

Universidad Nacional Autónoma de México



FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

Frecuencia de cepas de Escherichia coli uropatógenas manosa sensible y manosa resistente aisladas de mujeres embarazadas

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A
GRACIELA ROMERO DIAZ

Asesor de Tesis; PROFRA ELDA PENICHE QUINTANA

MEXICO, D. F.

1994

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

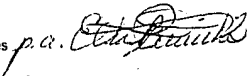
Presidente	Prof. Eida Peniche Quintana
Vocal	Prof. Ma. Elsa Escudero García
Secretario	Prof. Raul Garza Velasco
1er. Suplente	Prof. Adriana Guadalupe Mejía Chavez
2do. Suplente	Prof. Mayté Astigarraga Zavaleta

Sitio donde se desarrolló el tema: Instituto Nacional de Perinatología y Hospital Juárez de México

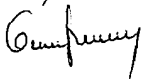
Nombre completo y firma del asesor del tema: Prof. Eida Peniche Quintana



Nombre completo y firma del supervisor técnico: Dr. Ernesto Calderón Jaimes

p.a. 

Nombre completo y firma del sustentante: Graciela Romero Díaz



CON TODO MI CARÍÑO DEDICO ESTA TESIS
A MIS PADRES POR SU ESFUERZO.

JUAN ROMERO S. Y CONSUELO DIAZ A

AGRADEZCO POR SU AYUDA, CONFIANZA
Y ESTIMULO QUE ME BRINDO MI ESPOSO.

CESAR LUGO RUIZ

AL MAYOR TESORO DE MI VIDA, MI HIJA
Y AL PROXIMO BEBE.

LAURA ANDREA LUGO ROMERO

AGRADEZCO EL IMPULSO Y APOYO QUE
ME BRINDO EL DR.

ERNESTO CALDERON JAIMES

DOY GRACIAS A MI ASESORA POR SU
COMPRENSION Y APOYO.

Q.F.B. ELDA PENICHE QUINTANA

AGRADEZCO A MIS COMPAÑEROS DE
TRABAJO POR SU COLABORACION.

ROBERTO, MYRIAM, NICO Y ROCIO

GRACIAS A TODOS AQUELLOS QUE DE
ALGUNA MANERA ME BRINDARON SU
APOYO.

INDICE

	PAG.
INTRODUCCION	1
OBJETIVOS.....	4
GENERALIDADES.....	5
Andecedentes.....	5
Patogenicidad.....	7
Mecanismos de virulencia.....	10
Pruebas de adherencia.....	24
Epidemiología de las infecciones urinarias.....	26
PARTE EXPERIMENTAL.....	32
A. Material.....	32
B. Métodos.....	37
RESULTADOS.....	45
DISCUSION.....	57
CONCLUSIONES.....	61
ANEXOS.....	63
BIBLIOGRAFIA.....	65

INTRODUCCION

Las infecciones del tracto urinario (ITU) son las más comunes en el humano, la mayoría de los casos son causados por un número limitado de microorganismos entre los cuales se encuentran los pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae, a los géneros Pseudomonas, Staphylococcus y otros géneros, cuya presencia en orina se conoce como bacteriuria.

Estas infecciones pueden involucrar varios sitios anatómicos, incluyendo : uretra, vejiga, riñones y glándulas de comunicación como la próstata, dando un amplio espectro de síndromes clínicos, como es la bacteriuria asintomática, bacteriuria sintomática como en la cistouretritis y en la pielonefritis que se pueden diseminar a tejidos adyacentes (abscesos perinefríticos) y , finalmente , producir bacteriemia.

El riesgo de desarrollar infección del tracto urinario, puede ser favorecido por la presencia de anomalías congénitas o anomalías estructurales adquiridas del tracto urinario, o bajo condiciones tales como el embarazo, tumores o cuerpos extraños como catéteres.

Con relación a las mujeres gestantes, este tipo de infección representa una de las complicaciones más comunes durante el embarazo, dichas complicaciones están asociadas al parto prematuro, mortalidad perinatal, así como anomalías en la estructura de la función renal, ruptura prematura de membranas, pre-eclampsia, hipertensión arterial, perfiles bajos de hemoglobina y algunas otras patologías perinatales.

Las ITU son las infecciones extraintestinales más comunes por Escherichia coli siendo el agente etiológico más frecuente en este tipo de infección

Debido a que ciertas cepas de E. coli presentan una capacidad inherente para causar enfermedad, resultante de una o varias propiedades especiales o factores de virulencia, éstos sirven para distinguir al patógeno potencial del no patógeno intestinal.

Dentro de estas propiedades se encuentran :expresión de adhesinas mediante el ataque a receptores específicos de las células uroepiteliales, producción de hemolisinas, resistencia al suero, producción de aerobactina y presencia de antígenos de superficie particulares.

La Interacción entre el hospedero y las células bacterianas, ha sido un tema central en estudios actuales de la patogénesis de las infecciones del tracto urinario.

Las Investigaciones han demostrado que la adherencia a las células uroepiteliales se considera como la primer etapa necesaria en la colonización de la mucosa del tracto urinario y un precedente a una infección invasiva en muchas situaciones, resultando de esta manera la evasión de los mecanismos de defensa del hospedero.

La adherencia a sustratos sólidos es una propiedad de muchos microorganismos patógenos, incluyendo virus, bacterias gram negativas y gram positivas, levaduras y protozoarios.

Con respecto a las cepas de E. coli uropatógenas , la adherencia es mediada por la presencia de fimbrias específicas en su superficie. Estas fimbrias se clasifican con base en la capacidad de la manosa para inhibir la adherencia.

La adherencia se pone de manifiesto in vitro por métodos de aglutinación a diferentes superficies celulares, entre ellas la aglutinación a células sanguíneas rojas, con y sin D-manosa.

El presente trabajo tiene como finalidad el reconocimiento de dos marcadores de patogenicidad, para poder entender mejor los mecanismos de patogenicidad de las cepas uropatógenas de Escherichia coli, asimismo nos permitirá ampliar el rango de probabilidades de acertar en el reconocimiento de una cepa con potencialidad de que su presencia se acompañe de problemas que alteren el curso del embarazo, o bien, que puedan ser utilizados esos conocimientos para evitar intervenciones innecesarias.

La aplicación práctica de los conocimientos generados, permitirá seleccionar la población a la cual se le prodigan mayores atenciones, lo que sin duda se reflejará en una disminución sustancial de la morbimortalidad a mediano plazo, en lo que respecta a la infección urinaria durante la gestación.

Objetivos

- 1).- Aislamiento de las cepas E. coli uropatógenas a partir de mujeres embarazadas.
- 2).- Caracterización según el tipo de fimbria, en cepas manosa sensibles (MS) y en cepas manosa resistentes (MR) .
- 3).- Determinar la frecuencia de cepas de E. coli uropatógenas manosa sensible (MS) y manosa resistentes (MR) aisladas de pacientes embarazadas con bacteriuria asintomática, cistouretritis y pielonefritis.
- 4).- Determinar la frecuencia de cepas de E. coli uropatógenas productoras de beta- hemólisis.

Generalidades

Antecedentes :

Los miembros de la familia Enterobacteriaceae son los agentes etiológicos más frecuentes de las ITU, asimismo Escherichia coli en sus diferentes serotipos se reconoce como el agente etiológico más comunmente aislado (85 - 90 %) de pacientes con ITU, del 15 al 10 % restante , son responsables Proteus, Klebsiella, Pseudomonas , Enterococcus y Staphylococcus saprophyticus. (ver tabla No.1)

Escherichia coli es el microorganismo más prevalente en la flora fecal humana, usualmente habita el colon como un comensal inocuo. Es un bacilo Gram negativo, aproximadamente mide de 2 a 3 micras por 0.4 a 0.6 micras, móvil que posee flagelos peritricos, algunas especies poseen envoltura, no producen esporas, fermentan la glucosa (como todas las especies de la familia Enterobacteriaceae) , con o sin producción de gas , son catalasa positivo y oxidasa negativa por carecer del sistema citocromo oxidasa, reducen nitratos a nitritos; crecen con facilidad en todos los medios ordinarios, es facultativo.

La morfología de las colonias de Escherichia coli muestra colonias que miden de 2 a 4 mm de diámetro, después de incubadas a 37° C durante 18 a 24 horas, son opacas y convexas con un borde uniforme.

En el medio de McConkey las colonias presentan una coloración rosa como resultado de la fermentación de la lactosa; aproximadamente el 95 % de cepas de Escherichia coli fermentan la lactosa rápidamente con producción de gas, todas producen indol y presentan ausencia de actividad de la ureasa.

Las especies de Escherichia coli se agrupan en cuatro categorías, basados en los mecanismos y marcadores de patogenicidad.

A).- E. coli de flora normal, las cuales pueden causar infecciones oportunistas, en heridas, o provocar infecciones del tracto urinario bajo y .varias manifestaciones en hospederos inmunocomprometidos.

B).- E. coli causantes de septicemia y/o meningitis en neonatos .

C).- E. coli causante de Infecciones del tracto urinario (ITU) alto.

D).- E. coli causante de diarreas, disentería, colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico.

El presente trabajo únicamente se enfocará a las cepas de Escherichia coli causantes de ITU en mujeres embarazadas, por lo que las demás especies no se tratarán en este trabajo (5,6,7,10,17,30).

Los coliformes tienen una estructura antigénica muy compleja, las cepas son heterogéneas en su comportamiento serológico, los antígenos son de tres tipos:

a).- Antígeno O somático (termoestables)

b).- Antígeno K envoltura (termolábiles)

c).- Antígeno H flagelar (termolábiles)

La serotipificación es, probablemente, el sistema de clasificación más efectivo para E. coli.

Se han reconocido 171 antígenos O somáticos, 80 antígenos K de envoltura y 56 antígenos H de proteína flagelar.

El antígeno O somático de Escherichia coli es propio de la membrana externa. Está compuesto de complejos fosfolípidos-polisacáridos, termoestables, resistentes a tratamientos con alcohol y ácidos diluidos; sirve como estructura protectora.

El antígeno K de Escherichia coli está presente en grandes cantidades en la envoltura de la bacteria, de naturaleza polisacárido, y muchas veces interfiere en las aglutinaciones del antígeno O, por lo que es necesario calentar para ser destruido. Protege a la bacteria de los mecanismos de defensa del hospedero.

El antígeno H es de naturaleza proteica (flagelina), son termolábiles, se inactivan por tratamiento con alcohol y los agregados que forman floculan (1,7,17,18).

PATOGENICIDAD

El papel de E. coli como patógeno es bien conocido desde hace ya muchos años.

Muchas cepas de E. coli tienen una capacidad inherente para causar enfermedad (término conocido como patogenicidad) (10, 39).

Los procesos patológicos producidos con mayor frecuencia por E. coli en el hombre son los que afectan al tracto urinario, asimismo representan una de las complicaciones más comunes durante la gestación ; se ha observado que estas especies uropatógenas provienen de la flora fecal (14, 23).

Este microorganismo puede desplazarse del conducto intestinal al tracto urinario y a los riñones por vía hematógica o linfática, aunque con mayor frecuencia sigue la vía ascendente desde la uretra, a través de vejiga hasta alcanzar los ureteres y el riñón. El reflujo de la orina dentro de los ureteres y en la pelvis renal probablemente sea un mecanismo que facilita el paso de bacterias en el sistema urinario superior.

