipo UPEC, EAEC y EPEC (Valdés, 2016; Baldiris-Ávila et al., 2020; Gupta et al., 2021; Marcos-Carbajal et al., 2021).

Las cifras de resistencia bacteriana y su relación con grupos filogenéticos en el presente estudio fueron altas, todas las cepas que se ubicaron en los filogrupos D y B1 presentaron resistencia a más de nueve y siete antibióticos respectivamente, entre los cuales está la ampicilina, eritromicina, oxacilina, clindamicina, lincomicina, amoxicilina, cefpodoxima, azitromicina y sulfametoxazol, seguido del grupo A y B2 con una resistencia a más de siete antibióticos entre los que se encuentra la ampicilina, oxacilina, clindamicina, lincomicina, azitromicina, eritromicina y sulfametoxazol.

De los 14 antibióticos ensayados, los serotipos de los grupos D y B1, fueron resistentes a más de seis antibióticos lo cual concuerda con el estudio realizado por Lee et al., (2015) con el grupo D, sin embargo, en otros estudios como el de Allami et al., (2022) que señalan al filogrupo B2 en el que hay un número mayor de cepas resistentes a los antimicrobianos, en comparación con los otros grupos, resultado que difiere con Mohammed et al., (2022) donde señalan que los filogrupos con más resistencia bacteriana son D, A, E y C.

Del grupo A, la mayoría presentó resistencia a más de cinco antibióticos a excepción de una cepa que fue resistente a cuatro antibióticos y del filogrupo B2 se detectó resistencia a más de cinco antibióticos la mayoría de las cepas, a excepción de una que presentó resistencia a cuatro antibióticos, resultados que concuerdan con lo reportado por Ramírez et al., (2020). Por otro lado, Curová et al., (2020) reportaron resultados similares al presente estudio con relación a que el grupo A presentó mayor resistencia a los antimicrobianos que el grupo B2. Las cepas que no se les pudieron clasificar por grupo filogenético, presentaron resistencia a más de siete antibióticos

En cuanto a los grupos filogenéticos y los factores de virulencia, el grupo filogenético B2 presentó un mayor número de genes de virulencia, en los que se destacan *fimH*, *exhA* y O25-ST131 resultados que concuerdan con respecto a la clona O25-ST131 según Aguilar (2019), seguido del orden, se encuentra el grupo A en donde los genes que más presencia tuvieron fueron: *fimH*, *subAB*, *sat*, O25-ST131 resultados que concuerdan en *fimH* y *sat* con Miranda-Estrada et al (2016) y Martínez (2017), del filogrupo D fueron *fimH*, *subAB* y O25-ST131, resultados que según Montes-Robledo et al., (2023) concuerdan con la presencia del gen *fimH* en este grupo, del grupo B1 fue *fimH* y *subAB* resultados que se obtuvieron

con Badouei et al., (2021) para el gen *subAB*, mientras que para el no determinado (ND) los genes que más se presentaron en fueron O16-ST131 y *sth*.

En el presente estudio, con base en los resultados obtenidos, se sugiere que las cepas podrían ser híbridas, ya que los genes como *fimH*, *subAB*, *sat*, *exhA* y clona O25-ST131, se encuentran ampliamente distribuidos entre los grupos filogenéticos, así como también se encuentran repartidos entre los diferentes patotipos de *E. coli*, lo cual podría decir que estos genes pueden transferirse entre bacterias por medio de la transferencia genética horizontal de genes que promueve la aparición esporádica de cepas altamente virulentas pertenecientes a filogrupos de tipo comensal (A y/o B1), además la notable plasticidad del genoma de *E. coli* ha permitido la aparición de cepas virulentas que muestran una disposición inusual, teniendo varios factores de virulencia de diferentes patotipos en un solo aislado (Lara et al., 2017; Cortez, 2020; Abdelerahim et al., 2021).

VII. Conclusiones.

Las cepas de *E. coli* aisladas de muestras fecales en adolescentes, en su mayoría pertenecen a grupos filogenéticos comensales A y B1, y con menor frecuencia los grupos D y B2, considerados como patógenos, además de que las cepas pertenecientes al filogrupo D y B1 muestran resistencia a más de cuatro antibióticos de los catorce que se incluyeron en el estudio; se destaca resistencia del 100% a clindamicina, lincomicina, oxacilina y eritromicina y resistencia alta ante ampicilina y sulfametoxazol. En cuanto a los patotipos de *E. coli*, de acuerdo con los genes de virulencia, es posible que la mayoría de las cepas estudiadas sean híbridas debido a que los genes de virulencia se encontraron ampliamente distribuidos entre la mayoría de los aislados, por lo que se podría decir que cabe la posibilidad de que *E. coli* intestinal sea potencialmente patógena.

