



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**DETERMINACIÓN DE LA
CAPACIDAD ADHERENTE
DE CEPAS DE *Escherichia coli*
AISLADAS DE INFECCIONES
DEL TRACTO URINARIO.**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACEÚTICA BIÓLOGA
P R E S E N T A:

ALICIA IBARRA LÓPEZ



México, D.F. a

2007.



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 esta 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	PROFA. LILIA VIERNA GARCÍA
VOCAL	PROF. LUCIANO HERNÁNDEZ GÓMEZ
SECRETARIO	PROF. ANGEL H. MANJARREZ HERNÁNDEZ
1er. SUPLENTE	PROF. GONZALO CASTILLO ROJAS
2°. SUPLENTE	PROF. JOSÉ IGNACIO PÁRAMO RAMÍREZ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

FACULTAD DE MEDICINA, UNIDAD DE POSGRADO.

Dr. Angel H. Manjarrez H.
ASESOR DEL TEMA

M. en C. Sandra Gavilanes P.
SUPERVISOR TÉCNICO

Alicia Ibarra López
SUSTENTANTE

DEDICATORIA

CON CARIÑO A MIS MÁS GRANDES AMORES:

GERARDO, ANA MARÍA, ISAAC Y OMAR.

AGRADECIMIENTOS

*A mis padres y hermano:
por el amor,
la paciencia y comprensión,
todos estos años.*

*A Omar:
por todas las alegrías y
bellos momentos
que hemos compartido juntos.*

*A toda la gran familia:
por su apoyo y confianza.*

*A mis mejores amigos:
(Dulce, Sandra, Ivone y Martín)
por las tantas experiencias y
recuerdos vividos en
nuestra segunda casa,
la Facultad de Química.*

*Al Dr. Angel Manjarrez y a la M. en C. Sandra Gavilanes:
Por su gran apoyo y dedicación, para que llevara a cabo
la realización de este trabajo.*

RESUMEN

Escherichia coli uropatógena es el microorganismo aislado con mayor frecuencia de pacientes con infecciones del tracto urinario (ITU). Estas bacterias despliegan una variedad de factores de virulencia que le ayudan a colonizar la mucosa y a persistir dentro del tracto urinario. La expresión de adhesinas por parte de las cepas UPEC, más que la expresión de toxinas u otros factores de virulencia, es el determinante de patogenicidad más importante. En el presente estudio, se trabajó con 51 cepas aisladas de pacientes Mexicanos con ITU, en las cuales se determinó la presencia de genes que codifican para adhesinas (*fimH*, *papC*, *sfa*, *afa*) y el gen sideróforo aerobactina (*aer*) por medio de la técnica de PCR, además se investigó la capacidad de adherencia de estas cepas a células epiteliales de vejiga humana *in vitro*. Encontramos el gen *fimH* en la mayoría de las cepas aisladas y una baja frecuencia de los genes *papC* y *sfa*, esta última es una posible razón de la baja incidencia de pielonefritis reportada en México. En el ensayo de adherencia, prácticamente todas las cepas mostraron alta capacidad de adherencia a las células cultivadas, (el 63% de las cepas presentaron más de 10 bacterias adheridas/célula). Este resultado y la disminución en la adherencia producido por manosa nos indica que la adhesina fim H juega un papel primordial en la adherencia de nuestros aislados a las células de vejiga T24. Nuestros resultados sugieren que las cepas UPEC poseen adhesinas no identificadas.

Los serogrupos más frecuentes dentro de los aislados fueron: O1, O8 y O25; los cuales fueron diferentes a los serogrupos mas frecuentes encontrados en otros países. La identificación de las principales adhesinas (proteínas bacterianas que median la adherencia a la mucosa del tracto urinario) sería de gran utilidad en el diseño y desarrollo de una vacuna, y en el establecimiento de un método diagnóstico.

ÍNDICE

	PÁGINAS
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	
2.1 Epidemiología	2
2.2 Patogénesis	3
2.3 Factores de Virulencia de UPEC	5
2.3.1 Aerobactina	6
2.3.2 Adherencia bacteriana	7
2.3.3 Adhesinas	8
2.3.4 Pili tipo 1	10
2.3.5 Pili P	13
2.3.6 Pili S/F1C	16
2.3.7 Familia de adhesinas Dr	17
2.3.8 Regulación de la adherencia de UPEC	18
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20
4. HIPÓTESIS.	22
4.1 Objetivo General	22
4.2 Objetivos Particulares	22
5. DISEÑO EXPERIMENTAL	23
6. MATERIALES Y MÉTODOS.	
6.1 APARATOS.	24
6.1.1 Electroforesis en geles de agarosa	24
6.1.2 Centrifugación	24
6.1.3 Varios	24
6.2 MATERIALES	24
6.2.1 Reactivos	24
6.2.2 Células	25
6.2.3 Medios de cultivo	26

	PÁGINAS
6.3 MÉTODOS	27
6.3.1 Cultivo bacteriano	27
6.3.2 Cultivo celular	27
6.3.3 Cultivo bacteriano para el ensayo de adherencia.	27
6.3.4 Ensayo de adherencia a células T24.	28
6.3.5 Método de obtención de ADN bacteriano.	29
6.3.6 Técnica de PCR	30
7. RESULTADOS	
7.1 Presencia y distribución de genes implicados en la adherencia bacteriana en cepas de <i>E.coli</i> aisladas de ITU.	33
7.2 Presencia y distribución de genes implicados en la adherencia bacteriana en cepas fecales de <i>E. coli</i> no virulentas.	35
7.3 Ensayos de Adherencia.	37
7.4 Ensayos de Adherencia adicionando manosa al 1%.	42
8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.	44
8.1 Adherencia bacteriana y genes implicados.	44
8.2 Aerobactina en cepas aisladas de ITU.	49
8.3 Serogrupos y Serotipos de cepas de <i>E.coli</i> aisladas de ITU.	50
9. CONCLUSIONES	52
10. PERSPECTIVAS	53
11. APÉNDICE. Composición de Reactivos.	54
12. LISTA DE ABEVIATURAS	57
13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

1. INTRODUCCIÓN.

Las Infecciones del Tracto Urinario (ITU) son una de las infecciones bacterianas más frecuentes en todo el mundo, que afectan tanto a la población ambulatoria como a la hospitalizada, resultando en seria morbilidad y representando grandes costos para el diagnóstico y tratamiento médico [3].

Alrededor del 80% de las ITU son causadas por cepas de *Escherichia coli* uropatógena (UPEC) [3], las cuales poseen diversos factores que pueden modular la virulencia bacteriana en el tracto urinario, dentro de los cuales se encuentran principalmente: adhesinas, toxinas, mecanismos de captación de hierro (sideróforos) y la cápsula.

El primer obstáculo encontrado por un uropatógeno dentro del tracto urinario es el efecto de lavado del flujo de la orina. La bacteria que no se adhiera a la superficie uroepitelial será arrastrada hacia fuera de la vejiga antes de que pueda multiplicarse, por tal motivo la característica clave de los uropatógenos es su habilidad para adherirse a la mucosa de la vejiga. Las cepas UPEC expresan distintas adhesinas, las cuales permiten la adherencia a los tejidos del tracto urinario, estas adhesinas sin lugar a dudas son el determinante más importante de la patogenicidad producida por estas cepas.

El presente trabajo es uno de los primeros estudios en México que trata sobre la caracterización de cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con ITU, de la ciudad de México. Se investigó la capacidad de adherencia de estas cepas a células epiteliales de vejiga humana *in vitro*, y se determinó la presencia de los principales genes que codifican para adhesinas y que son reconocidas como factores de virulencia en las cepas UPEC. Con esta

investigación se pretende contribuir al conocimiento y entendimiento de los mecanismos de patogenicidad implicados en este tipo de infecciones.

2. MARCO TEÓRICO.

2.1 Epidemiología.

Las infecciones del tracto urinario ITU afectan a una gran proporción de la población mundial [3], por lo que constituyen un problema importante de salud pública, y de hecho son una de las infecciones bacterianas más frecuentes en humanos [4, 16, 34].

Epidemiológicamente, las ITU se subdividen en infecciones hospitalarias e infecciones en la comunidad. Las infecciones agudas adquiridas en la comunidad son muy comunes y fueron responsables del 10% de las consultas al médico general, con más de 8 millones de visitas médicas al año en los Estados Unidos.

Estas infecciones ocurren en 1-3% de mujeres en edad escolar, e incrementan de manera importante su incidencia con el inicio de la vida sexual durante la adolescencia. La mayoría de las infecciones sintomáticas agudas afectan a mujeres jóvenes. En los Estados Unidos, el 11% de las mujeres de edad ≥ 18 años presentan una ITU cada año. Y alrededor del 25% de las mujeres que han experimentado una ITU aguda, por lo menos tendrán una recurrencia dentro de los próximos 6 meses de haberse presentado la ITU inicial, y algunas otras mujeres presentarán recurrencias múltiples [4].

Las infecciones del tracto urinario sintomáticas agudas son infrecuentes en varones mayores de los 50 años, siendo la uretritis y la prostatitis de mayor frecuencia. La frecuencia de bacteriuria asintomática es similar a la de la infección sintomática y es rara entre hombres menores de 50 años de edad, pero común en mujeres de entre 20 y 50 años [16].

Además de afectar principalmente a las mujeres, las ITU pueden ser una importante causa de morbilidad en niños y adultos mayores. Las ITU afectan por arriba del 10% a la población infantil, y el rango de recurrencia está estimado entre 30 y 40%, en donde la mayoría de las recurrencias se presentan en los primeros 12 meses después de la infección primaria. La mayoría de las ITU recurrentes en niños mayores de 6 meses de edad se presentan en niñas [13]. En algunos estudios, se ha reportado que la bacteriuria asintomática es la infección más común entre mujeres y hombres adultos mayores, encontrándose con tasas de hasta 40 y 50% [16].

Las ITU representan una gran carga económica en la evaluación y tratamiento de los pacientes, con gastos médicos cercanos a los 2000 millones de dólares solamente en los Estados Unidos [4].

En México, pocos estudios se han realizado respecto a la problemática de las ITU, de tal forma que no se conoce su frecuencia en la población mexicana y tampoco se conocen las características de las cepas *E. coli* que con frecuencia son causantes de ITU.

2.2 Patogénesis.

Las infecciones del tracto urinario se definen desde una perspectiva microbiológica, cuando se detectan microorganismos patógenos en orina, uretra, vejiga, riñón o próstata. En la mayoría de los casos, el crecimiento de más de 10^5 microorganismos por mililitro, obtenido de un flujo de orina apropiadamente colectado, sin ser contaminado, es indicativo de infección. Sin embargo, en algunos pacientes sintomáticos, un número menor de bacterias (10^2 - 10^4 / ml) puede significar infección [31].

Las infecciones del tracto urinario se registran ante la presencia de microorganismos en el tracto urinario en número suficiente como para causar o no, sintomatología clínica.

Por su parte, en diversos estudios experimentales se ha demostrado la trascendencia de factores de virulencia entre los microorganismos que ocasionan las infecciones urinarias, destacando las adhesinas, que promueven la adherencia y colonización a las células epiteliales del hospedero, antígeno K que participa en la invasión del tracto urinario, inclusive el lipopolisacárido de las bacterias Gram negativas, que induce severas reacciones inflamatorias locales y facilita el ascenso de los agentes causales.

En más del 95% de las infecciones del tracto urinario, especialmente las no complicadas, tal es el caso de *Escherichia coli* uropatógena (UPEC) que es el microorganismo responsable de estas infecciones [4, 16, 22, 39, 40]. El tracto gastrointestinal es el reservorio de *E. coli* a partir del cual la bacteria origina una infección ascendente en el tracto urinario [34, 39]. Otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae* también son capaces de causar ITU, como son: *Proteus sp.*, *Klebsiella sp.*, *Enterobacter sp.*, *Serratia sp.*, además *Pseudomonas sp.* es un agente etiológico importante de las ITU intrahospitalarias. Los microorganismos Gram positivos como: *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus saprophyticus* y *Streptococcus agalactiae* son aislados con menor frecuencia de las ITU [3, 16, 39, 40].

Las cepas UPEC tienen una gran capacidad de adaptación y poseen los factores para colonizar la vejiga, sobrevivir en el tracto urinario y frecuentemente la habilidad para causar daño al tejido. Son un grupo diverso, ya que se han asociado a 17 serotipos (O1:H4, O1:H6, O1:H7, O1:H-, O2:H1, O2:H4, O4:H5, O6:H1, O7:H4, O7:H6, O7:H-, O18a,c:H7, O18a,c:H-, O22:H1, O25:H1, O75:H5, O75:H-); y pertenecen a un número limitado de serogrupos, entre los que se encuentran: O1, O2, O4, O6, O7, O8, O16, O18, O22, O25, O73 y O75 [52].

Las cepas uropatógenas despliegan una variedad de factores de virulencia que le ayudan a colonizar la mucosa y a evadir las defensas del hospedero para permitir la invasión del tracto urinario normalmente estéril. Cierta número de factores de virulencia han sido relacionados con la adquisición o desarrollo de ITU; dentro de los que se encuentran principalmente: adhesinas, mecanismos de obtención de hierro (sideróforos), toxinas y la cápsula [10, 34, 39].

2.3 Factores de virulencia de UPEC

La virulencia es definida como la habilidad de un organismo para causar enfermedad, en un hospedero en particular, la cual resulta del impacto acumulativo de una o más propiedades o factores, que lo caracterizan como un patógeno potencial y de este modo lo distinguen de las cepas comensales. El tracto urinario humano esta protegido contra la invasión bacteriana por las defensas del sistema inmune específicas y no específicas, bajo circunstancias normales; sin embargo, las bacterias que son capaces de invadir el tracto urinario produciendo ITU sintomáticas, están provistas con factores de virulencia para evadir las defensas del hospedero. Dentro de los factores de virulencia de los aislados de UPEC que han sido implicados potencialmente como importantes para establecer una ITU, se encuentran: los factores de adherencia bacteriana como pili tipo 1, familia de adhesinas Dr, pili P, adhesina fimbrial S y la adhesina homóloga IrgA, producción de toxinas como hemolisina, factor citotóxico necrosante tipo 1 (CNF-1), bacteriocina, colicina, proteínas autotransportadores con dominios de serin-proteasas, resistencia a la actividad bactericida del suero principalmente antígenos O y K, producción de moléculas captadoras de hierro como Iron y aerobactina , y proteasas de membrana externa [6, 10, 21, 22, 31, 34, 39, 47].

2.3.1 Aerobactina.

El hierro es necesario por todos los organismos vivos. A pesar de que la concentración de hierro en los fluidos biológicos es de 20 μM , el hierro no está disponible para los microorganismos en el cuerpo, ya que la mayoría del hierro se encuentra formando complejos con proteínas de hierro del hospedero, por ejemplo: lactoferrina, transferrina, proteínas hemo, ferritina. Además, parte de la respuesta del huésped a la infección es limitar la cantidad de hierro disponible a los patógenos invasores, disminuyendo la absorción intersticial de hierro, sintetizando proteínas adicionales que atrapan el hierro y lo transportan del plasma hacia los almacenes intracelulares [39].

