



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

ASOCIACIÓN DE LOS GENES DE VIRULENCIA CON LOS DISTINTOS
SEROGRUPOS DE CEPAS DE *Escherichia coli* UROPATÓGENAS

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA:

BIANCA JOCELYN HIDALGO HERNÁNDEZ

DIRECTORA DE TESIS

DRA. GLORIA LUZ PANIAGUA CONTRERAS

PROYECTO FINANCIADO POR LA DGAPA, UNAM, PAPIITIN218614.

Los Reyes Iztacala, Enero 2015





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

ÍNDICE

Resumen	5
Introducción	6
Justificación	15
Antecedentes	16
Objetivo General y Particulares	17
Materiales y Métodos	18
Resultados	26
Discusión	44
Conclusiones	50
Referencias	51

DEDICATORIA

A mis admirables padres por todo el apoyo incondicional que me brindaron, por creer en mí, motivarme siempre, compartir toda la ilusión y el orgullo de terminar mi carrera. Hicieron todo para que pudiera lograr esta meta.

A ti mi pequeña que llegaste de manera inesperada, pero me has dado fortaleza para llegar hasta aquí y porque me inspiraste para ser mejor para ti.

A mis hermanos que también siempre me han acompañado y compartido muchos momentos.

A mis maestros que para lograr esta meta, influyeron con sus lecciones y experiencias en formarme como una persona de bien y preparada para los retos que siguen en la vida.

A todos mis amigos que me han acompañado en diferentes y nuevas etapas de la carrera, compartiendo los sacrificios y los grandes esfuerzos que pasamos, aunque también momentos divertidos, ocurrentes e inolvidables. En especial a Esmeralda, Selene, Adaly y Carlos. Gracias por su amistad. Y a todos los demás amigos y compañeros que estuvieron presentes y fueron igual de importantes.

A todas esas personas importantes en mi vida, que siempre me brindaron su ayuda.

A todos ustedes por siempre mi agradecimiento.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO por formarme profesionalmente y por permitirme con gran orgullo ser parte de una de las mejores universidades.

A mi directora de tesis Dra. Gloria Luz Paniagua Contreras por abrirme las puertas de su laboratorio y dirigir mi trabajo de tesis, por aportarme sus conocimientos y permitirme culminar la última fase de mis estudios profesionales.

Al Dr. Eric Monroy Pérez por guiarme y por aportarme sus conocimientos, así como también por sacarnos algunas sonrisas.

Gracias a mis sinodales, Dr. Sergio Vaca Pacheco y las Biólogas Alina Uribe y Susana Almazán.

A mis padres por apoyarme siempre incondicionalmente, por las constantes motivaciones, por alentarme a seguir adelante, por creer siempre en mí y que a pesar de los momentos difíciles siempre estuvieron conmigo. Así como su apoyo moral, económico y brindarme siempre su cariño. Gracias por guiarme y hacer de mí una persona de bien.

A quienes nunca encontrare la forma de agradecer su apoyo, comprensión y confianza, esperando que sepan que mis logros también son suyos e inspirados en ustedes.

RESUMEN

Escherichia coli uropatógena (UPEC) es responsable de un alto porcentaje de infecciones del tracto urinario en la población mexicana. El objetivo de este trabajo fue identificar por PCR los genes de virulencia P fimbriae (*pap*), cytotoxic necrotizing factor 1 (*cnf1*), hemolysin A (*hlyA*), S fimbriae (*sfa*), afimbrial adhesin I (*afa*), aerobactin (*iuc*) y los serogrupos O2 (*xzy*), O4 (*wzx*), O15 (*wzy*), O18 (*wzx*), O22 (*wzx*), O25 (*wzy*) y O83 (*wzx*) en cepas de *Escherichia coli*. Las cepas de *E. coli* fueron identificadas por pruebas bioquímicas y por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) mediante el gen *rRNA*. Los genes de virulencia se detectaron por PCR convencional. Se analizaron las muestras de orina de 321 pacientes con infecciones del tracto urinario de hospitales del IMSS y de la CUSI, FESI, a partir de las cuales *E. coli* fue identificada en el 61 % de las cepas analizadas (n =194). El gen identificado con mayor frecuencia en las cepas de *E. coli* fue *pap* con el 25% (n=48), seguido por *iuc* con el 17% (n=32), *hlyA* con el 15% (n=30), *afa* con el 13% (n=25), *sfa* con el 12 % (n=24) y por último *cnf* con el 7% (n=14). El serogrupo más frecuente entre las cepas de *E. coli* fue el O25 con el 21% (n= 41), seguido por el O15 con el 17% (n= 33). El 92% de las cepas fue resistente a la Ampicilina y Cefalotina, en cada caso, el 91% a Carbenicilina, seguido por Pefloxacina con 72%, Ceftriaxona con 68%, Trimetoprim/sulfametoxazol con 63%, Netilmicina con 53%, Nitrofurantoína con 48%, Gentamicina con 46%, Cefotaxima con 46%, Cloranfenicol con 25% y Amikacina con 12%. La asociación de varios de los marcadores de virulencia entre las cepas de *E. coli* analizadas podrían incrementar la virulencia y desencadenar en infecciones más severas como cistitis o pielonefritis.

