



TONANTZINTLA, PUEBLA, MEXICO

RELACIÓN ENTRE LOS GRUPOS FILOGENÉTICOS Y LAS CARACTERÍSTICAS MICROBIANAS DE *ESCHERICHIA COLI* AISLADA DE INFECCIÓN DE TRACTO URINARIO

Ibarra-Valencia Marco Antonio*¹, Arenas-Hernández Margarita María De La Paz*^{1,2}; Navarro-Ocaña Armando³; Medrano López Abraham⁴; Martínez-Laguna Ygnacio^{1,2}.

¹Licenciatura en Biomedicina, Facultad de Medicina, BUAP. helterbone@gmail.com

²Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, ICUAP-BUAP.

maguie10@gmail.com; igmatine@gmail.com

³Facultad de Medicina, UNAM; México, D.F. arnava@servidor.unam.mx

⁴Instituto de Biotecnología, UNAM. Cuernavaca, México. medlop@ibt.unam.mx

RESUMEN:

Escherichia coli es el principal agente causal de infecciones de tracto urinario (ITU), se clasifica en 4 grupos filogenéticos: A, B1, B2 y D. Los dos primeros asociados a cepas poco virulentas y comensales y los últimos dos con cepas virulentas y extraintestinales. Este trabajo tuvo como objetivo relacionar los grupos filogenéticos de una colección de cepas de *E. coli* con características microbiológicas. A 171 cepas de *E. coli* de pacientes con diferente diagnóstico clínico inicial, se les extrajo ADN genómico, se determinó sus grupos filogenéticos mediante PCR múltiple (PCRm). Estos resultados se analizaron con el expediente clínico y serológico de cada cepa. El 24.6% (29 cepas) de los pacientes tenían diagnóstico de ITU y las demás cepas fueron aisladas de pacientes con un primodiagnóstico diferente a ITU. Se hizo una clasificación filogenética a esta colección de cepas y se analizaron los resultados con sus características serológicas y el cuadro clínico que desarrollaron en el paciente. Los serogrupos más comunes fueron O4 (10.62 %), O6 (8.26 %) y con 5.9 % O2, O25 y O86. Los serotipos más frecuentes fueron: O4:NM (9.44 %), O6:H1 (8.26 %), O1:H6 (4.72 %) y O25:H4 (4.72 %). El grupo más frecuente fue el A (33.12 %), después el grupo D (29.44 %) y el grupo B2 con 22.08 %. De las 29 cepas aisladas de pacientes diagnosticados con ITU, el 12.98 % son grupo A, el 10.62% grupo B2 y un 8.26% son D. 5.9% de las cepas del grupo D causaron sepsis, B2 y A solo participaron con un 2.36% en este evento. La agenesia vaginal favoreció la ITU por D y A con 9.44% y 7.08% respectivamente. Concluimos que aplicar técnicas moleculares para clasificar filogenéticamente a *E. coli* es un método sencillo para obtener información sobre las características patológicas de cada grupo.

1. INTRODUCCIÓN

Las infecciones de tracto urinario son una de las principales causas de muerte a nivel mundial, estas son causadas por microorganismos patógenos que logran invadir y colonizar alguna región de este aparato, ya sean las vías bajas (uretra, vejiga y próstata) o las altas (riñones). El desarrollo de la infección puede ser sintomático o asintomático, con lo que se dificulta su detección y por lo



TONANTZINTLA, PUEBLA, MEXICO

tanto el inicio de un tratamiento adecuado (Barragan *et al.* 2005; Arenas *et al.* 2012; Rendón *et al.* 2012). *E. coli* uropatógena (UPEC) es responsable de más del 80% de las ITUs. La anatomía del aparato genitourinario femenino es un factor que influye en que estas infecciones se desarrollen mayormente en mujeres que en hombres, a esto cabe añadir que entre el 16.8% y el 46% de las ITUs son observadas en pacientes con anomalías del tracto urinario, de las que el reflujo vesicouretral es el más significativo (Díaz *et al.* 2007). En cuanto a los aspectos fenotípicos de UPEC y que favorecen a su virulencia encontramos adhesinas (Afa/Dr), fimbrias (tipo 1, P, S y ecp), sideróforos (Aerobactina y iut) y toxinas (CNF-1 y hemolisina), todos ellos característicos de UPEC (Johnson *et al.* 1988; Slacech *et al.* 2008; Martínez *et al.* 2012).

