



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Química  
Maestría en Química Clínica Diagnóstica

**“Identificación molecular de enterobacterias portadoras de genes de virulencia asociados a ExPEC”**

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de  
**Maestra en Química Clínica Diagnóstica**

Presenta  
**QFB. Daniela Jiménez Balderas**

Dirigido por:  
**MIM. David Gustavo García Gutiérrez**

MIM. David Gustavo García Gutiérrez  
Presidente

Dr. Gerardo Manuel Nava Morales  
Secretario

Dra. Karla Isabel Lira De León  
Vocal

Dra. María Carlota García Gutiérrez  
Suplente

M. en C. Alma Delia Bertadillo Jilote  
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.  
Enero 2024  
México



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales  
de Información



Identificación molecular de enterobacterias  
portadoras de genes de virulencia asociados a ExPEC

**por**

Daniela Jiménez Balderas

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons  
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

**Clave RI:** FQMAC-196588



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Química  
Maestría en Química Clínica Diagnóstica

**“Identificación molecular de enterobacterias portadoras de genes de virulencia asociados a ExPEC”**

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de  
**Maestra en Química Clínica Diagnóstica**

Presenta

**QFB. Daniela Jiménez Balderas**

Dirigido por:

**MIM. David Gustavo García Gutiérrez**

MIM. David Gustavo García Gutiérrez  
Presidente

\_\_\_\_\_  
Firma

Dr. Gerardo Manuel Nava Morales  
Secretario

\_\_\_\_\_  
Firma

Dra. Karla Isabel Lira De León  
Vocal

\_\_\_\_\_  
Firma

Dra. María Carlota García Gutiérrez  
Suplente

\_\_\_\_\_  
Firma

M. en C. Alma Delia Bertadillo Jilote  
Suplente

\_\_\_\_\_  
Firma

Centro Universitario, Querétaro, Qro.  
Enero 2024

## Índice general

Índice general	I
Índice de tablas	IV
Índice de figuras	V
Abreviaturas	VI
Resumen	1
Abstract	2
1. Introducción	3
2. Antecedentes	5
2.1 Iniciativa “Una Salud” en infecciones transmitidas por alimentos.	5
2.2 Familia <i>Enterobacteriaceae</i>	5
2.3 <i>Escherichia coli</i>	6
2.4 Clasificación de <i>E. coli</i>	7
2.5 <i>Escherichia coli</i> patógena	8
2.6 <i>Escherichia coli</i> patógena extraintestinal (ExPEC)	9
2.6.1 <i>Escherichia coli</i> Patógena Aviar (APEC).	10
2.7 Factores de virulencia asociados a ExPEC	11
2.8 Genes de virulencia	13
2.8.1 Toxinas	14
2.8.1.1 Hemolisina F ( <i>hlyF</i> )	14
2.8.2 Sistemas de captación de hierro	14
2.8.2.1 Sideroforo salmoquelina ( <i>iroN</i> )	14
2.8.2.2 Receptor de sideróforo aerobactina ( <i>iutA</i> )	14
2.8.3 Protectinas	14
2.8.3.1 Proteína de membrana externa T ( <i>ompT</i> )	15
2.8.3.2 Incremento de supervivencia al suero ( <i>iss</i> )	15

2.9	Genes de virulencia	15
2.10	Islas de patogenicidad	15
2.11	Transferencia de genes de virulencia	16
2.12	ExPEC como causante de zoonosis.	18
2.13	Diagnóstico de cepas ExPEC	19
3.	Objetivos	20
3.1	General	20
3.2	Específicos	20
3.3	Objetivos profesionalizantes	20
4.	Metodología	21
4.1	Aprobación ética	21
4.2	Diseño	21
4.2.1	Definición de variables y unidades de medida	21
4.3	Procedimientos	22
4.3.1	Obtención de muestras	22
4.3.2	Conservación de muestras	22
4.3.3	Resiembra de aislamientos.	22
4.3.4	Extracción de ADN.	22
4.3.5	Implementación de PCR multiplex para la detección de las determinantes genéticas de virulencia.	23
4.3.5.1	Cepas bacterianas de referencia.	23
4.3.5.2	Oligonucleótidos de PCR.	23
4.3.5.3	Preparación de la reacción de amplificación	23
4.3.5.4	Programa de amplificación.	24
4.3.5.5	Análisis de productos de PCR.	24
4.3.6	Identificación taxonómica	24
4.3.6.1	PCR para identificación de <i>E. coli</i>	24
4.3.6.2	Análisis de productos de PCR.	25

4.3.7	Análisis de prevalencia de las determinantes genéticas de virulencia.	25
4.3.7.1	Análisis bioinformático de prevalencia de las determinantes genéticas de virulencia en la familia <i>Enterobacteriaceae</i> .	25
5.	Resultados	27
5.1	Implementación de PCR multiplex para detección de genes de virulencia asociados a ExPEC.	27
5.2	Confirmación de especie <i>Escherichia coli</i> .	30
5.3	Análisis de patrones de genes de virulencia asociados a ExPEC.	31
5.4	Análisis bioinformático de distribución de genes asociados a ExPEC en otras enterobacterias.	31
6.	Discusión	35
7.	Conclusiones	39
8.	Referencias	40
9.	Anexos	44

## Índice de tablas

Tabla 1. Factores de virulencia y gen asociado.	13
Tabla 2. Variables y unidades de medida.	21
Tabla 3. Secuencia de los oligonucleótidos propuestos para cada una de las determinantes genéticas.	23
Tabla 4. Secuencia de los oligonucleótidos usados en este estudio para identificación de <i>E. coli</i> .	24
Tabla 5. Número de acceso específico a cada factor de virulencia.	25
Tabla 6. Número de aislamientos obtenidos de cada tipo de muestra.	28
Tabla 7. Microorganismos reportados para cada factor de virulencia y el nivel de identidad y cobertura de las secuencias proteicas. A) <i>iss</i> , B) <i>hlyF</i> , C) <i>iutA</i> , D) <i>ompT</i> y E) <i>iroN</i> .	32

## Índice de figuras

Figura 1 Clasificación de <i>E. coli</i> .	9
Figura 2 Mecanismos de transferencia de material genético móvil.	17
Figura 3 Transmisión zoonótica de ExPEC.	18
Figura 4. Gel de agarosa al 1.5% que muestra los productos de la reacción de PCR individual para cada gen.	27
Figura 5. Gel de electroforesis PCR multiplex.	28
Figura 6 Número de aislamientos ExPEC de acuerdo con el número de genes de virulencia presentes y el tipo de muestra del que fue obtenido.	29
Figura 7 Porcentaje de distribución de los genes de virulencia en los aislamientos ExPEC.	30
Figura 8. Gel de electroforesis de productos de amplificación dirigida al gen 16S rRNA.	30
Figura 9. Patrones de distribución de genes de virulencia en aislamientos ExPEC.	31
Figura 10 Análisis de bases de datos de presencia de cada determinante de virulencia en otras enterobacterias.	34



## Abreviaturas

<b>APEC</b>	<i>Escherichia coli</i> Patógena Aviar
<b>ColV</b>	Plásmido Colicina V
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>ECA</b>	Antígeno Común de Enterobacterias
<b>ExPEC</b>	<i>Escherichia coli</i> Patógena Extraintestinal
<b>FV</b>	Factores de virulencia
<b>IPEC</b>	<i>Escherichia coli</i> Patógena Intestinal
<b>MLST</b>	Tipificación Multilocus de Secuenciación
<b>MNEC</b>	<i>Escherichia coli</i> asociada a Meningitis Neonatal
<b>PAIs</b>	Islas de Patogenicidad
<b>PCR</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa
<b>UPEC</b>	<i>Escherichia coli</i> uropatógena
<b>SEPEC</b>	<i>Escherichia coli</i> asociada a sepsis

## Resumen

*Escherichia coli* patógena extraintestinal (ExPEC) es un microorganismo que afecta a la salud humana y animal, por lo tanto, es necesario el uso de la estrategia “Una Salud”, para la vigilancia de este tipo de microorganismos. En humanos causa infecciones de tracto urinario, sepsis y meningitis; en animales, afecta principalmente a aves de granja, causando colibaciliosis. La presencia de este tipo de infección en aves puede llevar a la contaminación de los alimentos que se producen en estas granjas, como la carne de pollo y el huevo; y por medio de la cadena alimentaria llegar a infectar a los humanos. La identificación de ExPEC es posible mediante la detección de genes de virulencia previamente descritos. En este trabajo se realizó la búsqueda de cinco determinantes de virulencia (*iutA*, *hlyF*, *iss*, *iroN* y *ompT*), en aislamientos obtenidos de tejidos y lesiones de origen avícola mediante PCR multiplex. Se confirmó como *E. coli* a los 115 aislamientos ExPEC, mediante PCR para el gen 16S rRNA. La prevalencia de cada uno de los genes evaluados fue *iutA* 64.3%, *hlyF* 91.3%, *iroN* 80.9%, *iss* 74.8% y *ompT* 88.7%. Mediante un análisis bioinformático se encontró registros de otras enterobacterias que presentan los factores de virulencia codificados por los genes *iutA*, *hlyF*, *iss*, *iroN* y *ompT*, siendo reportados los géneros *Salmonella*, *Shigella*, *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Citrobacter* principalmente. Con este trabajo resalta la importancia de la detección de microorganismos virulentos, por su capacidad de diseminar sus genes de virulencia a otros microorganismos. Además, del monitoreo de estas cepas con potencial de causar enfermedad en el ámbito avícola y de salud pública.

**Palabras clave:** ExPEC, Factores de virulencia, Familia *Enterobacteriaceae*.

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras.

Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.

## Abstract

Pathogenic extraintestinal *Escherichia coli* (ExPEC) is a microorganism that affects both human and animal health. Therefore, the use of the "One Health" strategy is necessary for the surveillance of this type of microorganism. In humans, it causes urinary tract infections, sepsis, and meningitis, while in animals, it primarily affects in poultry, causing colibacillosis. The presence of this type of infection in chickens can lead to the contamination of food produced on these poultry, such as chicken meat and eggs. Through the food chain, it can also infect humans. The identification of ExPEC is possible through the detection of previously described virulence genes.

In this study, the search for five virulence determinants (*iutA*, *hlyF*, *iss*, *iroN*, and *ompT*) was conducted in isolates obtained from tissues and lesions of avian origin using multiplex PCR. The 115 ExPEC isolates were confirmed as *E. coli* through PCR for the 16S rRNA gene. The prevalence of each of the evaluated genes was as follows: *iutA* 64.3%, *hlyF* 91.3%, *iroN* 80.9%, *iss* 74.8%, and *ompT* 88.7%. Through a bioinformatic analysis, records of other enterobacteria were found to exhibit virulence factors encoded by the genes *iutA*, *hlyF*, *iss*, *iroN*, and *ompT*, with *Salmonella*, *Shigella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, and *Citrobacter* being primarily reported genera. This work highlights the importance of detecting virulent microorganisms due to their ability to disseminate their virulence genes to other microorganisms. Additionally, it emphasizes the monitoring of these strains with the potential to cause disease in the poultry and public health domains.

**Key words:** ExPEC, Virulence Factors, *Enterobacteriaceae* family.

## 1. Introducción

El estudio de las infecciones transmitidas por alimentos de origen animal es un tema de interés de la iniciativa “Una Salud” (Antunes et al., 2020). Mediante el análisis multidisciplinario de todos los factores que interaccionan; microorganismos patógenos, animales, alimentos y el ser humano; se evalúa el impacto a la salud de los animales, al costo de producción de alimentos, a la diseminación de cepas patógenas y a la salud pública (García and Fox, 2021). Se ha reportado a las enterobacterias como un grupo de microorganismos de importancia por su transmisión a través de alimentos de origen animal producidos en granjas (Jørgensen et al., 2019; Riley, 2020). Dentro de esta familia se encuentra *Escherichia coli* Patógena Extraintestinal (ExPEC, por sus siglas en inglés), que ha sido reconocida como el patógeno Gram negativo más común en humanos (Wasiński, 2019). Además, se han hecho estudios que confirman la interacción zoonótica entre los animales de granjas avícolas y el humano, mediante la transmisión de infecciones por cepas ExPEC presentes en productos como carne de pollo y huevo (Mellata et al., 2018). Las infecciones que ExPEC causa en humanos son de tracto urinario, meningitis, y sepsis; las cuales son un gran problema de salud pública a nivel mundial (Sora et al., 2021). Lo anterior, ocasionado por tratarse de cepas muy virulentas y difíciles de tratar, pues presentan alto grado de resistencia a antimicrobianos (Čurová et al., 2020). Debido al problema que representan, es importante hacer la detección de estas cepas, para poder prevenir su diseminación y de esta manera proporcionar un beneficio a la salud pública y veterinaria, permitiendo optimizar la producción en las granjas y evitando que estas cepas patógenas lleguen al consumidor (Sora et al., 2021; Torres, 2017). Una manera de detectar estas cepas se basa en la identificación molecular de genes de virulencia (Johnson & Russo, 2018). Esto fundamentado en la alta prevalencia de ciertos genes en aislamientos patógenos obtenidos de sitios anatómicos extraintestinales. Tal es el caso de los genes de virulencia *iutA*, *hlyF*, *iss*, *iroN* y *ompT*, identificados por Johnson y colaboradores como predominantes en aislamientos ExPEC obtenidos de animales y alimentos provenientes de granjas avícolas, y propusieron a la presencia de estos genes

como criterio predictivo de inclusión al grupo ExPEC (Johnson et al., 2008). De esta manera, los aislamientos que cumplen este criterio, que sean obtenidos de infecciones en humanos, pueden ser indicativo de una transmisión zoonótica (Mitchell et al., 2015). Además, estos genes de virulencia generalmente se encuentran en material genético móvil, con capacidad de transmisión horizontal entre otros microorganismos de diferente género y especie (Balbuena-Alonso et al., 2022). Esto resalta la necesidad del monitoreo de estos genes y los microorganismos que los albergan. Para esto, en el presente trabajo se realizó la detección de las ya mencionadas determinantes de virulencia, en muestras de carne de pollo usando el criterio de consideración de cepa ExPEC a aquellas que tengan 3 o más de los genes, para posteriormente hacer la identificación confirmatoria de *E. coli*. Además, se hizo un análisis bioinformático que permitió encontrar a otros microorganismos de la familia *Enterobacteriaceae* que han sido reportados que expresan los factores de virulencia asociados a los genes evaluados en este estudio.