El tracto urinario es relativamente inhabitable para que se de la colonización bacteriana. Además, para resistir las fuerzas hidrocinéticas, un patógeno potencial tiene que multiplicarse lo suficientemente rápido para compensar los efectos de dilución de la orina y la constante exfoliación del uroepitelio. Por lo que la capacidad de crecimiento en la orina es esencial para que sobreviva la bacteria. La orina es un fluido complejo, ya que contiene una variedad de productos que se excretan pero es limitante para el crecimiento bacteriano, en parte, porque contiene mínimas cantidades de hierro libre. Esta situación es ventajosa para UPEC si éstas pueden activar su maquinaria para la adquisición de hierro una vez que se encuentran dentro del tracto urinario [1, 39].

Los microorganismos son capaces de procurarse hierro para sus actividades metabólicas mediante la elaboración de sustancias que secuestran el hierro llamadas sideróforos. *E.coli* produce dos tipos de sideróforos: enteroquelinas (fenolatos) y aerobactina (hidroxamatos). Estas sustancias son secretadas al medio en donde forman complejos activos con los iones Fe^{3+} y los transportan a través de la membrana bacteriana.

En UPEC el sideróforo hidroxamato (Aerobactina) es el sistema quelante de hierro más efectivo y el más utilizado para la extracción de hierro del hospedero [39].

2.3.2 Adherencia bacteriana.

La habilidad de un patógeno para adherirse a las superficies celulares del hospedero es usualmente un paso necesario en la colonización exitosa y finalmente en la producción de la enfermedad. Esto es particularmente importante en áreas tales como la boca, intestinos y la vejiga donde las superficies de las mucosas son lavadas por los fluidos. En estas áreas, solo las bacterias que pueden adherirse a las superficies de las mucosas serán capaces de quedarse en el sitio [15,37].

La colonización de los tejidos del hospedero esta mediada por adhesinas en la superficie de la bacteria; las adhesinas son las responsables del reconocimiento y de la unión a receptores específicos en las células hospederas [39]. El evento de unión al receptor puede activar cascadas de transducción de señales en las células hospederas que pueden tener diversas consecuencias incluyendo la activación de las defensas innatas del hospedero o la presentación de procesos celulares que facilitan la colonización o invasión bacteriana. Además, el proceso de unión también puede activar la expresión de nuevos genes en la bacteria que son importantes para el proceso patogénico. En algunos casos, las adhesinas están directamente asociadas dentro de apéndices parecidos a pelos llamados pilis o fimbrias que se extienden hacia fuera de la superficie bacteriana. En otros casos, las adhesinas están directamente asociadas con la superficie celular microbiana (llamadas adhesinas no fimbriales). Al menos cuatro distintos mecanismos han surgido en años recientes para describir el ensamblaje de estos diversos organelos, siendo la vía de chaperona- usher la más documentada [37].

La bacteria se adhiere solo con sustratos complementarios. Se adhieren por interacciones iónicas o coulombicas, por puentes de hidrógeno y por compuestos de coordinación involucrando iones metálicos multivalentes. Frecuentemente, la adhesión es altamente estereo-específica en la que la bacteria se unirá a un sustrato sólo si el sustrato posee cierto tipo de receptor [37].

El potencial de la bacteria para adherirse a un sustrato en particular no es suficiente para iniciar la colonización, ya que factores como los requerimientos nutricionales y la resistencia a presiones físicas y químicas también son importantes [37].

El proceso de adhesión es probablemente un componente de factores que incluyen presentación, orientación, y accesibilidad de los receptores y las adhesinas en las superficies de las bacterias y el sustrato, respectivamente. El proceso de adhesión requiere de la participación de un número de constituyentes que interactúan de manera secuencial para evitar las fuerzas de repulsión. Además, los componentes de la superficie aparte de las adhesinas interfieren con la accesibilidad de éstas y el éxito de la adhesión depende de la expresión y la regulación de estas moléculas que interfieren [37].

2.3.3 Adhesinas.

El término adhesión describe una interacción específica de las proteínas de reconocimiento bacteriano (adhesinas) con glicoproteínas o glicolípidos de las células de mamíferos. La mayoría de las infecciones bacterianas son iniciadas por la adhesión de los patógenos a las células epiteliales del hospedero. Algunas de las ventajas de la adhesión para los patógenos son: la resistencia a los efectos de lavado y limpieza por parte de los fluidos corporales, la posición cercana a las células blanco para que la bacteria produzca exotoxinas, mejor adquisición de nutrientes a partir de los distintos sustratos y una mejor

protección de las defensas del hospedero [37, 39, 44]. Además, la adhesión es un prerequisite para la penetración de un microorganismo invasivo [15, 39].

Las bacterias ensamblan adhesinas en su superficie como monómeros, oligómeros simples, o componentes de fibras supramoleculares llamadas fimbrias o pilis. Los organelos adhesivos más comúnmente asociados con UPEC incluyen: pili tipo 1, P, S/F1C y la familia de adhesinas Dr [34, 35].

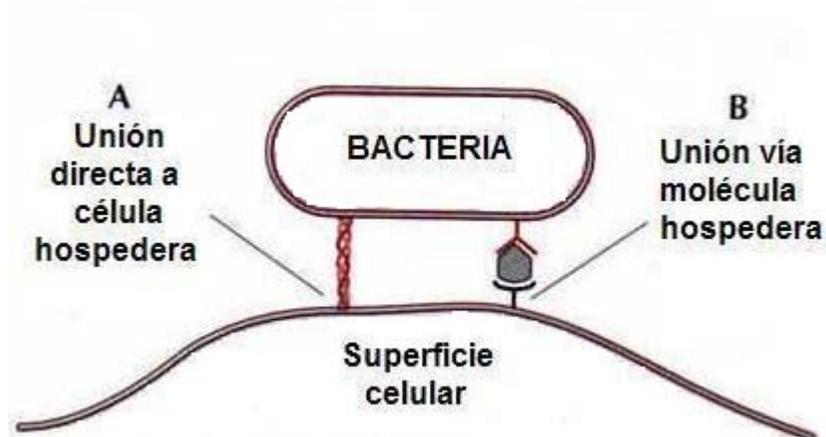


Fig.A. Adherencia bacteriana a células hospederas. Las bacterias pueden adherirse a las superficies de las células hospederas directamente a través de las adhesinas ancladas a la superficie bacteriana o indirectamente por la unión a un componente soluble del hospedero que también sirve como un puente entre la adhesina bacteriana y el receptor natural del hospedero para esa molécula. [37]

2.3.4 Pili tipo 1.

De todas las adhesinas codificadas por UPEC, el pili tipo 1, también llamado fimbria tipo 1, es el más prevalente. Estos organelos son fibras compuestas que varían desde unas fracciones de micra a varias micras de medida. Estos organelos consisten de filamentos delgados en hélice de 7 nm, conformados por subunidades repetitivas de FimA, acopladas a hebras cortas de 3 nm que contienen la adhesina FimH y 2 proteínas adaptadoras, FimF y FimG [15, 24, 32, 34, 35, 44].

La unión al carbohidrato que se encuentra localizado en la cavidad distal del dominio de la adhesina puede mediar las interacciones bacterianas con una variedad de receptores glicoproteicos que contienen manosa y son expresados por un gran número de diferentes tipos de células hospederas [34, 35].

El dominio de la adhesina adquiere una estructura de barril β . Este dominio está conectado con el dominio de pilina vía un ligando que provee de óptima flexibilidad para posicionarse correctamente y de esa manera unirse a los sitios que contienen manosa de los receptores del hospedero [15, 24, 34, 35, 44].

Además de UPEC, otros aislados de *E.coli* patógenos y comensales, y otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae* codifican para el pili tipo 1. A lo largo de los últimos años, un número de variantes alélicas de FimH naturales y creadas por ingeniería genética, y que difieren en tan poco como en un aminoácido, han sido identificadas por que confieren distintos fenotipos adhesivos para el pili tipo 1. Cambios en los aminoácidos, tanto dentro como fuera del sitio de unión al carbohidrato de FimH, además de alteraciones en la composición de las hebras, han sido encontrados que influyen las características de unión de FimH. Todas las variantes naturales de FimH pueden unirse a estructuras

trimanosa, pero pueden diferir en sus habilidades para unirse a otros receptores con y sin carbohidratos, incluyendo residuos monomanosa, colágeno tipo I y tipo IV, laminina y fibronectina [34].

Alrededor del 80% de los aislados de *E.coli* fecales comensales codifican adhesinas FimH que se unen solo a receptores trimanosa, mientras que el 70% de los aislados de UPEC expresan variantes de FimH con mutaciones que aumentan su afinidad para residuos monomanosa además de receptores trimanosa. La conversión de FimH a formas con mayor afinidad por residuos monomanosa frecuentemente involucra mutaciones del dominio de la adhesina que se ha visto que alteran la conformación y la estabilidad de las asas proteicas que contienen los residuos de interacción con el receptor. El fenotipo de unión a monomanosa prevalente dentro de los aislados de UPEC confiere un alto tropismo por receptores glicoproteicos expresados por células uroepiteliales y aumenta la colonización bacteriana del tracto urinario. Las interacciones bacterianas con las células uroepiteliales mediadas por la FimH son críticas para la habilidad de UPEC de colonizar la vejiga y causar enfermedad. El receptor primario del hospedero para el pili tipo 1 dentro de la vejiga es una proteína integral de membrana conocida como uroplakina 1a (UP1a). Esta proteína, junto con otras tres proteínas (UP1b, UPII y UPIII), están ensambladas dentro de complejos hexagonales de 16 nm que a su vez están organizados dentro de placas de 0.3-0.5 μm de diámetro. Estas placas cubren la superficie luminal entera de la vejiga y se ha pensado que funcionan como parte de una barrera permeable y ayudan a estabilizar las células epiteliales de la vejiga. La expresión de las placas de uroplakina por las células epiteliales superficiales, que delimitan el lumen de la vejiga, hace de estas células el blanco primario para que las UPEC asciendan al tracto urinario. Las interacciones bacterianas con

el glicocálix que cubre la superficie de la vejiga también facilitan la colonización bacteriana del tracto urinario [15, 34, 35].

Además de promover las interacciones, algunas variantes de FimH median contactos interbacterianos, estimulan la autoagregación bacteriana y la formación de biopelículas (del Inglés biofilms). El papel de FimH en estos procesos todavía no es claro, pero parece ser que no son necesariamente dependientes de la capacidad de unión a manosa por parte de la adhesina. FimH podría mediar la autoagregación y la formación de biopelículas, generando que las UPEC sean capaces de resistir mejor a los tratamientos con antibióticos y a las defensas antibacterianas dentro del tracto urinario. Debido a que el pili tipo 1 media en parte la formación de biopelículas podría facilitar la colonización bacteriana de catéteres urinarios y otros implantes médicos, lo cual sería un gran problema para individuos hospitalizados [34].

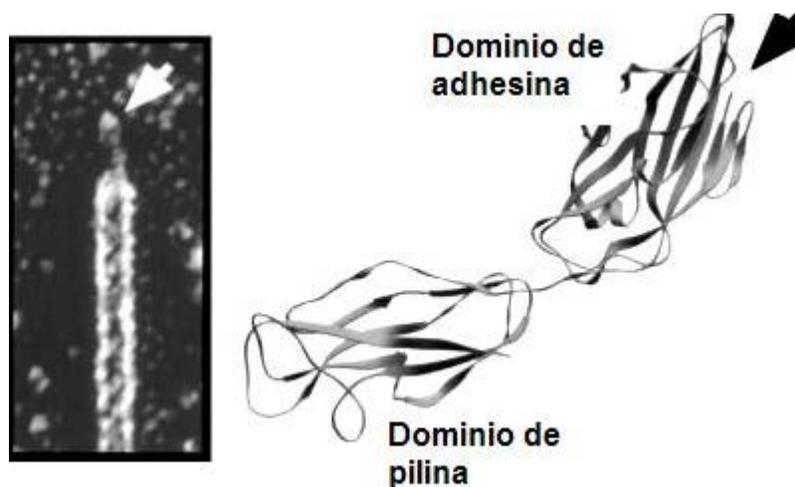


Fig. B. Arquitectura del pili tipo 1 y estructura cristalina de la adhesina FimH. (Izquierda) La microscopía electrónica de alta resolución revela la estructura del pili tipo 1. En el extremo se indica la adhesina FimH. (Derecha) FimH consta de dos dominios, el de adhesina está indicado con una flecha, que es el sitio en donde se une la D-manosa. [35]

2.3.5 Pili P.

Similar al pili tipo 1, el pili P esta compuesto de organelos que consisten en fibras cortas y flexibles unidas a la parte distal del filamento del pili P. El filamento del pili P es de 6.8 nm y esta compuesto de subunidades repetitivas de PapA conformadas en un cilindro helicoidal. En una subunidad designada como PapH esta anclada la hebra de PapA hacia la membrana externa. Las fibras miden alrededor de 2 nm, contienen una adhesina localizada distalmente, PapG, en asociación con otras tres subunidades, PapE, PapF y PapK. PapD, es una proteína chaperona, con un dominio de inmunoglobulina, el cual es necesario para transportar diversas subunidades del pili de la membrana citoplasmática a la membrana externa. PapC acepta las moléculas que transporta PapD y ha sido propuesta que sirve como un adaptador (usher) de membrana externa, el cual forma un poro de secreción en la membrana externa que discrimina selectivamente entre subunidad – chaperona, en un proceso que facilita el ordenamiento del ensamblaje de la subunidad [15, 24, 44]. La adhesina PapG reconoce receptores glicolipídicos expresados por eritrocitos y células hospederas presentes en el riñón. Diversos estudios han indicado que el pili P, y específicamente la adhesina PapG, son significativos factores de virulencia asociados con pielonefritis. El pili P incrementa la colonización del tracto urinario y facilita el establecimiento de bacteriuria por los aislados de UPEC que se sabe que causan bacteriuria asintomática. Estudios epidemiológicos indican que el Pili P es un factor importante en iniciar pielonefritis en tractos urinarios normales, estos organelos adhesivos se ha visto que tienen un papel menos significativo en la colonización del tracto urinario con anormalidades u obstrucciones. La adhesina PapG puede unirse con partículas surfactantes (partículas que disminuyen la tensión superficial en una interfase aire-agua) que son secretadas en los intestinos de humanos y ratones, dentro de los que se encuentran:

pequeñas cantidades de proteínas surfactantes B y D, y grandes cantidades de proteína surfactante A, particularmente en el colon [28]). PapG media las interacciones con estas partículas, y esto capacita a las UPEC para establecer un reservorio dentro de la mucosa intestinal y esto a su vez puede facilitar la persistencia de UPEC dentro de la flora intestinal [15, 34, 49].

El receptor mínimo glicolípido para la adhesina PapG se llama globotriacilceramida o globobiosa (GbO3) y consiste de un digalactósido (Gal α 1 - 4Gal) unido por un residuo β -glucosa (Glc) a un grupo ceramida anclado a un receptor en la membrana. Alteraciones del centro Gal α 1 - 4Gal de GbO3 por la adición de N-acetilgalactosamina (GalNAc) genera GbO4 (globósido), mientras que la modificación con 2 azúcares GalNAc crea GbO5 (antígeno de Forsman). Se han identificado tres variantes distintas de PapG, designadas como: GI, GII y GIII, que reconocen GbO3, GbO4 y GbO5 respectivamente. Diferentes variantes de PapG afectan la especificidad del hospedero de las cepas UPEC pielonefríticas, pero recientemente estudios epidemiológicos han aumentado las dudas acerca de esta posibilidad [15, 24, 34].

