



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO-BIOLÓGICAS

POSGRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**“SECUENCIACIÓN Y GENÓMICA COMPARATIVA DE
CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI* DE ORIGEN AMBIENTAL,
ANIMAL Y CLÍNICO AISLADAS EN SINALOA”**

TESIS

QUE PRESENTA

M. en C. JOSÉ ANTONIO MAGAÑA LIZÁRRAGA

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

DIRECTOR(ES)

DRA. MARÍA ELENA BÁEZ FLORES

DR. BRUNO GÓMEZ GIL RODRÍGUEZ SALA

CULIACÁN DE ROSALES, SINALOA, MÉXICO A NOVIEMBRE DE 2023.



Dirección General de Bibliotecas
Ciudad Universitaria
Av. de las Américas y Blvd. Universitarios
C. P. 80010 Culiacán, Sinaloa, México.
Tel. (667) 713 78 32 y 712 50 57
dgbuas@uas.edu.mx

UAS-Dirección General de Bibliotecas

Repositorio Institucional Buelna

Restricciones de uso

Todo el material contenido en la presente tesis está protegido por la Ley Federal de Derechos de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

Queda prohibido la reproducción parcial o total de esta tesis. El uso de imágenes, tablas, gráficas, texto y demás material que sea objeto de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente correctamente mencionando al o los autores del presente estudio empírico. Cualquier uso distinto, como el lucro, reproducción, edición o modificación sin autorización expresa de quienes gozan de la propiedad intelectual, será perseguido y sancionado por el Instituto Nacional de Derechos de Autor.

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial
Compartir Igual, 4.0 Internacional



DEDICATORIA

A mi familia.

A mi madre y padre, mis cimientos y motor.

A mis hermanos, mi apoyo incondicional.

A Kara, mi leal compañera.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Sinaloa (UAS), a través del programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Facultad de Ciencias Químico-Biológicas (FCBQ), por permitirme ser parte de esta honorable institución y brindarme la formación académica requerida para desarrollarme profesionalmente.

Al Consejo Nacional de Humanidades Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) por la beca otorgada durante la realización del presente proyecto.

A mis directores de tesis, Dra. María Elena Báez Flores, por brindarme su apoyo, confianza e invaluable mentoría en todo momento durante mi formación académica, profesional y personal. La agradezco recibirme como su alumno y permitirme aprender de usted. Al Dr. Bruno Gómez Gil Rodríguez Sala, por su accesibilidad, confianza, disponibilidad e interés depositados en este proyecto. Le agradezco enormemente su valiosa guía y contribución en mi desarrollo profesional.

A mis asesores de tesis, Dr. Francisco Delgado Vargas, Dr. Inés Fernando Vega López y Dr. José Guadalupe Rendón Maldonado, por su disposición, interés y sugerencias que contribuyeron en gran medida a la mejora del proyecto. *¡Muchas gracias!*

Al personal académico y administrativo de la Unidad de Investigación en Salud Pública "Dra. Kaethe Willms" por su apoyo, compañía y disposición en el día a día durante mi estadía. Es un enorme gusto haber compartido ideas y momentos junto a todos, especialmente, los convivios que nunca se olvidarán.

A mis amigos y compañeros de la Unidad en Investigaciones en Salud Pública "Dra. Kaethe Willms": Alma, Yesenia, Any, Guillermo, Gloria, Claudia, Cruz, Carolina, Diana, Itzayana, Paola, Evelin y Geraldyn gracias a todos por su apoyo, compañía y momentos compartidos.

A Angeina Valenzuela y Yazmin Bujons, les agradezco su amistad, disponibilidad y disposición en todo momento para apoyarme tanto dentro y fuera del laboratorio. Nuestras pláticas, picnics y convivencia, simplemente *¡memorables!*

A Yaima Henry y Yajaira Alvarado, por el apoyo, la atención, pero sobre todo la comprensión y motivación brindadas. *¡Gracias, amigas!*

A mis excompañeros de Maestría y grandes amigos Cintli Balcazar, Fernanda Salomón y Saul Beltrán gracias por tantos momentos tan enriquecedores derivados de nuestras conversaciones y convivencia. *¡Son parte sustancial de esto!*

Cintli B. agradezco enormemente tu invaluable amistad, el apoyo incondicional, la atención, los consejos tan acertados y las palabras de aliento brindadas. *¡Gracias por creer en mí!*

A los *tiquis*: Ana María López y Christian Grimaldi, por su apreciable amistad, confianza, paciencia, ánimos y motivación brindada para continuar. Gracias por estar pendientes y tenerme siempre en consideración. *¡Que nunca nos falte café!*

A Maryfer Quintero, por tu gran amistad, atención, consejos y motivación para seguir adelante. *¡Muchísimas gracias!*

Los *altatiza*: Alejandro, Angeina, Arely, Any, Omar, Leslie, Verónica y Rodolfo les agradezco enormemente su apoyo y constante preocupación, los momentos compartidos, pero sobre todo por su amistad. *¡Son únicos!*

A mí *amigui*, Any Castañeda, gracias por el gran apoyo, interés, la preocupación y brindarme el soporte siempre cuando lo requería, pero principalmente, por tu valiosa gran amistad. Por todo *¡muchísimas gracias!*

LadyBlack, por el apoyo y atención incondicional, el aliento, la comprensión y confianza otorgada, especialmente, en el transcurso de cierre de esta etapa. *¡Sencillamente, muchas gracias!*

A mis padres, José Antonio y Ana Lidia, y hermanos, Claudia y Raúl, por alentarme siempre en todo momento a alcanzar mis metas, ser los cimientos, fortaleza y mis guías, apoyarme en todas y cada una de mis decisiones y proyectos, esencialmente, por confiar en mí todo momento. *¡Los amo!*

Gracias a todas las personas que contribuyeron de alguna manera en la realización de este trabajo, más aún, a todos los que hacen que esto valga la pena. *¡Gracias a ti por leer esto!*

4.8.	Secuenciación del ADN y su relevancia en la genómica	42
4.9.	Antecedentes	44
4.9.1.	Estudios genómicos de <i>E. coli</i> multirresistente derivadas de diversas fuentes de aislamiento	44
4.9.2.	Resistencia antimicrobiana de <i>E. coli</i> en Sinaloa	46
4.9.2.1.	Resistencia antimicrobiana de <i>E. coli</i> multirresistente desde una perspectiva genómica	48
V.	JUSTIFICACIÓN	50
VI.	HIPÓTESIS	51
VII.	OBJETIVOS	52
7.1.	Objetivo general	52
7.2.	Objetivos específicos	52
VIII.	MATERIALES Y MÉTODOS	53
8.1.	Diseño de estudio	53
8.2.	Objeto del estudio	53
8.3.	Reactivación y preservación de cepas de <i>E. coli</i>	55
8.4.	Perfil de susceptibilidad antimicrobiana	55
8.5.	Extracción de ADN genómico	56
8.6.	Secuenciación del genoma completo	57
8.7.	Análisis bioinformático	57
8.7.1.	Preprocesamiento de lecturas de secuenciación y control de calidad	57
8.7.2.	Ensamble y anotación de genomas	58
8.7.3.	Tipificación molecular <i>in silico</i>	60
8.7.4.	Determinación de genes asociados a virulencia y resistencia antimicrobiana	61
8.7.5.	Identificación y caracterización de elementos genéticos móviles	62
8.7.6.	Análisis filogenéticos	63
8.7.6.1.	Contexto global de grupos clonales de alto riesgo	63
8.8.	Análisis estadísticos	65
IX.	RESULTADOS	66
9.1.	Caracterización fenotípica y susceptibilidad antimicrobiana	66
9.2.	Secuenciación, ensamble y anotación del genoma	73

9.2.1.	Ensamble de genomas de <i>E. coli</i>	73
9.2.2.	Anotación de genomas de <i>E. coli</i>	73
9.3.	Tipificación molecular <i>in silico</i>	79
9.4.	Determinantes genéticos asociados a virulencia y resistencia antimicrobiana	83
9.4.1.	Genes asociados a la virulencia (VAGs)	83
9.4.2.	Genes asociados a la resistencia antimicrobiana (ARGs).....	87
9.5.	Contenido plasmídico y profágico	93
9.6.	Análisis filogenético	102
9.6.1.	Contexto global de grupos clonales de alto riesgo	105
X.	DISCUSIÓN.....	119
10.1.	Caracterización fenotípica y susceptibilidad antimicrobiana.....	119
10.2.	Secuenciación, ensamble y anotación del genoma	121
10.3.	Tipificación molecular <i>in silico</i>	124
10.4.	Determinantes genéticos asociados a virulencia y resistencia antimicrobiana	128
10.4.1.	Genes asociados a la virulencia (VAGs)	128
10.4.2.	Genes asociados a la resistencia antimicrobiana (ARGs).....	131
10.5.	Contenido plasmídico y profágico	135
10.6.	Análisis filogenético	138
XI.	CONCLUSIONES.....	142
11.1.	Conclusión general	142
11.2.	Conclusiones específicas.....	142
XII.	PERSPECTIVAS DEL PROYECTO	144
XIII.	BIBLIOGRAFÍA.....	145
XIV.	ANEXOS	181
14.1.	Documentos complementarios	181
14.2.	Productos Académicos	182
XV.	SIGLAS Y ABREVIACIONES	189

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Contribución de elementos genéticos móviles en la evolución de <i>E. coli</i> patógena.....	19
2	Susceptibilidad antimicrobiana de aislados de <i>E. coli</i> de origen ambiental, animal y clínico.....	68
3	Perfiles de resistencia de aislados de <i>E. coli</i> de origen ambiental, animal y clínico por clase de antimicrobianos.....	71
4	Representación esquemática de la anotación funcional en RAST de secuencias codificantes de proteínas (CDS) de <i>E. coli</i> de origen ambiental, animal y clínico.....	77
5	Variabilidad del tamaño del genoma y secuencias codificantes (CDS) de <i>E. coli</i> de origen animal, ambiental y clínico.....	78
6	Perfil genotípico de VAGs en <i>E. coli</i> de origen ambiental, animal y clínico.....	86
7	Perfil genotípico de ARGs en <i>E. coli</i> de origen ambiental, animal y clínico.....	92
8	Perfil plasmídico de <i>E. coli</i> de origen ambiental, animal y clínico.....	95
9	Árbol filogenético Neighbor-Joining (NJ) de los 15 genomas de <i>E. coli</i> de origen ambiental, animal y clínico.....	104
10	Árbol filogenético NJ del grupo clonal ST4 basado en las distancias alélicas del esquema cgMLST.....	113

11	Árbol filogenético NJ del grupo clonal ST40 basado en las distancias alélicas del esquema cgMLST.....	114
12	Árbol filogenético NJ del grupo clonal ST69 basado en las distancias alélicas del esquema cgMLST.....	115
13	Árbol filogenético NJ del grupo clonal ST410 basado en las distancias alélicas del esquema cgMLST.....	116
14	Árbol filogenético NJ del grupo clonal ST617 basado en las distancias alélicas del esquema cgMLST.....	117
15	Árbol filogenético NJ del grupo clonal ST2279 basado en las distancias alélicas del esquema cgMLST.....	118

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1 Características generales de cepas patógenas intestinales de <i>E. coli</i> (InPEC).....	27
2 Clasificación molecular y funcional de enzimas β -lactamasas.....	37
3 Características de cepas de <i>E. coli</i> seleccionadas para la secuenciación del genoma completo.....	54
4 Patrones de resistencia y/o susceptibilidad a antibióticos de aislados de <i>E. coli</i> de origen ambiental, animal y clínico.....	69
5 Rasgos fenotípicos de resistencia asociados al origen de aislamiento de las cepas de <i>E. coli</i>	72
6 Características generales de los genomas de <i>E. coli</i> de origen ambiental, animal y clínico.....	76
7 Rasgos epidemiológicos de <i>E. coli</i> de origen ambiental, animal y clínico.....	81
8 Perfiles alélicos de MLST de <i>E. coli</i> de origen ambiental, animal y clínico.....	82
9 Replicones plasmídicos asociados a determinantes de resistencia antimicrobiana y virulencia en <i>E. coli</i> de origen ambiental, animal y clínico.....	96
10 Contenido profágico identificado en <i>E. coli</i> de origen ambiental, animal y clínico.....	99
11 Regiones profágicas asociadas a determinantes de resistencia antimicrobiana, virulencia y replicones plasmídicos en <i>E. coli</i> de origen ambiental, animal y clínico.....	100

I. RESUMEN

Las infecciones causadas por bacterias pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* resistentes a los antibióticos, incluyendo *Escherichia coli*, han ido en aumento a nivel mundial. La resistencia a los antibióticos (RA) es un fenómeno complejo y multidimensional que involucra el uso excesivo e inadecuado de los antibióticos en los sectores de salud humana, animal/agrícola y ambiental, así como el intercambio de material genético asociado a la resistencia conllevando al surgimiento, selección y diseminación de bacterias multirresistentes (MDR) dentro de esta triada ecológica. La implementación de técnicas de secuenciación masiva en paralelo representa una alternativa de estudio vanguardista en la vigilancia de la RA. El presente trabajo tuvo como objetivo analizar los determinantes de virulencia (VAGs), resistencia a antibióticos (ARGs), contenido plasmídico y profágico de 15 genomas de *E. coli* incluyendo cepas de origen ambiental, animal y clínico aisladas en Sinaloa y establecer las relaciones filogenéticas respecto a cepas provenientes de distintas fuentes de aislamiento y regiones geográficas del mundo. Se realizó secuenciación de genoma completo empleando la plataforma Illumina MiniSeq (2 × 150 pb). Los genomas ensamblados *de novo* se anotaron con el servidor RAST y se determinó de manera *in silico* el serogrupo, filogrupo y la tipificación multilocus de secuencias (MLST). La identificación de VAGs y ARGs se realizó con las bases de datos VirulenceFinder y ResFinder, respectivamente. Se establecieron las relaciones filogenéticas basado en MLST. Asimismo, se reconstruyeron filogenias basadas en el esquema de *core-genome* MLST (cgMLST) sobre los grupos clonales de alto riesgo identificados empleando una colección global genómica. El tamaño del genoma fue el esperado para *E. coli*. La tipificación *in silico* evidenció diversos perfiles genéticos en los genomas analizados. Se detectaron grupos clonales de relevancia clínica pertenecientes a los linajes ST4, ST40, ST69, ST410, ST617 y ST2279. Se identificaron múltiples VAGs implicados en la adherencia bacteriana, captación de hierro, proteínas autotransportadoras, producción de toxinas y sistemas de secreción, principalmente en cepas de origen clínico. Por otro lado, se identificaron ARGs que confieren resistencia a aminoglucósidos, anfenícolos, β-lactámicos, desinfectantes, fosfomicina, lincosamidas, macrólidos, quinolonas/fluoroquinolonas, tetraciclinas y trimetoprima/sulfametoxazol. Es importante resaltar la presencia de β-lactamasas de espectro extendido (BLEE; CTX-M-15) e integrones de clase 1 entre cepas de origen clínico y ambiental. Además, del reconocimiento de la nueva variante *fosA7.5* involucrada en la resistencia a fosfomicina en una cepa de origen ambiental obtenida en el 2013. Independientemente del origen de aislamiento, el análisis de cgMLST indicó que todos los aislados de *E. coli* se derivan del humano y fueron introducidas a los ambientes secundarios tales como el drenaje agrícola y estanques acuícolas. El contenido de VAGs, ARGs, plásmidos y profagos es diverso entre los genomas de *E. coli* provenientes de distintas fuentes de aislamiento.

Palabras clave: *Escherichia coli*, Secuenciación del genoma completo, MDR, grupos clonales de alto riesgo

II. ABSTRACT

Antibiotic-resistant infections caused by bacteria belonging to *Enterobacteriaceae*, including *Escherichia coli*, have been rising worldwide. Antibiotic resistance (AR) is a complex and multidimensional phenomenon that involves the excessive and inappropriate use of antibiotics in human, animal/agricultural, and environmental health sectors, and the exchange of genetic material associated with resistance, leading to the emergence, selection, and dissemination of multidrug-resistant (MDR) strains within this triad. Implementing next-generation sequencing technologies represents a cutting-edge alternative in the AR surveillance. The primary aim of this study was to analyze the virulence-associated genes (VAGs), antimicrobial resistance genes (ARGs), and plasmid and prophage contents of 15 *E. coli* genomes of environmental, animal, and human origin obtained from Sinaloa State and to establish the phylogenetic relationships with *E. coli* strains from diverse isolation sources and geographical locations. Whole-genome sequencing (WGS) was performed on the Illumina MiniSeq platform (2×150 bp). *De novo*-assembled genomes were annotated using the RAST server, and serotyping, phylogrouping, and multilocus sequence typing (MLST) were assessed *in silico*. Identification of VAGs and ARGs was performed using VirulenceFinder and ResFinder databases, respectively. An MLST-based phylogeny was reconstructed. In addition, core-genome MLST (cgMLST) analysis was performed on identified high-risk clones using a respective genomic global collection. Overall, all sequenced genomes were similar in length as expected for *E. coli*. *In silico* typing revealed genetic diversity among the studied *E. coli* genomes. Moreover, clinically relevant clonal groups were detected in our genomic dataset, namely ST4, ST40, ST69, ST410, ST617, and ST2279 lineages. Multiple VAGs categorized in bacterial adherence, iron uptake, autotransporter proteins, toxin production, and secretion systems were identified, mainly in human-sourced strains. On the other hand, several ARGs associated with aminoglycosides, amphenicols, β -lactams, disinfectants, fosfomycin, lincosamides, macrolides, tetracyclines, trimethoprim/sulfamethoxazole, and quinolones/fluoroquinolones resistance were identified. It is noteworthy that the presence of extended-spectrum β -lactamases (ESBL; *bla*_{CTX-M-15}) and class 1 integrons were detected only in human and environmental-sourced strains. Moreover, a novel *fosA7.5* variant involved in fosfomycin resistance was discovered in an environmental-sourced strain isolated in 2013. The cgMLST analysis indicated that all *E. coli* isolates are human-derived strains introduced into secondary habitats such as agricultural drainage and aquaculture ponds. The genetic content of VAGs, ARGs, plasmids, and prophages is diverse and independent of the source origin.

Keywords: *Escherichia coli*, WGS, MDR, high-risk clones

III. INTRODUCCIÓN

La resistencia a los antimicrobianos (RAM) es en uno de los principales problemas de salud pública del siglo XXI. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha catalogado la resistencia a antimicrobianos como una emergencia de seguridad sanitaria mundial que amenaza la prevención y el tratamiento efectivo de una gama cada vez mayor de infecciones causadas por virus, bacterias, hongos y parásitos (WHO, 2014). Particularmente, la problemática de la RAM es especialmente urgente con respecto a la resistencia a los antibióticos (RA). La RA es un fenómeno complejo y multidimensional que involucra el uso excesivo e inadecuado de los antibióticos en los sectores de salud humana, animal/agrícola y ambiental conllevando al surgimiento, selección y diseminación de bacterias multirresistentes dentro de esta triada (Prestinaci et al., 2015).

A nivel mundial, las infecciones causadas por bacterias pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* resistentes a los antibióticos, incluyendo *Escherichia coli*, han ido en aumento posicionándola en el primer lugar de la lista de patógenos de prioridad crítica de la OMS por sus elevadas tasas de resistencia a cefalosporinas de 3.^a generación, quinolonas/fluoroquinolonas y carbapenémicos (Tacconelli et al., 2017). *E. coli* es un microorganismo altamente versátil que forma parte de la microbiota intestinal del ser humano y mamíferos, así como de aves, reptiles y peces. Sin embargo, en humanos y animales es capaz de causar importantes síndromes diarreicos, infecciones del tracto urinario y del torrente sanguíneo, sintomatología que eleva las tasas de mortalidad por el fracaso en el tratamiento (Kaper et al., 2004).

Al aumento significativo de la resistencia a antibióticos en *E. coli* contribuye en gran medida la flexibilidad genómica de este microorganismo. Esta característica le permite la continua adquisición e intercambio de determinantes genéticos implicados en la resistencia a los antibióticos, los cuales suelen estar asociados a elementos genéticos móviles (MGEs – por sus siglas en inglés) como plásmidos, transposones e integrones que facilitan la diseminación de tales determinantes en el ambiente que la bacteria se encuentre habitando (Leimbach et al., 2013).

Datos generados en diversos estudios epidemiológicos realizados en el estado evidencian una alta proporción de resistencia a antibióticos en cepas de *E. coli* patógenas y no patógenas provenientes de reservorios humanos, no humanos y ambientales (Canizalez-Roman et al., 2013, 2016, 2019; Murillo Llanes et al., 2011; Uribe-Beltrán et al., 2017). No obstante, los métodos convencionales de susceptibilidad a antibacterianos tienen limitaciones en cuanto a la correcta caracterización de los atributos que confieren dicha resistencia. Por ello, la implementación de técnicas de secuenciación masiva en paralelo (NGS – por sus siglas en inglés) representan una alternativa de estudio y permiten generar contribuciones significativas en la vigilancia de la resistencia a los antibióticos.

Actualmente, es necesario comprender la relación entre *E. coli*, sus determinantes genómicos de virulencia y resistencia antimicrobiana y los probables mecanismos de diseminación. Para ello se requiere del empleo de estrategias multisectoriales como “*One Health*” y hacer uso de técnicas de alto rendimiento y poder resolutivo como las tecnologías de NGS. El objetivo del presente trabajo es analizar los determinantes de virulencia y resistencia a antibióticos en 15 genomas

de *E. coli* incluyendo cepas de origen ambiental, animal y clínico aisladas en Sinaloa, con respecto a genomas de *E. coli* provenientes de distintas regiones geográficas del mundo. Resultados de la implementación de este enfoque contribuirán a la generación de información sobre los rasgos genómicos que definen la virulencia y la resistencia a antibióticos en cepas de *E. coli* que circulan localmente y al potencial desarrollo de estrategias para un mejor control de la resistencia a antibióticos en México y el mundo.

IV. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1. Resistencia a los antimicrobianos

La resistencia a los antimicrobianos (RAM) es uno de los principales problemas de salud pública del siglo XXI. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha catalogado la resistencia antimicrobiana como una emergencia de seguridad sanitaria mundial que amenaza la prevención y el tratamiento efectivo de una gama cada vez mayor de infecciones causadas por virus, bacterias, hongos y parásitos que no son susceptibles a los medicamentos comúnmente empleados para su tratamiento (WHO, 2014). En ese sentido, la problemática de la RAM es especialmente urgente con respecto a la resistencia a los antibióticos debido a que amenaza los logros de la medicina moderna.

La resistencia a los antibióticos es un fenómeno complejo y multidimensional con una creciente preocupación mundial que involucra el uso excesivo e inadecuado de los antibióticos en los sectores de salud humana, animal/agrícola y ambiental; así como el desarrollo y la diseminación de una variedad de mecanismos de resistencia entre las bacterias pertenecientes a estos hábitats (Prestinaci et al., 2015). Lo anterior, ha permitido el surgimiento y la persistencia de bacterias multirresistentes (MDR – por sus siglas en inglés) dentro de esta triada ecológica teniendo un mayor impacto en bacterias patógenas de relevancia en medicina humana y veterinaria por la subsecuente ineficiencia de las terapias estándar, elevación en los costos de tratamiento, aumento del tiempo de hospitalización y el alza de las tasas de morbilidad y mortalidad que generan (Aslam et al., 2018).

Por ello, la comprensión de los diversos factores que genera y promueven la resistencia a los antibióticos es clave para abordar dicha problemática. Desde una perspectiva biológica, la resistencia a los antibióticos es un fenómeno evolutivamente natural en respuesta a la presión selectiva ejercida por una sustancia con efecto antibacteriano en determinado ambiente.

La mayoría de los antibióticos son producidos de manera natural por bacterias saprófitas y hongos ambientales, otros son de carácter semisintético y pocos son completamente sintéticos. En ese sentido, las bacterias han desarrollado diversos mecanismos para protegerse del efecto de estos fármacos, los cuales incluyen el impedimento de entrada o transporte del fármaco, alteraciones del sitio blanco o la producción de enzimas que degraden o modifiquen el fármaco (Holmes et al., 2016).

Inicialmente se especulaba que la producción de compuestos con actividades antimicrobianas por organismos saprófitos proveía una ventaja competitiva inhibiendo el desarrollo de otros microorganismos residentes en determinado nicho. No obstante, recientes descubrimientos sugieren una interacción más compleja. Ya que las concentraciones de compuestos antimicrobianos parecen ser bastante bajas para inhibir el crecimiento de otras bacterias. En consecuencia, las concentraciones subletales de dichos antimicrobianos tienen un efecto considerable en la fisiología y evolución bacteriana; éstos actúan como moléculas de señalización que afectan la expresión génica bacteriana, pudiendo aumentar la tasa mutacional en respuesta a la presión ejercida (Holmes et al., 2016).

Además de las mutaciones espontáneas, la adquisición e intercambio de material genético entre microorganismos en un ambiente determinado desempeñan

un papel clave en la evolución y diseminación de la resistencia antibacteriana. Lo anterior es impulsado especialmente por el fenómeno de la transferencia horizontal de genes (THG). Los mecanismos de THG son conjugación, transformación y transducción. Siendo la conjugación el que más impacta en la diseminación de la resistencia a antibióticos de microorganismos comensales y ambientales a especies patógenas (von Wintersdorff et al., 2016).

Por otra parte, el uso excesivo e inadecuado de los antibióticos en los diferentes sectores de salud humana, medicina veterinaria, agrícola y ambiental ha propiciado el incremento y selección de bacterias resistentes a los antibióticos (Allel et al., 2023; Aslam et al., 2018). Particularmente, en medicina humana se tienen prácticas que incrementan la adaptabilidad y persistencia de las bacterias patógenas resistentes a antibióticos, entre ellas se puede mencionar esquemas de tratamiento empírico, prescripción de regímenes inadecuados, uso prolongado de fármacos antibacterianos en ambientes hospitalarios, el desconocimiento y rango de actividad de los antibióticos por parte de la población general, la interrupción temprana del tratamiento, así como la automedicación (Prestinaci et al., 2015).

En el sector animal y medicina veterinaria, una proporción substancial de antibióticos es empleada inapropiadamente (Tiseo et al., 2020). En ese sentido, el uso de fármacos antibacterianos con fines de promoción del crecimiento, la prevención (profilaxis/metafilaxis) y el tratamiento de enfermedades en animales destinados para la producción de alimentos y acuicultura es probablemente uno de los principales contribuyentes al problema general de la resistencia antibacteriana a nivel mundial (Marshall & Levy, 2011). De igual manera, dentro del sector agrícola el

uso extensivo de ciertos antibióticos, empleados principalmente como pesticidas en el cultivo de árboles frutales, expone a las poblaciones bacterianas que habitan en la superficie y el suelo de los cultivos a cantidades subinhibitorias, ejerciendo una presión selectiva y favoreciendo el desarrollo de aquellos microorganismos resistentes frente a los susceptibles, alterando de manera radical la ecología microbiana (Stockwell & Duffy, 2012).

Por otro lado, el ambiente *per se* desempeña un papel importante en la diseminación de la resistencia a los antibióticos. El suelo es reconocido como el principal reservorio de genes asociados a la resistencia a los antibióticos, ya que la mayoría de los fármacos antibacterianos derivan de microorganismos productores saprófitos que son intrínsecamente resistentes. Asimismo, los cuerpos de agua fungen como vehículos facilitando la diseminación de bacterias resistentes entre los diferentes ecosistemas (Baquero et al., 2008; Prestinaci et al., 2015).

Debido a que la mayoría de las bacterias y los genes asociados a la resistencia a los antibióticos pueden moverse entre humanos, animales y el ambiente, las adaptaciones microbianas a causa del uso y la presión selectiva de antibióticos dentro de un sector se ve reflejado en otro; por lo que la resistencia antibacteriana es considerada un problema ecológico y su estudio no puede ser dirigido únicamente considerando el sector de la medicina humana. Por consiguiente, el abordaje de la resistencia a los antibióticos debe considerar su naturaleza compleja y aplicar aproximaciones multisectoriales como el de “Una salud” (*One health*) (Collignon & McEwen, 2019).

El concepto de “Una salud” se define como un enfoque colaborativo, multisectorial y transdisciplinario – que trabaja a nivel local, regional, nacional y global – para lograr resultados óptimos de salud y bienestar, reconociendo las interconexiones entre personas, animales, plantas y el entorno que comparten (Commission, 2020).

De esta manera, la integración de los elementos biológicos necesarios para el entendimiento de la evolución de la resistencia a los antibióticos, incluyendo los microorganismos y vectores implicados en su diseminación y emergencia, los organismos hospederos, y el ambiente involucrado, junto con las repercusiones culturales y socioeconómicas, pueden ser comprendidas mediante el abordaje de “Una salud”.

4.1.1. Impacto de la resistencia a antibacterianos y panorama mundial

En medicina humana, las infecciones a causa de microorganismos resistentes conducen a la falla terapéutica con antibióticos de primera línea, haciendo necesario la implementación de antibióticos de segunda o tercera línea, uso de equipo especializado, estadías más prolongadas en el hospital y procedimientos de aislamiento de los pacientes.

En la actualidad, diversos procedimientos de la medicina moderna dependen de la efectividad profiláctica de los antibióticos. Al respecto, procedimientos como cirugías, trasplante de órganos, tratamiento quimioterapéutico para cáncer, el cuidado intensivo de nacimientos prematuros y diagnóstico invasivo se han visto severamente obstaculizados con un aumento correspondiente en la morbilidad y mortalidad a causa de infecciones bacterianas secundarias. De hecho, las

infecciones causadas por bacterias multirresistentes son los principales factores que influyen en la morbilidad y mortalidad de pacientes sometidos a estos procedimientos (Prestinaci et al., 2015).

El impacto de la resistencia a los antibióticos en términos de morbilidad, mortalidad y costos de salud pública es difícil de estimar ya que deben tomarse en cuenta diversos factores. A pesar de ello, el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) de Estados Unidos registró una prevalencia anual para el 2013 de más de 2 millones de infecciones por microorganismos resistentes y al menos 23,000 decesos (CDC, 2013). Estas cifras aumentaron en 2019 a 2.8 millones y 35,000, respectivamente (CDC, 2019). En Europa, se registraron 400,000 infecciones por bacterias multirresistentes (*Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*) y 25,000 defunciones (ECDC/EMA, 2009).

En el 2014, el proyecto “*The Review on Antimicrobial Resistance (AMR)*” auspiciado por el Reino Unido realizó un análisis prospectivo al 2050 sobre el fenómeno de resistencia a antibióticos a nivel mundial, incluyendo predicciones del costo económico global y el costo humano. El estudio mostró una disminución del producto interno bruto (PIB) mundial del 2 – 3.5 %, lo que se traduce a costos superiores a los 100 mil millones de dólares y una mortalidad mundial cercana a los 10 millones cada año (RAR, 2014). No obstante, dicha predicción solamente contempló el impacto de un pequeño subgrupo de bacterias resistentes a los antibióticos: *S. aureus*, *K. pneumoniae* y *E. coli*, por lo que dichas predicciones podrían estar subestimadas.

Por otro lado, la OMS en su informe del 2014 “*Antimicrobial resistance: global report on surveillance*”, declara que 129 de los 194 países miembros que conforman la red de vigilancia epidemiológica, incluyendo México, reportan la presencia de infecciones resistentes a antibióticos. Dicho informe se centró en siete de los principales agentes patógenos de relevancia internacional para la salud pública (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *Salmonella* no tifoidea, especies de *Shigella* y *Neisseria gonorrhoeae*) (WHO, 2014). *E. coli* destaca por su amplia distribución mundial, casos de infecciones asociadas y sus altos niveles de resistencia a cefalosporinas de 3.ª generación y fluoroquinolonas, antibióticos utilizados ampliamente para el tratamiento de infecciones en la medicina humana y veterinaria.

Posteriormente, la OMS reunió un grupo de expertos en el 2017 que realizaron la estratificación de patógenos bacterianos de acuerdo con el tipo de resistencia que presentan y la urgente necesidad de investigación y desarrollo de nuevas estrategias de tratamiento efectivos (Tacconelli et al., 2017). Como resultado, la lista fue categorizada en tres niveles de prioridad:

- i) **Prioridad crítica:** *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y especies pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*.
- ii) **Prioridad alta:** *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter*, *Salmonella* spp. y *Neisseria gonorrhoeae*.
- iii) **Prioridad media:** *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Shigella* spp.

Es importante resaltar que bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*, incluyendo *E. coli*, están incluidas en la categoría de prioridad crítica, presentando resistencia a carbapenémicos y cefalosporinas de 3.^a generación.

Asimismo, el informe “*Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS) Report: Early Implementation 2020*” de la OMS presenta datos de vigilancia epidemiológica de la resistencia a antibióticos durante el 2018-2019 en 82 países inscritos al programa GLASS, de los cuales México no forma parte. Así, 66 países manifiestan la frecuencia de aislamiento y resistencia a antibióticos en ocho patógenos de prioridad alta (*Acinetobacter* spp., *E. coli*, *K. pneumoniae*, *N. gonorrhoeae*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *S. aureus* y *S. pneumoniae*) causantes de infecciones del torrente sanguíneo, tracto urinario, gastrointestinales y urogenital. Entre ellas, *E. coli* resultó el patógeno más frecuentemente aislado en casos de infecciones del torrente sanguíneo (51%) y de tracto urinario (89%); presentando proporciones variables de resistencia a carbapenémicos (0 – 35%), cefalosporinas de 3.^a generación (8 – 100%) y fluoroquinolonas (8 – 88%) en infecciones del torrente sanguíneo, así como a β -lactámicos (42 – 98%), carbapenémicos (0 – 38%), cefalosporinas de 3.^a y 4.^a generación (3 – 92%/ 2 – 89%), fluoroquinolonas (9 – 93%) y trimetoprima/sulfametoxazol (20 – 97%) en infecciones del tracto urinario (WHO, 2020).

4.2. Generalidades de *Escherichia coli*

Escherichia coli, originalmente designada como *Bacterium coli commune*, fue aislada a partir de heces de neonatos en 1885 por el microbiólogo Theodor von Escherich (Escherich, 1885). Sin embargo, no fue hasta 1954 que se nombró como

Escherichia coli en honor a su descubridor. *E. coli* es una bacteria con morfología bacilar, Gram negativa, anaerobio facultativo, mesófilo (óptimo 37°C), no esporulado y generalmente móvil (flagelos peritricos). Sus características bioquímicas principales son producción de ácido y gas a partir del metabolismo de la glucosa, fermentación de lactosa, producción de indol a partir del metabolismo del triptófano, capacidad de reducir nitratos a nitritos, producción de catalasa y carencia de la enzima citocromo oxidasa (Rodríguez-Angeles, 2002).

Taxonómicamente, *E. coli* pertenece al filo *Proteobacteria*, clase *Gammaproteobacteria*, orden *Enterobacterales*, familia *Enterobacteriaceae*, género *Escherichia* y especie *coli*. Esta bacteria forma parte de la microbiota intestinal del ser humano y mamíferos, así como de aves, reptiles y peces (Leimbach et al., 2013). *E. coli* es un organismo comensal de la microbiota intestinal y raramente ocasiona patología. Sin embargo, *E. coli* puede translocar el epitelio intestinal cuando las barreras gastrointestinales están comprometidas/alteradas o en situaciones de inmunosupresión y alcanzar otros sitios anatómicos convirtiéndose en un patógeno oportunista (Kaper et al., 2004; D. Yu et al., 2021).

El nicho ecológico de *E. coli* en el ser humano es la capa mucosa del colon donde desempeña procesos metabólicos esenciales para el hospedero, por ejemplo mediante la producción de vitamina K y B12, así como por el impedimento del establecimiento de bacterias patógenas en el intestino (Bentley & Meganathan, 1982). Es importante mencionar que la mucosa del colon presenta un alto recambio y favorece el desprendimiento de *E. coli* y su excreción en la materia fecal al ambiente.

Fuera del hospedero, *E. coli* debe adaptarse al desafío constante de los factores ambientales bióticos y abióticos que influyen su crecimiento y supervivencia. Factores entre los que se incluyen temperatura, oxígeno, humedad, radiación solar, pH, disponibilidad de nutrientes, incluso la competencia con otros microorganismos residentes (van Elsas et al., 2011). Sin embargo, la robustez, la flexibilidad metabólica y amplitud de sustratos que presenta *E. coli* permiten que persista tiempos prolongado con las condiciones fluctuantes del ambiente logrando establecerse y formar parte de las comunidades microbianas del suelo, agua y plantas (Berthe et al., 2013; van Elsas et al., 2011).

Además de la interacción hospedero-bacteria de *E. coli*, en la que esta última se desempeña como microorganismo comensal, la plasticidad que presenta su genoma por la adquisición de atributos inter- o intraespecíficos adaptativos y/o virulencia ha permitido que este microorganismo evolucione a variantes patógenas capaces de causar enfermedades y síndromes de relevancia para la salud pública de humanos y animales.

4.3. Evolución del genoma de *E. coli*

La estructura dinámica y plasticidad de un genoma bacteriano, se clasifica en dos categorías: genoma central (*core genome*) y genoma flexible o accesorio. El genoma central es el conjunto de genes altamente conservados, compartidos entre las distintas cepas de una misma especie y que participan en procesos celulares esenciales como el metabolismo, la replicación, transcripción y traducción. En cambio, el genoma flexible o accesorio engloba aquellos genes que se encuentran únicamente presentes en ciertas cepas bacterianas y que son responsables de las

diversas características adaptativas y fenotípicas en un ambiente específico. La unificación del genoma central y el genoma flexible o accesorio conforman el pan-genoma, es decir, el repertorio genético global en toda una especie bacteriana (Medini et al., 2005).

A diferencia del genoma central, cuya evolución se rige principalmente por mutaciones; la evolución del genoma flexible o accesorio se encuentra sujeta a la adquisición y pérdida continua de material genético. La ganancia y pérdida paralela de elementos genéticos móviles tales como bacteriófagos, plásmidos, islas genómicas, transposones (Tn) y elementos de secuencias de inserción (IS – por sus siglas en inglés), y su propagación mediante los mecanismos de transferencia horizontal de genes han permitido la evolución y la variabilidad del contenido genómico entre especies e intraespecies (Dobrindt, 2005; Medini et al., 2005).

En ese sentido, la diversidad genética y fenotípica que subyace a *E. coli* se encuentra reflejada en la plasticidad de su genoma. Esta característica es de particular interés por la capacidad de adquisición e integración de elementos genéticos accesorios, conllevando a una reorganización estructural tipo mosaico de su genoma y propiciando el surgimiento de nuevas variantes dentro de la misma especie. Es decir, desde *E. coli* comensales residentes del tracto gastrointestinal hasta una diversidad de cepas patógenas. Adicionalmente, la reducción genómica mediada por eventos de delección ha favorecido la adaptabilidad de las diferentes cepas a un nicho en particular (Leimbach et al., 2013).

En consecuencia, el tamaño del genoma de *E. coli* puede variar aproximadamente hasta en un millón de pares de bases (Mpb) entre una cepa

comensal y una variante patógena. Hecho demostrado en el análisis genómico comparativo entre la cepa de laboratorio *E. coli* K12 MG1655 y la cepa EDL933 causante de un brote epidemiológico asociado al consumo de carne molida en Estados Unidos. El estudio mostró que 4.1 Mpb se encontraban conservados en ambos genomas, registrándose un incremento de 1.34 Mpb en el genoma de EDL933 debido a la adquisición de 177 islas genómicas, un plásmido y la integración cromosómica de distintos bacteriófagos (Perna et al., 2001). Lo anterior, demostró el grado de diversidad entre dos miembros de la misma especie y la contribución de la THG en la patogénesis de dicha bacteria.

Paralelamente, el análisis mediante enfoques comparativos de datos genómicos provenientes de diversos aislados de *E. coli* ha revelado que el genoma central es altamente colinear entre los genomas, incluso, mostrando solamente hasta un 3% de divergencia nucleotídica. Por otra parte, la continua acumulación de información genómica demuestra la diversidad intra-específica en *E. coli* dilucidando la plasticidad que presenta su genoma, resultando en una estructura pan-genómica abierta (Leimbach et al., 2013). Mientras que el genoma típico de *E. coli* contiene aproximadamente 5,000 genes, distintos estudios genómicos comparativos han demostrado la contribución del genoma flexible o accesorio en el dinamismo evolutivo de *E. coli* y en el tamaño del genoma nuclear y pan-genoma (Kaas et al., 2012; Rasko et al., 2008; Touchon et al., 2009).

Recientemente, el análisis de 491 genomas de *E. coli* reveló diferencias substanciales entre el número de genes y el tamaño del genoma. Adicionalmente, el número de genes que constituyen el genoma central y el pan-genoma resultó de 867

y 43,415 genes, respectivamente (Z.-K. Yang et al., 2019). Por ende, la secuenciación de nuevos genomas conlleva al descubrimiento de nuevos genes dentro de la especie extendiendo el tamaño del pan-genoma continuamente.

Si bien el contenido genético adicional suele conceder rasgos importantes de adaptabilidad y flexibilidad metabólica; la asociación de atributos de virulencia o resistencia a agentes antimicrobianos con elementos genéticos móviles resulta alarmante. Esto, debido a que las islas de patogenicidad (PAIs) e islas de resistencia (RIs) – subgrupos de islas genómicas – fungen como sitios de integración génica agrupando una enorme variedad de determinantes de virulencia y de resistencia, respectivamente. Por lo que diversos fenotipos patogénicos y de resistencia pueden ser adquiridos simultáneamente entre los distintos linajes de *E. coli*, permitiendo la evolución de clonas separadas (Figura 1) (Leimbach et al., 2013).

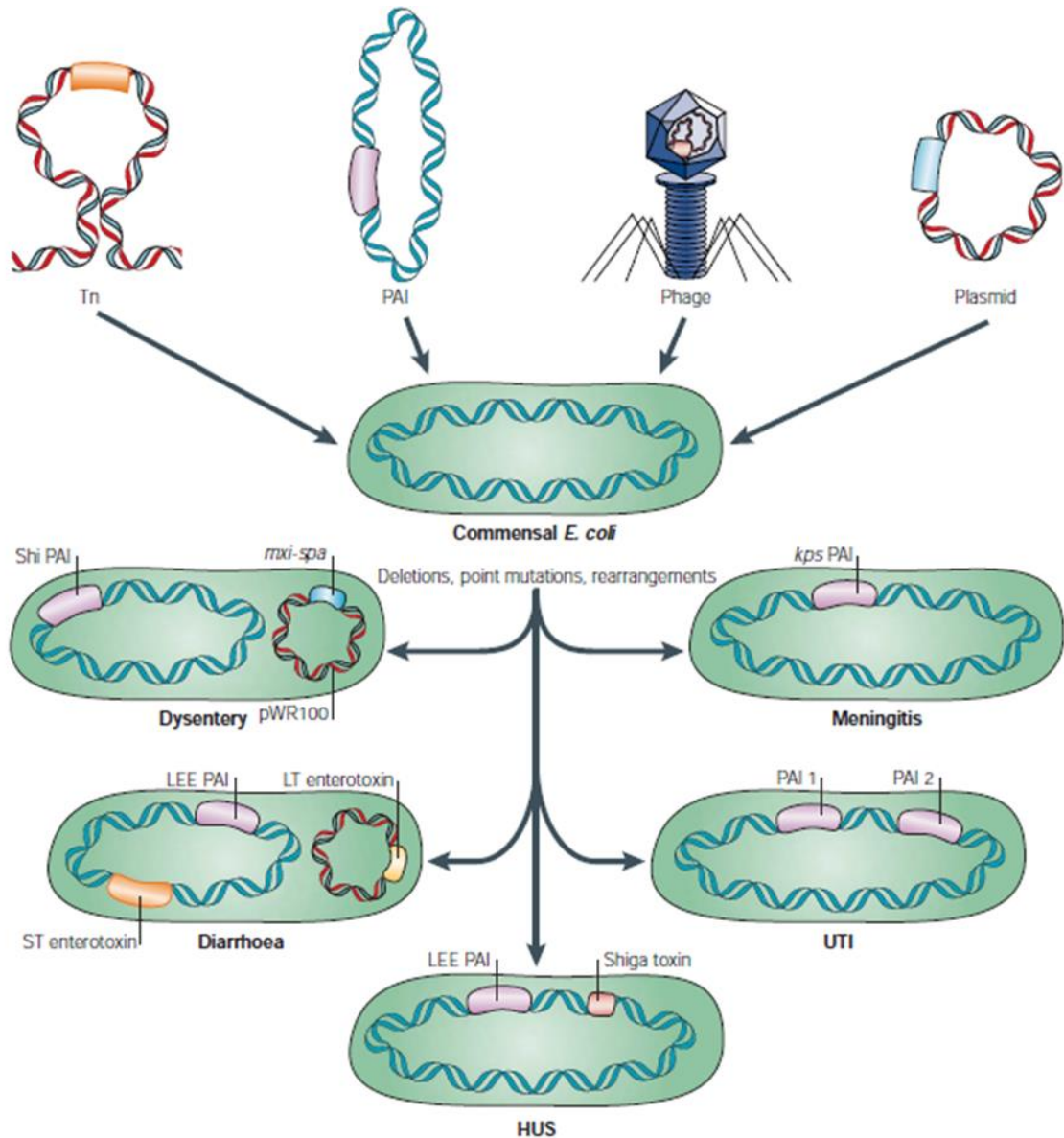


Figura 1. Contribución de elementos genéticos móviles en la evolución de *E. coli* patógena. Los factores de virulencia de *E. coli* pueden encontrarse codificados en elementos genéticos móviles, incluyendo transposones (Tn) (ST de ETEC), plásmidos (LT de ETEC/factores de invasión en EIEC), bacteriófagos (Stx en EHEC) e islas de patogenicidad (PAIs) – (LEE de EPEC/EHEC; PAIs I y II de UPEC). Las cepas comensales de *E. coli* sufren alteraciones como deleciones, mutaciones puntuales, rearrreglos cromosómicos que contribuyen a su diversidad genética. Modificada de Kaper et al. (2004).

4.4. *E. coli* patógena

La adquisición y el conjunto de combinaciones de factores de virulencia (FV) ha originado el desarrollo de linajes patogénicos exitosos – denominándoseles patotipos – capaces de causar enfermedades y síndromes de gran relevancia para la salud pública en humanos y animales. De acuerdo con el sitio anatómico de infección y el cuadro clínico que ocasionan, las variantes patógenas de *E. coli* son clasificadas en *E. coli* patógenas intestinales (InPEC – por sus siglas en inglés) y *E. coli* patógenas extraintestinales (ExPEC – por sus siglas en inglés) (Kaper et al., 2004; Nataro & Kaper, 1998).