## **2. Antecedentes**

### **2.1 Iniciativa “Una Salud” en infecciones transmitidas por alimentos.**

La transmisión de microorganismos patógenos que provienen de animales y alimentos de origen animal, es un tema de interés de la iniciativa “Una Salud” (Antunes et al., 2020). Dicho enfoque reconoce que la salud de las personas está estrechamente relacionada con la salud de los animales y el entorno compartido (CDC, 2020). Por lo que, se propone abordar los problemas de salud desde una perspectiva global, que permita entender la interacción que hay entre la salud y la enfermedad entre el humano, animales y la interferencia del ambiente (García and Fox, 2021). La finalidad de este enfoque es que, con la información recolectada por grupos interdisciplinarios sea posible establecer medidas para la prevención y tratamiento de las enfermedades (Torres, 2017). Bajo esta perspectiva, se aborda a las zoonosis, teniendo en cuenta que la mayoría de estas se origina en la cadena de producción de alimentos (Wielinga and Schlundt, 2012). Siendo considerados algunos alimentos como principales vehículos de microorganismos patógenos, como lo son alimentos crudos o poco cocinados de origen animal, tales como carne, carne de aves, huevo, pescado y leche. Las infecciones transmitidas por alimentos provenientes de origen animal generalmente causan síntomas gastrointestinales, sin embargo, también se ha reconocido que los patógenos presentes en alimentos también pueden causar infecciones extraintestinales (Antunes et al., 2020). Tal es el caso de algunos miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, detectados principalmente en Infecciones de Tracto Urinario (ITU) e infecciones de torrente sanguíneo (Riley, 2020).

### **2.2 Familia *Enterobacteriaceae***

La familia *Enterobacteriaceae* es un grupo de microorganismos perteneciente al orden *Enterobacterales*. La conformación de esta familia ha sufrido diversos cambios en los últimos años, gracias a las nuevas herramientas moleculares y estudios filogenéticos. En la actualidad se conforma por 36 géneros válidos. Los

miembros de esta familia presentan varias características comunes. Fenotípicamente son bacilos Gram negativo, son móviles, no forman esporas, son anaerobias facultativas, presentan reacciones bioquímicas oxidasa negativos, nitrato reductasa positivo, fermentación de glucosa positivo, catalasa positivo y presencia de Antígeno Común de Enterobacterias (ECA). Se encuentran ampliamente distribuidas en el ambiente, en el suelo, agua, alimentos como frutos, carne y huevo; tienen como hábitat el tracto gastrointestinal de vertebrados, incluido el humano (Brenner and Framer, 2015). Las enterobacterias son una importante amenaza a la salud, pues es el grupo de microorganismos que mayor impacto causa a nivel de salud pública y veterinaria. Pues como se ha mencionado, se encuentran asociadas a infecciones transmitidas por alimentos e infecciones zoonóticas. Los géneros de esta familia de mayor relevancia por su importancia e impacto económico y a la salud son *Salmonella*, *Citrobacter* y *Escherichia* que afectan a la producción ganadera y de animales de granja. A nivel de salud humana los principales géneros implicado son *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella* y *Escherichia*; que causan diferentes tipos de enfermedades intestinales y extraintestinales, como diarrea, septicemia, enfermedades respiratorias, infecciones de tracto urinario y meningitis. Dentro de los microorganismos pertenecientes a esta familia que se han asociado en mayor medida a la transmisión por alimentos contaminados, se encuentra *Escherichia coli* (Janda and Abbott, 2021; Riley, 2020).

### **2.3 *Escherichia coli***

*Escherichia coli* (*E. coli*) es uno de los microorganismos mayormente estudiados, es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, que en medios de cultivo es capaz de crecer con fuentes de nutrientes simples. De manera tradicional se identifica a *E. coli* por sus características fenotípicas expresadas en las pruebas bioquímicas como indol y rojo de metilo positivos; pruebas de Vogues-Proskauer, citrato y ureasa negativo (Devi et al., 2018). De manera natural se encuentra distribuida en el ambiente y forma parte de la microbiota del intestino de humanos y otros mamíferos. Se ha descrito que para que *E. coli* colonice el intestino debe

encontrarse en el interior de la mucosidad intestinal ya que es ahí donde puede obtener los nutrientes que requiere para crecer, por lo que se describe como una interacción simbiótica, pues se ha encontrado que su colonización tiene un efecto benéfico para la salud del hospedero, al participar en la digestión y síntesis de algunas vitaminas, así como limitando el crecimiento de otros microorganismos que pudieran causar infección, al actuar de manera competitiva por el espacio y los nutrientes que requiere para sus actividades metabólicas (Conway and Cohen, 2015). *E. coli* es un microorganismo muy versátil, pues comprende cepas comensales y patógenas, debido a que presenta variabilidad fenotípica y genotípica, generada principalmente por la transferencia horizontal de material genético y otras modificaciones a su genoma como pérdida de genes, reordenamiento del genoma y mutaciones puntuales (Leimbach et al., 2013).

#### **2.4 Clasificación de *E. coli***

Las cepas de *E. coli* pueden ser clasificadas de acuerdo a varios criterios, estas incluyen a la clasificación por secuencia, serotipo y patotipo. La clasificación por secuencia se basa en el estudio de la distancia genética entre cepas a través del estudio de polimorfismos en determinados genes conservados. Filogenéticamente *E. coli* se clasifica en diferentes grupos A, B1, B2, C, D, E, F y clado 1. Por lo general las cepas no patógenas se encuentran dentro del grupo A y B1. La serotipificación se basa en la variación de los antígenos de superficie O- (polisacárido) y H- (flagelo). Y finalmente la clasificación por patotipos que se fundamenta en la similitud de factores de virulencia que albergan las cepas. Todas estas clasificaciones son de ayuda para entender la epidemiología y patogénesis de una cepa en particular, para poder rastrear la ruta de transmisión en algún brote. Aunque tiene limitantes, pues la variación genética de los microorganismos hace que no siempre se adapten por completo a cierto grupo, y sea imposible clasificarlo dentro de un solo patotipo. Existe una gran diversidad genética de *E. coli*, sin embargo, son indistinguibles fenotípicamente (Robins-Browne et al., 2016; Sarowska et al., 2019).



## 2.5 *Escherichia coli* patógena

Como ha sido descrito, generalmente *E. coli* es un comensal, sin embargo, las cepas capaces de generar enfermedades se han definido como patógenas, y se asocian a infecciones en humanos y animales (Desvaux et al., 2020). El tipo de infecciones que causan algunas cepas de *E. coli* que afectan al tracto intestinal, causan enfermedad entérica, con cuadros sintomáticos variados de diarrea y colitis hemorrágica. Otras cepas de este microorganismo pueden también causar infecciones extra-intestinales, principalmente de tracto urinario e infecciones sistémicas como sepsis o meningitis. En consecuencia, las cepas de *E. coli* patógena pueden ser clasificadas en dos principales grupos: patógenas intestinales y patógenas extraintestinales. La diversidad de esta patogenicidad, está relacionada con la expresión de determinados factores de virulencia, resultando en distintas manifestaciones clínicas (Torres, 2017).

Dicha patogenicidad es provocada por qué tan virulento sea el microorganismo. La virulencia es la propiedad de los microorganismos de producir diversas moléculas que le permiten evadir al sistema inmune del hospedero y causar enfermedad. Las principales moléculas descritas son toxinas, enzimas, exopolisacáridos, estructuras de superficie celular, como cápsulas, lipopolisacáridos, glicoproteínas y lipoproteínas (Leitão, 2020).

La patogenicidad de *E. coli* está dada por la plasticidad en su genoma, que le permite poder integrar material genético portador de factores de virulencia y de resistencia a antimicrobianos, que le dan la capacidad de invadir, colonizar, y evadir al sistema inmune del huésped. Este material genético generalmente se encuentra presente en elementos genéticos móviles; como plásmidos, transposones, bacteriófagos e islas de patogenicidad; que pueden ser transmitidos de manera horizontal entre bacterias relacionadas filogenéticamente o incluso de familias diferentes, y así originar cepas de microorganismos con mayor o menor grado de virulencia. Además, también pueden presentarse mutaciones puntuales o deleciones que pueden contribuir a su virulencia. De esta manera *E. coli* que de manera normal no causa infecciones en individuos inmunocompetentes, ha

logrado evolucionar, al adquirir estos factores de virulencia que le dan la capacidad de adaptarse a los diferentes nichos anatómicos, proliferar, romper el equilibrio en la microbiota normal y así causar infección (Kaper et al., 2004).

Las cepas de *E. coli* que han adquirido las combinaciones de factores de virulencia más exitosas para persistir y sobrevivir han conformado grupos con características específicas capaces de causar patogenicidad, de acuerdo al tipo de infección que causan y a la tipificación genética se ha clasificado a *E. coli* en diferentes grupos llamados patotipos, que se divide de manera general en *E. coli* patógena intestinal (IPEC) y *E. coli* patógena extraintestinal (ExPEC) (Figura 1) (Amer et al., 2020; Kaper et al., 2004).

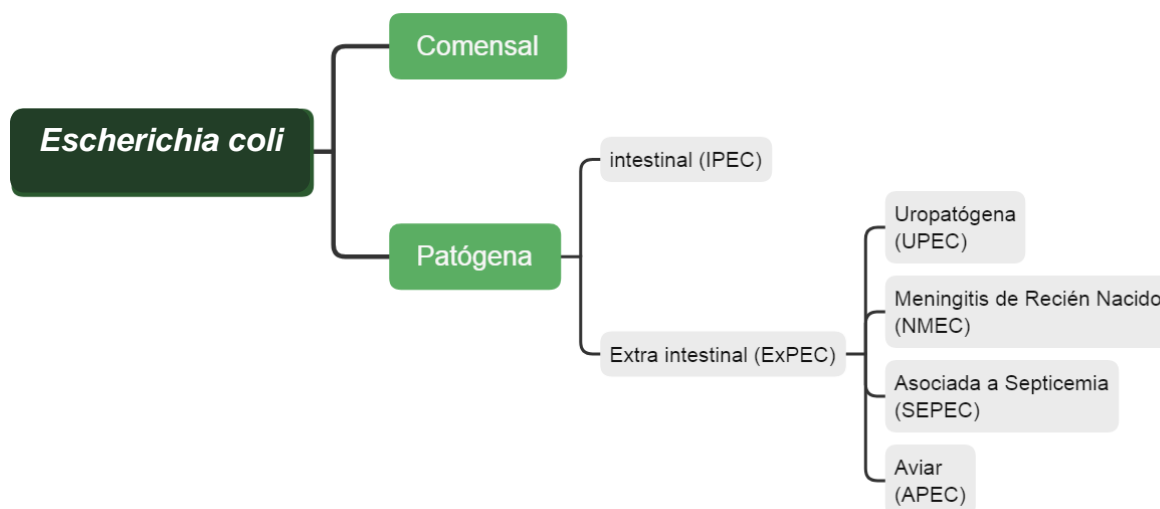


Figura 1 Clasificación de *E. coli*. Fuente propia.