VIII. Referencias

1. Abdelrahim, S., Fouad, M., Abdallah, N., Ahmed, R. y Zaki, S. (2021) *Comparative Study of CTX-M-15 Producing Escherichia coli ST131 Clone Isolated from Urinary Tract Infections and Acute Diarrhoea*. Infection and Drug Resistance. 14.4027-4038.
2. Adib, N., Ghanbarpour, R., Solatzadeh, H y Alizade, H (2014) *Antibiotic resistance profile and virulence genes of uropathogenic Escherichia coli isolates in relation to phylogeny*. Tropical Biomedicine. 31(1).17-25. PMID: 24862040.
3. Águila, A., Rodríguez, A., Fernández, A., Cruz, Y., Bravo, L., Hernández, J., Blanco, S. y Bebelagua, D. (2020) *Escherichia coli diarrogénicos, identificación de patotipos y fenotipos de resistencia antimicrobiana en aislados cubanos*. Revista Cubana de Medicina Tropical, 72(1).1-19.
4. Aguilar, J. (2019) *Estudio molecular de la resistencia a antibióticos β -lactámicos y quinolonas de cepas clínicas de Escherichia coli*. Tesis de grado (Maestría). Benemérita Universidad de Puebla. Instituto de Ciencias. Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas.
5. Ahumada-Santos, Y., Báez-Flores, M., Díaz-Camacho, S., Uribe-Beltrán, M., Eslava, C., Parra-Unda, J. y Delgado-Vargas, F. (2019). *Association of phylogenetic distribution and presence of integrons with multidrug resistance in Escherichia coli clinical isolates from children with diarrhoea*. Journal of Infection and Public Health. 13 (5).767-772. doi:10.1016/j.jiph.2019.11.019.
6. Allami, M., Bahreini, M. y Reza, M. (2022) *Antibiotic Resistance, Phylogenetic Typing and Virulence Genes Profile Analysis of Uropathogenic Escherichia Coli Isolated From Patients in Southern Iraq*. Journal of Applied Genetics. 63(2).401-412.
7. Aperador, L. (2020) *Caracterización molecular de patotipos de Escherichia coli de transmisión alimentaria aislados en Pamplona, Colombia*. Tesis de grado (Licenciatura).

Universidad de Pamplona Facultad de Ciencias Básicas Departamento de Microbiología
Pamplona, Colombia.

8. Badouei, M., Jajarmi, M., Narimani, A., Salehi, T., Ghanbarpour, R., Morabito, S. y Koochakzadeh, A. (2021) *Distribution and molecular analysis of Subtilase cytotoxin gene (SubAB) variants in Shiga Toxin-Producing Escherichia coli (STEC) isolated from different sources in Iran*. Research Square. doi: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-853144/v1>
9. Baldiris-Avila, R., Montes-Robledo, A. y Buelvas-Montes, Y. (2020). *Phylogenetic Classification, Biofilm-Forming Capacity, Virulence Factors, and Antimicrobial Resistance in Uropathogenic Escherichia coli (UPEC)*. Current Microbiology **77**. 3361–3370 <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02173-2>
10. Bölin, I., Wiklund, G., Qadri, F., Torres, O., Bourgeois, AL., Savarino, S. y Svennerholm, A. (2006) *Enterotoxigenic Escherichia coli with STh and STp genotypes is associated with diarrhea both in children in areas of endemicity and in travelers*. Journal of Clinical Microbiology. 44(11). 3872-3877. doi: 10.1128/JCM.00790-06.
11. Bravata-Alcántara, J., Bello-López, J., Cortes-Ortiz, I., Mendez-Velazquez, J., Aviles-Soto, B., Quintas-Granados, L., Chavez-Ocaña, S., Rosel-Pech, C., Gonzalez-Barrios, J. y Sierra, M. (2019) *Distribution of Virulence and Antimicrobial Resistance Genes in Phylogenetic Groups of Escherichia coli Strains Isolated from Mexican Patients with Urinary Infection*. Jundishapur Journal of Microbiology. 12(3). e83711.
12. Braz, V., Melchior, K. y Moreira, C. (2020) *Escherichia coli as a Multifaceted Pathogenic and Versatile Bacterium*. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 10. 548492. doi: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.548492>
13. Canata, M., Navarro, R., Velázquez, G., Rivelli, S., Rodríguez, F., Céspedes, A., Espínola, C., Canese, J., y Guillén, R. (2017). *Caracterización molecular de factores de virulencia de aislados Escherichia coli obtenidas de heces de niños con gastroenteritis*