El riesgo de desarrollar enfermedad en el tracto urinario puede ser favorecido por la presencia de:

- A).- Anormalidades estructurales adquiridas o congénitas de tracto urinario .
- B).- Condiciones tales como el embarazo.
- C).- Tumores .
- D).- Cuerpos extraños tales como catéteres o cálculos.

La severidad de la enfermedad está en función de la resistencia del hospedero, así como de la virulencia de la cepa infectante.

Dentro de los mecanismos de defensa urinarios del hospedero que se oponen al establecimiento de un agente etiológico en el sistema urinario se encuentran:

Osmolaridad de la orina, concentración urémica urinaria, concentración de ácidos orgánicos, pH, presencia de IgG e IgA secretora, fagocitosis por migración en la mucosa vesical, peristalsis ureteral, flujo continuo de la orina con vaciamiento completo y espontáneo de la vejiga durante la micción, etc (3,9,10,18,21,27,28).

En las cepas de E. coli la virulencia resulta de la suma de una o varias propiedades específicas o factores de virulencia, las cuales son de utilidad para distinguir al patógeno potencial de las especies intestinales no patógenas.

El potencial de los factores de virulencia se clasifica de acuerdo al síndrome clínico, en términos generales estos cuadros clínicos se clasifican en tres grupos :

1).- Bacteriuria asintomática

2).- Cistouretritis

3).- Pielonefritis

Las dos últimas corresponden a bacteriuria sintomática.

Bacteriuria: literalmente significa presencia de bacterias en la orina. Se considera con la presencia de $\geq 10^5$ ufc/ml de una sola especie bacteriana .

Bacteriuria asintomática : no se observan manifestaciones clínicas de disuria, urgencia y frecuencia de la micción; se detecta únicamente por escrutinio

Cistouretritis : cuadro clínico de aparición aguda con disuria, urgencia y frecuencia durante la micción, acompañada o no de pesadez pélvica, sin manifestaciones de ataque al estado general y de curso afebril con bacteriuria.(urocultivos positivos con cuentas coloniales \geq de 10^5 ufc/ml.)

Pielonefritis : cuadro clínico menos abrupto en su aparición que el anterior, pero con ataque al estado general, fiebre, escalofrío, dolor, disuria, presencia de leucoeritrocituria y cilindruria, con uno o más urocultivos positivos (3,8,913,18,22,27,28,39).

MECANISMOS DE VIRULENCIA

Diversos estudios experimentales han demostrado la existencia de factores de virulencia en las bacterias infectantes y que son críticas en el desarrollo de las infecciones urinarias tales como (4,14,27,28,30,39):

A).- Expresión de las adhesinas (fimbria tipo 1, fimbria P y X adhesinas) mediante el ataque a receptores específicos en las células uroepiteliales.

B).- Producción de hemolisina.

C).- Producción de aerobactin.

D).- Resistencia a la actividad bactericida del suero.

E).- Presencia de antígenos de superficie particulares (O y K)

A).- Adherencia bacteriana:

: La interacción entre la célula hospedero y la célula bacteriana ha sido un tema central en estudios actuales de la patogénesis de las enfermedades del tracto urinario.

El término adherencia significa unión o enlace de la bacteria a receptores específicos en la superficie mucosa de animales y de humanos, ya sea en el tracto respiratorio, gastrointestinal o genitourinario.

La capacidad para atacar el epitelio del hospedero, juega un papel significativo en la patogénesis no sólo en cepas de E. coli, sino de muchos otros microorganismos como son levaduras, virus, parásitos, bacterias Gram positivas y Gram negativas, siendo un prerrequisito para la proliferación local de la bacteria en el hospedero y poder dañar el tejido, así como para la invasión y diseminación. La infección no es causada por la adhesión en sí, sino por otros factores de virulencia, ésta sólo es el primer paso en la colonización (6,16,24,27,40,43).

Para colonizar las superficies del hospedero, la bacteria debe superar un gran número de barreras de defensa no específicas como ya se mencionó; también deben eludir el reconocimiento de moléculas inmunosolubles y no inmunes presentes en las secreciones del hospedero, tales moléculas se unen a la superficie del organismo y por ello causan su rápida eliminación en las secreciones (27).

Del mismo modo, la adhesión de microorganismos de la flora normal del hospedero juega un importante papel dentro de los mecanismos de defensa, ya que mantiene la flora de los ecosistemas y protege indirectamente al hospedero por la competencia que hay con el patógeno (23).

La adherencia es un fenómeno específico, existe preferencia de los microorganismos hacia ciertos tejidos, así como especificidad a especies. Por ej. Streptococcus mutans abunda en placas dentales, S. salivarius en lengua, E. coli y Streptococcus faecalis colonizan el tracto gastrointestinal y genitourinario así como piel y esófago, respectivamente. Las infecciones gonocócicas están limitadas a humanos.

Esta marcada especificidad se ha comparado con la que se observa en la reacción antígeno- anticuerpo (23,39).

La adherencia bacteriana a la superficie de la mucosa, involucra estructuras en la superficie bacteriana llamadas fimbrias o adhesinas y componentes de la célula epitelial llamados receptores. El ataque es la suma de las adhesinas de la bacteria y de receptores presentes en la célula epitelial; puede involucrar un simple receptor específico o varios (11, 14,39).

El término fimbria (del latín fibra o hilo) se refiere a los organelos adhesivos (adhesinas).

El término pili se refiere al apéndice bacteriano no flagelar involucrado en la conjugación.

Igual que especies de la familia Enterobacteriaceae, otras especies también son fimbriadas. (tabla No. 2).

Las fimbrias difieren en morfología, se pueden observar con el microscopio electrónico, todas las cepas de E. coli tienen distribución peritrica, en número de 100 a 1,000 por célula, tienen un diámetro entre 2 a 7 nm, son delgadas, rígidas, su longitud varía de 0.2 micrómetros a 20 micrómetros. Químicamente son polímeros de proteínas, compuestas de subunidades idénticas, aproximadamente 1,000 por fimbria, cuya masa molecular de cada subunidad es de 15,000 a 30,000 (11,24).

Se sabe que Escherichia coli expresa muchos tipos de fimbrias, las cuales se caracterizan por la especificidad de su unión, serotipos de la cepa fimbriada, propiedades serológicas y su asociación al cuadro clínico (26).

La capacidad de estas cepas para adherirse a la superficie celular está asociada con la presencia de la fimbria común o de otro tipo de fimbrias más específicas presentes en la bacteria (21,31).

Clasificación y nomenclatura de fimbrias de E. coli:

Dugiud y colaboradores propusieron un esquema basado en el diámetro fimbrial y en la capacidad de diferentes monosacáridos para inhibir la aglutinación de la fimbria, se incluyen 7 tipos que van del 1 al 6 y F.(ver tabla No.3)

Posteriormente se hizo una clasificación basada solamente en su actividad de hemaglutinación :

1).- Manosa sensibles (MS) corresponden a la fimbria común o fimbria tipo 1, se inhibe su hemaglutinación con D - manosa.

2.- Manosa resistentes (MR) son todas las restantes , no se inhibe la hemaglutinación con la D - manosa.

3).-F1C no es hemaglutinante, contribuye a las propiedades adhesivas.

Cabe aclarar que no todas las especies fimbriadas causan hemaglutinación.

Las manosa resistentes se subdividen a su vez en dos grupos de acuerdo a la especificidad de su receptor :

1.- Fimbrias que reconocen el antígeno P del grupo sanguíneo, llamadas fimbrias P.

2.- Otras fimbrias llamadas X adhesinas, dentro de las cuales están las fimbrias S, M ,Fy DR, determinadas por un receptor específico (6,18,19,32,35,42).

Regulación y expresión fimbrial:

La producción de fimbrias en E. coli es controlada por 3 grandes mecanismos regularorios:

1.- Temperatura. La mayoría de las fimbrias se expresan mejor a temperaturas entre bajas y fisiológicas.

2.- Fase de variación. Se refiere al estado de fimbriación y no fimbriación.

3.- Condiciones de crecimiento. Varían de acuerdo al tipo de fimbria, las manosa sensible se expresan mejor en medio líquido, las manosa resistente en medio sólido (18,27).

Manosa Sensible

Corresponde a la fimbria común o fimbria tipo 1 descrita por Brinton.

La fimbria tipo 1 frecuentemente se menciona como una fimbria somática, son apéndices filamentosos presentes en la superficie de E. coli y de otras bacterias (15).

Una sola fimbria mide 7 nanómetros de diámetro y tiene una longitud de 1 micrométrica, está compuesta de 1,000 subunidades idénticas. Existen tres variantes de esta fimbria, la tipo 1 A, tipo 1 B y la 1 C; todas estas fimbrias tienen una gran homología en su estructura N- y C-terminal.

La expresión de la fimbria es controlada por :

- 1.- Condiciones de crecimiento: La producción fimbrial se favorece en medio líquido, en medios sólidos se inhibe la producción.
- 2.- Temperatura: Se expresa tanto a 20° C como a 37° C.
- 3.- Fase de variación: Es un fenómeno independiente de las condiciones de crecimiento, es un proceso de encendido y apagado que experimentan algunas cepas; se controla a nivel transcripcional, le permite a la célula bacteriana alternar entre estados fimbriados y no fimbriados. Las cepas fimbriadas crecen mejor a altas temperaturas y crecen menos a bajas temperaturas a diferencia de las no fimbriadas.

El papel de la fimbria tipo 1 en la patogénesis ha sido difícil de correlacionar; Silver and Ofek mostraron que la fase no fimbriada es más virulenta cuando la ruta de administración es hematológica, esto se puede explicar por el hecho de que las bacterias fimbriadas son rápidamente eliminadas del torrente sanguíneo, ya que las reconocen fácilmente los fagocitos vía receptor de manosa. Esto sugiere que la fase de variación puede, por sí misma, ser un factor de virulencia.

Otros factores que influyen en la expresión son :

- Las condiciones limitadas de oxígeno que favorecen la expresión
- Las concentraciones subinhibitorias de muchas cefalosporinas, que aumentan la expresión, mientras que las de otros antibióticos la disminuyen.

La fimbria tipo 1 está presente en muchas cepas enterobacterianas, se encuentra más frecuentemente en cepas causantes de ITU así como en cepas procedentes de otras fuentes y, en realidad, puede prevenir la adhesión a las células epiteliales del tracto urinario por acarreo de la bacteria en su capa mucosa.

Los receptores para la fimbria 1 están presentes en muchos eritrocitos de diferentes especies.

La adherencia mediada por esta fimbria la bloquean soluciones de D- manosa o alfa metil manósido y concanavalina a la manera de inhibir la adherencia bacteriana o el desplazamiento de la bacteria adherente de la superficie celular epitelial, se debe probablemente al bloqueo de la actividad manosa- bacteria.

Cuando la concentración de la proteína de Tamm- Horsfall (THP) es alta, puede prevenir la adherencia de la bacteria a la mucosa urinaria ya que la THP frecuentemente cubre la célula uroepitelial, de esta manera permite que sean expulsadas por orina y entonces actúa como un mecanismo de defensa en el tracto urinario.

