



# Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Original

## Relación entre factores de virulencia, resistencia a antibióticos y los grupos filogenéticos de *Escherichia coli* uropatógena en dos localidades de México



Laura Iveth Miranda-Estrada<sup>a</sup>, María Ruíz-Rosas<sup>b</sup>, José Molina-López<sup>c,d</sup>, Isela Parra-Rojas<sup>a</sup>, Edgar González-Villalobos<sup>c,d</sup> y Natividad Castro-Alarcón<sup>e,\*</sup>

<sup>a</sup> Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero, Chilpancingo de los Bravo, Guerrero, México

<sup>b</sup> Laboratorio Clínico, Clínica Hospital ISSSTE, Chilpancingo de los Bravo, Guerrero, México

<sup>c</sup> Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana, Departamento de Salud Pública, Facultad de Medicina, UNAM, Ciudad de México, D.F., México

<sup>d</sup> Hospital Infantil de México «Federico Gómez», Secretaría de Salud, Ciudad de México, D.F., México

<sup>e</sup> Laboratorio de Investigación en Microbiología, Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero, Chilpancingo de los Bravo, Guerrero, México

### INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

#### Historia del artículo:

Recibido el 21 de julio de 2015

Aceptado el 18 de febrero de 2016

On-line el 3 de abril de 2016

#### Palabras clave:

*Escherichia coli* uropatógena  
Infección del tracto urinario  
Grupos filogenéticos  
Factores de virulencia  
Resistencia a antibióticos

### R E S U M E N

**Introducción:** *Escherichia coli* es el principal agente causal de infecciones del tracto urinario (ITU), y sus factores de virulencia son los responsables de la gravedad de estas infecciones emergentes. El objetivo de este estudio fue evaluar la relación entre los determinantes de virulencia y susceptibilidad a antibióticos con los grupos filogenéticos de *E. coli* aisladas de ITU en 2 localidades de México.

**Métodos:** Se analizaron 50 aislamientos de *E. coli* de una localidad en el centro del país y 57 provenientes de una localidad al suroeste. Los aislamientos fueron caracterizados fenotípica (serotipificación, ensayos de adherencia, formación de biopelícula, producción de hemolisina y susceptibilidad antibióticos) y genotípicamente (grupos filogenéticos y genes de virulencia).

**Resultados:** Los grupos filogenéticos B2 (60%) y F (12%) fueron significativamente predominantes en la localidad del centro con mayor frecuencia de los genes *fimH* (96%), *iutA* (66%) y *sat* (36%) en comparación con la localidad en el suroeste, donde los grupos A (35%) y B1 (21%) fueron más frecuentes y presentaron menor cantidad de genes de virulencia. El 21,5% del total de aislamientos pertenecieron al grupo O25-ST131. La producción de hemolisina y biopelícula fue significativamente mayor en cepas de la localidad del sureste. La resistencia a ampicilina (92,5%), tetraciclina (76,6%) y trimetoprim/sulfametoxazol (70,1%) fueron las más comunes en ambos grupos.

**Conclusión:** El grupo filogenético, los factores de virulencia y la susceptibilidad a antibióticos de *E. coli* causante de ITU en la comunidad varían significativamente entre las poblaciones mexicanas estudiadas. Los grupos filogenéticos A y B1 pueden ser multirresistentes y tienen la capacidad de producir infecciones urinarias.

© 2016 Elsevier España, S.L.U.

y Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Todos los derechos reservados.

## Relationship between virulence factors, resistance to antibiotics and phylogenetic groups of uropathogenic *Escherichia coli* in two locations in Mexico

### A B S T R A C T

**Introduction:** *Escherichia coli* is the major causative agent of urinary tract infections (UTI), and virulence factors are responsible for the severity of these emerging infections. The aim of this study was to evaluate the relationship between virulence determinants and antibiotic susceptibility with phylogenetic groups of *E. coli* isolates of UTI in two locations in Mexico.

#### Keywords:

Uropathogenic *Escherichia coli*  
Urinary tract infection  
Phylogenetic groups

\* Autor para correspondencia.

Correos electrónicos: natividadcastro24@gmail.com, natycaastro2@hotmail.com (N. Castro-Alarcón).

Virulence factors  
Antibiotic resistance

**Methods:** An analysis was performed on 50 isolates of *E. coli* from the centre of the country and 57 from a town in the southwest. The isolates were characterized by phenotype (serotyping assays, *in vitro* adhesion, biofilm formation, production of haemolysin, and antibiotic susceptibility) and genotype (phylogenetic groups and virulence genes).

**Results:** In the centre of the country location the phylogenetic group B2 (60%) and F (12%) were significantly more prevalent and had a higher frequency of genes, *fimH* (96%), *iutA* (66%), *sat* (36%), compared to the southwest location, where the group A (35%) and B1 (21%) were significantly predominant and had fewer virulence genes. About one-fifth (21.5%) of all isolates belonged to the O25-ST131 group. Haemolysin and biofilm producing strains were significantly higher in the southwest location. Resistance to ampicillin (92.5%), tetracycline (76.6%), and trimethoprim/sulfamethoxazole (70.1%) were the most common in both groups.

**Conclusion:** The phylogenetic group, virulence factors, and antibiotic susceptibility of the *E. coli* that causes UTI in the community, varies significantly among the Mexican populations studied. Phylogenetic groups A and B1 may be multidrug resistant and have the ability to produce UTI.

© 2016 Elsevier España, S.L.U. and Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. All rights reserved.

## Introducción

*Escherichia coli* es el agente causal más común de infecciones en el tracto urinario (ITU), incluyendo cistitis aguda, pielonefritis y urosepsis, los 3 síndromes más comunes y clínicamente distintos. Normalmente, *E. coli* establece una relación simbiótica con su huésped y tiene una función importante en la promoción de la estabilidad de la microbiota normal intestinal<sup>1</sup>. Sin embargo, las infecciones causadas por *E. coli* extraintestinales son la principal causa de morbilidad, mortalidad y altos costos asociados a la salud. Las *E. coli* tienen que adaptarse al medio ambiente del hospedero (vejiga, riñón y torrente sanguíneo) y los factores de virulencia juegan un papel importante en las etapas iniciales de interacción con el hospedero<sup>2</sup>. Los factores de virulencia son principalmente de 2 tipos: los expresados en la superficie celular (que desempeñan funciones de adhesión e invasión de tejidos además de formación de biopelículas e inducción de citosinas) y los producidos dentro de la célula bacteriana y que son exportados al sitio de infección<sup>3</sup>.