## 2.6 *Escherichia coli* patógena extraintestinal (ExPEC)

ExPEC es un patotipo o subconjunto de cepas de *E. coli*, con especial relevancia e impacto en la salud de animales y humanos (García and Fox, 2021). Generalmente las cepas ExPEC forman parte del grupo filogenético B2, el cual es característico por ser el grupo más diverso, presenta mayor cantidad y variedad de factores de virulencia en comparación con el grupo filogenético A en el cual se encuentran la mayoría de las cepas comensales, por lo que el patotipo ExPEC es un grupo de bacterias muy heterogéneo. Se ha sugerido que las cepas ExPEC evolucionaron a partir de *E. coli* comensal, como ya se ha mencionado, por medio

de la transferencia horizontal de genes de virulencia (Desvaux et al., 2020; Wasiński, 2019). Recientemente ha sido reconocido como el patógeno Gram-negativo más común en humanos (Riley, 2020). Se estima que el 80% de las infecciones de tracto urinario adquiridas en la comunidad y el 50% de las intrahospitalarias son provocadas por este microorganismo. Es el principal microorganismo causante de abscesos, y causa en 30% de las meningitis en recién nacidos. Además, todas las infecciones mencionadas pueden ir acompañadas o resultar en septicemia (Desvaux et al., 2020). Los patotipos pertenecientes a ExPEC descritos en humanos que causan las infecciones mencionadas son UPEC (*E. coli* uropatógena), MNEC (*E. coli* asociada a meningitis neonatal) y SEPEC (*E. coli* asociada a sepsis). UPEC causa cistitis y pielonefritis aguda en el tracto urinario y MNEC está asociado con un alto grado de mortalidad, pues es el microorganismo Gram negativo más frecuente como causante de meningitis en neonatos (Sarowska et al., 2019). Como se ha mencionado, ExPEC representa también una gran amenaza dentro de la salud veterinaria, principalmente causa infecciones en animales de granjas de producción avícola, representando significantes pérdidas económicas debido a la mortalidad y reducción en la producción de aves que resultan afectadas. El patotipo relacionado a este tipo de infecciones es APEC (*E. coli* patógena aviar) (Apostolakos et al., 2021).

### **2.6.1 *Escherichia coli* Patógena Aviar (APEC).**

APEC afecta a aves de granja; incluidos principalmente pollos, pavos y patos; causando infecciones de tracto respiratorio que puede evolucionar a infección generalizada, resultando en lesiones de los órganos internos como perihepatitis, aerosaculitis, pericarditis, peritonitis, salpingitis (inflamación / infección de las trompas de Falopio), onfalitis (infección del saco vitelino del ombligo), celulitis y osteomielitis; todas éstas conocidas comúnmente como colibacilosis aviar (Hu et al., 2022). El impacto de estas infecciones es grande para las industrias avícolas, pues presenta alta morbilidad y una mortalidad arriba de 20% en aves adultas y de 53.3% en pollos jóvenes. Disminuye la producción de carne de pollo en un 2% y de huevo arriba de 20%. Debido a esto se estiman pérdidas económicas de

millones de dólares en todo el mundo. Las aves pueden infectarse a través de alimento, agua, huevos contaminados y transmitirse a otras aves por vía fecal-oral (Kathayat et al., 2021). La patogenicidad de APEC se debe a los mecanismos de virulencia que presenta, que le permiten evadir la respuesta inmune del huésped y colonizarlo. Se ha descrito que APEC comparte determinantes de virulencia con cepas ExPEC que afectan a humanos, es así que se considera ésta una posible relación zoonótica (López et al., 2017).

## **2.7 Factores de virulencia asociados a ExPEC**

La investigación experimental y epidemiológica en cuanto a los factores de virulencia (FV) ExPEC, muestran que un determinado FV no está limitado a un tipo de infección en particular, sino que pueden estar presentes en microorganismos pertenecientes a diferentes patotipos ExPEC, sin embargo, de manera general, los principales factores de virulencia descritos en ExPEC son los productores de adhesinas, como los pilis y proteínas de membrana externa, las cuales le dan capacidades de adherencia a sitios anatómicos a los que normalmente no lo hace, por ejemplo, la uretra. Otros factores de virulencia le dan la capacidad de producir toxinas las cuales pueden afectar procesos celulares fundamentales en el huésped, como señales de transducción, síntesis de proteínas, función mitocondrial, función del citoesqueleto, división celular, secreción de iones, transcripción y apoptosis (Sarowska et al., 2019).

En UPEC se han descrito varios factores de virulencia, por ejemplo, adhesinas, toxinas, sideróforos, transportadores de hierro y fimbrias; responsables de la adhesión a las células epiteliales del intestino, riñones o tracto urinario bajo. Una característica importante de UPEC es su capacidad de multiplicarse en el interior de las células del huésped, se ha descrito que la pérdida de una porción del genoma que produce una fimbria es capaz de producir bacteriuria asintomática, puesto que estas estructuras son las que reconoce el sistema inmune, al estimular la producción de citocinas y de células T, lo que evita que se produzca inflamación (Kaper et al., 2004).

*E. coli* asociada a meningitis tiene la capacidad de sobrevivir en torrente sanguíneo y de invadir las meninges en niños. Los factores de virulencia descritos, son la presencia del antígeno capsular K1, el cual protege a la bacteria de ser fagocitada y le permite diseminarse exitosamente (Sarowska et al., 2019).

APEC está caracterizado por un conjunto específico de genes de virulencia, los cuales le dan la capacidad de generar infección extraintestinal, estos genes son productores de hemolisinas (*hlyF*), colicinas (*CvaC*), proteína sérica de supervivencia incrementada (*iss*), fimbria tipo I (*fimC*), hemaglutinina termosensible (*Tsh*), productores de fimbrias (*papC*), aerobactina (*iucD*), sideróforos (*iutA*), gen del receptor de sideróforos (*iroN*) y proteínas de membrana externa (*ompT*) (Johnson et al., 2008).

Un estudio hecho por Johnson y colaboradores en desde 2008, se ha tomado como estándar, pues en él se reportó que los genes de virulencia más frecuentes encontrados en cepas obtenidas de fuentes extraintestinales fueron *iroN*, *ompT*, *hlyF*, *iss*, y *iutA* (Tabla 1), al estar presentes en la mayoría de aislamientos de APEC evaluados, comparado con los aislamientos IPEC, en donde no fue significativa su presencia. De esta manera, la presencia de dos o más de dichas determinantes genéticas se usan como criterio de mínimos marcadores para establecer que un aislamiento se encuentra dentro del grupo APEC (Johnson et al., 2008).

Esto resulta relevante, puesto que ha sido confirmado que los aislamientos APEC pueden actuar como patógenos zoonóticos mediante la transmisión directa o por alimentos (huevo y carne) y causar infecciones en humanos (Kim et al., 2020). Mellata y colaboradores reportaron en 2018 como estas cepas provenientes de aislamientos APEC eran capaces de causar infección de tracto urinario, meningitis y sepsis en modelos animales de infección extrapolables a humanos. De esta manera se ha establecido la relación zoonótica y la importancia de monitorear estos aislamientos, con el fin de conocerlos e identificarlos adecuadamente (Mellata et al., 2018).

Tabla 1. Factores de virulencia y gen asociado.

Factor de virulencia	Gen asociado	Mecanismo de acción	Referencia
<b>Hemolisina F</b>	<i>hlyF</i>	Aumento en la síntesis de Vesículas de membrana externa.	(Westhuizen et al., 2019)
<b>Receptor del sideróforo salmoquelina</b>	<i>iroN</i>	Captación de hierro, receptor de sideróforo.	(Desvaux et al., 2020)
<b>Receptor de sideróforo aerobactina</b>	<i>iutA</i>	Captación de hierro, receptor de sideróforo.	(Sarowska et al., 2019)
<b>Proteína de membrana externa</b>	<i>ompT</i>	Evasión de sistema inmune.	
<b>Supervivencia al suero incrementada</b>	<i>iss</i>	Protección contra fagocitosis por macrófagos.	

## 2.8 Genes de virulencia

La distribución de estos genes de virulencia usados como marcadores, aunque son genes comunes en las cepas ExPEC, no son exclusivos de éstas. Se han encontrado localizados en el plásmido ColV (Colicina V) y algunos dentro del cromosoma bacteriano. Al ser un elemento de material genético móvil, el plásmido ColV ha sido detectado también en el género *Salmonella*.

Las características de los genes de virulencia de interés, así como su función y distribución se enuncian a continuación.

## **2.8.1 Toxinas**

### **2.8.1.1 Hemolisina F (*hlyF*)**

Algunos microorganismos tienen la capacidad de producir moléculas que les facilitan invadir al hospedero, tal es el caso de la Hemolisina F codificada por el gen *hlyF* (Kathayat et al., 2021). Se ha descrito que la manera en que actúa es mediante un incremento en la síntesis de vesículas de membrana externa, las cuales protegen a las bacterias de la neutralización enzimática del suero (Westhuizen et al., 2019). El plásmido que posee gen se ha encontrado en aislamientos de *Escherichia* y de *Salmonella* (Murase et al., 2016).

### **2.8.2 Sistemas de captación de hierro**

El hierro es esencial para las bacterias, pues es fundamental para varias funciones metabólicas, como lo es el transporte de electrones y de oxígeno. En el organismo de los humanos el hierro se encuentra en complejos moleculares como la transferrina, lactoferrina, ferritina, hemoglobina y mioglobina; por lo que la no se encuentra disponible para que las bacterias puedan captarlo. Sin embargo, debido a esta limitación de hierro, las bacterias han desarrollado sistemas de captura, como lo es la producción de sideróforos, los cuales tienen mayor afinidad por el hierro que los transportadores del hospedero, entonces la bacteria los puede captar a través de receptores específicos (Desvaux et al., 2020). Hay evidencia de la diseminación de genes de transporte de hierro presentes en material genético móvil en *Escherichia*, *Salmonella* y *Shigella* (Mey et al., 2021).

#### **2.8.2.1 Sideroformo salmoquelina (*iroN*)**

El sideroformo salmoquelina ha sido identificado en cepas ExPEC, principalmente de cepas obtenidas de infecciones en tracto urinario (Desvaux et al., 2020).

#### **2.8.2.2 Receptor de sideroformo aerobactina (*iutA*)**

La presencia de este gen de virulencia ha sido reportado principalmente en el género *Echerichia* y *Shigella* (Wyckoff et al., 2009).

## **2.8.3 Protectinas**

Estos factores de virulencia protegen a las bacterias de las condiciones externas que no sean favorables y del sistema inmune del hospedero. Las protectinas son

estructuras, como las cápsulas bacterianas, proteínas de membrana externa y componentes del lipopolisacárido, que impiden que las bacterias sean fagocitadas por los macrófagos y que el efecto bactericida de suero mediado por el complemento sea activado (Kathayat et al., 2021).

#### **2.8.3.1 Proteína de membrana externa T (*ompT*)**

La expresión de este gen de virulencia produce una proteína de membrana, que le da la capacidad a la bacteria de inactivar al péptido antimicrobiano presente en el suero del huésped (Desloges et al., 2019).

#### **2.8.3.2 Incremento de supervivencia al suero (*iss*)**

Dentro de las habilidades que han adquirido algunas cepas ExPEC se encuentra la capacidad de evasión del efecto bactericida del suero del hospedero, lo cual desencadena en la producción de sepsis. Los microorganismos que presentan el gen *iss* (incremento de la supervivencia al suero) se han asociado contundentemente al desarrollo de septicemia con una elevada tasa de letalidad, debido a que se ha descrito que le proporciona capacidad de resistencia al complemento. Sin embargo, el mecanismo específico por el cual tiene esta acción no ha sido completamente descrito. Se ha observado la relación que tiene con la formación de cápsulas bacterianas del grupo 4. Pues en cepas formadoras de este tipo de estructuras a los que se les hizo la delección del gen *iss*, se observó que no eran capaces de formar la cápsula, presentando así completa sensibilidad al suero (Biran et al., 2021).

### **2.9 Genes de virulencia**

#### **2.10 Islas de patogenicidad**

Las Islas de Patogenicidad (PAIs, por sus siglas en inglés) son un grupo de grandes elementos integrativos; mayor a 10 kb; que codifican uno o más genes de virulencia (Desvaux et al., 2020).



## 2.11 Transferencia de genes de virulencia

Los factores de virulencia que ha adquirido *E. coli*, principalmente se encuentran codificados en elementos genéticos móviles. De esta manera, las cepas que adquieren estas características, pueden tener la habilidad de evadir las defensas del huésped y causar infecciones extraintestinales en individuos inmunocompetentes (Johnson & Russo, 2018).

La manera en que los microorganismos obtienen estas características se ha descrito como transferencia horizontal de material genético, de manera que estos genes pueden moverse de una bacteria a otra mediante diferentes mecanismos. Uno de ellos es la conjugación, que requiere contacto entre las células mediante estructuras como pilis. Otro de los mecanismos es la transformación, donde la bacteria ingresa material genético que se encuentra libre en el ambiente. Finalmente, el otro mecanismo descrito es la transducción, que requiere de un bacteriófago para que movilice el material genético de una bacteria a otra (ver figura 2) (Daniel et al., 2020).