- del Hospital Central de Instituto de Previsión Social en el 2012. *Pediatría* (Asunción). 43(1). 12-16.
14. Cardozo, A. (2020). *Asignación de grupos filogenéticos a cepas de Escherichia coli productoras de toxina Shiga LEE-positivas, asociadas, a diarrea neonatal de terneros*. Tesis de grado (Licenciatura). Universidad de la República. Facultad de Ciencias. Montevideo, Uruguay.
15. Carrasco, R. (2022) *Identificación de grupos filogenéticos de Escherichia coli en aislados de cerdos con cuadros diarreicos provenientes de granjas tecnificadas de Lima*. Tesis de grado (Licenciatura). Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Medicina Veterinaria. Lima, Perú.
16. Castañeda, C. (2020) *Microbiota intestinal y obesidad en la infancia*. *Revista Cubana de Pediatría*. 92(1). e927.
17. Chattopadhyay, S., Tchesnokova, V., McVeigh, A., Kisiela, D., Dori, K., Navarro, A., Sokurenko, E. y Savarino, S. (2012) *Adaptive evolution of class 5 fimbrial genes in enterotoxigenic Escherichia coli and its functional consequences*. *Journal of Biological Chemistry*. 287(9). 6150-6158.
18. Clermont, O., Dhanji, H., Upton, M., Gibreel, T., Fox, A., Boyd, D., Mulvey, M., Nordmann, P., Ruppé, E., Sarthou, J., Frank, T., Vimont, S., Arlet, G., Branger, C., Woodford, N. y Denamur, E. (2009) *Rapid detection of the O25b-ST131 clone of Escherichia coli encompassing the CTX-M-15-producing strains*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 64. 274-277.
19. Clermont, O.; Christenson, J. K., Denamur, E. y Gordon, D. M. (2013). *The Clermont Escherichia coli phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups*. *Environmental Microbiology Reports*. 5(1). 58-65.
20. Contreras, C., Ochoa, T., Lacher, D., DebRoy, C., Navarro, A., Talledo, M., Donnenberg, M., Ecker, L., Gil, A., Lanata, C. y Cleary, T. (2010) *Allelic variability of critical virulence*

- genes (*eae*, *bfpA* and *perA*) in typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* in Peruvian children. *Journal of Medical Microbiology*. 59. 25-31. doi: [10.1099/jmm.0.013706-0](https://doi.org/10.1099/jmm.0.013706-0).
21. 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*. Tesis de grado (Maestría) Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
22. Čurová, K., Slobodníková, R., Kmeťová, M., Hrabovský, V., Maruniak, M., Liptáková, E. y Siegfried, L. (2020) *Virulence, phylogenetic background and antimicrobial resistance in Escherichia coli associated with extraintestinal infections*, *Journal of Infection and Public Health*, 13(10).1537-1543. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2020.06.032>.
23. Czeizulin, J., Whittam, T., Henderson, I., Navarro-Garcia, F. y Nataro, J. (1999) *Phylogenetic analysis of enteroaggregative and diffusely adherent Escherichia coli*. *Infection and Immunity*. 67(6). 2692-2699.
24. Dadi, B., Abebe, T., Zhang, L., Mihret, A., Abebe, W. y Amogne, W. (2022) Distribution of virulence genes and phylogenetics of uropathogenic *Escherichia coli* among urinary tract infection patients in Addis Ababa, Ethiopia. *BMC Infection Diseases*. 20.108. doi: <https://doi.org/10.1186/s12879-020-4844-z>
25. Delbono, M. (2020). *Microbiota intestinal, nutrición y salud*. *Tendencias en Medicina*. 57. 112-117.
26. El-Baz, R., Said, H., Abdelmegeed, E. y Barwa, R. (2022) *Characterization of virulence determinants and phylogenetic background of multiple and extensively drug resistant Escherichia coli isolated from different clinical sources in Egypt*. *Applied Microbial and Cell Physiology*. 106. 1279-1298.
27. Eslava, C., Navarro, A, y Cravioto, A. (2003) *Factores implicados en la colonización y producción de enfermedad por E. coli O157:H7*. Universidad de los Andes. Memorias Primer Congreso Colombiano de Microbiología.