INTRODUCCIÓN

La familia Enterobacteriaceae comprende el grupo mayor y más heterogéneo de bacilos Gramnegativos de importancia médica. Son organismos ubicuos de distribución mundial y que se encuentran en el suelo, el agua, la vegetación y formando parte de la flora bacteriana normal del ser humano. Son bacilos Gramnegativos con un tamaño medio de 0.1-0.3 μm de ancho x 1.0-60 μm de largo, con flagelos y son anaerobios o anaerobios facultativos.

Escherichia coli es miembro de esta familia, produce infecciones oportunistas, en especial relacionadas con el tracto urinario, es responsable de más del 80% de las infecciones en vías urinarias, adquiridas en las comunidades humanas o nosocomiales. Las cepas que producen la infección se originan en el tracto gastrointestinal, asociándose a enfermedades con serotipos específicos. (Murray *et al.*, 1993)

Escherichia coli se encuentra de manera natural formando parte de la flora intestinal de los humanos. Poseen una estructura antigénica compleja y producen diversas toxinas y otros factores de virulencia. (Jawetz *et al.*, 1990)

E. coli, como otras bacterias de la flora intestinal frecuentemente forma una relación simbiótica benéfica con su hospedero, proporcionando sustancias nutritivas, señales clave para la regulación y desarrollo de la respuesta inmune y protección contra patógenos extraños (Yan y Polk, 2004).

Las cepas patógenas se clasifican como *E. coli* diarreogénicas o *E. coli* extra intestinales patógenas (ExPEC) (Kaper *et al.*, 2004; Russo & Johnson, 2000). Dentro de cada uno de estos grupos existen cepas conocidas como patotipos que comparten

factores de virulencia comunes, y causan patologías similares (Marrs *et al.*, 2005). Varios patotipos diarreogénicos de *E. coli* ocasionan gastroenteritis, pero rara vez ocasionan enfermedad fuera del tubo digestivo. Por otro lado ExPEC puede existir en el intestino sin causar molestias, sin embargo tiene la capacidad de diseminarse y colonizar otros lugares del anfitrión incluyendo sangre, sistema nervioso central y el tracto urinario ocasionando enfermedad. Entre las ExPEC se encuentran las cepas de *E. coli* uropatógenas (UPEC). (Foxman, 2003)

Una infección del tracto urinario ocurre cuando existe un número significativo de organismos patógenos en el sistema urinario que ocasionan algunos síntomas, como el orinar frecuentemente (polaquiuria), dolor durante la micción y/o presencia de sangre en la orina (hematuria). Se requieren de 100 bacterias uropatógenas por mililitro de orina para que el urocultivo sea considerado positivo. Las infecciones de tracto urinario generalmente siguen la ruta ascendente y son causadas por bacterias presentes en la biota intestinal normal. (Tay *et al.*, 2012)

Las UPEC posee un gran número de genes de virulencia, lo que les permite invadir el tracto urinario, el tracto urinario humano es un ambiente normalmente estéril, protegido de patógenos por el flujo de la orina, factores antibacterianos secretados y por las actividades bactericidas de células efectoras inmunitarias. Sin embargo aún en poblaciones que tienen estas defensas naturales y a pesar de la utilización intensiva de antibióticos, las infecciones bacterianas del tracto urinario son incidentalmente un problema común. Las infecciones del tracto urinario (ITU) generalmente empiezan con la colonización de la uretra por cepas de *E. coli* provenientes de la microbiota rectal. El establecimiento prolongado de cepas uropatógenas en el colon provee de una fuente

constante de bacterias y así aumentan las posibilidades de colonizar la uretra. El hecho de que el colon contamine continuamente con bacterias la uretra, explica, en buena parte, porque son tan comunes las infecciones recurrentes en el tracto urinario. (Tay *et al.*, 2012)

Dentro de los padecimientos causados por la *E. coli* se encuentran bacteriuria, prostatitis, uretritis, bacteriuria asintomática, así como de mayor importancia la cistitis y pielonefritis.