Esta fimbria está involucrada en un número de procesos de adhesión manosa reversible de E. coli, incluyendo el enlace bacteriano a eritrocitos de diferentes especies entre los que se encuentran los eritrocitos de cayo, levaduras, epitelio humano y fagocitos.

Las cepas de E. coli aisladas de orina a partir de pacientes con pielonefritis aguda, tienen una capacidad alta para adherirse a células uroepiteliales humanas, las cepas aisladas de pacientes con bacteriuria asintomática y de heces de personas sanas, tienen una baja capacidad para adherirse, las aisladas de pacientes con cistouretritis tienen una capacidad intermedia.

Los genes involucrados en la producción de esta fimbria residen en el cromosoma bacteriano (2,15,18,21,23,24,27,31,40,41,43).

Manosa Resistente

La fimbria P es la adhesina manosa resistente expresada por E. coli causante de infección extraintestinal.

Está compuesta de subunidades polimerizadas con una especie de subunidad mayor (Pap) que constituye la masa de la fimbria; tiene tres subunidades menores que son la PapE, Pap F y Pap G.

Esta proteína fimbrial es codificada por un grupo de genes llamados Pap.

Esta fimbria sigue la misma estructura descrita por Brinton para la fimbria tipo 1.

La fimbria P o fimbria Pap que se sabe es la fimbria asociada a cepas uropatógenas, reconoce al alfa-D-gal(1-4)-beta -D-gal, molécula presente en la superficie de células uroepiteliales, en eritrocitos humanos y de antígenos del grupo sanguíneo P (P1, P2 y P1k, pero no al grupo sanguíneo p).

Algunas evidencias sugieren que las fimbrias P son las adhesinas más importantes de E. coli asociadas con la infección del tracto urinario alto y con la urosepsis. Se unen al epitelio tubular y vascular endotelial de los riñones y a las células epiteliales de descamación de la orina humana. Los receptores para esta fimbria también se encuentran en eritrocitos de puerco, perros, aves de corral, cabra, pero no en los de vaca, cuyos o caballos.

En contraste con la fimbria tipo 1, la fimbria P no se adhiere a los polimorfonucleares, se une al epitelio y capas musculares de la vejiga.

La adherencia no se inhibe en presencia de D-manosa.

Se han usado digalactósidos que contienen glicolípidos y oligosacáridos para bloquear la unión de la fimbria P.

Las cepas fimbriadas P difieren poco en la especificidad de entace, algunas muestran mayor adherencia a globósido que a globotriaosilceramida y algunos reconocen globósidos pero no solamente a la molécula gal-gal.

La adhesión específica en el epitelio humano es un gran factor de virulencia bacteriana en pielonefritis causada por E. coli.

Al igual que la fimbria tipo 1, la expresión de la fimbria P está sujeta a una fase de variación y a condiciones de crecimiento, con pocas excepciones se favorece por crecimiento a 37° C y en placas de agar y se inhibe por crecimiento a 18° - 22° C y en caldo. Concentraciones de trimetoprim inhiben la expresión de la fimbria P.

Entre los miembros de la familia Enterobacteriaceae solamente E. coli contiene fimbrias P.

La alta virulencia asociada con los demás factores de virulencia es necesaria para que E. coli establezca una infección renal en un hospedero normal; mientras en uno comprometido, las cepas con baja virulencia pueden causar infección renal severa.

En estudios epidemiológicos se ha observado que aproximadamente el 70% de las cepas aisladas de pacientes con pielonefritis, expresan fimbria P, así como 36% de las cepas de pacientes con cistouretritis, 24% de las cepas de pacientes con bacteriuria asintomática y 19% de las cepas procedentes de muestras fecales.

De la fimbria P, depende la capacidad de las cepas de E. coli para causar ITU, específicamente en las formas clínicas más severas. Se utiliza la aglutinación con partículas de látex cubiertas con el digalactósido o eritrocitos humanos que expresen el antígeno P sanguíneo, para caracterizar a las adhesinas de las cepas de E. coli manosa resistentes; estas pruebas no son útiles para detectar las otras adhesinas manosa resistente, diferentes de la fimbria P, ver tabla número 5.

Prevención de la adherencia

La investigación de la especificidad de la adherencia es importante en el desarrollo de intentos para prevenir la adherencia de la bacteria nociva a la superficie del hospedero, antes de que el microorganismo pueda producir daño tisular.

Se pueden usar un cierto número de estrategias para prevenir la adhesión:

- 1.- Receptores de membrana purificados o receptores análogos que puedan ser aplicados como inhibidores competitivos de la adhesión fimbrial.
- 2.- Drogas que suprimen la formación o expresión de adhesinas fimbriales y que pueden ser administradas.
- 3.- Desarrollo de vacunas antiadherentes.

Las restantes X adhesinas no se tratarán en este trabajo ya que su importancia es en otro tipo de infecciones y no en las del tracto urinario (6,14,16,18,19,23,27,42,43).

Producción de hemolisina :

Las hemolisinas son proteínas citotóxicas, secretadas por muchas cepas de E.coli hemolíticas, se reconocen por su capacidad de lisar eritrocitos, produciendo zonas de hemólisis parcial.

La hemolisina es tóxica para un amplio rango de células incluyendo eritrocitos de todos los mamíferos y aún los de peces, así como leucocitos polimorfonucleares humanos y monocitos in vitro. La hemolisina de E. coli puede también dañar células del túbulo renal.

La capacidad para lisis eritrocitos es un fenotipo más común en cepas de E. coli aisladas de infecciones, que de aquéllas encontradas en heces normales.

No está bien aclarado que la hemólisis por sí misma sea un factor de virulencia determinante, lo que sí es claro es que aumenta la capacidad virulenta de la cepa. Aún falta mucho más para dejar bien clara su prevalencia y su significado clínico.

La producción de hemolisina se suprime cuando hay cantidades altas de hierro y aumenta en presencia de bajas cantidades. La actividad hemolítica de las cepas es máxima en el sobrenadante de cultivos en fase log y disminuye en cultivos en fase estacionaria, no obstante que continúa la producción de la proteína .

La actividad provirulenta de la hemolisina es multifactorial, incluyendo la liberación de hierro de los eritrocitos, el rompimiento de la función de los fagocitos y una directa toxicidad a los tejidos del hospedero.

En ITU humanas, la producción de hemolisina es más común entre las cepas de pacientes con pielonefritis, seguida de pacientes con cistitis y finalmente en cepas de pacientes con bacteriuria asintomática. Esto demuestra una asociación en la producción de la hemolisina con cepas uropatogénicas invasivas.

La producción de hemolisina se detecta in vitro mediante la lisis de los eritrocitos de carnero que se utilizan en los medios de cultivo (13,18,39,44).

Aerobactin :

Se trata de un sideróforo bacteriano.

En el caso de E. coli se sabe que necesita al hierro para su metabolismo aeróbico y su multiplicación, casi todo el hierro está complejado con proteínas en el hospedero. Parte de la respuesta de éste a la infección, es reducir la cantidad de hierro disponible para el patógeno invasivo; por lo tanto, la bacteria busca la manera de satisfacer sus necesidades de hierro durante la infección.

El sideróforo aerobactin de E. coli, es el más efectivo sistema de quelación del hierro empleado por la bacteria para adquirirlo. Es una molécula pequeña formada de la condensación de dos moléculas de lisina y un citrato .

Las cepas con el sistema aerobactin tienen un mejor crecimiento en condiciones bajas de hierro, incluyendo el suero y la orina diluida.

El sistema aerobactin y la fimbria P se encuentran más comunmente en cepas aisladas de pacientes con ITU y con urosepsis (18,39).

Resistencia a la actividad bactericida del suero :

Las bacterias son destruidas por el suero humano normal a través de la actividad lítica del sistema del complemento. La bacteria activa la vía alterna en ausencia del anticuerpo específico y juega un papel más importante en la destrucción sérica que la que ocurre por la vía clásica.

La resistencia bacteriana a la destrucción por el suero, resulta de efectos individuales o combinados de polisacáridos capsulares, polisacáridos y/o proteínas de superficie.

Las cepas lisas son más resistentes que las cepas rugosas o semi-rugosas.

El grado de resistencia al suero puede ser una medida indirecta de la cantidad de lipopolisacárido que contienen las cepas, pero no está influenciada significativamente por el polisacárido capsular.

Las cepas aisladas de pacientes con pielonefritis y cistitis son más comúnmente resistentes al suero que las cepas de pacientes con bacteriuria asintomática, que provengan de heces.

La resistencia al suero es importante en la patogénesis de las ITU sintomáticas a pesar de la severidad del cuadro clínico (18,39).

Serotipos :

Las cepas de E. coli causantes de ITU pueden ser diferenciadas de las cepas fecales por su expresión de antígeno o polisacárido específicos.

Las cepas uropatógenas son más comúnmente tipificables con los equipos de sueros anti.

Los mismos grupos O predominan entre cepas urinarias y fecales pero ciertos grupos O comunes son significativamente más prevalentes entre las cepas urinarias que entre

las fecales. Las cepas de ITU tienen menos diversidad serológica que las cepas de origen fecal (18,39).

Pruebas de adherencia

La adhesión fimbrial de E. coli así como su papel en la adherencia y en la aglutinación a células, se ha estudiado extensamente y está sujeta a varias revisiones (11).

A finales de 1970 se reconoció por primera vez que las cepas de E. coli causantes de ITU típicamente aglutinaban eritrocitos humanos a pesar de la presencia de manosa (18).

La adhesión a células epiteliales es difícil de cuantificar, mientras que la aglutinación a células sanguíneas rojas es una reacción fácil de medir y muy usada en Microbiología Clínica (40).

La hemaglutinación ejemplifica al fenómeno general de la adherencia bacteriana.

Tanto la adhesión como la hemaglutinación para la fimbria tipo 1 son manosa sensible, es decir se inhibe la adherencia en presencia de D - manosa o de alfa- metil -D- manopiranosido; lo cual indica la presencia de estructuras que contienen manosa, tanto en la célula epitelial como en los eritrocitos y que sirven como receptores.

Las cepas de E. coli manosa resistentes, generalmente asociadas a pielonefritis, causan hemaglutinación manosa resistente, es decir, que la adherencia bacteriana no se inhibe con D - manosa, el receptor mínimo para su reconocimiento es un alfa -D-galactopiranosil - (1-4)beta - D galactopiranosido. Alfa -D galp (1-4)-beta-D-galp. Esta estructura es parte del determinante antigénico PK (trihexil ceramida) y P (globósido) del sistema sanguíneo.

Estos diferentes tipos de fimbrias pueden estar presentes en la misma cepa, por lo que se tendrían que realizar las pruebas de hemaglutinación o de adherencia a células epiteliales con los receptores específicos para cada una de ellas.

La saturación por un azúcar, de los sitios de enlace en la superficie bacteriana, prevé el ataque de estos microorganismos a la membrana epitelial del receptor.

Para cepas de E. coli aisladas de pacientes con ITU, la severidad de la infección producida in vivo se relaciona fuertemente con la capacidad de adherirse a células del tracto urinario humano in vitro (29).