Los principales facilitadores de la invasión a células epiteliales de la vejiga son los pili tipo 1, los cuales se expresan en más de un 90% en todos los aislamientos de *E. coli*, incluyendo tanto cepas patógenas como comensales. Los pili tipo 1 están compuestos por repeticiones de subunidades de pilina FimA, la parte distal del pili está formada por 2 adaptadores (proteínas FimF y FimG) y la adhesina unida a manosa FimH. Esta adhesina FimH media la adherencia de la bacteria a una serie de glucoproteínas y epitopes peptídicos no glucosilados en el epitelio de la vejiga que conducen a la internalización de la bacteria, formando comunidades bacterianas intracelulares<sup>4-6</sup>. Mientras que el pili P (pili asociado a pielonefritis) se ha encontrado aproximadamente en el 80% de los aislamientos causantes de ITU altas<sup>7</sup>, las distintas subunidades estructurales de las fimbrias P se encuentran codificadas por el operón pap<sup>8</sup>.

Tres tipos de toxinas son producidas por *E. coli* uropatógenas (UPEC), la  $\alpha$ -hemolisina, el factor citotóxico necrosante tipo 1 (CNF1) y la toxina secretada autotransportadora Sat. La  $\alpha$ -hemolisina (HlyA), también denominada «toxina formadora de poros», se inserta dentro de la membrana celular del huésped provocando lisis celular, facilitando la liberación de hierro y nutrientes que son esenciales para el crecimiento bacteriano<sup>9</sup>. El CNF1 conduce a una activación constitutiva de los miembros de la familia Rho, resultando en el rearrreglo del citoesqueleto de la célula huésped, provocando apoptosis de las células de la vejiga estimulando su exfoliación *in vivo*<sup>10</sup>. La toxina Sat es una serina-proteasa que se encuentra clasificada dentro de la familia de las serina-proteasa autotransportadora de *Enterobacteriaceae* (SPATE), la cual se encuentra predominantemente en cepas de UPEC y se caracteriza por tener efectos citopáticos en riñón y vejiga; esta toxina

puede inducir vacuolización dentro del citoplasma de células uroepiteliales<sup>11</sup>.

En función de las relaciones de similitudes evaluadas mediante técnicas de electroforesis de diferentes enzimas y de secuenciación de sus genes (MLST) se han determinado grupos filogenéticos<sup>12</sup>. Clermont et al.<sup>13</sup> han desarrollado una PCR cuádruple que reconoce 7 grupos filogenéticos (A, B1, B2, C, D, E, F), uno llamado clado 1. Además, hay evidencias de que ciertos serotipos *E. coli* se asocian con ITU: O1, O2, O4, O6, O7, O8, O16, O18, O25 y O75<sup>14,15</sup>.

El manejo clínico de las ITU es complicado debido al incremento en la incidencia de infecciones causadas por cepas de *E. coli* que son resistentes a los antibióticos comúnmente utilizados y son productores de biopelículas. Recientemente, una clona de *E. coli*, O25-ST131, productora de betalactamasas de espectro extendido, multirresistentes y con alta virulencia, ha emergido a nivel mundial como una causa importante de las ITU adquiridas en la comunidad<sup>16</sup>.

A pesar de la identificación de múltiples genes asociados a la virulencia en cepas UPEC, no ha sido posible determinar un perfil de urovirulencia, dado que la mitad de todos los aislamientos de UPEC no contienen ninguno o solo uno de los determinantes de virulencia identificados. El objetivo de este estudio fue evaluar la relación entre determinantes de virulencia (serotipificación, capacidad de adherencia, producción de biofilm y toxinas) y perfil de resistencia con los grupos filogenéticos de *E. coli* en aislamientos de ITU de pacientes ambulatorios en 2 localidades en México.

## Metodología

### Aislamientos bacterianos

Durante el periodo comprendido entre septiembre de 2010 y agosto de 2011 se recuperaron aislamientos clínicos de *E. coli* a partir de muestras de orina de pacientes con ITU adquiridas en la comunidad. Solo se trabajó una cepa por paciente, y fueron de cistitis aguda no complicada (pacientes ambulatorios, mujeres no embarazadas y sin ninguna otra enfermedad concomitante). Los urocultivos fueron procesados por métodos convencionales y se incluyeron las muestras con cuenta viable  $> 10^5$  UFC/ml. Los aislamientos clínicos fueron identificados por el sistema semiautomatizado API20E (Biomérieux) y pruebas bioquímicas. Cincuenta cepas fueron recuperadas de la clínica número 61 del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) y 57 del hospital del ISSSTE en Chilpancingo, Guerrero, ubicados al centro y al suroeste de México, respectivamente.

### Pruebas de susceptibilidad

Las pruebas de susceptibilidad a antibióticos se llevaron a cabo por el método de difusión en disco (Oxoid Ltd, Basingstoke, Reino Unido) siguiendo las indicaciones del *Clinical and Laboratory Standards Institute*<sup>17</sup>. Los aislamientos con resistencia a 3 o más clases de antibióticos fueron considerados multirresistentes (MDR).

### Ensayo de hemolisina

La capacidad hemolítica de los aislamientos fue evaluada por el método propuesto por Scheffer et al.<sup>18</sup> en 1988, con algunas modificaciones. Se obtuvieron cultivos a una concentración de  $6 \times 10^8$  células. Se incubaron 0,1 ml del cultivo con 0,9 ml de una suspensión de eritrocitos de carnero al 2% en *buffer* (20 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris y 140 mM NaCl, pH 7,4) durante 30 min a 37 °C; transcurrido el tiempo, los tubos fueron colocados en hielo y centrifugados. La liberación de hemoglobina fue determinada a 530 nm y los resultados fueron expresados en porcentaje de lisis comparado con los eritrocitos lisados en agua destilada. Se establecieron terciles, clasificando la lisis en baja (> 14,2%), moderada (14,13–23,3%) y alta (> 23,4%).

### Producción de biofilm

La capacidad de formación de biofilm fue determinada por el método cuantitativo en microplacas, descrito por George A. O'Toole en 2011<sup>19</sup>. Las lecturas fueron realizadas a una densidad óptica de 570 nm en un lector de Elisa (Awareness Stat Fax 2100). Para cuantificar el biofilm, se tomó en cuenta la densidad óptica del crecimiento y la del cristal violeta<sup>20</sup>.

### Serotipificación

La determinación de los serogrupos se llevó a cabo en el Laboratorio Patógenos Entéricos del Departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México, con antisueros preparados en dicho laboratorio. Se utilizaron antisueros preparados en conejo contra los 187 antígenos somáticos y 56 sueros monovalentes de antígenos flagelares. Los aislamientos fueron cultivados en agar soya triptícase para el antígeno somático y en medio semisólido de Craige para el antígeno flagelar<sup>21</sup>.