4.5. *E. coli* patógenas intestinales (InPEC)

Las variantes InPEC comprenden un grupo de cepas causantes de importantes enfermedades de tipo entéricas/diarreicas. Estas bacterias se subclasifican basado en el conjunto de factores de virulencia que portan, tropismo tisular, mecanismos de infección/colonización, y manifestaciones clínicas en siete diferentes patotipos: *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enterohemorrágica/productora de toxina Shiga (EHEC/STEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC, incluye *Shigella* spp.), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* de adherencia difusa (DAEC), y *E. coli* adherente-invasiva (AIEC) (Gomes et al., 2016; Kaper et al., 2004). Las características respectivas al sitio anatómico de colonización, cuadro clínico producido, reservorios y factores de virulencia de los patotipos InPEC se muestran en el Cuadro 1.

4.5.1. *E. coli* enteropatógena (EPEC)

Las cepas EPEC son un grupo de bacterias patógenas conocidas por su habilidad de formar lesiones distintivas sobre la superficie de las células epiteliales del intestino denominadas lesiones de “adherencia y esfacelamiento” (A/E). Estas se caracterizan por la degeneración de las microvellosidades y la alteración de la morfología de la región apical del enterocito debido a la polimerización de actina del citoesqueleto, formando estructuras en forma de pedestal en el sitio de unión de la bacteria (Vidal et al., 2007). Esta particularidad, además de no producir toxina tipo Shiga (Stx), distingue a las cepas EPEC de otros patotipos InPEC.

La habilidad fenotípica de inducir lesiones A/E es atribuible a los genes dentro del Locus de Esfacelamiento Enterocítico (LEE), PAI que contiene 41 marcos de lectura abiertos (ORFs) entre los que figuran los genes codificantes de la intimina (*eae*) y el receptor translocado para intimina (*tir*), así como otras proteínas efectoras que son secretados mediante un sistema de secreción tipo III (SSTIII) (Kaper et al., 2004). Por otra parte, estas cepas pueden ser clasificadas a su vez en subtipos típicos (tEPEC) y atípicos (aEPEC) basado en la presencia o ausencia del plásmido del factor de adherencia de EPEC (pEAF), respectivamente (Trabulsi et al., 2002).

4.5.2. *E. coli* enterotoxigénica (ETEC)

El grupo ETEC se considera el principal agente etiológico de la diarrea del viajero y diarreas endémicas en los países subdesarrollados, aislándose de portadores sintomáticos y asintomáticos. Las cepas ETEC son un importante agente causal de diarrea infantil en países en desarrollo, donde están asociadas a tasas de mortalidad altamente significativas (Nataro & Kaper, 1998). Adicionalmente, la

industria porcina se ve afectada negativamente ya que la diarrea neonatal y posdestete por ETEC causa elevadas tasas de morbi-mortalidad en cerdos.

Las cepas ETEC se caracterizan por la producción de la enterotoxina termolábil (LT), enterotoxina termoestable (ST), o ambas simultáneamente, junto con proteínas de superficie denominados factores de colonización (CFs) para la adherencia al epitelio intestinal. Los CFs se encuentran principalmente asociados a plásmidos (Croxen et al., 2013). La enterotoxina LT es codificada por el gen *eltAB* y se encuentra estrechamente relacionada en estructura y función con la enterotoxina CT expresada por *Vibrio cholerae*. Por otra parte, la toxina ST es codificada por el gen *estA* y contiene múltiples residuos de cisteína cuyos enlaces disulfuro contribuyen a la termo-estabilidad de esta toxina (Croxen et al., 2013; Nataro & Kaper, 1998).

4.5.3. *E. coli* enterohemorrágica/productora de toxina Shiga (EHEC/STEC)

Las cepas EHEC/STEC son un grupo de patógenos transmitidos por alimentos y de distribución mundial. La característica distintiva y factor de virulencia principal del grupo EHEC/STEC es la producción de toxina Stx. Adicionalmente y al igual que en cepas EPEC, las cepas EHEC generan lesiones A/E en el epitelio intestinal. En conjunto, EHEC/STEC provocan desde diarreas leves hasta colitis hemorrágica (CH); cuadros clínicos que pueden progresar a cuadros más severos como el síndrome urémico hemolítico (SUH). En este grupo, el principal serotipo asociado a enfermedades humanas y aislado con mayor frecuencia en los brotes epidémicos es EHEC O157:H7 (Croxen et al., 2013; Nataro & Kaper, 1998).

La secuencia de la toxina Stx (*stx*) se encuentra asociada al genoma de bacteriófagos lamboides, los cuales se rigen por ciclos lisogénicos que culminan con

la integración de su material genético al genoma bacteriano. La toxina Stx se clasifica en dos tipos: Stx1 y Stx2. Stx1 presenta tres subtipos (a, b, d); mientras que Stx2 presenta siete variantes (a – g). Las cepas integrantes del grupo EHEC/STEC pueden expresar solamente alguna de las variantes de Stx1, Stx2 o ambas toxinas simultáneamente; siendo las variantes de Stx2 las asociadas con enfermedades más severas en humanos (Gyles, 2007).

4.5.4. *E. coli* enteroinvasiva (EIEC)

Shigella spp. y el grupo EIEC están estrechamente relacionado bioquímica-, genética- y taxonómicamente; ambos son patógenos intracelulares facultativos y agentes etiológicos de la disentería bacilar (Nataro & Kaper, 1998). Su sitio de infección es la mucosa colónica.

Las cepas pertenecientes al grupo EIEC son patógenos altamente invasivos que utilizan el medio intracelular de células del epitelio intestinal como su nicho replicativo, lo que conduce a la destrucción epitelial y una elevada respuesta inflamatoria. La capacidad invasiva de EIEC depende de la presencia del plásmido de invasión (pINV), el cual alberga factores de virulencia incluyendo componentes del SSTIII (Mxi-Spa) y cerca de 25 proteínas efectoras con actividades implicadas en la supresión de la respuesta inmunológica, reorganización y alteración del citoesqueleto, así como la producción de enterotoxinas de *Shigella* 1 y 2 (ShET1/ShET2) (Croxen et al., 2013; Gomes et al., 2016).

4.5.5. *E. coli* enteroagregativa (EAEC)

El grupo EAEC incluye cepas de *E. coli* que no secretan enterotoxinas LT o ST y presentan un fenotipo de adherencia denominado “adherencia agregativa (AA)” sobre la superficie de células HEp-2 en cultivo, así como en la superficie de cubreobjetos libres de células HEp-2. El fenotipo AA se caracteriza por la prominente auto-aglutinación de las células bacterianas en una configuración similar a ladrillos apilados (Kaper et al., 2004). Este patotipo afecta a la población de países desarrollados y en vías de desarrollo, donde con frecuencia es reconocido como agente causal de diarrea persistente en adultos y principalmente infantes, así como la segunda causa más común de la diarrea del viajero, después de ETEC (Okhuysen & Dupont, 2010).

El mecanismo patogénico y de colonización del grupo EAEC es bastante complejo y las cepas que integran dicho patotipo son bastante heterogéneas en cuanto a su contenido de genes de virulencia. El fenotipo AA es producido por la participación de adhesinas fimbriales tipo AAF y afimbriales cuya expresión y biogénesis se encuentra regulada por AggR. Estas adhesinas están codificadas en el plásmido de virulencia pAA (Croxen et al., 2013). Asimismo, se ha descrito la participación de diversas toxinas con efectos citotóxicos o enterotóxicos dentro de la patogénesis de EAEC. Esto incluye la citotoxina Pet, perteneciente a la familia de Serina Proteasas Autotransportadoras de *Enterobacteriaceae* (SPATE – por sus siglas en inglés), la enterotoxina termoestable EAST1, la SPATE Pic y enterotoxinas ShET1 y ShET2 (Clements et al., 2012).

4.5.6. *E. coli* de adherencia difusa (DAEC)

El patotipo DAEC se constituye por cepas que fenotípicamente presentan patrones de adherencia no característico en cultivo celular, por ejemplo, de adherencia localizada (LA), lesiones A/E o AA. En cambio, las cepas DAEC exhiben un patrón inespecífico denominado adherencia difusa (DA). Tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo, las cepas DAEC han sido asociadas a brotes diarreicos en infantes menores de 12 meses (Jafari et al., 2012; Kaper et al., 2004).

El patrón de DA es mediado, principalmente, por el conjunto de adhesinas no fimbriales pertenecientes a la familia de adhesinas Afa/Dr. Los miembros que integran la familia Afa/Dr son las adhesinas AfaE-I, AfaE-II, AfaE-III, AfaE-V, Dr, Dr-II, F1845 y NFA-I. Todos los miembros de la familia Afa/Dr tienen como diana el factor de aceleramiento del deterioro (DAF), molécula altamente expresada sobre la superficie apical de los enterocitos. La unión de Afa/Dr – DAF induce cambios conformacionales en el citoesqueleto de la célula epitelial ocasionando la destrucción e incluso el reordenamiento de las microvellosidades. Asimismo, la participación de la SPATE Sat en la patogénesis de DAEC ha sido ampliamente evidenciada (Clements et al., 2012).

Debido a la enigmática naturaleza del grupo DAEC en cuanto a sus perfiles de FV asociados en la infección, los datos epidemiológicos permanecen inciertos. De igual forma, hasta el momento se desconocen los mecanismos de transmisión y los posibles reservorios (Servin, 2014). Por otra parte, si bien se ha considerado que los adultos mayores se vuelven portadores asintomáticos, se ha especulado que en este

grupo de pacientes la colonización puede desencadenar enfermedades inflamatorias intestinales (IBD – por sus siglas en inglés), como la enfermedad de Crohn (CD – por sus siglas en inglés) (Croxen et al., 2013).

4.5.7. *E. coli* adherente-invasiva (AIEC)

El patotipo AIEC, a diferencia de los grupos patógenos anteriormente descritos, tiene la habilidad fenotípica de adherirse e invadir las células epiteliales del intestino, así como internalizarse y replicarse dentro de macrófagos sin inducir la muerte de éstos (Glasser et al., 2001). El grupo AIEC ha sido implicado como uno de los agentes causales de enfermedades inflamatorias intestinales, tales como CD y colitis ulcerativa (UC – por sus siglas en inglés). Lo anterior, como resultado de la alta prevalencia de cepas AIEC encontrada en pacientes con CD (Darfeuille-Michaud et al., 2004). Si bien los factores genéticos involucrados en este fenotipo de adherencia/invasión no se encuentran del todo definidos, la secuenciación del genoma ha contribuido a la identificación de potenciales determinantes de virulencia asociados a AIEC: sistema de secreción tipo VI (SSTVI), fimbria tipo 1, varios reguladores transcripcionales de genes de virulencia, y genes implicados en la captación de hierro (Nash et al., 2010). Estudios más recientes sugieren que la proteína IbeA parece desempeñar el papel central en el proceso de invasión en cepas AIEC (Cieza et al., 2015). Aunque los datos epidemiológicos respecto a su rol patogénico y prevalencia continúan siendo escasos, la información disponible muestra una correlación entre la presencia de AIEC y la ocurrencia de la enfermedad de Crohn y colitis ulcerativa, haciendo de este patotipo una amenaza para la salud y blanco terapéutico relevantes (Lee et al., 2019).

Cuadro 1. Características generales de cepas patógenas intestinales de *E. coli* (InPEC).

Patotipo	Hospedero	Sitio de colonización	Cuadro clínico	Reservorios	Factores de virulencia
tEPEC	Niños < 5 años y adultos	Intestino delgado	Diarrea acuosa	Humanos	LEE, Intimina, Tir, SSTIII, pEAF, BFP, <i>perABC</i>
aEPEC	Adultos y niños			Humanos y animales	LEE, Intimina, Tir, SSTIII
ETEC	Niños < 5 años, Viajeros, personas inmunocomprometidas	Intestino delgado	Enfermedad del viajero; diarrea acuosa y persistente	Humanos y animales	ST, LT, CF
EHEC/STEC	Adultos y niños	Colon e íleon distal	Diarrea acuosa, colitis hemorrágica y SUH	Humanos y animales	LEE, Stx1, Stx2, pO157
EIEC	Niños < 5 años, Viajeros, personas inmunocomprometidas	Colon	Disentería	Humanos y animales	pINV, VirF, VirB, <i>mxi</i> , <i>spa</i> , ShET1/2
EAEC	Adultos y niños	Intestino delgado y grueso	Enfermedad del Viajero y diarrea persistente	Portadores adultos	pAA, AAF, AggR, Pet, EAST1, Pic, ShET1
DAEC	Adultos y niños	Intestino	Diarrea acuosa persistente, enfermedad de Crohn	Desconocido	Adhesinas Afa/Dr, Sat
AIEC	Adultos y niños	Íleon	Enfermedad de Crohn	Desconocido	OmpA, IbeA, Lpf, Fimbria tipo 1

4.6. *E. coli* patógenas extraintestinales (ExPEC)

Las cepas ExPEC comprenden un grupo de cepas de *E. coli* epidemiológica- y filogenéticamente diferentes a las cepas comensales y variantes InPEC. Si bien, las cepas ExPEC son consideradas incapaces de causar enfermedades entéricas, pueden colonizar de forma eficiente el tracto gastrointestinal del hospedero, inclusive llegando a ser la variante más predominante en el 20% de individuos sanos (Russo & Johnson, 2000).

A diferencia del grupo InPEC, las cepas integrantes del grupo ExPEC presentan una amplia diversidad genómica al portar combinaciones bastante heterogéneas de genes asociados a la virulencia, incluyendo múltiples variantes de adhesinas, toxinas, cápsulas de polisacáridos, invasinas y sistemas de captación de hierro. Por lo tanto, las cepas ExPEC pueden causar enfermedades fuera del intestino. Por su diversidad genética, el grupo ExPEC incluye importantes patógenos para humanos y animales sanos, por lo que son definidas principalmente con base en su sitio de aislamiento. Los grupos ExPEC clínicamente más relevantes son *E. coli* uropatogénicas (UPEC), *E. coli* casusantes de meningitis neonatal (NMEC), *E. coli* septicémica (SEPEC) y *E. coli* patogénica aviar (APEC) (Ewers et al., 2007; J. R. Johnson & Russo, 2018).

4.6.1. *E. coli* uropatógenas (UPEC)

Las cepas UPEC son la principal causa mundial de infecciones del tracto urinario (ITU) adquiridas en la comunidad, ocasionando principalmente cuadros clínicos de cistitis y pielonefritis aguda (Croxen & Finlay, 2010). Se ha estimado que las cepas UPEC son responsables del 70 – 95% de casos de ITU adquiridas en la

comunidad y del 50% de ITU adquiridas en ambiente hospitalario, incrementando tasas de morbilidad, mortalidad y monto de gastos médicos; especialmente en individuos que cursan ITU recurrentes (ITU-R) (Foxman, 2010). El principal reservorio de cepas UPEC se cree que es el tracto gastrointestinal humano. Las cepas UPEC emplean un amplio repertorio de factores de virulencia para colonizar e infectar el tracto urinario de manera ascendente; sin embargo, existe evidencia de que UPEC puede ser transmitido por el consumo de comida contaminada y mediante vía sexual (Foxman, 2010; Wiles et al., 2008).

El proceso patogénico de UPEC durante la ITU implica las siguientes etapas: i) colonización de la uretra; ii) ascensión a la vejiga y crecimiento celular planctónico en la orina; iii) adherencia e interacción con el epitelio de la vejiga; iv) formación de biopelícula; v) invasión y replicación dentro del epitelio de la vejiga formando comunidades bacterianas intracelulares (IBCs – por sus siglas en inglés) quiescentes; y vi) colonización y daño al tejido renal incrementando el riesgo de bacteriemia/septicemia (Terlizzi et al., 2017). Distintos FV altamente regulados contribuyen de manera orquestada en este complejo proceso infeccioso, incluyendo componentes estructurales como el lipopolisacárido (LPS), los polisacáridos capsulares, el flagelo, las vesículas de membrana externa (OMVs – por sus siglas en inglés), las proteínas de membrana externa (OMPs – por sus siglas en inglés), múltiples adhesinas fimbriales/no fimbriales, así como la producción y secreción de toxinas y sistemas de captación de hierro (Terlizzi et al., 2017).

La heterogeneidad respecto a los atributos de virulencia con el que cuentan las cepas UPEC hace casi imposible definir un perfil fenotípico característico. Sin

embargo, la expresión de fimbrias tipo 1 y P, hemolisina, SPATE Sat, factor necrosante citotóxico tipo 1 (CNF1), aerobactina, resistencia al suero y producción de cápsula se asocian epidemiológicamente a cepas causantes de cistitis y pielonefritis aguda (J. R. Johnson & Russo, 2018).

4.6.2. *E. coli* asociada a meningitis neonatal (NMEC)

Las cepas integrantes del grupo NMEC son la causa más frecuente de meningitis asociada a bacterias Gram negativas en recién nacidos; estas infecciones alcanzan tasas de mortalidad del 15 al 40%, mientras que hasta el 50% de los individuos sobrevivientes presentan secuelas neurológicas severas tales como convulsiones, hidrocefalia, encefalopatías y retraso en el neurodesarrollo (Chu et al., 2014; Dale & Woodford, 2015).

La patogénesis de NMEC es un proceso bastante complejo que involucra la translocación bacteriana del lumen intestinal o tracto urinario hacia el torrente sanguíneo y posterior colonización del sistema nervioso central. Este proceso transcurre sin daño aparente de la barrera hematoencefálica, pero provoca inflamación meníngea, pleocitosis del líquido cefalorraquídeo (LCR) y daño neuronal (Croxen & Finlay, 2010). La infección comienza con la replicación bacteriana ($> 10^3$ UFC/ml de sangre) y su diseminación vía hematógena hasta lograr la penetración de la barrera hematoencefálica mediada por mecanismo transcelular y paracelular de las células endoteliales microvasculares cerebrales (CEMB), así como mediante la invasión de macrófagos (Breland et al., 2017; Mittal et al., 2011).

De modo similar a lo que ocurre en UPEC, la expresión de una diversidad de genes asociados en la virulencia bacteriana contribuye en la patogénesis de las

cepas NMEC. Los determinantes de virulencia fuertemente relacionados con la capacidad invasiva de la barrera hematoencefálica y la habilidad de causar meningitis neonatal incluyen las proteínas de invasión del endotelio cerebral (IbeA, IbeB, IbeC), proteínas de membrana externa OmpA, AsIA, expresión del antígeno capsular K1, adhesinas fimbriales (tipo 1, -P, -S) y toxina CNF1 (Breland et al., 2017; Croxen & Finlay, 2010).

4.7. Mecanismos de resistencia a antibióticos en *E. coli*

La resistencia a los antibióticos es el resultado de las diversas estrategias ejercidas por las bacterias para evadir los mecanismos de acción de un fármaco en su contra. Estos fármacos son categorizados de acuerdo al proceso que involucran: i) modificación e inactivación del fármaco antibiótico; ii) disminución en la permeabilidad y aumento en expulsión del antibiótico; iii) alteraciones en el sitio blanco; y iv) adaptación global de la célula bacteriana mediada por la modulación de distintas rutas metabólicas (Munita & Arias, 2016).

El aumento significativo de la resistencia a antibióticos en *E. coli* ha obstaculizado el tratamiento y el manejo apropiado de las infecciones que este microorganismo ocasiona en humanos y animales, especialmente por la multirresistencia que posee frente a los antibióticos de primera línea. Las principales clases de antibióticos empleados para el tratamiento de las infecciones humanas de tipo comunitarias y de ambiente hospitalario, así como en medicina veterinaria por cepas de *E. coli* resistente a los antibióticos son los aminoglucósidos, β -lactámicos, anfenicoles, fosfomicina, macrólidos, quinolonas, trimetoprima/sulfametoxazol y, más

recientemente, polimixinas para el caso particular de infecciones por cepas de *E. coli* MDR.

4.7.1. Mecanismos de resistencia a aminoglucósidos

Los aminoglucósidos son un grupo de fármacos que presentan un anillo aminociclitol unido a azúcares aminados, teniendo una actividad de amplio espectro contra bacterias Gram positivas y Gram negativas. Particularmente, los aminoglucósidos se unen al ARN ribosómico (ARNr) 16S, componente de la subunidad ribosómica 30S, inhibiendo la síntesis de proteínas. Dentro de este grupo farmacológico, los miembros más representativos empleados para el tratamiento de infecciones humanas y de origen animal son amikacina, estreptomicina, gentamicina, kanamicina, neomicina y tobramicina. No obstante, su administración requiere un monitoreo constante para limitar su potencial nefrotoxicidad y ototoxicidad (Mella M. et al., 2004).

En *E. coli* se han descrito diversos mecanismos de resistencia a aminoglucósidos destacando i) la inactivación enzimática mediada por enzimas modificadoras de aminoglucósidos (EMAs); ii) alteraciones en el sitio de unión ribosómico; y iii) modificaciones en la membrana celular y bombas de expulsión. La inactivación mediada por EMAs es el mecanismo de resistencia más frecuentemente identificado.

La familia de las EMAs se subdivide en función de la reacción de acetilación, fosforilación o adenilación de los grupos aminos e hidroxilos de la molécula del aminoglucósido, ocasionando una disminución en la unión del fármaco al ribosoma bacteriano. Por lo tanto, las EMAs se clasifican en *N*-acetiltransferasas (AACs), *O*-

fosfotransferasas (APHs) y O-nucleotidiltransferasas (ANTs), respectivamente. Cabe destacar que los genes codificantes de las EMAs son altamente movilizables debido a que están codificados en plásmidos, integrones, transposones y otros elementos genéticos móviles, en conjunto con genes de resistencia a otros agentes antibacterianos (Ramirez & Tolmasky, 2010).

Por otra parte, la alteración del sitio de unión ribosómico es lograda por la acción de enzimas denominadas metiltransferasas del ARNr 16S (RMTasas), mismas que adicionan un grupo metilo en las posiciones G1405 y A1408 del sitio "A" de la subunidad ARNr 16S confiriendo altos niveles de resistencia a la mayoría de los miembros que integran los aminoglucósidos. Los genes codificantes de las RMTasas se encuentran asociados en plásmidos conjugativos que portan genes adicionales de resistencia a antibióticos, siendo las enzimas ArmA y RmtB las más prevalentes en *E. coli* (Griffey et al., 1999; J. Yang et al., 2011).

Debido a la estructura catiónica e hidrofílica que presentan los aminoglucósidos, ha sido hipotetizado que éstos atraviesan la membrana externa bacteriana a través de canales de difusión denominados porinas. No obstante, bacterias mutantes deficientes de porinas son capaces de captar continuamente aminoglucósidos; por lo que ha sido planteado que éstos interactúan con la membrana externa, desestabilizándola e ingresando directamente a la célula bacteriana. Por ello, la modificación en la permeabilidad de la membrana mediante la alteración de las cargas electrostáticas del LPS constituye un mecanismo de resistencia contra aminoglucósidos. Un ejemplo de esto, el adicionamiento de fosfoetanolamina (pENT) al motivo del lípido A del LPS (Garneau-Tsodikova & Labby, 2016).

Respecto a los sistemas de expulsión, la bomba de eflujo a múltiples drogas AcrAD-TolC, miembro de la familia de transportadores resistencia-nodulación-división (RND – por sus siglas en inglés), desempeña un importante papel en la resistencia intrínseca a aminoglucósidos en bacterias Gram negativas, incluyendo *E. coli* (Aires & Nikaido, 2005).

4.7.2. Mecanismos de resistencia a β -lactámicos

Los antibióticos β -lactámicos comprenden un extenso grupo de moléculas con propiedades bactericidas y están definidos estructuralmente por la presencia de un anillo β -lactámico. En general, los β -lactámicos interrumpen la biosíntesis de la pared celular bacteriana como resultado de su interacción con las proteínas ligadoras de penicilina (PBPs – por sus siglas en inglés), enzimas que catalizan las reacciones de transpeptidación de los precursores de peptidoglicano, interfiriendo así con el entrecruzamiento del peptidoglicano y generando la desestabilización de la pared celular y la consecuente lisis bacteriana (Tooke et al., 2019).

En la actualidad, los agentes pertenecientes a las clases de las penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos y monobactámicos se emplean principalmente en la práctica médica humana y veterinaria. El uso extensivo, excesivo e inadecuado de estos antibióticos ha conducido a la emergencia y diseminación de la resistencia. A este respecto, se han descrito múltiples mecanismos de resistencia en *E. coli*: i) la modificación de su sitio blanco (mutación en o expresión de PBPs alternativas); ii) la reducción en la permeabilidad celular por la disminución en la expresión o mutaciones en genes codificantes de porinas, tales como OmpF y OmpC; iii) la sobreexpresión de sistemas de eflujo, particularmente la bomba AcrAB-TolC; y iv) la

producción de enzimas degradativas, es decir, β -lactamasas. Este último, es el principal mecanismo de resistencia a los β -lactámicos descrito en *E. coli* (Matlashewski et al., 2017).

4.7.2.1. β -lactamasas

Las β -lactamasas son una extensa familia de enzimas producidas por bacterias Gram positivas y Gram negativas que catalizan la hidrólisis del enlace amida en el anillo β -lactámico, inactivando la molécula antibiótica. Actualmente, un gran número de genes codificantes de β -lactamasas (*bla*) continúan describiéndose en cepas de *E. coli* de origen humano y animal; genes que forman parte del cromosoma bacteriano o se localizan en elementos genéticos móviles. En *E. coli*, las β -lactamasas cromosómicas (tipo AmpC) son intrínsecas, pero no suelen conferir una resistencia significativa debido al bajo nivel de expresión constitutiva. En cambio, las β -lactamasas adquiridas (TEM, SHV, CTX-M) son responsables de conferir altos niveles de resistencia a fármacos β -lactámicos (Tooke et al., 2019).

Actualmente, las β -lactamasas son clasificadas empleando dos sistemas, el Ambler y Bush-Jacoby-Medeiros (Cuadro 2). El sistema Ambler divide a las enzimas en cuatro clases (A, B, C, D) basado en la secuencia aminoacídica y su mecanismo de hidrólisis de sustrato. Las clases A, C y D poseen serina en su centro catalítico y las de clase B, denominadas metalo- β -lactamasas, requieren iones divalentes de Zinc para efectuar la hidrólisis del sustrato (Ambler, 1980).

Por otro lado, el sistema Bush-Jacoby-Medeiros clasifica las enzimas con base en su perfil funcional, incluyendo la especificidad del sustrato y su patrón de inhibición, y las agrupa principalmente en tres grupos y varios subgrupos (Bush et al.,

1995). Si bien, más de 1,000 variantes de β -lactamasas con distintas afinidades frente a β -lactámicos se han descrito, destacan por su impacto clínico y epidemiológico las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) [TEM, SHV, CTX-M], cefalosporinasas (AmpC, CMY) y carbapenemasas (KPC, IMP, NDM, VIM, OXA).

Cuadro 2. Clasificación molecular y funcional de enzimas β -lactamasas.

Clasificación Ambler	Clasificación Bush-Jacoby-Medeiros	Perfil inhibitorio	Espectro de actividad	Enzimas representativas
C	1	---	Penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas, monobactámicos	AmpC, CMY, ACT, FOX, DHA, ACC, MOX
A	2be	Ácido clavulánico	Penicilinas, cefalosporinas de reducido y amplio espectro, monobactámicos, carbapenémicos	TEM, SHV, CTX-M, KPC
D	2d		Penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos, carbapenémicos	OXA
B	3	EDTA	Mayoría de β -lactámicos	VIM, IMP, NDM

4.7.3. Mecanismos de resistencia a quinolonas/fluoroquinolonas

Las quinolonas (Q) y fluoroquinolonas (FQ) son compuestos sintéticos con actividad antibacteriana de amplio espectro utilizados para el tratamiento de un amplio rango de infecciones dentro de la medicina humana y veterinaria. Particularmente, las Q y FQ interrumpen la replicación del ADN bacteriano al inhibir dos enzimas cruciales, la ADN topoisomerasa II (ADN girasa) y la topoisomerasa IV. A pesar de la potente actividad bactericida de Q y FQ contra bacterias Gram positivas y negativas, su uso extendido e inadecuado ha resultado en la aparición de cepas resistentes alrededor del mundo (Redgrave et al., 2014).

E. coli cuenta con distintos mecanismos de resistencia a Q y FQ: i) mutaciones en los genes codificantes de las enzimas ADN girasa (*gyrA* y *gyrB*) y topoisomerasa IV (*parC* y *parE*) localizados en una región cromosómica definida como región determinante de resistencia a quinolonas (QRDR – por sus siglas en inglés); ii) presencia de genes de resistencia a quinolonas mediada por plásmidos (PMQRs – por sus siglas en inglés); iii) permeabilidad reducida; y iv) acumulación reducida por sistemas de eflujo intrínsecos. Al respecto, la mutación de genes es el mecanismo de mayor relevancia clínica al conferir altos niveles de resistencia (Hopkins et al., 2005; Jacoby, 2005).

Mutaciones en los genes blanco dentro de la región QRDR originan cambios aminoacídicos que alteran la estructura proteica, disminuyendo la afinidad de la enzima hacia la molécula antibiótica dando lugar a la resistencia. Estas mutaciones suelen presentarse primero sobre la subunidad GyrA de la ADN girasa, en las posiciones Ser83 y Asp87, y con menor frecuencia en los residuos Asp426 y Lys447

de la subunidad GyrB. Asimismo, de manera secundaria, mutaciones en las subunidades que conforman a la topoisomerasa IV contribuyen al alto grado de resistencia hacia FQ. Cambios en los codones codificantes de los residuos Ser80 y Glu84 de la subunidad ParC e Ile444, Ser458, Asp475, Ile529 de la subunidad ParE son las más frecuentemente identificadas (Hopkins et al., 2005; van der Putten et al., 2019).

Por otro lado, en elementos genéticos móviles (PMQRs) se han identificado un gran número de genes que mediante diferentes mecanismos disminuyen la susceptibilidad a Q y FQ. Entre los genes involucrados se incluyen miembros de la familia génica *qnr* (*qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*), éstos codifican proteínas que se unen y previenen la inhibición de la ADN girasa y topoisomerasa IV. El gen *aac(6')-Ib-cr* codifica una acetiltransferasa con actividad dual contra aminoglucósidos y quinolonas. Mientras que los sistemas de expulsión *oqxAB* y *qepA* codifican bombas de eflujo para Q y FQ (Redgrave et al., 2014).

La pérdida de la permeabilidad en la membrana por la disminución de la expresión o mutaciones en genes de porinas OmpC y OmpF contribuye poco en la resistencia a Q y FQ; mientras que la sobreexpresión de la bomba de eflujo AcrAB-TolC tiene una contribución significativa (Hopkins et al., 2005). Este último ha sido particularmente demostrado en cepas de *E. coli* MDR (T. Sato et al., 2013).

4.7.4. Mecanismos de resistencia a trimetoprima/sulfametoxazol

Al igual que las quinolonas/fluoroquinolonas, los agentes trimetoprima y sulfametoxazol son compuestos sintéticos involucrados en la intervención de dos pasos enzimáticos clave dentro de la ruta biosintética del folato. En este sentido, las

sulfonamidas inhiben competitivamente la enzima dihidropteroato sintasa (DHPS), mientras que la trimetoprima inhibe la actividad enzimática de dihidrofolato reductasa (DHFR). De manera individual, actúan como agentes bacteriostáticos; sin embargo, su combinación – denominada cotrimoxazol – resulta en un efecto sinérgico bactericida en microorganismos susceptibles (van Duijkeren et al., 2018).

En la actualidad, se han descrito mecanismos de resistencia intrínseca y adquirida a sulfonamidas y trimetoprima en *E. coli*: i) mutaciones en los genes cromosómicos nativos *dhps* y *dhfr*; y ii) adquisición de genes codificantes de variantes enzimáticas de la dihidropteroato sintasa y dihidrofolato reductasa no susceptibles a sulfonamidas y trimetoprima, respectivamente. En particular, la sustitución de un único aminoácido en la enzima DHPS nativa da lugar a la resistencia a sulfonamidas. En cambio, mutaciones dentro de la región promotora del gen *dhfr* son responsable de la sobreexpresión de la enzima DHFR promoviendo la resistencia a trimetoprima (Eliopoulos & Huovinen, 2001).

Por otro lado, la adquisición de enzimas no susceptibles es responsable de los altos niveles de resistencia a ambos agentes antibacterianos. Actualmente, tres variantes de enzimas DHPS resistentes son codificadas por los genes *sul1*, *sul2* y *sul3*. Estos suelen estar asociados a elementos genéticos móviles como los integrones de clase 1, transposones Tn5393 y plásmidos conjugativos, respectivamente, junto con otros genes de resistencia a diversos agentes antibacterianos. Por el contrario, 41 distintas enzimas DHFR resistentes a trimetoprima son codificadas por las variantes de los genes *dfr*, considerando sus estructuras, éstos son divididos en dos grupos principales: 33 variantes tipo *dfrA* y

ocho variantes tipo *dfrB* (Pattishall et al., 1977). En su mayoría, las distintas variantes *dfr* forman parte de casetes génicos, plásmidos o transposones, favoreciendo la diseminación de la resistencia.

Considerando que el genoma de *E. coli* es muy dinámico, la adquisición e integración constante de nuevos elementos genéticos accesorios que albergan factores de virulencia y determinantes de resistencia a agentes antimicrobianos resulta alarmante para la medicina humana y animal, favoreciendo el surgimiento de clonas altamente virulentas y multirresistentes a los antibióticos. Por consiguiente, la caracterización puntual y el diagnóstico de estos patógenos emergentes son necesarios y la implementación de técnicas de secuenciación masivas del ADN es una invaluable alternativa de estudio.

Los avances en la secuenciación del ADN han acelerado significativamente las investigaciones y los descubrimientos en las áreas biológicas. Particularmente, el análisis genómico ha aportado información relevante respecto al contenido, variabilidad, funcionalidad y regulación genética que presentan organismos tan heterogéneos como *E. coli*. Por ejemplo, la caracterización genómica de cepa de *E. coli* hetero-patógena causante del brote epidemiológico del 2011 en Europa proporcionó información acerca de los rasgos patogénicos característicos de los patotipos EAEC y STEC, así como de los determinantes de resistencia a múltiples clases de antimicrobianos (aminoglucósidos, β -lactámicos, anfenicoles, tetraciclinas y metales pesados), todos ellos contenidos en elementos movilizables (Brzuszkiewicz et al., 2011).

4.8. Secuenciación del ADN y su relevancia en la genómica

La secuenciación del ADN es el conjunto de metodologías empleadas para determinar el orden secuencial de las bases nucleotídicas (A, G, C, T) en un determinado fragmento de ADN, gen o incluso el genoma completo de un organismo (Carter & Shieh, 2015). En la actualidad, las tecnologías NGS o “de alto rendimiento” incluyen técnicas basadas en la generación y secuenciación de millones de fragmentos cortos de ADN de manera paralela y a un costo relativamente bajo (Shendure & Ji, 2008).

Las técnicas de NGS comparten una estrategia metodológica semejante implicando: i) la fragmentación del ADN; ii) adición de secuencias adaptadoras al ADN fragmentado que indican el punto de partida para la secuenciación; iii) amplificación de los fragmentos de ADN – adaptadores mediante técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR – por sus siglas en inglés); iv) secuenciación de los fragmentos de ADN; y v) reconstrucción de la secuencia completa (Rodríguez-Santiago & Armengol, 2012; Rubio et al., 2020). Estas nuevas tecnologías tienen el potencial de detectar todos los tipos de variación genómica en un único experimento, incluyendo variantes de nucleótido único o mutaciones puntuales, pequeñas inserciones y deleciones, así como variantes estructurales tanto equilibradas (inversiones y translocaciones) como desequilibradas (deleciones o duplicaciones) (Rodríguez-Santiago & Armengol, 2012).

Con el desarrollo de tecnologías NGS y de la bioinformática, la secuenciación de genomas completos (WGS - por sus siglas en inglés) y su análisis permitió el surgimiento de una nueva área dentro de la biología denominada genómica. La

genómica tiene como objetivo predecir la función de los genes a partir de su secuencia o de sus interacciones con otros genes. Esta disciplina se subdivide en dos grandes áreas: genómica estructural, orientada a la caracterización y localización de las secuencias que conforman el ADN de los genes, y la genómica funcional que se encarga de la recolección sistemática de información sobre las funciones de los genes (Encarnación-Guevara, 2006; Kaur, 2013).

Las técnicas de secuenciación de ADN a gran escala han permitido adquirir una nueva percepción global sobre los genomas y del conocimiento genético de un organismo. Particularmente, el estudio de las secuencias genómicas de microorganismos ha aportado información relevante acerca de sus propiedades biológicas, relaciones que presentan con otros microorganismos e interacciones con el medio ambiente que habitan. Lo anterior, ha hecho posible determinar los genes responsables de procesos celulares comunes y exclusivos de cada especie. Asimismo, mediante la comparación de su genoma contra un genoma de referencia, es posible conocer el grado de similitud o diferencia existente entre dos organismos de la misma especie (Garza-Ramos et al., 2009).

Respecto a bacterias patógenas, la genómica permite predecir y comprobar el conjunto de genes implicados en la interacción con el hospedero, así como evidenciar los genes asociados en la adaptabilidad, proliferación y supervivencia a los factores bióticos y abióticos del nicho en que habitan. Asimismo, se han reconocidos los determinantes asociados directamente en los distintos mecanismos de resistencia antimicrobiana y la virulencia bacteriana; factores que exacerbaban las infecciones ocasionadas por los mismos. Por otro lado, los estudios genómicos han

permitido evidenciar la plasticidad que presentan los genomas bacterianos y demostrar la influencia que ejercen los mecanismos de THG sobre la evolución del propio genoma, conllevando al surgimiento de nuevos agentes patógenos causantes de brotes epidemiológicos severos (Garza-Ramos et al., 2009; Hernández et al., 2020).

Consecuentemente, el estudio de bacterias desde una perspectiva genómica tiene innumerables aplicaciones, destacando la identificación y caracterización evolutiva de patógenos emergentes, el descubrimiento de nuevos blancos terapéuticos y potenciales candidatos a vacunas para el tratamiento de las infecciones ocasionadas por microorganismos resistentes a antibióticos.

4.9. Antecedentes

4.9.1. Estudios genómicos de *E. coli* multirresistente derivadas de diversas fuentes de aislamiento

Las tecnologías NGS han permitido obtener un número creciente de genomas de *E. coli* secuenciados a nivel mundial. La disponibilidad de los genomas en bases de datos ha hecho posible comparar genomas de cepas derivadas de múltiples fuentes de aislamiento. Investigaciones realizadas en diferentes países muestran la relevancia de los estudios genómicos sobre *E. coli* multirresistente. Estos estudios plantean las posibles rutas de transmisión entre los diferentes nichos ecológicos que habitan (Y. Li et al., 2021; Ma et al., 2021; McDougall et al., 2021), la detección y diseminación de los determinantes de resistencia antimicrobiana (Sonda et al., 2018; Yasir et al., 2020), el contenido génico de virulencia que portan (Lindsey et al., 2016; Mazumder et al., 2021) y las plataformas genéticas (MGEs) en las que los

determinantes de resistencia antimicrobiana y de virulencia se diseminan (Sabença et al., 2021; Sadek et al., 2021).

Al respecto, Runcharoen et al. (2017) mostraron la diversidad genética existente en una colección de aislados de *E. coli* productores de BLEE provenientes de fuentes ambientales y humanas en Tailandia. En este estudio identificaron la presencia de diversos grupos clonales de alto riesgo internacional, predominando el tipo de secuencia clonal (ST) ST131 en cepas derivadas de muestras humanas. Asimismo, evidenciaron las bases genéticas de la producción de BLEE e identificaron diversas variantes génicas de la familia CTX-M, predominando las variantes CTX-M-55 y CTX-M-14, en aislados clínicos y ambientales, respectivamente.

En Kenia, Wawire et al. (2021) investigaron la presencia de los determinantes de resistencia antimicrobiana y de virulencia en un conjunto de cepas de *E. coli* provenientes de aislamientos clínicos y de aguas residuales. Los autores emplearon el esquema de tipificación del Instituto Pasteur e identificaron a ST43 como grupo clonal predominante, linaje perteneciente al extenso grupo clonal de alto riesgo ST131. Asimismo, encontraron que las cepas de *E. coli* poseían un número similar de genes de resistencia antimicrobiana y de virulencia, independientemente de su origen de aislamiento. No obstante, en los aislados de origen clínico ambas clases de determinantes se localizan principalmente en plásmidos, mientras que en su contraparte provenientes de aguas residuales se encuentran codificados en el cromosoma; sugiriendo que los plásmidos son el impulsor principal en la diseminación de estos determinantes.

Recientemente, en Nueva Zelanda la vigilancia espaciotemporal en paisajes prístinos por Cookson et al. (2022) mostró la distribución poblacional y el viruloma de *E. coli* en muestras ambientales (agua, perifiton, sedimento y suelo) y de heces de animales salvajes. En este estudio, mediante WGS se identificó la presencia de los siete filogrupos (A, B1, B2, C, D, E y F), el filogrupo B1 fue el más prevalente entre los distintos tipos y sitios de muestreo. Aunque la detección de determinantes de resistencia antimicrobiana fue escasa reconociéndose solo una cepa MDR en dicha colección; la posesión de genes de virulencia resultó más abundante en cepas pertenecientes a los filogrupos B2, D, E y A, específicamente, los grupos B2 y D enriquecidos por factores de virulencia relacionados con ExPEC. Lo anterior, demostró la distribución clonal entre aislados ambientales y animales, así como el posible papel adicional de los factores de virulencia en la persistencia y supervivencia ambiental de las cepas.

4.9.2. Resistencia antimicrobiana de *E. coli* en Sinaloa

En el estado de Sinaloa han sido estudiados aislados patogénicos y no patogénicos de *E. coli*, derivados de muestras de alimentos, ambientales, animales y humanas. Al respecto, las investigaciones han demostrado la existencia de una alta proporción de cepas que presentan resistencia a los antibióticos de primera línea empleados en el tratamiento de infecciones ocasionadas por *E. coli*. En ese sentido, Murillo et al. (2011) determinaron los patrones de resistencia a antibióticos, por el método de difusión en disco, de una colección de aislados de *E. coli* restringidos a ambiente hospitalario. Al respecto, los autores identificaron cepas con altos niveles (> 70%) de resistencia a antibióticos β -lactámicos (penicilinas y cefalosporinas de 1.^a y

3.^a generación), quinolonas y antagonistas de la ruta biosintética del folato; permaneciendo sólo susceptibles al subgrupo de carbapenémicos, fármacos utilizados en el tratamiento de infecciones por microorganismos multirresistentes.

Canizalez-Roman et al. (2016) realizaron trabajo de vigilancia epidemiológica en población general en el estado de Sinaloa, demostrando alta prevalencia de cepas InPEC (n = 242) asociadas a cuadros diarreicos y los patrones de resistencia a antibióticos de las mismas. La identidad de las cepas se determinó mediante ensayos de PCR y el patrón de resistencia por difusión en disco. Los patotipos más prevalentes encontrados en el estudio fueron EAEC, EPEC y ETEC; asimismo, el 81% de las cepas InPEC exhibieron fenotipos de multirresistencia antimicrobiana, principalmente a tetraciclinas, ampicilina y cotrimoxazol; mientras que sólo el 9% permaneció susceptible a los antibióticos evaluados.

Igualmente, Uribe-Beltrán et al. (2017) evidenciaron altos niveles de resistencia a antibióticos en aislados derivados de infantes (< 5 años) con y sin diarrea mediante difusión en disco. El 95% del total de aislados obtenidos (n = 205) exhibió resistencia a al menos uno de los fármacos evaluados, principalmente, con antibióticos de las clases de β -lactámicos, antagonistas de la ruta biosintética del folato y quinolonas y en menor frecuencia a aminoglucósidos. Sin embargo, cerca del 45% de éstos mostraron fenotipos de multirresistencia, solamente permaneciendo susceptibles a fármacos pertenecientes al subgrupo de cefalosporinas (3.^a y 4.^a generación), carbapenémicos y aminoglucósidos (amikacina y gentamicina).

Por otro lado, Canizalez-Roman et al. (2019) estudiaron diferentes cuerpos acuáticos (n = 472) del estado de Sinaloa resaltando que todas las fuentes de agua

estudiadas presentan alto nivel de contaminación por *E. coli* (43%). Del total de aislados (n = 206), el 14% (29/206) fueron caracterizados como cepas InPEC mediante PCR y sus patrones de resistencia antimicrobiana fueron determinados por la técnica de difusión en disco. Los subgrupos más prevalentes resultaron EAEC, EPEC, DAEC y ETEC. De estos, el 90% (26/29) resultó resistente al menos a uno de los fármacos evaluados, principalmente aquellos perteneciente a las clases de β -lactámicos, tetraciclinas y antagonistas de la ruta biosintética del folato; resaltando la resistencia frente a la cefalosporina de 3.^a generación cefotaxima. Asimismo, se identificaron cepas multirresistentes que exhibieron resistencia antimicrobiana adicional a las clases de aminoglucósidos, anfenicoles y quinolonas.

4.9.2.1. Resistencia antimicrobiana de E. coli multirresistente desde una perspectiva genómica

Los estudios anteriormente mencionados demuestran el panorama concerniente respecto a la resistencia antimicrobiana que exhiben los aislados de *E. coli* provenientes de diversas fuentes de aislamiento en el estado de Sinaloa. Sin embargo, los estudios citados utilizaron solamente métodos fenotípicos, sin abordar los mecanismos moleculares y determinantes genómicos que propician los fenotipos de resistencia observados, así como la posible diseminación de estos facilitada por elementos genéticos móviles.

Recientemente, nuestro grupo de investigación secuenció y analizó el genoma de dos aislados clínicos de *E. coli* multirresistentes, derivados de distintos infantes con diarrea, para evidenciar sus rasgos epidemiológicos, potencial patogénico y los determinantes de resistencia a antibióticos que codificaban. Ambos aislados

resultaron miembros pertenecientes del grupo filogenético B2. De acuerdo con la tipificación basada en el genoma y el contenido génico de virulencia, uno de los aislados se caracterizó como una cepa que expresa el serotipo O55:H51, pertenece al grupo clonal ST5342 y al subgrupo patogénico tEPEC (Magaña-Lizárraga et al., 2018). Por otro lado, el segundo aislado se caracterizó como una cepa con serotipo O25:H4 y del grupo clonal ST131; linaje de alto riesgo perteneciente al extenso grupo ExPEC responsable de infecciones multirresistente a antibióticos a nivel internacional (Magaña-Lizárraga et al., 2019).