Las reacciones de hemaglutinación se llevan a cabo en placas de vidrio sobre hielo, se elabora una suspensión bacteriana y una suspensión de glóbulos rojos en PBS, se incuban y se observa la hemaglutinación. Las pruebas se corren paralelamente con D-manosa al 2%.

Un gran número de consideraciones técnicas influyen en la confiabilidad de las pruebas de hemaglutinación y de adhesión a células epiteliales, incluyendo las condiciones de crecimiento usadas para preparar la suspensión bacteriana.

De esta forma se clasifican las cepas de E. coli uropatógenas en manosa sensible (MS) y en manosa resistente (MR) (6,15,16,18,19,21,29,31,43,).

Epidemiología de las infecciones urinarias

Las infecciones de las vías urinarias constituyen una de las principales causas de consulta y de hospitalización en todas las edades, desde el recién nacido hasta el anciano.

Se tienen evidencias de que una tercera parte de la población femenina experimenta una o más infecciones del tracto urinario durante su vida y algunas mujeres las

experimentan recurrentes. La infección urinaria ocurre con más frecuencia en mujeres, aún cuando este proceso puede observarse en ambos sexos y edades.

Se ha determinado con los conceptos actuales, que del 1 al 2 % de la población aparentemente sana presenta bacteriuria.

Entre los recién nacidos y los lactantes es más frecuente la infección en los hombres, posteriormente predomina en las mujeres, desde la edad escolar hasta las edades avanzadas. La prevalencia de bacteriuria no sólo se incrementa con la edad, sino también con la actividad sexual, con el número de partos, así como con el nivel socioeconómico. Las pacientes embarazadas de nivel socioeconómico bajo pueden ser más frecuentemente bacteriúricas que aquéllas de nivel socioeconómico alto.

La prevalencia de bacteriuria asintomática en la edad adulta es de 4 % en el sexo femenino y de 0.5 % en el masculino, estas cifras aumentan al 7 % en la mujer durante el embarazo ya que más del 20 % de ellas desarrollan infección de vías urinarias altas en forma sintomática.

La alta prevalencia en mujeres se debe a que la uretra femenina es aproximadamente 11 cm más corta que la masculina y esta variación anatómica facilita la contaminación del tracto urogenital con las bacterias entéricas; asimismo, se ha detectado que existen algunas diferencias en los receptores superficiales de los epitelios de algunas mujeres consideradas de alto riesgo para las ITU.

Durante el embarazo se obtienen cifras más elevadas, aproximadamente de 2 a 3 % de primigrávidas menores de 21 años desarrollan bacteriuria significativa; en cambio, del 8 al 10 % de las multiparas mayores de 35 años pueden presentar el problema, de ahí la importancia máxima durante la gestación.

Una de cada cinco mujeres bacteriúricas tendrá problemas en alguna fase del embarazo, especialmente al final del 2do. trimestre, momento en el que se hacen evidentes algunos cambios anatómicos, como es la dilatación de los colectores de la pelvis renal y ureteres, hay aumento en la capacidad y vaciamiento incompleto; estos cambios predisponen al reflujo vesicouretral y, en consecuencia, a la infección por la presencia de orina remanente.

La bacteriuria durante el embarazo induce a una alta prevalencia de pielonefritis aguda en niños con madres bacteriúricas, de ahí la importancia de realizar estudios sobre los factores de colonización en la ITU.

Es deseable contar con marcadores que permitan identificar la población en riesgo y de esta manera ofrecer opciones de diagnóstico, prevención y tratamiento.

Un proceso infeccioso del sistema urinario, independientemente de la signología, es capaz de tener progresión silenciosa hacia una lesión renal y ser evidente con diferentes grados de insuficiencia renal, las complicaciones más frecuentes son hipertensión e insuficiencia renal.

La bacteriuria asintomática es un factor de riesgo para desarrollar ITU sintomáticas, las cuales están asociadas con riesgos significativos tanto en la madre como en el feto (3,8,20,22,28,34,37,38,45).

Las consecuencias perinatales de la ITU son :

- 1.- Labor y parto prematuros.
- 2.-Extensión directa de la infección.
- 3.-Compromiso placentario y/o miometral.
- 4.- Coriamniocentesis.
- 5.-Ruptura prematura de membranas.
- 6.-Bajo peso del recién nacido
- 7.-Menor edad gestacional.
- 8.- Infección prenatal.
- 9.- Fiebre postparto.

Tabla No. 1 Especies Bacterianas aisladas en orina (9).

Microorganismos	Porcentaje
<u>Escherichia coli</u>	≥ 90%
<u>Proteus mirabilis</u>	5%
<u>Klebsiella-Enterobacter sp</u>	1%
<u>Enterococcus</u>	1%
<u>Staphylococcus coagulasa negativa</u>	1%
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	0%
<u>Serratia marcescens</u>	0%
Otros	2%

Tabla No. 2 Adhesina fimbrial de varias bacterias (27).

Escherichia coli

Tipo 1

K 88

K 99

CFA (I,II,III, IV.)

F7-F12

Salmonella typhimurium

Tipo 1

Tipo 2

Klebsiella pneumoniae

Tipo 1

Tipo 3

Neisseria gonorrhoeae

201

α y β

Neisseria meningitidis I y II

Pseudomonas aeruginosa

PAO y PAK

Serratia marcescens

Tipo 1

Tipo 3

Actinomyces viscosus

Tipo 1

Tipo 2

Proteus mirabilis UCA

Tabla No. 3 Algunas características de fimbrias de E. coli uropatógenas.

Tipo de cepa, adhesión fimbrial	morfología masa molecular de la subunidad fimbrial (x 10)	receptor implicado
tipo 1	rígida / 17	alfa-D-manósidos
P (pap)	rígida / 18.2	Digalactósido
tipo 1 C	rígida / 16	no conocido
S	rígida / 17	alfa-sialil-2,3gal

tabla No. 4 Adhesinas fimbriales de E. coli virulentas (27).

Adhesión fimbrial	Células hospederas/órgano específico	Enfermedad
tipo 1	Células hospederas en general	no definida
P	Epitelio del tracto urinario humano	infección del tracto urinario (cistitis y pielonefritis)
S	Cerebro de recién nacido de humano y septicemia	meningitis, peritonitis
Tipo 1 C	Túbulos distales y conductores colectores de riñón humano	pielonefritis

tabla No. 5 Adhesinas de E. coli uropatógenas (18).

Tipo de adhesina	Sinónimo	Fimbria presente	Receptor	Papel en ITU
Manosa resistente				
P	gal-gal,pap	+	gal(1-4)gal	+++
S		+	neunac(2-3)gal	+/-
M		-	antígeno del grupo sanguíneo M (alfa -glicoforin)	+/-
G		+	glcnac.	+/-
Dr.	075-X	-	antígeno del grupo sanguíneo Dr.	++
F	Prs,Pap-2	+	antígeno Forssman.	++
Manosa sensible				
tipo 1 fimbria		+	manósidos +- componente hidrofóbico	++
otros				
F1C (No aglutinan)	pseudo tipo 1	+	?	+/-

La escala es +/- a +++ en orden de mayor importancia en ITU (basada en humanos y modelo de animales).
 Manosa-resistentes aglutinan eritrocitos humanos.
 Manosa-sensible aglutinan eritrocitos de cuyo. (18)

PARTE EXPERIMENTAL

A.- MATERIAL :

MATERIAL DE VIDRIO :

Cubreobjetos 22 X 22 mm

Matraces aforados de 50 ml.

Matraces ertenmeyer de 500 ml.

Pipetas volumétricas graduadas de 0.1 ml.

Pipetas graduadas de 1.0 ml.

Pipetas graduadas de 5.0 ml.

Pipetas Pasteur.

Placas de vidrio excavadas.

Portaobjetos 25 X 75 mm

Probeta de 1,000 ml.

Tubos de vidrio de 13 X 100 con tapón de rosca.

EQUIPO :

Agitador horizontal con velocidad variable. Marca Labline

Agitador Vortex. Marca Fisher.

Autoclave. Marca Médica Industrial.

Balanza analítica. Marca Fisher Científica.

Balanza granataria. Marca Ohaus.

Campana de flujo laminar. Marca Industrias Alder S.A de C.V.

Centrífuga. Marca Beckman.

Espectrofotómetro. Marca Merck.
Horno eléctrico. Marca Craft Instrumentos Científicos.
Incubadora. Marca Fisher Científica.
Lámpara de luz. Marca Windsor Industrias Inc.
Microscopio estereoscópico. Marca Olympus.
Microscopio óptico, Marca Olympus.
Refrigerador. Marca General Electric.

MATERIAL VARIOS:

Algodón
Aplicadores de madera
Asas bacteriológicas
Asas calibradas de 0.001 ml.
Cajas Petri desechables sin división
Cestos
Cinta testigo
Charolas
Frascos Gerber estériles.
Gasa
Gradillas
Guantes desechables
Hielo frapé
Lápiz graso
Libretas
Masking tape.
Marcadores

Mechero

Papel Kraft

Papel Parafilm

Pipetas automáticas de 50 microlitros

Puntas desechables.

MATERIAL BIOLÓGICO:

Muestras de orina de mujeres embarazadas sin tomar en cuenta su tiempo de gestación o sus manifestaciones clínicas, procedentes del Instituto Nacional de Perinatología y del Hospital Juárez de México.

Cepas bacterianas uropatógenas de E. coli aisladas de dichas embarazadas.

Eritrocitos humanos tipo O o tipo A.

Cepa control de E. coli ATCC. H10407

REACTIVOS:

Agua desliada y bidesliada

Aceite mineral estéril

Benzal

Cloruro de potasio R. A.

Cloruro de sodio R.A.

D-Manosa

Marca Gleeson Velarde S.A.

Marca Sigma de México

Marca Laboratorios Terrier

Marca Técnica Química cat. no. 1500

Marca J.F. Baker cat. no. 3824

Marca Merck cat. no. 5984

Equipo para grupo sanguíneo	Marca Ortho Diagnostics
Equipo para tinción de Gram	Marca SSA clave 6010
Fenol R.A.	Marca Analit cat. no. f2000
Fosfato dibásico de sodio	Marca Analit cat. no. s2800
Fosfato monobásico de potasio	Marca Analit cat. no. 5300
Glicerol	Marca Sigma de México no. 911
L-Arginina	Marca Sigma cat. no. A 3784
Reactivo de Kovac'	Marca SSA clave 323-4

SOLUCIONES:

D-Manosa 2%
 Fenol 5%
 PBS (amortiguadora de fosfatos) pH 7.4 ± 0.2
 Solución Salina 0.85%
 Ver Anexo 1

MEDIOS DE CULTIVO :

Agar BHI	Marca BBL cat. no. 11065
Agar Citrato de Simons	Marca Bioxon cat. no. 216-1
Agar Hierro Lisina (LIA)	Marca BBL cat. no. 11367
Agar Kligler	Marca Merck cat. no. 3913
Agar McConkey	Marca Bioxon cat. no. 109-1
Agar Triplicase Soya	Marca BBL cat. no. 11043

Base agar Columbia	Marca BBL cat. no. 11124
Base de agar Gelosa Sangre	Marca Bioxon cat. no. 210-1
Caldo BHI	Marca Bioxon cat. no. 112
Caldo base de Moeller	Marca BBL cat. no. 115430
Caldo Malonato	Marca Bioxon cat. no. 258-1
Caldo Urea	Marca Merck cat. no. 8483
Medio M10	Marca Bioxon cat. no 241

B.- METODOS

TOMA DE MUESTRA :

Las muestras de orina se recolectan siguiendo el método estandarizado del chorro medio con aseo previo; se le explica a la paciente que después de lavarse las manos se higienice el introito de adelante hacia atrás con gasas estériles o torundas de algodón estériles embebidas en benzal, posteriormente enjuagarse con agua estéril, la paciente se abre los labios utilizando dos gasas estériles, el primer chorro y el final lo desecha, sólo se recolecta el chorro medio de la micción en un recipiente estéril etiquetado, con el nombre de la paciente (9).