### Ensayos de adherencia

En cada uno de los 24 pozos de la placa se colocó una lenteja de vidrio y las células Vero se colocaron para formar la monocapa (a una concentración de  $2,5 \times 10^5$ ), se colocó 1 ml de volumen final conteniendo medio Mínimo Esencial de Eagle y una suspensión bacteriana de  $2,5 \times 10^8$ . Se incubó a 37 °C durante 3 h, se realizaron 3 lavados con PBS, se fijaron con metanol durante un minuto. Después se tiñeron con Giemsa durante 20 min y se lavaron 3 veces con agua destilada. Se agregó una mezcla acetona/xileno (50/50) durante un minuto. Para observar al microscopio se montaron con resina las lentejas con las células teñidas en un portaobjetos y se observaron a inmersión. Se consideró adhesión positiva cuando se encontró por lo menos el 10% de las células con más de 10 bacterias adheridas.

### Extracción de ADN

Se utilizó el kit InstaGene Matrix™ (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE. UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante.

### Determinación de grupos filogenéticos

Los grupos filogenéticos se determinaron por medio de una PCR múltiple para definir los 7 grupos reconocidos (A, B1, B2, C, D, E, F) y el clado 1, descrita previamente en 2013 por Clermont et al.<sup>13</sup>. Se usó una Taq polimerasa (Life Technologies) y la PCR fue realizada en un termociclador Gene Amp® PCR System 2400 (Applied Biosystems, EE. UU.).

### Detección de genes de virulencia

Se utilizó una PCR múltiple para los genes *hlyA*, *fimH*, *papC*, *iutA*, *cnf1* y una PCR convencional simple para el gen *sat*. Los oligonucleótidos utilizados se muestran en la [tabla 1](#)<sup>22,23</sup>. La mezcla de la reacción múltiple fue de 25 µl, conteniendo 2 µl de ADN, 4 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,08 mM de cada uno de los 4 dNTPs, 0,6 µM de cada oligonucleótido y 2,5 U de Taq polimerasa. Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización por 5 min a 94 °C, 25 ciclos de 30 s a 94 °C, 63 °C/30 s y 68 °C/3 min, y una extensión final a 72 °C/10 min. Para el gen *sat* la mezcla de reacción contuvo 3 µl del *buffer* (10X), 0,9 µl de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 0,6 µl de dNTPs (2 mM), 3 µl (10 µM) de cada oligonucleótido, 0,15 µl de Taq ADN polimerasa (5 U/µl), 3 µl del templado de ADN y 16,35 µl de H<sub>2</sub>O para dar un volumen final de 25 µl. Bajo las siguientes condiciones: desnaturalización por 3 min a 94 °C, 35 ciclos de 1 min a 94 °C, alineamiento a 58 °C 1 min y una extensión final a 72 °C/1 min. Posteriormente se realizó la electroforesis en gel de agarosa (1,5%) a 100 v durante 90 min. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y los amplificados fueron visualizados en un transiluminador ultravioleta.

### Identificación de la clona O25-ST131

El ADN de los aislamientos con serogrupo O25 fue usado para realizar una PCR alelo específica para el gen *pabB* y determinar si las cepas pertenecen a la clona O25-ST131<sup>24</sup>.

### Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el paquete estadístico STATA v.11.0. La distribución de las variables se reportó en base a sus frecuencias de aparición; las comparaciones de la producción de biofilm se realizaron con la prueba U de Mann-Whitney. Para comparar las frecuencias obtenidas de los genes de virulencia, adherencia y hemolisina se utilizó el test de chi cuadrado ( $\chi^2$ ) y la prueba exacta de Fisher según su aplicabilidad. Se consideraron como significativos los valores de  $p \leq 0,05$ .

## Resultados

### Características fenotípicas

Las características fenotípicas evaluadas fueron: capacidad hemolítica, producción de biofilm, adherencia y resistencia antimicrobiana. Los aislamientos en la localidad al suroeste presentaron significativamente mayor capacidad hemolítica y producción de biofilm ( $p < 0,001$ ) en comparación con los aislamientos en la localidad en el centro del país. Los ensayos de adherencia en células Vero en cultivo mostraron que 59 cepas (55,1%) fueron positivas, 43 aislamientos (40,2%) resultaron negativos y 5 aislamientos (4,7%) ocasionaron desprendimiento celular. El patrón de adherencia en general fue de tipo agregativo.

El mayor porcentaje de resistencia se detectó frente a ampicilina (92,5%), tetraciclina (76,6%) y trimetoprim/sulfametoxazol (70,1%); se encontró diferencia estadísticamente significativa en la resistencia a ampicilina, cefotaxima, ceftazidima, ácido nalidíxico,

**Tabla 1**  
Oligonucleótidos para la identificación de factores de virulencia

Gen	Oligonucleótidos	Temperatura de alineamiento	Tamaño del producto amplificado	Referencia
<i>hlyA</i>	5'-AACAAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT-3' 5'-ACCATATAAGCGGTCATTCCCGTCA-3'	63	1.177	22
<i>fimH</i>	5'-TGAGAACGGATAAGCCGTGG-3' 5'-GCAGTACCTGCCCTCCGGTA-3'	63	508	22
<i>papC</i>	5 GTGGCAGTATGAGTAATGACCGTTA-3' 5'-ATATCCTTCTGCAGGGATGCAATA-3'	63	200	22
<i>iutA</i>	5'-GGCTGGACATCATGGGAAGTGG-3' 5'-CGTCCGGAAACGGGTAGAATCG-3'	63	302	22
<i>cfm1</i>	5'-AAGATGGAGTTTCTATGCAGGAG-3' 5'-CATTGAGTCTGCCCTCATTATT-3'	63	498	22
<i>sat</i>	5'-ACTGGCGGACTCATGTGT-3' 5'-AACCTGTAAGAAGACTGAGC-3'	55	387	23