Respecto a la resistencia antimicrobiana en ambos genomas se identificaron diversas variantes génicas responsables de la resistencia a fármacos pertenecientes a las clases de aminoglucósidos (*aadA5*, *aadA24*, *aac(3)-IId*, *aph(3'')-Ib*, *aph(6)-Id*), antagonistas de la ruta biosintética del folato (*dfrA15*, *dfrA17*, *sul1*, *sul2*), β -lactámicos (*bla_{TEM-1B}*) y tetraciclinas [*tet(A)*]; algunos de ellos asociados a integrones de clase I. Adicionalmente, la cepa ExPEC O25:H4-B2-ST131 presentó diversas mutaciones puntuales en la región QRDR conduciendo a mutaciones no sinónimas en los blancos génicos GyrA (S83L, D87N), ParC (S80I, E84V) y ParE (I529L), asociadas a la elevada resistencia frente a quinolonas y fluoroquinolonas (Magaña-Lizárraga et al., 2018, 2019).

V. JUSTIFICACIÓN

La resistencia a antibióticos (RA) representa un desafío significativo y una de las amenazas más alarmantes que aqueja la salud pública mundial. Para el 2050, se prevé que el número de defunciones anuales relacionadas a la RA ascenderán a los 10 millones de casos a nivel mundial. Entre las bacterias que poseen gran relevancia por su creciente RA están los miembros pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, principalmente *E. coli*, agente causal de infecciones intestinales y extraintestinales en humanos y animales. En el 2020, la OMS declaró a *E. coli* como patógeno de distribución cosmopolita que exhibe alta variabilidad en resistencia a β -lactámicos (42–98%), carbapenémicos (0–35%), cefalosporinas de 3.^a (8–100%) y 4.^a generación (2–89%), fluoroquinolonas (9–93%) y trimetoprima/sulfametoxazol (20–97%) en las seis regiones de la OMS en el mundo. En México, estas proporciones son del 54, 59 y 62% para cefalosporinas de 3.^a generación, quinolonas y trimetoprima/sulfametoxazol, respectivamente. Para abordar esta problemática, se ha reconocido la importancia de estudiar el surgimiento de patógenos resistentes y los mecanismos que subyacen a la RA desde un enfoque multisectorial. Con la implementación de las tecnologías de secuenciación masiva (NGS) es posible analizar simultáneamente el repertorio génico y mecanismos que contribuyen a la RA, así como las estrategias de diseminación a través de distintos reservorios y/o ambientes. Por ello, es fundamental escrutar los genomas de variantes comensales, patogénicas y ambientales de *E. coli* empleando tecnologías NGS para generar información sobre los rasgos genómicos que definen la virulencia y resistencia a antibióticos de *E. coli*, contribuyendo al desarrollo de estrategias para un mejor control de la resistencia a antibióticos en México y el mundo.

VI. HIPÓTESIS

La naturaleza genómica de los determinantes de virulencia y resistencia a antibióticos en aislamientos ambientales, de animales y clínicos de *E. coli* sinaloenses es conservada independientemente del origen del aislado. Asimismo, estas cepas no comparten relación con cepas de otras regiones geográficas a nivel mundial.

VII.OBJETIVOS

7.1. Objetivo general

Analizar los determinantes de virulencia y resistencia a antibióticos en 15 genomas de *E. coli* incluyendo cepas de origen ambiental, animal y clínico aisladas en Sinaloa, con respecto a genomas de *E. coli* provenientes de distintas regiones geográficas del mundo.

7.2. Objetivos específicos

7.2.1. Identificar el conjunto de determinantes de virulencia presentes en los genomas de las cepas de *E. coli* bajo estudio.

7.2.2. Determinar el repertorio de genes adquiridos involucrados en la resistencia a antibióticos en los genomas de las cepas de *E. coli* bajo estudio y relacionarlo con su fenotipo.

7.2.3. Investigar la presencia de elementos genéticos móviles en cada genoma de las cepas bacterianas en estudio.

7.2.4. Establecer las relaciones filogenéticas entre las cepas de *E. coli* secuenciadas en este trabajo y genomas de *E. coli* provenientes de diferentes países reportados en bases de datos.

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1. Diseño de estudio

Se realizó un estudio prospectivo, descriptivo y observacional, en el cual la secuencia del genoma de cepas de *E. coli* de origen ambiental, animal y clínico aisladas en Sinaloa fueron obtenidas y analizadas.

8.2. Objeto del estudio

De la colección de microorganismos que conforman el cepario bacteriano de la Unidad de Investigaciones en Salud Pública “Dra. Kaethe Willms” (UISP), de la Facultad de Ciencias Químico-Biológicas en la Universidad Autónoma de Sinaloa, se seleccionaron 15 aislados de *E. coli* derivados de muestras de origen ambiental, animal y clínico para la secuenciación y el análisis de su genoma (Cuadro 3).

Cuadro 3. Características de cepas de *E. coli* seleccionadas para la secuenciación del genoma completo.

Aislados de <i>E. coli</i>	Origen/Fuente aislamiento^a	Padecimiento^b	Año de aislamiento	Origen geográfico
CCDC44-3	Clínico/Heces	Sano	2004	Culiacán, Sinaloa
FD20-2	Clínico/Heces	Dispepsia funcional	2016	Culiacán, Sinaloa
FD21-2	Clínico/Heces	Dispepsia funcional	2016	Culiacán, Sinaloa
RUTI01	Clínico/Orina	ITU-R	2017	Culiacán, Sinaloa
RBR72	Clínico/Heces	Gastroenteritis	2015	Los Mochis, Sinaloa
RBR95	Clínico/Heces	Gastroenteritis	2015	Los Mochis, Sinaloa
U13824	Clínico/Orina	ITU	2019	Culiacán, Sinaloa
ADD105	Ambiental/ Agua superficial	N/A	2013	Navolato, Sinaloa
ADD147	Ambiental/ Agua superficial	N/A	2013	Navolato, Sinaloa
ADD167	Ambiental/ Agua superficial	N/A	2013	Navolato, Sinaloa
ADD169	Ambiental/ Agua superficial	N/A	2013	Navolato, Sinaloa
ADD183	Ambiental/ Agua superficial	N/A	2013	Navolato, Sinaloa
ACM5	Animal/Acuicultura	N/A	2011	Culiacán, Sinaloa
ACM22	Animal/Acuicultura	N/A	2013	Culiacán, Sinaloa
ACM47	Animal/Acuicultura	N/A	2014	Culiacán, Sinaloa

^aFuente de aislamiento: Agua superficial, drenaje agrícola “La Michoacana”; Acuicultura, cultivo de Tilapia (*Oreochromis* sp.).

^bPadecimiento: ITU-R, Infección del tracto urinario recurrente; ITU, Infección del tracto urinario; N/A, no aplica.

8.3. Reactivación y preservación de cepas de *E. coli*

Inicialmente, los aislados de *E. coli* en estudio se encontraban en criopreservación contenidos en caldo Infusión Cerebro-Corazón (BHI – por sus siglas en inglés) y dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración final del 8% (v/v). Para su recuperación, cada aislado criopreservado se sembró en cajas de Petri con agar sangre y agar MacConkey, incubándose a 37 ± 2 °C durante 24 h. Se evaluó la pureza del cultivo y se seleccionaron colonias para reconfirmar la identidad bacteriana mediante pruebas bioquímicas convencionales. Para este propósito, se evaluó la capacidad de utilización de distintas fuentes de carbono (citrate y malonato), fermentación de carbohidratos (glucosa, lactosa y sacarosa), producción de gas y ácido sulfhídrico (H₂S), movilidad, producción de indol, y descarboxilación de aminoácidos (lisina y ornitina). Confirmada la pureza e identidad bacteriana, los aislados de *E. coli* se mantuvieron en cultivos inclinados de agar Soya Trypticaseína (TSA – por sus siglas en inglés) y almacenados a 4 °C para su uso posterior.

8.4. Perfil de susceptibilidad antimicrobiana

La evaluación de la susceptibilidad a los antimicrobianos se realizó mediante el método de difusión en disco (Kirby-Bauer), siguiendo el protocolo y lineamientos descritos en la guía M02 (Ed13:2018) del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI – por sus siglas en inglés) (CLSI, 2018). Para lo anterior, se evaluaron 12 discos de antibióticos comerciales (Multibac I.D. PT-35, Investigación Diagnóstica – ID) pertenecientes a distintas clases de antimicrobianos: aminoglucósidos (amikacina [AK; 30 µg], gentamicina [GE; 10 µg], netilmicina [NET; 30 µg]), β-lactámicos (ampicilina [AM; 30 µg], carbenicilina [CB; 100 µg], cefalotina [CF; 30 µg], cefotaxima

[CFX; 30 µg]), fluoroquinolonas (ciprofloxacino [CPF; 5 µg], norfloxacino [NOF; 10 µg]), nitrofuranos (nitrofurantoína [NF; 300 µg]), anfenicoles (cloranfenicol [CL; 30 µg]), y antagonistas de la ruta biosintética del folato (trimetoprima/sulfametoxazol [SXT; 1.25/23.75 µg]).

La cepa de *E. coli* ATCC 25922 se empleó con fines de control de calidad del ensayo. Se midieron los halos de inhibición utilizando un Vernier y los diámetros resultantes se interpretaron de acuerdo con los puntos de corte establecidos en la tabla 2A de la guía M100 (Ed31:2021) del CLSI (CLSI, 2021). De acuerdo con Magiorakos et al. (2012) los aislados que mostraron un fenotipo de resistencia al menos a un agente antibacteriano perteneciente a tres o más distintas clases de antimicrobianos fueron clasificados como cepas MDR.

8.5. Extracción de ADN genómico

Para la obtención de un cultivo bacteriano fresco, cada aislado de *E. coli* se resembró en cajas de Petri con agar TSA e incubó a 37 ± 2 °C durante 24 h. A continuación, una colonia correspondiente a cada aislado se inoculó en tubos con 5 mL de caldo Luria-Bertani (LB) y fueron incubados a 37 ± 2 °C durante 18 h. Finalmente, la suspensión bacteriana se centrifugó a $3,500 \times g$ durante 5 min y se decantó el sobrenadante. Con el paquete celular colectado (25 – 50 mg de bacteria en peso húmedo), se realizó la extracción del ADN genómico (ADNg) usando el kit comercial ZymoBIOMICS™ DNA Miniprep (Zymo Research, Irvine, CA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración y pureza del ADNg se determinó mediante espectrofotometría utilizando el equipo Nanodrop Lite (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). La integridad del material genético se verificó

mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con GelRed™. El ADNg extraído de las cepas bajo estudio se almacenó a -20 °C hasta su procesamiento para la secuenciación.

8.6. Secuenciación del genoma completo

Para la secuenciación del genoma completo (WGS), los ADNg extraídos fueron enviados al Laboratorio de Genómica Microbiana del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. – Unidad Mazatlán, en la ciudad de Mazatlán, Sinaloa, México, para su procesamiento y subsecuente secuenciación. Se construyeron bibliotecas genómicas individuales empleando el kit comercial Illumina Nextera XT DNA Library Prep (Illumina, San Diego, CA, USA), siguiendo el protocolo descrito en el manual de Nextera XT DNA Library Prep Reference Guide [Document #15031942 v03 – February 2018] de Illumina Inc., con algunas modificaciones. Preparadas las bibliotecas genómicas estas fueron secuenciadas en la plataforma MiniSeq (Illumina, San Diego, CA, USA) empleando el kit de secuenciación MiniSeq Mid OutPut (300 ciclos) generando lecturas pareadas (*paired-end* – PE) de una longitud de 150 pb (2 × 150 pb). Se calculó una profundidad teórica de secuenciación de al menos 30X para cada genoma.

8.7. Análisis bioinformático

8.7.1. Preprocesamiento de lecturas de secuenciación y control de calidad

Como resultado de la implementación de las plataformas de Illumina en la secuenciación del genoma completo mediante PE, se obtienen dos archivos en formato FASTQ. Cada uno de los archivos FASTQ contiene las lecturas de

secuenciación (*reads*) crudas en sentido *forward* (R1) y *reverse* (R2), respectivamente, junto con los valores de calidad asociados a cada base nucleotídica que conforman dichas secuencias. Estos últimos, expresados como valor *Phred* (Q), que determina la confiabilidad con que cada base fue asignada durante el proceso de llamado de las bases (*base calling*) en la secuenciación; es decir, un valor asignado de Q30 indica una precisión del 99.9% en la identidad de la respectiva base nucleotídica.

Para evaluar la calidad inicial de los *reads* crudos de cada genoma secuenciado, se empleó el programa FastQC v0.11.9 (Andrews, 2010). Posteriormente, se realizó una limpieza (*trimming*) y filtrado de los *reads* crudos con el programa Cutadapt v2.4 (Martin, 2011) para eliminar la presencia de posibles secuencias residuales de adaptadores, bases nucleotídicas ambiguas (N's), de baja calidad (< Q30), y *reads* cortos (< 50 pb). Se verificó la calidad final nuevamente con FastQC y los *reads* procesados se analizaron con la base de datos que integra la herramienta en línea KmerFinder v3.2 (Hasman et al., 2014; Larsen et al., 2014) del *Center for Genomic Epidemiology* (CGE) (<http://www.genomicepidemiology.org/services/>) para descartar la posible contaminación genómica, así como la confirmación de la especie bacteriana más cercana.

8.7.2. Ensamble y anotación de genomas

Posterior al paso de limpieza y filtrado, se realizó el ensamble *de novo* de los genomas con la herramienta SPAdes v3.15.1 (Bankevich et al., 2012) utilizando solamente *reads* de alta calidad (> Q30). Para lo anterior, la corrida de SPAdes se

configuró para minimizar el número de *mismatches* e indeles cortos (opción *--careful*), y ensamblar a diferentes longitudes de *k-mer* (*-k 21,33,55,77,99,107,117*). Finalizado el ensamble de genoma, se generaron dos archivos en formato FASTA denominados: *contigs.fasta* y *scaffolds.fasta*; ambos contienen la secuencia resultante del borrador (*draft*) del genoma ensamblado a nivel de *contigs* y *scaffolds*, respectivamente. Estos últimos, son los recomendados para utilizarse en análisis posteriores. Para realizar la evaluación y validación del ensamble de cada genoma se empleó la herramienta QUAST v5.0.2 (Gurevich et al., 2013).

Debido a que los ensambles *de novo* resultaron fragmentados (> 200 *contigs/scaffolds*), se realizó un proceso de andamiaje (*scaffolding*) asistido por un genoma de referencia a cada uno de los genomas de *E. coli* bajo estudio. Para ello, se empleó la herramienta MeDuSa (Bosi et al., 2015), en su versión web (<http://combo.dbe.unifi.it/medusa>), y se utilizó como referencia la secuencia del genoma completo filogenéticamente más cercano a cada genoma de *E. coli* en estudio, resultante del análisis con KmerFinder. Los *scaffolds* con una longitud menor a 300 pb fueron excluidos. La predicción y anotación automática de las secuencias génicas presentes en cada uno de los genomas ensamblados se realizó utilizando la plataforma en línea RAST (Rapid Annotation Subsystem Technology v2.0) (<http://rast.nmpdr.org>) empleando la configuración predeterminada (Aziz et al., 2008).

Los datos crudos de secuenciación y los ensambles de los genomas se depositaron en las bases de datos: *Sequence Read Archive* (SRA) y *Assembly*, respectivamente. Estas pertenecen al *National Center for Biotechnology Information*

(NCBI) y se registraron dentro del BioProject PRJNA715781 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA715781>).

8.7.3. Tipificación molecular *in silico*

Para la determinación de los rasgos epidemiológicos presentes en los genomas de *E. coli* bajo estudio se utilizaron diversas herramientas y bases de datos asociadas pertenecientes al CGE (<http://www.genomicepidemiology.org/services/>) usando la configuración predeterminada. Particularmente, para la predicción del serotipo (O:H) se implementó la base de datos que integra la herramienta SerotypeFinder v2.0 (Joensen et al., 2015). Dicha base de datos contiene las secuencias alélicas de los genes involucrados en el procesamiento y exporte del antígeno somático (antígeno O) (*wzx*, *wzy*, *wzm*, y *wzt*) y el antígeno flagelar (antígeno H) (*fliC*, *flkA*, *fliA*, *flmA*, y *flnA*).

El tipo de secuencia clonal (ST – por sus siglas en inglés) se determinó mediante la tipificación multilocus de secuencias (MLST – por sus siglas en inglés); método en el que la secuencia de un determinado número de genes o fragmentos internos derivados de genes constitutivos altamente conservados en los genomas bacterianos son analizados y posteriormente comparados para catalogar perfiles alélicos únicos (Maiden et al., 1998). Para ello, se utilizó la herramienta MLST v2.0 (Larsen et al., 2012), empleando el esquema propuesto por Achtman (opción “*Escherichia coli* #1”). El esquema de Achtman integra las variantes alélicas de siete loci: *adk* (adenilato ciclasa), *icd* (isocitrato/isopropilmalato deshidrogenasa), *fumC* (fumarato hidratasa), *recA* (motivo de unión de ATP/GTP), *mdh* (malato

deshidrogenasa), *gyrB* (ADN girasa) y *purA* (adenilsuccinato deshidrogenasa) permitiendo la asignación a determinado linaje o ST (Wirth et al., 2006).

Finalmente, para determinar el filogrupo al que pertenecen los aislados de *E. coli* analizados en el presente trabajo, se utilizó la herramienta en línea ClermonTyping v21.03 (<http://clermontyping.iame-research.center/>) (Beghain et al., 2018). Dicha herramienta se basa en el esquema de tipificación por PCR de Clermont (*arpA*, *chuA*, *yjaA*, TspE4.C2, *ybgD* y *cfaB*) adaptado de manera *in silico* para la discriminación y asignación de los grupos filogenéticos A, B1, B2, C, D, E, F, y G en cepas de *E. coli* (Clermont et al., 2013, 2019).

8.7.4. Determinación de genes asociados a virulencia y resistencia

antimicrobiana

Para la determinación de los genes, tanto de virulencia bacteriana como de resistencia antimicrobiana, presentes en los genomas de *E. coli* bajo estudio se utilizaron herramientas pertenecientes al CGE (<http://www.genomicepidemiology.org/services/>). Particularmente, para identificar los genes involucrados en la codificación de factores de virulencia (FV) se utilizó la base de datos que integra la herramienta VirulenceFinder v2.0 (Joensen et al., 2014; Malberg Tetzschner et al., 2020). Dicha base de datos contiene las secuencias de FV principales involucrados en procesos patogénicos de cepas InPEC y ExPEC, como lo son adherencia bacteriana, adquisición de nutrientes, invasión celular, producción de toxinas/enzimas hidrolíticas y protección bacteriana.

Para identificar los determinantes de resistencia adquiridos y mutaciones cromosómicas que participan en la resistencia antimicrobiana se empleó la

herramienta ResFinder v4.1 (Bortolaia et al., 2020; Zankari et al., 2017). Dicha herramienta implementa dos bases de datos para su análisis: ResFinder y PointFinder. La primera, alberga diversas secuencias alélicas de múltiples genes que confieren resistencia directa a 16 diferentes clases de antimicrobianos, incluyendo desinfectantes. Por otro lado, PointFinder integra diversas mutaciones puntuales en genes cromosómicos diana, conocidas por conferir de manera parcial o total resistencia a antimicrobianos.

8.7.5. Identificación y caracterización de elementos genéticos móviles

Para la identificación de los elementos genéticos móviles presentes en los genomas de *E. coli* en estudio fueron empleadas diversas herramientas. Particularmente, se determinó la presencia de secuencias plasmídicas utilizando la base de datos conformada por secuencias correspondientes a replicones de plásmidos pertenecientes al orden Enterobacterales y la herramienta en línea PlasmidFinder v2.1 (Carattoli et al., 2014; Carattoli & Hasman, 2020). Dicha herramienta pertenece al CGE (<http://www.genomicepidemiology.org/services/>) y los parámetros de búsqueda establecidos para la interrogación de cada genoma fueron del 90% y 60% de identidad nucleotídica y de longitud mínima, respectivamente.

Por otra parte, para la identificación de regiones asociadas a bacteriófagos insertados en el cromosoma (profagos) o mantenidos de forma extracromosómica, así como la anotación de sus secuencias génicas, se empleó la herramienta en línea PHASTER (<http://phaster.ca/>). De acuerdo con la ponderación resultante de la evaluación con PHASTER, las regiones asociadas a bacteriófagos son predichas

como regiones intactas (≥ 90), cuestionables (70 – 90) e incompletas (≤ 70) (Arndt et al., 2016).

8.7.6. Análisis filogenéticos

Para establecer las relaciones filogenéticas entre los genomas de *E. coli* secuenciados en el presente trabajo, se realizó un análisis basado en MLST. Las secuencias alélicas de los genes constitutivos del esquema Achtman (*adhA*, *fumC*, *gyrB*, *mdh*, *icdA*, *purA*, *recA*) fueron extraídos de cada genoma, concatenados y alineados empleando el programa Clustal Omega (Sievers et al., 2011) para generar un alineamiento múltiple de secuencias (MSA – por sus siglas en inglés). A partir del MSA, se determinaron las distancias genéticas del conjunto de datos y se reconstruyó la filogenia empleando una variante del algoritmo de *neighbor-joining* (NJ), denominado BIONJ (Gascuel, 1997), el modelo evolutivo de Kimura-2 parámetros (K80) (Kimura, 1980) y 1,000 repeticiones de Bootstrap como soporte y robustez en la topología del árbol. El MSA y la reconstrucción filogenética se realizaron con la plataforma SeaView v5.0.5 (Gouy et al., 2021). El árbol filogenético fue visualizado y anotado mediante la plataforma en línea *Interactive Tree of Life* (iTOL) (<https://itol.embl.de/>) v6.7.4 (Letunic & Bork, 2021).

8.7.6.1. Contexto global de grupos clonales de alto riesgo

Dada la presencia de grupos clonales de relevancia médica entre el conjunto de genomas de *E. coli* en estudio y con la finalidad de situarlas en un contexto global, se realizaron inferencias filogenéticas empleando colecciones internacionales de cepas de *E. coli* pertenecientes al mismo grupo clonal (ST), es decir, ST4, ST40, ST69, ST410, ST617 y ST2279. Para ello, se consultó la base de datos de EnteroBase

(<https://enterobase.warwick.ac.uk/species/index/ecoli>) usando como patrones de búsqueda el “Origen de aislamiento” y el esquema de tipificación por MLST de Achtman (Zhou et al., 2020).

Se construyeron árboles filogenéticos individuales basados en el esquema de tipificación de *core-genome* MLST (cgMLST) V1 + Hierarchical Clustering (HierCC) V1 de EnteroBase (2,513 loci) para cada grupo clonal implementando la función GrapeTree, el cual genera árboles recubridores mínimos (MST – por sus siglas en inglés), y el algoritmo de *rapid neighbor-joining* (RapidNJ) (Zhou et al., 2018). La longitud de las ramas se utilizó para determinar las diferencias alélicas (cgMLST) entre cepas estrechamente relacionadas.

8.8. Análisis estadísticos

La asociación entre variables cualitativas: resistencia por antimicrobiano, resistencia por clase de antimicrobiano y fenotipo MDR dado el origen de aislamiento de las cepas de *E. coli* se evaluó con la prueba exacta de Fisher. Para las variables cuantitativas se determinó la media y desviación estándar. Para evaluar la normalidad de los datos se empleó la prueba de Shapiro-Wilk. Las diferencias entre variables cuantitativas: longitud del genoma, número de genes, número de secuencias codificantes de proteínas respecto el origen de aislamiento de las cepas de *E. coli* se determinaron mediante análisis de varianza (ANOVA) de un factor, utilizando como prueba *post-hoc* la prueba de Tukey. Las variables que no cumplieron con el supuesto de normalidad: categorías funcionales por subsistemas de RAST en relación con el origen de aislamiento se evaluaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba de suma de rangos de Wilcoxon con corrección de Bonferroni para las comparaciones múltiples pareadas por grupo. Se consideró un valor $p \leq 0.05$ como significancia estadística. Todos los análisis estadísticos se efectuaron con el software R v4.3.1.

IX. RESULTADOS

9.1. Caracterización fenotípica y susceptibilidad antimicrobiana

La susceptibilidad a antimicrobianos se realizó mediante el método de difusión en disco e interpretó de acuerdo con los puntos de corte establecidos por el CLSI. En general, de los 12 agentes antimicrobianos evaluados, ampicilina (AM) y amikacina (AK) resultaron los antibióticos a los cuales los aislados de *E. coli* presentaron mayor frecuencia de resistencia (67%) y susceptibilidad (93%), respectivamente. Asimismo, se observaron altas frecuencias de resistencia a ciprofloxacino (CPF; 60%), carbenicilina (CB; 47%) y trimetoprima/sulfametoxazol (SXT; 40%). Por el contrario, se obtuvieron susceptibilidades mayores al 73% para cloranfenicol (CL), nitrofurantoína (NF), netilmicina (NET), cefotaxima (CFX), cefalotina (CF), gentamicina (GE) y norfloxacino (NOF) (Figura 2).

El Cuadro 4 muestra los patrones de resistencia y/o susceptibilidad de los aislados de *E. coli* de origen ambiental, animal y clínico. El 93% de los aislados de *E. coli* (14/15) exhibieron susceptibilidad reducida al menos a un agente antibacteriano, principalmente a antibióticos pertenecientes a las clases de β -lactámicos (AM y CB) y fluoroquinolonas (CPF). Cabe destacar que los aislados de origen clínico RBR95 y U13824, así como ADD167 de origen ambiental exhibieron resistencia a CFX, agente β -lactámico del subgrupo de cefalosporinas de 3.^a generación, sugiriendo presuntivamente un fenotipo de producción de BLEE. Del mismo modo, los aislados RBR95 y ADD167 fueron los únicos que presentaron susceptibilidad reducida a nitrofurantoina; además de amikacina, en el caso de RBR95 (Cuadro 4).

De acuerdo con los perfiles fenotípicos de resistencia observados, diversos aislados de origen clínico (3) y ambiental (3) se clasificaron como cepas MDR, siendo sus perfiles comparables respecto a la resistencia que exhibieron frente a agentes antimicrobianos de las clases de los β -lactámicos, fluoroquinolonas y antagonistas de la ruta biosintética del folato. En cambio, los aislados de origen animal sólo exhibieron susceptibilidad reducida a ampicilina, con excepción del aislado ACM47 que resultó pansusceptible (Figura 3; Cuadro 4). Al compararse las frecuencias de resistencia observadas por antibiótico, clase de antimicrobiano, o cepas MDR frente al origen de aislamiento de las cepas de *E. coli*, no se obtuvieron asociaciones estadísticamente significativas ($p > 0.05$) entre dichas variables (Cuadro 5).

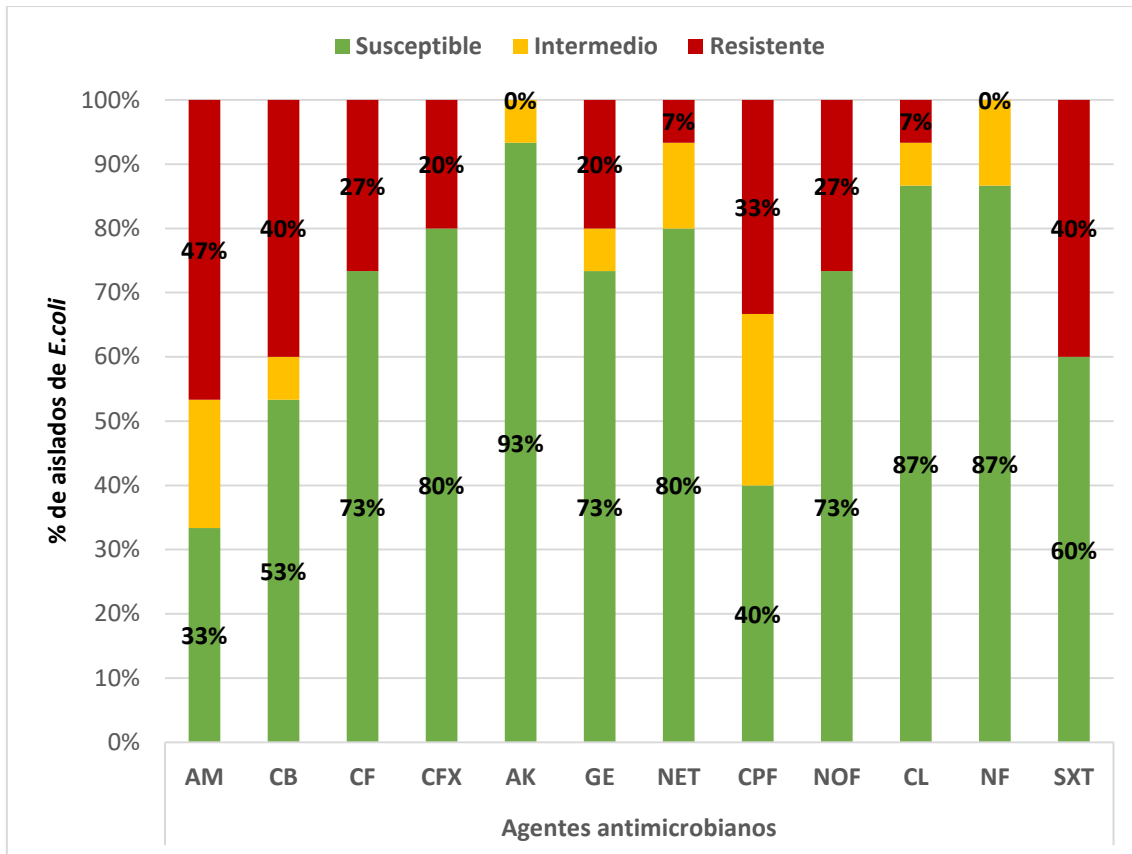


Figura 2. Susceptibilidad antimicrobiana de aislados de *E. coli* de origen ambiental, animal y clínico. Las barras apiladas se encuentran coloreadas de acuerdo con el resultado de interpretación de la susceptibilidad antimicrobiana indicada. Agentes antimicrobianos: AM, ampicilina; CB, carbenicilina; CF, cefalotina; CFX, cefotaxima; AK, amikacina; GE, gentamicina; NET, netilmicina; CPF, ciprofloxacino; NOF, norfloxacino; CL, cloranfenicol; NF, nitrofurantoína; SXT, trimetoprima/sulfametoxazol.

Cuadro 4. Patrones de resistencia y/o susceptibilidad a antibióticos de aislados de *E. coli* de origen ambiental, animal y clínico.

Aislado de <i>E. coli</i>	Origen	Resistente	Intermedio	Susceptible
CCDC44-3	Clínico	AM, CB, CF	---	AK, CFX, CPF, CL, GE, NET, NF, NOF, SXT
FD20-2	Clínico	CPF	---	AK, AM, CB, CF, CFX, CL, GE, NET, NF, NOF, SXT
FD21-2	Clínico	SXT	CL	AK, AM, CB, CF, CFX, CPF, GE, NET, NF, NOF
RUTI01	Clínico	---	CPF	AK, AM, CB, CF, CFX, CL, GE, NET, NF, NOF, SXT
RBR72	Clínico	SXT	AM, CPF	AK, CB, CF, CFX, CL, GE, NET, NF, NOF
RBR95	Clínico	AM, CB, CF, CFX, CPF, NOF	AK, NET, NF	CL, GE, SXT
U13824	Clínico	AM, CB, CF, CFX, CPF, GE, NOF, SXT	NET	AK, CL, NF

Cuadro 4. (Continuación).

Aislado de <i>E. coli</i>	Origen	Resistente	Intermedio	Susceptible
ADD105	Ambiental	AM	---	AK, CB, CF, CFX, CPF, CL, GE, NET, NF, NOF, SXT
ADD147	Ambiental	AM, CB, CPF, CL, GE, NET, NOF, SXT	---	AK, CF, CFX, NF
ADD167	Ambiental	AM, CB, CF, CFX, CPF, NOF, SXT	GE, NF	AK, CL, NET
ADD169	Ambiental	AM, CB, GE, SXT	CPF	AK, CF, CFX, CL, NET, NF, NOF
ADD183	Ambiental	---	CPF	AK, AM, CB, CF, CFX, CL, GE, NET, NF, NOF, SXT
ACM5	Animal	---	AM	AK, CB, CF, CFX, CPF, CL, GE, NET, NF, NOF, SXT
ACM22	Animal	---	AM, CB	AK, CF, CFX, CPF, CL, GE, NET, NF, NOF, SXT
ACM47	Animal	---	---	AK, AM, CB, CF, CFX, CPF, CL, GE, NET, NF, NOF, SXT

Antimicrobianos: β -lactámicos (AM, ampicilina; CB, carbenicilina; CF, cefalotina; CFX, cefotaxima); Aminoglucósidos (AK, amikacina; GE, gentamicina; NET, netilmicina); Fluoroquinolonas (CPF, ciprofloxacino; NOF, norfloxacino); Anfenicoles (CL, cloranfenicol); Nitrofuranos (NF, nitrofurantoína); Antagonistas de la ruta biosintética del folato (SXT, trimetoprima/sulfametoxazol).

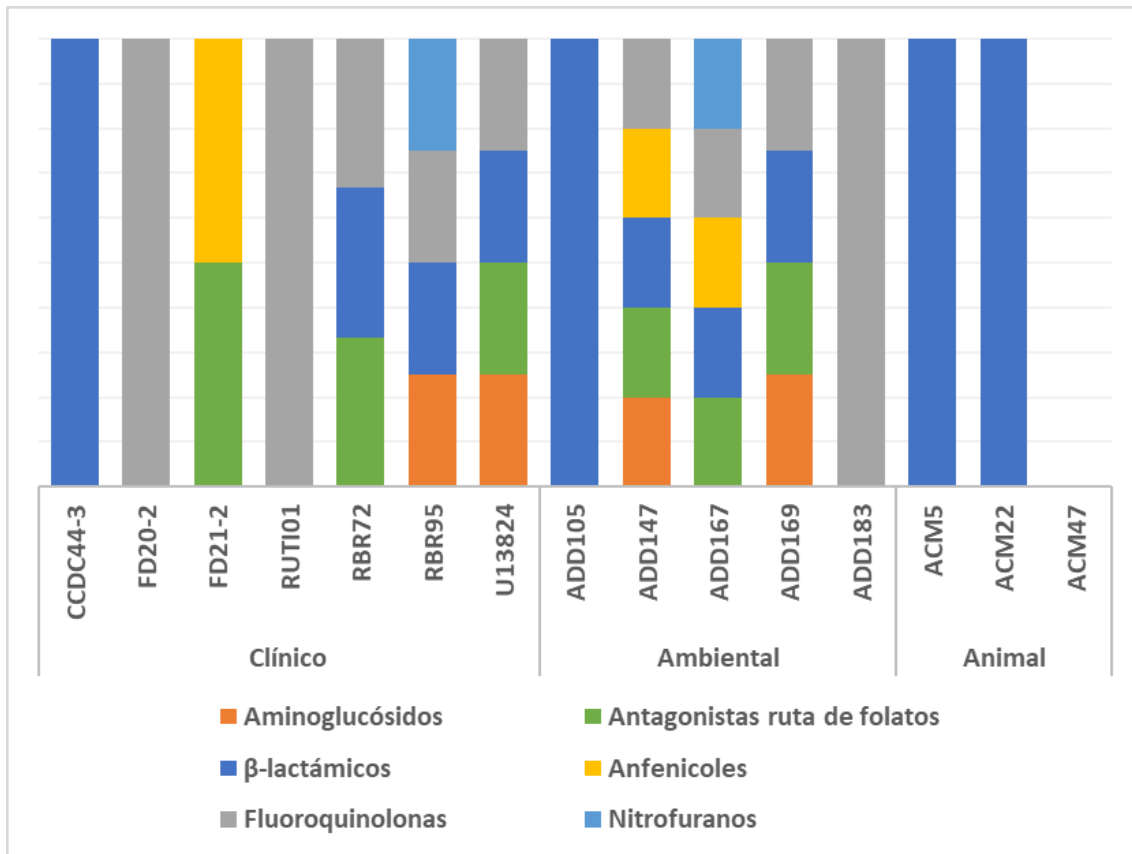


Figura 3. Perfiles de resistencia de aislados de *E. coli* de origen ambiental, animal y clínico por clase de antimicrobianos. Las barras apiladas se encuentran coloreadas de acuerdo con la clase de antimicrobiano a la cual se presentó resistencia (aminoglucósidos, naranja; antagonistas de la ruta biosintética del folato, verde; β-lactámicos, azul; anfénicoles, amarillo; fluoroquinolonas, gris; nitrofuranos, azul claro).

Cuadro 5. Rasgos fenotípicos de resistencia asociados al origen de aislamiento de las cepas de *E. coli*.

	No. (%) de aislamientos			Valor p^a
	Clínico (n = 7)	Ambiental (n = 5)	Animal (n = 3)	
Antimicrobianos				
Ampicilina	4 (57.1)	4 (80)	2 (66.6)	0.7902
Carbenicilina	3 (42.8)	3 (60)	1 (33.3)	1
Cefalotina	3 (42.8)	1 (20)	0 (0)	0.4615
Cefotaxima	2 (28.5)	1 (20)	0 (0)	1
Amikacina	1 (14.2)	0 (0)	0 (0)	1
Gentamicina	1 (14.2)	2 (40)	0 (0)	0.5385
Netilmicina	2 (28.5)	1 (20)	0 (0)	1
Ciprofloxacino	5 (71.4)	4 (80)	0 (0)	0.1469
Norfloxacino	2 (28.5)	2 (40)	0 (0)	0.7692
Cloranfenicol	1 (14.2)	2 (40)	0 (0)	0.5385
Nitrofurantoina	1 (14.2)	1 (20)	0 (0)	1
Trimetoprima/ sulfametoxazol	3 (42.8)	3 (60)	0 (0)	0.3287
Clase antimicrobiano				
Aminoglucósidos	2 (28.5)	2 (40)	0 (0)	0.7692
Anfenicoles	1 (14.2)	2 (40)	0 (0)	0.5385
Antagonistas ruta de folatos	3 (42.8)	3 (60)	0 (0)	0.3287
β -lactámicos	4 (57.1)	4 (80)	2 (66.6)	0.7902
Fluoroquinolonas	5 (71.4)	4 (80)	0 (0)	0.1469
Nitrofuranos	1 (14.2)	1 (20)	0 (0)	1
Fenotipo MDR^b				
MDR	3 (42.8)	3 (60)	0 (0)	0.3287

^aPrueba exacta de Fisher.

^bMultirresistencia antibiótica.

9.2. Secuenciación, ensamble y anotación del genoma

9.2.1. Ensamble de genomas de *E. coli*

Las lecturas PE crudas de secuenciación se almacenaron en la base de datos SRA perteneciente al NCBI bajo los números de acceso indicados en el Anexo 14.1.1. El rango del número de lecturas PE crudas osciló de 0.64 a 3.60 millones (M). Realizada la limpieza y filtrado, el número de las lecturas PE osciló de 0.62 M a 3.43 M, conservándose lecturas de alta calidad en una proporción superior al 94% para cada uno de los genomas.

Los 15 genomas de *E. coli* fueron ensamblados *de novo* y validados produciéndose genomas con una profundidad promedio de 45X (17X – 91X), una longitud de genoma de 4.99 Mpb (4.63 – 5.51 Mpb), así como un contenido de GC promedio de 50.73% (50.42% – 50.94%). Debido a que se obtuvieron ensambles de genomas fragmentados (> 200 *scaffolds*), se procedió a realizar un *scaffolding* asistido por un genoma de referencia obteniéndose *drafts* de genomas con una longitud promedio de 5.00 Mpb (4.62 – 5.53 Mpb), contenido de GC de 50.54% (50.14% – 50.78%) y 50 *scaffolds* (6 – 144 *scaffolds*) con una longitud mayor a 300 pb (Cuadro 6). Los ensambles de genomas se almacenaron en la base de datos *Assembly* perteneciente al NCBI bajo los números de acceso indicados en el Anexo 14.1.1.

9.2.2. Anotación de genomas de *E. coli*

La anotación genómica consiste en la predicción de las regiones con secuencias codificantes de proteínas (CDS – por sus siglas en inglés), así como la

asignación funcional de las secuencias génicas predichas a lo largo del genoma. En el presente trabajo los genomas ensamblados de *E. coli* fueron anotados empleando el servidor RAST. El proceso de anotación de RAST implica la identificación de las secuencias codificantes y la asignación de estas a los subsistemas correspondientes, es decir, a una colección de familia de proteínas funcionalmente relacionadas. En general, el número promedio determinados de genes y CDS resultó de 5,284 (4,741 – 5,826) y 5,113 (4,586 – 5,658), respectivamente (Cuadro 6).

En promedio, el 30% de los CDS identificados en cada uno de los 15 genomas tuvieron asignación dentro de algún subsistema (Figura 4A). Lo que indica que en promedio 3,589 CDS no presentan la suficiente evidencia para una asignación y reconstrucción de una red metabólica de acuerdo con RAST; hecho posiblemente explicado por el elevado número de secuencias putativas (33%) que presentan homología con secuencias previamente identificadas en genomas cercanos, pero su función continúa siendo desconocida. Respecto a las asignaciones funcionales determinadas (Figura 4B), las categorías más representadas resultaron metabolismo de carbohidratos ($\bar{x} = 359$ CDS), metabolismo de aminoácidos y sus derivados ($\bar{x} = 305$ CDS), metabolismo de proteínas ($\bar{x} = 228$ CDS) y transporte de membrana ($\bar{x} = 119$ CDS).

Al evaluarse la variación en la longitud (4.99 ± 0.27 Mpb), número de genes ($5,284 \pm 354$) y número de CDS ($5,113 \pm 343$) en los genomas de *E. coli* respecto a su origen de aislamiento se encontró diferencia estadísticamente significativa en la longitud del genoma ($p = 0.0252$) y el número de CDS codificados ($p = 0.0318$). Las comparaciones múltiples determinaron que las cepas de origen clínico presentan

genomas con longitud promedio mayor, seguido de las cepas de origen animal; sin embargo, su diferencia no es significativa. En cambio, las cepas de origen ambiental presentan genomas más pequeños, encontrándose diferencia estadísticamente significativa ($p = 0.0234$) respecto a las cepas de origen clínico (Figura 5A). El mismo efecto se identificó con el número de CDS contenido en los genomas, encontrándose diferencia significativa ($p = 0.0282$) entre las cepas de origen clínico y ambiental (Figura 5B).

Con relación al análisis comparativo de las categorías funcionales por subsistemas de RAST con mayor asignación de CDS respecto al origen de aislamiento, sólo la categoría asociada con la adquisición y metabolismo del hierro presentó diferencia estadísticamente significativa ($p = 0.0047$). Al realizarse la comparación múltiple, se determinó que existe diferencia significativa ($p = 0.016$) en el contenido de CDS que presentan las cepas de origen clínico en comparación con las de origen ambiental en este subsistema.

Cuadro 6. Características generales de los genomas de *E. coli* de origen ambiental, animal y clínico.

Aislados de <i>E. coli</i>	Longitud del genoma (Mpb)	GC (%)	Profundidad	<i>Scaffolds</i> (> 300 pb)	Anotación génica				
					Genes	CDS ^a	ARNr	ARNt	Subsistemas
CCDC44-3	5.29	50.14	54X	48	5,564	5,394	14	87	395
FD20-2	5.07	50.72	91X	44	5,365	5,197	13	82	375
FD21-2	5.53	50.62	46X	22	5,826	5,658	15	83	405
RUTI01	4.91	50.67	56X	75	5,134	4,983	12	86	385
RBR72	4.99	50.23	17X	144	5,634	5,503	7	65	383
RBR95	4.82	50.61	29X	50	4,902	4,787	7	76	378
U13824	5.37	50.6	43X	41	5,628	5,535	7	76	391
ADD105	4.62	50.71	30X	32	4,741	4,586	10	76	374
ADD147	4.77	50.45	60X	47	4,971	4,837	7	79	378
ADD167	4.65	50.67	60X	22	4,784	4,646	11	81	373
ADD169	4.87	50.54	44X	38	5,119	4,988	8	79	372
ADD183	4.88	50.52	44X	6	5,541	4,976	13	78	381
ACM5	5.27	50.4	38X	83	5,702	5,524	14	95	390
ACM22	5.07	50.45	33X	40	5,303	5,161	10	76	385
ACM47	4.88	50.78	30X	60	5,052	4,919	9	74	380

^aCDS, Secuencias codificantes de proteínas.

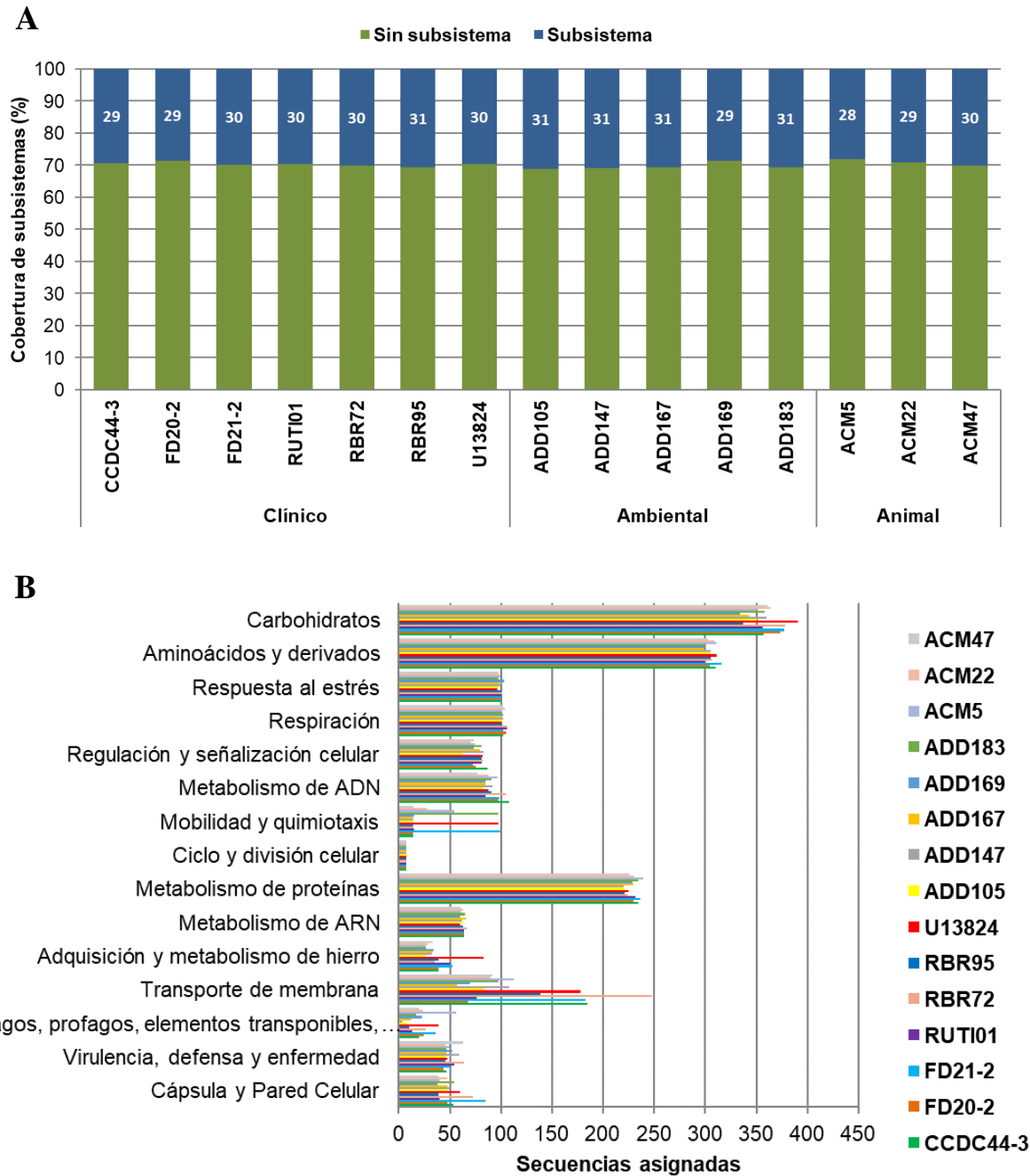


Figura 4. Representación esquemática de la anotación funcional en RAST de secuencias codificantes de proteínas (CDS) de *E. coli* de origen ambiental, animal y clínico. A. Cobertura de asignaciones funcionales en subsistemas de RAST. B. Categorías funcionales con mayor asignación de CDS. Las cepas de *E. coli* se encuentran indicadas de acuerdo con la leyenda de color.