Una vez recolectada la muestra se remite lo más pronto posible al laboratorio con su respectiva hoja de antecedentes, la cual contiene: nombre, edad, registro, semanas de gestación, gestas, partos, cesáreas, síntomas actuales, antecedentes de infección en orina (ardor al orinar, frecuencia, urgencia), tratamiento en los últimos 15 días, presencia de flujo vaginal, comezón, olor, motivo de la solicitud del urocultivo.

PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA:

Se recibe la muestra en el laboratorio y se procede a realizar el urocultivo lo más pronto posible, sino se puede hacer de inmediato, se refrigeran las muestras y se procesan antes de dos horas.

El urocultivo se realiza siguiendo la técnica del asa calibrada, utilizando una de 0.001 ml, de esta manera, una colonia representa 1,000 UFC/ml. Se inoculan en Gelosa Sangre,

en Tripticase Soya y en McConkey, incubándose de 18 a 24 hora a 37° C en condiciones de aerobiosis.

Después de sembrar la orina se toman 5.0 ml de la misma y se colocan en tubos de 13 x 100 para centrifugarla 10 minutos a 3,000 rpm, se desecha el sobrenadante y del sedimento se realiza un frotis, se deja secar, se fija por calor y se tiñe con la tinción de Gram; esto se hace con la finalidad de tener un resultado presuntivo del microorganismo presente en el urocultivo, se leen 12 campos en forma de greca, se considera positivo el Gram si en más de 6 campos se observa el mismo tipo de morfología y es negativo cuando se observa en menos de 6 campos, además con diferente morfología (12, 36, 33).

Para la cuantificación de las bacterias se siguió el criterio de Kass considerando los urocultivos positivos con cuentas de colonias de $\geq 100,000$ UFC/ml.

Si la tinción y el urocultivo no coinciden se deben incubar las placas otras 24 horas y si fuera necesario se incuban en diferentes condiciones atmosféricas, esto se hace pensando en los microorganismos delicados como los anaerobios. Si a las 48 horas no se presenta crecimiento se interpreta el urocultivo como negativo.

En este trabajo sólo se van a considerar los urocultivos positivos con cuentas coloniales de 100,000 o más UFC/ml de Escherichia coli.

Ya cuantificado el urocultivo se proceden a realizar las pruebas bioquímicas, para lo cual se selecciona una colonia de la caja de McConkey lo bastante aislada cuya morfología colonial coincida con la de E. coli y que su tinción de Gram indique pureza del inóculo y bacilos negativos.

Al mismo tiempo se observa la producción de hemolisina en la caja de Gelosa Sangre, para reportar en la libreta todos los datos conforme se vayan obteniendo (Esquema. No. 1). Se consideran algunas de las pruebas bioquímicas ya estandarizadas para diferenciar a E. coli de otras enterobacterias, basadas principalmente en la determinación de la presencia o ausencia de diferentes enzimas, las cuales se pueden detectar a través de medios rutinarios utilizados en las técnicas de cultivo in vitro normalmente, (ver cuadro No. 1).

CUADRO No. 1

Las bioquímicas que se utilizaron fueron las siguientes:

PRUEBA BIOQUIMICA	RELACION
LACTOSA	+
GLUCOSA	+
GAS DE GLUCOSA	+
H ₂ S	-
MOVILIDAD	+
INDOL	+
UREA	-
CITRATO DE SIMMONS	-
MALONATO	-
ORNITINA *	-/+
ARGININA *	-/+
LISINA *	-/+

* La mayoría de las cepas de E. coli dan negativas estas bioquímicas, sin embargo, hay algunas que pueden darlas positivas, en algunas referencias las reportan con porcentaje o como dudosas (10,17,25,5).

Cuando por algún motivo no den bien las bioquímicas (muy ocasional), se identificara con el sistema API 20, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Una vez identificadas perfectamente las cepa como E. coli, se almacenan en caldo o en agar BHI a temperatura ambiente, para después realizar las pruebas de hemaglutinación y, finalmente, almacenarlas en tubos con 1.0 ml de caldo BHI y con 0.1 ml de glicerol estéril a -70° C.

SUSPENSION BACTERIANA:

Las cepas de E. coli uropatógenas ya aisladas e identificadas se cultivan en placas de agar McConkey dando de dos a tres pases, posteriormente se inoculan tubos con caldo BHI (tubos con tapón de rosca conteniendo 3.0 ml de caldo), se incuban 18 h a 37° C, para proceder con las otras pruebas (Esquema No. 2)

Después de este tiempo la bacteria se sedimenta por centrifugación 10 minutos a 3,000 rpm y se lava de dos a tres veces con amortiguador de fosfatos (PBS), finalmente se resuspende en el mismo amortiguador a una concentración de $1 \text{ a } 8 \times 10^9$ bacterias/ ml (D.O. 0.8 a 540 nm).

ERITROCITOS:

Las muestras de sangre las proporcionaron los Bancos de Sangre de los Institutos, se recolectan en 1% de citrato. En el laboratorio se lavan dos veces los eritrocitos en PBS y se centrifugan a 3,000 rpm durante 10 minutos, finalmente se suspenden a una concentración de 2% v/v (Anexo 1).

PRUEBAS DE HEMAGLUTINACION:

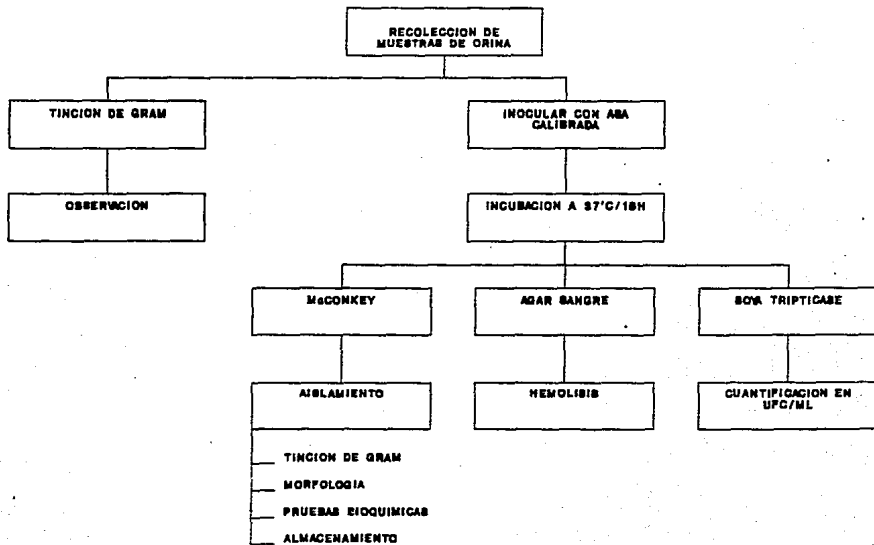
La hemaglutinación se lleva a cabo en placas excavadas de vidrio, con la pipeta automática de 50 microlitros se colocan 25 microlitros de suspensión bacteriana y 25 microlitros de la suspensión de eritrocitos, se mezclan con aplicadores de madera y se colocan las placas en una charola con hielo frapé, se incuban 5 minutos con agitación suave en un rotor mecánico, después de este tiempo se procede a leer en forma visual la hemaglutinación, interpretándose como - ó +.

En otras placas, al mismo tiempo se corre la prueba en presencia de solución de D-Manosa al 2% colocando igual cantidad (25 microlitros), se mezclan, se incuban y se leen igual que la hemaglutinación.

De esta forma se clasifican las cepas en manosa sensible (MS), aquéllas que hemaglutinan y que posteriormente se inhibe la hemaglutinación en presencia de D-Manosa y en cepas manosa resistentes (MR) a las que hemaglutinan y además no se inhibe la hemaglutinación en presencia de D-Manosa.

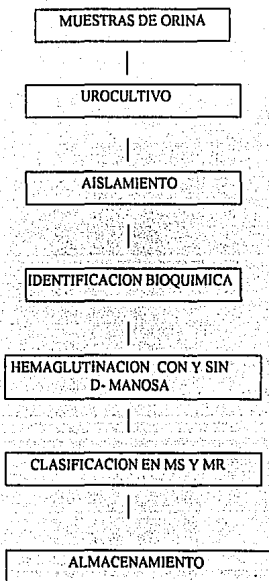
Se utiliza una cepa control de E. coli, ATCC que se procesa exactamente igual que las problema, cada vez que se realizan las pruebas de hemaglutinación y de inhibición de la hemaglutinación. (Esquema No. 3)

DIAGRAMA DEL PROCESAMIENTO DEL UROCULTIVO



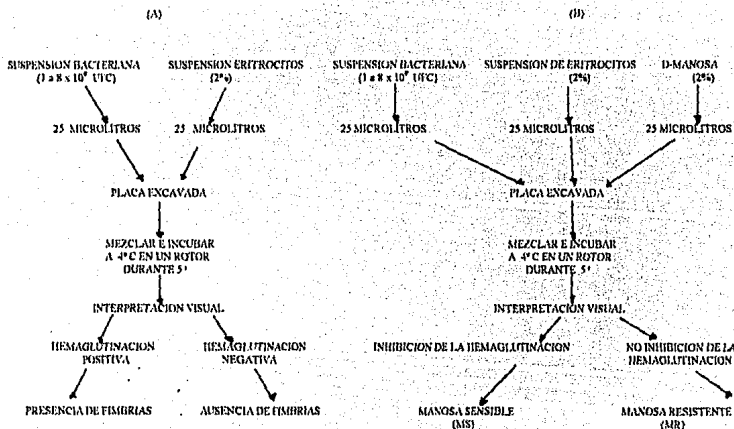
Esquema No. 1

DIAGRAMA DE TRABAJO



Esquema No. 2

DIAGRAMA DE HEMAGLUTINACION (A)
 DIAGRAMA DE INHIBICION DE LA HEMAGLUTINACION (B)



Nota: La inhibición se realiza sólo a las cepas que dieron hemaglutinación positiva en el diagrama (A)

Esquema No. 3

RESULTADOS

Selección de la paciente:

Se estudiaron 330 pacientes embarazadas, sin importar su edad gestacional o sus manifestaciones clínicas. 180 pertenecían al Instituto Nacional de Perinatología (INPer) y 150 al Hospital Juárez de México (HJM), como se muestra en la gráfica 1.

Aislamiento de cepas de *E. coli* uropatógenas en ITU sintomática y asintomática.