**Tabla 2**  
Características fenotípicas de los aislamientos de *Escherichia coli* en 2 localidades en México

Características	Número (%) de aislamientos			p <sup>a</sup>
	Total n = 107	Suroeste n = 57	Centro n = 50	
<b>Hemólisis (% lisis)</b>				
Bajo	35 (32,7)	7 (12,3)	28 (56)	<b>&lt; 0,001</b>
Moderado	37 (34,6)	30 (52,6)	7 (14)	
Alto	35 (32,7)	20 (35,1)	15 (30)	
Producción de biofilm <sup>c</sup>	1,04 (0,17)	1,4 (0,3)	0,71 (0,15)	<b>&lt; 0,001<sup>b</sup></b>
<b>Adherencia</b>				
Negativa	43 (40,2)	18 (31,6)	25 (50)	0,152
Positiva	59 (55,1)	36 (63,2)	23 (46)	
Desprendimiento celular	5 (4,7)	3 (5,3)	2 (4)	
<b>Resistencia</b>				
Ampicilina	99 (92,5)	49 (86)	50 (100)	<b>0,006</b>
Amoxicilina/Ácido clavulánico	47 (43,9)	24 (42,1)	23 (46)	0,685
Cefuroxima	67 (62,6)	32 (56,1)	35 (70)	0,139
Cefotaxima	61 (57)	14 (24,6)	47 (94)	<b>&lt; 0,001</b>
Ceftriaxona	20 (18,7)	14 (24,6)	6 (12)	0,096
Ceftazidima	61 (57)	14 (24,6)	47 (94)	<b>&lt; 0,001</b>
Cefepima	17 (15,9)	12 (21)	5 (10)	0,119
Amikacina	15 (14)	11 (19,3)	4 (8)	0,093
Tobramicina	30 (28)	16 (28,1)	14 (28)	0,994
Gentamicina	35 (32,7)	23 (40,4)	12 (24)	0,072
Ácido nalidíxico	68 (63,5)	30 (52,6)	38 (76)	<b>0,012</b>
Norfloxacin	49 (45,8)	24 (42,1)	25 (50)	0,413
Ciprofloxacino	49 (45,8)	24 (42,1)	25 (50)	0,413
Ofloxacino	31 (29)	17 (29,8)	14 (28)	0,836
Fosfomicina	9 (8,4)	4 (7)	5 (10)	0,579
Trimetoprim/sulfametoxazol	75 (70,1)	43 (75,4)	32 (64)	0,197
Tetraciclina	82 (76,6)	48 (84,2)	34 (68)	<b>0,048</b>
Nitrofurantoína	14 (13,1)	12 (21,1)	2 (4)	<b>0,009</b>

En negrita, los valores estadísticamente significativos.

<sup>a</sup> Prueba de  $\chi^2$ .

<sup>b</sup> Prueba de U de Mann-Whitney.

<sup>c</sup> Media geométrica (error estándar).

tetraciclina y nitrofurantoína entre las 2 localidades, con mayor resistencia a ampicilina, cefotaxima, ceftazidima y ácido nalidíxico en los aislamientos provenientes de la localidad en el centro del país, en comparación con la localidad al suroeste, que presentó mayor resistencia a tetraciclina y nitrofurantoína (tabla 2).

#### Tipificación serológica

Los resultados serológicos mostraron para el antígeno «O» que de 107 aislamientos analizados, 98 (91,5%) fueron tipificables, 9 (8,4%) fueron no tipificables y 9 aislamientos presentaron un fenotipo rugoso. Los aislamientos tipificables se distribuyeron en 43 serotipos diferentes, entre los cuales el serotipo más frecuente fue el O25:H4, con 23 (21,5%) aislamientos: 9 (15,7%) en la localidad al suroeste y 14 (28%) en la localidad en el centro del país. Para el antígeno «H» se encontró que 70 (65,4%) aislamientos fueron

tipificables, 10 (9,3%) fueron no móviles y 27 aislamientos (25,2%) fueron no tipificables. Se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre serotipo y localidad ( $p=0,002$ ).

#### Grupos filogenéticos

Del total de aislamientos el grupo B2 (42%) fue el más predominante, seguido del grupo A (26,1%). Los grupos A y B1 fueron más prevalentes (35 y 21%, respectivamente) en la localidad al suroeste, en contraste con los grupos filogenéticos B2 y F (60 y 12%, respectivamente), que fueron más frecuentes en la localidad en el centro del país, observándose diferencias estadísticamente significativas en estos grupos filogenéticos. El grupo filogenético E no fue detectado. También se detectó el grupo O25-ST131 con una frecuencia del 21,5%, siendo en su mayoría aislado en la comunidad del centro del país (tabla 3).



**Tabla 3**  
Distribución de los grupos filogenéticos y O25-ST131 en 2 localidades de México

Grupos filogenéticos	Número (%) de aislamientos de <i>E. coli</i>			p
	Total (n=107)	Suroeste (n=57)	Centro (n=50)	
A	28 (26,1)	20 (35)	8 (16)	<b>0,025<sup>a</sup></b>
B1	13 (12,1)	12 (21)	1 (2)	<b>0,002<sup>b</sup></b>
B2	45 (42)	15 (26,3)	30 (60)	<b>&lt; 0,001<sup>a</sup></b>
C	6 (5,6)	4 (7)	2 (4)	0,404 <sup>b</sup>
D	7 (6,5)	5 (8,7)	2 (4)	0,276 <sup>b</sup>
E	0	0	0	0
F	7 (6,5)	1 (1,7)	6 (12)	<b>0,049<sup>b</sup></b>
clado	1 (0,93)	0	1 (2,9)	0,467 <sup>b</sup>
O25-ST131				
Negativos	84 (78,5)	48 (84,2)	36 (72)	0,125 <sup>b</sup>
Positivos	23 (21,5)	9 (15,7)	14 (28)	

En negrita, los valores estadísticamente significativos.

<sup>a</sup> Prueba de  $\chi^2$ .

<sup>b</sup> Prueba exacta de Fisher.

### Genes de virulencia

Los genes de virulencia más frecuentes, independientemente de la localización geográfica, fueron *fimH* (86%), seguido por *iutA* (54,2%) y *sat* (26,2%); 4 aislamientos (3,7%) fueron positivos a los 6 genes evaluados. La figura 1 muestra la distribución de los genes de virulencia entre las cepas UPEC analizadas en las 2 localidades: los 6 genes evaluados fueron encontrados en ambas localidades. La carga de genes fue mayor en los aislamientos en la localidad al centro en comparación con los aislamientos en la localidad del suroeste (U-test,  $p=0,0152$ ). Cabe resaltar que en 8 aislamientos (7,5%) no se encontró ninguno de los 6 genes de virulencia evaluados. En el ensayo de hemólisis todos los aislamientos positivos para *hlyA* presentaron actividad hemolítica.

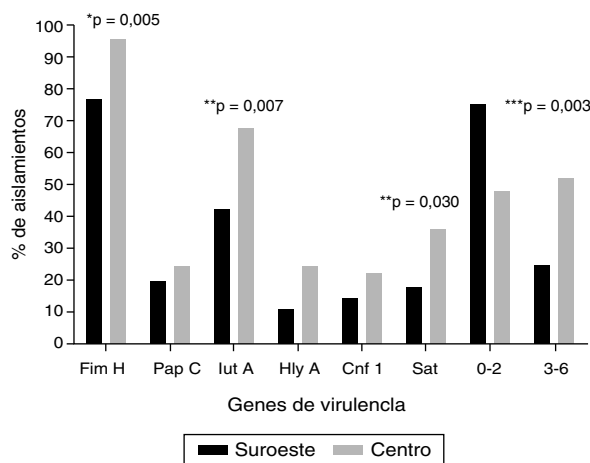
No se encontró asociación entre la presencia de genes de virulencia y la producción de biopelícula (datos no mostrados). Sin embargo, *papC* y *sat* se asociaron de manera significativa con la adherencia a células Vero en cultivo ( $p < 0,001$  y  $p = 0,010$ , respectivamente).