28. Fiallos, J. D., Enríquez de la Madrid, M y Navarro, A. (2018) *Caracterización serológica de cepas Escherichia coli en cepas de origen humano*. Revista Portal de la Ciencia. 14.41-52.
29. Flores-Mireles, A., Walker, J., Caparon, M. y Hultgren, S. (2015) *Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options*. Nature Reviews Microbiology. 13. 269-284. doi: 10.1038/nrmicro3432.
30. Garza-Velasco, R., Garza-Manero, S. y Perea-Mejía, L. (2021). *Microbiota intestinal: aliada fundamental del organismo humano*. Educación Química, 32(1). DOI: <http://dx.doi.org/10.22201/fq.18708404e.2021.1.75734>.
31. González-Gallegos, N., González-Torres, Y. S., y Padilla-Durán, L. F. (2017). *Microbiota intestinal, sobrepeso y obesidad*. RESPYN Revista Salud Pública Y Nutrición. 16(3). 23–28. doi:<https://doi.org/10.29105/respyn16.3-4>
32. Guerra, J., Romero-Herazo, Y., Arzuza, O. y Gómez-Duarte, O. (2014) *Phenotypic and genotypic characterization of enterotoxigenic Escherichia coli clinical isolates from northern Colombia, South America*. BioMed Research International. 11. doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/236260>
33. Gupta, G., Kumar, A. y Bhardwaj, A. (2021) *Resistance, Phylogenetic Analysis of Pathogenic Escherichia coli in Human Isolate and Their Sensitivity with Plant Extracts*. International Journal of Medical Research and Health Sciences. 10(1). 1-15.
34. Haghighatpanah, M y Mojtahedi, A. (2019) *Characterization of antibiotic resistance and virulence factors of Escherichia coli strains isolated from Iranian inpatients with urinary tract infections*. Infection and Drug Resistance. 12. 2747-2754. doi: 10.2147/IDR.S219696. PMID: 31564925; PMCID: PMC6731957.
35. Halaji, M., Fayyazi, A., Rajabnia, M., Zare, D., Pournajaf, A. y Ranjbar, R. (2022) *Phylogenetic Group Distribution of Uropathogenic Escherichia coli and Related Antimicrobial Resistance Pattern: A Meta-Analysis and Systematic Review*. Frontiers in

- Cellular Infection Microbiology. 12. doi: 10.3389/fcimb.2022.790184. PMID: 35281449; PMCID: PMC8914322.
36. Hernández, J. (2015) *Caracterización Fenotípica y Genotípica de Beta-Lactamasas de espectro extendido en Escherichia coli aisladas de Itu en la comunidad*. Tesis de grado (Maestría). Universidad Autónoma de Guerrero. Unidad Académica Ciencias Químico-Biológicas.
37. Icaza-Chávez M. (2013). *Microbiota intestinal en la salud y la enfermedad*. Revista de Gastroenterología de México. 78(4). 240-248. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rgmx.2013.04.004>.
38. Islam, M., Heuvelink, A., Talukder, K., Zwietering, M. y de Boer, E. (2006) *Evaluation of immunomagnetic separation and PCR for the detection of Escherichia coli O157 in animal feces and meats*. Journal of Food Protection. 69(12). 2865-2869.
39. Johnson, J. y Stell, A. (2000) *Extended Virulence Genotypes of Escherichia coli Strains from Patients with Urosepsis in Relation to Phylogeny and Host Compromise*. The Journal of Infectious Diseases. 181(1). 261–272. doi: <https://doi.org/10.1086/315217>.
40. Johnson, K., Thorpe, C. y Sears, C. (2006) *The emerging clinical importance of non-O157 Shiga toxin-producing Escherichia coli*. Clinical Infectious Diseases. 43(12). 1587-1595.
41. Johnson, J., Clermont, O., Johnston, B., Clabots, C., Tchesnokova, V., Sokurenko, E., Junka, A., Maczynska, B. y Denamur, E. (2014) *Rapid and specific detection, molecular epidemiology, and experimental virulence of the O16 subgroup within Escherichia coli sequence type 131*. Journal of Clinical Microbiology. 52(5). 1358-1365. doi: [10.1128/JCM.03502-13](https://doi.org/10.1128/JCM.03502-13).
42. Johnson, J., Kuskowski, M., Gajewski, A., Sahm, D. y Karlowsky, J. (2004) *Virulence Characteristics and Phylogenetic Background of Multidrug-Resistant and Antimicrobial-Susceptible Clinical Isolates of Escherichia coli from across the United States, 2000–*