La serología es otro factor relacionado a las ITUs, ya que cada patotipo de *E. coli*, expresa antígenos O, H y K diferentes. A esto podemos añadir que el 75% de todas las ITUs son causadas por solo 6 grupos O distintos.

E. coli puede ser clasificada en 4 grupos filogenéticos, dos de ellos propios de cepas comensales y poco virulentas (A y B1) y los otros típicos de cepas extraintestinales y virulentas (B2 y D) (Bashir *et al.* 2012). Se ha reportado que las cepas pertenecientes al grupo B2 expresan una mayor cantidad de factores de virulencia (Clermont *et al.* 2008) lo que convierte a las cepas pertenecientes a este grupo, las más frecuentes en casos de cistitis complicada, no complicada y la bacteriuria asintomática complicada (Takahashi *et al.* 2006). Las cepas del grupo D también presentan factores de virulencia de UPEC, lo cual las hace partícipes de las infecciones de tracto urinario aunque con menor frecuencia que el grupo B2. (Clermont *et al.* 2000; Johnson *et al.* 20001). Se ha observado que las cepas O25, pertenecientes al grupo filogenético B2, expresan β -lactamasas de amplio espectro (ESBL por sus siglas en inglés) como las enzimas CTX-M, las cuales han sido descritas en infecciones tanto nosocomiales como comunitarias (Clermont *et al.* 2008)

2. TEORÍA

El uso de marcadores moleculares ha acelerado el proceso diagnóstico de las ITUs, de igual nos brinda información tanto para administrar el tratamiento adecuado y para hacer estudios epidemiológicos (Landgraf *et al.* 2012). Esto es de importancia ya que en tiempos recientes diversas cepas han desarrollado multirresistencia hacia los fármacos usados en su tratamiento, esto por un diagnóstico tardío o un tratamiento inadecuado. Dicha resistencia se ha reportado a nivel mundial, principalmente hacia β -lactámicos (penicilina), aminoglucósidos (amikacina) y cefalosporinas (Cefotaxima, cefalotina y ciprofloxacina). (Aguirre *et al.* 2007; Lautenbach y Polk *et al.* 2007; Mandal *et al.* 2012).

Los serogrupos asociados con UPEC más comunes son O1, O2, O4, O6, O7, O8, O9, O11, O12, O14, O15, O16, O17, O18, O21, O22, O25, O50, O75, O77, O78, O81, O83, O85, y O86. Y de estos los que más se encuentran en UTIs son O1, O2, O4, O6, O17, O25 y O75 (Ananias *et al.* 2008; Molina *et al.* 2011) siendo O25 el más frecuente de todos (Jadhav *et al.* 2011). Se ha encontrado una relación entre el serogrupo y la expresión de ciertos factores de virulencia (Molina *et al.* 2011).



TONANTZINTLA, PUEBLA, MEXICO

Las cepas pertenecientes al grupo filogenético B2, además de ser las más representativas de UPEC, se han asociado con la formación de β -lactamasas. La determinación del grupo filogenético podría ser útil para encontrar una relación entre serogrupos productores de ESBL, como es el caso del serogrupo O25, el cual comparte ciertas características de multiresistencia con otras cepas de distribución mundial, y otros serotipos de mayo impacto mundial, como la clona B2-O25b-ST131-CTX-M-15 (Jadhav *et al.* 2011). En el año 2000 Clermont *et al.* reportaron un método de clasificación filogenética mediante la amplificación por PCR múltiple de los genes *chuA*, *yjaA* y el fragmento TSPE4.C2. Lo cual mejora en costos y tiempo la detección de cepas pertenecientes al grupo B2.

El estudio de las clonas del grupo B2 y en general de los diferentes grupos clonales, nos permitirá entender los mecanismos evolutivos por los que el primer grupo obtuvo la capacidad de virulencia y de resistencia hacia los antibióticos, características que en tiempos recientes, se ha ido manifestando más y más en las cepas pertenecientes al grupo A, Lo cual nos habla de un constante intercambio de material genético por parte de estos microorganismos (Le gall *et al.* 2007). En este trabajo también se pretende asociar los antecedentes clínicos con los grupos filogenéticos y el serotipo.