### Factores de virulencia, grupo filogenético y resistencia antimicrobiana

Al correlacionar los determinantes fenotípicos de virulencia con los grupos filogenéticos se encontró mayor producción de hemólisis en los grupos B2 y D (42,2 y 42,8%, respectivamente). Los ensayos de adherencia mostraron que todos los grupos filogenéticos fueron capaces de adherirse a células Vero, a excepción del clado I. Los porcentajes de adherencia fueron mayores al 50% en cada grupo, y en el grupo D esta asociación fue estadísticamente significativa ( $p=0,017$ ).

Del total de aislamientos, 92 (86%) fueron clasificados como MDR; dichos aislamientos pertenecieron a todos los grupos filogenéticos determinados, con frecuencias mayores al 85%. La MDR estuvo asociada significativamente con el grupo filogenético F ( $p=0,056$ ). La producción de biofilm fue clasificada en baja, moderada y alta dependiendo de la densidad óptica. La producción de biofilm alta fue en los grupos filogenéticos A y B1, y la producción de biofilm fue asociada significativamente con el grupo B1 ( $p=0,053$ ). Cabe mencionar que el 86% de los aislamientos productores de biofilm fueron multirresistentes y el serotipo O25:H4 fue el más MDR (tabla 4).

La mayor cantidad de genes de virulencia evaluados pertenecieron al grupo filogenético B2 (tabla 5). El gen *fimH* se distribuyó en todos los grupos. Se encontró mayor frecuencia de los genes *papC* y *sat* en el grupo B2 en comparación con los grupos A/B1. El gen *iutA* fue significativamente más frecuente en el grupo B2 en



**Figura 1.** Frecuencia de genes de virulencia en cepas de *Escherichia coli* uropatógena en 2 localidades en México.

\* Prueba exacta de Fisher.

\*\* Prueba de  $\chi^2$ . Únicamente se muestran los valores de p estadísticamente significativos ( $p \leq 0,05$ ).

\*\*\* Relación entre los grupos que contienen de 0-2 genes y de 3-6 genes de virulencia.

comparación los otros grupos filogenéticos. Los genes *cnf1* y *hlyA* fueron más frecuentes en el grupo B2 en comparación el grupo A, B1, C y D.

La tabla 6 muestra la relación entre resistencia antimicrobiana y genes de virulencia. La frecuencia del gen *fimH* fue significativamente mayor en los aislamientos resistentes a ampicilina, cefotaxima, ceftazidima y tetraciclina en comparación con los aislamientos susceptibles. El gen *iutA* se asoció con la resistencia a amoxicilina/ácido clavulánico, cefotaxima, ceftazidima y ácido nalidíxico. El gen *cnf1* se asoció con la resistencia amoxicilina/ácido clavulánico y a fosfomicina (valores de  $p=0,004$  y  $p=0,029$ , respectivamente). El gen *hlyA* solo se asoció con amoxicilina/ácido clavulánico ( $p=0,033$ ). Cuando se analizó la producción de biofilm con la resistencia antimicrobiana se encontró una diferencia estadísticamente significativa con la resistencia a ampicilina, cefotaxima, ceftazidima y ácido nalidíxico. Al evaluar la resistencia y el grupo filogenético se encontró que los aislamientos pertenecientes al grupo filogenético B2 fueron más resistentes a cefotaxima y ceftazidima ( $p=0,009$ ).

### Discusión

Se ha reportado que las cepas de *E. coli* causantes de ITU pertenecen en su gran mayoría a los grupos filogenéticos B2 y D y poseen

**Tabla 4**  
Relación entre grupo filogenético con el fenotipo de virulencia y multirresistencia en *Escherichia coli* uropatógena

Fenotipos de virulencia	Grupos filogenéticos													
	A	p	B1	p	B2	p	C	p	D	p	F	p	Clado I	p
<i>Hemólisis (% lisis)</i>														
Baja	9 (32,1)		2 (15,3)		15 (33,3)		2 (33,3)		2 (28,5)		4 (57,1)		1 (100)	
Moderada	13 (46,4)	0,221	6 (46,1)	0,424	11 (24,4)	0,107	4 (66,6)	0,162	2 (28,5)	0,895	1 (14,2)	0,299	0 (0)	0,654
Alta	6 (21,4)		5 (38,4)		19 (42,2)		0 (0)		3 (42,8)		2 (28,5)		0 (0)	
<i>Adherencia</i>														
Negativa	14 (50)		3 (23,0)		21 (46,6)		1 (16,6)		1 (19,2)		2 (28,5)		1 (100)	
Positiva	14 (50)	0,329	10 (76,9)	0,315	21 (46,6)	0,323	5 (83,3)	0,551	4 (57,1)	<b>0,017</b>	5 (71,4)	0,785	0 (0)	0,449
DC	0 (0)		0 (0)		3 (6,6)		0 (0)		2 (28,5)		0 (0)		0 (0)	
<i>Resistencia</i>														
No MDR	4 (14,2)		2 (15,3)		6 (13,3)		0 (0)		0 (0)		0 (0)		0 (0)	
MDR	24 (85,7)	0,962	11 (84,6)	0,576	39 (86,6)	0,862	6 (100)	0,395	7 (100)	0,336	7 (100)	<b>0,056</b>	1 (100)	0,860
<i>Producción de biofilm</i>														
Baja	10 (35,7)		1 (7,6)		18 (40)		1 (1,6)		2 (28,5)		4 (57,1)		0 (0)	
Moderada	7 (25,0)	0,578	7 (53,8)	<b>0,053</b> <sup>a</sup>	15 (33,3)	0,356	3 (50)	0,526	1 (14,2)	0,498	2 (28,5)	0,398	0 (0)	1,000
Alta	11 (39,2)		5 (38,4)		12 (26,6)		2 (33,3)		4 (57,1)		1 (14,2)		1 (100)	
<i>Producción de biofilm</i> <sup>b</sup>	1,07 (0,4)	0,983	1,3 (0,3)	0,181	0,9 (0,2)	0,224	1,2 (0,5)	0,625	1,6 (1,2)	0,298	0,7 (0,6)	0,267	1,6 (0)	0,418

DC: desprendimiento celular.

En negrita, los valores estadísticamente significativos.