- 2001, *The Journal of Infectious Diseases*. 190(10). 1739–1744. doi: <https://doi.org/10.1086/425018>
43. Khairy, R., Mohamed, E., Abdel Ghany, H. y Abdelrahim, S. (2019) *Phylogenetic classification and virulence genes profiles of uropathogenic E. coli and diarrhegenic E. coli strains isolated from community acquired infections*. PLoS ONE. 14(9). e0222441. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222441>
44. Kim, S., Covington, A. y Pamer, E. (2017) *The intestinal microbiota: Antibiotics, colonization resistance, and enteric pathogens*. Immunological Reviews. 79(1). 90-105. doi: 10.1111/imr.12563
45. Lacher, D., Steinsland, H., Blank, T., Donnenberg, M. y Whittam, T. (2007) *Molecular evolution of typical enteropathogenic Escherichia coli: clonal analysis by multilocus sequence typing and virulence gene allelic profiling*. Journal of Microbiology. 189(2). 342-350.
46. Lara, F., Nery, D., de Oliveira, P., Araujo, M., Carvalho, F., Messias-Silva, L., Ferreira, L., Faria-Junior, C. y Pereira, A. (2017) *Virulence Markers and Phylogenetic Analysis of Escherichia coli Strains with Hybrid EAEC/UPEC Genotypes Recovered from Sporadic Cases of Extraintestinal Infections*. Frontiers in Microbiology. 8.146. doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00146>
47. Lee, J., Subhadra, B., Son, Y., Kim, D., Park, H., Kim, J., Koo, S., Oh, M., Kim, H. y Choi, C. (2015) *Phylogenetic group distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties of uropathogenic Escherichia coli strains isolated from patients with urinary tract infections in South Korea*. Letters in Applied Microbiology. 62. 84-90.
48. Li, H., Wu, G., Zhao, L. y Zhang, M. (2021) *Suppressed inflammation in obese children induced by a high-fiber diet is associated with the attenuation of gut microbial virulence factor genes*. Virulence. 12(1). 1754-1770.

49. Llenque-Díaz, L. y Acevedo-Hurtado Y. (2012) *Betalactamasas en cultivos de Escherichia coli aislados de urocultivos, coprocultivos y de alimentos de la Ciudad de Trujillo 2011*. SCIÉENDO. 15(2). 1-12.
50. Luna-Pineda, V., Ochoa, S., Cruz-Cordova, A., Cázares-Domínguez, V., Reyes-Grajeda, J., Flores-Oropeza, M., Arellano-Galindo, J., Castro-Hernández, R., Flores-Encarnación, M., Ramírez-Vargas, A., Flores-García, H., Moreno-Fierros, L. y Xicontencatl-Cortes, J. (2018) *Features of urinary Escherichia coli isolated from children with complicated and uncomplicated urinary tract infections in Mexico*. PLoS ONE. 13(11). e0204934. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208285>
51. Manges, A., Johnson, J., Foxman, B., O'Bryan, T., Fullerton, K. y Riley, L. (2001) *Widespread distribution of urinary tract infections caused by a multidrug-resistant Escherichia coli clonal group*. The New England Journal of Medicine. 345(14). 1007-1013. doi: 10.1056/NEJMoa011265. PMID: 11586952.
52. Marcos-Carbajal, P., Salvatierra, G., Yareta, J., Pino, J., Vásquez, N., Díaz, P., Martínez, I., Asmat, P., Peralta, C., Huamani, C., Briones, A., Ruiz, M., Nicomedes, L., Luque, Á., Arapa, L. y Tsukayama, P. (2021). *Caracterización microbiológica y molecular de la resistencia antimicrobiana de Escherichia coli uropatógenas de hospitales públicos peruanos*. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica. 38(1), 119-123. doi: <https://dx.doi.org/10.17843/rpmesp.2021.381.6182>
53. Martínez, D (2017) *Caracterización fenotípica y genotípica de cepas de Escherichia coli aisladas de infecciones del tracto urinario*. Tesis de grado (Licenciatura). Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Facultad de Ciencias Químicas.
54. Matta-Chuquisapon, J., Valencia-Bazalar, E., Sevilla-Andrade, C. y Barrón-Pastor, H. (2022) *Filogenia y resistencia de cepas de Escherichia coli productoras de betalactamasas de espectro extendido a los antibióticos en pacientes con cáncer hospitalizados en Perú*. Biomédica. 42. 470-478.