En este trabajo se estudiaron 330 pacientes, aislándose 44 cepas de Escherichia coli las cuales fueron encontradas especialmente en pacientes sintomáticas como se observa en la gráfica 2A. El mayor número de ellas pertenecen a la población estudiada en el INPer como se observa en la gráfica 2B.

Frecuencia de cepas de E. coli uropatógenas manosa resistente y manosa sensible.

Las cepas manosa resistentes (MR) son las que se observan con más frecuencia entre las E. coli uropatógenas aisladas, como se muestra en la gráfica 3, encontrándose que la mayoría de ellas provienen de pacientes sintomáticas como se muestra en la gráfica 4. Se puede ver que en ambos hospitales se observa la mayor frecuencia de cepas de manosa resistente entre las aisladas provenientes de la población sintomática, los datos se observan en la gráfica 5 siendo los resultados más evidentes entre la población del Hospital Juárez de México.

Distribución de cepas hemolíticas uropatógenas.

La mayor parte de las cepas de E. coli uropatógenas, aisladas de infección del tracto urinario bajo, no fueron hemolíticas en este trabajo como se observa en la gráfica 6.

Por otro lado, se puede ver en la gráfica 7, que la distribución de cepas hemolíticas fue similar entre las que provenían de pacientes sintomáticas y asintomáticas.

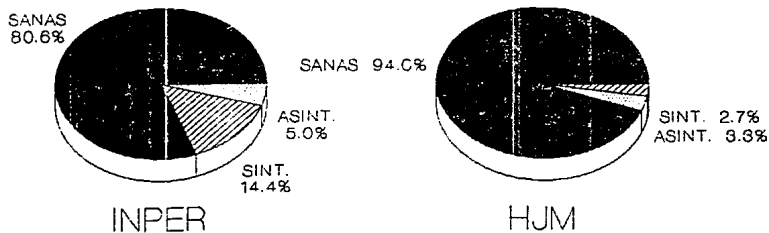
Se observa que entre las cepas de las pacientes del INPer no hay diferencia alguna en la distribución de cepas hemolíticas y no hemolíticas de acuerdo a la sintomatología del paciente. En las cepas aisladas en el Hospital Juárez de México la mayor parte de cepas hemolíticas provenían de pacientes asintomáticas como lo muestra la gráfica 8.

Correlación entre hemólisis y sensibilidad a la manosa en cepas de E. coli uropatógenas.

La producción de hemólisis no presentan ninguna diferencia con respecto a la resistencia a la manosa. En efecto, en la gráfica 9 se observa que entre las cepas manosa resistentes, el porcentaje de cepas hemolíticas y no hemolíticas es similar.

En el caso de las cepas aisladas de pacientes del Hospital Juárez de México la mayor parte de cepas hemolíticas pertenecen al grupo de E. coli manosa resistente, en el caso de las pacientes aisladas del INPer las cepas hemolíticas pertenecen al grupo de manosa sensible y manosa resistente, en el caso de las aisladas de pacientes del INPer, la distribución de E. coli hemolíticas es muy similar entre las cepas manosa sensible y manosa resistentes como se observa en la gráfica 10.

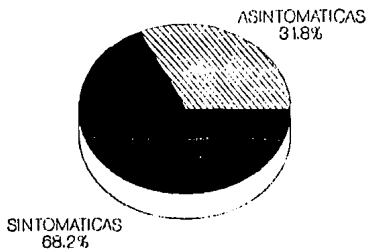
FRECUENCIA DE I.T.U. SINTOMATICAS Y ASINTOMATICAS EN EL INPER Y HJM.



INPER: INSTITUTO NAL. DE PERINATOLOGIA
HJM: HOSPITAL JUAREZ DE MEXICO
INPER N=180 HJM N=150

GRAFICA 1

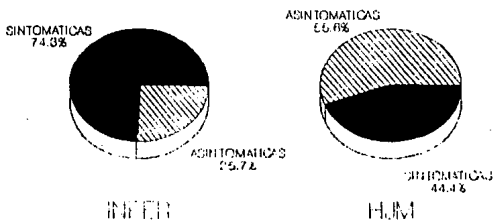
**DISTRIBUCION DE *E. coli* UROPATOGENAS
EN PACIENTES EMBARAZADAS**



SINTOMATICAS N=30 ASINTOMATICAS N=14
TOTAL N=44

GRAFICA 2A

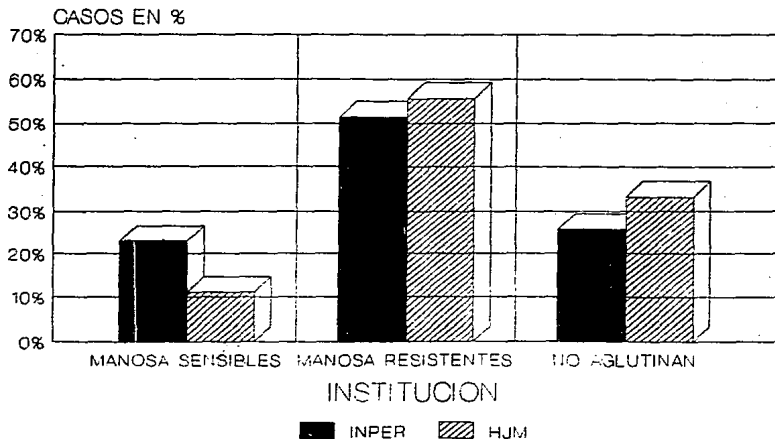
**DISTRIBUCION DE *E. coli* UROPATOGENAS
EN PACIENTES EMBARAZADAS
EN EL INPER Y HJM.**



INPER INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGIA
HJM HOSPITAL GUERRERO DE MEXICO.
INPER N=25 HJM N=9 T=44

GRAFICA 2B

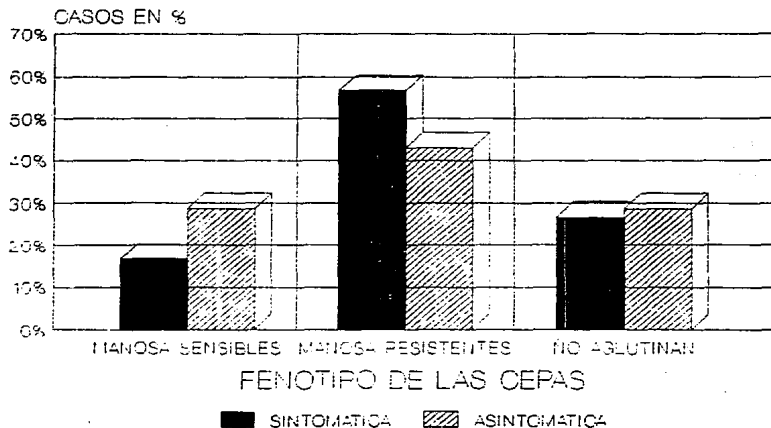
E. coli UROPATOGENAS MANOSA SENSIBLES Y MANOSA RESISTENTES EN EL INPER Y EL HJM



INPER. INSTITUTO NAL. DE PERINATOLOGIA
HJM. HOSPITAL JUAREZ DE MEXICO
INPER N=35 HJM N=9 T=44

GRAFICA 3

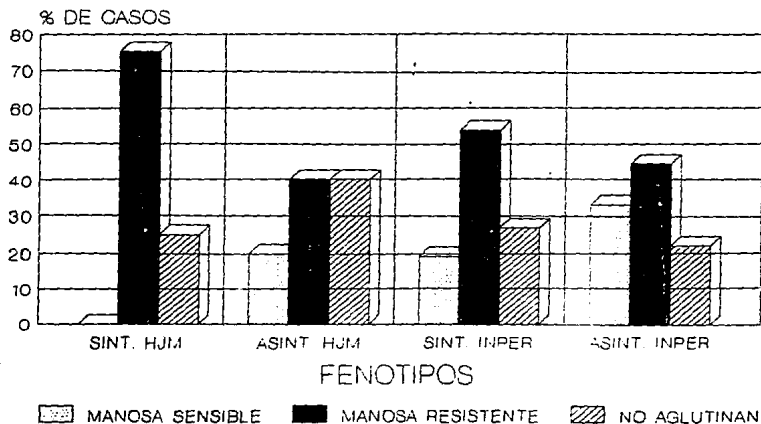
***E. coli* UROPATOGENAS MANOSA RESISTENTES
Y MANOSA SENSIBLES EN PACIENTES
SINTOMATICAS Y ASINTOMATICAS**



SINTOMATICAS N=30
ASINTOMATICAS N=14

GRAFICA 4

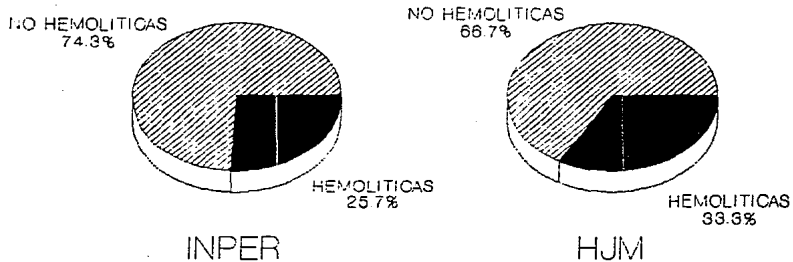
FRECUENCIA DE CEPAS DE *E. coli* UROPATOGENAS EN PACIENTES SINTOMATICAS Y ASINTOMATICAS EN EL INPER Y EL HJM.



ASINTOMATICAS INPER N=9 HJM N=5
SINTOMATICAS INPER N=26 HJM N=4

GRAFICA 5

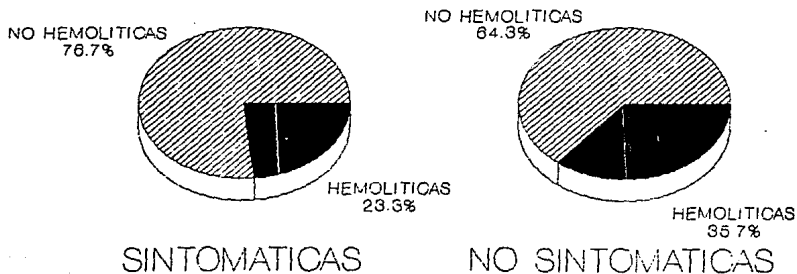
DISTRIBUCION DE *E. coli* UROPATOGENAS HEMOLITICAS, POR INSTITUCION



INPER. INSTITUTO NAL. DE PERINATOLOGIA
HJM. HOSPITAL JUAREZ DE MEXICO.
INPER N=35 HJM = 9 T=44

GRAFICA 6

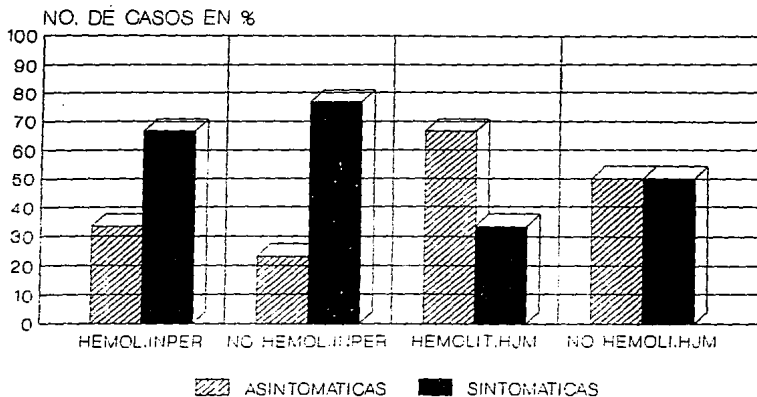
DISTRIBUCION DE CEPAS DE *E. coli*
HEMOLITICAS UROPATOGENAS EN PACIENTES
SINTOMATICAS Y ASINTOMATICAS.