<sup>a</sup>  $\chi^2$  y exacta de Fisher.<sup>b</sup> Media geométrica (error estándar); valor p calculado con la prueba de Mann-Whitney.**Tabla 5**  
Distribución de genes de virulencia entre los grupos filogenéticos de *Escherichia coli* uropatógena

Genes de virulencia	Número (%) aislamientos				p <sup>a</sup>			
	A/B1 (n=41)	B2 (n=45)	C/D (n=13)	F/clado I (n=8)	A vs B1	A/B1 vs B2	B2 vs C/D	B2 vs F/clado I
<i>papC</i>	2 (4,8)	18 (40)	2 (15,3)	1 (12,5)	0,539	< 0,001	0,091	0,136
<i>iutA</i>	11 (26,8)	38 (84,4)	7 (53,8)	2 (25,0)	0,007	< 0,001	0,020	0,002
<i>CnfI</i>	1 (2,4)	17 (37,7)	0 (0)	1 (12,5)	0,317	< 0,001	0,008	0,163
<i>Sat</i>	3 (7,3)	21 (46,6)	3 (23)	1 (12,5)	0,693	< 0,001	0,114	0,074
<i>hlyA</i>	1 (2,4)	16 (35,5)	0 (0)	1 (12,5)	0,683	< 0,001	0,008	0,194
<i>fimH</i>	32 (78)	41 (91,1)	13 (100)	6 (75)	0,135	0,091	0,265	0,219

<sup>a</sup> Valor de p obtenido con prueba de  $\chi^2$  y exacta de Fisher; se consideró p > 0,050 como estadísticamente significativo.**Tabla 6**  
Relación entre factores de virulencia y resistencia a antimicrobianos

Antibióticos	Factores genotípicos de virulencia (p <sup>a</sup> )						Biofilm <sup>b</sup>
	<i>fimH</i>	<i>papC</i>	<i>iutA</i>	<i>sat</i>	<i>cnfI</i>	<i>hlyA</i>	
Ampicilina	<b>0,047</b>	0,252	0,085	0,329	0,197	0,597	<b>0,019</b>
Amoxicilina/AC	0,741	0,065	<b>0,003</b>	0,101	<b>0,004</b>	<b>0,033</b>	0,595
Fosfomicina	0,793	0,080	0,433	0,433	<b>0,029</b>	0,174	0,174
Cefuroxima	0,169	0,771	0,140	0,832	0,321	0,497	0,597
Cefotaxima	<b>0,046</b>	0,597	<b>0,020</b>	0,365	0,551	0,364	<b>0,009</b>
Ceftriaxona	0,117	0,305	0,283	0,895	0,347	0,081	0,904
Ceftazidima	<b>0,046</b>	0,597	<b>0,020</b>	0,365	0,551	0,364	<b>0,009</b>
Cefepima	0,218	0,824	0,343	0,383	0,647	0,420	0,682
Amikacina	0,472	0,599	0,942	0,962	0,524	0,272	0,260
Tobramicina	0,622	0,416	0,106	0,574	0,705	0,261	0,602
Gentamicina	0,516	0,214	0,991	0,941	0,133	0,086	0,083
Ácido nalidíxico	0,758	0,429	<b>0,004</b>	0,055	0,572	0,190	<b>0,008</b>
Norfloxacin	0,627	0,801	0,180	0,603	0,879	0,900	0,858
Ciprofloxacino	0,627	0,801	0,180	0,603	0,879	0,900	0,858
Ofloxacino	0,688	0,488	0,073	0,667	0,782	0,309	0,888
Trimetoprim/sul	0,366	0,564	0,156	0,857	0,706	0,140	0,139
Tetraciclina	<b>0,021</b>	0,445	0,507	0,778	0,120	0,345	0,355
Nitrofurantoina	0,105	0,161	0,813	0,665	0,240	0,271	0,217

AC: ácido clavulánico; SxT: trimetoprim-sulfametoxazol.

En negrita, los valores estadísticamente significativos.

<sup>a</sup> Prueba de  $\chi^2$ .<sup>b</sup> Prueba de U de Mann-Whitney.

mayor cantidad de determinantes de virulencia en comparación con las cepas consideradas comensales pertenecientes a los grupos filogenéticos A y B1<sup>22</sup>. En nuestro estudio, en la localidad del centro del país la mayoría de los aislamientos pertenecieron al grupo

filogenético B2 (60%) y presentaron mayor cantidad de determinantes de virulencia; en contraste, en la localidad al suroeste del país el grupo filogenético A fue el más frecuente (35%) y presentó menor cantidad de genes de virulencia. También el grupo F fue más

prevalente en la localidad del centro (valor estadísticamente significativo), mientras que el C y el D fueron más prevalentes en el suroeste, aunque no se encontraron diferencias significativas. En un estudio previo realizado en México<sup>25</sup>, donde solo se determinaron 4 grupos filogenéticos, se encontró que la mayoría de los aislamientos asociados con ITU pertenecen al grupo filogenético B2 (55,6%), seguido del grupo A (30,6%). Resultados similares fueron reportados en la región de Faisalabad, en Pakistán<sup>26</sup>: el 50% de los aislamientos de UPEC pertenecieron al grupo B2, seguido de los grupos A y B1 (19%). Nuestros resultados confirman que cepas consideradas comensales (grupos A y B1) pueden ocasionar ITU, y estas cepas pueden adquirir genes de virulencia en el tracto gastrointestinal por transferencia horizontal que les permita colonizar el tracto urinario<sup>12,25</sup>. Además, estudios realizados en cepas comensales y patógenas en diferentes regiones indican que las condiciones geográficas/climáticas, la dieta, el uso de antibióticos y los factores genéticos pueden influir en la flora comensal para adquirir genes de virulencia y volverse potencialmente patógenas<sup>27</sup>.

Se han documentado los mecanismos por medio de los cuales los factores de virulencia promueven el desarrollo de ITU, y el número de genes puede ser proporcional al potencial patógeno<sup>12,28</sup>; los genes *fimH*, *iutA* y *sat* (96, 68 y 36%, respectivamente) fueron más frecuentes en la localidad en el centro, donde el grupo filogenético B fue más predominante. La alta frecuencia del gen de *fimH* indica su importancia en la etapa inicial de la infección, ya que FimH reconoce a los receptores sobre la superficie de las células de la vejiga, facilitando la colonización bacteriana, mientras que *iutA* es el receptor hidroxamato más importante durante la infección que contribuye a la colonización<sup>29,30</sup>.

La toxina Sat es una serina-proteasa que exhibe actividad citopática sobre células HEp-2 y Vero; a nivel renal se ha caracterizado por provocar vacuolización y daño glomerular<sup>28</sup>. PapC es una proteína de membrana externa esencial para la biogénesis del pili P, el cual se ha asociado a pielonefritis por la adherencia de la adhesina PapG a los receptores sobre la célula huésped<sup>8</sup>. En este estudio los genes *sat* y *papC* se asociaron de manera significativa con la adherencia a células Vero, lo cual puede ser indicativo de que estas cepas causen infecciones en vías urinarias altas. El patrón de adherencia observado de manera general fue de tipo agregativo, el cual es característico de *E. coli* enteroagregativa (EAEC). Abe et al.<sup>31</sup> reportaron este fenotipo en el 6,9% de las cepas UPEC adherentes y mencionan que es posible que algunos aislamientos de EAEC causen ITU, por lo que sería importante determinar características de virulencia de patotipos diarreogénicos en cepas UPEC.