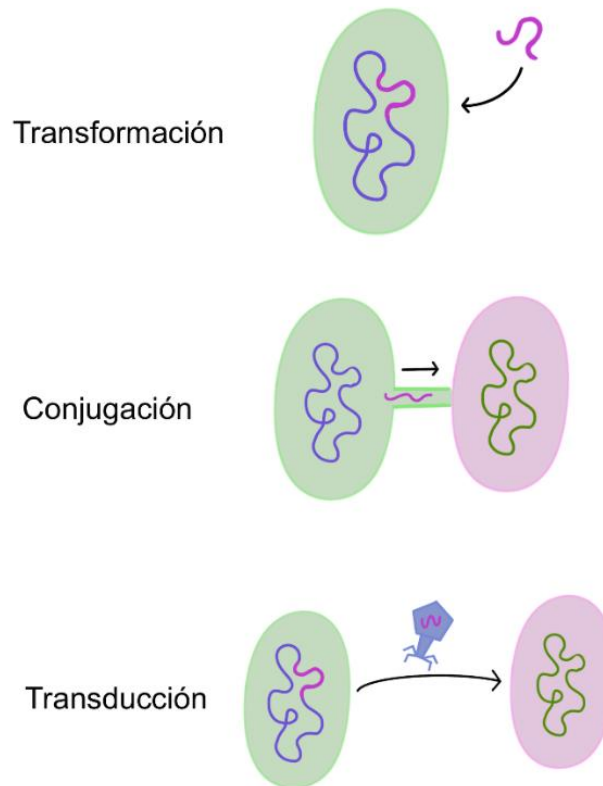


Figura 2 Mecanismos de transferencia de material genético móvil. Fuente propia.

Como ya se ha mencionado, los factores de virulencia pueden encontrarse codificados en varios tipos de material genético. Uno de estos son las islas de patogenicidad (PAIs), que son regiones específicas en el cromosoma bacteriano donde se acumulan genes de virulencia. Otro de los principales tipos de material genético móvil son los plásmidos, los cuales contienen los genes esenciales para su replicación, para su transferencia mediante conjugación, para su estabilidad en la población bacteriana que lo alberga y características de utilidad para su hospedero como factores de virulencia o resistencia a antibióticos (Desvaux et al., 2020; Gama et al., 2020).

Los factores de virulencia causantes de patogenicidad en ExPEC son muy variados y tienen diferentes mecanismos de acción como la producción de adhesinas, toxinas, quelantes de hierro, lipopolisacáridos, generación de cápsulas de polisacáridos e invasinas (Johnson & Russo, 2018; Sarowska et al., 2019).

## 2.12 ExPEC como causante de zoonosis.

Se ha descrito similitud filogenética entre cepas ExPEC provenientes de aves y las que infectan a humanos, presentando factores de patogenicidad similares. Se han realizado estudios que demuestran el potencial zoonótico de cepas APEC, demostrando similitud sobre todo con cepas causantes de infecciones de tracto urinario (UPEC) y meningitis (NMEC) (Hu et al., 2022).

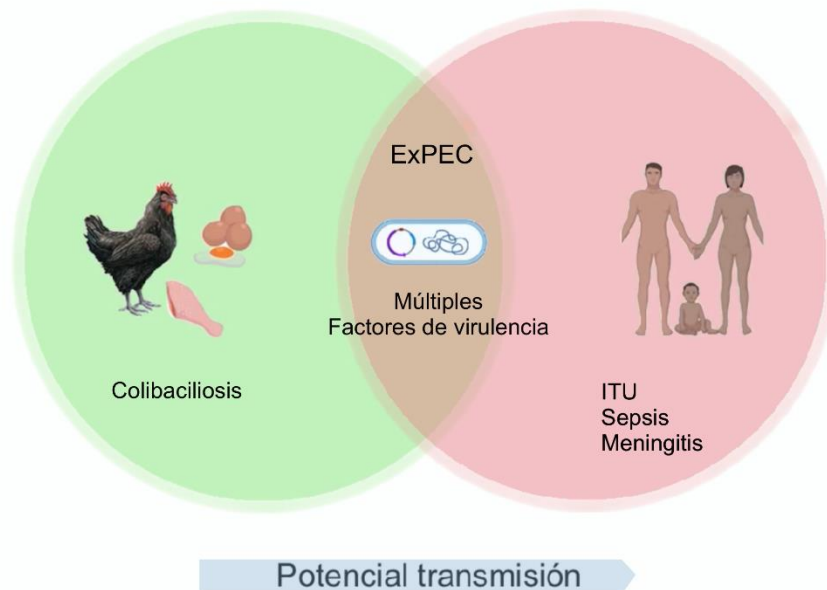


Figura 3 Transmisión zoonótica de ExPEC. Fuente propia.

Con la finalidad de aplicar la iniciativa “Una Salud” en este ámbito, en América Latina se ha formado un grupo multidisciplinario de científicos llamado por sus siglas en inglés LACER (Latin American Coalition for *Escherichia coli* Research), el cual se enfoca en la educación de profesionales de la salud humana, animal y en ámbitos de transmisión de *E. coli* a través de alimentos. También, se encarga de trabajar en la publicación de la información que obtengan de su actividad científica en revistas, conferencias y redes sociales. Además, de mantener programas de vigilancia tanto en el ámbito humano como animal. Y por último, otra actividad a

destacar es el esfuerzo por desarrollar métodos de diagnóstico, terapia y creación de vacunas (Torres, 2017).

### **2.13 Diagnóstico de cepas ExPEC**

Debido a la evidencia publicada de que los genes propuestos como marcadores de cepas ExPEC no son exclusivos de estos microorganismos, es necesario complementar esta búsqueda de genes con otras metodologías que permitan identificar el género bacteriano de los aislamientos. Para fines de seguimiento epidemiológico se ha definido a las cepas ExPEC como aquellas obtenidas de infecciones diagnosticadas de sitios anatómicos extraintestinales y además que se identifiquen como miembro de un linaje bacteriano predominante en causar infecciones extraintestinales, por ejemplo, el grupo clonal de *E. coli* ST131. La identificación de dicho linaje se realiza mediante la técnica de tipificación multilocus de secuencias (MLST). Dicha técnica va enfocada a la búsqueda de genes conservados que puedan hacer más exacta la caracterización de los aislamientos, con esta finalidad también se ha propuesto la secuenciación del gen 16S rRNA, para poder hacer la identificación correcta del género bacteriano.(García and Fox, 2021; Manges et al., 2019).

El estudio de los factores de virulencia, por medio de análisis moleculares, hace posible conocer sus mecanismos de acción, comprender mejor el problema de transmisión de estos factores y la trazabilidad de la evolución de estas cepas (Johnson and Russo, 2018).

En este estudio se evaluará la presencia de los genes *iroN*, *ompT*, *hlyF*, *iss*, y *iutA* en aislamientos provenientes de fuentes extraintestinales, tanto avícolas como clínicas. Además, se confirmará el género del aislamiento mediante secuenciación del gen 16S rRNA. De esta manera, será posible conocer la prevalencia de las enterobacterias que poseen estas variantes genéticas.

### **3. Objetivos**

#### **3.1 General**

Identificar los géneros de los aislamientos pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* que poseen los genes de virulencia asociados a ExPEC (*iutA*, *hlyF*, *iss*, *iroN*, y *ompT*).

#### **3.2 Específicos**

- Implementar el método de detección de las determinantes genéticas de virulencia (*iutA*, *hlyF*, *iss*, *iroN*, y *ompT*) basado en ensayos de PCR multiplex.
- Identificar a través de ensayos taxonómicos moleculares los géneros bacterianos que poseen las determinantes genéticas de virulencia.
- Determinar la prevalencia de los genes *iutA*, *hlyF*, *iss*, *iroN* y *ompT* en los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* identificados.

#### **3.3 Objetivos profesionalizantes**

- Desarrollar habilidades de análisis y planteamiento de proyectos de investigación.
- Conocimiento y aplicación de técnicas moleculares para la detección de determinantes genéticas asociadas a enfermedades infecciosas.

## 4. Metodología

### 4.1 Aprobación ética

El presente estudio fue sometido a evaluación ante el comité de bioética de la Universidad Autónoma de Querétaro, de acuerdo con el proceso de registro vigente (ver anexo 1).

### 4.2 Diseño

El diseño de este proyecto de investigación es de tipo observacional descriptivo.

#### 4.2.1 Definición de variables y unidades de medida

Tabla 2. Variables y unidades de medida.

Variable	Definición	Unidad de medida	Tipo de variable
Aislamientos ExPEC.	Presencia de al menos tres de las determinantes genéticas de virulencia ( <i>iutA</i> , <i>hlyF</i> , <i>iss</i> , <i>iroN</i> , <i>ompT</i> ).	Amplificación de secuencias de genes <i>iutA</i> (302 pb), <i>hlyF</i> (450 pb), <i>iss</i> (323 pb), <i>iroN</i> (553 pb), <i>ompT</i> (496 pb).	Cualitativa nominal
Tipificación de <i>Escherichia coli</i>	Presencia de secuencia específica de especie del gen 16S rRNA de <i>Escherichia coli</i> ,	Amplificación de secuencia específica 16S rRNA <i>E. coli</i> (90 pb).	Cualitativa nominal

### **4.3 Procedimientos**

#### **4.3.1 Obtención de muestras**

Se trabajó con 223 aislamientos obtenidos en el laboratorio de Microbiología Molecular de la Universidad Autónoma de Querétaro a partir de tejidos de pollo, de diferentes lesiones y sitios anatómicos como corazón, médula, hígado, bazo y ovarios. Dichos tejidos se incubaron en agua peptonada por 24 horas a 37 °C. Posteriormente, se sembró en agar EMB y MacConkey mediante la técnica de estriado en placa. Se seleccionaron las colonias que presentaron morfología característica de *E. coli* (colonias rosas por la fermentación de la lactosa) y se resembraron en placas de agar soya tripticaseína para obtener colonias puras.

#### **4.3.2 Conservación de muestras**

Se inoculó una colonia pura en caldo soya tripticaseína con glicerol al 20% (v/v) y se almacenó a -20°C hasta su uso.

#### **4.3.3 Resiembra de aislamientos.**

Los aislamientos fueron activados a partir de caldo BHI/glicerol 20%, que se encontraban en conservación, a partir del cual se inoculó en caldo LB, con posterior incubación a 37 °C, durante 24 horas.

#### **4.3.4 Extracción de ADN.**

La extracción del ADN se realizó a partir de los medios LB inoculados, mediante el uso del kit comercial Kit Quick DNA Miniprep para aislamientos bacterianos (Zymo Research), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Posteriormente se verificó la pureza del material genético obtenido, mediante la medición de las absorbancias en las relaciones de las longitudes de onda a 260/280 y 260/230, con el uso del NanoDrop y se evaluó la integridad del material genético obtenido mediante una electroforesis en gel.

#### 4.3.5 Implementación de PCR multiplex para la detección de los determinantes genéticos de virulencia.

Se hizo la clasificación de ExPEC mediante la realización de la PCR multiplex reportada por Johnson y colaboradores para la detección de las 5 determinantes de virulencia, bajo las siguientes condiciones de reacción.

##### 4.3.5.1 Cepas bacterianas de referencia.

Las pruebas de PCR fueron realizadas en conjunto con las cepas de control interno (21-7069, 21-535, 21-537) del Laboratorio de Microbiología Molecular de la Universidad Autónoma de Querétaro.

##### 4.3.5.2 Oligonucleótidos de PCR.

En la tabla 3 se muestran los oligonucleótidos propuestos para el análisis de los determinantes de virulencia y el tamaño de amplicón esperado.

Tabla 3. Secuencia de los oligonucleótidos propuestos para cada una de las determinantes genéticas.

Gen blanco	Secuencia (5'-3')	Tamaño de amplicón
<i>iroN</i>	F-AATCCGGCAAAGAGACGAACCGCCT TCGGGCAACCCCTGCTTTGACTTT	553 pb
<i>ompT</i>	F-TCATCCCGGAAGCCTCCCTCACTACTAT R- TAGCGTTTGCTGCACTGGCTTCTGATAC	496 pb
<i>hlyF</i>	F- GGCCACAGTCGTTTAGGGTGCTTACC R-GGCGGTTTAGGCATTCCGATACTCAG	450 pb
<i>iss</i>	F-GGCCACAGTCGTTTAGGGTGCTTACC R-GGCGGTTTAGGCATTCCGATACTCAG	323 pb
<i>iutA</i>	F-GGCTGGACATCATGGGAAGTGG R-CGTCGGGAACGGGTAGAATCG	302 pb

##### 4.3.5.3 Preparación de la reacción de amplificación

Se elaboraron dos mezclas de reacción para una PCR múltiple para los genes *iroN*, *iutA*, y *hlyF*; y la segunda mezcla de reacción para los genes *OmpT* e *iss*.

Todas las reacciones de PCR fueron preparadas con un volumen total de 17  $\mu$ L para cada muestra, compuesto por 1.7  $\mu$ L de 10X PCR Buffer, 0.34  $\mu$ L de dNTP 10 mM, 0.09  $\mu$ L de Taq polimerasa (Taq Dream, Termofisher, 5 U/ $\mu$ L), 0.68  $\mu$ L de



cada oligonucleótido (10 5  $\mu\text{M}$ ), 2  $\mu\text{L}$  de ADN (5  $\text{ng}/\mu\text{L}$ ) y el volumen restante de agua grado molecular.