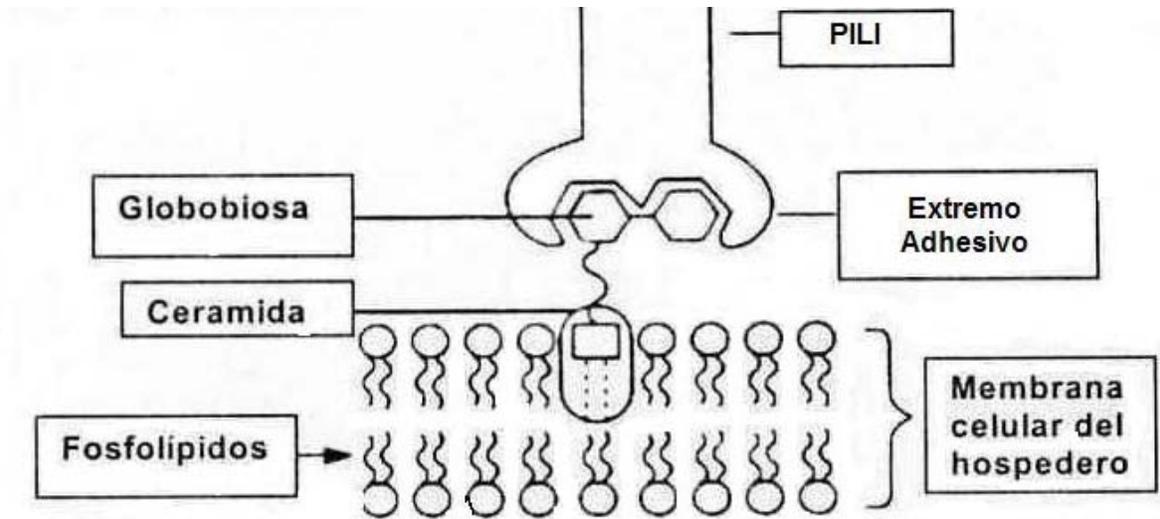


Fig.C. Estructura del receptor glicolípido para pili P. La ceramida sujeta a la membrana y el carbohidrato presente, que está unido por el pili P, es globobiosa.

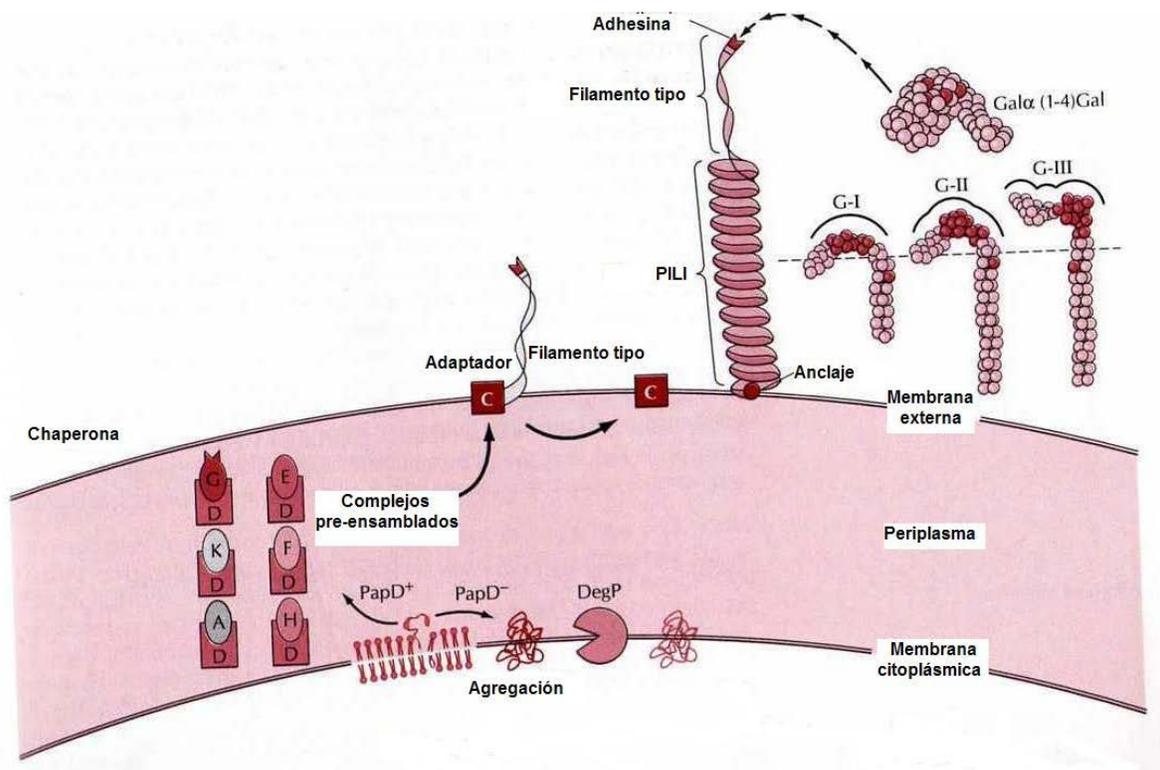


Fig. D. Esquema de la biogénesis del pili P. [37]

2.3.6 Pili S/F1C.

El pili S tiene una arquitectura similar, aunque menos definida que el pili 1 y el pili P. Las fibras del pili S están compuestas de una subunidad mayor SfaA y tres subunidades menores SfaG, SfaH y SfaS. La subunidad SfaS ha sido localizada en el pili S y puede mediar las interacciones bacterianas con residuos de ácido siálico de los receptores expresados en las células epiteliales y endoteliales vasculares del riñón. La subunidad mayor SfaA tiene características de adhesina y puede mediar la adherencia bacteriana a glicolípidos y plasminógeno de células endoteliales. Las subunidades menores, además de la SfaS, también pueden modular las propiedades de unión del pili S. El pili S facilita la diseminación bacteriana dentro de los tejidos del huésped y frecuentemente se ha asociado con cepas de *E.coli* que causan sepsis, meningitis, UTI ascendentes, incluyendo pielonefritis. En un trabajo reciente se demostró que los residuos de ácido siálico están presentes en UP3, una de las cuatro proteínas integrales de membrana uroplakinas que se expresan abundantemente en la superficie luminal de la vejiga, lo cual sugiere que el pili S también podría tener un papel en cistitis [15, 34].

Un número de organelos adhesivos han sido identificados como genéticamente homólogos del pili S, pero difieren en la especificidad de su receptor. Dentro de esas estructuras homólogas se encuentra el pili F1C el cual se une a residuos β -GalNac-1, 4 β -Gal en los glicolípidos expresados por las células epiteliales de los túbulos distales y túbulos colectores del riñón y también a las células endoteliales del riñón y vejiga. El pili F1C está codificado aproximadamente por el 14% de los aislados de UPEC. Esta observación, sobre la especificidad de unión de estos organelos, indica que el pili F1C podría tener impacto sobre la patogénesis de gran número de casos de ITU [15, 34].

2.3.7 Familia de adhesinas Dr.

Este grupo de adhesinas incluye a adhesinas Dr fimbriales asociadas a uropatógenos y a las adhesinas no fimbriales AFA-I, AFA-II, AFA-III, AFA-IV, Nfa-I y Dr-II. Los miembros de la familia de adhesinas Dr son quienes facilitan la colonización ascendente y la infección crónica del tracto urinario. Estudios epidemiológicos indican que cerca de la mitad de los niños con ITU y un 30% de las mujeres embarazadas con pielonefritis son colonizados por UPEC que expresan la adhesina Dr. La infección con cepas de *E.coli* que expresan adhesinas Dr incrementan el riesgo de ITU recurrente. La contribución de Dr como factor de virulencia se debe a que promueve la persistencia bacteriana dentro del tracto urinario. Se ha reportado que las UPEC que codifican para adhesinas Dr pueden sobrevivir por más de un año dentro del parénquima renal. Miembros de la familia de adhesinas Dr reconocen uno o más de 4 de los 60 consensos cortos repetidos de aminoácidos SCR (short consensus repeat), secuencias presentes en el Factor acelerador del consumo (DAF, CD55), que es un receptor complementario ligado a glicosilfosfatidilinositol (GPI) y es un factor de regulación, expresado en eritrocitos y otros tejidos incluyendo el uroepitelio. El aumento en la expresión de DAF en el tracto urinario durante el embarazo tal vez sea el responsable del aumento de la susceptibilidad de infección por UPEC Dr⁺ por mujeres embarazadas. La adhesina Dr es la única de esta familia que reconoce la colágena tipo IV. La interacción con DAF y la posibilidad de otros receptores como la colágena tipo IV y el CD66e, pueden promover la adherencia bacteriana en el compartimiento intersticial del riñón y así facilitar la persistencia dentro del tracto urinario alto [15, 34].

2.3.8 Regulación de la adherencia de UPEC.

La biogénesis de los organelos adhesivos bacterianos en general es un proceso altamente controlado. La expresión variable de los diferentes organelos adhesivos les permite a las UPEC alterar sus características de unión en respuesta a cambios ambientales presentes dentro del hospedero durante el curso de una infección. Potencialmente, esto puede aumentar el número de receptores del hospedero con los cuales las UPEC pueden interactuar durante una ITU y pueden facilitar la diseminación bacteriana dentro del tracto urinario. La modulación de los organelos adhesivos hace posible que las UPEC puedan escapar de la detección rápida por el sistema inmune del hospedero.

Cambios ambientales, incluyendo cambios en la temperatura, osmolaridad, pH, tensión de oxígeno, fuente de carbono y disponibilidad de nutrientes pueden alterar la expresión de adhesinas bacterianas así como la presencia de hierro, aminoácidos alifáticos y otros aceptores de electrones diferentes del oxígeno. Estas señales pueden afectar la biogénesis de las adhesinas a través de proteínas reguladoras que pueden modificar la transcripción de genes que codifican para los pilis y adhesinas. Un gran número de reguladores globales han sido identificados e incluyen factor de integración del hospedero (IHF) y H-NS, proteínas de unión al DNA homólogas a las histonas que frecuentemente median la regulación de temperatura de síntesis de pili. La regulación por fuente de carbono puede ocurrir a través de proteínas activadoras de catabolitos (CAP), mientras que la proteína reguladora que responde a leucina (Lrp) puede modular la expresión del pili en respuesta a aminoácidos alifáticos. Múltiples factores reguladores pueden actuar sobre la misma región promotora, activando la expresión de los genes del pili y adhesina de encendido y apagado (del inglés on a off) y viceversa. Este cambio de encendido a

apagado en la expresión, es conocido como variación de fase, y esta controlado por el estado de metilación de una región promotora (pili P) o por la inversión de elementos de secuencia dentro de la región promotora (pili tipo 1) [17, 34, 38].

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las ITUs son consideradas como las infecciones bacterianas más frecuentes, que afectan a una gran proporción de la población mundial [3]. La mayoría (más del 80%) de las ITUs son causadas por *Escherichia coli* [34], un sorprendente grupo heterogéneo de patógenos. Se piensa que la mayoría de las UPEC se encuentran inicialmente como parte de la flora intestinal, y posteriormente se introducen a través de la uretra hacia la vejiga y los riñones. Las cepas de *E.coli* reflejan adaptaciones evolutivas, cambios que han capacitado a las cepas UPEC para colonizar mejor ambientes únicos y variados encontrados dentro del tracto urinario.

Los aislados de UPEC expresan una variedad de factores de virulencia los cuales normalmente no se encuentran en las cepas comensales de *E. coli* o se encuentran en baja frecuencia. Sin embargo, hasta ahora, ningún factor de virulencia ha demostrado ser único o definitivo de cepas UPEC. Dentro de los factores de virulencia asociados con UPEC se encuentran principalmente: toxinas, adhesinas, sistemas de adquisición de hierro y polisacáridos que forman la cápsula bacteriana [10].

La presencia de adhesinas por UPEC, más que la expresión de toxinas u otros factores de virulencia, es el determinante de patogenicidad más importante [34]. Los genes de adhesinas *fim*, *pap*, *sfa* y *afa*, que codifican para fimbria tipo 1, fimbria P, fimbria S y adhesinas afimbriales, respectivamente, son los factores de adherencia más ampliamente distribuidos y estudiados en cepas UPEC [33]. Las adhesinas son las proteínas mediante las cuales las bacterias se adhieren a las células del hospedero dentro del tracto urinario, dicha adherencia es tan estable que las bacterias evitan ser eliminadas o arrastradas por el flujo rápido de la orina [34]. Las adhesinas le proveen además de un mejor acceso a

fuentes de nutrientes, facilitan la liberación de agentes tóxicos y finalmente la penetración de la bacteria a los tejidos [44].

La vejiga es el sitio primario de infección en alrededor del 95% de todas las ITUs [34]. La adherencia de *E.coli* a las células uroepiteliales es el paso inicial para el desarrollo de las ITUs. Existe la evidencia de estudios en animales que indica que la persistencia de *E.coli* en el riñón y la vejiga esta asociada con su habilidad para adherirse a las células uroepiteliales.

La producción de aerobactina también es un factor de virulencia importante en las UPEC, este es un sistema de captación de hierro, y dado que el hierro no se encuentra de forma libre dentro del organismo hospedero, es importante que las UPEC activen su sistema aerobactina para obtener el hierro necesario para sus diferentes actividades metabólicas y de esta manera tendrán la capacidad de multiplicarse y por lo tanto de sobrevivir dentro del tracto urinario.

Poco se sabe respecto a los factores de virulencia que portan las cepas de *E. coli* causantes de ITUs en la población mexicana. En consecuencia, en el presente trabajo se determinará la habilidad de cepas UPEC de adherirse a células y se determinará la presencia de genes que codifican para adhesinas en cepas de *E. coli* responsables de ITU aisladas de orina de pacientes de la ciudad de México. El conocimiento generado de las características genotípicas y fenotípicas permitirá entender mejor el mecanismo patógeno de dichas bacterias y así proveer herramientas para un diagnóstico certero y un mejor tratamiento.

4. HIPÓTESIS:

La mayoría de las cepas de *E.coli* aisladas de Infecciones del Tracto Urinario se adhieren abundantemente a células de vejiga, en los ensayos de adherencia, a pesar de no poseer los principales genes que codifican para fimbrias o adhesinas (*fimH*, *papC*, *sfa*, *afa*).