SINTOMATICAS N=30
ASINTOMATICAS N=14

GRAFICA 7

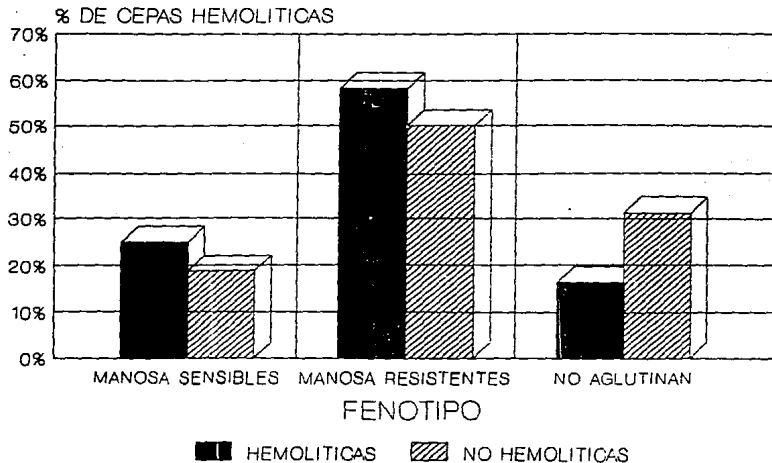
CORRELACION DE CEPAS HEMOLITICAS EN PACIENTES SINTOMATICAS Y ASINTOMATICAS EN EL INPER Y EL HJM.



HJM HOSPITAL JUAREZ DE MEXICO
 INPER INSTITUTO NAL. DE PERINATOLOGIA
 INPER H+ N=26 H- N=9 HJM H+ N=3 H- N=6

GRAFICA 8

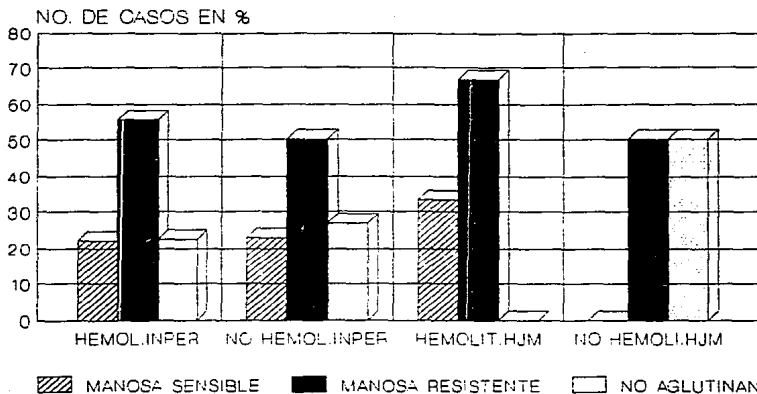
CORRELACION ENTRE CEPAS DE *E. coli* MANOSA SENSIBLES Y MANOSA RESISTENTES



HEMOLITICAS N=12 NO HEMOLITICAS N=32

GRAFICA 9

CORRELACION DE CEPAS HEMOLITICAS MANOSA RESISTENTES Y MANOSA SENSIBLES EN EL INPER Y EL HJM.



HJM HOSPITAL JUAREZ DE MEXICO
 INPER INSTITUTO NAL. DE PERINATOLOGIA
 INPER H+ N=26 H- N=9 HJM H+ N=3 H- N=6

GRAFICA 10

DISCUSION

El porcentaje de pacientes con bacteriuria durante el embarazo encontradas en el HJM, concuerda con lo reportado en la literatura, el cual varía entre el 3 y el 8%, mientras que la frecuencia de pacientes con bacteriuria durante el embarazo en el INPer fue mucho mayor, lo cual puede explicarse porque éste es un Instituto especializado en la atención de embarazos de alto riesgo. Los índices de prevalencia de bacteriuria durante la gestación fueron de 19.4% en el INPer y del 6.0 en el HJM gráficas 1, 2A y 2B.

La mayoría de las pacientes con infección del tracto urinario bajo encontradas en el INPer fueron sintomáticas, mientras que en el HJM la mayoría no refirió presentar sintomatología, observándose una relación inversa entre los dos hospitales, posiblemente debido al tipo de pacientes, ya que a pesar de ser embarazadas unas son de alto riesgo y otras de población abierta.

La frecuencia de bacteriuria sintomática en el INPer no concuerda con lo reportado en la literatura, lo cual es del 20 al 40% mientras que en el HJM esta frecuencia sí coincide (8). Estas diferencias, así como la frecuencia, son difíciles de evaluar ya que pueden ser muy subjetivas y estar en muchos casos sujetas a la interpretación de las pacientes; no obstante, estas diferencias (gráfica 2B) pueden explicarse debido a que la población del INPer presenta diferentes complicaciones como pueden ser: Hipertensión arterial, diabetes, problemas cardíacos, problemas renales, etc., que ocasionaría que estas pacientes, con cualquier síntoma por pequeño que éste fuera, lo notifican al médico quien las clasifica de una manera diferente a como se clasificaron las provenientes del HJM, las cuales no manifestaban ningún síntoma fuera de lo que sería el embarazo en sí.

En este trabajo no se evaluaron estas complicaciones, ya que sólo se deseaba conocer la frecuencia de cepas de E. coli uropatógenas MR y MS y su asociación con la producción de hemólisis.

En la literatura se ha reportado que la bacteriuria asintomática es un factor de riesgo durante el embarazo teniendo como complicación, bajo peso al nacer, parto pretérmino, ruptura prematura de membranas, etc., por lo que se recomienda que la búsqueda de bacteriuria asintomática debe realizarse entre las pruebas de escrutinio. Como se muestra en la gráfica 2 el porcentaje de bacteriuria asintomática en una población abierta como es la que asiste al Hospital Juárez de México, es considerable, y por otro lado, se sabe que un porcentaje elevado de ellas van a desarrollar bacteriuria sintomática durante el embarazo y en ocasiones llegar a pielonefritis, sino se prevé esta manifestación clínica.

La mayoría de las cepas de E. coli uropatógenas presentan la característica de resistencia a la manosa, encontrándose que un 57% de ellas provienen de bacteriuria sintomática y un 43% de bacteriuria asintomática, lo cual coincide con lo reportado en la literatura (19), que hace referencia a las cepas manosa resistente, pensando que la fimbria P es la que se encuentra en mayor proporción en este fenotipo y están más asociadas a bacteriuria sintomática; en este caso se habla de cistitis cuyo porcentaje es medio y un porcentaje más alto a pielonefritis, las cuales podrían tener mayor posibilidad de alcanzar el riñón y adherirse a las células renales (19, 42).

En este trabajo se observa que algunas cepas de E. coli fueron manosa sensible, encontrándose especialmente en pacientes asintomáticas, lo cual era de esperarse si se tiene en cuenta lo reportado en la literatura (19,23,24,42), que se refiere a que las cepas con fenotipo manosa sensible poseen la fimbria tipo 1 la cual se adhiere únicamente a células de vejiga y a la proteína de Tamm-Horsfall, aunque su relación con la pielonefritis no está totalmente clara.

La alta frecuencia de cepas MR en pacientes con bacteriuria asintomática (gráficas 3,4,5) como ya se mencionó, es un factor de riesgo importante, no obstante cabe mencionar que la clasificación de bacteriuria sintomática y asintomática no está adecuadamente sustentada por las razones ya mencionadas; sin embargo, la frecuencia de cepas es un factor de virulencia importante en la población estudiada.

Asociación de las cepas de E. coli uropatógenas con la producción de hemólisis.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que no hay ninguna correlación entre la producción de hemólisis y la sintomatología de la paciente, ni con el tipo de población estudiada (gráficas 6,7,8). Debe considerarse que las cepas aisladas en este trabajo provienen de muestras de infección del tracto urinario bajo y no del alto (pielonefritis y urosepsis); consecuentemente, estos resultados concuerdan con lo reportado en la literatura (4,16,38), que hace mención a que la producción de hemólisis es frecuente en cepas provenientes de septicemia o de ITU alto; no obstante debe tenerse en cuenta que en el embarazo la paciente se considera como un hospedero comprometido (22,38), por lo que sería importante evaluar más a fondo la frecuencia de la infección de vías urinarias y su asociación en mujeres embarazadas y no embarazadas.

Entre las cepas manosa resistente no se observa diferencia importante en la producción de hemólisis (gráficas 9,10). Sin embargo, se observa que el 58% de las cepas hemolíticas son manosa resistente, en el Hospital Juárez de México la mayoría de cepas hemolíticas fueron manosa resistente, aunque debido a las diferencias del número de cepas obtenidas en las dos poblaciones es difícil valorar la correlación de estos dos marcadores.

Los resultados encontrados en este trabajo, hacen notar que la detección de cepas de manosa resistente es un marcador de patogenidad importante; en el caso de bacteriuria

sintomática del tracto urinario bajo, la producción de hemólisis no es por sí solo un marcador de patogenicidad relevante.

Un estudio más profundo de los marcadores de patogenicidad como sería la serotipificación, la producción de aerobactina, la resistencia al suero, etc., ayudaría mejor para asociar a las cepas resistentes con estos factores de virulencia, y no sólo la producción de hemólisis, ya que también hay que tener en cuenta que este marcador está determinado por plásmidos y que éstos pueden transferirse o perderse con facilidad.

CONCLUSIONES

- 1.- La frecuencia de bacteriuria en el embarazo se incrementa en poblaciones de alto riesgo, como la que se atiende en el INPer.
- 2.- En la población estudiada se encuentra un porcentaje considerable de pacientes con bacteriuria asintomática.
- 3.- La bacteriuria asintomática durante el embarazo puede ser una complicación importante y debe ser vigilada. Se considera que debe realizarse un urocultivo antes del tercer trimestre de embarazo.
- 4.- Las cepas de E. coli manosa resistente son las que con mayor frecuencia producen infección de vías urinarias durante la gestación.
- 5.- La bacteriuria asintomática con cepas manosa resistente debe seguirse estrechamente ya que debido a la patogenicidad de las mismas la infección puede evolucionar con mayor facilidad.
- 6.- Debido a la alta capacidad de virulencia de las cepas de E. coli manosa resistente, es importante que se caractericen más a fondo sus marcadores de patogenicidad.
- 7.- La detección de la producción de hemolisinas en cepas uropatógenas durante las enfermedades de vías urinarias bajas, no es por sí sola un marcador de patogenicidad importante.
- 8.- En este trabajo no se observó correlación entre producción de hemolisinas y resistencia a la manosa, porque las cepas no se aislaron de enfermedades de vías urinarias altas o de septicemia.