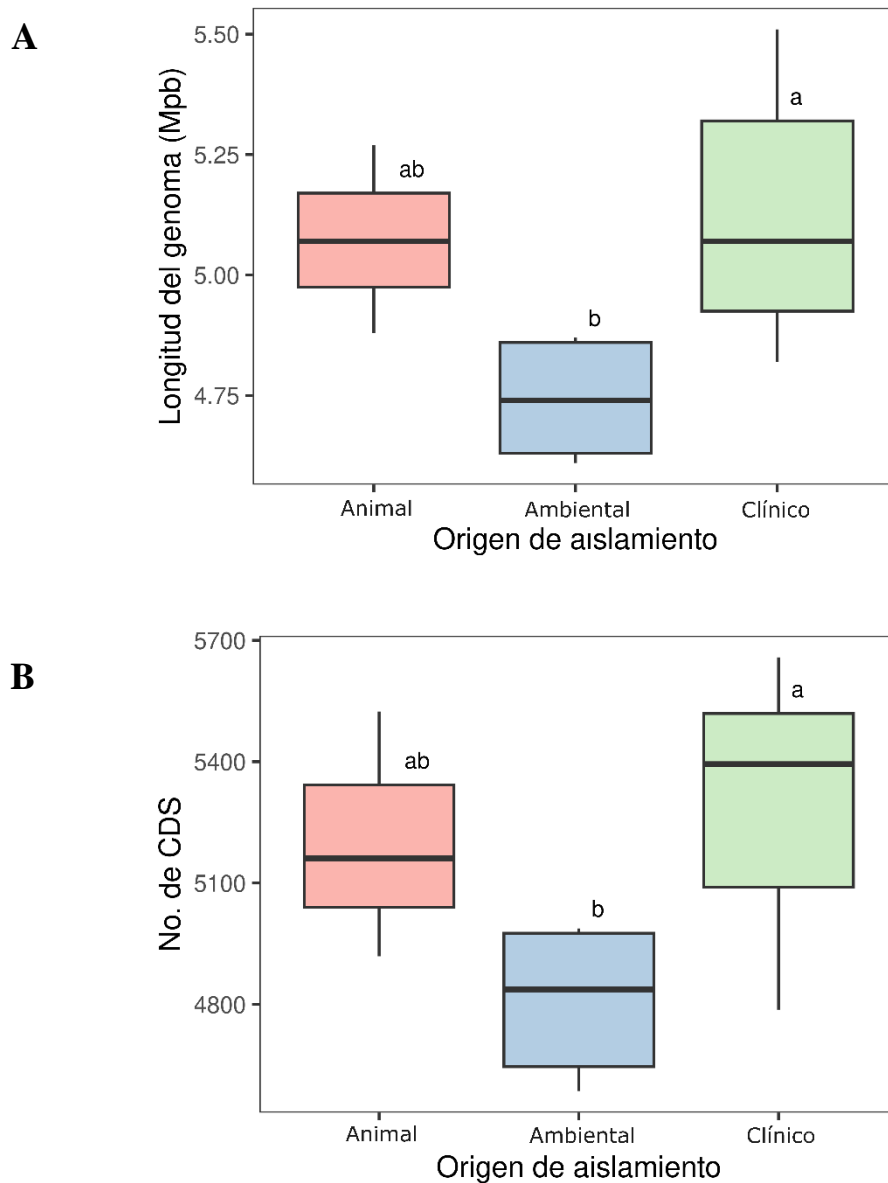


Figura 5. Variabilidad del tamaño del genoma y secuencias codificantes (CDS) de *E. coli* de origen animal, ambiental y clínico. A. Boxplot representando la comparación de la longitud del genoma de *E. coli* respecto al origen de aislamiento. **B.** Boxplot representando la comparación los CDS de *E. coli* respecto al origen de aislamiento. Letras diferentes indican diferencia estadística entre grupos ($p < 0.05$).

9.3. Tipificación molecular *in silico*

El uso conjunto de SerotypeFinder, MLST y ClermonTyping permitió determinar las características epidemiológicas de las cepas de *E. coli* de origen ambiental, animal y clínico, evidenciando la variabilidad genética y la correcta discriminación entre ellas. El Cuadro 7 muestra los rasgos epidemiológicos más relevantes de las cepas de *E. coli* bajo estudio.

En general, 13 diferentes serotipos fueron determinados entre las cepas de *E. coli*, reconociéndose un par de cepas de origen clínico, una cepa de origen animal y una cepa de origen ambiental que pertenecen al mismo serotipo (Cuadro 7). Cabe resaltar que, a diferencia de las cepas de origen clínico, cepas provenientes de agua superficial del drenaje agrícola (2) y acuicultura (2) fueron caracterizadas con serogrupos (antígeno O) no tipificables (ONT – por sus siglas en inglés); es decir, carecen del conjunto de genes que intervienen en el ensamble y exporte de las unidades del antígeno O mediada por la vía dependiente de Wzx/Wzy (*wzx* – *wzy* – *wzz*), así como de aquellos involucrados en el transporte del antígeno O vía dependiente de transportadores de la familia ABC (*wzm* – *wzt*).

De acuerdo con el genotipo determinado por el esquema de MLST de Achtman, las 15 cepas de *E. coli* pertenecen a 14 distintos STs, asignándose el mismo tipo de secuencia clonal (ST617) a las cepas de origen clínico RBR95 y ambiental ADD167 (Cuadro 8). El análisis reveló la presencia de clones de relevancia clínica entre el conjunto de cepas de *E. coli* analizadas independientemente de su origen de aislamiento, destacando los linajes ST4, ST40, ST69, ST410 y ST617. Al respecto, los linajes ST69, ST410 y ST617 han sido reconocidos como clones de alto riesgo de

carácter internacional por su fácil transmisión y persistencia en el hospedero, así como la posesión de distintos determinantes de resistencia antibiótica.

Es importante señalar que las cepas clínicas tipo EAEC CCDC44-3, RUTI01 y ambiental ADD169 fueron asignados a linajes no reportados con anterioridad. Por lo tanto, al registrarse en la base de datos pública de EnteroBase se designaron tres nuevos STs: ST12036, ST12035 y ST13498, respectivamente; constituyendo los únicos reportados a nivel internacional hasta la realización del presente trabajo. Por otro lado, la comparación y el análisis de los perfiles alélicos permitió agrupar los 14 STs identificados en complejos clonales (CCs), reconociéndose nueve diferentes CCs constituidos principalmente por un único aislado de *E. coli* (Cuadro 7). No obstante, siete cepas pertenecieron al CC ST10 (ST4, ST218, ST617, ST1491, ST12035, ST13498), considerándose así el CC más representativo.

En cuanto a la estructura poblacional, la filoagrupación identificó cinco grupos filogenéticos, es decir, los filogrupos A, B1, B2, C y D (Cuadro 7). El filogrupo A (8/15) fue el principal grupo filogenético identificado en la colección de cepas estudiadas, seguido del filogrupo B1 (3/15); ambos distribuidos independientemente de su origen de aislamiento. El filogrupo A se constituyó por cepas que presentaron la mayor variabilidad genética en cuanto a serotipos y STs. No obstante, la mayoría pertenecen al CC ST10. Asimismo, el filogrupo B1 se constituyó por cepas genéticamente variables en cuanto serotipo, STs y CCs. Sin embargo, resalta el hecho que tres de cuatro cepas caracterizadas como ONT pertenecen al filogrupo B1. Las cepas restantes se distribuyeron en los filogrupos D (2/15), B2 (1/15) y C (1/15).

Cuadro 7. Rasgos epidemiológicos de *E. coli* de origen ambiental, animal y clínico.

Aislado de <i>E. coli</i>	Origen	Serotipo^a	STs^b	CC^c	Filogrupo
CCDC44-3	Clínico	O17/O77:H18	12036	ST394	D
FD20-2	Clínico	O13/O129:H30	399	ST399	A
FD21-2	Clínico	O17/O77:H18	69	ST69	D
RUTI01	Clínico	O8:H30	12035	ST10	A
RBR72	Clínico	O25:H16	1491	ST10	A
RBR95	Clínico	O101:H9	617	ST10	A
U13824	Clínico	O25:H4	2279	ST131	B2
ADD105	Ambiental	ONT:H7	9006	ST446	B1
ADD147	Ambiental	ONT:H9	410	ST23	C
ADD167	Ambiental	O101:H10	617	ST10	A
ADD169	Ambiental	O96:H19	13498	ST10	A
ADD183	Ambiental	O6:H16	4	ST10	A
ACM5	Animal	ONT:H21	40	ST40	B1
ACM22	Animal	ONT:H7	11732	ST278	B1
ACM47	Animal	O160:H34	218	ST10	A

^aONT, Antígeno O no tipificable.

^bSTs, Tipo de secuencia clonal.

^cCC, Complejo clonal.

Cuadro 8. Perfiles alélicos de MLST de *E. coli* de origen ambiental, animal y clínico.

Aislado de <i>E. coli</i>	Origen	<i>adk</i> ^a	<i>fumC</i> ^b	<i>gyrB</i> ^c	<i>icd</i> ^d	<i>mdh</i> ^e	<i>purA</i> ^f	<i>recA</i> ^g	STs ^h
CCDC44-3	Clínico	1306	35	61	52	5	5	4	12036
FD20-2	Clínico	6	4	1	95	69	8	20	399
FD21-2	Clínico	21	35	27	6	5	5	4	69
RUTI01	Clínico	10	11	4	8	8	977	2	12035
RBR72	Clínico	6	11	4	223	8	78	2	1491
RBR95	Clínico	10	11	4	8	8	13	73	617
U13824	Clínico	53	40	47	13	36	8	29	2279
ADD105	Ambiental	6	19	3	16	773	8	6	9006
ADD147	Ambiental	6	4	12	1	20	18	7	410
ADD167	Ambiental	10	11	4	8	8	13	73	617
ADD169	Ambiental	10	7	4	1676	12	35	2	13498
ADD183	Ambiental	6	5	4	8	8	8	2	4
ACM5	Animal	6	4	5	26	20	8	14	40
ACM22	Animal	9	1751	64	18	11	8	6	11732
ACM47	Animal	10	11	4	12	8	8	2	218

^a*adk*, Adenilato ciclasa.

^b*fumC*, Fumarato hidratasa.

^c*gyrB*, ADN girasa.

^d*icd*, Isocitrato/isopropilmalato deshidrogenasa.

^e*mdh*, Malato deshidrogenasa.

^f*purA*, Adenilsuccinato deshidrogenasa.

^g*recA*, Motivo de unión de ATP/GTP.

^hSTs, Tipo de secuencia clonal.

9.4. Determinantes genéticos asociados a virulencia y resistencia antimicrobiana

9.4.1. Genes asociados a la virulencia (VAGs)

El análisis genómico empleando la base de datos de VirulenceFinder reveló la presencia de 43 potenciales factores de virulencia entre los 15 genomas secuenciados, mismos que se agruparon de acuerdo con el proceso patogénico en el cual se encuentran implicados. Los genes asociados a la virulencia (VAGs – por sus siglas en inglés) identificados con mayor frecuencia correspondieron a *terC* (100%, 15/15), perteneciente al operón de resistencia a telurio (*terZABCDE*); *gad* (80%, 12/15), codificante de la enzima glutamato descarboxilasa; *iss* (53%, 8/15) y *traT* (46%, 7/15), ambos codifican de proteínas de membrana externa (OMPs) que promueven la supervivencia y resistencia al complemento sérico; además, *lpfA* (46%, 7/15), codificante de la subunidad principal de la fimbria polar larga (Lpf – operón *lpfABCDE*).

El número de VAGs presentes en los genomas analizados osciló de dos a 22 genes por genoma; cada cepa de *E. coli* mostró una combinación particular de factores de virulencia. La Figura 6 muestra la distribución y perfiles genotípicos de VAGs identificados en las cepas de *E. coli* bajo estudio.

El análisis de distribución de VAGs indicó que las cepas U13824 (22 VAGs), FD21-2 (15 VAGs) y CCDC44-3 (11 VAGs) derivadas de muestras clínicas presentan una mayor prevalencia de determinantes de virulencia; mientras que las cepas ADD183 y ACM5, de origen ambiental y animal, presentaron 11 y 15 VAGs, respectivamente. Al respecto, los perfiles genotípicos de VAGs más representados

fueron los implicados en procesos patogénicos de adherencia, captación de hierro, protección bacteriana (protectinas) y supervivencia al estrés. En base a lo anterior, diversos grupos patogénicos fueron identificados entre la colección de cepas en estudio, incluyendo los patotipos aEPEC, ETEC, tipo EAEC y ExPEC/UPEC.

Particularmente, la cepa proveniente de acuicultura ACM5 (ST40/B1) se caracterizó por albergar diversos VAGs codificantes de intimina (*eae*), el receptor de intimina Tir (*tir*), proteínas estructurales (*espA/espF*) y efectoras (*cif*, *espJ*, *nleB*, *nleC*) del sistema de secreción tipo III y la enterotoxina EAST1 (*astA*). Sin embargo, no se identificó ningún gen integrante del operón *bfp* (*bfpABCDEFGHIJKLM*) ni del regulador transcripcional Per (*perABC*). En consecuencia, *E. coli* ACM5 se clasificó como cepa perteneciente al patotipo aEPEC. Por otra parte, las cepas clínicas RBR72 (ST1491/A) y ambiental ADD183 (ST4/A) compartieron un perfil genotípico de virulencia bastante similar (Figura 6), identificándose genes involucrados en la producción de la enterotoxina LT (*ltcA*), biosíntesis de polisacáridos capsulares pertenecientes al grupo 3 (*kpsE*, *kpsMIII*, *kpsM_K15*) y la SPATE EatA (*eatA*). Por lo que, de acuerdo con el perfil de VAGs ambas se asignaron al patotipo ETEC.

Las cepas clínicas CCDC44-3 (ST12036/D) y FD21-2 (ST69/D) compartieron parcialmente su perfil de virulencia, destacando la presencia de *air* y *eilA*; determinantes ampliamente prevalentes en cepas del patotipo EAEC. Genes que codifican para la adhesina agregativa Air, que presenta repeticiones de inmunoglobulina, y el regulador transcripcional EilA homólogo a HilA de *Salmonella*. Aunque los factores de virulencia clásicos característicos de EAEC como fimbrias agregativas (AAF/I – AAF/V), dispersina (*aap*), AggR, enterotoxina EAST1 y SPATEs

Pet o Pic no fueron identificados, ambas cepas fueron clasificadas como “tipo EAEC” dada la heterogeneidad respecto al contenido génico de virulencia que presenta este patotipo.

Finalmente, el genoma de la cepa clínica U13824 (ST2279/B2) albergó diversos VAGs implicados en todos los procesos patogénicos aquí descritos, con excepción del grupo de regulador transcripcional (Figura 6). Entre ellos destacó la presencia de múltiples sistemas de adherencia, incluyendo la fimbria tipo P (*papa_F43*, *papC*), la fimbria YcfV (*yfcV*), y factores de adherencia Hra (*hra*) e Iha (*iha*); diversos sistemas para la captación de hierro mediada por sideróforos (*fyuA*, *irp2*, *iucC*, *iutA*), adquisición del grupo hemo (*chuA*) y transportadores de iones metálicos (*sitA*). Asimismo, resaltó la identificación de distintos genes involucrados en la producción de toxinas, entre ellas la toxina CNF1 (*cnf1*) y Usp (*usp*), la biosíntesis de polisacáridos capsulares pertenecientes al grupo 2 (*kpsE*, *kpsMIII_K5*), la supervivencia/resistencia al complemento sérico (*iss*, *ompT*, *traT*) y la producción de la SPATE Sat (*sat*). Lo anterior demuestra el potencial patogénico de *E. coli* U13824, aislado derivado de ITU, corroborando su naturaleza como cepa ExPEC y por ende UPEC.

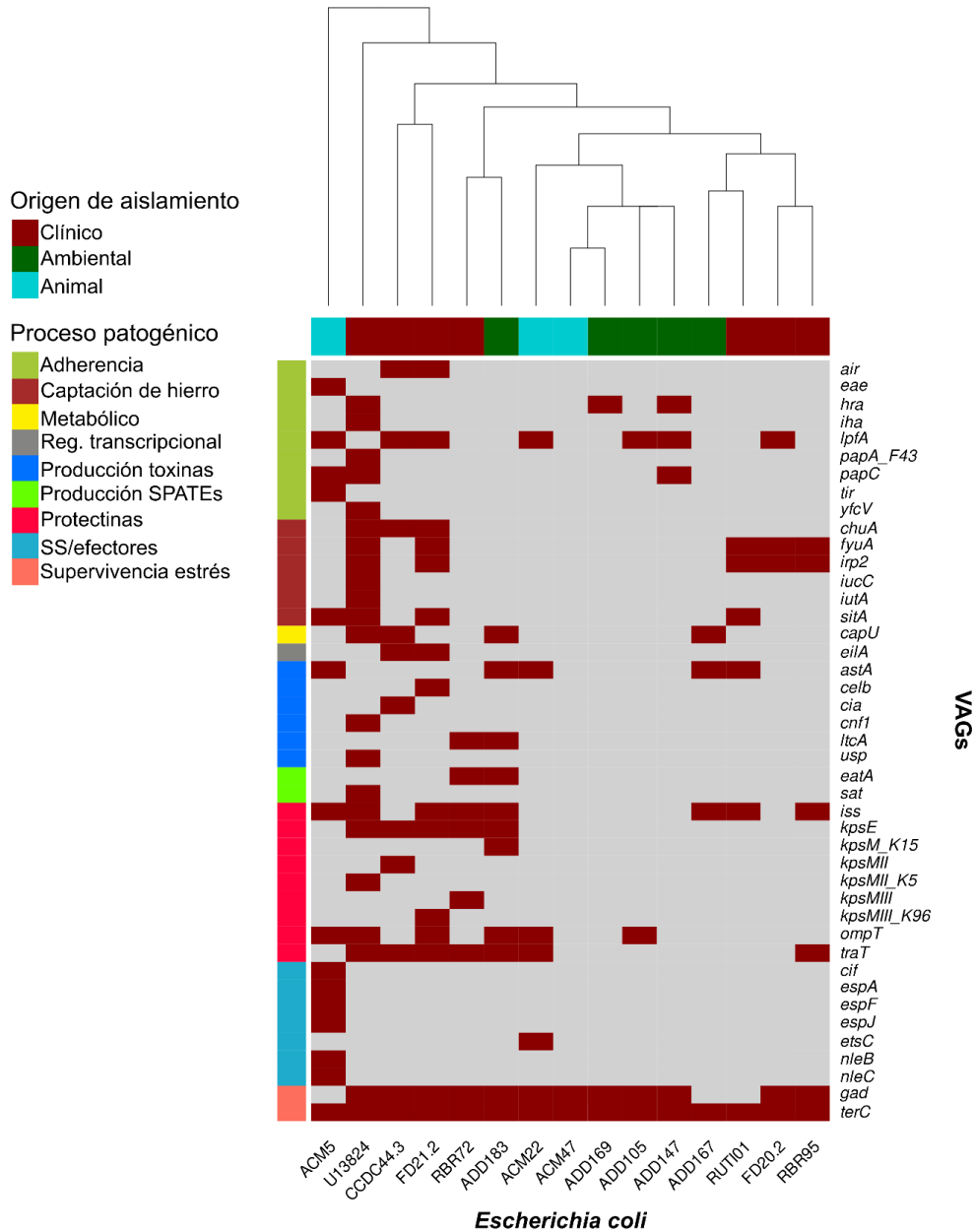


Figura 6. Perfil genotípico de VAGs en *E. coli* de origen ambiental, animal y clínico. Mapa de calor que indica la presencia (rojo) o ausencia (gris claro) de los VAGs identificados en los genomas de las cepas de *E. coli* provenientes de diversos orígenes. Anotación horizontal: Origen de aislamiento de cada cepa de *E. coli* (clínico, rojo oscuro; ambiental, verde oscuro; animal, turquesa oscuro). Anotación vertical: Proceso patológico asociado (adherencia, verde limón; captación de hierro, café rojizo; metabólico, amarillo; regulador transcripcional, gris; producción de toxinas, azul; producción de SPATEs, verde brillante; protectinas, rosa americano; sistemas de secreción [SS] y efectores, azul claro; supervivencia al estrés, salmón).

9.4.2. Genes asociados a la resistencia antimicrobiana (ARGs)

El análisis de los 15 genomas secuenciados, empleando las bases de datos de ResFinder y PointFinder, reveló la presencia de 35 diferentes determinantes génicos implicados en la resistencia antimicrobiana adquirida y seis mutaciones cromosómicas dentro de genes diana en la región QRDR (*gyrA*, *parC*, *parE*). Entre los genes asociados a la resistencia antimicrobiana (ARGs – por sus siglas en inglés) se identificaron diversas variantes implicadas en la resistencia a aminoglucósidos (11), anfenicoles (3), β -lactámicos (3), desinfectantes (3), fosfomicina (1), lincosamidas (1), macrólidos (2), quinolonas (2), sulfonamidas (3), tetraciclinas (2) y trimetoprima (4). No se identificaron determinantes asociados a la resistencia de carbapenémicos y colistina. La Figura 7 muestra la distribución y los perfiles genotípicos de ARGs reconocidos en las cepas de *E. coli* en estudio.

Para la clase de aminoglucósidos, los ARGs más prevalentes fueron las variantes *aph(3'')-Ib* y *aph(6)-Id* que confieren resistencia a estreptomicina. Cabe señalar que se identificó la variante *aac(6')-Ib-cr* implicada a su vez en la susceptibilidad reducida a ciprofloxacino. Entre los genes identificados que confieren resistencia a β -lactámicos, la variante más prevalente resultó *bla_{TEM-1B}*, misma que codifica para una β -lactamasa de espectro reducido tipo TEM-1. En menor frecuencia fueron identificadas las variantes génicas *bla_{OXA-1}* y *bla_{CTX-M-15}*. La primera codifica una β -lactamasa de la clase D perteneciente a la familia OXA con susceptibilidad reducida a la combinación del grupo de fármacos penicilina/inhibidor de β -lactamasas, mientras que la segunda codifica para una BLEE de la familia CTX-M que media la resistencia a cefalosporinas de amplio espectro y monobactámicos.

Adicionalmente, resalta la identificación de ARGs implicados en la resistencia a fosfomicina (*fosA7*) y lincosamidas [*Inu(F)*].

La predicción de los determinantes de resistencia antimicrobiana basada en el análisis del genoma confirmó, de manera parcial, los perfiles de resistencia fenotípica descritos previamente. Lo anterior se debió que cepas provenientes de agua del drenaje agrícola ADD105 (ST9006/B1) y de acuicultura aEPEC ACM5 (ST40/B1) y ACM22 (ST11732/B1) exhibieron resistencia y susceptibilidad reducida a ampicilina, respectivamente; aunque no se identificó ningún determinante adquirido asociado con la resistencia a β -lactámicos. Todos los genomas analizados albergaron al menos un determinante de resistencia antimicrobiana. El gen *mdf(A)*, codificante de un sistema de eflujo a múltiples drogas, resultó el más representado entre la colección analizada; sin embargo, este determinante presenta mayor grado de afinidad por moléculas no antibióticas.

Con respecto a las cepas MDR identificadas, las cepas clínicas ETEC RBR72 (ST1491/A), RBR95 (ST617/A), ExPEC/UPEC U13824 (ST2279/B2) y ambientales ADD147 (ST410/C), ADD167 (ST617/A) y ADD169 (ST13498/A) presentaron un mayor número de determinantes de resistencia en sus genomas, incluyendo mutaciones cromosómicas en los genes diana *gyrA*, *parC* y *parE* (Figura 7).

Si bien la cepa tipo EAEC FD21-2 (ST69/D) no exhibió un fenotipo MDR, y solo mostró resistencia a SXT y susceptibilidad reducida a CL, albergó en su genoma 11 determinantes de resistencia distintos, incluyendo ARGs asociados a tetraciclinas [*tet(B)*] y macrólidos [*mph(A)*] (Figura 7). Sin embargo, estos agentes antimicrobianos no fueron evaluados en el ensayo de susceptibilidad fenotípica. Consecuentemente,

E. coli FD21-2 podría considerarse una cepa MDR al basarnos en el genotipo de su genoma.

Asimismo, resaltó la presencia de dos integrones de clase 1 en el genoma de FD21-2. El primero contiene el casete génico *ant(2'')-Ia-aadA1-cmlA1* en su región variable, que confiere resistencia a aminoglucósidos (*ant(2'')-Ia*, *aadA1*) y cloranfenicol (*cmlA1*), así como su región 3' conservada (3'CS) *qacEΔ1-sul1-orf5* que está asociada a la resistencia a desinfectantes y sulfonamidas. El segundo integrón carece de la clásica región 3'CS y contiene solamente el gen *dfrA17* en su región variable, implicado en la resistencia a trimetoprima. Corriente abajo, se identificó el operón de resistencia a tetraciclina con *tet(B)* como variante génica. No se identificaron mutaciones en la región QRDR asociadas a niveles elevados de resistencia a fluoroquinolonas. No obstante, se identificó la variante génica *qnrB19*, PMQR asociado a bajos niveles de resistencia a fluoroquinolonas.

En ETEC RBR72 se identificaron seis ARGs y una mutación dentro de QRDR. La mutación corresponde a la sustitución no-sinónima S83L en la subunidad GyrA de la ADN girasa y está relacionada a susceptibilidad reducida hacia ciprofloxacino. Asimismo, se encontró la variante génica *tet(A)*, así como un integrón de clase 1 con el casete génico *dfrA15-aadA24* estructurado en su región variable y región 3'CS clásica intacta (*qacEΔ1-sul1-orf5*). Por el contrario, el genoma de RBR95 co-albergó diez ARGs, así como cuatro mutaciones puntuales en la región QRDR que propician múltiples sustituciones no-sinónimas en las subunidades GyrA (S83L, D87N), ParC (S80I) y ParE (S458A) de la topoisomerasa IV (Figura 7).

Aunque en RBR95 no se identificó la presencia de algún integrón, se reconoció un loci complejo de resistencia antibiótica (CRL – por sus siglas en inglés) que albergó ARGs frente a β -lactámicos (*bla*_{TEM-1B}), tetraciclinas [*tet(A)*], aminoglucósidos (*aph(6)-Id*, *aph(3'')-Ib*) y sulfonamidas (*sul2*). Adicionalmente, resalta la presencia de los genes *bla*_{CTX-M-15} y *bla*_{OXA-1}. Este último fue identificado dentro de un casete génico flanqueado por *catB3*, variante alélica involucrada en la resistencia a cloranfenicol mediante la codificación de una enzima acetiltransferasa, y *aac(6')-Ib-cr*, variante génica codificante de la EMA implicada en la resistencia dual frente aminoglucósidos y ciprofloxacino.

La cepa ExPEC/UPEC U13824 co-albergó 14 distintos determinantes de resistencia en su genoma y comparte un perfil de ARGs similar al de RBR95, diferenciándose por la posesión adicional de los genes *aac(3)-IIa*, *tet(B)* y *dfrA8*, así como las mutaciones en ParC (E84V) y ParE (I529L) (Figura 7). Asimismo, a diferencia de la región CRL identificada en RBR95, la región CRL de *E. coli* U13824 se encontró constituida por los genes *aac(6')-Ib-cr*, *bla*_{OXA-1}, *catB3* Δ , *sul2*, *aph(3'')-Ib*, *aph(6)-Id* y *aac(3)-IIa*.

Con respecto a las cepas ambientales, *E. coli* ADD147, ADD167 y ADD169 poseen 14, 11 y 10 ARGs, respectivamente (Figura 7). Mientras que las cepas ADD147 y ADD167 presentaron un perfil mutacional en QRDR similar, esto es, sustituciones en GyrA (S83L, D87N), ParC (S80I) y ParE (S458A), *E. coli* ADD169 albergó la variante *qnrB6*. Estas características contribuyeron al fenotipo de resistencia y susceptibilidad reducida observada a CPF de ADD147/ADD167 y

ADD169, respectivamente. En los genomas de las tres cepas MDR ambientales se reconocieron integrones de clase 1 con distintos ARGs asociados.

Particularmente, el integrón identificado en *E. coli* ADD147 destaca por presentar el casete génico *dfrA12-orfF-aadA2-cmlA1-aadA1-qacH-tnp440-sul3* que porta determinantes implicados en la resistencia frente a trimetoprima, aminoglucósidos, cloranfenicol, desinfectantes y sulfonamidas, respectivamente. El gen de resistencia a anfenicoles (*floR*) se localizó corriente arriba del integrón de clase 1 asociado a *sul3*. En contraste, el integrón identificado en la cepa ADD167 se encuentra flanqueado por regiones que co-albergan diversos ARGs. Corriente arriba se encontró la unidad de transposición que moviliza a la BLEE CTX-M-15 (*ISEcp1-bla_{CTX-M-15}-orf477Δ*) y el gen *aac(3)-IIa*, mientras que corriente abajo se identificó el re-arreglo génico *sul2-aph(3'')-Ib-aph(6)-Id*. La región variable albergó el casete génico *dfrA17-aadA5* y la región 3'CS (*qacEΔ1-sul1-orf5*) se conservó intacta. En *E. coli* ADD169, el integrón analizado carecía de la región clásica 3'CS y mostró un casete génico constituido por los genes *dfrA12-orf-aadA2-qacEΔ1* contiguo al fragmento *insB-repA-repC-sul2-aph(3'')-Ib-aph(6)-Id*.

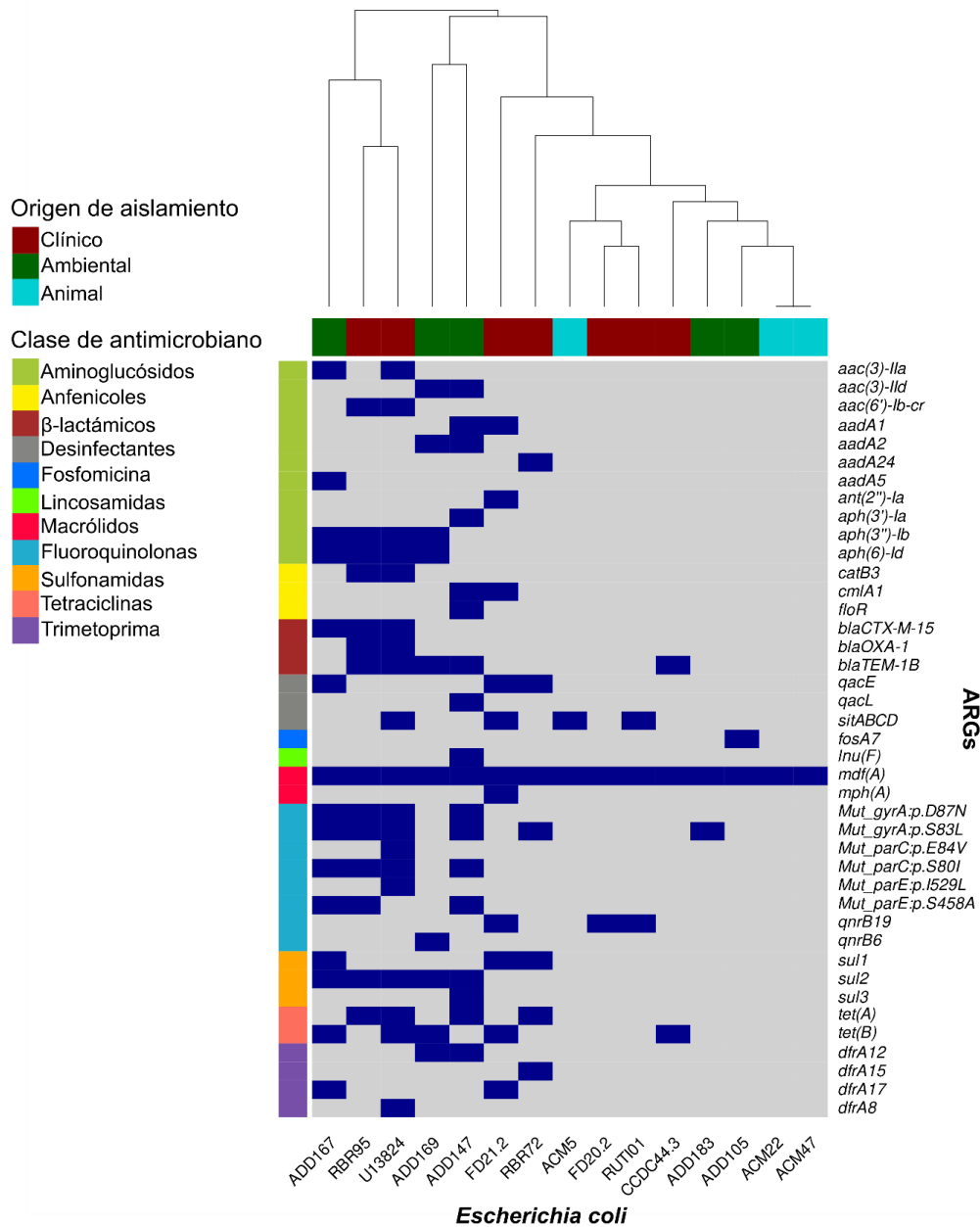


Figura 7. Perfil genotípico de ARGs en *E. coli* de origen ambiental, animal y clínico. Mapa de calor que indica la presencia (azul) o ausencia (gris claro) de los ARGs identificados en los genomas de las cepas de *E. coli* provenientes de diversos orígenes. Anotación horizontal: Origen de aislamiento de cada cepa de *E. coli* (clínico, rojo oscuro; ambiental, verde oscuro; animal, turquesa oscuro). Anotación vertical: Resistencia a clase de antimicrobiano (aminoglucósidos, verde limón; anfenicoles, amarillo; β-lactámicos, café rojizo; desinfectantes, gris; fosfomicina, azul; lincosamidas, verde brillante; macrólidos, rosa americano; fluoroquinolonas, azul claro; sulfonamidas, naranja; tetraciclinas, salmón; trimetoprima, morado).

9.5. Contenido plasmídico y profágico

El escrutinio de los 15 genomas de *E. coli* empleando la base de datos que integra PlasmidFinder permitió identificar 23 replicones plasmídicos pertenecientes a diferentes grupos/familias de plásmidos pequeños y de gran tamaño; siendo los replicones plasmídicos tipo Col y del grupo de incompatibilidad (Inc) tipo F lo más representados, respectivamente. Todas las cepas de *E. coli* albergaron replicones plasmídicos, excepto la cepa ambiental ADD105 (ST9006/B1). La Figura 8 muestra la distribución y los perfiles genotípicos de los replicones plasmídicos encontrados en las cepas de *E. coli* en estudio.

Los replicones plasmídicos IncF fueron identificados en la mayoría de las cepas de *E. coli* independientemente de su origen de aislamiento. Los plásmidos IncF son de naturaleza multireplicón y algunas cepas albergaron distintas combinaciones de las variantes alélicas de los replicones IncFIA, IncFIB, e IncFII. Notablemente, los replicones del grupo IncY, plásmidos tipo bacteriófago, solamente se encontraron en las cepas clínicas FD20-2 (ST399/A), tipo EAEC FD21-2 (ST69/D) y RUTI01 (ST12035/A).

Es importante señalar que la reconstrucción de secuencias plasmídicas completas empleando estrategias de secuenciación de lecturas cortas resulta un desafío. Lo anterior se debe a que los plásmidos presentan elementos de inserción (IS), secuencias repetidas y alto nivel de variabilidad genética. Por lo tanto, su reconstrucción genera ensamblajes incompletos o fragmentados en múltiples *contigs/scaffolds*. Sin embargo, el análisis realizado a los *scaffolds* que contienen los replicones plasmídicos permitió evidenciar la presencia de algunos ARGs y VAGs. El

Cuadro 9 muestra sólo las cepas de *E. coli* en los que se logró identificar determinantes de resistencia y/o virulencia albergados en los *scaffolds* que contienen replicones plasmídicos.

Basado en esta estrategia se presentan las siguientes observaciones: i) en los genomas analizados, los plásmidos del grupo IncF contienen los ARGs y VAGs; ii) las cepas de origen clínico presentan un mayor número de determinantes de resistencia antimicrobiana asociados a plásmidos del grupo IncF, contrario a los aislados provenientes de orígenes ambiental y animal en el que prevalecieron solamente determinantes de virulencia; y iii) el replicón plasmídico Col(pHAD28) identificado en el genoma de la cepa ADD167 (ST617/A) corresponde a plásmidos de tamaño pequeño (< 6 kpb). Sin embargo, el *scaffold* (28.7 kpb) que contenía dicho replicón co-albergó la mayoría de los ARGs identificados, incluyendo la BLEE CTX-M-15; hecho que pudiera deberse a un artefacto generado durante el ensamble del genoma.

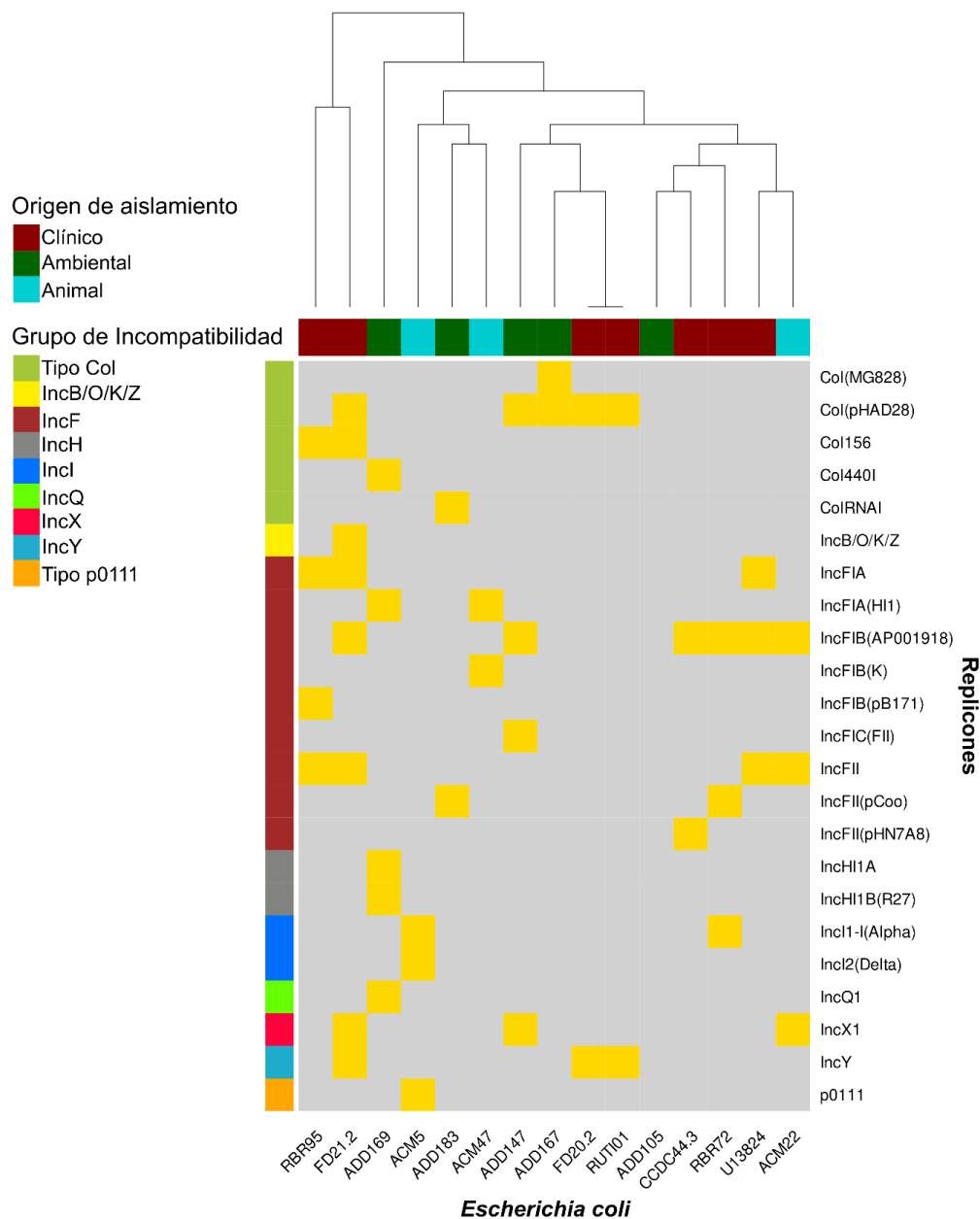


Figura 8. Perfil plasmídico de *E. coli* de origen ambiental, animal y clínico. Mapa de calor que indica la presencia (amarillo) o ausencia (gris claro) de los replicones plasmídicos identificados en los genomas de las cepas de *E. coli* provenientes de diversos orígenes. Anotación horizontal: Origen de aislamiento de cada cepa de *E. coli* (clínico, rojo oscuro; ambiental, verde oscuro; animal, turquesa oscuro). Anotación vertical: Familia/Grupo de Incompatibilidad (Inc) de plásmidos (Tipo Col, verde limón; IncB/O/K/Z, amarillo; IncF, café rojizo; IncH, gris; IncI, azul; IncQ, verde brillante; IncX, rosa americano; IncY, azul claro; tipo p0111, naranja).

Cuadro 9. Replicones plasmídicos asociados a determinantes de resistencia antimicrobiana y virulencia en *E. coli* de origen ambiental, animal y clínico.

Aislado de <i>E. coli</i>	Origen	Replicones	Scaffold (kpb)	ARGs	VAGs
CCDC44-3	Clínico	IncFIB(AP001918), IncFII(pHN7A8)	177.1	<i>bla_{TEM-1B}</i>	<i>cia, traT</i>
FD21-2	Clínico	IncFII, IncX1, IncB/O/K/Z	113.5	---	<i>traT</i>
		IncFIA, IncFIB(AP001918)	83.6	<i>dfrA17, tet(B)</i>	<i>traT</i>
RUTI01	Clínico	Col(pHAD28)	5.3	<i>qnrB19</i>	---
RBR72	Clínico	IncFIB(AP001918), IncFII(pCoo)	133.3	---	<i>ltaA</i>
RBR95	Clínico	IncFII	58.9	---	<i>traT</i>
		IncFIB(pB171)	42.2	<i>aac(6')-Ib-cr, bla_{OXA-1}, catB3Δ</i>	---
		IncFIA	21.3	<i>aph(6)-Ia, aph(3'')-Ib, bla_{TEM-1B}, sul2, tet(A)</i>	---
U13824	Clínico	IncFIA, IncFIB(AP001918), IncFII	85.9	<i>bla_{TEM-1B}, tet(A)</i>	---
ADD167	Ambiental	Col(pHAD28)	28.7	<i>aac(3)-IIa, aph(6)-Ia, aadA5, aph(3'')-Ib, sul1, sul2, dfrA17, bla_{CTX-M-15}, qacEΔ1</i>	---
ADD183	Ambiental	IncFII(pCoo)	125.3	---	<i>astA, capU, eatA, ltaA, traT</i>
ACM22	Animal	IncFIB(AP001918), IncFII	207.3	---	<i>astA, ompT, traT</i>

El análisis del contenido profágico en los genomas de *E. coli* usando PHASTER mostró 176 regiones asociadas a bacteriófagos: 56 intactas, 36 cuestionables y 84 incompletas (Cuadro 10). El contenido profágico varió de 4 a 20 profagos por genoma de *E. coli*, con longitudes de 3.8 a 96.8 kpb. Los genomas de *E. coli* de origen animal y clínico presentaron, en promedio, un mayor número de regiones asociadas a profagos, destacando las cepas aEPEC ACM5 (ST40/B1) con 18 y tipo EAEC FD21-2 (ST69/D) con 20 regiones. De acuerdo con PHASTER, las regiones profágicas asociadas a los replicones plasmídicos IncY identificados en las cepas FD20-2 (ST399/A), FD21-2 (ST69/D) y RUTI01 (ST12035/A) presentaron homología con los bacteriófagos P1 de *Escherichia* (NC_005856), SJ46 de *Salmonella* (NC_031129) y RCS47 de *Escherichia* (NC_042128), respectivamente. Sin embargo, los elementos similares a P1 y SJ46 fueron anotados como profagos incompletos (crípticos), mientras que RCS47 como cuestionable.

La inspección manual de las regiones asociadas a profagos permitió evidenciar la presencia de ciertos ARGs y VAGs codificados dentro dichas regiones. De los 15 genomas analizados, las regiones profágicas en CCDC44-3 (ST12036/D), ADD147 (ST410/C) y ADD169 (ST13498/A) no presentaron determinantes de resistencia antimicrobiana o de virulencia. La mayoría de los elementos profágicos que codificaron algún ARG o VAG fueron predichas como cuestionables o crípticos. El Cuadro 11 muestra las regiones profágicas que albergaron ARGs, VAGs y replicones plasmídicos identificadas en los genomas de *E. coli*.