La cistitis aguda es una inflamación superficial de la vejiga y la uretra la cual conduce a los principales síntomas asociados que incluyen; micción dolorosa (sensación de ardor), necesidad urgente y frecuente de orinar, generalmente se orina en pequeñas cantidades, deseos de orinar aunque la vejiga esté vacía, sangre en la orina y en algunos casos dolor suprapúbico que indican una infección renal. El paciente puede experimentar algunos o todos los síntomas mencionados. Las infecciones pueden diseminarse dentro del tracto urinario, frecuentemente los pacientes tienen recurrencias de cistitis algunas veces espaciadas con episodios de pielonefritis.

La pielonefritis es usualmente un problema más serio, los dos primeros síntomas son dolor lumbar, en un costado y en el área justo debajo de las costillas, y fiebre que persiste por más de dos días. Otros síntomas menos comunes son, náuseas, vómito y malestar general además de los síntomas característicos de cistitis. La orina puede estar turbia, con sangre o con mal olor. En algunos casos (aproximadamente el 30% de los casos) las infecciones del tracto urinario pueden conducir a septicemia y aún a la muerte. (Tay *et al.*, 2012). Dependerá del origen de la infección y de la enfermedad

subyacente, la mortalidad aumenta en pacientes inmunocomprometidos o con infecciones producto de peritonitis.

UPEC es capaz de multiplicarse en el citoplasma de las células de la vejiga y formar una biopelícula intracelular que puede contener miles de bacterias. La multiplicación intracelular le permite evadir la respuesta inmune del hospedero, la acción de varios antibióticos y constituye un reservorio para las infecciones recurrentes del tracto urinario (Anderson *et al.*, 2003.; Eto *et al.*, 2007).

E. coli tiene la capacidad infectiva debido a la producción de un lipopolisacárido (LPS) o también conocido como endotoxina asociado al antígeno O, que a su vez se asocia con la membrana externa que se libera con la lisis celular.

Los organismos con antígenos K específicos se asocian a mayor virulencia son externos en relación con los O, los K pueden interferir en la aglutinación mediante antiseros O, en *E. coli* que producen antígeno K1 son predominantes en la meningitis neonatal y también producen fijación de las bacterias a las células epiteliales antes de la invasión de las vías gastrointestinales o urinarias. (Jawetz *et al.*, 1990).

Se han reconocido más de 1000 serotipos de *E. coli* basados en antígenos O, H y K. La serotipificación es importante porque contribuye a distinguir el número pequeño de cepas que frecuentemente causan enfermedades. (Tay *et al.*, 2012)

Se han asociado de forma específica a infecciones del tracto urinario, aunque el papel de los antígenos flagelares y capsulares en la patogenia no se han definido concretamente. Los antígenos flagelares contribuyen a la adherencia de las cepas

nefrogénicas al uroepitelio antes de que aparezca la infección. *E. coli* puede ocasionar septicemia y la mortalidad aumenta en pacientes inmunocomprometidos.

Como consecuencia de la invasión y colonización por UPEC, la respuesta inflamatoria del hospedero permite la producción de citocinas, la influencia de neutrófilos, la exfoliación de células epiteliales de la vejiga infectada y la generación de nitrógeno reactivo y oxígeno con otros compuestos antimicrobianos. (Bower *et al.*, 2005; Mulvey *et al.*, 2000)

La capacidad de las bacterias para adherirse a las células uroepiteliales parece contribuir al desarrollo de la infección (Murray *et al.*, 1993). Los factores determinantes de virulencia son las adhesinas (Tarchouna *et al.*, 2013).

Los pili o fimbrias son proyecciones similares a pelos que surgen de la superficie de los bacilos y facilitan la adherencia a la célula huésped.