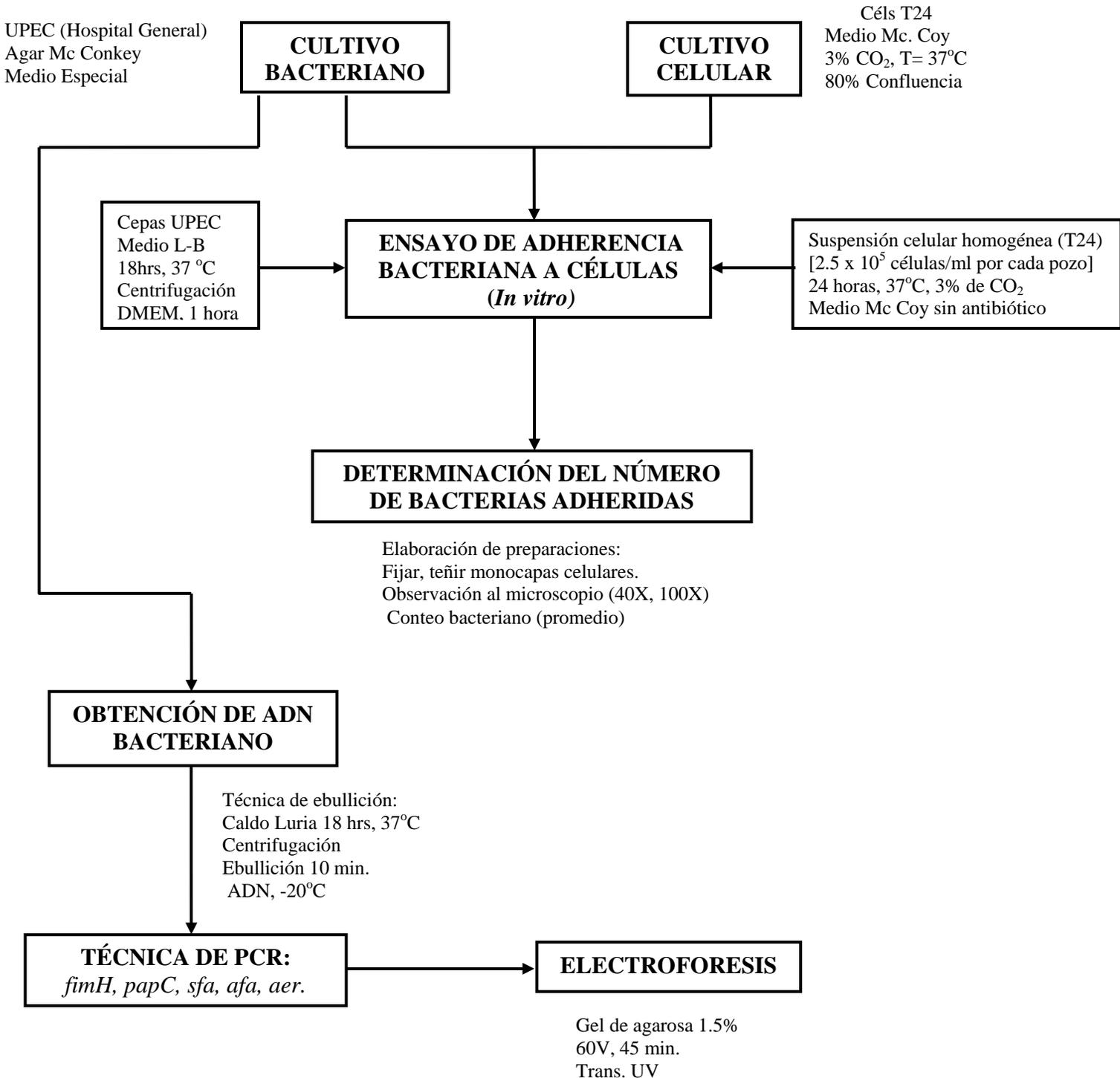
4.1 OBJETIVO GENERAL:

Investigar la capacidad de adherencia a células de vejiga (*in vitro*) de cepas de *Escherichia coli* aisladas de pacientes con infecciones del tracto urinario, y determinar la presencia de genes que codifican para las principales fimbrias de adherencia.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES:

- Determinar la presencia de genes que codifican para adhesinas (*fimH*, *papC*, *sfa*, *afa*) y un sideróforo (*aer*) en las cepas de *E.coli* aisladas de ITU, mediante la técnica de PCR.
- Determinar la capacidad de adherencia de cepas de *E.coli* aisladas de ITU a células epiteliales de vejiga en ensayos de adherencia.
- Analizar los datos sobre la presencia de genes que codifican para adhesinas en las cepas aisladas y su capacidad adherente en los ensayos de adherencia a células de vejiga. Analizar los datos obtenidos con los de cepas de *E. coli* de origen fecal.
- Investigar y analizar los serotipos y serogrupos de cepas UPEC implicados en las ITU en otras partes del mundo y en las cepas de *E. coli* aisladas de ITU de pacientes mexicanos.

5. DISEÑO EXPERIMENTAL.



6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Aparatos

6.1.1 Electroforesis en geles de agarosa: Cámara de electroforesis horizontal (Minicell Primo EC320), Fuente de poder (Pharmacia EPS 3500).

6.1.2 Centrifugación: Centrífuga de mesa para tubos Eppendorf (Sigma 1-15K).

6.1.3 Varios: Incubadora (Fisher, Modelo 230F), Incubadora (Baxter WJ301D Ultra Teach Scientific Products), Campana de flujo laminar (Forma Scientific Inc, Modelo 1839 S/N 15010-453), Refrigerador (Lab- line Instruments, Inc), Transiluminador UV (UVP, Upland, CA 91786 USA), Termociclador (iCycler BIO RAD Thermal Cycler), Microscopio invertido ZEISS West Germany (Modelo 473012-9901), Microscopio CARL ZEISS West Germany (Modelo J08086611).

6.2 Materiales:

6.2.1 Reactivos

- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR): dNTP's mix (Invitrogen), Taq DNA polimerasa (Invitrogen), MgCl₂ (Invitrogen), Buffer PCR 1X (Invitrogen), Marcador de peso molecular [Gene Ruler™ 100pb DNA Ladder (Fermentas)], Oligonucleótidos (Invitrogen).
- Electroforesis en geles de agarosa: agarosa (Bio-Whittaker), TAE (solución reguladora para electroforesis) 10X, buffer de corrimiento TAE 1X, bromuro de etidio (BIO RAD), amortiguador de carga 10X.

6.2.2 Células:

1. Cepas bacterianas:

- 51 cepas de *Escherichia coli* aisladas de la orina de pacientes con infecciones del tracto urinario, en el Hospital General de México. Los pacientes no tuvieron alteraciones morfológicas en el tracto urinario, no estaban embarazadas, y no padecían alguna enfermedad degenerativa grave.

- 20 cepas de *Escherichia coli* fecales aisladas de muestras de coprocultivo de adultos sanos.

* A estas 71 cepas mencionadas en la parte superior, se les realizó la tipificación serológica con anterioridad a este trabajo, por parte del Lab.35, Depto. Salud Pública, Facultad de Medicina, UNAM. El procedimiento empleado fué de acuerdo a lo propuesto por la División de Patógenos Entéricos del Laboratorio Central de Salud Pública de Londres, y se emplearon 174 sueros somáticos y 56 sueros flagelares; y se siguieron los criterios de evaluación de la aglutinación establecidos por el Laboratorio de Serología de la Facultad de Medicina, UNAM.

- 9 cepas de *Escherichia coli* fecales aisladas de muestras de coprocultivo de niños sanos.

- Cepas de referencia:

- Cepa de *Escherichia coli* aislada de un paciente con infección de prostatitis, posee los siguientes factores de virulencia: *aer*, *papC*. Donada por el Dr. Joaquín Ruíz, Servicio de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Barcelona. Barcelona, España.
- Cepa de *Escherichia coli* aislada de paciente con infección de prostatitis, posee los siguientes factores de virulencia: *papC*, *sfa*. Donada por el Dr. Joaquín Ruíz,

Servicio de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Barcelona.
Barcelona, España.

- Cepa de *Escherichia coli* aislada de un paciente con Infección del Tracto Urinario (ITU), (Hospital General de México), factor de virulencia: *fimH*.
- Cepa de *Escherichia coli* aislada de un paciente con Infección del Tracto Urinario (ITU), (Hospital General de México), factor de virulencia: *afa*.
- Cepa de *Escherichia coli* ATCC catalogo número: 700928 designada CFT073 [WAM2267]. ATCC. The Global Bioresource Center. Aislada de la sangre de una mujer con pielonefritis aguda. Factores de virulencia: *aer*, *fimH*, *papC* y *sfa*.

2. Líneas celulares:

- Células T24 (células de vejiga proveniente de carcinoma humano). Línea celular designada: T24, ATCC catálogo número: HTB-4. ATCC. The Global Bioresource Center.

6.2.3 Medios de cultivo:

Medio de cultivo para bacterias: Luria- Bertani (LB) Broth Luria, Medio Especial, Agar Mc Conkey. Marca DIFCO.

Medio de cultivo celular: Medio McCoy y Dulbecco`S Modified Eagle`S Medium (DMEM). In vitro, S.A.

6.3 Métodos

6.3.1 Cultivo bacteriano.

Se verificó la pureza de las cepas sembrándolas en Agar Mc Conkey y se mantuvieron en Medio Especial para su ensayo.

6.3.2 Cultivo celular

Las células T24 fueron mantenidas en Medio McCoy suplementado con 10% de Suero Fetal de Bovino (SFB), previamente desactivado a 56°C durante 30 min en baño María. A este medio se le adicionaron tanto 100 U/ml de penicilina, como 100 µg/ml de estreptomycin (Bio-Whitaker), como medida preventiva por una posible contaminación bacteriana, así como 1.0 g/l de bicarbonato de sodio (Gibco BRL), para mantener mediante el CO₂ de la atmósfera un pH fisiológico en los cultivos. Se utilizó una incubadora con una atmósfera de 3% de CO₂ en aire, la cual tenía una temperatura constante de 37°C y con humedad a saturación. Las células fueron resembradas rutinariamente (1:2 botellas) cuando estas alcanzaron 80% de confluencia. El medio fue reemplazado cada 2 días. El procedimiento se llevó a cabo en condiciones de esterilidad y en la campana de flujo laminar.

6.3.3 Cultivo bacteriano para el ensayo de adherencia.

Las cepas fueron crecidas en 1.0 ml de Luria- Bertani (LB) Broth Luria y se incubaron por 18 horas a 37°C. Una hora antes de realizar el ensayo de adherencia, las cepas bacterianas se centrifugaron a 14,000 X g durante 3 minutos, se descartó el sobrenadante, y al botón bacteriano se le agregó 1.0 ml de medio DMEM, se deshizo el

botón en el vortex y se incubó por 1 hora adicional antes de realizar el ensayo de adherencia.

6.3.4. Ensayo de adherencia a células T24.

Para el ensayo de adherencia, se empleó la técnica de Cravioto *et.al.* (1979). A una placa de polipropileno de 24 pozos (NUNCLON) se le colocaron lentejas de vidrio estériles de 1.0 cm de diámetro, luego, se adicionó 1.0 ml de suspensión celular homogénea a una concentración de 2.5×10^5 células/ml por cada pozo, y se incubó la placa por 24 horas a 37°C con 3% de CO₂ para formar una monocapa celular a 80% de confluencia.

Después de este tiempo, se eliminó el medio de cultivo de los pozos, y se reemplazó con el medio Mc Coy sin antibiótico, suplementado con 3% de SFB. En algunos ensayos también se adicionó 1% de D-manosa. Posteriormente, se agregó 1×10^8 bacterias a cada uno de los pozos que contenía 1.0 ml de medio de cultivo celular, y se incubó por 3 horas a 37°C en 3% de CO₂. Se incluyó un control negativo (cepa K12, no adherente a células T24) y un control positivo (Cepa E2348/69, cepa adherente a células T24); también se incluyeron como controles: Cepa *E.coli* 87365, serotipo O40:H18 aislada de muestras fecales humanas, cepa que presenta adherencia difusa, y la Cepa *E.coli* JPN10, serotipo O44:H18 aislada de un niño con diarrea, cepa que presenta adherencia enteroagregativa. Después de la incubación, la placa se lavó tres veces con Solución Salina de Fosfatos (PBS), para remover las bacterias no adheridas. Las células se fijaron con metanol: ácido acético (3:1) frío por 30 minutos. Posteriormente se tiñeron con el colorante de Giemsa durante 30 minutos. Se lavaron tres veces con agua desionizada para eliminar el exceso de colorante. Las células se deshidrataron haciéndolas pasar por acetona-xileno y xileno. Por último las preparaciones se fijaron a un portaobjetos con bálsamo de Canadá. Las preparaciones se

observaron al microscopio de luz (40X, 100X). Se contó el número de bacterias adheridas a 50 células de la preparación, elegidas al azar. Se calculó el número promedio de *E. coli* adheridas por célula. Los experimentos fueron realizados por duplicado.

6.3.5 Método de obtención de ADN bacteriano.

Para la obtención del ADN bacteriano total se probaron dos técnicas: la técnica de ebullición (C. Le Bouguenec et.al., 1992) y la técnica de aislamiento de ADN genómico de bacterias gram-negativas (QIAGEN). La técnica que más utilizamos fue la primera, ya que se obtienen resultados confiables, además de que es más práctica y económica.

Técnica de ebullición. (C. Le Bouguenec et.al., 1992).

Las cepas se sembraron en 1.0 ml de Caldo Luria, se incubaron por 18 horas a 37°C, se centrifugaron a 8000 X g durante 10 minutos y el botón se resuspendió en 500µl de agua destilada estéril. Después se hirvió a 94°C durante 10 minutos y se centrifugó a 8000 X g durante 10 minutos, y el sobrenadante que contiene el ADN bacteriano se guardó a -20°C hasta que se realizó la PCR.

Técnica de aislamiento de ADN genómico de bacterias gram-negativas. (QIAGEN)

Las cepas se sembraron en 1.0 ml de Caldo Luria. Se incubaron por 18 horas a 37°C. Se centrifugaron a 5000 X g durante 10 minutos y el botón se resuspendió en 180 µl de Buffer ATL y se adicionaron 20 µl de proteinasa K, se homogeneizó y se incubó a 55°C. Después se adicionaron 200 µl de Buffer AL, se homogeneizó y se incubó a 70 °C por 10 minutos. Al término de este tiempo, se agregaron 200 µl de etanol (96-100%) y se homogeneizó. La muestra se transfirió a una columna (Dneasy spin column) conectada con un tubo de colecta de 2.0 ml. Se centrifugó a 6000 X g durante 1 minuto y se descartó el líquido colectado en el tubo. A la columna se le conectó otro tubo de colecta y se le

adicionaron 500 µl de Buffer AW2, se centrifugo a 6000 X g por 3 minutos, se descartó el líquido colectado en el tubo. Posteriormente se conectó un nuevo tubo de colecta y se pipetearon 200 µl de Buffer AE directamente sobre la matriz de la columna, se incubó a temperatura ambiente por 1 minuto y se centrifugo a 6000 X g por un minuto para la elución. Por último se repite la elución como se describió anteriormente. El líquido eluido que contiene el ADN bacteriano se guardó a -20°C hasta que se realizó la PCR.

6.3.6 Técnica de PCR.

La mezcla de amplificación se llevó a cabo en 30 µl de volumen final bajo las siguientes concentraciones:

TABLA A. Mezcla de amplificación empleada en la PCR.

REACTIVOS	VOLUMEN	CONCENTRACIÓN FINAL
ADN bacteriano	5 µl	100 ng/25 µL
Oligonucleótido iniciador (100 µmol/ml)	3µl (de cada uno) 1.0 µM	1 µmol/mL
Mezcla de dNTPs (10mM)	0.6µl	0.2 mM
MgCl ₂ (50mM)	0.9 µl	1.5 mM
Taq DNA polimerasa Recombinante (5U/µl)	0.15 µl	2.5 U
*Buffer PCR (10X)	3 µl	1.0 X
Agua destilada pH = 7.0	9.35 µl	

* El buffer PCR 10X contiene: 500 mM KCl; 100 mM Tris-HCl (pH 8.3); 15 mM MgCl₂ (las concentraciones finales de estos ingredientes en la mezcla de PCR son: 50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl; 1.5 mM MgCl₂).

Para preparar la mezcla de amplificación se utilizaron las secuencias de oligonucleótidos que se muestran en la siguiente tabla:

TABLA B. Genes implicados en ITU y su secuencia de oligonucleótidos.