Solamente cuatro de los genomas analizados albergaron determinantes de resistencia antimicrobiana asociados a elementos profágicos, específicamente, las

cepas MDR provenientes de origen clínico (3) y ambiental (1). Los ARGs codificados en dichas regiones confieren resistencia a aminoglucósidos (*aac(3)-IIa*, *aadA5*, *aadA24*), β -lactámicos (*bla_{CTX-M-15}*), sulfonamidas (*sul1*), tetraciclinas (*tet(B)*) y trimetoprima (*dfrA15*, *dfrA17*). Estos ARGs están principalmente codificados en elementos con homología al bacteriófago SJ46 de *Salmonella* (NC_031129) (Cuadro 11).

En contraste, la presencia de VAGs en las regiones profágicas fue independiente del origen de aislamiento de las cepas de *E. coli*, donde *iss* y *ompT* fueron los más prevalentes. Si bien el cargo de *iss* y *ompT* se presentó en elementos profágicos con distintas identidades, estos estuvieron principalmente asociados a los bacteriófagos BP-4795 de *Enterobacteria* (NC_004813) y DE3 de *Escherichia* (NC_042057), caracterizados como elementos intactos de acuerdo con PHASTER.

Cabe destacar que las cepas pertenecientes a los grupos patogénicos aEPEC (ACM5) y ETEC (ADD183) albergaron una mayor cantidad de VAGs codificados en profagos. Sin embargo, los elementos profágicos que los contenían fueron considerados como profagos crípticos o cuestionables (Cuadro 11). Asimismo, la enterotoxina LT (*ltcA*) presente en la cepa ETEC ADD183 (ST4/A) se identificó en un elemento profágico similar al bacteriófago phiKO2 de *Klebsiella* (NC_005857), hecho que sugiere que la adquisición de dicha toxina es derivada de un evento de transducción, uno de los mecanismos de transferencia horizontal génica.

Cuadro 10. Contenido profágico identificado en *E. coli* de origen ambiental, animal y clínico.

Aislado de <i>E. coli</i>	Origen	Profagos intactos (Longitud)	Profagos cuestionables (Longitud)	Profagos incompletos (Longitud)
CCDC44-3	Clínico	2 (34.4 – 60.2 kpb)	3 (6 – 45.3 kpb)	5 (4.6 – 49.8 kpb)
FD20-2	Clínico	6 (28.7 – 63.4 kpb)	1 (42.6 kpb)	7 (5.5 – 19.1 kpb)
FD21-2	Clínico	5 (39.4 – 64.1 kpb)	5 (3.9 – 61.2 kpb)	10 (3.8 – 24.9 kpb)
RUTI01	Clínico	2 (25.5 – 45.8 kpb)	2 (26.8 – 33.5 kpb)	8 (5.5 – 30.1 kpb)
RBR72	Clínico	4 (5.4 – 48.8 kpb)	5 (9.2 – 44.7 kpb)	6 (4.5 – 24.4 kpb)
RBR95	Clínico	1 (37 kpb)	1 (19.6 kpb)	2 (25.8 – 40.9 kpb)
U13824	Clínico	8 (10.8 – 90.2 kpb)	2 (32.2 – 36.3 kpb)	3 (7.1 – 38.6 kpb)
ADD105	Ambiental	2 (44.9 – 59.5 kpb)	---	2 (10.7 – 26.6 kpb)
ADD147	Ambiental	1 (11.5 kpb)	---	8 (4.2 – 26.5 kpb)
ADD167	Ambiental	2 (15.1 – 40.4 kpb)	1 (12.6 kpb)	6 (5.8 – 27.3 kpb)
ADD169	Ambiental	3 (26.9 – 43.1 kpb)	3 (18.4 – 96.8 kpb)	4 (5.6 – 25.5 kpb)
ADD183	Ambiental	4 (10.3 – 53.7 kpb)	5 (13.5 – 27.4 kpb)	6 (5.5 – 30.1 kpb)
ACM5	Animal	5 (14.8 – 58.1 kpb)	4 (21.7 – 50.3 kpb)	9 (9.2 – 37.5 kpb)
ACM22	Animal	7 (16.8 – 49.2 kpb)	3 (6.1 – 26 kpb)	2 (7.9 – 14.2 kpb)
ACM47	Animal	4 (35.2 – 46.6 kpb)	1 (41.4 kpb)	6 (5.3 – 21.5 kpb)

Cuadro 11. Regiones profágicas asociadas a determinantes de resistencia antimicrobiana, virulencia y replicones plasmídicos en *E. coli* de origen ambiental, animal y clínico.

Aislado de <i>E. coli</i> (Origen)	Profago (No. acceso NCBI)	Predicción región (Longitud)	ARGs	VAGs	Replicón plasmídico
FD20-2 (clínico)	<i>Escherichia</i> P1 (NC_005856)	Incompleto (13.1 kpb)	---	---	IncY
FD21-2 (clínico)	<i>Salmonella</i> SJ46 (NC_031129)	Incompleto (16.2 kpb)	---	---	IncY
	<i>Enterobacteria</i> Sfl (NC_027339)	Cuestionable (34.5 kpb)	---	<i>ompT</i>	---
	<i>Escherichia</i> DE3 (NC_042057)	Intacto (64.1 kpb)	---	<i>iss, sitA</i>	---
	<i>Escherichia</i> RCS47 (NC_042128)	Incompleto (24.9 kpb)	<i>tet(B), dfrA17</i>	---	---
RUTI01 (clínico)	<i>Escherichia</i> RCS47 (NC_042128)	Incompleto (33.5 kpb)	---	---	IncY
	<i>Escherichia</i> RCS47 (NC_042128)	Incompleto (23.1 kpb)	---	<i>astA</i>	---
RBR72 (clínico)	<i>Salmonella</i> SJ46 (NC_031129)	Cuestionable (25.3 kpb)	<i>dfrA15, aadA24, qacEΔ1, sul1</i>	---	---
	<i>Escherichia</i> HK544 (NC_019767)	Intacto (32.4 kpb)	---	<i>iss</i>	---
	Fago Stx2 1717 (NC_011357)	Cuestionable (9.2 kpb)	---	---	IncFIB(AP001918)
RBR95 (clínico)	<i>Enterobacteria</i> BP-4795 (NC_004813)	Intacto (37 kpb)	---	<i>iss</i>	---
U13824 (clínico)	<i>Salmonella</i> SJ46 (NC_031129)	Incompleto (16.2 kpb)	<i>aac(3)-IIa, bla_{CTX-M-15}</i>	---	---
	<i>Escherichia</i> HK629 (NC_019711)	Cuestionable (32.2 kpb)	---	<i>iss</i>	---

Cuadro 11. (Continuación).

Aislado de <i>E. coli</i> (Origen)	Profago (No. acceso NCBI)	Predicción región (Longitud)	ARGs	VAGs	Replicón plasmídico
ADD105 (ambiental)	<i>Escherichia</i> DE3 (NC_042057)	Intacto (59.2 kpb)	---	<i>ompT</i>	---
	<i>Enterobacteria</i> BP-4795 (NC_004813)	Intacto (40.4 kpb)	---	<i>iss</i>	---
ADD167 (ambiental)	<i>Salmonella</i> SJ46 (NC_031129)	Incompleto (5.8 kpb)	<i>bla_{CTX-M-15}</i>	---	---
	<i>Mycobacterium</i> Charlie (NC_023729)	Incompleto (13.5 kpb)	<i>aac(3)-IIa,</i> <i>dfrA17,</i> <i>aadA5,</i> <i>qacEΔ1, sul1</i>	---	---
	<i>Escherichia</i> vB_EcoS_swan01 (NC_048202)	Incompleto (12.9 kpb)	---	<i>ompT, iss</i>	---
ADD183 (ambiental)	<i>Escherichia</i> 520873 (NC_049344)	Cuestionable (27.4 kpb)	---	<i>capU</i>	---
	<i>Klebsiella</i> phiKO2 (NC_005857)	Cuestionable (16.3 kpb)	---	<i>ltaA</i>	---
	<i>Shigella</i> 75/02 Stx (NC_029120)	Incompleto (27.5 kpb)	---	<i>sitA</i>	---
ACM5 (animal)	<i>Escherichia</i> Lambda (NC_001416)	Cuestionable (36.6 kpb)	---	<i>espJ, cif</i>	---
	<i>Shigella</i> 75/02 Stx (NC_029120)	Incompleto (21.8 kpb)	---	<i>iss</i>	---
	<i>Salmonella</i> SJ46 (NC_031129)	Intacto (55.4 kpb)	---	<i>nleC</i>	---
ACM22 (animal)	Fago Stx2a_F451 (NC_049924)	Cuestionable (13.6 kpb)	---	<i>estC</i>	---
	<i>Yersinia</i> PY54 (NC_005069)	Intacto (16.8 kpb)	---	<i>ompT,</i> <i>astA</i>	---
ACM47 (animal)	<i>Escherichia</i> SH2026Stx1 (NC_049919)	Incompleto (7.3 kpb)	---	---	IncFIA(HI1)

9.6. Análisis filogenético

La concatenación de las secuencias de los siete genes constitutivos (*adk*, *fumC*, *gyrB*, *mdh*, *icdA*, *purA*, *recA*) empleadas en el esquema MLST de Achtman, generó grupos de secuencias con una longitud de 3,423 nucleótidos. Los 3,423 residuos nucleotídicos fueron empleados para la reconstrucción del árbol filogenético basado en el algoritmo de BIONJ. La Figura 9 muestra el árbol filogenético Neighbor-joining (NJ) resultante del conjunto de datos concatenados de los genes constitutivos de MLST extraídos de los genomas de *E. coli*.

La reconstrucción filogenética basada en MLST agrupó las 15 cepas de *E. coli* en cuatro clados de acuerdo con el filogrupo al que pertenecen. El clado 1 y 2 albergan a la mayoría de las cepas en estudio (12/15) y, por tanto, una mayor diversidad genética respecto a sus rasgos epidemiológicos (serotipo/STs). Ambos clados contuvieron cepas provenientes de los tres orígenes de aislamientos. El clado 1 (n = 7) se conformó por cepas restringidas al filogrupo A y al complejo clonal (CC) ST10. El clado 2 (n = 5) incluyó principalmente cepas del filogrupo B1 y restringidas a serogrupos ONT. No obstante, el clado 2 también albergó a las cepas FD20-2 y ADD147, pertenecientes al filogrupo A y C, respectivamente. La cepa ADD147 se posicionó entre la única cepa del filogrupo A y el conjunto de cepas del filogrupo B1 (Figura 9).

Las cepas pertenecientes a grupos patogénicos y MDR se distribuyeron en los cuatro clados. De las siete cepas catalogadas como MDR, la mayoría fueron agrupadas en el clado 1, entre las cuales, aquellas pertenecientes al linaje ST617 albergan la BLEE tipo CTX-M-15, al igual que la cepa ExPEC/UPEC U13824, único

aislado perteneciente al filogrupo B2. De acuerdo con el análisis filogenético, las cepas ETEC RBR72 y ADD183, así como la tipo EAEC CCDC44-3 y FD21-2 se encuentran estrechamente relacionadas (Figura 9). Sin embargo, difieren considerablemente por su origen de aislamiento, perfiles fenotípicos de resistencia antimicrobiana, características epidemiológicas, así como en su repertorio de ARGs.

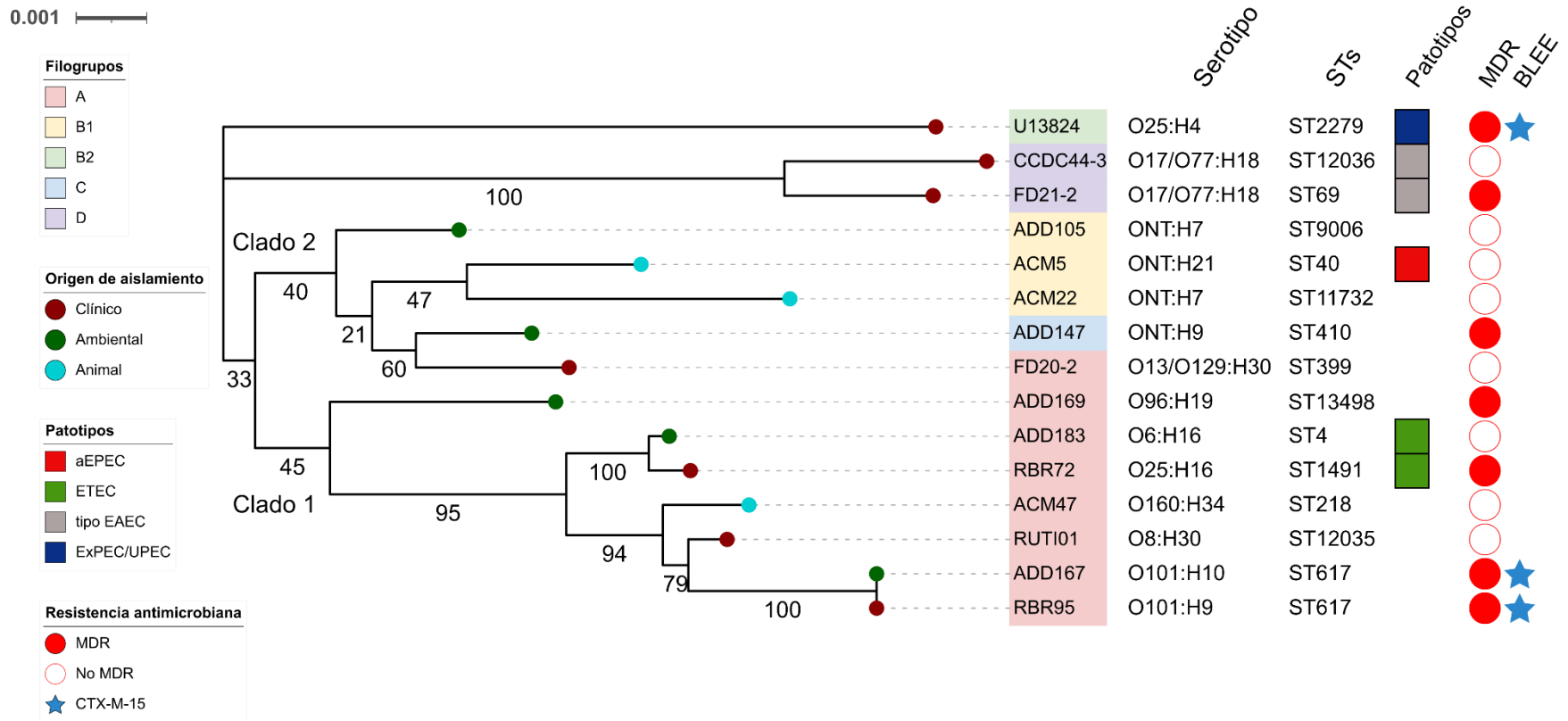


Figura 9. Árbol filogenético Neighbor-Joining (NJ) de los 15 genomas de *E. coli* de origen ambiental, animal y clínico. La reconstrucción filogenética se realizó basada en la concatenación de las secuencias MLST de los genes constitutivos *adk*, *fumC*, *gyrB*, *mdh*, *icdA*, *purA*, *recA* (3,423 nucleótidos) empleando el algoritmo de BIONJ y el modelo evolutivo de Kimura-2 parámetros (K80). Los valores de Bootstrap se indican para cada rama. La barra de escala indica el número de sustituciones nucleotídicas por sitio.

9.6.1. Contexto global de grupos clonales de alto riesgo

La búsqueda en EnteroBase indicó que las cepas pertenecientes a los grupos clonales ST9006, ST11732, ST12035, ST12036 y ST13498 están subrepresentadas, identificándose solamente registros dobles (ST9006, ST11732) o únicos (ST12035, ST12036, ST13498) en la base de datos. Por lo tanto, éstas no fueron consideradas para el análisis filogenético. Por otro lado, la búsqueda del conjunto de genomas de los grupos clonales analizados (ST4, ST40, ST69, ST410, ST617 y ST2279) permitió obtener colecciones de cepas de *E. coli* de carácter internacional que pertenecen a linajes de relevancia médica.

Es importante destacar la casi nula presencia de cepas de *E. coli* de origen mexicano en la base de datos de EnteroBase. Hasta la realización del presente trabajo, sólo se cuenta con 237 genomas provenientes de México, incluyendo los 15 aquí secuenciados, lo que representa el 0.00083% del total de registros en EnteroBase. En general, las colecciones globales de los grupos clonales analizados se encontraron representadas predominantemente por cepas derivadas de aislamientos humanos. Sin embargo, un número significativo de cepas también se encontraron asociadas a otros hospederos, principalmente ganado, y en menor medida a cepas de origen ambiental o alimentario; mientras, que de algunas otras se carecía de la información de su origen de aislamiento o procedencia.

De acuerdo con EnteroBase, el grupo clonal ST4, linaje perteneciente al CC ST10, es un grupo clonal patogénico InPEC representado principalmente por el patotipo ETEC (Figura 10A). La colección global del linaje ST4 se encuentra constituida por un total de 247 cepas, la mayoría son procedentes de Reino Unido y

Estados Unidos y sólo dos provienen de México (ADD183 y FMU073332). Asimismo, el 57% de las cepas provienen de fuentes humanas, principalmente de heces, y solo dos cepas de cuerpos acuáticos, incluyendo a ADD183, aquí estudiada (Figura 10B).

Si bien *E. coli* ADD183 (Sinaloa) y FMU073332 (Morelos) son cepas mexicanas, no se encuentran estrechamente relacionadas de acuerdo con el esquema de cgMLST, identificándose una diferencia superior a 200 alelos entre ellas. La rama que albergó a *E. coli* ADD183 incluye 27 cepas que mostraron una distancia alélica entre 2 – 34 del esquema cgMLST con respecto a ADD183. Asimismo, ADD183 se encontró en un sub-clado que contiene cinco cepas de *E. coli* de origen desconocido, todas procedentes de Estados Unidos. Las cepas más estrechamente relacionadas a ADD183 fueron aquellos identificados con el *barcode* de EnteroBase ESC_HA3106AA, ESC_HA3105AA y ESC_HA3103AA difiriendo por dos, tres y cuatro alelos cgMLST, respectivamente (Figura 10C).

Igualmente, el grupo clonal ST40, linaje perteneciente al CC ST40, comprende un grupo patogénico establecido por distintos patotipos InPEC, entre los que destacan EPEC, STEC, ETEC y EHEC; siendo el primero de ellos el más prevalente (Figura 11A). La colección global del linaje ST40 se conforma por 427 cepas, la mayoría son procedentes de Reino Unido (40%) y Estados Unidos (12%) y en menor medida de China (5%), España (5%) y Alemania (2%). El linaje ST40 se integra principalmente por cepas aisladas de muestras de heces de fuentes humanas y animales; la cepa *E. coli* ACM5 (Sinaloa) derivada de animales acuáticos (*Oreochromis* sp.) e identificada en la presente investigación y la cepa MEX-17

(Yucatán), derivada de heces de un infante, son las únicas procedentes de México (Figura 11B).

No obstante, ACM5 y MEX-17 presentan una diferencia alélica superior a 200 alelos cgMLST y sus perfiles de VAGs difieren clasificándolas en cepas aEPEC y EAEC, respectivamente. *E. coli* ACM5 se agrupó en una rama discreta constituida por 20 cepas derivadas principalmente de fuentes humanas, sin embargo, ACM5 presentó gran divergencia en comparación con el resto de las cepas y formó un nodo único. *E. coli* ACM5 se encuentra estrechamente relacionado al sub-clado que contiene seis cepas provenientes de Reino Unido (2), Estados Unidos (2), Dinamarca (1) y región geográfica desconocida (1); las distancias alélicas con respecto ACM5 estuvieron entre 150 – 162 (Figura 11C).

El grupo clonal ST69, linaje perteneciente al CC ST69, resultó considerablemente el linaje con mayor número de genomas entre los grupos clonales de alto riesgo aquí analizados. Esta colección incluye 3,903 cepas procedentes principalmente de Estados Unidos (23%), Reino Unido (6%), Australia (5%), Dinamarca (4%), Canadá, Francia y Países Bajos (3%). Aproximadamente, el 29% de las cepas de esta colección son de procedencia geográfica desconocida y sólo seis cepas (0.15%) son procedentes de México, entre ellas *E. coli* FD21-2. Dado que el grupo clonal ST69 se ha reconocido como un linaje ExPEC de carácter pandémico, menos del 2% de las cepas son catalogadas como cepas STEC de acuerdo con EnteroBase; principalmente por la posesión de la toxina Stx2 (Figura 12A).

El 64% de las cepas que integran la colección del linaje ST69 proceden de fuentes humanas, principalmente de aislamientos a partir de muestras de orina y sangre; mientras que, en conjunto, cerca del 21% provienen de hospederos no humanos, como aves de corral y ganado. Sólo el 4% de cepas se encuentran asociadas a muestras de origen ambiental, y en menor medida a muestras alimentarias (0.81%) (Figura 12B). Las cepas mexicanas de origen humano 118UI (CDMX), FD21-2 (Sinaloa), MEX-4 (Yucatán) y MEX-10 (Yucatán) se encuentran más estrechamente relacionadas entre sí en comparación a su contraparte de origen animal MOD1-EC914 (primate) y MOD1-EC983 (aviar), identificándose una distancia alélica superior a los 100 alelos de cgMLST contra las primeras.

E. coli FD21-2 se agrupó en una rama constituida por 329 cepas provenientes de distintos orígenes, principalmente humano y animal (Figura 12B). A su vez, FD21-2 se encontró en un sub-clado de 89 cepas que compartían, en general, una distancia alélica menor a los 50 alelos cgMLST. Las cepas más estrechamente relacionadas a FD21-2 resultaron aquellas identificadas con el *barcode* de EnteroBase con origen geográfico desconocido (ESC_BA7162AA, ESC_HA3230AA) y de Estados Unidos (ESC_BB8172AA, ESC_XA8668AA y ESC_BB6982AA) compartiendo distancias alélicas de 37 – 53 respecto a *E. coli* FD21-2 (Figura 12C).

Dos mil noventa y tres cepas conforman la colección global del grupo clonal ST410, linaje perteneciente al CC ST23. De estas cepas, el 13%, 7%, 6% y 5% proceden de Estados Unidos, Alemania, China y Tailandia, respectivamente. Cabe resaltar que se desconoce la procedencia geográfica del 26% de las cepas de dicha colección y que la cepa *E. coli* ADD147 aquí secuenciada es la única de México. De

acuerdo con EnteroBase, menos de 1% de las cepas del linaje ST410 corresponden a algún grupo patogénico InPEC (Figura 13A). Cerca del 54% de cepas provienen de aislamientos humanos, principalmente de orina, del tracto gastrointestinal y sangre; mientras que un 12% proceden de distintos hospederos de origen animal, especialmente ganado. Los aislamientos derivados de fuentes ambientales solo corresponden al 3% de la colección, dentro los que destacan aquellos provenientes de fuentes acuáticas (48) (Figura 13B).

E. coli ADD147 se agrupó dentro de una rama conformada por 92 cepas que comprende aislamientos de origen humano y animal, cepas que difieren por menos de 100 alelos del esquema cgMLST. A su vez, ADD147 formó un nodo singular dentro de un sub-clado constituido por 19 cepas que mostraron una distancia alélica de 60 – 86 con respecto a ADD147. Las cepas estrechamente relacionadas a ADD147 identificadas con el *barcode* de EnteroBase fueron originarias de Canadá (ESC_AB8451AA, ESC_AB7045AA y ESC_OA5418AA; 60 – 61 alelos cgMLST), Singapur (ESC_LA8671AA; 61 alelos cgMLST) y de región geográfica desconocida (ESC_EA7552AA; 62 alelos cdMLST) (Figura 13C).

La colección global del grupo clonal ST617, linaje perteneciente al complejo clonal ST10, incluye 745 cepas procedentes de distintas regiones geográficas, principalmente de Estados Unidos (14%), Alemania (7%), China y Países Bajos (6%), Francia (4%) y Canadá (3%). Sin embargo, la procedencia geográfica de aproximadamente el 30% de las cepas se desconoce. *E. coli* RBR95 y ADD167, secuenciadas en el presente trabajo, son las únicas cepas reportadas de México que se agrupan en el linaje ST617. Asimismo, cerca del 47% de las cepas que integran

dicha colección son derivadas de fuentes humanas, principalmente de muestras del tracto digestivo, orina y sangre; en cambio, cerca del 15% se derivan de hospederos no humanos, destacando ganado, animales de compañía y aves de corral. Menos del 5% corresponden a cepas derivadas de muestras ambientales, principalmente de fuentes acuáticas, y se desconoce el origen de aislamiento del 32% de cepas que integran dicha colección (Figura 14A).

Aunque *E. coli* RBR95 (Los Mochis, Sinaloa), derivada de heces de un adulto mayor, y ADD167 (Navolato, Sinaloa), derivada de agua de un drenaje agrícola, fueron obtenidas de zonas geográficas cercanas, éstas presentaron distancias alélicas de cgMLST cercanas a los 200 alelos entre ellas distribuyéndose en distintas ramas. Particularmente, RBR95 se albergó en una rama conformada por 37 cepas derivadas en su mayoría de aislamientos de origen humano y en menor grado de origen ambiental y animal. Asimismo, se posicionó dentro de un sub-clado formando un nodo singular en el que las cepas más cercanas mostraron una distancia alélica entre 32 – 50 del esquema cgMLST con respecto a RBR95; todas ellas procedentes de países de América del Norte, Europa, África Occidental y Medio Oriente. Las cepas estrechamente relacionadas a *E. coli* RBR95 resultaron identificadas con el *barcode* de EnteroBase y originarias de Alemania (ESC_EA3921AA; 32 alelos cgMLST), Polonia (ESC_QA7151AA; 32 alelos cgMLST) y Suiza (ESC_HA9993AA; 34 alelos cgMLST) (Figura 14B).

Por otro lado, *E. coli* ADD167 se alojó en una rama constituida por 216 cepas derivadas de fuentes humanas, principalmente. Ésta se posicionó en un sub-clado con 29 cepas que en general comparten una distancia alélica menor a los 50 alelos

cgMLST. El análisis cgMLST mostró que *E. coli* ADD167 forma un grupo de seis cepas con distancias alélicas de 28 – 39 con respecto a ADD167. Sin embargo, las cepas más estrechamente relacionadas, identificadas con el *barcode* de EnteroBase, fueron procedentes de Malawi (ESC_RA4943AA; 26 alelos cgMLST), Francia (ESC_BA5832AA; 28 alelos cgMLST), Alemania (ESC_BA5832AA; 28 alelos cgMLST) y de origen desconocido (ESC_EA3831AA; 28 alelos cgMLST, ESC_DA3742AA; 33 alelos cgMLST y ESC_LA4981AA; 33 alelos cgMLST) (Figura 14C).

El grupo clonal ST2279, linaje perteneciente al CC ST131, incluyó el menor número de genomas entre los grupos clonales de alto riesgo aquí analizados. De acuerdo con EnteroBase, la colección global del linaje ST2279 incluye 48 cepas procedentes principalmente de Estados Unidos (35%), Australia y Canadá (8%) y México y Zimbabue (4%). En general, cerca del 65% de cepas del linaje ST2279 son derivadas de fuentes humanas, principalmente aisladas de muestras de orina y sangre, mientras que sólo el 6% provienen de hospederos animales. El 29% de las cepas en este linaje tienen origen desconocido, en el que pudieran incluirse cepas provenientes de otras fuentes de aislamiento, incluyendo del medio ambiente (Figura 15A).

La mayoría de las cepas que integran el linaje ST2279 se agruparon en dos ramas con una distancia alélica cgMLST menor a 50 alelos. En el clado 1 aparecen cepas originarias de países norteamericanos, mientras que el clado 2 contuvo cepas de diversos orígenes geográficos, incluyendo África, Asia y Europa. *E. coli* U13824 se alojó en el clado 1 (Figura 15A). El análisis cgMLST mostró que *E. coli* U13824

está estrechamente relacionada con UTI-U7 (*barcode* ESC_BB4791AA), cepa derivada de infección del tracto urinario igualmente aislada en Culiacán, Sinaloa, México, con la que comparte una distancia cgMLST de 11 alelos. Asimismo, las cepas identificadas con los *barcode* y originarias de Estados Unidos (ESC_BB9856AA y ESC_CB0081AA) y Canadá (ESC_ AB8614AA y ESC_RA3879AA) comparten distancias alélicas de 17 – 23 respecto a *E. coli* U13824 (Figura 15B).

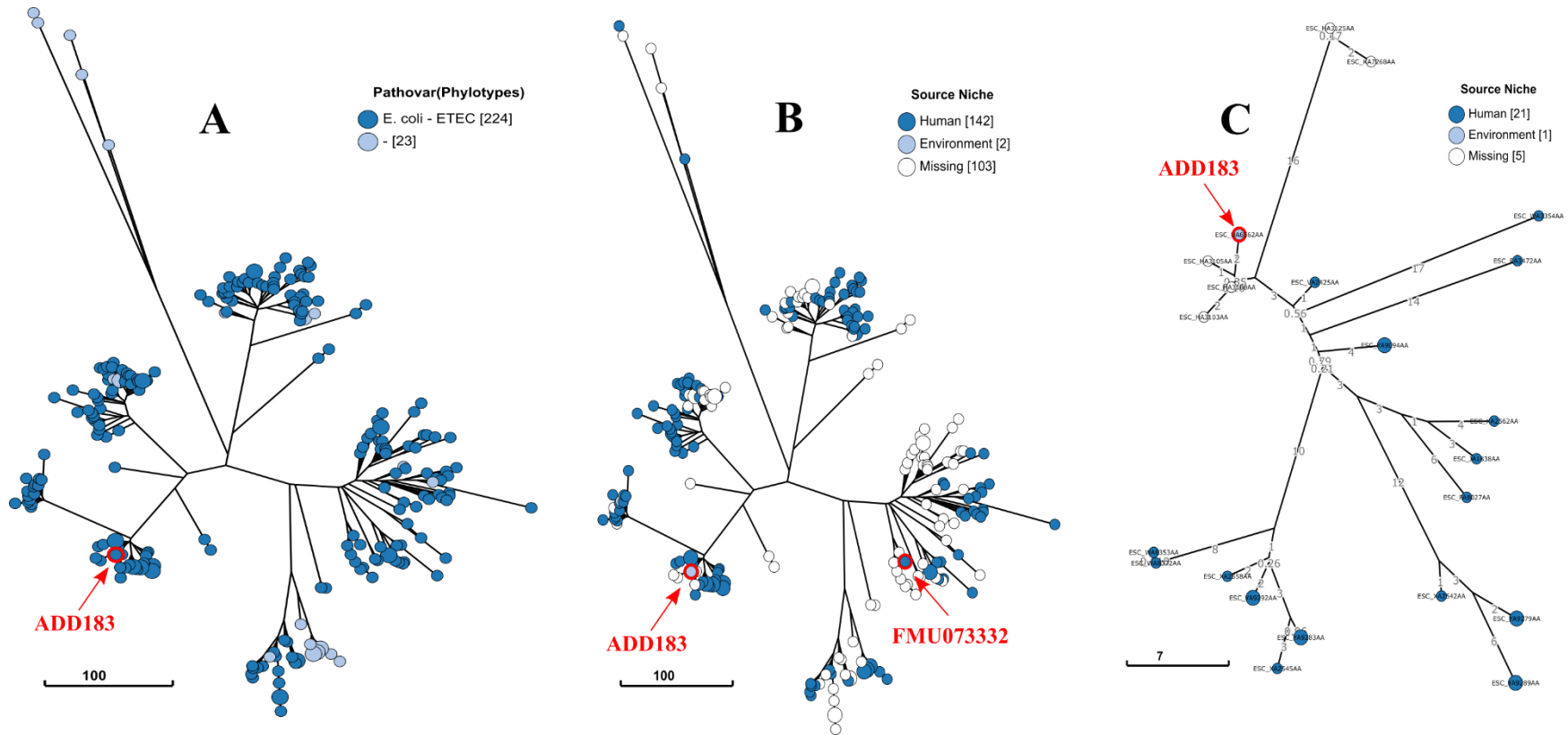


Figura 10. Árbol filogenético NJ del grupo clonal ST4 basado en las distancias alélicas del esquema cgMLST. A. Colección global del linaje ST4 (n = 247) distribuidos por grupo patogénico. **B.** Origen de aislamiento. **C.** Sub-clado que incluye a *E. coli* ADD183. Filogenia reconstruida por el algoritmo de RapidNJ y el esquema cgMLST V1 + Hierarchical Clustering (HierCC) V1. Los nodos están codificados por colores como se indica en la leyenda. La barra de escala indica las diferencias alélicas de cgMLST.

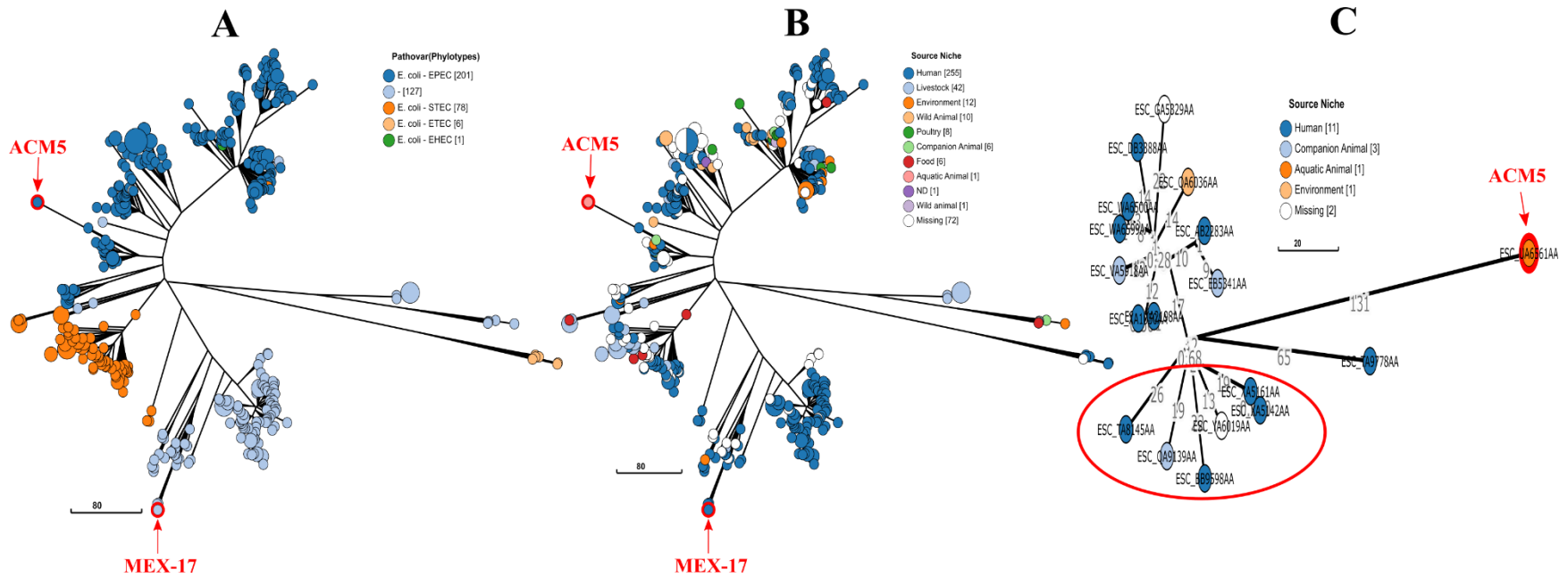


Figura 11. Árbol filogenético NJ del grupo clonal ST40 basado en las distancias alélicas del esquema cgMLST. A. Colección global del linaje ST40 (n = 427) distribuidos por grupos patogénicos. **B.** Origen de aislamiento. **C.** Sub-clado que incluye a *E. coli* ACM5. Filogenia reconstruida por el algoritmo de RapidNJ y el esquema cgMLST V1 + Hierarchical Clustering (HierCC) V1. Los nodos están codificados por colores como se indica en la leyenda. La barra de escala indica las diferencias alélicas de cgMLST.

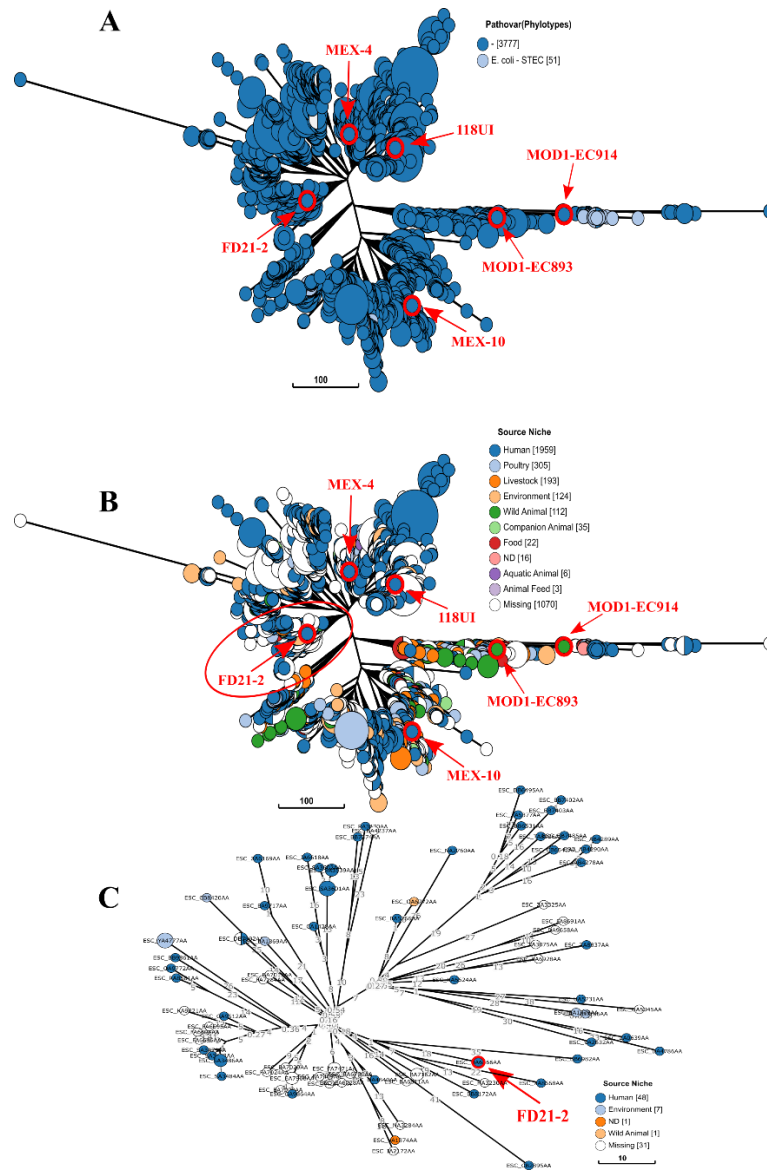


Figura 12. Árbol filogenético NJ del grupo clonal ST69 basado en las distancias alélicas del esquema cgMLST. A. Colección global del linaje ST69 (n = 3,903) distribuidos por grupos patogénicos. **B.** Origen de aislamiento. **C.** Sub-clado que incluye a *E. coli* FD21-2. Filogenia reconstruida por el algoritmo de RapidNJ y el esquema cgMLST V1 + Hierarchical Clustering (HierCC) V1. Los nodos están codificados por colores como se indica en la leyenda. La barra de escala indica las diferencias alélicas de cgMLST.

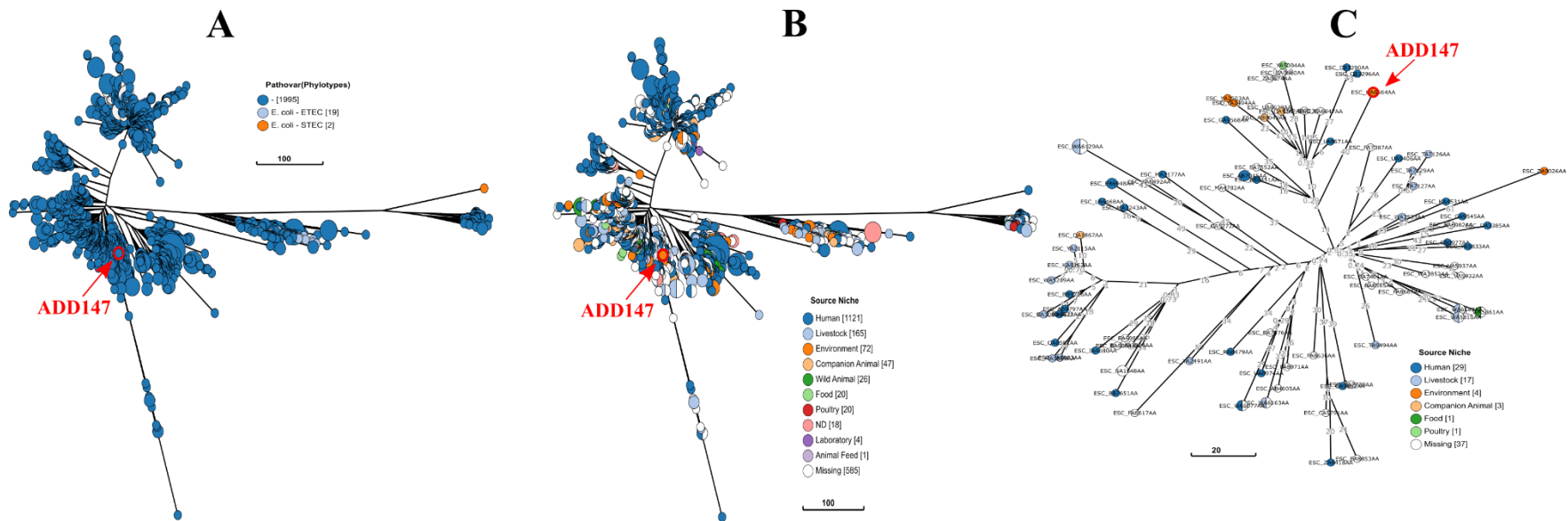


Figura 13. Árbol filogenético NJ del grupo clonal ST410 basado en las distancias alélicas del esquema cgMLST. A. Colección global del linaje ST410 (n = 2,093) distribuidos por grupos patogénicos. **B.** Origen de aislamiento. **C.** Sub-clado que incluye a *E. coli* ADD147. Filogenia reconstruida por el algoritmo de RapidNJ y el esquema cgMLST V1 + Hierarchical Clustering (HierCC) V1. Los nodos están codificados por colores como se indica en la leyenda. La barra de escala indica las diferencias alélicas de cgMLST.

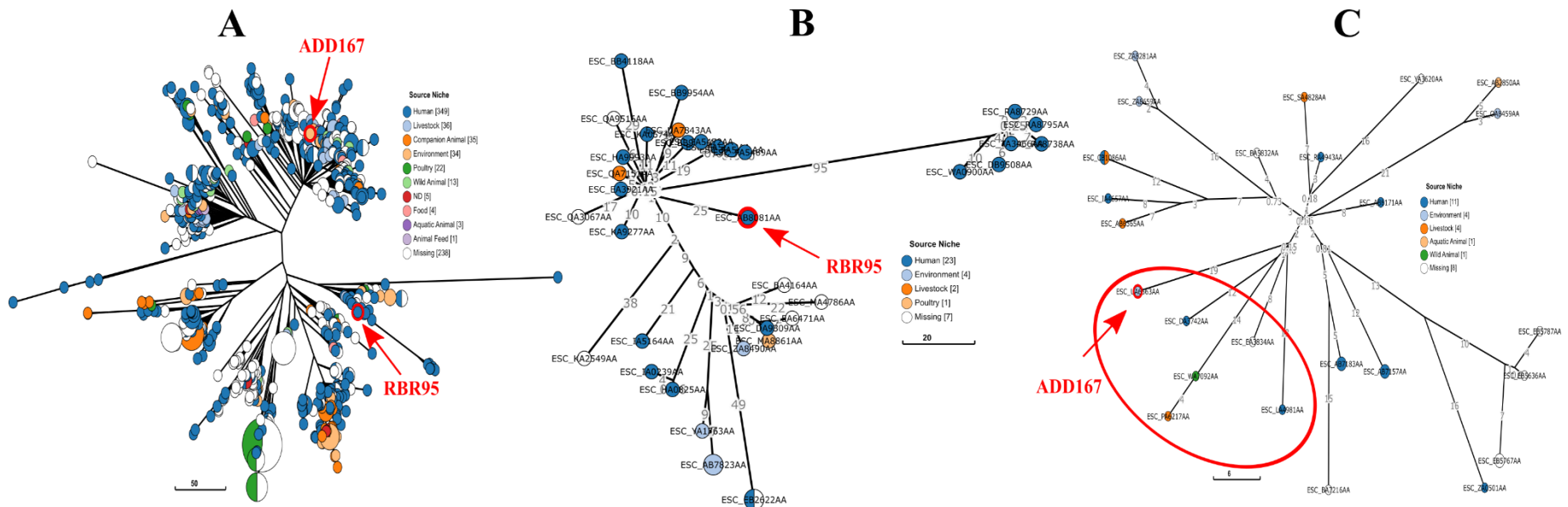


Figura 14. Árbol filogenético NJ del grupo clonal ST617 basado en las distancias alélicas del esquema cgMLST.
A. Colección global del linaje ST617 (n = 745) distribuidos por origen de aislamiento. **B.** Sub-clado que incluye a *E. coli* RBR95. **C.** Sub-clado que incluye a *E. coli* ADD167. Filogenia reconstruida por el algoritmo de RapidNJ y el esquema cgMLST V1 + Hierarchical Clustering (HierCC) V1. Los nodos están codificados por colores como se indica en la leyenda. La barra de escala indica las diferencias alélicas de cgMLST.