#### 4.3.5.4 Programa de amplificación.

Se realizó la amplificación con la siguiente programación: 95°C por 1 minuto; 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 63°C por 30 segundos, 72°C por 3 minutos; un ciclo final de 72°C por 2 minutos.

#### 4.3.5.5 Análisis de productos de PCR.

Las muestras amplificadas se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%, en buffer TBE 1x a temperatura ambiente. A 80 V por 30 minutos. Los pozos del gel fueron cargados con 5  $\mu\text{L}$  del producto de PCR y 2  $\mu\text{L}$  de buffer de carga/bromuro de etidio, usando un marcador de talla molecular de 1kb. El gel fue observado usando un transiluminador, fue fotografiado y analizado y se registraron los resultados de presencia o ausencia de amplificación de cada gen en los aislamientos evaluados.

#### 4.3.6 Identificación taxonómica

##### 4.3.6.1 PCR para identificación de *E. coli*

Se realizó PCR de punto final para el gen *16S rRNA* específica para *Escherichia coli*, usando oligonucleótidos previamente descritos (Silkie and Nelson, 2009).

Tabla 4. Secuencia de los oligonucleótidos usados en este estudio para identificación de *E. coli*.

Gen blanco	Secuencia (5´-3´)	Tamaño de amplicón
<i>16S rRNA - E. coli</i>	F- CAT GCC GCG TGT ATG AAG AA R- GGG TAA CGT CAA TGA GCA AAG G	90 pb

Se preparó la mezcla de reacción de acuerdo con las siguientes condiciones: 1.7  $\mu\text{L}$  de 10X PCR Buffer, 0.34  $\mu\text{L}$  de dNTP 10 mM, 0.09  $\mu\text{L}$  de Taq polimerasa (Taq Dream, Termofisher, 5 U/ $\mu\text{L}$ ), 0.68  $\mu\text{L}$  de cada oligonucleótido (10 5  $\mu\text{M}$ ), 2  $\mu\text{L}$  de ADN (5  $\text{ng}/\mu\text{L}$ ) y el volumen restante para 17  $\mu\text{L}$  de agua grado molecular.

Se realizó la amplificación mediante el siguiente programa: 94°C por 1 minuto; 35 ciclos de 94°C por 45 segundos, 58°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos; un ciclo final de 72°C por 5 minutos.

#### **4.3.6.2 Análisis de productos de PCR.**

Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%, en buffer TBE 1x a temperatura ambiente. A 80 V por 30 minutos. Los pozos del gel fueron cargados con 5 µL del producto de PCR y 2 µL de buffer de carga/bromuro de etidio, usando un marcador de talla molecular de 1kb. El gel fue observado usando un transiluminador, fue fotografiado y analizado y se registraron los resultados de presencia o ausencia de amplificación de la secuencia específica del gen *16S rRNA* de *E. coli*.

#### **4.3.7 Análisis de prevalencia de las determinantes genéticas de virulencia.**

Se analizó la frecuencia en porcentaje de cada una de las determinantes genéticas encontradas en los aislamientos de la familia *Enterobacteriaceae* identificados.

##### **4.3.7.1 Análisis bioinformático de prevalencia de las determinantes genéticas de virulencia en la familia *Enterobacteriaceae*.**

Se analizó la presencia de los factores de virulencia en otros géneros de la familia *Enterobacteriaceae*, a partir de la identificación bioinformática de la secuencia de aminoácidos que conforma a las proteínas de cada factor de virulencia y su presencia en diferentes géneros de la familia. En la Tabla 5 se muestra el número de acceso utilizado para el análisis de cada proteína correspondiente al factor de virulencia codificado por los genes asociados a ExPEC.

Tabla 5. Número de acceso específico a cada factor de virulencia.

Nombre del gen	Factor de virulencia	Número de acceso
<i>iroN</i>	Receptor de enterobactina	AAN76093
<i>ompT</i>	Proteasa de membrana externa	P58603
<i>hlyF</i>	Hemolisina	AAO49613
<i>Iss</i>	Proteína de supervivencia al suero	AAD41540
<i>iutA</i>	Receptor de aerobactina	CAE55774

Cada número de acceso fue ingresado en la página del repositorio central Uniprot (<https://www.uniprot.org/>) para obtener la secuencia de aminoácidos registrada para cada factor de virulencia, la secuencia proteica fue sometida a emparejamiento con la herramienta en línea BLAST® blastp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), excluyendo en los resultados a *Escherichia coli* y seleccionando un máximo de secuencias para mostrar de 100. Una vez realizada la búsqueda se filtraron resultados con un porcentaje de identidad mayor al 85%, y un nivel de cobertura mayor al 90%. Se identificó a los géneros bacterianos pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* que se han descrito con la presencia de estos factores de virulencia, evaluando la presencia de cada género y su porcentaje de similitud.

## 5. Resultados

### 5.1 Implementación de PCR multiplex para detección de genes de virulencia asociados a ExPEC.

Para la implementación de la prueba de PCR para la identificación de las determinantes genéticas de virulencia, se realizaron pruebas de las condiciones de PCR para la amplificación de cada gen, usando muestras con presencia de los genes de interés previamente identificados, usadas como muestras de referencia interna del Laboratorio de Microbiología molecular. En la Figura 4 se muestra el gel de electroforesis donde se revelaron los productos de reacción de PCR individual para cada uno de los genes de virulencia.

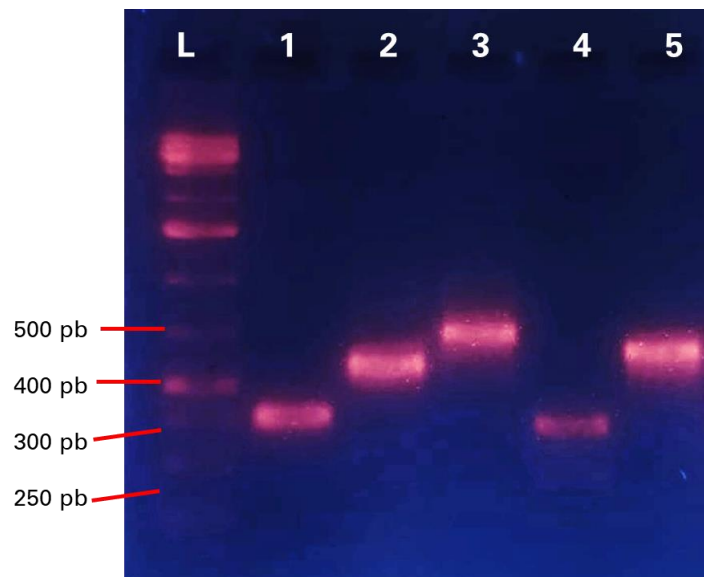


Figura 4. Gel de agarosa al 1.5% que muestra los productos de la reacción de PCR individual para cada gen. Carril L, marcador de talla molecular; 1) reacción para gen *iss* (323 pb); 2) *hlyF* (450 pb); 3) *iroN* (553 pb); 4) *iutA* (302 pb) y 5) *OmpT* (496 pb).

Una vez realizadas las pruebas de PCR para las determinantes genéticas de virulencia, se procedió a proponer el uso de la PCR multiplex para el análisis de las muestras. Se determinó hacer una reacción múltiple para el gen *iss* y *ompT*, y otra reacción múltiple para *hlyF*, *iroN* e *iutA*. Se sometió a los 223 aislamientos a dichas reacciones de PCR. En la Figura 5 se muestra la imagen de la

electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%, de los productos de ambas reacciones de PCR, en la parte superior la reacción para los genes (*hlyF*, 450 pb; *iroN* 553 pb e *iutA*, 302 pb) y en la parte inferior para los genes (*iss* 323 pb y *ompT*, 496 pb).

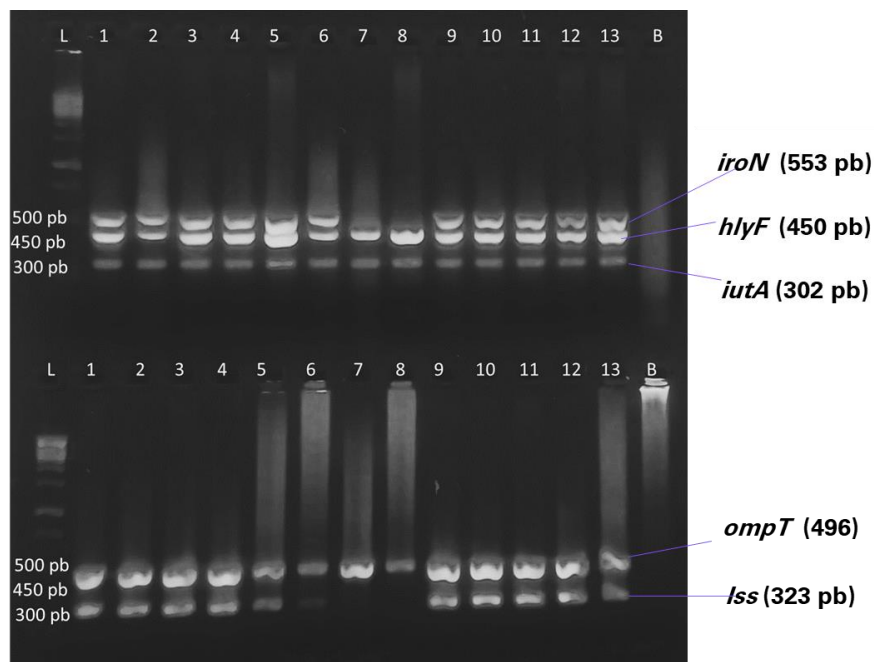


Figura 5. Gel de electroforesis PCR multiplex.

Carril L, marcador de talla molecular; carril 1-13, muestras evaluadas; carril B, blanco.

Se utilizó el criterio de considerar a los aislamientos como ExPEC a aquellos que presentaron 3 o más de los genes de virulencia, de esta manera resultó en 115 aislamientos ExPEC. Estos 115 aislamientos fueron obtenidos de diversos tejidos y lesiones de pollos de granja, en la tabla 6 se muestra la distribución de tipo de muestra.

Tabla 6. Número de aislamientos obtenidos de cada tipo de muestra.

Tipo de muestra	Número de aislamientos (n: 115)
Lesión	41
Corazón	17
Médula	12
Hígado	9
Bazo	7
Ovario- Testículo	8

Pulmón	5
Duodeno	3
Intestino Delgado	3
Riñón	3
Tráquea	3
Íleon	2
Tonsila Cecal	2

De los 115 aislamientos catalogados como ExPEC, 31 presentaron 3 de los genes de virulencia, 53 presentaron 4 genes de virulencia y 31 aislamientos presentaron todos los genes. En la Figura 6 se muestra el número de aislamientos que presentaron 3, 4 o 5 genes de virulencia y la distribución del tipo de muestra del que fueron obtenidos los aislamientos.

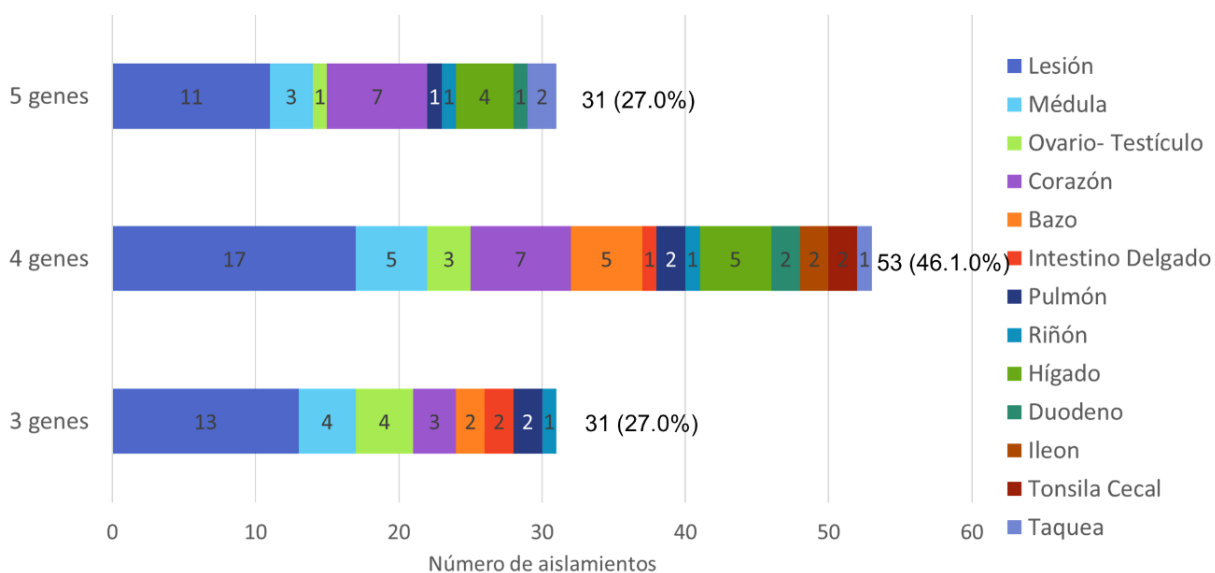


Figura 6 Número de aislamientos ExPEC de acuerdo con el número de genes de virulencia presentes y el tipo de muestra del que fue obtenido.