La capacidad bacteriana para resistir la acción bactericida del suero, producir hemolisinas y unirse a las células uropiteliales se asocia a un aumento en la virulencia. La adherencia *in vitro* de *E. coli* a las células uroepiteliales se ha asociado a los pili P, habiendo mostrado una fijación máxima en los pacientes con pielonefritis y una menor afinidad por las células en los casos de cistitis y bacteriuria asintomática. Existen indicios de que ciertos uropatógenos como *E. coli*, producen una capa de glicocálix o limo que es la responsable de la adhesión celular y la capacidad de las bacterias para adherirse a las células uroepiteliales parece contribuir al desarrollo de la infección. (Murray *et al.*, 1993)

Una vez en el interior del tracto urinario, UPEC coloniza preferentemente la vejiga causando cistitis, pero también puede ascender a través de los ureteros de los riñones y ocasionar pielonefritis. La bacteria asciende por la uretra y coloniza la vejiga, resultando en cistitis y si la infección continúa por los uréteres, alcanza el riñón produciendo pielonefritis (Lane *et al.* 2007). Como consecuencia de la invasión y colonización por UPEC, la respuesta inflamatoria del hospedero permite la producción de citocinas, la afluencia de neutrófilos, la exfoliación de células epiteliales de la vejiga infectada y la generación de nitrógeno reactivo y oxígeno con otros compuestos antimicrobianos (Bower *et al.*, 2005; Mulvey *et al.*, 2001).

La capacidad de adhesión de UPEC al tracto urinario es uno de los principales factores de virulencia para la colonización, lo que le permite resistir el flujo de la orina para promover posteriormente la invasión de las células uroteliales. Dentro de las células epiteliales de la vejiga, UPEC transita en el interior de compartimentos ácidos unidos a la membrana, similares a los endosomas tardíos o lisosomas (Eto *et al.*, 2007). UPEC es capaz de romper estos compartimentos para multiplicarse en el citoplasma de las células de la vejiga y formar una biopelícula intracelular que puede contener miles de bacterias, este fenómeno ha sido observado en modelos de ISUTU en ratón y en humanos con ISUTU. La multiplicación intracelular de UPEC le permite evadir la respuesta inmune del hospedero, la acción de varios antibióticos y constituye un reservorio para las infecciones recurrentes del tracto urinario. (Anderson *et al.*, 2003; Eto *et al.*, 2007; Mulvey *et al.*, 2001; Rosen *et al.*, 2007)

UPEC posee un gran número de genes de virulencia que codifican para adhesinas, sistemas de adquisición de hierro, citotoxinas, enterotoxinas y antígenos capsulares.

Estos genes a menudo se encuentran en regiones llamadas Islas de patogenicidad (PAIs) (Gal-Mor & Finlay, 2006; Hacker & Kaper, 2000; Lloyd *et al.*, 2007).

Entre los genes que codifican adhesinas se encuentran; *pap* (pilus associated with pyelonephritis), *sfa* (S fimbriae), *afa I* (afimbrial adhesin I), *fim* (type-1 fimbriae), *tsh* (temperature-sensitive hemagglutinin) e *iha*, (non hemagglutinating adhesin), sistemas de adquisición de hierro; *iuc* (aerobactin), *iroN* (iron), *irp2* (iron-repressible protein), citotoxinas; *cnf 1* (cytotoxic necrotizing factor I), *usp* (uropathogenic specific protein), *hly* (haemolysin), *vat* (vacuolating autotransporter toxin), *astA* (entero aggregative toxin), *iss* (increased serum survival protein) y *cva/cvi* (colicin V plasmid operon genes), entero toxinas; *set1A* y *set1B* (*Shigella* enterotoxin 1), *astA* (Entero Aggregative heat stable toxin), *sen* (ShET-2 toxin), capsulares: *kpsMT II* (K-antigen), y otros genes; *pic* (protein involved in the intestinal colonization) y *OmpT* (the outer membrane protease T). (Momtaz *et al.*, 2013).

En los últimos años el tratamiento de las infecciones del tracto urinario por UPEC en México y en el mundo se ha complicado, debido a la selección de cepas resistentes a los antibióticos (Johnson *et al.*, 2005a; Johnson *et al.*, 2005b).