Algunos estudios reportan a la  $\alpha$ -hemolisina como la toxina más prevalente<sup>15,32</sup>. La frecuencia de *hlyA* y *cnf1* (16,8 y 17,8%, respectivamente) fue mayor en nuestro estudio en comparación a reportes previos en México realizados por López-Banda et al.<sup>25</sup>, en donde la prevalencia registrada fue del 7,4 y del 6,5%, respectivamente. La frecuencia de aislamientos con un porcentaje de hemólisis alto pertenecieron al grupo filogenético B2, lo que sugiere que la presencia de HlyA podría estar asociada con la severidad de las ITU<sup>28</sup>. La presencia combinada de *papC*, *cnf1* y *hlyA* es evidencia de la isla de patogenicidad IJ96, la cual ya ha sido reportada en cepas de *E. coli* causantes de ITU<sup>33</sup>. En nuestro estudio, la presencia simultánea de *papC*, *cnf1* y *hlyA* fue observada en 9 aislamientos; esta frecuencia es mayor a la reportada en otros países, que va de 2 a 4 aislamientos<sup>25,26,32</sup>.

La resistencia a antibióticos en este estudio fue mayor a lo reportado en México y en otros países<sup>25,32,34,35</sup>. Las diferencias significativas en la resistencia a ampicilina, cefotaxima, ceftazidima y ácido nalidíxico entre las poblaciones estudiadas pueden ser debidas a que en la localidad del centro del país la mayoría de los aislamientos pertenecieron al grupo filogenético B2. El grupo filogenético B se ha relacionado con el grupo O25bST131 (el 21,5% de

los aislamientos MDR pertenecieron a este grupo), el cual ya ha logrado extenderse en México<sup>16</sup>. El grupo O25bST131 se ha asociado con la producción de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (principalmente tipo CTX-M-15) y resistencia a fluoroquinolonas en la comunidad<sup>24,36</sup>. Además, se encontró una asociación estadísticamente significativa de estos 3 antibióticos con la producción de biofilm, lo que sugiere que la adquisición de resistencia a algunos antibióticos puede disminuir la producción de biofilm, como en el caso de la resistencia a cefalosporinas de tercera generación y quinolonas<sup>37,38</sup>. Se ha documentado también que las bacterias formadoras de biofilm presentan un incremento en la resistencia a antimicrobianos y a la cronicidad de la infección, además de estar asociado con ITU recurrentes<sup>39,40</sup>. Los aislamientos en la localidad del suroeste presentaron mayor resistencia a tetraciclina y nitrofurantoína (diferencias estadísticamente significativas) que la del centro del país. En México se ha reportado resistencia a nitrofurantoína del 5,1 y del 7,4%<sup>16,34</sup>. Sin embargo, nosotros encontramos que el 13,1% de los aislamientos fueron resistentes, y este incremento puede estar asociado al uso más frecuente de este antibiótico en la comunidad del sureste.

La resistencia a cefotaxima y ceftazidima puede estar relacionada con la producción de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido, las cuales pueden estar presentes el grupo filogenético A y B1 de la localidad del sureste.

En nuestro estudio la resistencia a quinolonas estuvo asociada con la presencia de genes *iutA* y *sat*; estos determinantes de virulencia han sido reportados en aislamientos resistentes a ácido nalidíxico<sup>32,41</sup>. La resistencia a amoxicilina/ácido clavulánico estuvo asociada con los genes *iutA*, *cnf1* y *hlyA*; estos genes de virulencia han sido reportados en cepas UPEC productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido<sup>36</sup>. Estos resultados reflejan la heterogeneidad en la distribución de genes de virulencia y resistencia a antibióticos entre las cepas UPEC; es importante describir las características que definen a los aislamientos de UPEC dentro de las diferentes poblaciones de estudio.

En conclusión, el grupo filogenético, los factores de virulencia y la susceptibilidad a antibióticos de *E. coli* causante de infecciones del ITU varían significativamente entre las poblaciones mexicanas estudiadas. El grupo filogenético A puede ser multiresistente y tiene la capacidad de producir infecciones urinarias. La MDR está presente en todos grupos filogenéticos, lo que complica y disminuye las opciones terapéuticas en pacientes con ITU en la comunidad.

## Financiación

Este trabajo contó con el apoyo del proyecto financiado en la Convocatoria de Apoyo al Fortalecimiento y Desarrollo de la Infraestructura Científica y Tecnológica 2014, clave 229958. Asimismo se agradece el apoyo económico por parte del CONACYT al proyecto número 166004: «Papel de plásmidos e integrones en la multiresistencia a antimicrobianos en cepas de *Escherichia coli* uropatógena y su posible asociación con la adherencia e invasividad en células cultivadas».

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

## Agradecimientos

Al Laboratorio de Patógenos Entéricos del departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina de la UNAM, por la serotipificación de las cepas.