Factor De virulencia	Gen codificado	Nombre	Secuencia de oligonucleótido (5'-3')	Tamaño del amplificado (pb)	Temperatura de alineamiento (°C)	Ref
Fimbria Tipo 1	<i>fimH</i>	fimH-f fimH-r	TgCAgAACggATAAgCCgTgg gCAgTCACCTgCCCCTCCggTA	508	63	21
Fimbria P	<i>papC</i>	pap 1 pap 2	gACggCTgTACTgCAgggTgTggCg ATATCCTTTCTgCAgggATgCAATA	328	63	25
Fimbria S y Fimbria F1C	<i>sfa</i>	sfaD sfaE	CTCCggAgAACTgggTgCATCTTAC CggAggAgTAATTACAAACCTggCA	410	55	25
Adhesinas Afa	<i>afaC</i>	afa-f afa-r	CggCTTTTCTgCTgAACTggCAggC CCgTCAgCCCCACggCAgACC	672	65	26
Aerobactina	<i>aer</i>	aer 1 aer 2	TACCggATTgTCATATgCAgACCgT AATATCTTCCTCCAgTCCggAgAAg	602	63	50

Los protocolos en el termociclador para la PCR fueron:

- Para *aer*, *fimH*, *papC* y *afa*: a 95°C por 1 minuto el primer ciclo, seguidos por 30 ciclos de 95 °C por 1 minuto, 65 °C por 1 minuto y 72 °C por un minuto.
- Para *sfa*: a 95°C por 1 minuto el primer ciclo, seguidos por 30 ciclos de 95 °C por 1 minuto, 55 °C por 1 minuto y 72 °C por un minuto.

Electroforesis:

Los productos obtenidos de la PCR se corrieron en un gel de agarosa al 1.5%, que contenía 4 μ l de bromuro de etidio por cada 100 ml de agarosa. El gel se colocó en una cámara horizontal para electroforesis; en cada pozo del gel se depositaron 5 μ l de la muestra. Al gel se le aplicó una corriente de 60 Volts por 45 minutos. Los productos de amplificación se visualizaron en un transiluminador de luz Ultravioleta (UV).

7. RESULTADOS.

7.1 Presencia y distribución de genes implicados en la adherencia bacteriana en cepas de *E.coli* aisladas de ITU.

Se determinó la presencia de los principales genes que codifican para fimbrias o adhesinas, en cepas de *Escherichia coli* aisladas de pacientes con infecciones del tracto urinario. Los genes que se detectaron mediante la técnica de PCR son: *fimH*, *papC*, *sfa* y *afa*, ya que se ha demostrado que la adherencia bacteriana de cepas uropatógenas al tracto urinario, esta mediada principalmente por estos genes, que codifican para adhesinas fimbriales y afimbriales. También se incluyó el gen que codifica para un sideróforo, *aer*, por ser un potencial factor de virulencia, estos sideróforos atrapan hierro y aumentan la sobrevivencia de bacterias en un ambiente limitante en nutrientes como la vejiga. Con el objetivo de hacer un análisis comparativo también se investigó la presencia de dichos genes en cepas fecales no virulentas de *Escherichia coli*.

De las 51 cepas aisladas de ITU, el gen *fimH* fue el que se encontró en mayor proporción, en 46 cepas (90%), seguido por *aer* en 36 cepas (71%), mientras que los genes *papC*, *afa* y *sfa* se encontraron en 6 cepas (12%), 4 (8%) y 3 cepas (6%), respectivamente. Sólo 2 cepas fueron negativas para los cinco genes buscados. La mayoría de los aislados (33 cepas) presentaron al menos dos genes (*aer/fimH*, *papC/fimH*, *aer/afa*), 10 cepas presentaron solo 1 gen (*aer* ó *fimH*), 7 cepas presentaron 3 genes (*aer/papC/fimH*, *aer/sfa/fimH*, *aer/afa/fimH*, *afa/sfa/fimH*), y finalmente 1 cepa presentó 4 genes (*aer*, *papC*, *sfa*, *fimH*). Los resultados se encuentran descritos en la tabla 1.

Tabla 1. Serotipos y presencia de genes implicados en la adherencia bacteriana en cepas de *E.coli* aisladas de ITU.

No. Cepa	Serotipo	GENES				
		<i>aer</i>	<i>fimH</i>	<i>papC</i>	<i>sfa</i>	<i>afa</i>
1	O102:H6	-	+	+	-	-
2	O1:H6 UPEC	+	+	+	-	-
3	O1:H6 UPEC	+	+	-	-	-
4	O?:H-	-	-	-	-	-
5	O?:H-	+	+	-	-	-
6	OR:H4	+	+	-	-	-
7	O100:H31	+	+	-	-	-
8	O4:H-	+	+	+	+	-
9	O8:H42	-	+	-	-	-
10	O8:H-	-	+	-	-	-
11	O?:H1	+	+	-	+	-
12	O114:H16	-	+	+	-	-
13	O75:H5 UPEC	+	+	-	-	+
14	O24:H-	+	+	-	-	-
15	O?:	+	-	-	-	-
16	O84:H-	-	+	+	-	-
17	O25:H4	+	+	-	-	-
18	OR:H-	-	+	-	-	-
19	O8:H-	+	+	-	-	-
20	O173:H17	-	+	-	-	-
21	O100:H12	-	-	-	-	-
22	O152:H4	+	+	-	-	-
23	O141:H26	+	+	-	-	-
24	O?:H38	-	+	-	-	-
25	O101:H-	+	-	-	-	-
26	O25:H4	+	+	-	-	-
27	O?:	+	+	-	-	-
28	O19:H-	-	+	-	-	+
29	O1:H6 UPEC	+	+	-	-	-
30	O?:H-	+	+	-	-	-
31	O25:H- ETEC	+	+	-	-	-
32	O73:H31	-	+	-	-	-
33	OR:H-	+	+	-	-	+
34	O?:H8	+	+	-	-	-
35	O?:H16	-	+	-	-	-
36	O8:H42	+	+	-	-	-
37	O1:H6 UPEC	+	+	-	-	-
38	O81:H-	+	+	-	-	-
39	O158:H-	+	+	+	-	-
40	O132:H6	+	-	-	-	-
41	O166:H42	+	+	-	-	-
42	O17:H18 ETEC	+	+	-	-	-
43	O25:H4	+	+	-	-	-
44	O142:H-	+	+	-	-	-
45	O25:H4	+	+	-	-	-
46	O25:H4	+	+	-	-	-
47	O25:H4	+	+	-	-	-
48	O8:H53	-	+	-	-	-
49	O102:H53	+	+	-	-	-
50	O?:H4	+	+	-	-	-
51	O?:H-	-	+	-	+	+

* Los datos marcados en negritas corresponden al serogrupo UPEC.

7.2 Presencia y distribución de genes implicados en la adherencia bacteriana en cepas fecales de *E. coli* no virulentas.

Para hacer un estudio comparativo y tener un punto de referencia sobre la distribución y frecuencia de aparición de dichos factores, se buscaron dichos genes en las cepas fecales no virulentas de *E. coli*. Probamos dos grupos de controles de cepas de *E.coli*: uno aisladas de adultos y otro de cepas aisladas de niños.

De las 20 cepas fecales aisladas de adultos, el gen *fimH* fue el más frecuentemente encontrado, en 18 cepas (90%), después el gen *aer* en 13 cepas (65%), *papC* en 9 cepas (45%), *sfa* en 3 cepas (15%) y *afa* en 2 cepas (10%). Los resultados se muestran en la tabla 2.

En las 9 cepas fecales aisladas de niños sanos, el gen *fimH* fue nuevamente el más encontrado, en 7 cepas (78%), después los genes *papC* y *afa* en una 1 cepa (11%), y por último ninguna cepa presentó los genes *aer* y *sfa*. Los resultados se muestran en la tabla 3.

Tabla 2. Serogrupos y presencia de genes implicados en la adherencia bacteriana en cepas fecales de *E.coli* aisladas de coprocultivos de adultos.

No. Cepa	Serogrupo	GENES				
		<i>aer</i>	<i>fimH</i>	<i>papC</i>	<i>sfa</i>	<i>afa</i>
A	O107 VTEC	-	+	-	-	-
B	Rugosa	+	+	-	+	-
C	ND	+	-	-	-	-
D	O86 EPEC	-	+	-	-	-
E	O22 UPEC	+	+	+	-	+
F	O86 EPEC	+	+	+	-	-
G	ND	+	+	+	-	-
H	O169 ETEC	+	+	+	-	-
I	ND	+	+	+	+	-
J	O125 ab EPEC	-	+	+	-	-
K	O17 VTEC	+	+	+	-	-
L	ND	+	+	+	+	+
M	O25 UPEC	-	+	-	-	-
N	ND	+	+	-	-	-
O	ND	+	+	+	-	-
P	O103 EPEC	-	-	-	-	-
Q	Rugosa	-	+	-	-	-
R	ND	+	+	-	-	-
S	O59	+	+	-	-	-
T	O8 UPEC	-	+	-	-	-

- **ND** = No Determinado.

Tabla 3. Presencia de genes implicados en la adherencia bacteriana en cepas fecales de *E.coli* aisladas de coprocultivos de niños sanos.

No. Cepa	GENES				
	<i>aer</i>	<i>fimH</i>	<i>papC</i>	<i>sfa</i>	<i>afa</i>
I	-	+	-	-	-
II	-	+	-	-	-
III	-	+	-	-	-
IV	-	-	-	-	-
V	-	-	-	-	-
VI	-	+	+	-	-
VII	-	+	-	-	-
VIII	-	+	-	-	-
IX	-	+	-	-	+

7.3 Ensayos de Adherencia.

Para determinar la capacidad adherente de las cepas aisladas y dado que la adherencia bacteriana a células de vejiga juega un papel primordial en la patogénesis, se realizaron diversos ensayos de adherencia tanto con los aislados de ITU como con las cepas fecales. Se utilizaron células de vejiga humana, de una línea celular llamada T24, los datos se muestran en las tablas 4,5, 6 y 7.

Los ensayos de adherencia a células, llevados a cabo con las cepas *E.coli* aisladas de ITU, mostraron que 7 (14%) de las 51 cepas probadas tuvieron una alta capacidad de adherencia y en algunos casos el número de bacterias adheridas a las células fue tan grande que no fue posible contarlas. (Fig.1d). Solo una cepa (2%) no mostró adherencia a células en lo absoluto. El rango de bacterias adheridas por célula fue de 3 a un número incontable de bacterias por célula. Durante los ensayos de adherencia solo una cepa indujo el desprendimiento de células T24. Por otro lado, la mayoría (80%) de las cepas mostró un patrón de adherencia difusa (Fig.1c) y el 18% de las cepas mostró una adherencia parecida a la enteroagregativa (Fig.1b).

Se realizaron ensayos de adherencia bacteriana a 10 cepas de *E.coli* fecales, nuevamente empleando células de vejiga (T24). Se encontró que en general estas cepas se adhirieron en menor número a la monocapa celular que las cepas aisladas de ITU, el rango de bacterias fecales adheridas por célula fue de: 1-11 y el número promedio de bacterias adheridas por célula fue de 5. Todas las cepas mostraron adherencia difusa, 2 cepas indujeron el desprendimiento de células.

Tabla 4. Distribución de las 51 cepas aisladas de ITU de acuerdo al número de bacterias adheridas a las células T24.

No. DE CEPAS	NUMERO DE BACTERIAS ADHERIDAS/ POR CÉLULA
4	INCONTABLES
2	ENTRE 50-72
11	ENTRE 25-50
16	ENTRE 10-25
16	MENOR DE 10
1	NO PRESENTÓ ADHERENCIA
1	NO DETERMINADA POR DESPRENDIMIENTO DE MONOCAPA CELULAR.

Tabla 5. Adherencia de cepas de *E.coli* aisladas de ITU a células de vejiga humana T24 y presencia de genes implicados en la adherencia y gen *aer*.

No. Cepa	Serotipo	Genes	Patrón de Adherencia	Adherencia (1)	Adherencia (2)
1	O102:H6	<i>fimH,papC</i>	DA	451 ± 16	9 ± 0.3
2	O1:H6 UPEC	<i>aer, fimH,papC</i>	DA	933 ± 71	19 ± 1
3	O1:H6 UPEC	<i>aer,fimH</i>	DA	1349 ± 171	27 ± 3
4	O?:H-	-	DA	130 ± 8	3 ± 0.2
5	O?:H-	<i>aer,fimH</i>	DA	1271 ± 153	25 ± 3
6	OR:H4	<i>aer,fimH</i>	EA	633 ± 103	13 ± 2
7	O100:H31	<i>aer,fimH</i>	DA	3622 ± 126	72 ± 3
8	O4:H-	<i>aer,fimH,papC,sfa</i>	Desprendió células		
9	O8:H42	<i>fimH</i>	EA	2194 ± 219	44 ± 4
10	O8:H-	<i>fimH</i>	EA	1860 ± 100	37 ± 2
11	O?:H1	<i>aer,fimH,sfa</i>	EA	1365 ± 240	27 ± 5
12	O114:H16	<i>fimH,papC</i>	DA	Incontables	
13	O75:H5 UPEC	<i>aer,fimH,afa</i>	DA	1368 ± 30	27 ± 1
14	O24:H-	<i>aer,fimH</i>	DA	520 ± 71	10 ± 1
15	O?:	<i>aer</i>	No hay adherencia		
16	O84:H-	<i>fimH,papC</i>	DA	2507 ± 2	50 ± 0.04
17	O25:H4	<i>aer,fimH</i>	DA	1059 ± 46	21 ± 1
18	OR:H-	<i>fimH</i>	DA	313 ± 35	6 ± 1
19	O8:H-	<i>aer,fimH</i>	EA	1289 ± 195	26 ± 4
20	O173:H17	<i>fimH</i>	DA	585 ± 76	12 ± 2
21	O100:H12	-	DA	573 ± 25	11 ± 1
22	O152:H4	<i>aer,fimH</i>	DA	895 ± 95	18 ± 2
23	O141:H26	<i>aer,fimH</i>	DA	701 ± 77	16 ± 2
24	O?:H38	<i>fimH</i>	DA	1069 ± 40	21 ± 1
25	O101:H-	<i>aer</i>	DA	798 ± 57	17 ± 0.3
26	O25:H4	<i>aer,fimH</i>	DA	223 ± 18	5 ± 1
27	O?:	<i>aer,fimH</i>	DA	254 ± 34	5 ± 1
28	O19:H-	<i>fimH, afa</i>	DA	1652 ± 80	37 ± 7
29	O1:H6 UPEC	<i>aer,fimH</i>	DA	372 ± 30	8 ± 1
30	O?:H-	<i>aer,fimH</i>	DA	242 ± 18	5 ± 0.4
31	O25:H-	<i>aer,fimH</i>	DA	156 ± 1	3 ± 0.01
32	O73:H31	<i>fimH</i>	DA	1338 ± 146	27 ± 3
33	OR:H-	<i>aer,fimH,afa</i>	DA	362 ± 43	7 ± 1
34	O?:H8	<i>aer,fimH</i>	DA	746 ± 33	15 ± 1
35	O?:H16	<i>fimH</i>	DA	448 ± 20	9 ± 0.4
36	O8:H42	<i>aer,fimH</i>	DA	1364 ± 153	27 ± 3
37	O1:H6 UPEC	<i>aer,fimH</i>	DA	333 ± 43	7 ± 1
38	O81:H-	<i>aer,fimH</i>	DA	173 ± 39	4 ± 1
39	O158:H-	<i>aer,fimH,papC</i>	DA	193 ± 22	4 ± 0.4
40	O132:H6	<i>aer</i>	DA	776 ± 37	16 ± 1
41	O166:H42	<i>aer,fimH</i>	DA	664 ± 74	14 ± 1
42	O17:H18	<i>aer,fimH</i>	DA	498 ± 61	10 ± 1
43	O25:H4	<i>aer,fimH</i>	DA	472 ± 10	9 ± 0.2
44	O142:H-	<i>aer,fimH</i>	EA	Incontables	
45	O25:H4	<i>aer,fimH</i>	DA	181 ± 58	4 ± 1
46	O25:H4	<i>aer,fimH</i>	DA	269 ± 71	5 ± 1
47	O25:H4	<i>aer,fimH</i>	EA	Incontables	
48	O8:H53	<i>fimH</i>	EA	1608 ± 243	32 ± 5
49	O102:H53	<i>aer,fimH</i>	DA	635 ± 104	13 ± 2
50	O?:H4	<i>aer,fimH</i>	DA	771 ± 117	16 ± 3
51	O?:H-	<i>fimH,sfa,afa</i>	EA	Incontables	

Adherencia (1) = No. promedio de bacterias adheridas a 50 células.