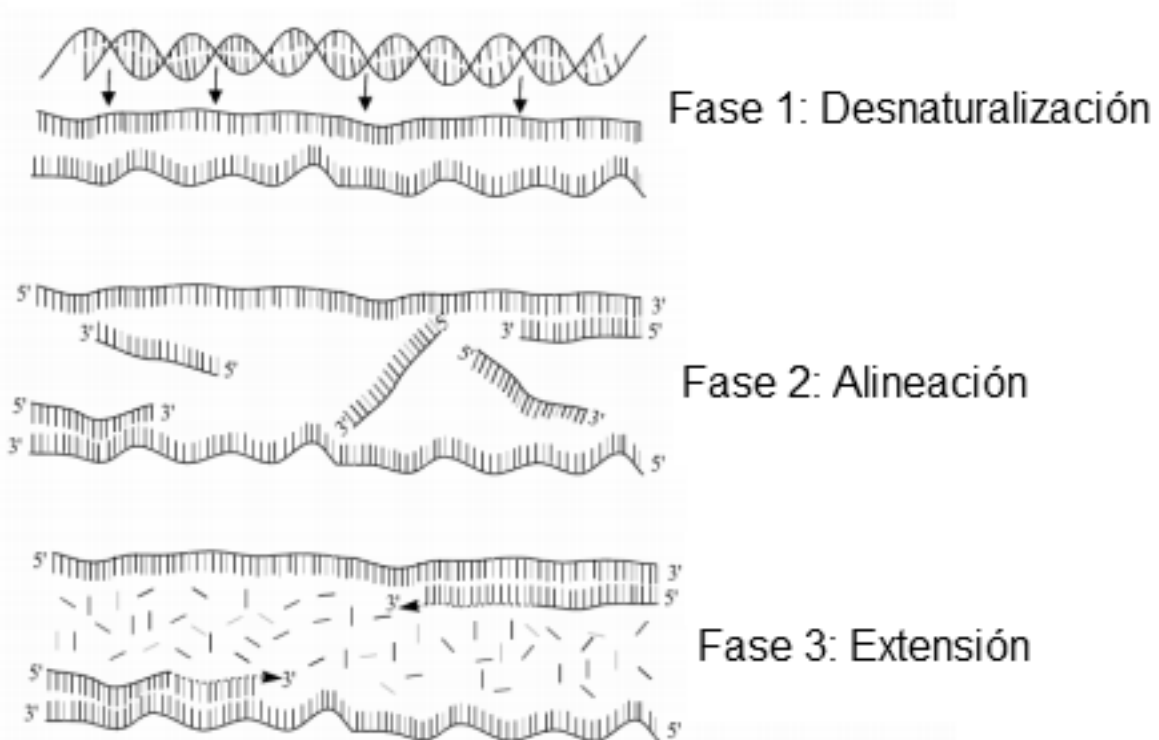
La resistencia a antimicrobianos que presenta *E. coli*, complica la terapia para las infecciones causadas por esta bacteria, un componente importante de esta resistencia es la actividad de las proteínas de eflujo de membrana, referidas como bombas de eflujo (Poole *et al.*, 2004). La función de las bombas de eflujo es la de exportar las moléculas a través de la envoltura bacteriana, con lo cual se limita la acumulación intracelular del antibiótico. El eflujo disminuye la eficacia antibacteriana incluso de

drogas no relacionadas estructuralmente, ya que son expulsadas por la misma bomba de eflujo, también es responsable de la resistencia a antibióticos natural o adquirida y es específica de género o especie. (Depardieu *et al.*, 2007)

Las infecciones en vías urinarias representan un padecimiento frecuente en la comunidad, los casos de recurrencia representan una problemática que se infieren a los factores de virulencia que tienen las cepas de *E. coli*, los que en varios casos aumentan su patogenicidad causando enfermedades de mayor gravedad que pueden desencadenar en la muerte como es el caso de la cistitis y la pielonefritis. Debido a lo anterior el propósito de este estudio será determinar la asociación de genes *P fimbriae (pap)*, *cytotoxic necrotizing factor 1 (cnf1)*, *hemolysin A (hlyA)*, *S fimbriae (sfa)*, *afimbrial adhesin I (afa)* y *aerobactin (iuc)* con los serogrupos O2 (*xzy*), O4 (*wzx*), O15 (*wzy*), O18 (*wzx*), O22 (*wzx*), O25 (*wzy*) y O83 (*wzx*), en cepas de *Escherichia coli* aisladas de pacientes con infecciones del tracto urinario (IsTU).

Las técnicas de biología molecular que más se utiliza es la PCR. Consiste en obtener microgramos de DNA a partir de nanogramos de un DNA molde o (de RNA en el caso de RT-PCR).