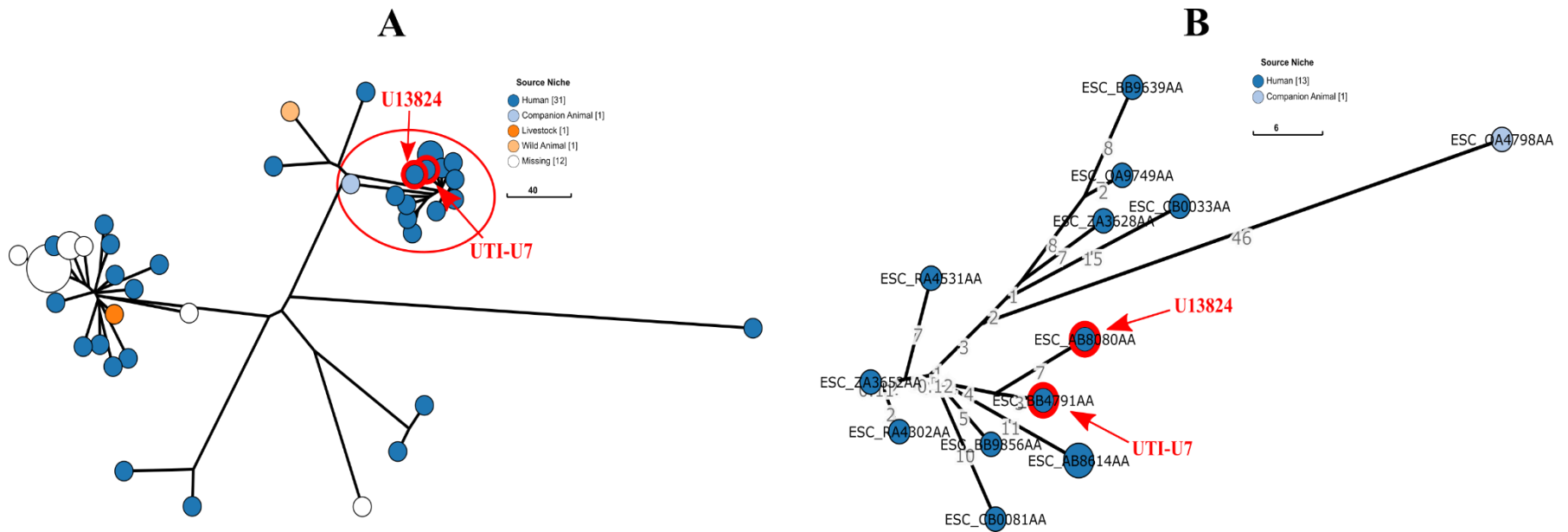


Figura 15. Árbol filogenético NJ del grupo clonal ST2279 basado en las distancias alélicas del esquema cgMLST. A. Colección global del linaje ST2279 (n = 48) distribuidos por origen de aislamiento. **B.** Sub-clado que incluye a *E. coli* U13824. Filogenia reconstruida por el algoritmo de RapidNJ y el esquema cgMLST V1 + Hierarchical Clustering (HierCC) V1. Los nodos están codificados por colores como se indica en la leyenda. La barra de escala indica las diferencias alélicas de cgMLST.

X. DISCUSIÓN

10.1. Caracterización fenotípica y susceptibilidad antimicrobiana

Los ensayos de susceptibilidad antimicrobiana indicaron prevalencias de resistencia del 40% al 67% a los fármacos ampicilina, carbenicilina, ciprofloxacino y cotrimoxazol entre las cepas de *E. coli* en estudio. Estos resultados son consistentes con lo reportado en estudios a nivel internacional (Nji et al., 2021; Pormohammad et al., 2019; Wang et al., 2023) y nacional (Garza-González et al., 2019) y revelan el elevado grado de resistencia que presenta *E. coli* proveniente de múltiples fuentes de aislamiento. La resistencia es contra fármacos de primera y segunda línea de tratamiento, principalmente, aquellos pertenecientes a las clases de antagonistas de la ruta biosintética de folatos (> 60%), β -lactámicos (> 50%), fluoroquinolonas (> 50%) y tetraciclinas (> 40%).

La OMS destaca la preocupante resistencia bacteriana a fármacos pertenecientes al subgrupo de cefalosporinas de 3.^a y 4.^a generación, característica conferida por la producción de BLEE (Paterson & Bonomo, 2005; WHO, 2014). Asimismo, este rasgo se vincula a un fenotipo MDR. Consecuentemente, el manejo de las infecciones ocasionadas por microorganismos MDR requiere del uso de fármacos considerados de último recurso como carbapenémicos, colistina y tigeciclina (Sheu et al., 2019). Al respecto, entre los aislados de origen clínico y ambiental se identificaron cepas con fenotipos MDR que exhibieron resistencia a cefotaxima, sugiriendo que producen BLEE. Aunque dicho rasgo no fue corroborado de manera fenotípica en este trabajo, resulta de interés evaluar el espectro de

resistencia frente a distintas cefalosporinas que pudiesen presentar dichas cepas de *E. coli*, así como el perfil inhibitorio de la BLEE que expresan.

Diversos estudios independientes realizados en Sinaloa demuestran una elevada prevalencia de aislados de *E. coli* resistentes a los antibióticos y de cepas MDR patogénicas procedentes de diferentes orígenes, incluyendo humanos de entornos hospitalarios y comunitarios (Canizalez-Roman et al., 2016; García Cervantes et al., 2021; Murillo Llanes et al., 2011; Uribe-Beltrán et al., 2017), de cuerpos acuáticos (Ahumada-Santos et al., 2022; Canizalez-Roman et al., 2019), de alimentos derivados de origen animal (Canizalez-Roman et al., 2013) y animales de granja (Amézquita-López et al., 2016). Lo anterior evidencia que cepas de alto riesgo para la salud pública humana y veterinaria están circulando dentro de la interfaz humano-animal-medio ambiente en Sinaloa. Por lo tanto, la realización de estudios de vigilancia epidemiológica molecular y genómica para una caracterización integral apropiada de las cepas resulta fundamental.

El presente trabajo no encontró asociación estadística significativa del origen de aislamiento contra la resistencia a los fármacos evaluados, la clase de antimicrobiano o la presencia de cepas MDR. En contraste, Salinas et al. (2019) reportaron una prevalencia de fenotipos de resistencia superior entre aislados obtenidos de infantes (n = 63) comparado a los provenientes de animales (n = 174), así como una asociación estadísticamente significativa en la resistencia a amoxicilina-clavulanato, ampicilina, estreptomina, sulfisoxazol y cotrimoxazol. Del mismo modo, aislados derivados de urocultivos humanos (n = 107) provenientes de dos distintas regiones geográficas de México exhibieron resistencia estadísticamente significativa contra

ampicilina, cefotaxima, ceftazidima, ácido nalidíxico, tetraciclina y nitrofurantoina (Miranda-Estrada et al., 2017). Por lo que, la falta de asociación observada en el presente trabajo puede ser atribuida a la heterogeneidad fenotípica *per se* de las cepas caracterizadas, así como al limitado número de aislados que conformaron los grupos de aislamiento.

10.2. Secuenciación, ensamble y anotación del genoma

La profundidad de secuenciación – entendida como el número de veces promedio que una base nucleotídica es representada en un conjunto de secuencias crudas (Sims et al., 2014) – fue calculada *a priori* a 30X para cada genoma obteniéndose en la mayoría de los genomas profundidades superiores a dicho valor. La profundidad promedio del conjunto de genomas analizados fue de 45X, cumpliendo con lo recomendado para la obtención de la representación del genoma completo bacteriano a partir de la implementación de secuenciación con lecturas cortas (35X – 50X) (Desai et al., 2013). Si bien los genomas de las cepas de origen clínico RBR72 y RBR95 fueron la excepción al cálculo teórico de la profundidad, Desai et al. (2013) reportaron que una profundidad cercana a 20X es suficiente al ensamblar un conjunto de lecturas derivadas de un genoma de *E. coli* para obtener una representación del genoma superior al 97%. Por lo tanto, ambos genomas fueron conservados para la realización de los análisis subsecuentes.

Por otro lado, durante la preparación de las bibliotecas genómicas es proclive la introducción de sesgos en las regiones del genoma con bajo contenido de GC, principalmente, en aquellos protocolos donde se emplea PCR para la amplificación de las bibliotecas y transposasas para la fragmentación del ADNg, ocasionando que

el material genético se fragmente de forma no aleatoria y que su posterior reconstrucción se dificulte (Lan et al., 2015; M. P. Sato et al., 2019; Seth-Smith et al., 2019). Además, es importante mencionar que uno de los aspectos limitantes de la secuenciación con lecturas cortas (75 – 300 pb) es la generación de genomas fragmentados dado que la longitud de las lecturas no logra resolver las regiones con elementos repetitivos complejos, es decir, MGEs (elementos de inserción, transposones), genes ribosómicos, clústeres génicos de rutas biosintéticas de metabolitos secundarios, regiones CRISPR; lo que genera bucles sin resolver durante el ensamble, quiebres en las secuencias, y por tanto, su fragmentación en múltiples *contigs/scaffolds* (Kingsford et al., 2010).

Recientemente, Bogaerts et al. (2021) validaron la profundidad de secuenciación y la longitud de lecturas PE en función del rendimiento e impacto sobre los análisis bioinformáticos, incluyendo el ensamble del genoma, detección génica, mutaciones puntuales en genes diana de resistencia antimicrobiana y predicción del serotipo. Particularmente, los autores reportan para *E. coli* que la contigüidad en el ensamble mejora significativamente con lecturas de mayor tamaño (201 pb – 251 pb) y a una profundidad superior a 20X. Asimismo, el estudio mostró que una profundidad $\geq 15X$ y una longitud de lecturas de 150 pb es suficiente para obtener resultados confiables en función de la anotación génica.

En este trabajo, el ensamble *de novo* de lecturas PE (2×150 pb) generó reconstrucciones con valores esperados para *E. coli* respecto a la longitud del genoma ($\bar{x} = 4.99$ Mpb), contenido de GC ($\bar{x} = 50.73\%$) y CDS ($\bar{x} = 5,113$). Sin embargo, los *drafts* de genomas resultaron moderadamente fragmentados para cada

ensamble ($\bar{x} = 469$ scaffolds). Dado que las profundidades de secuenciación se cumplieron, el grado de fragmentación observado en el ensamble inicial con SPAdes a nivel de *contigs/scaffolds* puede ser explicado por los sesgos inherentes introducidos durante la preparación de las bibliotecas genómicas, la estrategia de secuenciación implementada, así como por el contenido de elementos repetitivos en los genomas analizados.

Por tanto, la contigüidad de las secuencias y su análisis fue mejorado al realizar un *scaffolding* asistido por el genoma completo de referencia filogenéticamente más cercano. Sin embargo, para superar las limitaciones y sesgos técnicos impuestos por la secuenciación con lecturas cortas, la implementación en conjunto de estrategias de secuenciación con lecturas largas representa una opción atractiva para la obtención de genomas completos (Forde et al., 2019; Goldstein et al., 2019).

En relación con la longitud y número de CDS codificados en los genomas, se encontró variabilidad estadísticamente significativa respecto al origen de aislamiento, particularmente, entre cepas de origen clínico y ambiental. El resultado coincide con lo descrito por Touchon et al. (2020), donde cepas asociadas a ambientes secundarios poseen genomas de menor tamaño, mientras que las asociadas a hospederos sucede un efecto inverso. Asimismo, los autores indican que la variabilidad en el tamaño total (~ 8%) y contenido génico (~ 34%) del genoma de *E. coli* está sujeta al grado de adquisición de MGEs, característica que depende del origen de aislamiento y trasfondo genético (filogrupos). Por tanto, la variabilidad genómica depende principalmente de la densidad de los MGEs presentes en los

ambientes donde *E. coli* habita y de las tasas de selección e intercambio posterior a su adquisición (Touchon et al., 2020).

La anotación funcional de los genomas asignó un número considerable de CDS en categorías asociadas al metabolismo bacteriano primario. Las más representadas son funciones constitutivas relacionadas con la producción de energía y el transporte de moléculas. Sin embargo, en ninguno de estos subsistemas se observaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al origen de aislamiento, con excepción del implicado en la adquisición y metabolismo de hierro entre las cepas de origen clínico y ambiental. Por tanto, los efectos de variabilidad observados entre los orígenes de aislamiento pueden ser atribuido a la adquisición de rasgos adaptativos específicos mediada por MGEs con funciones asociadas a la supervivencia dentro del hospedero (humano y peces). Sin embargo, esto requiere de una exploración incluyendo un número mayor de cepas regionales provenientes de distintas fuentes de aislamiento.

10.3. Tipificación molecular *in silico*

Distintos rasgos de relevancia epidemiológica fueron extraídos a partir de las secuencias de los genomas de las cepas de *E. coli* de origen ambiental, animal y clínico, particularmente, el serotipo, grupo clonal (ST) y filogrupo. En relación con el serotipo, la predicción mostró la diversidad existente entre el conjunto de cepas analizadas reconociéndose 13 únicos serotipos, y aunque ninguno de ellos resultó representativo entre los diferentes orígenes de aislamiento, destaca la presencia de los serogrupos O6 y O25; ambos relacionados con cepas del patotipo ETEC y

ExPEC. Asimismo, resalta la frecuencia de serogrupos no tipificables (ONT) entre las cepas de origen ambiental y animal.

La presencia de cepas ONT ya ha sido reportada con anterioridad en diversos estudios. La frecuencia de cepas ONT es baja (< 9%) cuando el conjunto de aislados estudiados son derivados de fuentes humanas (Lang et al., 2019; Mazumder et al., 2021; Paramita et al., 2020; Sonda et al., 2018); mientras que esta frecuencia es mayor (> 23%) entre aislados derivados de fuentes ambientales y/o animales (Cookson et al., 2022; McDougall et al., 2021), como se observó en este estudio. Lo anterior sugiere que la pérdida del clúster génico del antígeno O puede derivarse de un evento adaptativo. Sin embargo, dada la relevancia del antígeno O en la interacción hospedero-patógeno y la virulencia bacteriana (Liu et al., 2020; Sarkar et al., 2014), el grado de ventaja o desventaja impuesto por este evento en el nuevo nicho ecológico es desconocido y resulta de interés su exploración.

Respecto a los grupos clonales (ST) y filogrupos determinados, destacó la identificación de cepas de relevancia clínica pertenecientes a distintos linajes considerados como de alto riesgo en el ámbito internacional (ADD183-ST4/A; ACM5-ST40/B1; FD21-2-ST69/D; ADD147-ST410/C y ADD167-ST617/A; RBR95-ST617/A). La denominación “alto riesgo” describe poblaciones bacterianas altamente especializadas con habilidad mejorada para colonizar, diseminar y persistir en nichos particulares, posterior a la adquisición de rasgos adaptativos que incrementan su potencial patogénico y epidemidad, incluyendo la resistencia antimicrobiana (Baquero & Coque, 2011). Un ejemplo destacado es el linaje ExPEC ST131/B2, grupo clonal diseminado a nivel mundial con rasgos mejorados de supervivencia,

patogenicidad y multirresistencia antimicrobiana (Stoesser et al., 2016). Sin embargo, a pesar de su dominancia, no fue identificado entre el conjunto de cepas estudiadas.

Diversos estudios muestran la presencia y la amplia distribución de grupos clonales de alto riesgo en muestras relacionadas al medio ambiente, animales y humanos. Particularmente, el grupo clonal ST4, perteneciente al filogrupo A, se ha vinculado a casos de enfermedad diarreica en humanos ocasionados por cepas ETEC alrededor del mundo, incluyendo países de América Latina (Rasko et al., 2019; Rodas et al., 2011; Saldaña-Ahuactzi et al., 2017), Asia (Kwon et al., 2017; Y. Li et al., 2017; F. Yu et al., 2018) y Europa (Kartsev et al., 2015). ST4 está constituido por cepas genéticamente heterogéneas respecto a factores de virulencia, resistencia antimicrobiana y serotipos, predominando el serotipo O6:H16.

Del mismo modo, el linaje ST40 del filogrupo B1 incluye cepas con amplia distribución geográfica y que están directamente asociadas a síndromes diarreicos en humanos y en menor medida en animales. En contraste al grupo clonal ST4, las cepas del linaje ST40 pertenecen al extenso grupo InPEC, prevaleciendo principalmente los patotipos aEPEC (de Frutos et al., 2020; Saidenberg et al., 2020; Watson et al., 2021; Xu et al., 2017) y EAEC (Dallman et al., 2012; Ellis et al., 2020; Llorente et al., 2023). Por tanto, ST40 destaca por su heterogeneidad patogénica con potencial zoonótico y por su relevancia en la salud pública humana y veterinaria.

Posterior al linaje ST131 del filogrupo B2, el grupo clonal ST69 perteneciente al filogrupo D se caracteriza como uno de los linajes ExPEC MDR más predominantes a nivel mundial. ST69 está vinculado principalmente a infecciones humanas del torrente sanguíneo e ITU (Manges et al., 2019). Sin embargo, también ha sido

reportado en muestras proveniente de distintos animales y ambientes (A. Silva et al., 2023), lo que resalta el extenso potencial de transmisión entre especies y nichos ecológicos que presentan las cepas pertenecientes a este linaje.

Los grupos clonales ST410 y ST617, pertenecientes a los filogrupos C y A, respectivamente, representan linajes MDR con notable transmisión intersectorial entre productos alimenticios, medio ambiente, animales y humanos a nivel mundial. Particularmente, las cepas integrantes del linaje ST410 se han asociado a la posesión de múltiples ARGs, resaltando las variantes de BLEE CTX-M-15, CMY-2 y NDM-5 (Falgenhauer et al., 2016; Roer et al., 2018; Schaufler et al., 2016). Asimismo, para el linaje ST617 se ha reportado la predominancia de las variantes CTX-M-15, OXA-1 y en menor medida CMY-2 (Monte et al., 2019; Rocha-Gracia et al., 2015; Zong et al., 2018).

Es importante mencionar que actualmente el grupo clonal ST2279/B2, aquí identificado con un único aislado, no es reconocido como un linaje de alto riesgo de carácter internacional. Sin embargo, este linaje representa un potencial grupo patogénico de carácter ExPEC subrepresentado considerando su asociación al CC ST131, aislamiento de muestras humanas y rasgos fenotípicos MDR (de Souza da-Silva et al., 2020; Umene et al., 2015), principalmente asociados con la producción de BLEE, carbapenemasas (Peirano et al., 2022; Sarwar et al., 2022) e inclusive la presencia del determinante *mcr-1*, variante génica involucrada en la resistencia de colistina (Jamil et al., 2022).

10.4. Determinantes genéticos asociados a virulencia y resistencia antimicrobiana

10.4.1. Genes asociados a la virulencia (VAGs)

Independientemente del origen de aislamiento, la predicción y distribución de los VAGs permitió identificar de cepas InPEC y ExPEC entre la colección de genomas estudiados, así como determinantes accesorios de virulencia previamente reportados (Pakbin et al., 2021; Sarowska et al., 2019). La presencia de cepas hetero-patogénicas o híbridas no fue develada (Santos et al., 2020). Como era de esperarse, las cepas de origen clínico presentan perfiles genotípicos de VAGs más enriquecidos y relacionados con distintos procesos patogénicos, principalmente, adherencia, protectinas y captación de hierro. El hierro es un elemento esencial para la supervivencia y virulencia bacteriana dado que diversos procesos patogénicos están regulados por este elemento, incluyendo la producción de toxinas y formación de biopelículas, y su obtención se encuentra facilitada mediante la acción de sideróforos (Khasheii et al., 2021).

La anotación funcional de RAST mostró el enriquecimiento de los sistemas para la captación y metabolismo de hierro, concordando con la asociación de VAGs identificada entre los genomas de origen clínico. Por ejemplo, la cepa ExPEC/UPEC U13824 co-alberga tres distintos mecanismos: producción de distintos sideróforos, captación del grupo hemo y transporte de iones metálicos (Mn^{2+}/Fe^{2+}). La producción de múltiples sideróforos se ha asociado a cepas UPEC y el grado de patogenicidad es dependiente del tipo de sideróforo, siendo yersiniabactina y salmoquelina los más prevalentes; éste último, factor importante en el desarrollo de ITU recurrentes

(Henderson et al., 2009). Sin embargo, los genes codificantes de salmoquelina (*iroB-CDEN*) están ausentes del genoma de las cepas derivadas de orina humana RUTI01 y U13824. Ahora bien, los principales genes involucrados en la biosíntesis de yersiniabactina (*fyuA*, *irp2*) fueron identificados en cepas derivadas de heces (FD20-2, tipo EAEC FD21-2 y RBR95). No obstante, Henderson et al. (2009) reportan que su expresión es diferencial en cepas de origen intestinal. Lo anterior resalta el papel fundamental de este sideróforo durante la colonización de tejidos (e.g. uroepitelio) en condiciones de baja disponibilidad de hierro.

La enterotoxina EAST1, codificada por el gen *astA* y descrita por primera vez en cepas EAEC, se distribuye en cepas patogénicas y no patogénicas de *E. coli* asociadas a humano (L. E. Silva et al., 2014; Yamamoto & Echeverria, 1996) y animales de granja, principalmente en cerdo (Osek, 2003; Zajacova et al., 2012). En el presente trabajo, *astA* fue identificado en cepas patogénicas (aEPEC ACM5, ETEC ADD183) y no patogénicas (RUTI01, ADD167, ACM22) provenientes de los tres orígenes de aislamiento; sin embargo, ninguna de ellas se derivó directamente de heces humana o animal. Aunque la expresión de EAST1 se ha vinculado con enfermedades diarreicas en humanos y animales, su implicación patogénica en el desencadenamiento de cuadros diarreicos es controversial. Lo anterior puede deberse a la falta de expresión en los modelos *in vitro* e *in vivo* utilizados para la evaluación de su toxicidad, así como el número de copias de *astA* presentes en el genoma bacteriano (Dubreuil, 2019; Ruan et al., 2012).

La categoría de protectinas se conforma por un conjunto de factores de virulencia tales como los polisacáridos capsulares, el LPS y componentes de

membrana externa implicados en la supervivencia/resistencia al complemento sérico, y por tanto el desarrollo de bacteriemia/septicemia en el hospedero (Miajlovic & Smith, 2014). Los genes *iss* y *traT* son determinantes asociados al bacteriófago λ y plásmidos tipo ColV/BM y F, respectivamente, y codifican OMPs involucradas en la inhibición de la formación del complejo de ataque a la membrana (MAC – por sus siglas en inglés); sin embargo, el mecanismo subyacente a esta característica no ha sido dilucidado hasta el momento (T. J. Johnson et al., 2008; Montenegro et al., 1985). Mientras que el gen *ompT* tiene como producto a la proteasa de membrana externa OmpT implicada en la degradación de péptidos antimicrobianos (Thomassin et al., 2012).

La asociación directa de los determinantes *iss*, *ompT* y *traT* a cepas ExPEC ya ha sido demostrada, principalmente con cepas provenientes de humanos y animales de granja, incluyendo ganado y aves de corral. Guerra et al (2020) reportaron prevalencia moderada de *ompT* (35.1%) y *traT* (81.6%) entre cepas derivadas de mastitis bovina. Asimismo, Ranjan et al. (2017) registraron la prevalencia de estas protectinas en cepas asociadas a pielonefritis (17%), septicemia (15%) e infecciones de piel y tejidos blandos (29%) en humanos. De manera similar, la presencia de los determinantes *iss* (53%), *ompT* (40%) y *traT* (46%) en los genomas analizados en el presente trabajo resultó moderada, independientemente de la fuente de aislamiento y grupo patogénico. Lo anterior, pone en evidencia la posible implicación de los mecanismos de THG en la adquisición de estos determinantes, así como la historia evolutiva a la que cada cepa aquí estudiada ha sido sujeta.

10.4.2. Genes asociados a la resistencia antimicrobiana (ARGs)

El análisis del genoma permitió identificar y mostrar la distribución de perfiles genotípicos de los ARGs similares entre cepas de origen ambiental y clínico, particularmente, entre aquellas pertenecientes a los grupos clonales de alto riesgo internacional ST69 (FD21-2), ST410 (ADD147) y ST617 (RBR95 y ADD167). Aunque las cepas RBR95 y ADD167 pertenecen al mismo linaje, el perfil genotípico de los ARGs difirió ligeramente entre ellas. Por el contrario, los perfiles de ARGs para las cepas RBR95 y ExPEC/UPEC U13824 (ST2279/B2) presentan mayor similitud a pesar de no presentar ninguna relación epidemiológica. Lo anterior, probablemente explicado por su asociación con el humano y la inherente presión selectiva dado el historial farmacológico de los pacientes de donde derivaron estos aislados, la microbiota asociada a la fuente de aislamientos, así como a la dinámica y densidad de MGEs que circundan las fuentes de aislamiento propiciando dicha variabilidad (Touchon et al., 2020).

Las cepas RBR95 y U13824 co-albergan diversos mecanismos de resistencia y ARGs de gran interés, esto es, diversas mutaciones puntuales en la región QRDR, la variante *aac(6)-Ib-cr* codificante de la EMA con acción sobre fluoroquinolonas y múltiples β -lactamasas con diversos espectros de acción, incluyendo TEM-1, OXA-1 y CTX-M-15. Este patrón de coproducción de ARGs ya ha sido reconocido con anterioridad en diversas regiones geográficas, principalmente en cepas ExPEC/filogrupo B2 provenientes de Portugal (Machado et al., 2006; Mendonça et al., 2006), Reino Unido (Livermore et al., 2019), México (Cortés-Cortés et al., 2017), ExPEC/filogrupo A de China (Sun et al., 2018), Nigeria (Iroha et al., 2012) e inclusive

en cepas de *K. pneumoniae* pertenecientes al linaje ST405 originarias de España (Luque-González et al., 2019), y su movilización se ha vinculado a la familia de plásmidos conjugativos del grupo IncF.

La relevancia del grupo clonal ST617 respecto a su rasgo MDR ya ha sido ampliamente descrita (Monte et al., 2019; Rocha-Gracia et al., 2015; Zong et al., 2018). En contraste, la información para el linaje ST2279 es muy limitada y su presencia ha sido escasamente estudiada. Recientemente, Jamil et al. (2022) reportaron la presencia de determinantes que codifican diversas BLEE y *mcr-1* entre aislados pertenecientes a ST2279. Aunque en el presente trabajo no se identificaron genes asociados a la resistencia frente a fármacos considerados de último recurso, destaca el alarmante escenario en un futuro próximo respecto al desafío en la utilización de β -lactámicos en la región sinaloense. Lo anterior, por la posible co-diseminación de múltiples β -lactatamasas y la circulación de cepas de alto riesgo entre la comunidad. Por lo que se requiere la realización de investigaciones moleculares adicionales que brinden claridad en relación con las variantes alélicas de BLEE que portan los aislados de *E. coli* en la región sinaloense.

Los integrones de clase 1 son plataformas genéticas que capturan y expresan ARGs. Estos integrones utilizan plásmidos o transposones conjugativos como vehículos para su movilización contribuyendo en gran medida en el surgimiento de cepas MDR patógenas (Gillings et al., 2008). En esta investigación se identificaron integrones de clase 1 en el genoma de aislados clínicos derivados de heces (tipo EAEC FD21-2 y ETEC RBR72) y ambientales (ADD147, ADD167 y ADD169) portando distintas configuraciones de casetes génicos. Al respecto, destaca el

alojamiento del integrón de clase 1-*sul3* en el genoma de la cepa ADD147, en el que la región 3'CS que contiene a *sul1* es sustituida por la variante génica *sul3* (Moran et al., 2016).

El integrón clase 1-*sul3* es un elemento poco común e inicialmente descrito en *Salmonella* no tifoidea (Antunes et al., 2007); éste se caracteriza por presentar distintas estructuras génicas y su expansión a *E. coli* se ha atribuido principalmente a plásmidos de los grupos IncHI2 e IncI1 (Curiao et al., 2011; Zingali, Chapman, et al., 2020). El re-arreglo *dfrA12-orfF-aadA2-cmlA1-aadA1-qacH-tnp440-sul3* observado en la cepa ADD147 representa la estructura más prevalente a nivel mundial y ha sido identificado tanto en aislados clínicos humanos como de origen porcino (Le-Vo et al., 2019; Zingali, Chapman, et al., 2020; Zingali, Reid, et al., 2020). Estos resultados corroboran el rol clave de los integrones en la captura simultánea de ARGs y de los plásmidos como vehículos de diseminación de regiones complejas de multirresistencia y, por ende, su contribución a la diversidad genotípica de ARGs entre cepas de diferentes orígenes de aislamiento.

Con relación a la resistencia y susceptibilidad reducida observada en las cepas de origen ambiental (ADD105) y animal (aEPEC ACM5 y ACM22) frente ampicilina, respectivamente, éstas cepas presentan el sistema de eflujo a múltiples drogas MdfA. Sin embargo, a pesar de que la expresión y actividad de dicho transportador confiere altos niveles de resistencia a compuestos y fármacos químicamente no relacionados, este no confiere resistencia a β -lactámicos, posiblemente por la falta de acoplamiento a un canal de membrana externa que permita la extrusión del fármaco desde el espacio periplasmático (Edgar & Bibi, 1997; Nishino et al., 2003). Por ello, la

combinación de otros mecanismos moleculares no considerados en el presente estudio podrían estar contribuyendo a la resistencia observada, tales como mutaciones en la región promotora de la β -lactamasa cromosómica AmpC, cambios en la permeabilidad de la membrana celular, la sobreexpresión de distintos sistemas de eflujo o la presencia de nuevos genes no descritos asociados en la resistencia (M. Li et al., 2019).

Diversos mecanismos de resistencia a fosfomicina se han descrito dentro de la familia *Enterobacteriaceae*, destacando la inactivación enzimática mediada por plásmidos que se asocia a la acción de la glutatión S-transferasa codificada por las variantes génicas *fosA* (Silver, 2017). Múltiples variantes alélicas de *fosA* se han descrito en aislados de *E. coli* de diversos países como Canadá (Milner et al., 2020), China (Pan et al., 2021), España (Loras et al., 2021), Estados Unidos (Balbin et al., 2020), México (Galindo-Méndez et al., 2022), Portugal (Grilo et al., 2023). La variante predominante es *fosA3* y usualmente se co-alberga junto a otros ARGs, incluyendo BLEE tipo CTX-M, carbapenemasas (KPC, NDM, VIM) y MCR-1.

En el presente trabajo, se identificó una secuencia homóloga a *fosA7* como ARG adicional en el genoma de la cepa ambiental ADD105. Sin embargo, se desconoce su fenotipo de resistencia a fosfomicina y no posee secuencias plasmídicas. Comparando con la secuencia nucleotídica de la variante original *fosA7* identificada en una cepa de *Salmonella enterica* serovar Heidelberg derivada de pollos en Canadá (Rehman et al., 2017), el ARG homólogo mostró 93.85% de similitud. Recientemente, Milner et al. (2020) identificaron y caracterizaron una nueva

variante homóloga de *fosA7* en *E. coli*, denominándola *fosA7.5*, variante similar a la que alberga el genoma de *E. coli* ADD105.

Si bien la variante *fosA7.5* ya ha sido reconocida en aislados clínicos de Canadá (Milner et al., 2020) y de animales de China (L.-J. Zhang et al., 2023; X. Zhang et al., 2022), en nuestro conocimiento, este sería la primera descripción de la variante génica *fosA7.5* en una cepa de origen ambiental de *E. coli* aislada de agua superficial de un drenaje agrícola en México. Por lo tanto, la realización de estudios moleculares que permitan conocer la diversidad y la prevalencia de los determinantes *fosA* en cepas aisladas de los sistemas riego y drenaje agrícola en el estado es importante, considerando la relevancia clínica de la fosfomicina como primera opción en el tratamiento exclusivo de ITU no complicadas en humanos ocasionada por patógenos MDR, incluyendo *E. coli* productores de BLEE.

10.5. Contenido plasmídico y profágico

Múltiples replicones plasmídicos pertenecientes a distintos grupos de incompatibilidad fueron identificados. Sin embargo, la obtención de secuencias plasmídicas completas fue imposible dado el grado de fragmentación en los ensamblajes generados asociado a las limitantes de las estrategias de WGS empleando lecturas cortas para la resolución estructural de MGEs (Arredondo-Alonso et al., 2017). En ciertos casos, se logró determinar la asociación de ARGs, VAGs o ambos a *scaffolds* con replicones plasmídicos, así como la identificación de plásmidos de tamaño pequeño tipo Col de manera correcta. La reconstrucción de MGEs a partir de estrategias de secuenciación de lectura corta es compleja. Por lo que la implementación en conjunto de estrategias de secuenciación con lecturas

largas representa una opción atractiva para la recuperación de plásmidos completos y conocer la sintenia de los genes asociados a estos (Goldstein et al., 2019).

La relevancia de los grupos plasmídicos IncHI1, IncI1, IncQ, IncX en el transporte y diseminación de ARGs ya ha sido reconocida a nivel mundial (Rozwandowicz et al., 2018). Algunos de estos replicones plasmídicos fueron reconocidos entre el conjunto de genomas estudiados, sin embargo, no fue posible determinar si portan ARGs o VAGs asociados. Los plásmidos IncF representan uno de los grupos plasmídicos conjugativos más prevalentes entre los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* provenientes de distintas fuentes de aislamiento y su relevancia reside en el alto contenido de genes de virulencia y resistencia que albergan (Villa et al., 2010).

Al respecto, diversos replicones tipo IncF fueron reconocidos entre los genomas analizados y presentaron gran diversidad de ARGs o VAGs. La mayor prevalencia de determinantes de resistencia se registró entre cepas de origen clínico, particularmente, β -lactamasas TEM-1 y OXA-1 y de resistencia a aminoglucósidos y tetraciclinas. Por el contrario, la prevalencia de VAGs en las cepas asociadas al drenaje agrícola o acuicultura resultó mayor, destacando los codificantes de enterotoxinas LT, EAST1 y de resistencia al complemento sérico TraT. Si bien lo anterior brinda evidencia respecto a los ARGs y VAGs albergados en plásmidos IncF y la posible dominancia entre poblaciones de *E. coli* regionales no relacionadas entre sí, el grado de diseminación y el repertorio génico presente en ellos permanece desconocido y requiere ser explorado.

Los plásmidos del grupo IncY son frecuentemente reconocidos en la familia *Enterobacteriaceae* y se han asociado al cargo del determinante *bla_{CTX-M-15}*. La uso conjunto de PlasmidFinder y PHASTER permitió el reconocimiento de plásmidos tipo bacteriófago con replicón IncY en los genomas de las cepas clínicas FD20-2, FD21-2 y RUTI01. Sin embargo, estos no presentan ningún determinante de virulencia o resistencia asociado y no se resolvieron como un elemento extracromosómico, imposibilitando la determinación de su tamaño aproximado y estructura génica. Resulta de interés mencionar que el gen *mcr-1*, determinante que confiere resistencia al fármaco considerado de último recurso a polimixina, se ha asociado a plásmidos IncY (C. Zhang et al., 2017). Lo que evidencia un nuevo mecanismo de diseminación adicional a los ya reconocidos por plásmidos IncI2, IncX4 e IncHI2, representando una amenaza de salud pública mundial (Matamoros et al., 2017).

Respecto a las regiones asociadas a profagos, PHASTER permitió asociar la presencia de algunos ARGs y VAGs codificados dentro de regiones correspondientes a profagos, independientemente del origen de aislamiento de las cepas. Es importante señalar que algunas de estas regiones profágicas se co-albergaron en *scaffolds* donde replicones plasmídicos del grupo IncF se encuentran asociados. Hecho que sugiere eventos de recombinación del ADN viral/plasmídico y el surgimiento de plásmidos mosaicos entre los genomas analizados (Pesesky et al., 2019). En ese sentido, otros MGEs no analizados, tales como ISs y transposones, pueden haber influido en la evolución de los plásmidos IncF presentes en los genomas de este estudio. Por tanto, para corroborar la hipótesis anterior, la

secuenciación con lecturas largas es requerida para descartar un posible artefacto originado durante el ensamble.

Las regiones profágicas identificadas entre las cepas MDR clínicas (FD21-2, RBR72 y U13824) y ambiental (ADD167) albergaron determinantes de resistencia a las clases de aminoglucósidos (*aac(3)-IIa*, *aadA5*, *aadA24*), β -lactámicos (*bla_{CTX-M-15}*), sulfonamidas (*sul1*), tetraciclinas (*tet(B)*) y trimetoprima (*dfrA15*, *dfrA17*). Estas regiones fueron descritas como incompletas, sin embargo, estudios previos reportan la implicación de los bacteriófagos en la movilización de diversas variantes alélicas de los determinantes aquí identificados; esto principalmente observado en ambientes impactados por actividades antropogénicas (Calero-Cáceres et al., 2019; Gabashvili et al., 2020). Lo que evidencia el impacto de las actividades humanas en el desarrollo de la RAM, así como el papel clave de los bacteriófagos en la adquisición, mantenimiento y diseminación de ARGs contribuyendo a la evolución bacteriana en aislados clínicamente relevantes.

10.6. Análisis filogenético

Considerando la heterogeneidad genética identificada entre las cepas de *E. coli*, el análisis filogenético basado en MLST, fue insuficiente para establecer relaciones directas de transmisión entre las diferentes fuentes de aislamiento. En ese sentido, dos cepas pertenecientes al grupo clonal ST617 fueron identificadas, sin embargo, éstas difieren considerablemente respecto al contenido génico de ARGs, VAGs, origen, tiempo y ubicación geográfica de aislamiento. Consecuentemente, es poco probable que estas cepas tengan una relación más allá de pertenecer al mismo

linaje. La única asociación reconocible resultó a nivel poblacional, en el que el análisis agrupó a las cepas conforme al filogrupo al que pertenecen.

Aunque la siguiente suposición presenta limitaciones dado el número de cepas analizadas, el agrupamiento observado a nivel de filogrupo permitió determinar que los grupos filogenético A y B1 son más generalistas, esto es, albergan cepas patógenas y no patógenas provenientes de distintas fuentes de aislamiento. Asimismo, es importante hacer notar que cepas MDR y productoras de BLEE pertenecen al filogrupo A. Por el contrario, los grupos B2 y D se encontraron constituidos por grupos patógenos de *E. coli* asociados al humano. Hecho que coincide con lo ya extensamente reportado y añade más evidencia al respecto (Chakraborty et al., 2015; Sajeev et al., 2023; Valat et al., 2012).

Por otro lado, los análisis basados en cgMLST demuestran la ubiquidad de los linajes de alto riesgo internacional identificados (ST4, ST40, ST69, ST410, ST617 y ST2279) y el grado diversidad genética entre los miembros que los conforman. En general, todas las inferencias filogenéticas demostraron la predominancia de cepas de *E. coli* asociadas a reservorios humanos. Sin embargo, este efecto puede ser atribuido al sesgo dado el gran número de estudios dirigidos al análisis de genomas de *E. coli* de origen humano comparado con los provenientes de nichos secundarios (Zhou et al., 2020). Por lo que, los análisis aquí realizados pueden cambiar conforme un mayor número de genomas de *E. coli* provenientes de fuentes o reservorios no humanos sean integrados a la base de datos de EnteroBase.

De acuerdo con la información de EnteroBase y el resultado del análisis por cgMLST, los linajes ST4 y ST40 son grupos clonales restringidos a patotipos InPEC.

Lo anterior indica que la presencia de las cepas ETEC ADD183 (ST4) y aEPEC ACM5 (ST40) es de relevancia clínica/epidemiológica, particularmente, dado su origen de aislamiento. La primera, al ser derivada de agua superficial de un drenaje agrícola donde es subsecuentemente utilizada en el riego de cultivos, ganadería y acuicultura, y la segunda, derivada del cultivo de tilapia (*Oreochromis spp.*). Esto puede tener un gran impacto en la salud pública por la capacidad de estos nichos de fungir como reservorio directo de cepas de *E. coli* con el potencial patogénico para desencadenar síndromes diarreicos en el ser humano (Ahumada-Santos et al., 2014; Cardozo et al., 2018).

La cepa FD21-2 (ST69), si bien fue obtenida de heces humanas, esta presenta una mayor relación con cepas aisladas de muestras de orina y sangre humana. Esto sugiere que FD21-2 tiene el potencial patogénico de desencadenar enfermedades de tipo extraintestinal. Además, aunque no se encontraron los VAGs en el genoma para considerarse como cepa ExPEC de acuerdo con Johnson et al. (2015), sí se identificaron factores de virulencia relacionados a cepas ExPEC implicados en la adquisición de hierro (yersiniabactina, operón chu, transportador Sit) y protectinas (cápsula grupo 3, Iss, OmpT, TraT). Lo que sugiere que la cepa FD21-2 es en realidad una cepa ExPEC y posee un repertorio distinto de determinantes de virulencia no definidos en el presente trabajo y requiere de experimentación para explorar estos aspectos con mayor detalle.

Aunque el objetivo principal del análisis por cgMLST no fue determinar el origen directo de las cepas aquí secuenciadas, éste permitió establecer parcialmente las relaciones entre las cepas de esta investigación con respecto aquellas derivadas de

diferentes fuentes de aislamiento a nivel mundial. Por ejemplo, las cepas MDR ADD147 (ST410) y ADD167 (ST617), si bien fueron obtenidas de una fuente ambiental, el análisis filogenético sugiere que se derivan de hospederos humanos y que fueron introducidas al drenaje agrícola mediante el drenaje doméstico (Ahumada-Santos et al., 2014). El grupo clonal ST2279 es un linaje ExPEC de relevancia clínica por los rasgos fenotípicos MDR que presenta (de Souza da-Silva et al., 2020; Umene et al., 2015), y aunque se encuentra aún subrepresentado a nivel mundial, su monitoreo es de importancia para evitar su diseminación y expansión satisfactoria como el de otros linajes ExPEC de alto riesgo tales como ST131, ST69, ST38, ST73, ST95, ST405, ST410, ST1193 (Manges et al., 2019).

Finalmente, es importante señalar que esta investigación generó los primeros reportes en México sobre la presencia de los linajes de *E. coli* de alto riesgo ST410 y ST617 en ambientes acuáticos, así como la descripción global del linaje ST2279 desde una perspectiva genómica.

XI. CONCLUSIONES

11.1. Conclusión general

El contenido de determinantes implicados en la virulencia bacteriana, resistencia antimicrobiana, plásmidos y profagos es diverso entre los genomas de *E. coli* provenientes de distintas fuentes de aislamiento en Sinaloa.

11.2. Conclusiones específicas

1. Los genomas de *E. coli* derivados de fuentes humanas presentan un enriquecimiento de determinantes de virulencia implicados en la captación de hierro, adherencia bacteriana y la supervivencia/resistencia al complemento sérico. Se reconocieron grupos patogénicos InPEC (aEPEC, ETEC) y ExPEC (UPEC) en cepas provenientes de los tres orígenes de aislamientos.

2. El perfil fenotípico de resistencia y la posesión de determinantes genómicos de resistencia antimicrobiana asociado al perfil es coincidente. Se identificaron integrones de clase 1 y regiones complejas de multiresistencia, principalmente, en cepas de origen clínico y ambiental. No se identificó ningún determinante asociado a la resistencia frente a carbapenémicos o polimixinas. La variante BLEE CTX-M-15 fue identificada con baja predominancia. En este trabajo se identificó y describió por primera vez en México la nueva variante *fosA7.5* implicada en la resistencia a fosfomicina.

3. Plásmidos y bacteriófagos co-albergan determinantes de virulencia y resistencia antimicrobiana. Plásmidos del grupo IncF y tipo Col predominan entre los genomas de *E. coli* independientemente del origen de aislamiento. Los plásmidos

IncF que poseen las cepas analizadas presentan estructura de mosaico albergando regiones profágicas.

4. Existe relación filogenética entre las cepas aisladas en Sinaloa y cepas de otras regiones geográficas a nivel mundial. La investigación demostró la circulación de linajes de *E. coli* de alto riesgo de carácter internacional en muestras de diferentes orígenes. Por lo tanto, su diseminación puede ser facilitada representando una amenaza para la salud pública, especialmente, en el caso de las cepas patogénicas MDR. El origen de las cepas aisladas de ambientes secundarios es derivado de fuentes humanas.

XII.PERSPECTIVAS DEL PROYECTO

1. Aumentar el número de aislados a caracterizar de manera fenotípica y genómica, incluyendo cepas provenientes de diversas fuentes de aislamiento, es decir, alimentos, aves, ganado, mascotas, suelos, sedimentos. Para el caso de humanos y animales incluir cepas comensales y patógenas; de este último, de carácter intestinal y extraintestinal.
2. Implementar secuenciación de lecturas largas para obtener reconstrucciones completas de secuencias plasmídicas, elementos repetitivos y la sintenia de los genes de resistencia y/o virulencia en los genomas.

XIII. BIBLIOGRAFÍA

- Ahumada-Santos, Y. P., Báez-Flores, M. E., Díaz-Camacho, S. P., Uribe-Beltrán, M. de J., López-Angulo, G., Vega-Aviña, R., Chávez-Duran, F. A., Montes-Avila, J., Carranza-Díaz, O., Möder, M., Kusch, P., & Delgado-Vargas, F. (2014). Spatiotemporal distribution of the bacterial contamination of agricultural and domestic wastewater discharged to a drainage ditch (Sinaloa, Mexico). *Ciencias Marinas*, 40(4), 277–289. <https://doi.org/10.7773/cm.v40i4.2456>
- Ahumada-Santos, Y. P., Delgado-Vargas, F., Báez-Flores, M. E., López-Angulo, G., Díaz-Camacho, S. P., Moeder, M., & Parra-Unda, J. R. (2022). Multidrug resistance and class 1 integron presence in *Escherichia coli* isolates from a polluted drainage ditch's water. *International Journal of Environmental Health Research*, 1–12. <https://doi.org/10.1080/09603123.2022.2115468>
- Aires, J. R., & Nikaido, H. (2005). Aminoglycosides Are Captured from both Periplasm and Cytoplasm by the AcrD Multidrug Efflux Transporter of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 187(6), 1923–1929. <https://doi.org/10.1128/JB.187.6.1923-1929.2005>
- Allel, K., Day, L., Hamilton, A., Lin, L., Furuya-Kanamori, L., Moore, C. E., Van Boeckel, T., Laxminarayan, R., & Yakob, L. (2023). Global antimicrobial-resistance drivers: an ecological country-level study at the human–animal interface. *The Lancet Planetary Health*, 7(4), e291–e303. [https://doi.org/10.1016/S2542-5196\(23\)00026-8](https://doi.org/10.1016/S2542-5196(23)00026-8)
- Ambler, R. P. (1980). The structure of beta-lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 289(1036), 321–331. <https://doi.org/10.1098/rstb.1980.0049>
- Amézquita-López, B. A., Quiñones, B., Soto-Beltrán, M., Lee, B. G., Yambao, J. C., Lugo-Melchor, O. Y., & Chaidez, C. (2016). Antimicrobial resistance profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 and Non-O157 recovered from domestic farm animals in rural communities in Northwestern Mexico. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 5(1), 1.