Adherencia (2) = No. promedio de bacterias adheridas por célula.

DA = Adherencia difusa, EA = Adherencia enteroagregativa.

* Los datos marcados en negritas corresponden al serogrupo UPEC.

Tabla 6. Distribución de las 10 cepas fecales de acuerdo al número de bacterias adheridas a las células T24.

No. DE CEPAS	NUMERO DE BACTERIAS ADHERIDAS/ POR CÉLULA
1	MAYOR DE 10
7	MENOR DE 10
2	NO DETERMINADA POR DESPRENDIMIENTO DE MONOCAPA CELULAR

Tabla 7. Adherencia de cepas fecales de *E.coli* a células T24 y presencia de genes implicados en la adherencia y gen *aer*.

No. Cepa	Serogrupo	Genes	Patrón de Adherencia	Adherencia (1)	Adherencia (2)
B	Rugosa	<i>aer, fimH, sfa</i>	DA	Desprendió células	
E	O22 UPEC	<i>aer, fimH, papC, afa</i>	DA	69 ± 9	1 ± 0.2
G	ND	<i>aer, fimH, papC</i>	DA	447 ± 80	9 ± 2
I	ND	<i>aer, fimH, papC, sfa</i>	DA	51 ± 17	1 ± 0.3
J	O125 ab EPEC	<i>fimH, papC</i>	DA	155 ± 30	3 ± 1
L	ND	<i>aer, fimH, papC, sfa, afa</i>	DA	422 ± 102	8 ± 2
N	ND	<i>aer, fimH</i>	DA	206 ± 5	4 ± 0.1
P	O103 EPEC	-	DA	Desprendió células	
S	O59	<i>aer, fimH</i>	DA	445 ± 110	9 ± 3
T	O8 UPEC	<i>fimH</i>	DA	545 ± 117	11 ± 2

Adherencia (1) = No. promedio de bacterias adheridas a 50 células.

Adherencia (2) = No. promedio de bacterias adheridas por célula.

DA = Adherencia difusa.

ND = No Determinado.

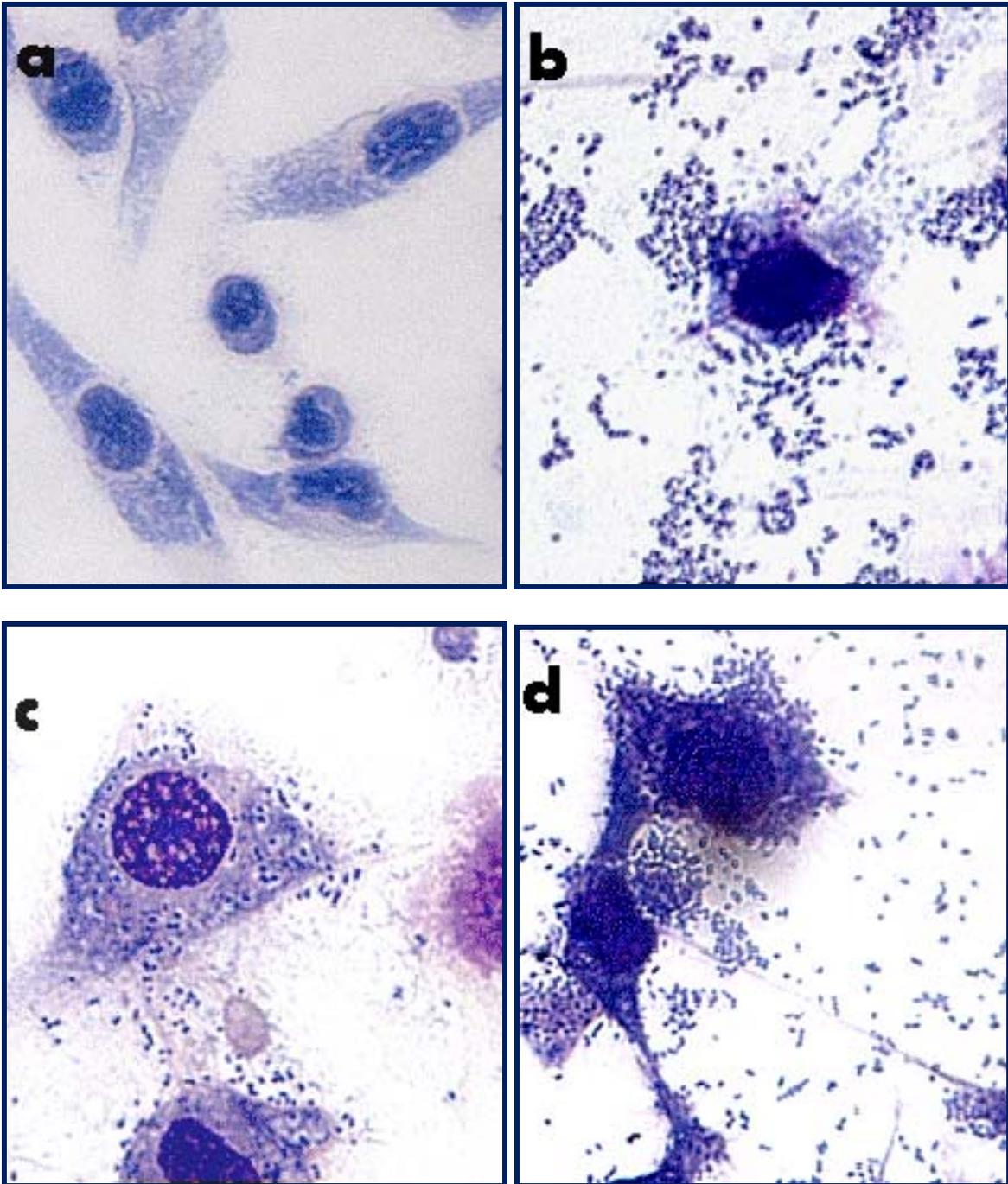


Fig. 1 – Patrones de adherencia bacteriana a células T24 de cepas aisladas de ITUs. (a) Células T24 cultivadas en la ausencia de bacterias (Control); (b) Adherencia enteroagregativa; (c) Adherencia difusa; (d) Bacterias con gran capacidad de adherencia (Incontable). Células teñidas con Giemsa, Microscopio de luz (Aumento, 40X).

7.4 Ensayos de Adherencia adicionando manosa al 1%.

Debido a que las cepas que mostraron mayor capacidad de adherencia en los ensayos fueron las que tenían fimbria H, decidimos probar si la manosa era capaz de inhibir la adherencia de estas cepas, puesto que se sabe que la manosa al 1% inhibe la adherencia bacteriana mediada por esta fimbria. Con este ensayo podríamos saber si la fimbria H es responsable de la alta capacidad de adherencia mostrada por nuestras cepas, o de que posiblemente existen otras adhesinas involucradas. Seleccionamos 8 cepas que reunieron las características de tener pili 1 y alta capacidad de adherencia y se les realizó el ensayo de adherencia adicionando manosa al 1%. El resultado fue que 5 cepas disminuyeron su adherencia marcadamente (Tabla 8). Las otras 3 cepas no se vieron afectadas significativamente por la manosa.

Tabla 8. Ensayo de adherencia en presencia de manosa al 1%.

No. Cepa	Serotipo	Genes	Adherencia (1) sin manosa	Adherencia (2) con manosa 1%.
3	O102:H6	<i>aer, fimH</i>	27 ± 3	8 ± 0.3
7	O1:H6	<i>aer, fimH</i>	72 ± 3	11 ± 1
9	O1:H6	<i>fimH</i>	44 ± 4	26 ± 1
10	O?:H-	<i>fimH</i>	37 ± 2	27 ± 1
16	O?:H-	<i>fimH, papC</i>	50 ± 0.04	9 ± 3
28	OR:H4	<i>fimH, afa</i>	37 ± 7	31 ± 8
32	O100:H31	<i>fimH</i>	27 ± 3	4 ± 1
48	O4:H-	<i>fimH</i>	32 ± 5	16 ± 5

Adherencia (1) y (2) = Número promedio de bacterias adheridas por célula.

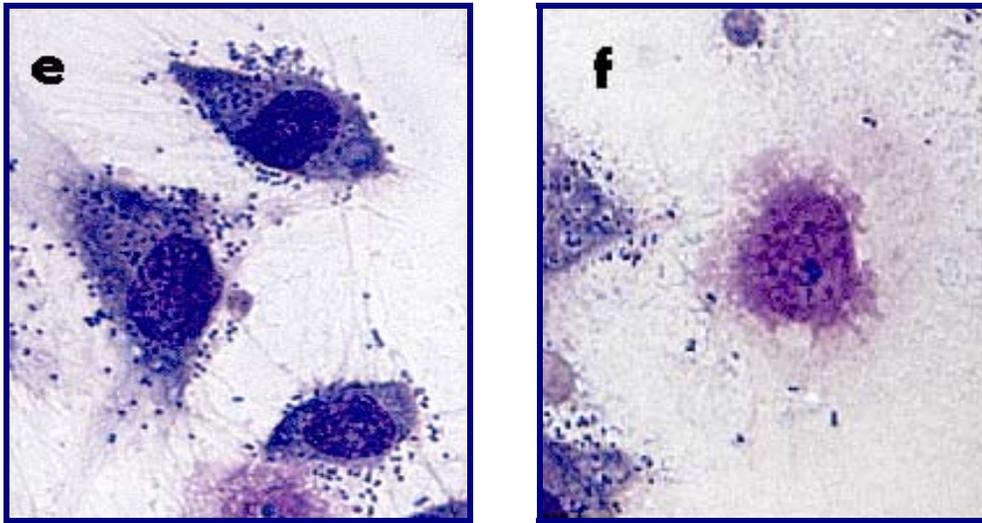


Fig. 2– Inhibición de adherencia bacteriana a células T24 por manosa al 1% en cepas aisladas de ITUs: (e) sin manosa; (f) con manosa. Células teñidas con Giemsa, Microscopio de luz (Aumento 40X).

8 . DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

El agente causal primario de las ITU son cepas de *Escherichia coli* uropatógena, estos aislados son un grupo genéticamente heterogéneo y pueden variar en sus habilidades para colonizar y persistir dentro de la vejiga o de los riñones. Epidemiológicamente, estudios en cultivos celulares y animales indican que un número de factores codificados por UPEC pueden modular la virulencia bacteriana dentro del tracto urinario. Estos factores de virulencia están usualmente codificados en el cromosoma de UPEC y también con frecuencia se encuentran codificados en regiones cromosomales inestables conocidas como islas de patogenicidad [21, 22, 34]. Los aislados de UPEC codifican una variedad de factores de virulencia que facilitan la colonización del tracto urinario. Sin embargo, a la fecha, ningún factor de virulencia ha demostrado ser específicamente único o definitivo de UPEC [10]. Las UPEC expresan un número de factores de virulencia que les confieren potencial patógeno y son encontrados con mucha menor frecuencia en las cepas fecales comensales [20].

8.1 Adherencia bacteriana y genes implicados

La adherencia de *E.coli* a las células uroepiteliales es el paso inicial para el desarrollo de las ITU. Existe la evidencia de estudios en animales que indican que la persistencia de *E.coli* en el riñón y la vejiga esta asociada con su habilidad para adherirse a las células uroepiteliales.

Los genes de adhesinas *fimH*, *pap*, *sfa* y *afa*, que codifican para fimbria H, fimbria P, fimbria S y adhesinas afimbriales, respectivamente, son los factores más estudiados en la adherencia de cepas UPEC [33]. En el presente estudio se determinó la presencia de dichos

genes en los aislados bacterianos. El gen que encontramos en mayor proporción tanto en las cepas aisladas de ITU como en las fecales es el *fimH*.

Estos resultados muestran que *fimH*, es el gen más predominante tanto en las cepas aisladas del tracto urinario como en las fecales aisladas de adultos y niños, por lo que pensamos que el pili tipo 1, con su adhesina llamada fimbria H, es un organelo muy importante en la sobrevivencia de este tipo de bacterias en los hospederos, ya sean patógenas o comensales, por tal motivo, el pili tipo 1 no es considerado estrictamente un factor de virulencia sino un requisito para que las bacterias puedan colonizar las mucosas. Se ha descrito que las interacciones bacterianas mediadas por FimH con las células uroepiteliales son críticas en la colonización de la vejiga y subsiguiente infección, así el 80% de los aislados de *E.coli* fecales codifican para adhesinas FimH que sólo se unen a receptores trimanosa, mientras que el 70% de los aislados UPEC expresan variantes de FimH con mutaciones que aumentan su afinidad para residuos monomanosa y para receptores trimanosa [34]. Cuando incluimos en nuestros ensayos manosa al 1% para inhibir la adherencia mediada por la fimbria H, en las cepas más adherentes, la adherencia se vio marcadamente reducida en cinco de las ocho cepas probadas, indicando que esta alta capacidad de adherencia es mediada en buena parte por la fimbria H. Probablemente la adherencia abundante de las otras tres cepas (no afectadas por la manosa) no esta mediada por la fimbria H, ni por las otras fimbrias conocidas. Este resultado es interesante porque sugiere que hay otras adhesinas en cepas UPEC que aún no han sido identificadas.