Del total de aislamientos catalogados como ExPEC, por presentar 3 o más de los genes evaluados, 93 (80.9%) presentaron el gen *iroN*, 105 (91.3%) el gen *hlyF*, 74 (64.3%) el gen *iutA*, 102 (88.7%) el gen *ompT* y 86 (74.8%) el gen *iss.*, como se muestra en la Figura 7.

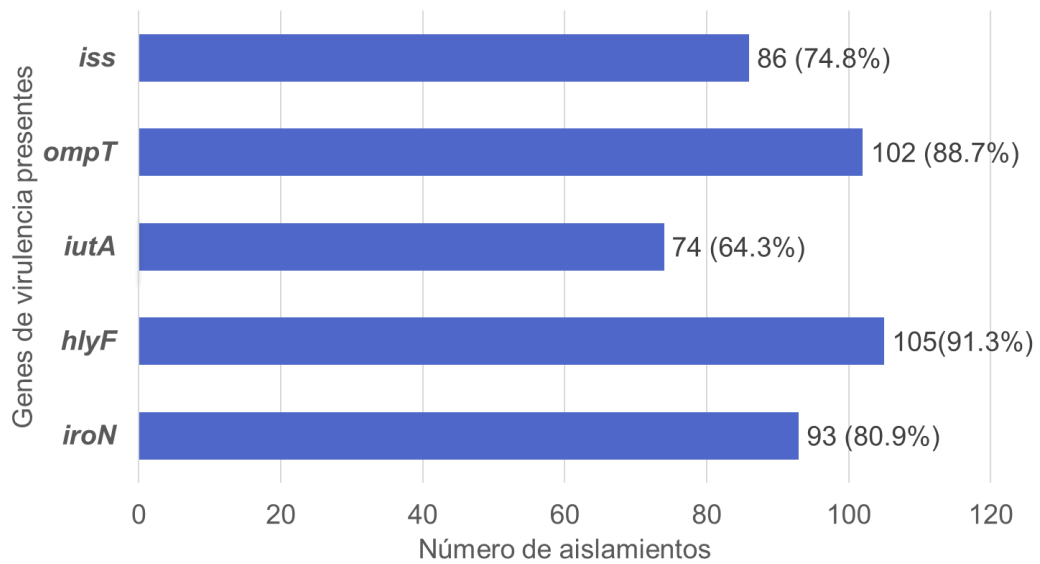


Figura 7 Porcentaje de distribución de los genes de virulencia en los aislamientos ExPEC.

## 5.2 Confirmación de especie *Escherichia coli*.

Se realizó la confirmación de género y especie de los 115 aislamientos ExPEC, por medio de la PCR específica para el gen *16S rRNA*, y se visualizó la presencia de amplificación en un gel de electroforesis al 1.5% (Figura 8), en donde las 115 muestras presentaron el amplicón a 90 pb.

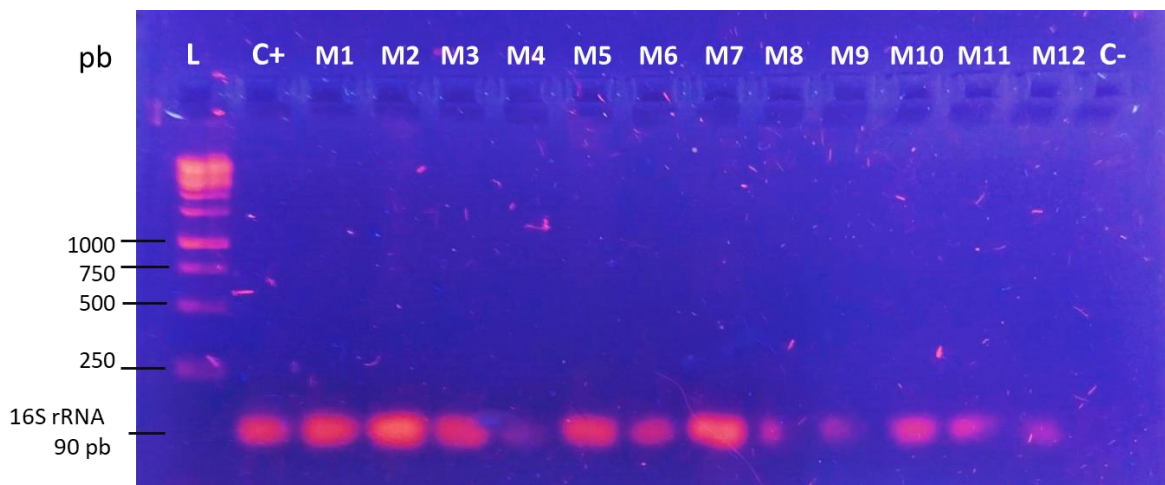


Figura 8. Gel de electroforesis de productos de amplificación dirigida al gen *16S rRNA*, L: marcador de talla molecular, C+: cepa de control interno, M1-M12: muestras ilustrativas evaluadas, C-: control negativo.

### 5.3 Análisis de patrones de genes de virulencia asociados a ExPEC.

De acuerdo con la distribución de los genes en los aislamientos se encontraron los patrones o combinación de genes que se muestran en la Figura 9.

Número de aislamientos	<i>iron</i>	<i>hlyF</i>	<i>iutA</i>	<i>ompT</i>	<i>iss</i>
31	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente
34	Presente	Presente	Ausente	Presente	Presente
6	Presente	Presente	Presente	Presente	Ausente
6	Ausente	Presente	Presente	Presente	Presente
4	Presente	Presente	Presente	Ausente	Presente
3	Presente	Ausente	Presente	Presente	Presente
11	Ausente	Presente	Presente	Presente	Ausente
7	Presente	Presente	Presente	Ausente	Ausente
4	Presente	Ausente	Presente	Presente	Ausente
3	Ausente	Presente	Ausente	Presente	Presente
2	Ausente	Ausente	Presente	Presente	Presente
2	Presente	Presente	Ausente	Ausente	Presente
1	Presente	Presente	Ausente	Presente	Ausente
1	Presente	Ausente	Ausente	Presente	Presente

Figura 9. Patrones de distribución de genes de virulencia en aislamientos ExPEC.

### 5.4 Análisis bioinformático de distribución de genes asociados a ExPEC en otras enterobacterias.

En la herramienta bioinformática BLAST protein se ingresó cada una de las secuencias proteicas de cada factor de virulencia y se obtuvieron las secuencias registradas con un grado de identidad mayor 85% y en qué microorganismo fue reportada. En las tablas 7 se muestran los resultados obtenidos de tasas de identidad y cobertura de las secuencias para cada microorganismo que portaba cada den de virulencia asociado a ExPEC.



Tabla 7. Microorganismos reportados para cada factor de virulencia y el nivel de identidad y cobertura de las secuencias proteicas. A) *iss*, B) *hlyF*, C) *iutA*, D) *ompT* y E) *iroN*.

**A) *iss***

Microorganismo	Porcentaje de identidad (%)	Nivel de cobertura (%)
<i>Salmonella enterica</i>	97.4	93.8
<i>Escherichia albertii</i>	96.4	95.0
<i>Enterobacteriaceae</i>	95.9	94.7
<i>Shigella sonnei</i>	92.2	94.0
<i>Escherichia fergusonii</i>	96.5	96.0
<i>Enterobacter hormaechei</i>	90.2	94.5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	91.7	94.5
<i>Shigella boydii</i>	96.9	95.0
<i>Shigella dysenteriae</i>	99.0	95.0

**B) *hlyF***

Microorganismo	Porcentaje de identidad (%)	Nivel de cobertura (%)
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Kentucky</i>	99.9	93.4
<i>Salmonella enterica</i>	99.9	94.3
<i>Escherichia albertii</i>	87.1	100
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	99.5	95.3
<i>Enterobacteriaceae</i>	99.8	98.8
<i>Escherichia marmotae</i>	99.73	100
<i>Shigella sonnei</i>	85.64	100

**C) *iutA***

Microorganismo	Porcentaje de identidad (%)	Nivel de cobertura (%)
<i>Salmonella enterica</i>	91.8	99.3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	96.9	99.3
<i>Shigella flexneri</i>	98.5	98.5
<i>Shigella sonnei</i>	90.5	98.7
<i>Shigella boydii</i>	89.9	98.7

<i>Citrobacter koseri</i>	94.1	99.7
<i>Enterobacteriaceae</i>	92.8	99.4
<i>Shigella</i>	93.9	99.0
<i>Escherichia albertii</i>	92.2	98.3

**D) ompT**

Microorganismo	Porcentaje de identidad (%)	Nivel de cobertura (%)
<i>Shigella sonnei</i>	98.6	99.8
<i>Shigella flexneri</i>	98.4	100.0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	94.3	100.0
<i>Shigella boydii</i>	98.9	100.0
<i>Shigella dysenteriae</i>	98.4	98.5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	98.9	93.0
<i>Gammaproteobacteria</i>	99.1	100.0
<i>Shigella sp.</i>	99.0	97.0

**E) iron**

Microorganismo	Porcentaje de identidad (%)	Nivel de cobertura (%)
<i>Enterobacter hormaechei</i>	94.9	99.9
<i>Klebsiella aerogenes</i>	92.5	100.0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	92.9	99.2
<i>Salmonella enterica</i>	99.6	97.8
<i>Enterobacter bugandensis</i>	94.6	100.0
<i>Enterobacter cancerogenus</i>	94.2	100.0
<i>Enterobacter</i>	94.4	100.0
<i>Enterobacter cloacae</i>	94.9	100.0
<i>Enterobacteriaceae</i>	97.6	100.0
<i>Citrobacter sp.</i>	92.0	99.4
<i>Shigella dysenteriae</i>	99.0	99.0
<i>Klebsiella sp.</i>	93.0	100.0

En la Figura 10 se muestra la distribución de microorganismos que se ha reportado para cada factor de virulencia, del total de secuencias proteicas similares obtenidas del repositorio de datos BLAST.

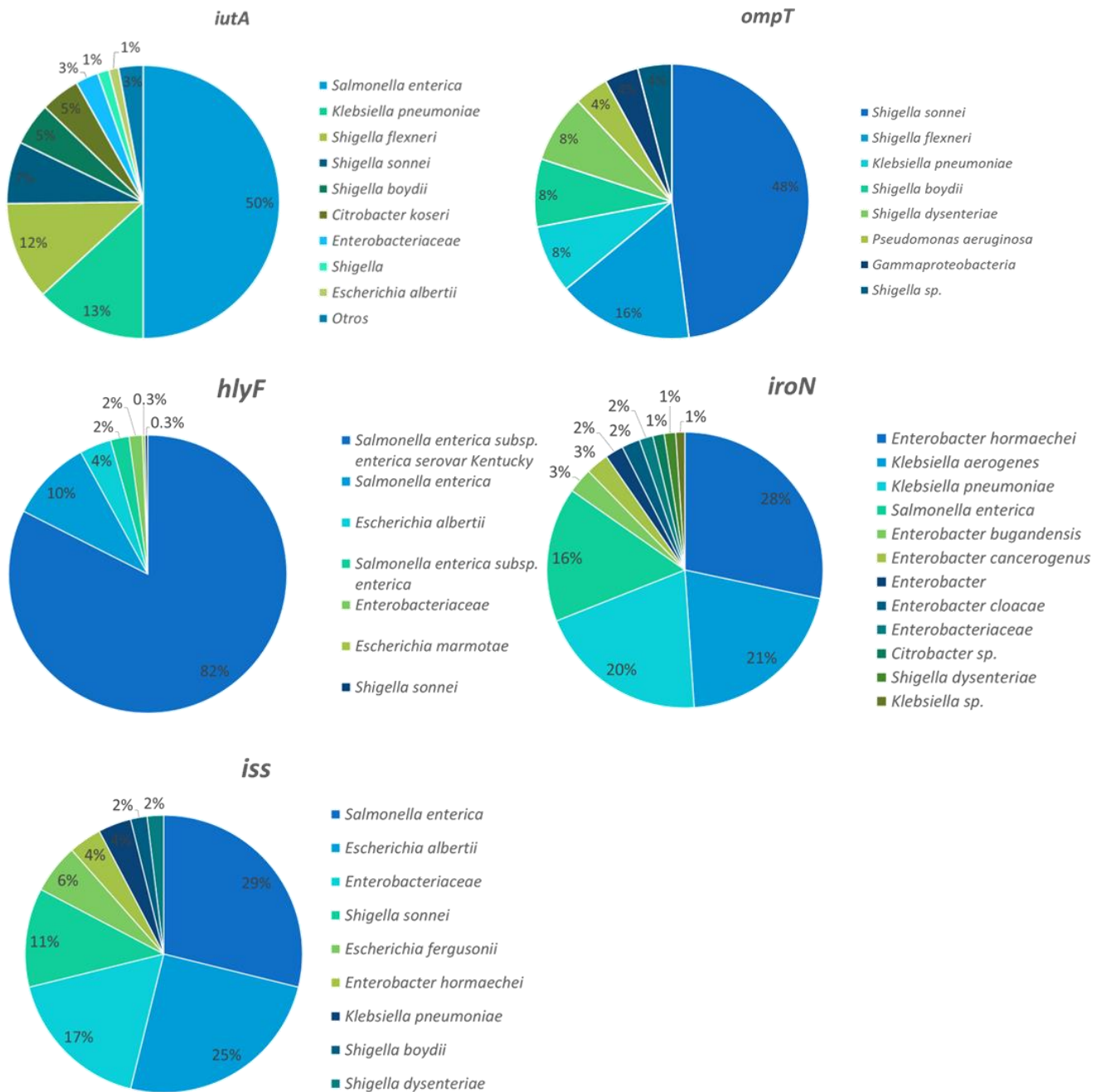


Figura 10 Análisis de bases de datos de presencia de cada determinante de virulencia en otras enterobacterias.