55. Michelacci, V., Tozzoli, R., Caprioli, A., Martínez, R., Scheutz, F., Grande, L., Sánchez, S. y Morabito, S. (2013) *A new pathogenicity island carrying an allelic variant of the Subtilase cytotoxin is common among Shiga toxin producing Escherichia coli of human and ovine origin*. Clinical Microbiology and Infection. 19(3). 149-156.
56. Michelli, E., Millán, A., Rodolfo, H., Michelli, M., Luiggi, J., Carreño, N. y Donato, M. (2016). *Identification of enteropathogenic Escherichia coli in children with acute diarrheic syndrome from Sucre State, Venezuela*. Biomédica. 36(1). 118-127. doi: <https://doi.org/10.7705/biomedica.v36i0.2928>
57. Millán, Y., Araque, M., y Ramírez, A. (2020). *Distribución de grupos filogenéticos, factores de virulencia y susceptibilidad antimicrobiana en cepas de Escherichia coli uropatógena*. Revista chilena de infectología. 37(2). 117-123. doi: <https://dx.doi.org/10.4067/s0716-10182020000200117>
58. Miranda-Estrada, L., Ruíz-Rosas, M., Molina-López, J., Parra-Rojas, I., González-Villalobos, E y Castro-Alarcón, N. (2017) *Relación entre factores de virulencia, resistencia a antibióticos y los grupos filogenéticos de Escherichia coli uropatógena en dos localidades de México*, Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 35(7). 426-433. doi: <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2016.02.021>.
59. Mohammed, E.J., Hasan, K.C. y Allami, M. (2022) *Phylogenetic groups, serogroups and virulence factors of uropathogenic Escherichia coli isolated from patients with urinary tract infection in Baghdad, Iraq*. Iran Journal of Microbiology. 14(4). 445-457. doi: 10.18502/ijm.v14i4.10230. PMID: 36721510; PMCID: PMC9867636.
60. Momtaz, H., Karimian, A., Madani, M., Safapoor F., Ranjbar, R., Sarshar, M y Souod, N. (2013) *Uropathogenic Escherichia coli in Iran: serogroup distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties*. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials. 12.8. doi: 10.1186/1476-0711-12-8. PMID: 23627669; PMCID: PMC3651382.

61. Montes-Robledo, A., Buelvas-Montes, Y. y Baldiris-Ávila, R. (2023) *Description of extraintestinal pathogenic Escherichia coli based on phylogenetic grouping, virulence factors, and antimicrobial susceptibility*. Iran Journal of Microbiology. 4(15). 503-512.
62. Morales-Espinosa, R., Hernández-Castro, R., Delgado, G., Mendez, J., Navarro, A., Manjarrez, A. y Cravioto, A. (2016) *UPEC strain characterization isolated from Mexican patients with recurrent urinary infections*. The Journal of Infection in Developing Countries. 10(4). 317-328.
63. Murga-Garrido, S., Ulloa-Pérez, E., Díaz-Benítez, C., Orbe-Orihuela, Y., Cornejo-Granados, F., Ochoa-Leyva, A., Sanchez-Flores, A., Cruz, M., Castañeda-Márquez, A., Plett-Torres, T., Burguete, A. y Lagunas-Martínez, A. (2023) *Virulence Factors of the Gut Microbiome Are Associated with BMI and Metabolic Blood Parameters in Children with Obesity*. Biology Spectrum. 11(2). e0338222.
64. Navarro, A., Rodea, G., Castelán-Sánchez, H., Saucedo-Pastrana, H., Licona-Moreno, D., Eslava-Campos, C., Tirado-Gómez, L., Vilchis-Reyes, A., García de la Torre, G., y Cruz-Licea, V. (2022) *Importance of Microbiome of Fecal Samples Obtained from Adolescents with Different Weight Conditions on Resistance Gene Transfer*. Microorganisms.10. 1995. doi: <https://doi.org/10.3390/microorganisms10101995>
65. Navidinia, M., Peerayeh, S., Fallah, F., Bakhshi, B. y Sajadinia, R. (2014) *Phylogenetic grouping and pathotypic comparison of urine and fecal Escherichia coli isolates from children with urinary tract infection*. Brazilian Journal of Microbiology. 45(2). 509-514.
66. Norouzian, H., Katouli, M., Shahrokhi, N., Sabeti, S., Pooya, M. y Bouzari, S. (2019) *The relationship between phylogenetic groups and antibiotic susceptibility patterns of Escherichia coli strains isolated from feces and urine of patients with acute or recurrent urinary tract infection*. Iranian Journal of Microbiology. 11(6). 478-487.
67. Nüesch-Inderbinnen, M., Funk, J., Cernela, N., Tasara, T., Klumpp, J., Schmidt, H. y Stephan, R. (2015) *Prevalence of subtilase cytotoxin-encoding subAB variants among*