<https://doi.org/10.1186/s13756-015-0100-5>

- Andrews, S. (2010). *FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data*. Babraham Bioinformatics, Babraham Institute, Cambridge, United Kingdom.
- Antunes, P., Machado, J., & Peixe, L. (2007). Dissemination of sul3 -Containing Elements Linked to Class 1 Integrons with an Unusual 3' Conserved Sequence Region among Salmonella Isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(4), 1545–1548. <https://doi.org/10.1128/AAC.01275-06>
- Arndt, D., Grant, J. R., Marcu, A., Sajed, T., Pon, A., Liang, Y., & Wishart, D. S. (2016). PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. *Nucleic Acids Research*, 44(W1), W16–W21. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw387>
- Arredondo-Alonso, S., Willems, R. J., van Schaik, W., & Schürch, A. C. (2017). On the (im)possibility of reconstructing plasmids from whole-genome short-read sequencing data. *Microbial Genomics*, 3(10), e000128. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000128>
- Aslam, B., Wang, W., Arshad, M. I., Khurshid, M., Muzammil, S., Rasool, M. H., Nisar, M. A., Alvi, R. F., Aslam, M. A., Qamar, M. U., Salamat, M. K. F., & Baloch, Z. (2018). Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infection and Drug Resistance*, 11, 1645–1658. <https://doi.org/10.2147/IDR.S173867>
- Aziz, R. K., Bartels, D., Best, A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R. A., Formsma, K., Gerdes, S., Glass, E. M., Kubal, M., Meyer, F., Olsen, G. J., Olson, R., Osterman, A. L., Overbeek, R. A., McNeil, L. K., Paarmann, D., Paczian, T., Parrello, B., ... Zagnitko, O. (2008). The RAST Server: Rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics*, 9, 1–15. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-75>
- Balbin, M. M., Hull, D., Guest, C., Nichols, L., Dunn, R., Hull, D., & Thakur, S. (2020). Antimicrobial resistance and virulence factors profile of Salmonella spp. and Escherichia coli isolated from different environments exposed to anthropogenic activity. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 22, 578–583. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.05.016>

- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., Lesin, V. M., Nikolenko, S. I., Pham, S., Pribelski, A. D., Pyshkin, A. V, Sirotkin, A. V, Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M. A., & Pevzner, P. A. (2012). SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of Computational Biology: A Journal of Computational Molecular Cell Biology*, 19(5), 455–477. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>
- Baquero, F., & Coque, T. M. (2011). Multilevel population genetics in antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(5), 705–706. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00293.x>
- Baquero, F., Martínez, J.-L., & Cantón, R. (2008). Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(3), 260–265. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2008.05.006>
- Beghain, J., Bridier-Nahmias, A., Le Nagard, H., Denamur, E., & Clermont, O. (2018). ClermonTyping: an easy-to-use and accurate in silico method for Escherichia genus strain phylotyping. *Microbial Genomics*, 4(7). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000192>
- Bentley, R., & Meganathan, R. (1982). Biosynthesis of vitamin K (menaquinone) in bacteria. *Microbiological Reviews*, 46(3), 241–280. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6127606>
- Berthe, T., Ratajczak, M., Clermont, O., Denamur, E., & Petit, F. (2013). Evidence for Coexistence of Distinct Escherichia coli Populations in Various Aquatic Environments and Their Survival in Estuary Water. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(15), 4684–4693. <https://doi.org/10.1128/AEM.00698-13>
- Bogaerts, B., Winand, R., Van Braekel, J., Hoffman, S., Roosens, N. H. C., De Keersmaecker, S. C. J., Marchal, K., & Vanneste, K. (2021). Evaluation of WGS performance for bacterial pathogen characterization with the Illumina technology optimized for time-critical situations. *Microbial Genomics*, 7(11). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000699>
- Bortolaia, V., Kaas, R. S., Ruppe, E., Roberts, M. C., Schwarz, S., Cattoir, V.,

- Philippon, A., Allesoe, R. L., Rebelo, A. R., Florensa, A. F., Fagelhauer, L., Chakraborty, T., Neumann, B., Werner, G., Bender, J. K., Stingl, K., Nguyen, M., Coppens, J., Xavier, B. B., ... Aarestrup, F. M. (2020). ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *75*(12), 3491–3500. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa345>
- Bosi, E., Donati, B., Galardini, M., Brunetti, S., Sagot, M.-F., Lió, P., Crescenzi, P., Fani, R., & Fondi, M. (2015). MeDuSa: a multi-draft based scaffold. *Bioinformatics*, *31*(15), 2443–2451. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv171>
- Breland, E. J., Eberly, A. R., & Hadjifrangiskou, M. (2017). An Overview of Two-Component Signal Transduction Systems Implicated in Extra-Intestinal Pathogenic *E. coli* Infections. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *7*, 162. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00162>
- Brzuszkiewicz, E., Thürmer, A., Schuldes, J., Leimbach, A., Liesegang, H., Meyer, F.-D., Boelter, J., Petersen, H., Gottschalk, G., & Daniel, R. (2011). Genome sequence analyses of two isolates from the recent *Escherichia coli* outbreak in Germany reveal the emergence of a new pathotype: Entero-Aggregative-Haemorrhagic *Escherichia coli* (EAHEC). *Archives of Microbiology*, *193*(12), 883–891. <https://doi.org/10.1007/s00203-011-0725-6>
- Bush, K., Jacoby, G. A., & Medeiros, A. A. (1995). A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *39*(6), 1211–1233. <https://doi.org/10.1128/aac.39.6.1211>
- Calero-Cáceres, W., Ye, M., & Balcázar, J. L. (2019). Bacteriophages as Environmental Reservoirs of Antibiotic Resistance. *Trends in Microbiology*, *27*(7), 570–577. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.02.008>
- Canizalez-Roman, A., Flores-Villaseñor, H. M., Gonzalez-Nuñez, E., Velazquez-Roman, J., Vidal, J. E., Muro-Amador, S., Alapizco-Castro, G., Díaz-Quiñonez, J. A., & León-Sicairos, N. (2016). Surveillance of Diarrheagenic *Escherichia coli* Strains Isolated from Diarrhea Cases from Children, Adults and Elderly at Northwest of Mexico. *Frontiers in Microbiology*, *7*, 1924.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01924>

Canizalez-Roman, A., Gonzalez-Nuñez, E., Vidal, J. E., Flores-Villaseñor, H., & León-Sicairos, N. (2013). Prevalence and antibiotic resistance profiles of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from food items in northwestern Mexico. *International Journal of Food Microbiology*, *164*(1), 36–45. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.03.020>

Canizalez-Roman, A., Velazquez-Roman, J., Valdez-Flores, M. A., Flores-Villaseñor, H., Vidal, J. E., Muro-Amador, S., Guadrón-Llanos, A. M., Gonzalez-Nuñez, E., Medina-Serrano, J., Tapia-Pastrana, G., & León-Sicairos, N. (2019). Detection of antimicrobial-resistance diarrheagenic *Escherichia coli* strains in surface water used to irrigate food products in the northwest of Mexico. *International Journal of Food Microbiology*, *304*, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.05.017>

Carattoli, A., & Hasman, H. (2020). PlasmidFinder and In Silico pMLST: Identification and Typing of Plasmid Replicons in Whole-Genome Sequencing (WGS). In F. de la Cruz (Ed.), *Methods in Molecular Biology* (Vol. 2075, pp. 285–294). Humana. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9877-7_20

Carattoli, A., Zankari, E., García-Fernández, A., Voldby Larsen, M., Lund, O., Villa, L., Møller Aarestrup, F., & Hasman, H. (2014). In Silico Detection and Typing of Plasmids using PlasmidFinder and Plasmid Multilocus Sequence Typing. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *58*(7), 3895–3903. <https://doi.org/10.1128/AAC.02412-14>

Cardozo, M. V., Borges, C. A., Beraldo, L. G., Maluta, R. P., Pollo, A. S., Borzi, M. M., dos Santos, L. F., Kariyawasam, S., & Ávila, F. A. de. (2018). Shigatoxigenic and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* in fish for human consumption. *Brazilian Journal of Microbiology*, *49*(4), 936–941. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2018.02.013>

Carter, M., & Shieh, J. (2015). Molecular Cloning and Recombinant DNA Technology. In *Guide to Research Techniques in Neuroscience* (Second, pp. 219–237). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800511-8.00010-1>

- CDC. (2013). *Antibiotic resistance threats in the United States, 2013*.
<https://stacks.cdc.gov/view/cdc/20705>
- CDC. (2019). *Antibiotic resistance threats in the United States, 2019*.
<https://doi.org/10.15620/cdc:82532>
- Chakraborty, A., Adhikari, P., Shenoy, S., & Saralaya, V. (2015). Clinical significance and phylogenetic background of extended spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* isolates from extra-intestinal infections. *Journal of Infection and Public Health*, 8(3), 248–253. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2014.10.001>
- Chu, S.-M., Hsu, J.-F., Lee, C.-W., Lien, R., Huang, H.-R., Chiang, M.-C., Fu, R.-H., & Tsai, M.-H. (2014). Neurological complications after neonatal bacteremia: the clinical characteristics, risk factors, and outcomes. *PloS One*, 9(11), e105294. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105294>
- Cieza, R. J., Hu, J., Ross, B. N., Sbrana, E., & Torres, A. G. (2015). The IbeA invasin of adherent-invasive *Escherichia coli* mediates interaction with intestinal epithelia and macrophages. *Infection and Immunity*, 83(5), 1904–1918. <https://doi.org/10.1128/IAI.03003-14>
- Clements, A., Young, J. C., Constantinou, N., & Frankel, G. (2012). Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Microbes*, 3(2), 71–87. <https://doi.org/10.4161/gmic.19182>
- Clermont, O., Christenson, J. K., Denamur, E., & Gordon, D. M. (2013). The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environmental Microbiology Reports*, 5(1), 58–65. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12019>
- Clermont, O., Dixit, O. V. A., Vangchhia, B., Condamine, B., Dion, S., Bridier-Nahmias, A., Denamur, E., & Gordon, D. (2019). Characterization and rapid identification of phylogroup G in *Escherichia coli*, a lineage with high virulence and antibiotic resistance potential. *Environmental Microbiology*, 21(8), 3107–3117. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14713>
- CLSI. (2018). *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. 13th*

- ed. *CLSI standard M02*. Wayne, PA: *Clinical and Laboratory Standards Institute*; 2018. Available online: <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m02/>
- CLSI. (2021). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 31st ed. *CLSI supplement M100*. *Clinical and Laboratory Standards Institute*; 2021. Available online: <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m100/>
- Collignon, P., & McEwen, S. (2019). One Health—Its Importance in Helping to Better Control Antimicrobial Resistance. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 4(1), 22. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed4010022>
- Commission, O. H. (2020). *What is One Health?* https://www.onehealthcommission.org/en/why_one_health/what_is_one_health/
- Cookson, A. L., Marshall, J. C., Biggs, P. J., Rogers, L. E., Collis, R. M., Devane, M., Stott, R., Wilkinson, D. A., Kamke, J., & Brightwell, G. (2022). Whole-Genome Sequencing and Virulome Analysis of *Escherichia coli* Isolated from New Zealand Environments of Contrasting Observed Land Use. *Applied and Environmental Microbiology*, 88(9), e0027722. <https://doi.org/10.1128/aem.00277-22>
- Cortés-Cortés, G., Lozano-Zarain, P., Torres, C., Alonso, C. A., Ríos-Torres, A. M., Castañeda, M., López-Pliego, L., Navarro, A., & del Carmen Rocha-Gracia, R. (2017). Extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from healthy humans in Mexico, including subclone ST131-B2-O25:H4-H30-Rx. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 9, 130–134. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2017.02.014>
- Croxen, M. A., & Finlay, B. B. (2010). Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology*, 8(1), 26–38. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2265>
- Croxen, M. A., Law, R. J., Scholz, R., Keeney, K. M., Wlodarska, M., & Finlay, B. B. (2013). Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*.

Clinical Microbiology Reviews, 26(4), 822–880.
<https://doi.org/10.1128/CMR.00022-13>

- Curiao, T., Cantón, R., Garcillán-Barcia, M. P., de la Cruz, F., Baquero, F., & Coque, T. M. (2011). Association of Composite IS 26-sul3 Elements with Highly Transmissible Incl1 Plasmids in Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* Clones from Humans. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(5), 2451–2457. <https://doi.org/10.1128/AAC.01448-10>
- Dale, A. P., & Woodford, N. (2015). Extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC): Disease, carriage and clones. *Journal of Infection*, 71(6), 615–626. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2015.09.009>
- Dallman, T., Smith, G. P., O'Brien, B., Chattaway, M. A., Finlay, D., Grant, K. A., & Jenkins, C. (2012). Characterization of a Verocytotoxin-Producing Enteroaggregative *Escherichia coli* Serogroup O111:H21 Strain Associated with a Household Outbreak in Northern Ireland. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(12), 4116–4119. <https://doi.org/10.1128/JCM.02047-12>
- Darfeuille-Michaud, A., Boudeau, J., Bulois, P., Neut, C., Glasser, A.-L., Barnich, N., Bringer, M.-A., Swidsinski, A., Beaugerie, L., & Colombel, J.-F. (2004). High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology*, 127(2), 412–421. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2004.04.061>
- de Frutos, M., Ramiro, R., Pereña, J. I., & Sánchez, S. (2020). Mixed infection of four diarrhoeagenic *Escherichia coli* pathotypes in a case of travellers' diarrhoea: Characterisation of the isolates by whole-genome sequencing. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (English Ed.)*, 38(1), 39–40. <https://doi.org/10.1016/j.eimce.2019.01.008>
- de Souza da-Silva, A. P., de Sousa, V. S., de Araújo Longo, L. G., Caldera, S., Baltazar, I. C. L., Bonelli, R. R., Santoro-Lopes, G., Riley, L. W., & Moreira, B. M. (2020). Prevalence of fluoroquinolone-resistant and broad-spectrum cephalosporin-resistant community-acquired urinary tract infections in Rio de Janeiro: Impact of genotypes ST69 and ST131. *Infection, Genetics and*

Evolution, 85, 104452. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104452>

Desai, A., Marwah, V. S., Yadav, A., Jha, V., Dhaygude, K., Bangar, U., Kulkarni, V., & Jere, A. (2013). Identification of Optimum Sequencing Depth Especially for De Novo Genome Assembly of Small Genomes Using Next Generation Sequencing Data. *PLoS ONE*, 8(4), e60204. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060204>

Dobrindt, U. (2005). (Patho-)Genomics of Escherichia coli. *International Journal of Medical Microbiology*, 295(6–7), 357–371. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2005.07.009>

Dubreuil, J. D. (2019). EAST1 toxin: An enigmatic molecule associated with sporadic episodes of diarrhea in humans and animals. *Journal of Microbiology*, 57(7), 541–549. <https://doi.org/10.1007/s12275-019-8651-4>

ECDC/EMA. (2009). *The bacterial challenge: time to react*. <https://doi.org/10.2900/2518>

Edgar, R., & Bibi, E. (1997). MdfA, an Escherichia coli multidrug resistance protein with an extraordinarily broad spectrum of drug recognition. *Journal of Bacteriology*, 179(7), 2274–2280. <https://doi.org/10.1128/jb.179.7.2274-2280.1997>

Eliopoulos, G. M., & Huovinen, P. (2001). Resistance to Trimethoprim-Sulfamethoxazole. *Clinical Infectious Diseases*, 32(11), 1608–1614. <https://doi.org/10.1086/320532>

Ellis, S. J., Crossman, L. C., McGrath, C. J., Chattaway, M. A., Hölken, J. M., Brett, B., Bundy, L., Kay, G. L., Wain, J., & Schüller, S. (2020). Identification and characterisation of enteroaggregative Escherichia coli subtypes associated with human disease. *Scientific Reports*, 10(1), 7475. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64424-3>

Encarnación-Guevara, S. (2006). Genomics and functional genomics in microbiology. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 48(2), 131–145. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17578085>

Escherich, T. (1885). Die Darmbakterien des Neugeborenen und Säuglings. *DMW -*

Deutsche Medizinische Wochenschrift, 11(43), 740–741.
<https://doi.org/10.1055/s-0029-1208962>

- Ewers, C., Li, G., Wilking, H., Kiessling, S., Alt, K., Antão, E.-M., Laternus, C., Diehl, I., Glodde, S., Homeier, T., Böhnke, U., Steinrück, H., Philipp, H.-C., & Wieler, L. H. (2007). Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: how closely related are they? *International Journal of Medical Microbiology: IJMM*, 297(3), 163–176. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2007.01.003>
- Falgenhauer, L., Imirzalioglu, C., Ghosh, H., Gwozdziński, K., Schmiedel, J., Gentil, K., Bauerfeind, R., Kämpfer, P., Seifert, H., Michael, G. B., Schwarz, S., Pfeifer, Y., Werner, G., Pietsch, M., Roesler, U., Guerra, B., Fischer, J., Sharp, H., Käsbohrer, A., ... Chakraborty, T. (2016). Circulation of clonal populations of fluoroquinolone-resistant CTX-M-15-producing *Escherichia coli* ST410 in humans and animals in Germany. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 47(6), 457–465. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.03.019>
- Forde, B. M., Roberts, L. W., Phan, M.-D., Peters, K. M., Fleming, B. A., Russell, C. W., Lenherr, S. M., Myers, J. B., Barker, A. P., Fisher, M. A., Chong, T.-M., Yin, W.-F., Chan, K.-G., Schembri, M. A., Mulvey, M. A., & Beatson, S. A. (2019). Population dynamics of an *Escherichia coli* ST131 lineage during recurrent urinary tract infection. *Nature Communications*, 10(1), 3643. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11571-5>
- Foxman, B. (2010). The epidemiology of urinary tract infection. *Nature Reviews. Urology*, 7(12), 653–660. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2010.190>
- Gabashvili, E., Osepashvili, M., Koulouris, S., Ujmajuridze, L., Tskhitishvili, Z., & Kotetishvili, M. (2020). Phage Transduction is Involved in the Intergeneric Spread of Antibiotic Resistance-Associated blaCTX-M, mel, and tetM Loci in Natural Populations of Some Human and Animal Bacterial Pathogens. *Current Microbiology*, 77(2), 185–193. <https://doi.org/10.1007/s00284-019-01817-2>
- Galindo-Méndez, M., Navarrete-Salazar, H., Baltazar-Jiménez, F., Muñoz-de la Paz, E., Sánchez-Mawcinitt, M. F., Gómez-Pardo, A., Garza-González, E., Ponce-de-León-Garduño, L. A., Franco-Cendejas, R., Morfín-Otero, R., Rojas-Larios, F.,

- Mena-Ramírez, J. P., Morales-de-la-Peña, C. T., García-Mendoza, L., Choy-Chang, E. V., Avilés-Benítez, L. K., López-Gutiérrez, E., Canizales-Oviedo, J. L., Barlandas-Rendón, N. E., ... Ostos-Cantú, H. L. (2022). Emergence of Fosfomycin Resistance by Plasmid-Mediated fos Genes in Uropathogenic ESBL-Producing *E. coli* Isolates in Mexico. *Antibiotics*, *11*(10), 1383. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11101383>
- García Cervantes, P. C., Castañeda Meléndrez, A. M., Osuna Ramírez, I., & Bernal Reynaga, R. (2021). Caracterización de cepas de *Escherichia coli* uropatógena aisladas del tracto urinario de mujeres durante el embarazo. *Revista Bio Ciencias*, *8*. <https://doi.org/10.15741/revbio.08.e1123>
- Garneau-Tsodikova, S., & Labby, K. J. (2016). Mechanisms of resistance to aminoglycoside antibiotics: overview and perspectives. *MedChemComm*, *7*(1), 11–27. <https://doi.org/10.1039/C5MD00344J>
- Garza-González, E., Morfín-Otero, R., Mendoza-Olazarán, S., Bocanegra-Ibarias, P., Flores-Treviño, S., Rodríguez-Noriega, E., Ponce-de-León, A., Sanchez-Francia, D., Franco-Cendejas, R., Arroyo-Escalante, S., Velázquez-Acosta, C., Rojas-Larios, F., Quintanilla, L. J., Maldonado-Anicacio, J. Y., Martínez-Miranda, R., Ostos-Cantú, H. L., Gomez-Choel, A., Jaime-Sanchez, J. L., Avilés-Benítez, L. K., ... Camacho-Ortiz, A. (2019). A snapshot of antimicrobial resistance in Mexico. Results from 47 centers from 20 states during a six-month period. *PLOS ONE*, *14*(3), e0209865. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209865>
- Garza-Ramos, U., Silva-Sánchez, J., & Martínez-Romero, E. (2009). Genética y genómica enfocadas en el estudio de la resistencia bacteriana. *Salud Pública de México*, *51*, s439–s446. <https://doi.org/10.1590/S0036-36342009000900009>
- Gascuel, O. (1997). BIONJ: an improved version of the NJ algorithm based on a simple model of sequence data. *Molecular Biology and Evolution*, *14*(7), 685–695. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a025808>
- Gillings, M., Boucher, Y., Labbate, M., Holmes, A., Krishnan, S., Holley, M., & Stokes, H. W. (2008). The Evolution of Class 1 Integrons and the Rise of Antibiotic Resistance. *Journal of Bacteriology*, *190*(14), 5095–5100.

<https://doi.org/10.1128/JB.00152-08>

- Glasser, A. L., Boudeau, J., Barnich, N., Perruchot, M. H., Colombel, J. F., & Darfeuille-Michaud, A. (2001). Adherent invasive *Escherichia coli* strains from patients with Crohn's disease survive and replicate within macrophages without inducing host cell death. *Infection and Immunity*, *69*(9), 5529–5537. <https://doi.org/10.1128/iai.69.9.5529-5537.2001>
- Goldstein, S., Beka, L., Graf, J., & Klassen, J. L. (2019). Evaluation of strategies for the assembly of diverse bacterial genomes using MinION long-read sequencing. *BMC Genomics*, *20*(1), 23. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-5381-7>
- Gomes, T. A. T., Elias, W. P., Scaletsky, I. C. A., Guth, B. E. C., Rodrigues, J. F., Piazza, R. M. F., Ferreira, L. C. S., & Martinez, M. B. (2016). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Brazilian Journal of Microbiology*, *47*, 3–30. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.015>
- Gouy, M., Tannier, E., Comte, N., & Parsons, D. P. (2021). Seaview Version 5: A Multiplatform Software for Multiple Sequence Alignment, Molecular Phylogenetic Analyses, and Tree Reconciliation. In *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* (Vol. 2231, pp. 241–260). https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1036-7_15
- Griffey, R. H., Hofstadler, S. A., Sannes-Lowery, K. A., Ecker, D. J., & Crooke, S. T. (1999). Determinants of aminoglycoside-binding specificity for rRNA by using mass spectrometry. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *96*(18), 10129–10133. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.18.10129>
- Grilo, T., Freire, S., Miguel, B., Martins, L. N., Menezes, M. F., Nordmann, P., Poirel, L., Sousa, M. J. R., & Aires-de-Sousa, M. (2023). Occurrence of plasmid-mediated fosfomicin resistance (fos genes) among *Escherichia coli* isolates, Portugal. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2023.08.001>
- Guerra, S. T., Orsi, H., Joaquim, S. F., Guimarães, F. F., Lopes, B. C., Dalanezi, F. M., Leite, D. S., Langoni, H., Pantoja, J. C. F., Rall, V. L. M., Hernandez, R. T., Lucheis, S. B., & Ribeiro, M. G. (2020). Short communication: Investigation of

- extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* virulence genes, bacterial motility, and multidrug resistance pattern of strains isolated from dairy cows with different severity scores of clinical mastitis. *Journal of Dairy Science*, *103*(4), 3606–3614. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17477>
- Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., & Tesler, G. (2013). QAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*, *29*(8), 1072–1075. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086>
- Gyles, C. L. (2007). Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *Journal of Animal Science*, *85*(13 Suppl), E45-62. <https://doi.org/10.2527/jas.2006-508>
- Hasman, H., Saputra, D., Sicheritz-Ponten, T., Lund, O., Svendsen, C. A., Frimodt-Møller, N., & Aarestrup, F. M. (2014). Rapid whole-genome sequencing for detection and characterization of microorganisms directly from clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology*, *52*(1), 139–146. <https://doi.org/10.1128/JCM.02452-13>
- Henderson, J. P., Crowley, J. R., Pinkner, J. S., Walker, J. N., Tsukayama, P., Stamm, W. E., Hooton, T. M., & Hultgren, S. J. (2009). Quantitative Metabolomics Reveals an Epigenetic Blueprint for Iron Acquisition in Uropathogenic *Escherichia coli*. *PLoS Pathogens*, *5*(2), e1000305. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000305>
- Hernández, M., Quijada, N. M., Rodríguez-Lázaro, D., & Eiros, J. M. (2020). Aplicación de la secuenciación masiva y la bioinformática al diagnóstico microbiológico clínico. *Revista Argentina de Microbiología*, *52*(2), 150–161. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.06.003>
- Holmes, A. H., Moore, L. S. P., Sundsfjord, A., Steinbakk, M., Regmi, S., Karkey, A., Guerin, P. J., & Piddock, L. J. V. (2016). Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *Lancet (London, England)*, *387*(10014), 176–187. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00473-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00473-0)
- Hopkins, K. L., Davies, R. H., & Threlfall, E. J. (2005). Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: Recent developments.

International Journal of Antimicrobial Agents, 25(5), 358–373.
<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2005.02.006>

- Iroha, I. R., Esimone, C. O., Neumann, S., Marlinghaus, L., Korte, M., Szabados, F., Gatermann, S., & Kaase, M. (2012). First description of *Escherichia coli* producing CTX-M-15- extended spectrum beta lactamase (ESBL) in out-patients from south eastern Nigeria. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 11(1), 19. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-11-19>
- Jacoby, G. A. (2005). Mechanisms of Resistance to Quinolones. *Clinical Infectious Diseases*, 41(Supplement_2), S120–S126. <https://doi.org/10.1086/428052>
- Jafari, A., Aslani, M. M., & Bouzari, S. (2012). *Escherichia coli*: a brief review of diarrheagenic pathotypes and their role in diarrheal diseases in Iran. *Iranian Journal of Microbiology*, 4(3), 102–117. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23066484>
- Jamil, A., Zahoor, M. A., Nawaz, Z., Siddique, A. B., & Khurshid, M. (2022). Genetic Diversity of *Escherichia coli* Coharboring *mcr-1* and Extended Spectrum Beta-Lactamases from Poultry. *BioMed Research International*, 2022, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2022/8224883>
- Joensen, K. G., Scheutz, F., Lund, O., Hasman, H., Kaas, R. S., Nielsen, E. M., & Aarestrup, F. M. (2014). Real-Time Whole-Genome Sequencing for Routine Typing, Surveillance, and Outbreak Detection of Verotoxigenic *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(5), 1501–1510. <https://doi.org/10.1128/JCM.03617-13>
- Joensen, K. G., Tetzschner, A. M. M., Iguchi, A., Aarestrup, F. M., & Scheutz, F. (2015). Rapid and Easy In Silico Serotyping of *Escherichia coli* Isolates by Use of Whole-Genome Sequencing Data. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(8), 2410–2426. <https://doi.org/10.1128/JCM.00008-15>
- Johnson, J. R., Porter, S., Johnston, B., Kuskowski, M. A., Spurbeck, R. R., Mobley, H. L. T., & Williamson, D. A. (2015). Host Characteristics and Bacterial Traits Predict Experimental Virulence for *Escherichia coli* Bloodstream Isolates From

- Patients With Urosepsis. *Open Forum Infectious Diseases*, 2(3), ofv083. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofv083>
- Johnson, J. R., & Russo, T. A. (2018). Molecular Epidemiology of Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*. *EcoSal Plus*, 8(1). <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0004-2017>
- Johnson, T. J., Wannemuehler, Y. M., & Nolan, L. K. (2008). Evolution of the *iss* Gene in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(8), 2360–2369. <https://doi.org/10.1128/AEM.02634-07>
- Kaas, R. S., Friis, C., Ussery, D. W., & Aarestrup, F. M. (2012). Estimating variation within the genes and inferring the phylogeny of 186 sequenced diverse *Escherichia coli* genomes. *BMC Genomics*, 13(1), 577. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-577>
- Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. T. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), 123–140. <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>
- Kartsev, N. N., Fursova, N. K., Pachkunov, D. M., Bannov, V. A., Eruslanov, B. V, Svetoch, E. A., & Dyatlov, I. A. (2015). Molecular Characterization of Enterotoxin-Producing *Escherichia coli* Collected in 2011–2012, Russia. *PLOS ONE*, 10(4), e0123357. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123357>
- Kaur, S. (2013). Genomics. In *Brenner's Encyclopedia of Genetics* (pp. 310–312). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.00642-2>
- Khasheii, B., Mahmoodi, P., & Mohammadzadeh, A. (2021). Siderophores: Importance in bacterial pathogenesis and applications in medicine and industry. *Microbiological Research*, 250, 126790. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126790>
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16(2), 111–120. <https://doi.org/10.1007/BF01731581>
- Kingsford, C., Schatz, M. C., & Pop, M. (2010). Assembly complexity of prokaryotic genomes using short reads. *BMC Bioinformatics*, 11(1), 21.

<https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-21>

- Kwon, T., Chung, S., Jung, Y.-H., Jung, S.-J., Roh, S.-G., Park, J.-S., Kim, C.-H., Kim, W., Bak, Y.-S., & Cho, S.-H. (2017). Comparative genomic analysis and characteristics of NCCP15740, the major type of enterotoxigenic *Escherichia coli* in Korea. *Gut Pathogens*, *9*(1), 55. <https://doi.org/10.1186/s13099-017-0204-y>
- Lan, J. H., Yin, Y., Reed, E. F., Moua, K., Thomas, K., & Zhang, Q. (2015). Impact of three Illumina library construction methods on GC bias and HLA genotype calling. *Human Immunology*, *76*(2–3), 166–175. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2014.12.016>
- Lang, C., Hiller, M., Konrad, R., Fruth, A., & Flieger, A. (2019). Whole-Genome-Based Public Health Surveillance of Less Common Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Serovars and Untypeable Strains Identifies Four Novel O Genotypes. *Journal of Clinical Microbiology*, *57*(10). <https://doi.org/10.1128/JCM.00768-19>
- Larsen, M. V, Cosentino, S., Lukjancenko, O., Saputra, D., Rasmussen, S., Hasman, H., Sicheritz-Pontén, T., Aarestrup, F. M., Ussery, D. W., & Lund, O. (2014). Benchmarking of Methods for Genomic Taxonomy. *Journal of Clinical Microbiology*, *52*(5), 1529–1539. <https://doi.org/10.1128/JCM.02981-13>
- Larsen, M. V, Cosentino, S., Rasmussen, S., Friis, C., Hasman, H., Marvig, R. L., Jelsbak, L., Sicheritz-Ponten, T., Ussery, D. W., Aarestrup, F. M., & Lund, O. (2012). Multilocus Sequence Typing of Total-Genome-Sequenced Bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, *50*(4), 1355–1361. <https://doi.org/10.1128/JCM.06094-11>
- Le-Vo, H.-N., Tran, P. T.-B., Le, L., Matsumoto, Y., Motooka, D., Nakamura, S., Jones, J. W., Iida, T., & Cao, V. (2019). Complex Class 1 Integron in a Clinical *Escherichia coli* Strain From Vietnam Carrying Both *mcr-1* and *bla*NDM-1. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 2472. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02472>
- Lee, J. G., Han, D. S., Jo, S. V., Lee, A. R., Park, C. H., Eun, C. S., & Lee, Y. (2019). Characteristics and pathogenic role of adherent-invasive *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease: Potential impact on clinical outcomes. *PloS One*,

14(4), e0216165. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216165>

- Leimbach, A., Hacker, J., & Dobrindt, U. (2013). E. coli as an All-Rounder: The Thin Line Between Commensalism and Pathogenicity. In *Current topics in microbiology and immunology* (Vol. 358, pp. 3–32). https://doi.org/10.1007/82_2012_303
- Letunic, I., & Bork, P. (2021). Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Research*, 49(W1), W293–W296. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab301>
- Li, M., Liu, Q., Teng, Y., Ou, L., Xi, Y., Chen, S., & Duan, G. (2019). The resistance mechanism of Escherichia coli induced by ampicillin in laboratory. *Infection and Drug Resistance*, Volume 12, 2853–2863. <https://doi.org/10.2147/IDR.S221212>
- Li, Y., Luo, Q., Shi, X., Lin, Y., Qiu, Y., Lv, D., Jiang, Y., Chen, Q., Jiang, M., Ma, H., Cheng, J., & Hu, Q. (2017). Phenotypic and Genotypic Characterization of Clinical Enterotoxigenic Escherichia coli Isolates from Shenzhen, China. *Foodborne Pathogens and Disease*, 14(6), 333–340. <https://doi.org/10.1089/fpd.2016.2233>
- Li, Y., Tang, M., Dai, X., Zhou, Y., Zhang, Z., Qiu, Y., Li, C., & Zhang, L. (2021). Whole-Genomic Analysis of NDM-5-Producing Enterobacteriaceae Recovered from an Urban River in China. *Infection and Drug Resistance*, Volume 14, 4427–4440. <https://doi.org/10.2147/IDR.S330787>
- Lindsey, R. L., Pouseele, H., Chen, J. C., Strockbine, N. A., & Carleton, H. A. (2016). Implementation of Whole Genome Sequencing (WGS) for Identification and Characterization of Shiga Toxin-Producing Escherichia coli (STEC) in the United States. *Frontiers in Microbiology*, 7, 766. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00766>
- Liu, B., Furevi, A., Perepelov, A. V, Guo, X., Cao, H., Wang, Q., Reeves, P. R., Knirel, Y. A., Wang, L., & Widmalm, G. (2020). Structure and genetics of Escherichia coli O antigens. *FEMS Microbiology Reviews*, 44(6), 655–683. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuz028>

- Livermore, D. M., Day, M., Cleary, P., Hopkins, K. L., Toleman, M. A., Wareham, D. W., Wiuff, C., Doumith, M., & Woodford, N. (2019). OXA-1 β -lactamase and non-susceptibility to penicillin/ β -lactamase inhibitor combinations among ESBL-producing *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *74*(2), 326–333. <https://doi.org/10.1093/jac/dky453>
- Llorente, M. T., Escudero, R., Ramiro, R., Remacha, M. A., Martínez-Ruiz, R., Galán-Sánchez, F., de Frutos, M., Elía, M., Onrubia, I., & Sánchez, S. (2023). Enteroaggregative *Escherichia coli* as etiological agent of endemic diarrhea in Spain: A prospective multicenter prevalence study with molecular characterization of isolates. *Frontiers in Microbiology*, *14*, 1120285. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1120285>
- Loras, C., González-Prieto, A., Pérez-Vázquez, M., Bautista, V., Ávila, A., Campoy, P. S., Oteo-Iglesias, J., & Alós, J.-I. (2021). Prevalence, detection and characterisation of fosfomycin-resistant *Escherichia coli* strains carrying *fosA* genes in Community of Madrid, Spain. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, *25*, 137–141. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2021.02.032>
- Luque-González, P., López-Cerero, L., Díaz-de-Alba, P., & Rodríguez-Martínez, J. M. (2019). Association of *bla*OXA-1, and *aac*(6')-Ib-cr with ST405 *K. pneumoniae* clone. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, *37*(6), 417–418. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2018.06.001>
- Ma, Y., Chen, J., Fong, K., Nadya, S., Allen, K., Laing, C., Ziebell, K., Topp, E., Carroll, L. M., Wiedmann, M., Delaquis, P., & Wang, S. (2021). Antibiotic Resistance in Shiga Toxigenic *Escherichia coli* Isolates from Surface Waters and Sediments in a Mixed Use Urban Agricultural Landscape. *Antibiotics*, *10*(3), 237. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10030237>
- Machado, E., Coque, T. M., Cantón, R., Baquero, F., Sousa, J. C., & Peixe, L. (2006). Dissemination in Portugal of CTX-M-15-, OXA-1-, and TEM-1-Producing Enterobacteriaceae Strains Containing the *aac*(6')-Ib-cr Gene, Which Encodes an Aminoglycoside- and Fluoroquinolone-Modifying Enzyme. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *50*(9), 3220–3221.

<https://doi.org/10.1128/AAC.00473-06>

Magaña-Lizárraga, J. A., Ahumada-Santos, Y. P., Parra-Unda, J. R., de Jesús Uribe-Beltrán, M., Vega-López, I. F., Prieto-Alvarado, R., & Báez-Flores, M. E. (2019). Draft genome sequence of *Escherichia coli* M51-3: a multidrug-resistant strain assigned as ST131-H30 recovered from infant diarrheal infection in Mexico. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, *19*, 311–312. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.10.030>

Magaña-Lizárraga, J. A., Ahumada-Santos, Y. P., Parra-Unda, J. R., Uribe-Beltrán, M. de J., Gómez-Gil, B., & Báez-Flores, M. E. (2018). Draft Genome Sequence of *Escherichia coli* Strain M15-4, a Typical Enteropathogenic *E. coli* Strain Isolated in Mexico. *Genome Announcements*, *6*(5). <https://doi.org/10.1128/genomeA.01522-17>

Magiorakos, A.-P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D. L., Rice, L. B., Stelling, J., Struelens, M. J., Vatopoulos, A., Weber, J. T., & Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, *18*(3), 268–281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>

Maiden, M. C. J., Bygraves, J. A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J. E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D. A., Feavers, I. M., Achtman, M., & Spratt, B. G. (1998). Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *95*(6), 3140–3145. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.6.3140>

Malberg Tetzschner, A. M., Johnson, J. R., Johnston, B. D., Lund, O., & Scheutz, F. (2020). In Silico Genotyping of *Escherichia coli* Isolates for Extraintestinal Virulence Genes by Use of Whole-Genome Sequencing Data. *Journal of Clinical Microbiology*, *58*(10). <https://doi.org/10.1128/JCM.01269-20>

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. *Clinical Microbiology Reviews*, 32(3). <https://doi.org/10.1128/CMR.00135-18>
- Marshall, B. M., & Levy, S. B. (2011). Food animals and antimicrobials: impacts on human health. *Clinical Microbiology Reviews*, 24(4), 718–733. <https://doi.org/10.1128/CMR.00002-11>
- Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.Journal*, 17(1), 10. <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>
- Matamoros, S., van Hattem, J. M., Arcilla, M. S., Willemsse, N., Melles, D. C., Penders, J., Vinh, T. N., Thi Hoa, N., Bootsma, M. C. J., van Genderen, P. J., Goorhuis, A., Grobusch, M., Molhoek, N., Oude Lashof, A. M. L., Stobberingh, E. E., Verbrugh, H. A., de Jong, M. D., & Schultsz, C. (2017). Global phylogenetic analysis of Escherichia coli and plasmids carrying the mcr-1 gene indicates bacterial diversity but plasmid restriction. *Scientific Reports*, 7(1), 15364. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15539-7>
- Matlashewski, G., Berghuis, A., Sheppard, D., Wainberg, M. A., & Gotte, M. (2017). *Handbook of Antimicrobial Resistance* (A. Berghuis, G. Matlashewski, M. A. Wainberg, & D. Sheppard (eds.)). Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0694-9>
- Mazumder, R., Hussain, A., Abdullah, A., Islam, M. N., Sadique, M. T., Muniruzzaman, S. M., Tabassum, A., Halim, F., Akter, N., Ahmed, D., & Mondal, D. (2021). International High-Risk Clones Among Extended-Spectrum β -Lactamase–Producing Escherichia coli in Dhaka, Bangladesh. *Frontiers in Microbiology*, 12, 736464. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.736464>
- McDougall, F. K., Boardman, W. S. J., & Power, M. L. (2021). Characterization of beta-lactam-resistant Escherichia coli from Australian fruit bats indicates anthropogenic origins. *Microbial Genomics*, 7(5). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000571>
- Medini, D., Donati, C., Tettelin, H., Massignani, V., & Rappuoli, R. (2005). The

- microbial pan-genome. *Current Opinion in Genetics & Development*, 15(6), 589–594. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2005.09.006>
- Mella M., S., Sepúlveda A., M., González R., G., Bello T., H., Domínguez Y., M., Zemelman Z., R., & Ramírez G., C. (2004). Aminoglucósidos-aminociclitolos: Características estructurales y nuevos aspectos sobre su resistencia. *Revista Chilena de Infectología*, 21(4), 330–338. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182004000400007>
- Mendonça, N., Louro, D., Castro, A. P., Diogo, J., & Caniça, M. (2006). CTX-M-15, OXA-30 and TEM-1-producing *Escherichia coli* in two Portuguese regions. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57(5), 1014–1016. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl062>
- Miajlovic, H., & Smith, S. G. (2014). Bacterial self-defence: how *Escherichia coli* evades serum killing. *FEMS Microbiology Letters*, 354(1), 1–9. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12419>
- Milner, K. A., Bay, D. C., Alexander, D., Walkty, A., Karlowsky, J. A., Mulvey, M. R., Sharma, M. K., & Zhanel, G. G. (2020). Identification and Characterization of a Novel FosA7 Member from Fosfomicin-Resistant *Escherichia coli* Clinical Isolates from Canadian Hospitals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 65(1). <https://doi.org/10.1128/AAC.00865-20>
- Miranda-Estrada, L. I., Ruíz-Rosas, M., Molina-López, J., Parra-Rojas, I., González-Villalobos, E., & Castro-Alarcón, N. (2017). Relación entre factores de virulencia, resistencia a antibióticos y los grupos filogenéticos de *Escherichia coli* uropatógena en dos localidades de México. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 35(7), 426–433. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2016.02.021>
- Mittal, R., Krishnan, S., Gonzalez-Gomez, I., & Prasadarao, N. V. (2011). Deciphering the Roles of Outer Membrane Protein A Extracellular Loops in the Pathogenesis of *Escherichia coli* K1 Meningitis. *Journal of Biological Chemistry*, 286(3), 2183–2193. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.178236>
- Monte, D. F., Sellera, F. P., Fernandes, M. R., Moura, Q., Landgraf, M., & Lincopan,

- N. (2019). Genome Sequencing of an Escherichia coli Sequence Type 617 Strain Isolated from Beach Ghost Shrimp (*Callichirus major*) from a Heavily Polluted Ecosystem Reveals a Wider Resistome against Heavy Metals and Antibiotics. *Microbiology Resource Announcements*, 8(3). <https://doi.org/10.1128/MRA.01471-18>
- Montenegro, M. A., Bitter-Suermann, D., Timmis, J. K., Agüero, M. E., Cabello, F. C., Sanyal, S. C., & Timmis, K. N. (1985). traT Gene Sequences, Serum Resistance and Pathogenicity-related Factors in Clinical Isolates of Escherichia coli and Other Gram-negative Bacteria. *Microbiology*, 131(6), 1511–1521. <https://doi.org/10.1099/00221287-131-6-1511>
- Moran, R. A., Holt, K. E., & Hall, R. M. (2016). pCERC3 from a commensal ST95 Escherichia coli: A ColV virulence-multiresistance plasmid carrying a sul3-associated class 1 integron. *Plasmid*, 84–85, 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2016.02.002>
- Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology Spectrum*, 4(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015>
- Murillo Llanes, J., Varon, J., Velarde Félix, J. S., & González-Ibarra, F. P. (2011). Antimicrobial resistance of Escherichia coli in Mexico: How serious is the problem? *The Journal of Infection in Developing Countries*, 6(02), 126–131. <https://doi.org/10.3855/jidc.1525>
- Nash, J. H., Villegas, A., Kropinski, A. M., Aguilar-Valenzuela, R., Konczyk, P., Mascarenhas, M., Ziebell, K., Torres, A. G., Karmali, M. A., & Coombes, B. K. (2010). Genome sequence of adherent-invasive Escherichia coli and comparative genomic analysis with other E. coli pathotypes. *BMC Genomics*, 11(1), 667. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-667>
- Nataro, J. P., & Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic Escherichia coli. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(1), 142–201. <https://doi.org/10.1128/CMR.11.1.142>
- Nishino, K., Yamada, J., Hirakawa, H., Hirata, T., & Yamaguchi, A. (2003). Roles of

- TolC-Dependent Multidrug Transporters of *Escherichia coli* in Resistance to β -Lactams. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(9), 3030–3033. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.9.3030-3033.2003>
- Nji, E., Kazibwe, J., Hambridge, T., Joko, C. A., Larbi, A. A., Dampsey, L. A. O., Nkansa-Gyamfi, N. A., Stålsby Lundborg, C., & Lien, L. T. Q. (2021). High prevalence of antibiotic resistance in commensal *Escherichia coli* from healthy human sources in community settings. *Scientific Reports*, 11(1), 3372. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82693-4>
- Okhuysen, P. C., & Dupont, H. L. (2010). Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC): a cause of acute and persistent diarrhea of worldwide importance. *The Journal of Infectious Diseases*, 202(4), 503–505. <https://doi.org/10.1086/654895>
- Osek, J. (2003). Detection of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1) gene and its relationship with fimbrial and enterotoxin markers in *E. coli* isolates from pigs with diarrhoea. *Veterinary Microbiology*, 91(1), 65–72. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00262-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00262-6)
- Pakbin, B., Brück, W. M., & Rossen, J. W. A. (2021). Virulence Factors of Enteric Pathogenic *Escherichia coli*: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(18), 9922. <https://doi.org/10.3390/ijms22189922>
- Pan, Y., Hu, B., Bai, X., Yang, X., Cao, L., Liu, Q., Sun, H., Li, J., Zhang, J., Jin, D., & Xiong, Y. (2021). Antimicrobial Resistance of Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolated from Humans and Domestic Animals. *Antibiotics*, 10(1), 74. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10010074>
- Paramita, R. I., Nelwan, E. J., Fadilah, F., Renesteen, E., Puspandari, N., & Erlina, L. (2020). Genome-based characterization of *Escherichia coli* causing bloodstream infection through next-generation sequencing. *PLOS ONE*, 15(12), e0244358. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244358>
- Paterson, D. L., & Bonomo, R. A. (2005). Extended-Spectrum β -Lactamases: a Clinical Update. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(4), 657–686. <https://doi.org/10.1128/CMR.18.4.657-686.2005>

- Pattishall, K. H., Acar, J., Burchall, J. J., Goldstein, F. W., & Harvey, R. J. (1977). Two distinct types of trimethoprim-resistant dihydrofolate reductase specified by R-plasmids of different compatibility groups. *The Journal of Biological Chemistry*, 252(7), 2319–2323. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14961>
- Peirano, G., Chen, L., Nobrega, D., Finn, T. J., Kreiswirth, B. N., DeVinney, R., & Pitout, J. D. D. (2022). Genomic Epidemiology of Global Carbapenemase-Producing *Escherichia coli*, 2015–2017. *Emerging Infectious Diseases*, 28(5), 924–931. <https://doi.org/10.3201/eid2805.212535>
- Perna, N. T., Plunkett, G., Burland, V., Mau, B., Glasner, J. D., Rose, D. J., Mayhew, G. F., Evans, P. S., Gregor, J., Kirkpatrick, H. A., Pósfai, G., Hackett, J., Klink, S., Boutin, A., Shao, Y., Miller, L., Grotbeck, E. J., Davis, N. W., Lim, A., ... Blattner, F. R. (2001). Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature*, 409(6819), 529–533. <https://doi.org/10.1038/35054089>
- Pesesky, M. W., Tilley, R., & Beck, D. A. C. (2019). Mosaic plasmids are abundant and unevenly distributed across prokaryotic taxa. *Plasmid*, 102, 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2019.02.003>
- Pormohammad, A., Nasiri, M. J., & Azimi, T. (2019). Prevalence of antibiotic resistance in *Escherichia coli* strains simultaneously isolated from humans, animals, food, and the environment: a systematic review and meta-analysis. *Infection and Drug Resistance*, Volume 12, 1181–1197. <https://doi.org/10.2147/IDR.S201324>
- Prestinaci, F., Pezzotti, P., & Pantosti, A. (2015). Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. *Pathogens and Global Health*, 109(7), 309–318. <https://doi.org/10.1179/2047773215Y.0000000030>
- Ramirez, M. S., & Tolmasky, M. E. (2010). Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resistance Updates*, 13(6), 151–171. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2010.08.003>
- Ranjan, A., Shaik, S., Nandanwar, N., Hussain, A., Tiwari, S. K., Semmler, T., Jadhav, S., Wieler, L. H., Alam, M., Colwell, R. R., & Ahmed, N. (2017). Comparative Genomics of *Escherichia coli* Isolated from Skin and Soft Tissue

and Other Extraintestinal Infections. *MBio*, 8(4).
<https://doi.org/10.1128/mBio.01070-17>