## Bibliografía

1. Mao B, Chang Y, Scaria J, Chang C, Chou L, Tien N, et al. Identification of *Escherichia coli* genes associated with urinary tract infections. *J Clin Microbiol*. 2011;50:449–56.
2. Narciso A, Nunes F, Amores T, Lito L, Melo-Cristiano J, Duarte A. Persistence of uropathogenic *Escherichia coli* strains in the host for long periods of time: Relationship between phylogenetic groups and virulence factors. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2011;31:1211–7.
3. Emódy L, Kerényi M, Nagy G. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli*. *Int J Antimicrob Agents*. 2003;22:29–33.
4. Dhakal B, Kulesus R, Mulvey M. Mechanisms and consequences of bladder cell invasion by uropathogenic *Escherichia coli*. *Eur J Clin Invest*. 2008;38(S2):2–11.
5. Weichhart T, Haidinger M, Hörl W, Säemann M. Current concepts of molecular defense mechanisms operative during urinary tract infection. *Eur J Clin Invest*. 2008;38(S2):29–38.
6. Rosen DA, Hooton TM, Stamm WE, Humphrey PA, Hultgren SJ. Detection of intracellular bacterial communities in human urinary tract infection. *PLoS Med*. 2007;4:1949–58.
7. Yamamoto S. Molecular epidemiology of uropathogenic *Escherichia coli*. *J Infect Chemother*. 2007;13:68–73.
8. Slavchev G, Pisareva E, Markova N. Virulence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Culture Collections*. 2009;6:61–8.
9. Wiles TJ, Kulesus RR, Mulvey MA. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Exp Mol Pathol*. 2009;85:11–9.
10. Mills M, Meysick KC, Brien AD. Cytotoxic necrotizing factor type 1 of uropathogenic *Escherichia coli* kills cultured human uroepithelial 5637 cells by an apoptotic mechanism. *Infect Immun*. 2000;68:5869–80.
11. Liévin-Le Moal V, Comenge Y, Ruby B, Amsellen R, Nicolas V, Servin AL. Secreted autotransporter toxin (Sat) triggers autophagy in epithelial cells that relies on cell detachment. *Cell Microbiol*. 2011;13:992–1013.
12. Moreno E, Prats G, Planells I, Planes AM, Pérez T, Andreu A. Caracterización de *Escherichia coli* de los grupos filogenéticos A y B1 causantes de infección extraintestinal. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2006;24:483–9.
13. Clermont O, Christenson JK, Denamur E, Gordon DM. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: Improvement of specificity of new phylo-groups. *Environ Microbiol Rep*. 2013;5:58–65.
14. Bidet P, Mahjoub-Messai F, Blanco J, Blanco J, Dehem M, Aujard Y, et al. Combined multilocus sequence typing and O serogrouping distinguishes *Escherichia coli* subtypes associated with infant urosepsis and/or meningitis. *J Infect Dis*. 2007;196:297–303.
15. Ananias M, Yano T. Serogroups and virulence genotypes of *Escherichia coli* isolated from patients with sepsis. *Braz J Med Biol Res*. 2008;41:877–83.
16. Molina L, Aparicio G, Ribas R, Gavilanes S, Manjarrez A. Drug resistance, serotypes, and phylogenetic groups among uropathogenic *Escherichia coli* including O25-ST131 in Mexico City. *J Infect Dev Ctries*. 2011;5:840–9.
17. Clinical and Laboratory Standards Institute. M100-S23. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, approved standard. Wayne: CLSI; 2013.
18. Scheffer J, König W, Braun V. Comparison of four hemolysin-producing organisms (*Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Aeromonas hydrophila*, and *Listeria monocytogenes*) for release of inflammatory mediators from various cells. *J Clin Microbiol*. 1988;26:544–51.
19. O'Toole GA. Microtiter dish biofilm formation assay. *J Vis Exp*. 2011;30, pii: 2437.
20. Gilbert E. Colorimetric method for identifying plant essential oil components that affect biofilm formation and structure. *Appl Environ Microbiol*. 2004;70:6951–6.
21. Orskov F, Birth A, Kanamore M, Svanborg C, O, K, H and fimbrial antigen in *Escherichia coli* serotypes associated with pyelonephritis and cystitis. *Scand J Infect Dis Suppl*. 1982;33:18–25.
22. Stell Adam L. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *J Infect Dis*. 2000;181:261–72.
23. Navia MM, Vila J, Gascón J. Prevalence of *sat* gene among clinical isolates of *Shigella* spp. causing traveler's diarrhea: Geographical and specific differences. *J Clin Microbiol*. 2002;40:1565–6.
24. Dhanji H, Upton M, Gibreel T, Fox A, Mulvey MR, Nordmann P, et al. Rapid detection of the O25b-ST131 clone *Escherichia coli* encompassing the CTX-M-15-producing strains. *J Antimicrob Chemother*. 2009;64:274–7.
25. López-Banda DA, Carrillo-Casas EM, Leyva-Leyva M, Orozco-Hoyuela G, Manjarrez-Hernández AH, Arroyo-Escalante S, et al. Identification of virulence factors genes in *Escherichia coli* isolates from women with urinary tract infection in Mexico. *Biomed Res Int*. 2014;40:1565–6.
26. Bashir S, Haque A, Sarwar Y, Ali A, Anwar MI. Virulence profile of different phylogenetic groups of locally isolated community acquired uropathogenic *E. coli* from Faisalabad region of Pakistan. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2012;11:1–6.
27. Duriez P, Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E, Chaventré A, Elion J, et al. Commensal *Escherichia coli* isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human populations. *Microbiology*. 2001;147:1671–6.
28. Bien J, Sokolova O, Bozko P. Role of uropathogenic *Escherichia coli* virulence factors in development of urinary tract infection and kidney damage. *Int J Nephrol*. 2012;681473, <http://dx.doi.org/10.1155/2012/681473>
29. Chen SL, Hung CS, Pinkner JS, Walker JN, Cusumano CK, Li Z, et al. Positive selection identifies an *in vivo* role for FimH during urinary tract infection in addition to mannose binding. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:22439–44.
30. García EC, Brumbaugh AR, Mobley HLT. Redundancy and specificity of *Escherichia coli* iron acquisition systems during urinary tract infection. *Infect Immun*. 2011;79:1225–35.
31. Abe CM, Salvador FA, Falsetti IN, Vieira MAM, Blanco J, Blanco JE, et al. Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) strains may carry virulence properties of diarrhoeagenic *E. coli*. *Immunol Med Microbiol*. 2008;52:397–406.
32. Oliveira F, Paludo K, Arend LNV, Farah SMSS, Pedroza FO, Souza EM, et al. Virulence characteristics and antimicrobial susceptibility of uropathogenic *Escherichia coli* strains. *Genet Mol Res*. 2011;10:4114–25.
33. Rasko DA, Mobley HL. Defining genomic islands and uropathogen-specific genes in uropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 2007;189:3532–46.
34. Amábile-Cuevas CF. High resistance prevalence towards ampicillin, cotrimoxazole and ciprofloxacin, among uropathogenic *Escherichia coli* isolates in Mexico City. *J Infect Dev Ctries*. 2008;2:350–3.
35. Jadhav S, Hussain A, Devi S, Kumar A, Parveen S, Gandham N, et al. Virulence characteristics and genetic affinities of multiple drug resistant uropathogenic *Escherichia coli* from a semi urban locality in India. *Plos One*. 2011;6:e18063, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0018063>
36. Hussain A, Ewers C, Nandanwar N, Guenther S, Jadjav S, Wieler LH, et al. Multiresistant uropathogenic *Escherichia coli* from a region in India where urinary tract infections are endemic: Genotypic and phenotypic characteristics of sequence type 131 isolates of the CTX-M-15 extended-spectrum-β-lactamase-producing-lineage. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56:6358–65.
37. Natarajan V, Sevanan M. *In vitro* biofilm formation by uropathogenic *Escherichia coli* and their antimicrobial susceptibility pattern. *Asian Pac J Trop Med*. 2012;210–3.
38. Soto SM, Smithson A, Horcajada JP, Martínez JA, Mensa JP, Vila J. Implication of biofilm formation in the persistence of urinary tract infection caused by uropathogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Infect*. 2006;12:1034–6.
39. Vollmerhausen TL, Katouli M. Molecular characterisation of *Escherichia coli* isolated from hospitalised children and adults with urinary tract infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014;33:975–82.
40. Ejmaes K, Stegger M, Reisner A, Ferry S, Monsen T, Holm SE, et al. Characteristics of *Escherichia coli* causing persistence or relapse of urinary tract infections. *Virulence*. 2011;2:528–37.
41. Basu S, Mukherjee SK, Hazra A, Mukherjee M. Molecular characterization of uropathogenic *Escherichia coli*: Nalidixic acid and ciprofloxacin resistance, virulent factors and phylogenetic background. *J Clin Diagn Res*. 2013;7:2727–31.