9.- Se sugiere que los marcadores de patogenicidad que mejor puedan ayudar a la valoración de virulencia de las cepas uropatógenas, son aquéllos codificados en el cromosoma bacteriano.

ANEXO 1

PREPARACION DE SOLUCIONES

SOLUCIONES

1. Amortiguador de fosfatos (PBS):

Cloruro de sodio	8.0 g
Cloruro de potasio	0.2 g
Fosfato de potasio monobásico	0.2 g
Fosfato de sodio dibásico	1.15 g
Agua bidestilada	1.0 g

2. D- Manosa al 2%:

D-Manosa	2.0 g
Agua destilada	100.0 ml

3. Eritrocitos al 2%:

Eritrocitos lavados	0.2 ml
Amortiguador de fosfatos	9.8 ml

Bibliografía

1.- Arana, V.R..

Adherencia de Escherichia coli a eritocitos de diferentes especies.

UNAM. México, (1989)

2.- Arosón, A., Medalia, O., Schori, L., Mirelman, D., Sharon, N. and Ofek, I. "Prevention of colonization of the urinary tract of mice with Escherichia coli by blocking of bacterial adherence with methyl alfa-D-Mannopyranoside". J. Infect. Dis. 139/3/329-332 (1979)

3.- Arredondo, J.L., Calderon, J.E.

Conceptos Clínicos de Infectología.

Décima Edición.

Méndez Editores

México. (1993)

4.- Arthur, M., Johnson, C.E., Rubin, R. H., Arbeit, R. D., Capanelli, C., Kim, C., Steinbach, S., Agarwal, M., Wilkinson, R. and Goldstein, R. "Molecular epidemiology of adhesin and hemolysin virulence factors among uropathogenic Escherichia coli". Infect. Immun. 57/2 /303-313 (1989)

5.- Balows, A., William, J., Hermann, L., Senberg, D. H. and Shadomy, H. J.

Manual of Clinical Microbiology.

Fifth Edition

American Society for Microbiology. Washington. (1991)

6.- Blanco, J., Alonso, M. P., Blanco, M., Blanco, J., González, E. A. and Carbajal, I. J. "Establishment of three categories of P-fimbriated Escherichia coli strains that show different toxic phenotypes and belong to particular O serogroups". FEMS. Microbiol. Lett. 99 /131-136 (1992)

7.- Bertina, B.

Diagnostics procedures for bacterial infections.

7 th. edition

Editorial Board.

Washington. (1987)

8.- Calderon, J.E., Arredondo, J. L.

Infectología perinatal.

1a. Edición

Editorial Trillas.

México. (1991)

9.- Clarridge, J. E., Pezzlo, M. T., Vosti, K. L. "Laboratory diagnosis of urinary tract infections".

Cumitech 2A .1-15.

10.- Davis, B. D., Dulbecco, R., Eisen, N. H., Ginsberg, S. H., Wood, B. W., McCarty, M.

Tratado de Microbiología

2a. Edición

Salvat Editores.

Barcelona. (1978)

- 11- Goldhar, J., Perry, R., Golecki, J. R., Hoschutzky, H., Jann, B. and Jann, K. "Nonfimbrial, mannose-resistant adhesins from uropathogenic Escherichia coli O83: K1 : H4 and O14:K?:H11". Infect. Immun. 55/8/1837-1842 (1987)
- 12.-Goswitz, J. J., Willard, K. E., Eastep, S. J., Shanholzer, C. J., Olson, M. L., Pinnel, M., Singleton, T. and Peterson, L. R. "Utility of slide centrifuge Gram's stain versus quantitative culture for diagnosis of urinary tract infection". Clin. Microbiol. and Infect. Dis. 99/2/132-136 (1992)
- 13.- Huges, C., Hacker, J., Roberts, A. and Werner, G. "Hemolysin production as a virulence marker in symptomatic and asymptomatic urinary tract infections caused by Escherichia coli". Infect. Immun. 39/2/546-551 (1983)
- 14.- Hulla, R., Gillronald, H. P., Minshew, B. and Falkow, S."Construction and expression of recombinant plasmids encoding type 1 or D-mannose-resistant pili from a urinary tract infection Escherichia coli isolate". Infect. Immun. 33/3/933-938 (1981)
- 15.-Hultgren, S.J., Schwan, W. R., Schaeffer, A. J. and Duncan, J.L."Regulation of production of type 1 pili among urinary tract isolates of Escherichia coli". Infect. Immun. 54/ 3/613-620 (1986)
- 16.- Ikahelmo, R., Siitonen, A., Karkkainen, U. and Mekela, P. H. "Virulence characteristics of Escherichia coli in nosocomial urinary tract infection". Clin. Infect. Dis.16/785-791 (1993)
- 17.- Jawetz, E., Melnick, J. L. and Adelberg, E. A.
Manual de Microbiología Médica.
séptima Edición.
El Manual Moderno
México. (1977)

- 18.- Johnson, J. R. "Virulence Factors in Escherichia coli urinary tract infection". Clin. Microbiol. Rev. 4/1/80-128 (1991)
- 19.- Johnson, J. R., Swanson, J. L. and Neill, M. A. "Avian P1 antigens inhibit agglutination mediated by fimbria P of uropathogenic Escherichia coli". Infect. Immun. 60/2/578-583 (1992)
- 20.- Haack, M. B., Roberts, J. A., Baskin, G. and George, P. M. "Maternal immunization with P fimbriae for the prevention of neonatal pyelonephritis". Infect. Immun. 56/1/1-6 (1988)
- 21.- Kallenius, G. and Mollby, R. "Adhesion of Escherichia coli to human periturethral cells correlated to mannose-resinant agglutination of human erythrocytes". FEMS. Microbiol. Lett. 5/295-299 (1979)
- 22.- Kass, E. H. and Zinner, S. H. "Bacteriuria y pielonefritis en el embarazo".
- 23.- Klemm, P. "Fimbrial adhesins of Escherichia coli". Rev. Infect. Dis. 7/3/321-340 (1985)
- 24.- Klemm, P., Orskov, I. and Orskov, F. " F7 and type 1-like from three Escherichia coli strains isolated from urinary tract infections:protein chemical and immunological aspects". Infect. Immun. 36/2/462-468 (1982)
- 25.- Koneman, E. W., Allen, S. D., Dowell, R. V. and Sommers, M. H.
Diagnóstico Microbiológico
Editorial Médica Panamericana
(1989)

- 26.- Korhonen, T. K., Parkkinen, J., Hacker, J., Finne, J., Pere, A., Rhen, M. and Holthofer, H. "Binding of Escherichia coli S fimbriae to human kidney epithelium". Infect. Immun. 54/2/322-327 (1986)
- 27.- Krogfelt, K. A. "Bacterial Adhesion: Genetics, Biogenesis, and role in pathogenesis of fimbrial adhesins of Escherichia coli". Rev. Infect. Dis. 13/721-735 (1991)
- 28.- Kumate, J. y Muñoz, O.
Manual de Infectología
13a. Edición
México (1992)
- 29.- Leffler, H. and Svanborg, E. C. "Chemical identification of a glycosphingolipid receptor for Escherichia coli attaching to human urinary tract epithelial cells and agglutinating human erythrocytes" FEMS Microbiol. Lett. 8/127-134 (1980)
- 30.- Lidin, G. J., Hanson, L. A., Kaijser, B., Lincoln, U., Lindberg, U., Olling, S. and Medel, H. "Comparison of Escherichia coli from bacteriuric patients with those from feces of healthy schoolchildren". J. Infect. Dis. 136/3/ 346-353 (1977)
- 31.- Ofek, I., Mirelman, D., Sharon, N. "Adherence of Escherichia coli to human mucosal cells mediated by manose receptors". Nature. 265/17/823-825 (1977)
- 32.- O'Hanley, P., Lark, D., Normark, S., Falkow, S. and Shoollnik, G. K. "Manose-Sensitive and gal-gal bindings Escherichia coli pili from recombinant strains". J. Exp. Med. 158/1713-1719 (1983)

- 33.- Olson, M. L., Shanholzer, C. J., Willard, K. E. and Peterson, L. R. "The slide centrifuge Gram stain as a urine screening method". Clin. Microbiol. Infect. Dis. 95/4/454-458 (1991)
- 34.- Pattenson, F. T. and Andriole, T. V. "Bacteriuria in Pregnancy". Infect. Dis. Clin. 1/4/807-822 (1987)
- 35.- Riegman, N., Kudtens, R. Veggel, V., H. Bergmans, H. Bergen, V. P., Hacker, J. and Ivan, D. I. "FIC fimbriae of uropathogenic Escherichia coli strain: Genetic and functional organization of Foc gene cluster and identification of minor subunits". J. Bacteriol. 172/2/1114-1120 (1990)
- 36.- Shanholzer, C. J., Schaper, P. J. and Petherson, L. R. "Concentrated Gram stain smears prepared with a cytospin centrifuge". J. Clin. Microbiol. 16/6/1052-1056 (1982)
- 37.- Stamm, W. E., Mckevitt, M., Roberts, P. L. and White, N. J. "Natural history of recurrent urinary tract infections in women". Rev. Infect. Dis. 13// 77-84 (1991)
- 38.- Stenquist, K., Nilsson, D., Silin-Janson, G. L. K., Odena, R. and Svanborg-Eden, C. "Bacteriuria in pregnancy frequency and risk of acquisition". Am. J. Epidemiol. 129/2/372-379 (1989)
- 39.- Svanborg, E. C. and Man, P. "Bacterial virulence in urinary tract infection". Infect. Dis. Clin. of North America. 1/4/731-750 (1987)
- 40.- Vaisanen, V., Tallgren, L. G., Makela, H. P., Kallentus, G., Hultberg, H., Elo, J., Siitonen, A., Svanbor, E. C., Svenson, S. B. and Korhonen, T. "Mannose-resistant haemagglutination and P antigen recognition are characteristic of Escherichia coli causing primary pyelonephritis". Lancet 19/26/1366-1369 (1981)

- 41.- Van Den Bosch, J. F., Verboom, S. U., Postma, P., Graaff, J. and Maclaren, D. M. "Mannose-sensitive and mannose-resistant adherence to human uroepithelial cells and urinary virulence of Escherichia coli". Infect. Immun. 29/1/226-233 (1980)
- 42.- Virkola, R. "Binding Characteristics of Escherichia coli type 1 fimbriae in the human kidney". FEMS. Microbiol. Lett. 40/257-262 (1987)
- 43.- Virkola, R., Westerlund, B., Holthofer, H., Parkkinen, J., Kekomaki, M. and Korhonen, T. K. "Binding Characteristic of Escherichia coli adhesins in human urinary bladder". Infect. Immun. 56/10/2615-2622 (1988)
- 44.- Welch, R. A. Dellinger, P., Minshen, B. and Falkow, S. "Haemolysin contributes to virulence of extra-intestinal E. coli infections". Nature 294/17/ 665-667 (1981)
- 45.- Williams, J. D., Reeves, D. S., Condie, A.P. and Brumfitt, A.
Significance bacteriuria in pregnancy.
Infections of the urinary tract
University of Chicago Press. (1978)