## 6. Discusión

En el presente trabajo se hizo la búsqueda de los genes *iutA*, *hlyF*, *iroN*, *iss* y *ompT* en aislamientos provenientes de carne de origen avícola. La detección de estos genes se hizo mediante la técnica molecular de PCR multiplex. Se considera al uso de esta técnica como una mejora en el diagnóstico de patógenos, pues permite identificar varias determinantes genéticas simultáneamente (Devi et al., 2018). En este estudio se implementó el uso de una reacción triple para la detección de los genes *iutA*, *hlyF* e *iroN* y una reacción doble para los genes *iss* y *ompT*. Las ventajas del uso de PCR multiplex fue la optimización de reactivos, materiales y el tiempo necesario para procesar un número grande de muestras. Sin embargo, para el diseño de las reacciones se consideraron aspectos diferentes que para una PCR simple. Uno de estos aspectos fue hacer el análisis de los oligonucleótidos que se usaron en la misma reacción, pues se debe verificar que no interaccionen entre ellos, además, su temperatura de alineación debe ser similar. Otro factor que se consideró en el diseño de las reacciones de PCR fue el tamaño de los amplicones esperados, pues estos deben ser de tamaños diferentes de manera que puedan distinguirse en el gel de agarosa que se usó para revelar los resultados (Lorenz, 2012).

El uso de PCR multiplex optimiza el monitoreo de cepas virulentas y es una ventaja para las granjas de producción avícola, pues permite eficientizar la detección de estas cepas, impedir su diseminación y de esta manera mejorar su producción (Najafi et al., 2019).

En este sentido, estas estrategias implementadas en el ámbito avícola se convierten en oportunidades de mejora de la salud pública, debido al impacto que causan los patógenos de los animales y sus productos al ser transmitidos a los humanos y al medio ambiente. De esta manera es como la puesta en práctica de la iniciativa “Una Salud” puede ayudar al monitoreo y prevención de la transmisión

de infecciones zoonóticas y de esta forma a mejorar la salud global (Wasiński, 2019).

Se ha demostrado que los aislamientos APEC obtenidos de aves poseen potencial de causar infecciones zoonóticas en humanos (Hu et al., 2022; Mellata et al., 2018; Mitchell et al., 2015).

Para la detección de cepas APEC se usó el panel de genes de virulencia propuesto por Johnson y colaboradores (Johnson et al., 2008), el cual está conformado por los cinco genes *iutA*, *hlyF*, *iroN*, *iss* y *ompT*. Este panel es de utilidad para la detección de cepas patógenas con potencial de causar infecciones extraintestinales. Aun cuando se han descrito otras determinantes de virulencia asociados a APEC, la detección de los 5 genes empleados en este panel continúa siendo de utilidad, pues siguen mostrando una alta prevalencia en este tipo de aislamientos. Tal es el caso de un estudio realizado por Kim y colaboradores en 2020 donde se considera a este panel de 5 genes como predictores de cepas APEC, presentando una alta prevalencia de los cinco genes, con una tasa que va del 78.5 al 93.7% (Kim et al., 2020). En un estudio más reciente, publicado por Joseph y colaboradores en 2023, se evaluó un panel de genes de virulencia más amplio, conformado por las determinantes de virulencia *papC*, *tsh*, *ibeA*, *iutA*, *iroN*, *iss*, *ompT*, *astA*, *hlyF*, y *cva/cvi*, en aislamientos obtenidos de lesiones de pollos de granja. El resultado confirma que los genes que muestran mayor asociación a este tipo de cepas son los 5 genes utilizados en el presente trabajo (*iutA*, *hlyF*, *iroN*, *iss* y *ompT*), pues son los que Joseph y colaboradores reportan con mayor prevalencia, con tasas que van del 65 al 78.5%, a diferencia de las otras determinantes genéticas de virulencia evaluadas en dicho estudio (*papC*, *tsh*, *ibeA*, *astA*, y *cva/cvi*) que presentaron tasas de prevalencia menores que van de un 14.3% a un 42.9% (Joseph et al., 2023). Con esta evidencia, se comprueba que la detección del panel de genes de virulencia empleado en este estudio continúa vigente, pues, aunque fue propuesto desde el año 2008, estudios recientes muestran la alta asociación que existe entre dichos genes de virulencia y la patogenicidad de aislamientos APEC.

En este estudio se consideró a todos aquellos aislamientos que presentaron 3 o más de las determinantes genéticas de virulencia evaluadas. El porcentaje de la presencia de cada uno de estos genes en los 115 aislamientos evaluados fue *iutA* 64.3%, *hlyF* 91.3%, *iroN* 80.9%, *iss* 74.8% y *ompT* 88.7%. La frecuencia de estos genes varía en las publicaciones actuales alrededor del mundo, la mayoría presentan al gen *hlyF* y *ompT* como los más prevalentes, al igual que el presente estudio, con tasas que van del 95-99% para el gen *hlyF* y del 93-99% para *ompT* (Johar et al., 2021; Newman et al., 2021). Además, se ha reportado una alta prevalencia de que los aislamientos que tengan el gen *hlyF* también tengan el gen *ompT*, tal es el caso de lo reportado por De Oliveira y colaboradores en donde estos genes se encontraron siempre en conjunto en los aislamientos que estudiaron (de Oliveira et al., 2015), en el presente trabajo, se encontraron en conjunto en 92 de los 115 aislamientos estudiados. Dando un indicativo de que estos dos genes son característicos de cepas APEC.

En México ha habido reportes sobre la presencia de estos genes en aislamientos avícolas, tal es el caso del estudio realizado por López y colaboradores en la Universidad Autónoma de Zacatecas en 2017 (López et al., 2017), donde se reportó la frecuencia de varios genes de virulencia, entre ellos *ompT*, *iss* e *iroN*, con una prevalencia de 26%, 95% y 78% respectivamente. La diferencia en la frecuencia de *OmpT* con la encontrada en el presente estudio (88.7%) es muy grande, sin embargo, remarca la característica de que la patogenicidad de ExPEC es multigénica y que estos microorganismos se encuentran en un intercambio de información genética.

Un factor para tomar en cuenta es la presencia de genes de virulencia en material genético móvil, lo que le permite transferirse entre bacterias. Los cinco genes estudiados en este trabajo se han detectado en plásmidos. El plásmido ColV se ha asociado a la patogenicidad de APEC y se han encontrado en el a los cinco genes de aquí evaluados. En publicaciones anteriores se ha encontrado presente con una frecuencia entre el 53% al 67% en aislamientos APEC. En el estudio realizado por López y colaboradores en México se encontró a este plásmido en un 91% de los aislamientos evaluados, este dato es relevante porque puede ser indicativo de

un alto grado de transferencia horizontal de material genético de virulencia. En Este estudio se encontraron los 5 genes en conjunto en el 26.9% de los aislamientos evaluados, lo que pudiera estar relacionado con la presencia del plásmido ColV, sin embargo, para comprobarlo sería necesario hacer pruebas para la detección de genes estructurales que conforman el plásmido.

La detección de los genes *iutA*, *hlyF*, *iroN*, *iss* y *ompT* se relaciona a la presencia de diferentes factores de virulencia, como lo son sistemas de captación de hierro, toxinas y protectinas. La presencia de este panel de cinco genes ha mostrado tener alta prevalencia en cepas patógenas de *E. coli* en aves de granja (APEC), pero también en aislamientos ExPEC obtenidos de humanos. La similitud genética que se ha descrito entre las cepas obtenidas de aves y de humanos, remarca la capacidad zoonótica de estas cepas y el alto riesgo de que los microorganismos presentes en los productos provenientes de granjas avícolas sean transmitidos al humano. Según diversas investigaciones se ha encontrado relación entre los mecanismos de virulencia expresados por APEC y ExPEC de humanos, principalmente UPEC. Por ejemplo, en un estudio en Irán publicado en 2019 por Najafi y colaboradores, reporta la presencia de varios genes de virulencia en aislamientos APEC y UPEC, entre ellos el gen *ompT*, *iutA* e *iss*, los cuales tuvieron una prevalencia de 63%, 89% y 89% en los aislamientos APEC y de 40%, 74% y 48% en los aislamientos UPEC. En comparación con los datos obtenidos en este estudio se observa una frecuencia más parecida a la presentada en los aislamientos APEC que en los UPEC, lo cual corresponde pues los aislamientos usados en este trabajo son de origen avícola.

La presencia de estos genes de virulencia se ha asociado con un potencial de causar infecciones extra-intestinales en humanos y en animales. Lo que resalta la necesidad del estudio de estas determinantes genéticas en otros microorganismos de interés para la salud animal y humana.

## 7. Conclusiones

Se hizo la caracterización de 115 aislamientos de origen avícola como ExPEC por la presencia de 3 o más de los genes *iutA*, *hlyF*, *iss*, *iroN*, y *ompT*. Se demostró que este panel sigue siendo de utilidad para detección de cepas con potencial patógeno.

Se demostró que el panel de genes de virulencia utilizado es de ayuda para diagnóstico de cepas ExPEC, pues se confirmó a todos estos aislamientos como *Escherichia coli*.

Los patrones de genes de virulencia encontrados revelan la alta prevalencia del gen *hlyF* y *ompT*, los cuales se asocian a factores de virulencia con acción de protectinas y toxinas, lo que favorece a la infección extraintestinal.

Los ensayos bioinformáticos revelan que estos genes pueden encontrarse en otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, principalmente *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella* y *Citrobacter*, lo que es indicativo de la posible transferencia horizontal de genes

Con este trabajo sale a relucir la importancia de la detección de microorganismos virulentos en el ámbito avícola pues de esta manera ayuda a mejorar la producción y salud animal, y de esta manera prevenir la transferencia de estos microorganismos al humano. Logrando la implementación del enfoque “Una Salud” encaminado a la prevención y toma de medidas para lograr la salud global.



## 8. Referencias

- Amer, M.M., Mekky, H.M., Fedawy, H.S., EL-Shemy, A., Bosila, M.A., Elbayoumi, Kh.M., 2020. Molecular identification, genotyping of virulence-associated genes, and pathogenicity of cellulitis-derived *Escherichia coli*. *Vet World* 13, 2703–2712. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2020.2703-2712>
- Antunes, P., Novais, C., Peixe, L., 2020. Food-to-Humans Bacterial Transmission. *Microbiology Spectrum* 8, 8.1.1. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MTBP-0019-2016>
- Apostolakos, I., Laconi, A., Mughini-Gras, L., Yapicier, Ö.Ş., Piccirillo, A., 2021. Occurrence of Colibacillosis in Broilers and Its Relationship With Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC) Population Structure and Molecular Characteristics. *Frontiers in Veterinary Science* 8.
- Balbuena-Alonso, M.G., Cortés-Cortés, G., Kim, J.W., Lozano-Zarain, P., Camps, M., del Carmen Rocha-Gracia, R., 2022. Genomic analysis of plasmid content in food isolates of *E. coli* strongly supports its role as a reservoir for the horizontal transfer of virulence and antibiotic resistance genes. *Plasmid* 123–124, 102650. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2022.102650>
- Biran, D., Sura, T., Otto, A., Yair, Y., Becher, D., Ron, E.Z., Raffatellu, M., 2021. Surviving Serum: the *Escherichia coli* *iss* Gene of Extraintestinal Pathogenic *E. coli* Is Required for the Synthesis of Group 4 Capsule [WWW Document]. <https://doi.org/10.1128/IAI.00316-21>
- Brenner, D.J., Framer, J., 2015. Enterobacteriaceae [WWW Document]. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. URL <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/9781118960608.fbm00222> (accessed 12.10.21).
- CDC, 2020. One Health Basics | One Health | CDC [WWW Document]. URL <https://www.cdc.gov/onehealth/basics/index.html> (accessed 12.10.21).
- Conway, T., Cohen, P.S., 2015. Commensal and Pathogenic *Escherichia coli* Metabolism in the Gut. *Microbiol Spectr* 3, 10.1128/microbiolspec.MBP-0006–2014. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MBP-0006-2014>
- Čurová, K., Slobodníková, R., Kmet'ová, M., Hrabovský, V., Maruniak, M., Liptáková, E., Siegfried, L., 2020. Virulence, phylogenetic background and antimicrobial resistance in *Escherichia coli* associated with extraintestinal infections. *J Infect Public Health* 13, 1537–1543. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2020.06.032>
- Daniel, S., Goldlust, K., Quebre, V., Shen, M., Lesterlin, C., Bouet, J.-Y., Yamaichi, Y., 2020. Vertical and Horizontal Transmission of ESBL Plasmid from *Escherichia coli* O104:H4. *Genes* 11, 1207. <https://doi.org/10.3390/genes11101207>
- De Oliveira, A.L., Rocha, D.A., Finkler, F., de Moraes, L.B., Barbieri, N.L., Pavanelo, D.B., Winkler, C., Grassotti, T.T., de Brito, K.C.T., de Brito, B.G., Horn, F., 2015. Prevalence of ColV Plasmid-Linked Genes and In Vivo Pathogenicity of Avian Strains of *Escherichia coli*. *Foodborne Pathogens and Disease* 12, 679–685. <https://doi.org/10.1089/fpd.2014.1934>