3. PARTE EXPERIMENTAL

Se usaron 171 cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con diagnóstico de ITU o con sospecha de ITU como una complicación del cuadro clínico inicial. Las cepas fueron obtenidas del departamento de salud pública de la facultad de medicina de la UNAM. Se crecieron en agar LB y se realizó una extracción de DNA cromosomal para hacer la determinación de grupo filogenético mediante PCR múltiple. Se analizaron estos resultados con el expediente clínico y la serología que venían adjuntos.

• Metodología

Crecimiento en agar LB: Se hizo una siembra por estría en Agar Luria Bertani (LB) y se incubó toda la noche, Posteriormente se realizó el protocolo de extracción de DNA cromosomal y se congelaron las muestras para su almacenamiento.

Reacción en cadena de polimerasa múltiple (PCRm): Mediante el protocolo de Clermont se amplificaron los genes *chuA*, *yjaA* y el fragmento TspE4.C2 para hacer la clasificación filogenética de las muestras, la efectividad del protocolo se comprobó usando cepas de EHEC O157:H7, *E. coli* K-12 y CF703 como controles positivos. El PCRm se llevó a cabo en un volumen final de 20 μ L, usando 1X de Buffer, 1.5 mM de $MgCl_2$, 0.5 mM de cada oligonucleótido, 0.2 mM de DNTPs, 1 U/ μ L de Taq Pol y 0.0135 μ g/ μ L de DNA.

Electroforesis en gel de agarosa: Los amplificados de PCRm se corrieron en gel de agarosa al 1.5%, para el corrimiento se usó solución TAE 0.5X. El gel se tiñó en bromuro de etidio y se registró el resultado con un fotodocumentador de luz Ultravioleta.

Análisis de resultados: Los resultados de la clasificación filogenética se analizaron con el expediente clínico y serológico con el que obtuvimos las muestras.



TONANTZINTLA, PUEBLA, MEXICO

4. CONCLUSIONES

Los serogrupos más comunes fueron O4 (10.62 %), O6 (8.26 %) y con 5.9 % O2, O25 y O86.

Los serotipos más frecuentes fueron: O4:NM (9.44 %), O6:H1 (8.26 %), O1:H6 (4.72 %) y O25:H4 (4.72 %).

Tanto los serogrupos como los serotipos encontrados tienen relación con cepas de UPEC.

El grupo filogenético más frecuente fue el A (33.12 %), después el grupo D (29.44 %) y el grupo B2 con 22.08 %.

El 24.6% (29 cepas) de los pacientes tenían diagnóstico de ITU. De estas cepas, el 12.98 % son grupo A, el 10.62% grupo B2 y un 8.26% son D.

5.9% de las cepas del grupo D causaron sepsis, B2 y A solo participaron con un 2.36% en este evento.

La agenesia vaginal favoreció la ITU por D y A con 9.44% y 7.08% respectivamente.

Aunque al grupo filogenético A pertenecen cepas comensales y poco virulentas, este fue el más encontrado durante la investigación.

La virulencia de UPEC no es un factor aleatorio, sino el resultado de la combinación de los elementos adecuados.

Aplicar técnicas moleculares para clasificar filogenéticamente a *E. coli* es un método sencillo para relacionarla con la información sobre las características clínicas de cada grupo e inferir un poco sobre sus características patogénicas.

BIBLIOGRAFÍA

1. A. Barragan, G. Barriga y F. Calderon. Primer consenso nacional de manejo antimicrobiano de infecciones de vías urinarias en el adulto. Boletín del colegio mexicano de urología. 2005; **20** (2): 46-57
2. A. Takahashi, S. Kanamaru, H. Kurazono, Y. Kunishima, T. Tsukamoto, O. Ogawa, et al. *Escherichia coli* Isolates Associated with Uncomplicated and Complicated Cystitis and Asymptomatic Bacteriuria Possess Similar Phylogenies, Virulence Genes, and O-Serogroup Profiles. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Dec. 2006, Vol. 44, No. 12p. 4589–4592.
3. E. Lautenbah y R. Polk. Resistant gram-negative bacilli: Aneglected healthcare crisis?. Am. J. Health-Syst Pharm. 2007. 64.
4. G. Slavchev, E. Pisavera, N. Markova. Virulence of uropathogenic *Escherichia coli*. J. Cult. Collect. **6**. 2008. pp. 3-9.
5. H. Aguirre, A. Plascencia, C. Rivera, M. Guerrero and V. Murillo. Resistencia de *Escherichia coli* en infecciones de vías urinarias en pacientes pediátricos del hospital civil de Guadalajara "Fray Antonio Alcalde". Enf. Inf. y Mic. 2007. **27** (3).
6. J. Johnson, A. Stell, P. Delavari, A. Murray, W. Kuskowski and W. Gaastra. Phylogenetic and pathotypic similarities between *Escherichia coli* isolates from urinary tract infections in dogs and extraintestinal infections in humans. J. Infect. Dsses. 2001. **183**, pp. 897-906.