Con respecto a la prevalencia de los otros genes que codifican para adhesinas, en nuestros aislados de ITU encontramos que el gen *afa* esta presente en el 8% de las cepas, lo cual es similar a lo reportado anteriormente por diversos autores, del 0-14% [11, 27, 33]. Sin embargo, los genes *papC* (12%) y *sfa* (6%) tuvieron una prevalencia mucho menor en

nuestros aislados que los reportados en otros países (para *papC* del 40-60% y *sfa* del 20-60% [11, 22, 30, 33]. Hasta este momento no sabemos si efectivamente estos genes (*papC* y *sfa*) se encuentran en baja frecuencia en las cepas UPEC que causan infecciones en la población Mexicana, aunque en ensayos realizados anteriormente por Manjarrez et.al. [29] con cepas aisladas de ITU de pacientes mexicanos, se encontró una distribución para el gen *papC* y *sfa* de un 13%, muy similar a lo reportado en este estudio. Es necesario obtener una muestra de cepas más grande y de diferentes poblaciones para que sea más representativa de la población del D.F. En México se han realizado pocos estudios al respecto, se desconocen las características de las cepas bacterianas que más frecuentemente causan ITU en la población mexicana. Sabemos que el gen *papC* está asociado con pielonefritis [7] y que el gen *sfa* se encuentra frecuentemente en cepas asociadas con meningitis y septicemia, y también ha sido implicado en la colonización del tracto urinario en ITU experimentadas en ratas [7]; podemos especular que la baja frecuencia de estos dos genes en cepas UPEC indicaría, una baja incidencia de pielonefritis en la población mexicana, así como también de septicemia y meningitis. Al respecto, se desconoce con precisión la incidencia de dichas enfermedades en la población mexicana, sin embargo algunos datos de la Secretaria de Salud indican que dichas enfermedades no son tan frecuentes como en otros países desarrollados. Es importante mencionar que la baja prevalencia de estos genes en los aislados de pacientes mexicanos puede deberse al uso indiscriminado de antibióticos en nuestro país, con lo cual las bacterias uropatógenas son eliminadas del tracto urinario y de esta manera impiden que las ITU evolucionen.

Se piensa que la expresión de moléculas adhesivas (adhesinas) por parte de las cepas UPEC, más que la expresión de toxinas u otros factores de virulencia, es el determinante más importante de patogenicidad. Las adhesinas permiten que las bacterias se

unan a las células del hospedero dentro del tracto urinario y eviten el lavado rápido por parte del flujo de la orina. Las adhesinas también contribuyen a la virulencia de muchas otras maneras: aumentando las vías de señalización entre bacteria y célula hospedera, facilitando la liberación de otros productos bacterianos a los tejidos del hospedero, y promoviendo la invasión bacteriana, lo cual tiene influencia directa en el desarrollo de una ITU [34].

En nuestros ensayos de adherencia, el 98% de los aislados de ITU mostraron adherencia a las células epiteliales de vejiga T24 y el rango de bacterias adheridas por célula fue de 3 a incontable. En otros ensayos de adherencia a células T24 se ha reportado que el rango de bacterias adherentes fue de 5 a 10 por célula, y que todos los aislados fueron adherentes a estas células [33]. Hay que considerar que los ensayos de adherencia se realizan bajo condiciones específicas en donde se trata de semejar las condiciones de la infección *in vivo*, sin embargo hay factores que no se pueden controlar.

Al comparar en general la capacidad de adherencia de las cepas aisladas de ITU con las cepas fecales encontramos que estas cepas tienen una mayor capacidad para adherirse a las células de vejiga T24 que las fecales, a pesar de que, algunas cepas fecales tienen más genes de adherencia que algunos aislados de ITU. En el presente estudio, no se encontró ninguna correlación entre la presencia de los genes que codifican para las principales adhesinas y la capacidad adherente de las bacterias a células T24. Observamos que algunas cepas, en las que no encontramos ninguno de los genes de adhesinas buscados, no obstante, mostraron capacidad adherente en el ensayo, aunque no muy eficiente. La mayoría de las cepas presentaron desde 1 a 3 genes de adhesinas, independientemente de si tienen baja o gran capacidad de adherencia, lo cual nos indica la complejidad de las interacciones entre estos patógenos y el hospedero, para colonizar el tracto urinario y así posteriormente

desarrollar una infección. Estos resultados coinciden con un estudio realizado también en células T24, donde se encontró que todos los aislados de ITU se adhirieron a las células, a pesar de que el 33% de éstas, mostraron no tener adhesinas conocidas (fimbria tipo 1, S, P y adhesinas afimbriales) [33].

Concluimos que las adhesinas conocidas hasta ahora no son indispensables para la adherencia en un buen número de cepas UPEC. Al respecto, se sabe que de todas las cepas UPEC aisladas, en muchos estudios recientes, solo la mitad posee uno o ninguno de los factores de virulencia ya conocidos y caracterizados como tal.

Haciendo una comparación con los datos obtenidos de las cepas aisladas de ITU con las fecales aisladas de niños, podemos observar que la prevalencia de los factores de virulencia es menor para las cepas fecales que para las cepas aisladas de ITU, confirmando la teoría de la especial patogenicidad (la cual apoya la hipótesis de que solo determinadas cepas con factores de virulencia son capaces de producir infecciones extraintestinales) [40, 41]. Así, 41 (80%) de las 51 cepas causantes de ITU presentaron al menos uno de los factores de virulencia examinados, frente a tan sólo 2 (22%) de las 9 cepas fecales aisladas de niños sanos, considerando los factores de virulencia a: *aer*, *afa*, *sfa* y *papC*.

Cuando se compararon las cepas aisladas de ITU con las fecales aisladas de adultos, encontramos una prevalencia mayor de los factores de virulencia identificados en las cepas fecales que en las aisladas de ITU, estos datos son totalmente contradictorios a los reportados por otros investigadores ya que se ha reportado que las UPEC poseen más factores de virulencia que las cepas fecales [40]. Sin embargo, gran cantidad de investigaciones y estudios indican que en individuos sanos, la mayoría de los uropatógenos se originan en la flora rectal y entran a la vejiga vía la uretra [34, 40]; y en el caso de las mujeres, la colonización del introito vaginal con cepas de *E.coli* también parece ser un paso

crítico inicial en la patogénesis de ITU, ya que se ha encontrado que bacterias de la microflora vaginal poseen los genes que codifican para factores de virulencia involucrados en las ITU [2, 25, 26, 36, 39, 40]; de esta forma los resultados obtenidos apoyan la hipótesis que dice “el reservorio activo para las UPEC son las cepas fecales que han adquirido los factores de urovirulencia, y que en algún momento, las habilitarán para causar la infección a lo largo del tracto urinario.

El hecho de que las cepas fecales aisladas de individuos adultos tengan mas factores de virulencia que las cepas fecales de niños, indica que estas últimas son menos virulentas, y que conforme la edad avanza, nuestro organismo es colonizado por nuevas cepas virulentas. Las bacterias virulentas pueden ser eliminadas por el sistema inmunológico del individuo o pueden ser toleradas y formar parte de la flora intestinal. Además, las bacterias no-virulentas pueden adquirir determinados factores de virulencia, a través de mecanismos como la transferencia horizontal de ADN, mutaciones y en menor grado la recombinación intragénica [21]. Para confirmar estas observaciones son necesarios más estudios en donde al menos el tamaño de muestra de las cepas fecales sea igual que el de las cepas aisladas de ITU.

8.2 Aerobactina en cepas aisladas de ITU.

La virulencia de las cepas UPEC depende de la habilidad para multiplicarse en los tejidos del hospedero. El hierro es un nutriente esencial para que *E. coli* se replique pero la disponibilidad de este elemento dentro del hospedero es limitada. Gran parte del hierro en humanos es intracelular, encontrado predominantemente en proteínas hemo o secuestrado en ferritina mientras que la pequeña cantidad de hierro extracelular esta fuertemente unido a proteínas captadoras de hierro de alta afinidad. La bacteria patógena de *E. coli* ha evolucionado una variedad de mecanismos para adquirir hierro de fuentes del hospedero.

Un mecanismo es la síntesis y transporte de sideróforos, queladores de hierro de bajo peso molecular con una alta afinidad para hierro. La mayoría de las cepas *E. coli*, producen el sideróforo de catecol enterobactina. Adicionalmente, aerobactina, un sideróforo de hidroxamato es producido por muchas cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con ITU, bacteremia u otras infecciones extraintestinales. La contribución precisa a la virulencia de aerobactina o enterobactina no esta bien establecida.

Por lo que las cepas de *E.coli* que cuenten con el sistema aerobactina, podrán obtener el hierro necesario para sus diferentes actividades metabólicas y de esta manera tendrán la capacidad de crecer y por lo tanto de sobrevivir dentro del tracto urinario.

En el caso del gen *aer*, lo encontramos ligeramente con mas frecuencia (71 %) que lo reportado 30-60% [33]. Con lo que podemos decir, que el sistema aerobactina al presentarse en un porcentaje alto, tiene especial importancia dentro de los aislados mexicanos por lo tanto dentro de la patogénesis de las ITUs de pacientes mexicanos.

8.3 Serogrupos y serotipos de cepas de *E.coli* aisladas de ITU.

Dentro de las 51 cepas de *E.coli* aisladas de ITU encontramos una gran variedad de serogrupos, repartiéndose en 22 diferentes serogrupos O. Algunos de los aislados tienen serogrupos de los patotipos de EPEC, ETEC, UPEC, EIEC, STEC. Sin embargo, para saber si realmente pertenecen a estos patotipos es necesario verificar que tengan los factores de virulencia específicos para cada patotipo. De las 37 cepas que resultaron tipificables con los antisueros O empleados, 19 cepas (51%) pertenecieron a los serogrupos considerados como clásicos UPEC (O1, O4, O8, O25, O73 y O75). Interesantemente, tres serogrupos O1, O8 y O25 englobaron 43% (16 cepas) de las cepas serotipificadas, por lo tanto podemos decir que estos tres serogrupos fueron los mas frecuentemente encontrados; O25 con 7 cepas, O8

con 5 y O1 con 4 cepas. Y cabe destacar que sólo 5 de las 51 cepas aisladas pertenecieron a los serotipos clásicos UPEC (O1:H6, con 4 cepas y O75:H5, con 1 cepa). Estos resultados indican que los serogrupos de las cepas causantes de ITU en pacientes de la ciudad de México son distintos a los identificados en otras zonas geográficas como Europa y Asia, por lo que es importante caracterizar a las cepas causantes de ITU dependiendo de la zona geográfica para un manejo específico y adecuado de estas infecciones.

Tabla 9. Frecuencia y Distribución de los serogrupos más comúnmente encontrados entre *E.coli* uropatogénicos aislados de diferentes países.

Bilbao n=103		Galicia n=252		Finlandia n=148		Hungría n=384		Inglaterra		Hong Kong n= 427		México** n=51		Cepas control*** n=20	
O1	(4)	O1	(3)	O1	(5)	O1	(4)	O1	(7)	O1	(4)	O1	(8)	O8	(5)
O2	(12)	O2	(8)	O2	(7)	O2	(8)	O4	(5)	O2	(8)	O8	(10)	O22	(5)
O4	(10)	O4	(8)	O6	(12)	O4	(4)	O6	(10)	O4	(7)	O25	(14)	O25	(5)
O6	(15)	O6	(13)	O8	(4)	O6	(8)	O7	(3)	O6	(5)				
O9	(4)	O7	(3)	O16	(3)	O7	(3)	O18	(5)	O8	(3)				
O18	(6)	O8	(3)	O18	(4)	O8	(4)	O75	(9)	O21	(4)				
O27	(4)	O15	(3)	O25	(3)	O18	(3)			O25	(3)				
O73	(7)	O18	(15)	O75	(9)										
O75	(5)	O75	(4)												
O77	(3)	O83	(4)												

*Entre paréntesis, los valores en porcentaje de cepas de cada serogrupo.

** Las cepas corresponden a cepas de *E.coli* aisladas de orina de pacientes con ITU, en el Hospital General de México.

*** Las cepas corresponden a cepas de *E.coli* aisladas de muestras de coprocultivo de adultos sanos.

9. CONCLUSIONES

Encontramos baja prevalencia de los genes *papC* y *sfa* en nuestros aislados, lo que sugiere que esta es una posible razón de la baja incidencia de pielonefritis reportada en México.

La fimbria H juega un papel primordial en la adherencia de nuestros aislados a las células de vejiga T24, ya que se encontró en un 90% en los aislados de ITU.

Debido a que encontramos cepas que a pesar de no poseer ninguno de los principales genes de adherencia fueron capaces de adherirse a las células de vejiga humana, creemos que estas cepas pueden tener otros genes que codifican para adhesinas que no han sido identificadas y que tienen un probable papel en la uropatogénesis.

Las bacterias presentes en la flora intestinal son un reservorio activo para las ITU ya que algunas cepas fecales poseen los factores de virulencia de las cepas UPEC. Dichos factores pueden habilitarlas para invadir y colonizar el tracto urinario y causar la infección.

No se encontró ninguna correlación entre la presencia de genes para adhesinas y la capacidad adherente de las distintas cepas. La adherencia bacteriana a las mucosas es un proceso complejo y hay muchos otros factores que intervienen como son la regulación de producción de adhesinas y mutaciones en las adhesinas que alteran la eficiencia de la adhesión.

Los serogrupos más frecuentes dentro de los aislados fueron: O1, O8 y O25; los cuales fueron diferentes a los serogrupos mas frecuentes encontrados en otros países, por lo que es importante hacer una caracterización de las cepas de acuerdo a la zona geográfica.

10.- PERSPECTIVAS

La identificación de las principales proteínas bacterianas que median la adherencia a la mucosa del tracto urinario sería de gran utilidad en el diseño y desarrollo de una vacuna, y en el establecimiento de un método diagnóstico.

11. APÉNDICE. Composición de Reactivos.

- TAE 10 X (Solución Reguladora de Electroforesis para ADN):

Tris-base	48.40 g
Ácido acético glacial	11.42 ml
EDTA 0.5 M	20.00 ml
Agua destilada c.b.p.	1000.00 ml
pH = 8	

- Amortiguador de carga 10 X:

Ficoll 400	20.00 %
EDTA	0.10 M
SDS	1.00 %
Azul de Bromofenol	0.25 %

- Luria- Bertani (LB) Broth Luria:

Triptona	10 g
Extracto de Levadura	5 g
Cloruro de Sodio	5 g
Agua destilada c.b.p.	1 L

Ajustar el pH a 7.0 con 1.0 M de NaOH, esterilizar con autoclave por 15 min a 121°C.

- Medio DMEM (Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium) para cultivar bacterias, a un litro se le adiciona:

Bicarbonato de Sodio 3.00 g

HEPES 4.76 g

- Agar Mc Conkey:

Peptona de caseína 1.50 g

Peptona de gelatina 17.0 g

Peptona de carne 1.50 g

Lactosa 10.0 g

Sales biliares 1.50 g

Cloruro de sodio 5.00 g

Agar 13.5 g

Rojo neutro 0.03 g

Cristal Violeta 0.001 g

Agua desionizada c.b.p. 1 L

pH = 7.1

- Medio Especial (conservación de cepas):

Base gelosa sangre 20 g

Agar bacteriológico 15 g

Extracto de carne 1.5g

Agua destilada c.b.p. 1000 ml

pH = 7.4

- Medio Mc Coy para cultivo de células, a cada 100 ml se le adiciona:

Glutamina 1%

Bicarbonato de sodio 1.0 ml a partir de una solución al 7.5 %

Suero fetal Bovino (SFB) 10%

HEPES 1.0 ml de una solución 1.0 M

Penicilina/Estreptomicina 1.0 ml de una solución a 10,000 U/ml y 10,000 µg/ml,

respectivamente.