RAR. (2014). *Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations*. [https://amr-review.org/sites/default/files/AMR Review Paper - Tackling a crisis for the health and wealth of nations_1.pdf](https://amr-review.org/sites/default/files/AMR%20Review%20Paper%20-%20Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of%20nations_1.pdf)

Rasko, D. A., Del Canto, F., Luo, Q., Fleckenstein, J. M., Vidal, R., & Hazen, T. H. (2019). Comparative genomic analysis and molecular examination of the diversity of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolates from Chile. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 13(11), e0007828.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007828>

Rasko, D. A., Rosovitz, M. J., Myers, G. S. A., Mongodin, E. F., Fricke, W. F., Gajer, P., Crabtree, J., Sebaihia, M., Thomson, N. R., Chaudhuri, R., Henderson, I. R., Sperandio, V., & Ravel, J. (2008). The Pangenome Structure of *Escherichia coli*: Comparative Genomic Analysis of *E. coli* Commensal and Pathogenic Isolates. *Journal of Bacteriology*, 190(20), 6881–6893. <https://doi.org/10.1128/JB.00619-08>

Redgrave, L. S., Sutton, S. B., Webber, M. A., & Piddock, L. J. V. (2014). Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Trends in Microbiology*, 22(8), 438–445.
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.04.007>

Rehman, M. A., Yin, X., Persaud-Lachhman, M. G., & Diarra, M. S. (2017). First Detection of a Fosfomycin Resistance Gene, *fosA7*, in *Salmonella enterica* Serovar Heidelberg Isolated from Broiler Chickens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(8). <https://doi.org/10.1128/AAC.00410-17>

Rocha-Gracia, R. C., Cortés-Cortés, G., Lozano-Zarain, P., Bello, F., Martínez-Laguna, Y., & Torres, C. (2015). Faecal *Escherichia coli* isolates from healthy dogs harbour CTX-M-15 and CMY-2 β -lactamases. *The Veterinary Journal*, 203(3), 315–319. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.12.026>

Rodas, C., Klena, J. D., Nicklasson, M., Iniguez, V., & Sjöling, Å. (2011). Clonal

- Relatedness of Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) Strains Expressing LT and CS17 Isolated from Children with Diarrhoea in La Paz, Bolivia. *PLoS ONE*, 6(11), e18313. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018313>
- Rodríguez-Angeles, G. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pública de México*, 44(5), 464–475. <https://doi.org/10.1590/S0036-36342002000500011>
- Rodríguez-Santiago, B., & Armengol, L. (2012). Tecnologías de secuenciación de nueva generación en diagnóstico genético pre- y postnatal. *Diagnostico Prenatal*. <https://doi.org/10.1016/j.diapre.2012.02.001>
- Roer, L., Overballe-Petersen, S., Hansen, F., Schønning, K., Wang, M., Røder, B. L., Hansen, D. S., Justesen, U. S., Andersen, L. P., Fulgsang-Damgaard, D., Hopkins, K. L., Woodford, N., Falgenhauer, L., Chakraborty, T., Samuelsen, Ø., Sjöström, K., Johannesen, T. B., Ng, K., Nielsen, J., ... Hasman, H. (2018). *Escherichia coli* Sequence Type 410 Is Causing New International High-Risk Clones. *MSphere*, 3(4). <https://doi.org/10.1128/mSphere.00337-18>
- Rozwandowicz, M., Brouwer, M. S. M., Fischer, J., Wagenaar, J. A., Gonzalez-Zorn, B., Guerra, B., Mevius, D. J., & Hordijk, J. (2018). Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in Enterobacteriaceae. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(5), 1121–1137. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx488>
- Ruan, X., Crupper, S. S., Schultz, B. D., Robertson, D. C., & Zhang, W. (2012). *Escherichia coli* Expressing EAST1 Toxin Did Not Cause an Increase of cAMP or cGMP Levels in Cells, and No Diarrhea in 5-Day Old Gnotobiotic Pigs. *PLoS ONE*, 7(8), e43203. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043203>
- Rubio, S., Pacheco-Orozco, R. A., Gómez, A. M., Perdomo, S., & García-Robles, R. (2020). Secuenciación de nueva generación (NGS) de ADN: presente y futuro en la práctica clínica. *Universitas Médica*, 61(2). <https://doi.org/10.11144/Javeriana.umed61-2.sngs>
- Runcharoen, C., Raven, K. E., Reuter, S., Kallonen, T., Paksanont, S., Thammachote, J., Anun, S., Blane, B., Parkhill, J., Peacock, S. J., & Chantratita,

- N. (2017). Whole genome sequencing of ESBL-producing *Escherichia coli* isolated from patients, farm waste and canals in Thailand. *Genome Medicine*, 9(1), 81. <https://doi.org/10.1186/s13073-017-0471-8>
- Russo, T. A., & Johnson, J. R. (2000). Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *The Journal of Infectious Diseases*, 181(5), 1753–1754. <https://doi.org/10.1086/315418>
- Sabença, C., Igrejas, G., Poeta, P., Robin, F., Bonnet, R., & Beyrouthy, R. (2021). Multidrug Resistance Dissemination in *Escherichia coli* Isolated from Wild Animals: Bacterial Clones and Plasmid Complicity. *Microbiology Research*, 12(1), 123–137. <https://doi.org/10.3390/microbiolres12010009>
- Sadek, M., Ortiz de la Rosa, J. M., Abdelfattah Maky, M., Korashe Dandrawy, M., Nordmann, P., & Poirel, L. (2021). Genomic Features of MCR-1 and Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing Enterobacterales from Retail Raw Chicken in Egypt. *Microorganisms*, 9(1), 195. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010195>
- Saidenberg, A. B. S., van Vliet, A. H. M., Brandão, P. E., de Sá, L. R. M., Cunha, M. P. V., La Ragione, R. M., & Knöbl, T. (2020). Genomic characterization of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) of avian origin and rabbit ileal loop response; a pet macaw (*Ara chloropterus*) as a possible zoonotic reservoir. *Veterinary Quarterly*, 40(1), 331–341. <https://doi.org/10.1080/01652176.2020.1845916>
- Sajeev, S., Hamza, M., Rajan, V., Vijayan, A., Sivaraman, G. K., Shome, B. R., & Holmes, M. A. (2023). Resistance profiles and genotyping of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) -producing and non-ESBL-producing *E. coli* and *Klebsiella* from retail market fishes. *Infection, Genetics and Evolution*, 112, 105446. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2023.105446>
- Saldaña-Ahuactzi, Z., Cruz-Córdova, A., Rodea, G. E., Porta, H., Navarro-Ocaña, A., Eslava-Campos, C., Cevallos, M. A., & Xicohtencatl-Cortes, J. (2017). Genome Sequence of Enterotoxigenic *Escherichia coli* Strain FMU073332. *Genome Announcements*, 5(8). <https://doi.org/10.1128/genomeA.01600-16>

- Salinas, L., Cárdenas, P., Johnson, T. J., Vasco, K., Graham, J., & Trueba, G. (2019). Diverse Commensal *Escherichia coli* Clones and Plasmids Disseminate Antimicrobial Resistance Genes in Domestic Animals and Children in a Semirural Community in Ecuador. *MSphere*, 4(3). <https://doi.org/10.1128/mSphere.00316-19>
- Santos, A. C. de M., Santos, F. F., Silva, R. M., & Gomes, T. A. T. (2020). Diversity of Hybrid- and Hetero-Pathogenic *Escherichia coli* and Their Potential Implication in More Severe Diseases. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 339. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00339>
- Sarkar, S., Ulett, G. C., Totsika, M., Phan, M.-D., & Schembri, M. A. (2014). Role of Capsule and O Antigen in the Virulence of Uropathogenic *Escherichia coli*. *PLoS ONE*, 9(4), e94786. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094786>
- 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 Pathogens*, 11(1), 10. <https://doi.org/10.1186/s13099-019-0290-0>
- Sarwar, F., Rasool, M. H., Khurshid, M., Qamar, M. U., & Aslam, B. (2022). *Escherichia coli* Isolates Harboring bla NDM Variants and 16S Methylases Belonging to Clonal Complex 131 in Southern Punjab, Pakistan. *Microbial Drug Resistance*, 28(6), 623–635. <https://doi.org/10.1089/mdr.2021.0315>
- Sato, M. P., Ogura, Y., Nakamura, K., Nishida, R., Gotoh, Y., Hayashi, M., Hisatsune, J., Sugai, M., Takehiko, I., & Hayashi, T. (2019). Comparison of the sequencing bias of currently available library preparation kits for Illumina sequencing of bacterial genomes and metagenomes. *DNA Research*, 26(5), 391–398. <https://doi.org/10.1093/dnares/dsz017>
- Sato, T., Yokota, S., Okubo, T., Ishihara, K., Ueno, H., Muramatsu, Y., Fujii, N., & Tamura, Y. (2013). Contribution of the AcrAB-TolC efflux pump to high-level fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* isolated from dogs and humans. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 75(4), 407–414.

<https://doi.org/10.1292/jvms.12-0186>

- Schaufler, K., Semmler, T., Wieler, L. H., Wöhrmann, M., Baddam, R., Ahmed, N., Müller, K., Kola, A., Fruth, A., Ewers, C., & Guenther, S. (2016). Clonal spread and interspecies transmission of clinically relevant ESBL-producing *Escherichia coli* of ST410—another successful pandemic clone? *FEMS Microbiology Ecology*, *92*(1), fiv155. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiv155>
- Servin, A. L. (2014). Pathogenesis of Human Diffusely Adhering *Escherichia coli* Expressing Afa/Dr Adhesins (Afa/Dr DAEC): Current Insights and Future Challenges. *Clinical Microbiology Reviews*, *27*(4), 823–869. <https://doi.org/10.1128/CMR.00036-14>
- Seth-Smith, H. M. B., Bonfiglio, F., Cuénod, A., Reist, J., Egli, A., & Wüthrich, D. (2019). Evaluation of Rapid Library Preparation Protocols for Whole Genome Sequencing Based Outbreak Investigation. *Frontiers in Public Health*, *7*, 241. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2019.00241>
- Shendure, J., & Ji, H. (2008). Next-generation DNA sequencing. *Nature Biotechnology*, *26*(10), 1135–1145. <https://doi.org/10.1038/nbt1486>
- Sheu, C.-C., Chang, Y.-T., Lin, S.-Y., Chen, Y.-H., & Hsueh, P.-R. (2019). Infections Caused by Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae: An Update on Therapeutic Options. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 80. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00080>
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J. D., & Higgins, D. G. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology*, *7*(1), 539. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.75>
- Silva, A., Silva, V., Pereira, J. E., Maltez, L., Igrejas, G., Valentão, P., Falco, V., & Poeta, P. (2023). Antimicrobial Resistance and Clonal Lineages of *Escherichia coli* from Food-Producing Animals. *Antibiotics*, *12*(6), 1061. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12061061>

- Silva, L. E., Souza, T. B., Silva, N. P., & Scaletsky, I. C. (2014). Detection and genetic analysis of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin (EAST1) gene in clinical isolates of enteropathogenic *Escherichia coli*(EPEC) strains. *BMC Microbiology*, *14*(1), 135. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-135>
- Silver, L. L. (2017). Fosfomycin: Mechanism and Resistance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *7*(2), a025262. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025262>
- Sims, D., Sudbery, I., Illott, N. E., Heger, A., & Ponting, C. P. (2014). Sequencing depth and coverage: key considerations in genomic analyses. *Nature Reviews Genetics*, *15*(2), 121–132. <https://doi.org/10.1038/nrg3642>
- Sonda, T., Kumburu, H., van Zwetselaar, M., Alifrangis, M., Mmbaga, B. T., Aarestrup, F. M., Kibiki, G., & Lund, O. (2018). Whole genome sequencing reveals high clonal diversity of *Escherichia coli* isolated from patients in a tertiary care hospital in Moshi, Tanzania. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, *7*(1), 72. <https://doi.org/10.1186/s13756-018-0361-x>
- Stockwell, V. O., & Duffy, B. (2012). Use of antibiotics in plant agriculture. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, *31*(1), 199–210. <https://doi.org/10.20506/rst.31.1.2104>
- Stoesser, N., Sheppard, A. E., Pankhurst, L., De Maio, N., Moore, C. E., Sebra, R., Turner, P., Anson, L. W., Kasarskis, A., Batty, E. M., Kos, V., Wilson, D. J., Phetsouvanh, R., Wyllie, D., Sokurenko, E., Manges, A. R., Johnson, T. J., Price, L. B., Peto, T. E. A., ... Crook, D. W. (2016). Evolutionary History of the Global Emergence of the *Escherichia coli* Epidemic Clone ST131. *MBio*, *7*(2), e02162. <https://doi.org/10.1128/mBio.02162-15>
- Sun, L., Xu, J., & He, F. (2018). Draft genome sequence of an NDM-5, CTX-M-15 and OXA-1 co-producing *Escherichia coli* ST167 clinical strain isolated from a urine sample. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, *14*, 284–286. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2018.08.005>
- Tacconelli, E., Magrini, N., Kahlmeter, G., & Singh, N. (2017). Global priority list of

antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. *World Health Organization*, 27, 318–327.

- Terlizzi, M. E., Gribaudo, G., & Maffei, M. E. (2017). UroPathogenic Escherichia coli (UPEC) Infections: Virulence Factors, Bladder Responses, Antibiotic, and Non-antibiotic Antimicrobial Strategies. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1566. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01566>
- Thomassin, J.-L., Brannon, J. R., Gibbs, B. F., Gruenheid, S., & Le Moual, H. (2012). OmpT Outer Membrane Proteases of Enterohemorrhagic and Enteropathogenic Escherichia coli Contribute Differently to the Degradation of Human LL-37. *Infection and Immunity*, 80(2), 483–492. <https://doi.org/10.1128/IAI.05674-11>
- Tiseo, K., Huber, L., Gilbert, M., Robinson, T. P., & Van Boeckel, T. P. (2020). Global Trends in Antimicrobial Use in Food Animals from 2017 to 2030. *Antibiotics*, 9(12), 918. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9120918>
- Tooke, C. L., Hinchliffe, P., Bragginton, E. C., Colenso, C. K., Hirvonen, V. H. A., Takebayashi, Y., & Spencer, J. (2019). β -Lactamases and β -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. *Journal of Molecular Biology*, 431(18), 3472–3500. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.04.002>
- Touchon, M., Hoede, C., Tenailon, O., Barbe, V., Baeriswyl, S., Bidet, P., Bingen, E., Bonacorsi, S., Bouchier, C., Bouvet, O., Calteau, A., Chiapello, H., Clermont, O., Cruveiller, S., Danchin, A., Diard, M., Dossat, C., Karoui, M. El, Frapy, E., ... Denamur, E. (2009). Organised Genome Dynamics in the Escherichia coli Species Results in Highly Diverse Adaptive Paths. *PLoS Genetics*, 5(1), e1000344. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000344>
- Touchon, M., Perrin, A., de Sousa, J. A. M., Vangchhia, B., Burn, S., O'Brien, C. L., Denamur, E., Gordon, D., & Rocha, E. P. (2020). Phylogenetic background and habitat drive the genetic diversification of Escherichia coli. *PLOS Genetics*, 16(6), e1008866. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008866>
- Trabulsi, L. R., Keller, R., & Tardelli Gomes, T. A. (2002). Typical and atypical enteropathogenic Escherichia coli. *Emerging Infectious Diseases*, 8(5), 508–513.

<https://doi.org/10.3201/eid0805.010385>

- Umene, Y. D., Wong, L. K., Satoh, T., Yamane, K., Matsui, M., Riley, L. W., Arakawa, Y., & Suzuki, S. (2015). Molecular Epidemiological Characterization of Uropathogenic *Escherichia coli* from an Outpatient Urology Clinic in Rural Japan. *Journal of Clinical Microbiology*, *53*(2), 681–683. <https://doi.org/10.1128/JCM.03068-14>
- Uribe-Beltrán, M. de J., Ahumada-Santos, Y. P., Díaz-Camacho, S. P., Eslava-Campos, C. A., Reyes-Valenzuela, J. E., Báez-Flores, M. E., Osuna-Ramírez, I., & Delgado-Vargas, F. (2017). High prevalence of multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates from children with and without diarrhoea and their susceptibility to the antibacterial activity of extracts/fractions of fruits native to Mexico. *Journal of Medical Microbiology*, *66*(7), 972–980. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000548>
- Valat, C., Auvray, F., Forest, K., Métayer, V., Gay, E., Peytavin de Garam, C., Madec, J.-Y., & Haenni, M. (2012). Phylogenetic Grouping and Virulence Potential of Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* Strains in Cattle. *Applied and Environmental Microbiology*, *78*(13), 4677–4682. <https://doi.org/10.1128/AEM.00351-12>
- van der Putten, B. C. L., Remondini, D., Pasquini, G., Janes, V. A., Matamoros, S., & Schultsz, C. (2019). Quantifying the contribution of four resistance mechanisms to ciprofloxacin MIC in *Escherichia coli*: a systematic review. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *74*(2), 298–310. <https://doi.org/10.1093/jac/dky417>
- van Duijkeren, E., Schink, A.-K., Roberts, M. C., Wang, Y., & Schwarz, S. (2018). Mechanisms of Bacterial Resistance to Antimicrobial Agents. In *Antimicrobial Resistance in Bacteria from Livestock and Companion Animals* (Vol. 6, Issue 1, pp. 51–82). American Society of Microbiology. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0019-2017>
- van Elsas, J. D., Semenov, A. V., Costa, R., & Trevors, J. T. (2011). Survival of *Escherichia coli* in the environment: fundamental and public health aspects. *The ISME Journal*, *5*(2), 173–183. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.80>

- Vidal, J. E., Canizález-Román, A., Gutiérrez-Jiménez, J., & Navarro-García, F. (2007). Molecular pathogenesis, epidemiology and diagnosis of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Salud Publica de Mexico*, *49*(5), 376–386. <https://doi.org/10.1590/s0036-36342007000500008>
- Villa, L., García-Fernández, A., Fortini, D., & Carattoli, A. (2010). Replicon sequence typing of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *65*(12), 2518–2529. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq347>
- von Wintersdorff, C. J. H., Penders, J., van Niekerk, J. M., Mills, N. D., Majumder, S., van Alphen, L. B., Savelkoul, P. H. M., & Wolffs, P. F. G. (2016). Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer. *Frontiers in Microbiology*, *7*, 173. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00173>
- Wang, S., Zhao, S., Zhou, Y., Jin, S., Ye, T., & Pan, X. (2023). Antibiotic resistance spectrum of *E. coli* strains from different samples and age-grouped patients: a 10-year retrospective study. *BMJ Open*, *13*(4), e067490. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2022-067490>
- Watson, V. E., Hazen, T. H., Rasko, D. A., Jacob, M. E., Elfenbein, J. R., Stauffer, S. H., & Gookin, J. L. (2021). Comparative Genomics of Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* from Kittens and Children Identifies Bacterial Factors Associated with Virulence in Kittens. *Infection and Immunity*, *89*(3). <https://doi.org/10.1128/IAI.00619-20>
- Wawire, S. A., Reva, O. N., O'Brien, T. J., Figueroa, W., Dinda, V., Shivoga, W. A., & Welch, M. (2021). Virulence and antimicrobial resistance genes are enriched in the plasmidome of clinical *Escherichia coli* isolates compared with wastewater isolates from western Kenya. *Infection, Genetics and Evolution*, *91*, 104784. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.104784>
- WHO. (2014). Antimicrobial resistance: global report on surveillance. In *World Health Organization*. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/112642>

- WHO. (2020). Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS) Report: early implementation 2020. In *World Health Organization*. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/332081>
- Wiles, T. J., Kulesus, R. R., & Mulvey, M. A. (2008). Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Experimental and Molecular Pathology*, *85*(1), 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2008.03.007>
- Wirth, T., Falush, D., Lan, R., Colles, F., Mensa, P., Wieler, L. H., Karch, H., Reeves, P. R., Maiden, M. C. J., Ochman, H., & Achtman, M. (2006). Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Molecular Microbiology*, *60*(5), 1136–1151. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05172.x>
- Xu, Y., Bai, X., Jin, Y., Hu, B., Wang, H., Sun, H., Fan, R., Fu, S., & Xiong, Y. (2017). High Prevalence of Virulence Genes in Specific Genotypes of Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *7*, 109. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00109>
- Yamamoto, T., & Echeverria, P. (1996). Detection of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 gene sequences in enterotoxigenic *E. coli* strains pathogenic for humans. *Infection and Immunity*, *64*(4), 1441–1445. <https://doi.org/10.1128/iai.64.4.1441-1445.1996>
- Yang, J., Ye, L., Wang, W., Luo, Y., Zhang, Y., & Han, L. (2011). Diverse prevalence of 16S rRNA methylase genes *armA* and *rmtB* amongst clinical multidrug-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *38*(4), 348–351. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.04.021>
- Yang, Z.-K., Luo, H., Zhang, Y., Wang, B., & Gao, F. (2019). Pan-genomic analysis provides novel insights into the association of *E. coli* with human host and its minimal genome. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *35*(12), 1987–1991. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty938>
- Yasir, M., Farman, M., Shah, M. W., Jiman-Fatani, A. A., Othman, N. A., Almasaudi, S. B., Alawi, M., Shakil, S., Al-Abdullah, N., Ismaeel, N. A., & Azhar, E. I. (2020).

- Genomic and antimicrobial resistance genes diversity in multidrug-resistant CTX-M-positive isolates of *Escherichia coli* at a health care facility in Jeddah. *Journal of Infection and Public Health*, 13(1), 94–100. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2019.06.011>
- Yu, D., Banting, G., & Neumann, N. F. (2021). A review of the taxonomy, genetics, and biology of the genus *Escherichia* and the type species *Escherichia coli*. *Canadian Journal of Microbiology*, 67(8), 553–571. <https://doi.org/10.1139/cjm-2020-0508>
- Yu, F., Chen, X., Zheng, S., Han, D., Wang, Y., Wang, R., Wang, B., & Chen, Y. (2018). Prevalence and genetic diversity of human diarrheagenic *Escherichia coli* isolates by multilocus sequence typing. *International Journal of Infectious Diseases*, 67, 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2017.11.025>
- Zajacova, Z. S., Konstantinova, L., & Alexa, P. (2012). Detection of virulence factors of *Escherichia coli* focused on prevalence of EAST1 toxin in stool of diarrheic and non-diarrheic piglets and presence of adhesion involving virulence factors in astA positive strains. *Veterinary Microbiology*, 154(3–4), 369–375. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.07.029>
- Zankari, E., Allesøe, R., Joensen, K. G., Cavaco, L. M., Lund, O., & Aarestrup, F. M. (2017). PointFinder: a novel web tool for WGS-based detection of antimicrobial resistance associated with chromosomal point mutations in bacterial pathogens. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(10), 2764–2768. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx217>
- Zhang, C., Feng, Y., Liu, F., Jiang, H., Qu, Z., Lei, M., Wang, J., Zhang, B., Hu, Y., Ding, J., & Zhu, B. (2017). A Phage-Like IncY Plasmid Carrying the mcr-1 Gene in *Escherichia coli* from a Pig Farm in China. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(3). <https://doi.org/10.1128/AAC.02035-16>
- Zhang, L.-J., Yang, J.-T., Chen, H.-X., Liu, W.-Z., Ding, Y.-L., Chen, R.-A., Zhang, R.-M., & Jiang, H.-X. (2023). F18:A-B1 Plasmids Carrying blaCTX-M-55 Are Prevalent among *Escherichia coli* Isolated from Duck–Fish Polyculture Farms. *Antibiotics*, 12(6), 961. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12060961>

- Zhang, X., Ma, M., Cheng, Y., Huang, Y., Tan, Y., Yang, Y., Qian, Y., Zhong, X., Lu, Y., & Si, H. (2022). Spread and Molecular Characteristics of Enterobacteriaceae Carrying fosA -Like Genes from Farms in China. *Microbiology Spectrum*, 10(4), e0054522. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00545-22>
- Zhou, Z., Alikhan, N.-F., Mohamed, K., Fan, Y., & Achtman, M. (2020). The EnteroBase user's guide, with case studies on Salmonella transmissions, Yersinia pestis phylogeny, and Escherichia core genomic diversity. *Genome Research*, 30(1), 138–152. <https://doi.org/10.1101/gr.251678.119>
- Zhou, Z., Alikhan, N.-F., Sergeant, M. J., Luhmann, N., Vaz, C., Francisco, A. P., Carriço, J. A., & Achtman, M. (2018). GrapeTree: visualization of core genomic relationships among 100,000 bacterial pathogens. *Genome Research*, 28(9), 1395–1404. <https://doi.org/10.1101/gr.232397.117>
- Zingali, T., Chapman, T. A., Webster, J., Roy Chowdhury, P., & Djordjevic, S. P. (2020). Genomic Characterisation of a Multiple Drug Resistant IncHI2 ST4 Plasmid in Escherichia coli ST744 in Australia. *Microorganisms*, 8(6), 896. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8060896>
- Zingali, T., Reid, C. J., Chapman, T. A., Gaio, D., Liu, M., Darling, A. E., & Djordjevic, S. P. (2020). Whole Genome Sequencing Analysis of Porcine Faecal Commensal Escherichia coli Carrying Class 1 Integrons from Sows and Their Offspring. *Microorganisms*, 8(6), 843. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8060843>
- Zong, Z., Fenn, S., Connor, C., Feng, Y., & McNally, A. (2018). Complete genomic characterization of two Escherichia coli lineages responsible for a cluster of carbapenem-resistant infections in a Chinese hospital. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(9), 2340–2346. <https://doi.org/10.1093/jac/dky210>

XIV. ANEXOS

14.1. Documentos complementarios

14.1.1. Datos de secuenciación genomas de *E. coli* de origen ambiental, animal y clínico asociados al BioProject PRJNA715781 del NCBI.

Aislado de <i>E. coli</i>	Origen	No. acceso BioSample	No. acceso SRA^a	No. acceso Assembly
CCDC44-3	Clínico	SAMN18352689	SRR14018341	GCA_033843345.1
FD20-2	Clínico	SAMN18352690	SRR14018340	GCA_033843445.1
FD21-2	Clínico	SAMN18352691	SRR14018339	GCA_033843405.1
RUTI01	Clínico	SAMN18352692	SRR14018338	GCA_033843385.1
RBR72	Clínico	SAMN30247024	SRR21010778	GCA_033843425.1
RBR95	Clínico	SAMN30247025	SRR21010777	GCA_033843465.1
U13824	Clínico	SAMN30247026	SRR21010776	GCA_033843365.1
ADD105	Ambiental	SAMN30247030	SRR21010773	GCA_033843565.1
ADD147	Ambiental	SAMN18352997	SRR14018337	GCA_033843545.1
ADD167	Ambiental	SAMN18352998	SRR14018336	GCA_033843585.1
ADD169	Ambiental	SAMN30247031	SRR21010772	GCA_033843625.1
ADD183	Ambiental	SAMN18352999	SRR14018335	GCA_033843605.1
ACM5	Animal	SAMN18353000	SRR14018334	GCA_033843485.1
ACM22	Animal	SAMN30247028	SRR21010775	GCA_033843505.1
ACM47	Animal	SAMN30247029	SRR21010774	GCA_033843525.1

^aSRA, Base de datos *Sequence Read Archive*.

14.2. Productos Académicos

De la presente tesis doctoral se derivaron los siguientes trabajos en modalidad cartel presentados dentro de los congresos nacionales e internacionales:



Báez-Flores M.E., **Magaña-Lizárraga A.**, Valenzuela-Armenta A., Gómez-Gil B, Díaz-Camacho S.P., Rendón-Maldonado G., Vega-López I.F., Prieto-Alvarado R., Gracia-Valenzuela M.H., Delgado-Vargas F. Análisis microbiológico en el cultivo de la tilapia *Oreochromis* spp. en el Estado de Sinaloa, México y uso de herramientas NGS para la caracterización genómica de cepas bacterianas recobradas en granjas acuícolas. San José, Costa rica, 19-22 de octubre de 2019.



ASOCIACIÓN MEXICANA DE MICROBIOLOGÍA
1949-2019 - 70 ANIVERSARIO



BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE BACTERIAS
SOCIEDAD MEXICANA DE BIOQUÍMICA

Se otorga la presente

CONSTANCIA a:

José Antonio Magaña Lizárraga

Quien asistió y presentó el trabajo:

Genome sequencing of two environmental *Escherichia coli* strains from agricultural drainage ditch water in Sinaloa, Mexico

por:

José Antonio Magaña-Lizárraga, Jesús Ricardo Parra-Unda, Inés Fernando Vega-López,
Francisco Delgado-Vargas, Bruno Gómez-Gil, María Elena Báez-Flores

En la modalidad de cartel durante el

VI Congreso de Bioquímica y Biología Molecular de Bacterias y XLI Congreso Nacional de Microbiología
27 – 31 de octubre de 2019 en la ciudad de Oaxaca, Oax.

Alentamente
Por el Comité Organizador

Dr. José Luis Puente García

Dra. María de Lourdes Girard Cuesy



Magaña-Lizárraga J.A., Parra-Unda J.R., Vega-López I.F., Delgado-Vargas F., Gómez-Gil B., Báez-Flores M.E. Genome sequencing of two environmental *Escherichia coli* strains from agricultural drainage ditch water in Sinaloa, Mexico. VI Congreso de Bioquímica y Biología Molecular de Bacterias; XLI Congreso Nacional de Microbiología, Ciudad de Oaxaca, Oaxaca, México, 27-31 de octubre de 2019.



Saint Petersburg
State University
www.spbu.ru

BiATA 2020 Organizing Committee
Center for Algorithmic Biotechnology,
Saint Petersburg State University,
6 Liniya V.O., 11
199004 Saint Petersburg, Russia
biata@spbu.ru
<http://biata2020.spbu.ru>

31 August 2020

To whom it may concern,

This is to certify that José Antonio Magaña Lizárraga participated in BiATA 2020 conference that was held virtually on July 27-28, at the Saint Petersburg State University in Saint Petersburg, Russia.

If you have any questions or concerns, or if I may be of assistance in any way, please do not hesitate to contact me.

On behalf of BiATA 2020 Organizing Committee,

Dr. Anton Korobeynikov

BiATA 2020 Organizing Committee Vice-chair,
Center for Algorithmic Biotechnology,
Saint Petersburg State University
E-mail: a.korobeynikov@spbu.ru

Magaña-Lizárraga J.A., Rendón-Maldonado J.G., Irineo-Cabrales A.B., Díaz-Camacho S.P., Vega-López I.F., Delgado-Vargas F., Gómez-Gil B., Báez-Flores M.E. Genome-wide characterization of postinfectious functional dyspepsia-associated antibiotic-resistant *Escherichia coli* isolates from Mexico. Bioinformatics: From Algorithms to Applications (BiATA'20), San Petersburgo, Rusia, 27-28 de julio del 2020.



FACULTAD DE
CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA



SE OTORGA LA PRESENTE

CONSTANCIA

A:

Magaña-Lizárraga José Antonio, Gómez-Gil Bruno, Rendón-Maldonado José Guadalupe, Delgado-Vargas Francisco, Gracia-Valenzuela Martina Hilda, Báez-Flores María Elena

Por su participación en la presentación del póster científico con el trabajo titulado "INTERROGACIÓN DEL GENOMA DE *Escherichia coli* ENTEROPATÓGENA ATÍPICA (aEPEC) AISLADA DE *Oreochromis* spp. EN GRANJA ACUÍCOLA" impartida el día 25 de octubre de 2022, en el marco del Simposium Internacional, 80 aniversario de QFB.



ATENTAMENTE
SURSUM VERSUS
CULIACÁN, SINALOA, OCTUBRE 2022

Eusiel Rubio Castro

DR. EUSIEL RUBIO CASTRO
DIRECTOR FCQB

Magaña-Lizárraga J.A., Gómez-Gil B., Rendón-Maldonado J.G., Delgado-Vargas F., Gracia-Valenzuela M.H., Báez-Flores M.E. Interrogación del genoma de *Escherichia coli* enteropatógena atípica (aEPEC) aislado de *Oreochromis* spp. en granja acuícola. Simposium Internacional 80 Aniversario de QFB. Culiacán de Rosales, Sinaloa, México, 24-25 de octubre del 2022.

Asimismo, parte de la tesis doctoral derivaron los siguientes artículos científicos publicados en revistas arbitradas e indizadas:



Communication

Genomic Profiling of Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* Isolates from Surface Water of Agricultural Drainage in North-Western Mexico: Detection of the International High-Risk Lineages ST410 and ST617

José Antonio Magaña-Lizárraga ¹, Bruno Gómez-Gil ², José Guadalupe Rendón-Maldonado ¹, Francisco Delgado-Vargas ¹, Inés Fernando Vega-López ³ and María Elena Báez-Flores ^{1,*}

- ¹ Unidad de Investigaciones en Salud Pública "Dra. Kaethe Willms", Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa, Ciudad Universitaria, Culiacan 80013, Mexico; jantonio.mlga@gmail.com (J.A.M.-L.); jrendonm@uas.edu.mx (J.G.R.-M.); fdelgado@uas.edu.mx (F.D.-V)
- ² Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD), Unidad Mazatlán en Acuicultura y Manejo Ambiental, AP711, Mazatlán 82112, Mexico; bruno@ciad.mx
- ³ Parque de Innovación Tecnológica, Universidad Autónoma de Sinaloa, Culiacan 80013, Mexico; ifvega@uas.edu.mx
- * Correspondence: elenabf@uas.edu.mx; Tel.: +52-667-752-0460



Citation: Magaña-Lizárraga, J.A.; Gómez-Gil, B.; Rendón-Maldonado, J.G.; Delgado-Vargas, F.; Vega-López, I.F.; Báez-Flores, M.E. Genomic Profiling of Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* Isolates from Surface Water of Agricultural Drainage in North-Western Mexico: Detection of the International High-Risk Lineages ST410 and ST617. *Microorganisms* **2022**, *10*, 662. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10030662>

Academic Editors: Steven. P. Djordjevic and Veronica Janscki

Received: 9 February 2022
Accepted: 15 March 2022
Published: 20 March 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Aquatic environments are recognized as one of the main reservoirs for the emergence and dissemination of high-risk lineages of multidrug-resistant (MDR) bacteria of public health concern. However, the genomic characteristics of antibiotic-resistant *Escherichia coli* isolates from aquatic origins remain limited. Herein, we examined the antibiotic resistance and virulence genomic profiles of three *E. coli* recovered from surface water in northwest Mexico. Antimicrobial susceptibility testing, whole-genome sequencing (WGS), and in-depth *in silico* analysis were performed. Two *E. coli* exhibited MDR phenotypes. WGS-based typing revealed genetic diversity, and phylogenetic analysis corroborated a notable divergent relationship among the studied *E. coli*. One *E. coli* strain, harboring enterotoxigenic and extraintestinal pathogenic-associated virulence genes, was assigned to the ST4 lineage. MDR *E. coli*, belonging to the international high-risk clones ST410 and ST617, carried genes and mutations conferring resistance to aminoglycosides, β -lactams, quinolones, sulfonamides, tetracyclines, and trimethoprim. This study describes, for the first time, the detection and genomic profiling of high-risk lineages of *E. coli* ST410 and ST617 from surface water in Mexico. Additionally, our results underscore the role of surface water as a reservoir for critical pathogenic and MDR *E. coli* clones and the need for the surveillance and monitoring of aquatic environments via WGS from the One Health perspective.

Keywords: multidrug-resistance; environmental *E. coli*; aquatic environment; high-risk *E. coli* clones; ETEC O6; class 1 integron; whole-genome sequencing; agricultural drainage

1. Introduction

Antimicrobial resistance (AMR) has been a primary global public health issue in recent decades. AMR hinders clinical effectiveness and limits the therapeutic options for infectious diseases, leading to increased healthcare costs, treatment failure, morbidity, and mortality rates. At present, the estimated AMR-related death toll accounts for 700,000 annually, and it is projected to increase to 10 million deaths per year by 2050 unless action is taken [1]. AMR phenomenon represents a complex and multifaceted threat of growing concern to the human, animal, and environmental health due to the emergence, persistence, and spread of antibiotic resistance genes (ARGs) and their acquisition by clinically relevant bacteria in each interconnected sector [2].

Magaña-Lizárraga J.A., Gómez-Gil B., Rendón-Maldonado J.G., Delgado-Vargas F., Vega-López I.F., Báez-Flores M.E. (2022). Genomic Profiling of Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* Isolates from Surface Water of Agricultural Drainage in North-Western Mexico: Detection of the International High-Risk Lineages ST410 and ST617. *Microorganisms*. 10(3), 662. ISSN: 2076-2607. DOI: [10.3390/microorganisms10030662](https://doi.org/10.3390/microorganisms10030662)

Characterization of a Pathogenic *Escherichia coli* Strain Derived from *Oreochromis* spp. Farms Using Whole-Genome Sequencing

José Antonio Magaña-Lizárraga¹, Bruno Gómez-Gil², Julissa Enciso-Ibarra², María Elena Báez-Flores¹

¹Unidad de Investigaciones en Salud Pública "Dra. Kaethe Willms", Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa, Ciudad Universitaria ²Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. (CIAD), Unidad Mazatlán en Acuicultura y Manejo Ambiental

Corresponding Author

María Elena Báez-Flores
elenabf@uas.edu.mx

Citation

Magaña-Lizárraga, J.A., Gómez-Gil, B., Enciso-Ibarra, J., Báez-Flores, M.E. Characterization of a Pathogenic *Escherichia coli* Strain Derived from *Oreochromis* spp. Farms Using Whole-Genome Sequencing. *J. Vis. Exp.* (190), e64404, doi:10.3791/64404 (2022).

Date Published

December 23, 2022

DOI

10.3791/64404

URL

jove.com/video/64404

Abstract

Aquaculture is one of the fastest-growing food-producing sectors worldwide and tilapia (*Oreochromis* spp.) farming constitutes the major freshwater fish variety cultured. Because aquaculture practices are susceptible to microbial contamination derived from anthropogenic sources, extensive antibiotic usage is needed, leading to aquaculture systems becoming an important source of antibiotic-resistant and pathogenic bacteria of clinical relevance such as *Escherichia coli* (*E. coli*). Here, the antimicrobial resistance, virulence, and mobilome features of a pathogenic *E. coli* strain, recovered from inland farmed *Oreochromis* spp., were elucidated through whole-genome sequencing (WGS) and *in silico* analysis. Antimicrobial susceptibility testing (AST) and WGS were performed. Furthermore, phylogenetic group, serotype, multilocus sequence typing (MLST), acquired antimicrobial resistance, virulence, plasmid, and prophage content were determined using diverse available web tools. The *E. coli* isolate only exhibited intermediate susceptibility to ampicillin and was characterized as ONT:H21-B1-ST40 strain by WGS-based typing. Although only a single antimicrobial resistance-related gene was detected [*mdf(A)*], several virulence-associated genes (VAGs) from the atypical enteropathogenic *E. coli* (aEPEC) pathotype were identified. Additionally, the cargo of plasmid replicons from large plasmid groups and 18 prophage-associated regions were detected. In conclusion, the WGS characterization of an aEPEC isolate, recovered from a fish farm in Sinaloa, Mexico, allows insights into its pathogenic potential and the possible human health risk of consuming raw aquacultural products. It is necessary to exploit next-generation sequencing (NGS) techniques for studying environmental microorganisms and to adopt a one health framework to learn how health issues originate.

Magaña-Lizárraga J.A., Gómez-Gil B., Enciso-Ibarra J., Báez-Flores M.E. (2022). Characterization of a Pathogenic *Escherichia coli* Strain Derived from *Oreochromis* spp. Farms Using Whole-Genome Sequencing. *Journal of Visualized Experiments*. (190), e64404. ISSN: 1940-087X. DOI: [10.3791/64404](https://doi.org/10.3791/64404)


Y el capítulo de libro:



A QUIEN CORRESPONDA:

Por este medio me permito hacer constar que **José Antonio Magaña-Lizárraga, Bruno Gómez-Gil, José Guadalupe Rendón-Maldonado, Inés Fernando Vega-López, María Elena Báez-Flores**, son coautores del capítulo ESTUDIO DE LA RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS MEDIANTE NGS Y DESDE EL ENFOQUE “UNA SALUD (ONE HEALTH)”, incluido en el libro Tópicos selectos en Biomedicina y Biotecnología el cual se dictaminó favorablemente por pares ciegos según lo establecido en nuestro proceso certificado de edición, publicación y difusión, evaluado bajo la norma ISO 9001: 2015.

Para los fines legales que los interesados juzguen convenientes, se extiende la presente en la ciudad de Culiacán Rosales, Sinaloa a los veintiocho días del mes de febrero del año 2023.

ATENTAMENTE.-
"SURSUM VERSUS"

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE SINALOA
DIRECCIÓN DE
EDITORIAL
Dr. Juan Carlos Ayala Barrón
Director de la Dirección de Editorial
y Presidente del H. Consejo Editorial

Oofinas de Editorial UAS
Calle Burócratas 274-3 ota., colonia Burócrata, C.P. 80030, Culiacán, Sinaloa.
Tel. 667.715.5992 Web: editorial.uas.edu.mx

Magaña Lizárraga, J.A., Gómez Gil, B., Rendón Maldonado, J.G., Vega López, I.F., Báez Flores, M.E. (s.f.). Estudio de la resistencia a antimicrobianos mediante NGS y desde el enfoque “una salud (*one health*)”. *Tópicos selectos en Biomedicina y Biotecnología*. Editorial UAS.

XV. SIGLAS Y ABREVIACIONES

A/E: Lesiones de adherencia y esfacelamiento

AA: Fenotipo de adherencia agregativa

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNg: Ácido desoxirribonucleico genómico

aEPEC: *E. coli* enteropatógena atípica

AIEC: *E. coli* adherente-invasiva

APEC: *E. coli* patogénica aviar

ARGs: Genes asociados a resistencia antimicrobiana

ARN: Ácido ribonucleico

ARNr: Ácido ribonucleico ribosómico

ARNt: ARN ribonucleico de transferencia

BHI: Caldo infusión-cerebro-corazón

BLEE: Beta-lactamasa de espectro extendido

CC: Complejo clonal

CD: Enfermedad de Crohn

CDC: Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades

CDS: Secuencia codificante de proteína

CEMB: Células endoteliales microvasculares cerebrales

CF: Factores de colonización

CGE: Centro de Epidemiología Genómica

cgMLST: Tipificación multilocus de secuencias del genoma central

CH: Colitis hemorrágica

CLSI: Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio

CNF1: Factor necrosante citotóxico tipo 1

CRL: Loci complejo de resistencia antibiótica

DA: Fenotipo de adherencia difusa

DAEC: *E. coli* de adherencia difusa

DAF: Factor de Aceleramiento del Deterioro

DHFR: Dihidrofolato reductasa

DHPS: Dihidropteroato sintasa

DMSO: Dimetilsulfóxido

EAEC: *E. coli* enteroagregativa

EHEC/STEC: *E. coli* enterohemorrágica / productora de toxina Shiga

EIEC: *E. coli* enteroinvasiva

EMA: Enzima modificadora de aminoglucósidos

ETEC: *E. coli* enterotoxigénica

ExPEC: *E. coli* patógena extraintestinal

FV: Factores de virulencia

IBC: Comunidades bacterianas intracelulares

IBD: Enfermedad inflamatoria intestinal

Inc: Grupo de Incompatibilidad

InPEC: *E. coli* patógena intestinal

IS: Secuencia de inserción

ITU: Infección del tracto urinario

ITU-R: Infección del tracto urinario recurrente

kpb: Mil pares de bases

LA: Fenotipo de adherencia localizada

LB: Caldo Luria-Bertani

LCR: Líquido cefalorraquídeo

LEE: Locus de Esfacelamiento Enterocítico

LPS: Lipopolisacárido

LT: Enterotoxina termolábil

M: Millón

MAC: Complejo de ataque a la membrana

MDR: Multirresistencia antibiótica

MGE: Elemento genético móvil

MLST: Tipificación multilocus de secuencias

Mpb: Millones de pares de bases

MSA: Alineamiento Múltiple de Secuencias

MST: Árboles Recubridores Mínimos

NCBI: Centro Nacional para la Información Biotecnológica

NGS: Secuenciación masiva en paralelo

NJ: Algoritmo Neighbor-joining

NMEC: *E. coli* causante de meningitis neonatal

OMP: Proteínas de membrana externa

OMS: Organización Mundial de la Salud

OMV: Vesículas de membrana externa

ONT: Antígeno O No tipificable

ORF: Marco de lectura abierto

PAI: Isla de patogenicidad

pb: Pares de bases

PBP: Proteína ligadora de penicilina

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PE: Lecturas pareadas

pH: Potencial de hidrógeno

PHASTER: Versión mejorada de herramienta de búsqueda de Fagos

PIB: Producto Interno Bruto

PMQR: Resistencia a Quinolonas Mediada por Plásmidos

QRDR: Región Determinante de Resistencia a Quinolonas

RA: Resistencia a los antibióticos

RAM: Resistencia a antimicrobianos

RAST: Tecnología de anotación rápida por subsistemas

RI: Isla de resistencia antibiótica

RND: Transportadores de la familia resistencia-nodulación-división

SEPEC: *E. coli* septicémica

SPATE: Serina Proteasa Autotransportadora de *Enterobacteriaceae*

SRA: Archivo de Lecturas de Secuenciación

SSTIII: Sistema de secreción tipo III

SSTVI: Sistema de secreción tipo VI

ST: Enterotoxina termoestable

ST: Tipo de secuencia clonal

Stx: Toxina tipo Shiga

SUH: Síndrome urémico hemolítico

tEPEC: *E. coli* enteropatógena típica

THG: Transferencia horizontal de genes

Tn: Transposón

TSA: Agar soja tripticaseína

UC: Colitis ulcerativa

UFC: Unidad Formadora de Colonia

UPEC: *E. coli* uropatógena

VAGs: Genes asociados a virulencia bacteriana

WGS: Secuenciación del genoma completo