TONANTZINTLA, PUEBLA, MEXICO

7. J. Johnson, S. Moseley, P. Roberts and W. Stamm. Aerobactin and other virulence factors genes among strains of *Escherichia coli* causing urosepsis: association with patient characteristics. *Inf. Immn.* **56** (2) 1988, pp. 405-412.
8. J. Mandal, S. Acharya, D. Buddhapiya y S. Chandra. Antibiotic resistance pattern among common bacterial uropathogens with a special reference to ciprofloxacin resistant *Escherichia coli*. *INDIAN J MED RES.* 2012. 136. pp 842-849.
9. J. Molina, G. Aparicio, R. Ribas, S. Gavilanes, M. Chávez, R. Hernández, H. Manjares. Drug resistance, serotypes, and phylogenetic groups among uropathogenic *Escherichia coli* including O25-ST131 in Mexico City. *J Infect Dev Ctries*, 2011.
10. M. Ananias, T. Yano. Serogroups and virulence genotypes of *Escherichia coli* isolated from patients with sepsis. *Brazilian J Med Biol Res.* 2008. 41: 877-883.
11. M. Arenas, A. Navarro, T. Molina, J. Martinez, F. Aroche e Y. Martinez. *Escherichia coli* Uropatògena. En modelos de la patogénesis de las enfermedades infecciosas II. R. Rocha, P. Lozano e Y. Martinez. (Eds.) Publicación especial de la Benemèrita Universidad Autónoma de Puebla. Puebla, México. 2012.
12. M. Díaz, B. Acosta, A. Arango, A. Claver, E. Hernández. Microorganismos diferentes a *E. coli* en la infección del tracto urinario neonatal y anomalías del tracto urinario. La Habana. 2007.
13. M. Rendon, A. Reyes, J. Rosas y F. Rodríguez. Infecciones de vías urinarias. Patrón de resistencia *in vivo* de *E. coli* y *E. coli* ESBL a quinolonas, trimetoprima-sulfametoxazol y nitrofurantoina. *Med. Int. Mex.* 2012. **28** (5): 434-439.
14. N. Landgraf, A Berlese., F Freitas, M Lima, R Martinez., A Castelo. El receptor de aerobactina lutA, una proteína aislada en columna de agarosa, no es esencial para la infección por *Escherichia coli* uropatógena. *Rev. Latino-Am. Enfermagem* 20(2):[07 pantallas] mar.-abr. 201
15. O. Clermont, M. Lavollay, S. Vimont, C. Deschamps, C. Forestier, C. Branger, E. Denamur y G. Arlet. The CTX-M-15 producing *Escherichia coli* diffusing clone belongs to a highly virulent B2 phylogenetic subgroup. *J. Ant. Chem.* 2008. **61**, pp. 1024-1028.
16. O. Clermont, S. Bonacorsi and E. Bingen. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl. Env. Microbiol.* 2000. **66** (10) pp. 4555
17. S. Bashir, A. Haque, Y. Sarwar, A. Ali y M. Lifan, Virulence profile of different phylogenetic groups of locally isolated community acquired uropathogenic *E. coli* from Faisalabad region of Pakistan. *An. Clin. Mic Antimic.* 2012. Pp. 11-23.
18. T. Le Gall, O. Clermont, S. Gourious, B. Picard, X. Nassif, E. Denamur and O. Tenailon. Extraintestinal virulence is a coincidental by-product of commensalism in B2 phylogenetic group *Escherichia coli* strains. *Mol. Biol. Evol.* 2007; 24 (11), pp. 2373-84