- Desloges, I., Taylor, J.A., Leclerc, J.-M., Brannon, J.R., Portt, A., Spencer, J.D., Dewar, K., Marczyński, G.T., Manges, A., Gruenheid, S., Moual, H.L., Thomassin, J.-L., 2019. Identification and characterization of OmpT-like proteases in uropathogenic *Escherichia coli* clinical isolates. *MicrobiologyOpen* 8, e915. <https://doi.org/10.1002/mbo3.915>
- Desvaux, M., Dalmasso, G., Beyrouthy, R., Barnich, N., Delmas, J., Bonnet, R., 2020. Pathogenicity Factors of Genomic Islands in Intestinal and Extraintestinal *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology* 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.02065>
- Devi, T.S., Durairaj, E., Lyngdoh, W.V., Duwarah, S.G., Khyriem, A.B., Lyngdoh, C.J., 2018. Real-time multiplex polymerase chain reaction with high-resolution melting-curve analysis for the diagnosis of enteric infections associated with diarrheagenic *Escherichia coli*. *Indian J Med Microbiol* 36, 547–556. [https://doi.org/10.4103/ijmm.IJMM\\_18\\_277](https://doi.org/10.4103/ijmm.IJMM_18_277)
- Gama, J.A., Zilhão, R., Dionisio, F., 2020. Plasmid Interactions Can Improve Plasmid Persistence in Bacterial Populations. *Frontiers in Microbiology* 11, 2033. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.02033>
- García, A., Fox, J.G., 2021. A One Health Perspective for Defining and Deciphering *Escherichia coli* Pathogenic Potential in Multiple Hosts. *Comp Med* 71, 3–45. <https://doi.org/10.30802/AALAS-CM-20-000054>
- Hu, J., Afayibo, D.J.A., Zhang, B., Zhu, H., Yao, L., Guo, W., Wang, X., Wang, Z., Wang, D., Peng, H., Tian, M., Qi, J., Wang, S., 2022. Characteristics, pathogenic mechanism, zoonotic potential, drug resistance, and prevention of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Front. Microbiol.* 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1049391>
- Janda, J.M., Abbott, S.L., 2021. The Changing Face of the Family Enterobacteriaceae (Order: “Enterobacterales”): New Members, Taxonomic Issues, Geographic Expansion, and New Diseases and Disease Syndromes. *Clin Microbiol Rev* 34, e00174-20. <https://doi.org/10.1128/CMR.00174-20>
- Johar, A., Al-Thani, N., Al-Hadidi, S.H., Dlissi, E., Mahmoud, M.H., Eltai, N.O., 2021. Antibiotic Resistance and Virulence Gene Patterns Associated with Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC) from Broiler Chickens in Qatar. *Antibiotics* 10, 564. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10050564>
- Johnson, J.R., Russo, T.A., 2018. Molecular Epidemiology of Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*. *EcoSal Plus* 8. <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0004-2017>
- Johnson, T.J., Wannemuehler, Y., Doetkott, C., Johnson, S.J., Rosenberger, S.C., Nolan, L.K., 2008. Identification of Minimal Predictors of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Virulence for Use as a Rapid Diagnostic Tool. *J Clin Microbiol* 46, 3987–3996. <https://doi.org/10.1128/JCM.00816-08>
- Jørgensen, S.L., Stegger, M., Kudirkiene, E., Lilje, B., Poulsen, L.L., Ronco, T., Pires Dos Santos, T., Kiil, K., Bisgaard, M., Pedersen, K., Nolan, L.K., Price, L.B., Olsen, R.H., Andersen, P.S., Christensen, H., 2019. Diversity and Population Overlap between Avian and Human *Escherichia coli* Belonging to Sequence Type 95. *mSphere* 4, e00333-18. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00333-18>

- Joseph, J., Jennings, M., Barbieri, N., Zhang, L., Adhikari, P., Ramachandran, R., 2023. Characterization of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Isolated from Broiler Breeders with Colibacillosis in Mississippi. *Poultry* 2, 24–39. <https://doi.org/10.3390/poultry2010004>
- Kaper, J.B., Nataro, J.P., Mobley, H.L., 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2, 123–140. <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>
- Kathayat, D., Lokesh, D., Ranjit, S., Rajashekara, G., 2021. Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC): An Overview of Virulence and Pathogenesis Factors, Zoonotic Potential, and Control Strategies. *Pathogens* 10, 467. <https://doi.org/10.3390/pathogens10040467>
- Kim, Y.B., Yoon, M.Y., Ha, J.S., Seo, K.W., Noh, E.B., Son, S.H., Lee, Y.J., 2020. Molecular characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* from broiler chickens with colibacillosis. *Poultry Science* 99, 1088–1095. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2019.10.047>
- Leimbach, A., Hacker, J., Dobrindt, U., 2013. *E. coli* as an All-Rounder: The Thin Line Between Commensalism and Pathogenicity, in: Dobrindt, U., Hacker, J.H., Svanborg, C. (Eds.), *Between Pathogenicity and Commensalism, Current Topics in Microbiology and Immunology*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 3–32. [https://doi.org/10.1007/82\\_2012\\_303](https://doi.org/10.1007/82_2012_303)
- Leitão, J.H., 2020. Microbial Virulence Factors. *Int J Mol Sci* 21, 5320. <https://doi.org/10.3390/ijms21155320>
- López, V., Serrano, I., Delgado, P., Rodríguez, L., Olague-Marchan, M., Rodríguez, S., Luna, M., De La Torre, A., Santoyo, R., 2017. Genes of Virulence and Phylogenetic Group in Isolates of Avian Pathogenic *Escherichia coli*. *Archives of Medicine* 9, 0–0. <https://doi.org/10.21767/1989-5216.1000247>
- Lorenz, T.C., 2012. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *J Vis Exp* 3998. <https://doi.org/10.3791/3998>
- Manges, A.R., Geum, H.M., Guo, A., Edens, T.J., Fibke, C.D., Pitout, J.D.D., 2019. Global Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) Lineages. *Clin Microbiol Rev* 32, e00135-18. <https://doi.org/10.1128/CMR.00135-18>
- Mellata, M., Johnson, J.R., Curtiss III, R., 2018. *Escherichia coli* isolates from commercial chicken meat and eggs cause sepsis, meningitis and urinary tract infection in rodent models of human infections. *Zoonoses and Public Health* 65, 103–113. <https://doi.org/10.1111/zph.12376>
- Mey, A.R., Gómez-Garzón, C., Payne, S.M., 2021. Iron Transport and Metabolism in *Escherichia*, *Shigella*, and *Salmonella*. *EcoSal Plus* 9, eESP-0034-2020. <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0034-2020>
- Mitchell, N.M., Johnson, J.R., Johnston, B., Curtiss, R., Mellata, M., 2015. Zoonotic Potential of *Escherichia coli* Isolates from Retail Chicken Meat Products and Eggs. *Appl Environ Microbiol* 81, 1177–1187. <https://doi.org/10.1128/AEM.03524-14>
- Murase, K., Martin, P., Porcheron, G., Houle, S., Helloin, E., Pénary, M., Nougayrède, J.-P., Dozois, C.M., Hayashi, T., Oswald, E., 2016. HlyF Produced by Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* Is a Virulence

- Factor That Regulates Outer Membrane Vesicle Biogenesis. *The Journal of Infectious Diseases* 213, 856–865. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv506>
- Najafi, S., Rahimi, M., Nikousefat, Z., 2019. Extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* from human and avian origin: Detection of the most common virulence-encoding genes. *Vet Res Forum* 10, 43–49. <https://doi.org/10.30466/vrf.2019.34307>
- Newman, D.M., Barbieri, N.L., de Oliveira, A.L., Willis, D., Nolan, L.K., Logue, C.M., 2021. Characterizing avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) from colibacillosis cases, 2018. *PeerJ* 9, e11025. <https://doi.org/10.7717/peerj.11025>
- Riley, L.W., 2020. Extraintestinal Foodborne Pathogens. *Annu Rev Food Sci Technol* 11, 275–294. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032519-051618>
- Robins-Browne, R.M., Holt, K.E., Ingle, D.J., Hocking, D.M., Yang, J., Tauschek, M., 2016. Are *Escherichia coli* Pathotypes Still Relevant in the Era of Whole-Genome Sequencing? *Front Cell Infect Microbiol* 6, 141. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00141>
- Sarowska, J., Futoma-Koloch, B., Jama-Kmiecik, A., Frej-Madrzak, M., Ksiazczyk, M., Bugla-Ploskonska, G., Choroszy-Krol, I., 2019. Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from different sources: recent reports. *Gut Pathog* 11, 10. <https://doi.org/10.1186/s13099-019-0290-0>
- Silkie, S.S., Nelson, K.L., 2009. Concentrations of host-specific and generic fecal markers measured by quantitative PCR in raw sewage and fresh animal feces. *Water Research, Cross-validation of detection methods for pathogens and fecal indicators* 43, 4860–4871. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.08.017>
- Sora, V.M., Meroni, G., Martino, P.A., Soggiu, A., Bonizzi, L., Zecconi, A., 2021. Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*: Virulence Factors and Antibiotic Resistance. *Pathogens* 10, 1355. <https://doi.org/10.3390/pathogens10111355>
- Torres, A.G., 2017. *Escherichia coli* diseases in Latin America—a ‘One Health’ multidisciplinary approach. *Pathogens and Disease* 75, ftx012. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftx012>
- Wasiński, B., 2019. Extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* - threat connected with food-borne infections. *Ann Agric Environ Med* 26, 532–537. <https://doi.org/10.26444/aaem/111724>
- Westhuizen, W.A. van der, Theron, C.W., Boucher, C.E., Bragg, R.R., 2019. Regulation of outer-membrane proteins (OMPs) A and F, during hlyF-induced outer-membrane vesicle (OMV) biosynthesis. *Heliyon* 5. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02014>
- Wielinga, P.R., Schlundt, J., 2012. Food Safety: At the Center of a One Health Approach for Combating Zoonoses. *One Health: The Human-Animal-Environment Interfaces in Emerging Infectious Diseases* 366, 3–17. [https://doi.org/10.1007/82\\_2012\\_238](https://doi.org/10.1007/82_2012_238)
- Wyckoff, E.E., Boulette, M.L., Payne, S.M., 2009. Genetics and environmental regulation of *Shigella* iron transport systems. *Biometals* 22, 43–51. <https://doi.org/10.1007/s10534-008-9188-x>

## 9. Anexos

Anexo 1. Dictamen de comité de Bioética

C.U., Querétaro, abril 06, 2022

No. de oficio. CBQ22/015

**MIM. David Gustavo García Gutiérrez**  
**Facultad de Química**  
**Presente**

**At'n. Daniela Jiménez Balderas**

Con base en las actividades de responsabilidad para el Comité de Bioética de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro en la revisión de proyectos de investigación con la participación de sujetos humanos (directamente en ensayos clínicos, investigación observacional o por empleo de muestras biológicas), así como del uso de animales de experimentación, le comunicamos que el protocolo de investigación titulado "**Identificación molecular de enterobacterias portadoras de genes de virulencia asociados a ExPEC**", del cual Usted es responsable, fue evaluado con una resolución de **exento de dictamen ético** debido a que el proyecto no incluye estudios con animales de experimentación ni sujetos humanos.

Sin más por el momento, quedamos a sus órdenes para cualquier duda o aclaración.

---

**Dra. Iza Fernanda Pérez Ramírez**  
Presidente

---

**Dra. Minerva Ramos Gómez**  
Secretaria

---

**Dr. Mamadou Moustapha Bah**  
Representante investigador

---

**M.C. Eduardo Balderas Martínez**  
Representante docente