- PBS (Solución Salina de Fosfato)

Cloruro de sodio	8.00 g
------------------	--------

Cloruro de potasio	0.20 g
--------------------	--------

Fosfato de sodio dibásico	1.44 g
---------------------------	--------

Fosfato de potasio monobásico	0.24 g
-------------------------------	--------

Agua destilada c.b.p.	1.00 L
-----------------------	--------

pH = 7.2

12.- LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico	mM	Milimolar
°C	Grados Centígrado	ng	Nanogramos
CAP	Proteína activadora de catabolitos	nm	Nanómetros
DA	Adherencia difusa	pb	Pares de bases
DAF, CD55	Factor acelerador del consumo	PBS	Solución Salina de Fosfatos
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium	PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
dNTP's	Dinucleótidos de fosfato	SCR	Short Consensus Repeat
EA	Adherencia enteroagregativa	SDS	Dodecilsulfato de sodio
EDTA	Ácido Etilendiaminotetracético	SFB	Suero fetal bovino
EHEC	<i>Escherichia coli</i> Enterohemorrágica	TAE	Solución reguladora para electroforesis para ADN
EIEC	<i>Escherichia coli</i> Enteroinvasiva	TU	Tracto Urinario
EPEC	<i>Escherichia coli</i> Enteropatógena	U	Unidades
STEC	<i>Escherichia coli</i> Verotoxigénica	µL	microlitro
ETEC	<i>Escherichia coli</i> Enterotoxigénica	µM	micromolar
Fig.	Figura	µmol	micromol
g	gramos	UP1a	Uroplakina 1a.
Galα1-4Gal	Digalactósido	UP1b	Uroplakina 1b
GalNAc	N-acetil-galactosamina	UPII	Uroplakina II
GbO3	Globotriacilceramida	UPIII	Uroplakina III
GbO4	Globósido	UPEC	Cepas de <i>Escherichia coli</i> uropatógena
GbO5	Antígeno de Forsman	UV	Ultravioleta
GPI	Glicosilfosfatidilinositol	X g	Fuerza centrífuga
HEPES	N-[2hidroxietil] piperazine-N'-[2-ethanesulfonicacid]		
IHF	Factor de Integración del hospedero		
ITU	Infección del Tracto Urinario		
Lrp	Proteína reguladora responde a leucina		
mL	mililitros		

13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- 1.-**Abraham, N. Soman, Jonsson, Ann-Beth, Normak, Staffan.** Fimbriae-mediated host-pathogen cross talk. *Current Opinion in Microbiology* 1: 75-81, 1998.
- 2.- **Adlerberth, I., Áke, H.L., Svanborg, C., Svennerholm, A-M., Nordgren, S., E. Wold, A.,** Adhesins of *Escherichia coli* associated with extraintestinal pathogenicity confer binding to colonic epithelial cells. *Microbial Pathogenesis*, 18: 373 – 385, 1995.
- 3.-**Anderson, G.G., Dodson, W.K., et. al.** Intracellular bacterial communities of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract pathogenesis. *TRENDS in Microbiology* 12(9): 424-430, 2004.
- 4.-**Anderson, G.G., Martin, M.S, Hultgren, J.S.** Host subversion by formation of intracellular bacterial communities in the urinary tract. *Microbes and Infection* 6: 1094-1101, 2004.
- 5.-**Barragán Arteaga, I., Barriga Angulo, G., et. al.** 1er Consenso Nacional sobre Manejo Antimicrobiano de Infecciones de Vías Urinarias (IVUs) en el Adulto. *Boletín del Colegio Mexicano de Urología A.C.* Vol. XX, Núm. 2. Julio-Diciembre, pp 46-57, 2005.
- 6.-**Bauer, J.R, Zhang, L. et.al.** Molecular Epidemiology of 3 Putative Virulence Genes for *Escherichia coli* Urinary Tract Infection- *usp, iha, and iron_{E.coli}*. *Journal of Infectious Diseases*, 185: 1521-4, 2002.
- 7.-**Blanco, M., Blanco J.E., et. al.** Detection of *pap, sfa* and *afa* adhesion-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains: relationship with expression of adhesions and production of toxins. *Res. Microbiol.* 148: 745-755, 1997.
- 8.-**Blanco, M., Blanco J.E., et. al.** Detection of urovirulence genes in uropathogenic *Escherichia coli* by polymerase chain reaction (PCR): comparison with results obtained using phenotypic methods. *Journal of Microbiological Methods* 31: 37-43, 1997.
- 9.-**Blanco, M., Blanco, J., Blanco, J.E., Alonso, Pilar., Abalia, I., Rodríguez, Elena., Bilbao, J.R., Umaran, A.,** Factores de virulencia y serogrupos O de *Escherichia coli* causantes de infecciones urinarias comunitarias, *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 13: 236 – 241, 1995.
- 10.-**Bower, M. Jean, Eto, S. Danelle, Matthew, A. Mulvey.** Covert Operations of Uropathogenic *Escherichia coli* within the Urinary Tract. *Traffic* 6: 18-31, 2005.
- 11.-**Croduta-Romanita, U., Damián, M., Tatu-Chitoiu, D., Capusa, C., Fagaras, R., Tudorache, D., Nica., M., Le Bouguéneq, C.,** Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* strains isolated from Romanian adult urinary tract infection cases, *J.Cell. Med.* Vol.5, No.3, pp. 303 – 310, 2001.

- 12.-**Dias da S, W., Benetti, F, Lancelotti, M., Ferreira, A., N. Solferini, V., Brocchi, M.,** Biological and genetic characteristics of uropathogenic *Escherichia coli* strains. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.* 43 (6): 303 – 310, 2001.
- 13.-**Finer, G., Landau, D.** Pathogenesis of urinary tract infections with normal female anatomy. *Lancet Infect Dis, 4: 631-35, 2004.*
- 14.-**Geerlings, S, Meiland, R, et. al.** Adherence of Type 1-Fimbriated *Escherichia coli* to Uroepithelial Cells. *Diabetes Care, 25 (8): 1405-1409, 2002.*
- 15.-**Gerhardt P., Murray R., Wood WA., Krieg N.** Methods for General and Molecular Bacteriology. *American Society for Microbiology. U.S.A. Copyright 1994*
- 16.-**González Pedraza-Avilés, A., Medina-Zarco L., Moreno-Castillo, Y., Ortiz-Zaragoza, C., Dávila-Mendoza, R.** Prevalencia de bacteriuria sintomática y asintomática en adultos mayores, y sensibilidad *in vitro* a antimicrobianos. *Archivos en Medicina Familiar, Vol. 6, Núm. 2, pp. 52-56, mayo-agosto 2004.*
- 17.-**Gunther IV, Nereus, Snyder, A. Jennifer, Lockatell, Virginia, Blomfield, et. al.** Assessment of Virulence of Uropathogenic *Escherichia coli* Type 1 Fimbrial Mutants in which the Invertible Element is Phase-Locked On or Off. *Infection and Immunity, pp. 3344-3354, 2002.*
- 18.-**Harber, M.J., Chick, S., Mackenzie, R., Asscher, A.W.,** Lack of adherence to epithelial cells by freshly isolated urinary pathogens. *Lancet I (8272), 586 – 588, 1982.*
- 19.-**Hull, A.R., Donovan, H.W., et. al.** Role of Type 1 Fimbria- and P Fimbria-Specific Adherence in Colonization of the Neurogenic Human Bladder by *Escherichia coli*. *Infection and Immunity. Vol. 70, No. 11, pp. 6481-6484, 2002.*
- 20.-**Johnson, R., Kuskowski, A. M., Gajewski, A., et. al.** Extended Virulence Genotypes and Phylogenetic Background of *Escherichia coli* Isolates from Patients with Cystitis, Pyelonephritis, or Prostatitis. *The Journal of Infectious Diseases 191: 46-50, 2005.*
- 21.-**Johnson, R., Russo, A.T, et.al.** Molecular Epidemiological and Phylogenetic Associations of Two Novel Putative Virulence Genes, *iha* and *iroN* *E. coli* , among *Escherichia coli* Isolates from Patients with Urosepsis. *Infection and Immunity, Vol. 68, No.5, pp. 3040-3047, 2000.*
- 22.-**Johnson, R., Stell, A.,** Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise, *J. Infect. Dis.* 181:261 – 272, 2000.
- 23.-**Justice, S.S., Hung, C., Theriot, J.** Differentiation and developmental pathways of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract pathogenesis. *PNAS, 101 (5): 1333-1338, 2004.*

- 24.-**Kau, L. Andrew, Hunstad, A. David, Hultgren, J. Scott.** Interaction of uropathogenic *Escherichia coli* with host uroepithelium. *Current Opinion in Microbiology* 8: 54-59, 2005.
- 25.-**Kuhar, I., Grabnar, M., Zgur-Bertok, D.,** Virulence determinants of uropathogenic *Escherichia coli* in fecal strains from intestinal infections and healthy individuals. *FEMS Microbiol. Letters*. 164: 243 – 248, 1998.
- 26.-**Le Bouguéne C., Archambaud M., Labigue A.,** Rapid and specific detection of the *pap*, *afa*, and *sfa* adhesins – encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains by polymerase chain reaction, *J. Clin. Microbiol.*, 30 (5): 1189 – 1193, 1992.
- 27.-**Le Bouguéne C., Lalioui L., Du Merie L., Jouve M., Courcoux P., Bouzari S., Selvarangan R., Nowicki B.J., Germani Y., Andremont A., Gounon P., Garcia M.I.,** Characterization of AfaE adhesins produced by extraintestinal and intestinal human *Escherichia coli* isolates. PCR assays for detection of Afa adhesins that do or do not recognize Dr blood group antigens, *J. Clin. Microbiol.*, 39:1738 –1745, 2001.
- 28.-**Mahmood, A., Engle, M.J., Hultgren, S.J., Goetz, G.S., Dodson, K., Alpers, D.H.,** Role of intestinal surfactant-like particles as a potential reservoir of uropathogenic *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1523 pp. 49 – 55, 2000.
- 29.-**Manjarrez, H. A., Gavilanes, S., Chavez, M., Martinez,S., Navarro A., Leon, L.** Factores de Virulencia y Serogrupos 0 de E.coli Causantes de Infecciones urinarias.. XXIX Congreso Anual de la Asociación Mexicana de Infectología y Microbiología Clínica A.C. Cd. De Puebla, México, 2004.
- 30.-**Marrs, C.F., Zhang, L., et. al.** Variations in 10 putative uropathogen virulence genes among urinary, faecal and peri-urethral *Escherichia coli*. *J. Med. Microbiol.* 51: 138-142, 2002.
- 31.-**Marrs, C.F., Zhang, L., Foxman, B.** *Escherichia coli* mediated urinary tract infections: Are there distinct uropathogenic *E. coli* (UPEC) pathotypes?. *FEMS Microbiology Letters* 252, pp. 183-190. 2005.
- 32.-**Martínez J. Juan, Mulvey, A. Matthew, Schilling D. Joel, et. al.** Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells. *The EMBO Journal*, 19 (12): 2803-2812, 2000.
- 33.-**Miyasaki, J., Ba-Thein, W., Kumao, T., Obata, Y.M., Akaza, H., Hayshi, H.,** Type 1, P and S fimbriae, and afimbrial adhesin I are not essential for uropathogenic *Escherichia coli* to adhere to and invade bladder epithelial cells. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 33: 23 – 26, 2002.
- 34.-**Mulvey, A. Matthew.,** Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*. *Cellular Microbiology*, Microreview, 193.1-193.15, 2002 (4).

- 35.-**Mulvey, A. Matthew, Schilling, D. Joel, Martínez, J. Juan, Hultgren J. Scott.** Bad bugs and beleaguered bladders: Interplay between uropathogenic *Escherichia coli* and innate host defenses. *PNAS*, 97 (16): 8829-8835.
- 36.-**Obata, Y.M., Ba-Thein, W., Tsukamoto, T., Yoshikawa, H., Hayshi, H.,** Vaginal *Escherichia coli* share common virulence factor profiles, serotypes and phylogeny with other extraintestinal *E.coli*. *Microbiology*, 148: 2745 – 2752, 2002.
- 37.-**Ofek I., and Doyle R.,** Bacterial Adhesion to Cells and Tissues. *Chapman & Hall*. U.S.A, 1994.
- 38.-**Puente, J., Finlay, B.** Pathogenic *Escherichia coli*. (Capítulo 9). Principles of Bacterial Pathogenesis. *Editor Eduardo Groisman. Academic Press U.S.A.* Copyright 2001
- 39.-**Rama, G., Chhina, D.K., China, R.S., Sharma, S.** Urinary tract infections – microbial virulence determinants and reactive oxygen species. *Comparative Immunology Microbiology & Infectious Diseases* 28, 339-349, 2005.
- 40.-**Ronald, A.** The Etiology of Urinary Tract Infection: Traditional and Emerging Pathogens. *American Journal of Medicine*, Vol 113 (1A): 14S-19S, 2002.
- 41.-**Ruiz J., Simon K., Horcajada, P. J., Velasco, M. Barranco M., Roig, G., et. al.** Differences in Virulence Factors among Clinical Isolates of *Escherichia coli* Causing Cystitis and Pyelonephritis in Women and Prostatitis in Men. *Journal of Clinical Microbiology*. 40 (12): 4445-4449, 2002.
- 42.-**Sakarya, S., Tuncer, E.G., et.al.** *Escherichia coli* bind to urinary bladder epithelium through nonspecific sialic acid mediated adherence. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 39: 45-50, 2003.
- 43.-**Seed, C.P., Hultgren, J.S.** Blueprinting the regulatory response of *Escherichia coli* to the urinary tract. *TRENDS in Microbiology*, Vol. 13, No. 6, pp. 246-248, 2005.
- 44.-**Sharon, N.** Carbohydrates as future anti-adhesion drugs for infectious diseases. *Biochimica et Biophysica Acta* 1760: 527-537, 2006.
- 45.-**Smith, C.Y., Grande, K.K., et. al.** Novel Three-Dimensional Organoid Model for Evaluation of the Interaction of Uropathogenic *Escherichia coli* with Terminally Differentiated Human Urothelial Cells. *Infection and Immunity*, pp. 750-757, 2006.
- 46.-**Sorsa, J.L., Dufke, S., Schubert, S.** Identification of novel virulence-associated loci in uropathogenic *Escherichia coli* by suppression subtractive hybridization. *FEMS Microbiology Letters* 230: 203-208, 2004.

- 47.-**Srinivasan U., Foxman, B, Marrs, F.C.** Identification of a Gene Encoding Heat-Resistant Agglutinin in *Escherichia coli* as a Putative Virulence Factor in Urinary Tract Infection. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol.41, No.1, pp 285-289, 2003.
- 48.-**Sussman, M., Gally, D.L.** The Biology of Cystitis: Host and Bacterial Factors. *Annu. Rev. Med.*, 50:149-58, 1999.
- 49.-**Svanborg, C., Bergsten, G., et. al.** Uropathogenic *Escherichia coli* as a model of host-parasite interaction. *Current Opinion in Microbiology* 9: 33-39, 2006.
- 50.-**Svanborg-Eden, C., Jodal, U.,** Attachment of *Escherichia coli* to urinary sediment epithelial cells from urinary tract infection-prone and healthy children. *Infect. Immun.* 26, 837 – 840, 1979.
- 51.-**Tarr, I.P., Bilge, S.S., et. al.** Iha: Novel *Escherichia coli* O157:H7 Adherence-Confering Molecule Encoded on a Recently Acquired Chromosomal Island of Conserved Structure. *Infection and Immunity*, Vol. 68, No.3, pp. 1400-1407, 2000.
- 52.-**Yamamoto, S., Terai, A., Yuri, K., Kurazono, H., Takeda, Y., Yoshida, O.,** Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 12:85 – 90, 1995.
- 53.- <http://ecoli.bham>.