- Shiga toxin-producing Escherichia coli strains isolated from wild ruminants and sheep differs from that of cattle and pigs and is predominated by the new allelic variant subAB2-2*. International Journal of Medical Microbiology. 305(1). 124-128. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.11.009>.
68. Orskov, F. y Orskov, I. (1984) *Serotyping of Escherichia coli*. Methods in Microbiology. 14. 43-112.
69. Osman, K., Kappell, A., ElHofy, F., Orabi, A., Mubarak, A., Dawoud, T., Moussa, I. y Hessain, A. (2018) Urinary tract infection attributed to *Escherichia coli* isolated from participants attending an unorganized gathering. Future Microbiology. 13(7). 745-756.
70. Paniagua-Contreras G. L., Monroy-Pérez E., Rodríguez-Moctezuma J., Domínguez-Trejo P., Vaca-Paniagua F y Vaca S. (2015) *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. 478-485. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jimii.2015.08.005>.
71. Paton, A. y Paton, J. (2005) *Multiplex PCR for direct detection of Shiga toxigenic Escherichia coli strains producing the novel subtilase cytotoxin*. Journal of Clinical Microbiology. 43(3). 2944-2947.
72. Paton, A., Srimanote, P. Talbot, U. Wang, H. y Paton, J. (2004) *A New Family of Potent AB5 Cytotoxins Produced by Shiga Toxigenic Escherichia coli*. The Journal of Experimental Medicine. 200(1). 35-46. doi: <https://doi.org/10.1084/jem.20040392>.
73. Pérez, A. (2018) *Estudio de las propiedades de virulencia en cepas Escherichia. coli Uropatógena*. Tesis de grado (Maestría). Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Facultad de Ciencias. Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas. Posgrado en Microbiología.
74. Quiroz, V. (2022) *Caracterización fenotípica y molecular de cepas clínicas de Escherichia coli uropatogénica productoras de Beta-Lactamasas de espectro extendido*.

Tesis de grado (Licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química.

75. Ramírez, R., Fragoso, C. y Vidales, L. (2020) *Características de patogenicidad en Escherichia coli aislada de tracto intestinal*. Investigación científica. 4. 62-66.
76. Rivera, R. (2018) *Caracterización fenotípica y detección de factores de virulencia de Escherichia coli BLEE positivo aisladas de muestras provenientes de mujeres adultas con infección del tracto urinario del Hospital Manuel Ygnacio Monteros durante el período marzo-agosto 2017*. Tesis de grado (Maestría). Universidad Técnica Particular de Loja. Área Biológica y Biomédica. Ecuador.
77. Riveros, M., García, W., García, C., Durand, D., Mercado, E., Ruiz, J. y Ochoa T. (2017) *Molecular and Phenotypic Characterization of Diarrheagenic Escherichia coli Strains Isolated from Bacteremic Children*. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 97(5). 1329-1336. doi: [10.4269/ajtmh.17-0066](https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0066).
78. Robledo, M. (2017) *Determinación de los principales factores de virulencia y resistencia de Escherichia coli uropatógena en la población del Estado de Aguascalientes y su asociación con la contaminación biológica del río San Pedro*. Tesis de grado (Maestría). Universidad Autónoma de Aguascalientes.
79. Rojas, S., Spooner, V., Duarte, C. y Campos, Y. (2019) *Resistencia antimicrobiana en la infección urinaria por Escherichia coli y su relación con la producción de Beta-Lactamasas de espectro extendido (BLEE)*. Centro de Capacitación Virtual e Investigación. Universidad Americana. 7(2). 23-34.
80. Rubab, M. y Oh, D H. (2020) *Virulence Characteristics and Antibiotic Resistance Profiles of Shiga Toxin-Producing Escherichia coli Isolates from Diverse Sources*. Antibiotics (Basel). Multidisciplinary Digital Publishing Institute. 9(9).587. doi: 10.3390/antibiotics9090587. PMID: 32911679; PMCID: PMC7559023.

81. Santacruz, Y. (2012) *Influencia de la microbiota intestinal en la obesidad*. Tesis de grado (Doctorado). Universidad Politécnica de Valencia Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México.
82. Santos A., Santos, F., Silva, R. y Gomes T. (2020) *Diversity of Hybrid and Hetero-Pathogenic Escherichia coli and Their Potential Implication in More Severe Diseases*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 10.339. doi: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00339>
83. Scheutz, F., Cheasty, T., Woodward, T. y Smith, H. (2004) *Designation of O174 and O175 to temporary O groups OX3 and OX7, and six new E. coli O groups that include Verocytotoxin-producing E. coli (VTEC): O176, O177, O178, O179, O180 and O181*. *AMPIS*. 112(9). 569-584.
84. Scheutz, F., Teel, L., Beutin, L., Piérard, D., Buvens, G., Karch, H., Mellmann, A., Caprioli, A., Tozzoli, R., Morabito, S., Strockbine, N., Melton-Celsa, A., Sanchez, M., Persson, S. y O'Brien, A. (2012) *Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature*. *Journal of Clinical Microbiology*. 50(9). 2951-2963.
85. Schmidt, H., Plaschke, B., Franke, S., Rüssmann, H., Schwarzkopf, A., Heesemann, J. y Karch, H. (1994) *Differentiation in virulence patterns of Escherichia coli possessing eae genes*. *Medical Microbiology and Immunology*. 183(1). 23-31. doi: 10.1007/BF00193628.
86. Sierra, R. (2019) *Serotipificación de Escherichia coli aislados en coprocultivo positivos de niños menores de 5 años atendidos en el Hospital Ramiro Priale Priale*. Tesis de grado (Licenciatura). Universidad Peruana los Andes. Facultad de Ciencias de la Salud. Escuela Académico Profesional de Tecnología Médica. Huancayo, Perú.
87. Sjöling, A., Wiklund, G., Savarino, S., Cohen, D. y Svennerholm, A. (2007) *Comparative analyses of phenotypic and genotypic methods for detection of enterotoxigenic*

- Escherichia coli* toxins and colonization factors. Journal of Clinical Microbiology. 45(10). 3295-3301. doi:10.1128/JCM.00471-07.
88. Staji, H., Khoshgoftar, J., Vayeghan, A., y Bejestani, M. (2016). *Phylogenetic grouping and assessment of virulence genotypes, with antibiotic resistance patterns, of Escherichia coli strains implicated in female urinary tract infections*. International Journal of Enteric Pathogens. 4(1). e31609.
89. Stoppe, N, Silva, J., Carlos, C., Sato, M., Saraiva, A., Ottoboni, L. y Torres, T. (2017) *Worldwide Phylogenetic Group Patterns of Escherichia coli from Commensal Human and Wastewater Treatment Plant Isolates*. Frontiers in Microbiology. 8:2512. doi: 10.3389/fmicb.2017.02512.
90. Tobias, J. y Vutukuru, S. (2012) *Simple and rapid multiplex PCR for identification of the main human diarrheagenic Escherichia coli*, Microbiological Research. 167(9). 564-570. doi: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2011.11.006>.
91. Tsutsuki, H., Zhang, T., Yahiro, K., Ono, K., Fujiwara, Y., Iyoda, S., Wei, F., Monde, K., Seto, K., Ohnishi, M., Oshiumi, H., Akaike, T. y Sawa, T. (2022) *Subtilase cytotoxin from Shiga-toxigenic Escherichia coli impairs the inflammasome and exacerbates enteropathogenic bacterial infection*. iScience. 25(4):104050. doi: <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.104050>.
92. Valdés, J (2016). *Caracterización molecular de la resistencia antimicrobiana y factores de virulencia en E. coli patógenas aisladas de pacientes y de alimentos*. Tesis de grado (Maestría). Universidad Autónoma de Sinaloa. Facultad de Ciencias Químico-Biológicas. Programa Regional de Posgrado en Biotecnología. Maestría en Ciencias en Biotecnología. Culiacán, Sinaloa, México.
93. Vieira, P., Espinoza-Culupú, A., Nepomuceno, R., Alves, M., Lebrun, I., Elias, W. y Ruiz, R (2020) *Secreted autotransporter toxin (Sat) induces cell damage during*

enteroaggregative Escherichia coli infection. PLoS ONE. 15(2). e0228959. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228959>

94. Yazdanpour, Z., Tadjrobehkar, O. y Shahkhah, M. (2020) *Significant association between genes encoding virulence factors with antibiotic resistance and phylogenetic groups in community acquired uropathogenic Escherichia coli* isolates. BMC Microbiology. 20(241). doi: <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01933-1>
95. Yun, K., Kim, D., Kim, W. y Lim, I. (2015) *Molecular typing of uropathogenic Escherichia coli isolated from Korean children with urinary tract infection*. Korean Journal of Pediatrics. 58(1). 20-27. doi: <http://dx.doi.org/10.3345/kjp.2015.58.1.20>