Fases de la amplificación por PCR



La invención de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) por K. Mullis y sus colaboradores en 1985 ha revolucionado la biología molecular y la medicina molecular (Saiki *et al.*, 1985). La reacción en cadena de la polimerasa es una técnica *in vitro* utilizada para amplificar enzimáticamente una región determinada de ADN situada entre dos regiones de ADN cuya secuencia se conoce. Mientras que antes solo podían obtenerse cantidades mínimas de un gen específico, ahora incluso un único ejemplar de un gen puede amplificarse con la PCR hasta un millón de ejemplares en tan solo unas pocas horas. La técnica de PCR se ha hecho indispensable para muchos procedimientos comunes, como la clonación de fragmentos específicos de ADN, la detección e identificación de genes para diagnóstico y medicina legal, y en la investigación de modelos de expresión de los genes. (Somma *et al.*, 2007)

JUSTIFICACIÓN

Debido al aumento en los padecimientos de infecciones de tracto urinario y a que no se conocen las asociaciones de los marcadores de virulencia de los genotipos de virulencia y su asociación con los distintos serogrupos de cepas UPEC, así también contribuirá a mejorar el tratamiento médico de las infecciones del tracto urinario y a disminuir el tiempo de duración de las infecciones por UPEC.

ANTECEDENTES

Momtaz y colaboradores en el 2013 identificaron por PCR en un grupo de cepas de *Escherichia coli* uropatógena (UPEC) (n= 12) los diferentes serogrupos, los genes *fim*, *uspyaadA1* y los genes de resistencia a antibióticos (*qnr*, *cat*, *cmla* y *dfrA1*).

Agarwal y colaboradores en el 2013 caracterizaron 172 cepas de UPEC asociadas con cistitis aguda en mujeres, identificaron 15 genes de virulencia por PCR multiplex, realizaron pruebas *in vitro* para la formación de biopelícula. Estos autores describieron que los genes *fimH*, *tratiutA*, *kpsMII*, *papGalelo II* y *fyuA* que codifican para adhesinas y sistemas de adquisición de hierro se asocian con infecciones en la vejiga.

Tarchouna y colaboradores en el 2013 investigaron la expresión de un amplio número de factores de virulencia de *E. coli*, entre los cuales se encontraron los genes que codifican para los sistemas fimbriales (*fimH*, *pap*, *sfa I*, *foc*), así como el operón que codifica para *afa* afimbrial. Las combinaciones de los genes detectados fueron establecidas como patrones de virulencia.

Berry y colaboradores en 2009, describieron que las cepas UPEC son las causantes de la mayoría de las infecciones de tracto urinario, encontrando que en un modelo de ratón, la expresión de otros factores de virulencia, incluyendo *hlyA*, *CnF1*, *FLIC*, *kpsD* y la biopelícula adhesina y *faL* también aumentó, mientras que la expresión de *fimA* disminuyó. Sus resultados indican que la UPEC regula diferencialmente los factores de virulencia en el medio ambiente intracelular.

OBJETIVO GENERAL

1. Caracterización molecular de genes de virulencia en cepas de *Escherichia coli* uropatógena.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Identificación de *Escherichia coli* por PCR convencional mediante del gen *rRNA*.
2. Determinar los fenotipos de resistencia a antibióticos de las cepas de *Escherichia coli* por el método de Kirby-Bauer.
3. Identificación por PCR convencional y multiplex de los genes de virulencia *P fimbriae (pap)*, *cytotoxic necrotizing factor 1 (cnf1)*, *hemolysin A (hlyA)*, *S fimbriae (sfa)*, *afimbrial adhesin I (afa)*, *aerobactin (iuc)* de *Escherichia coli*.
4. Determinación de los serogrupos O2 (*xzy*), O4 (*wzx*), O15 (*wzy*), O18 (*wzx*), O22 (*wzx*), O25 (*wzy*) y O83 (*wzx*), en cepas de *Escherichia coli* aisladas de pacientes con infecciones del tracto urinario.
5. Asociación de los diferentes marcadores de virulencia con los serogrupos de las cepas de UPEC.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de las Muestras

Para el desarrollo de este estudio se analizaron las muestras de orina de 321 pacientes con infecciones del tracto urinario que acudieron a la Unidad Médica Familiar (UMF) No.64 del IMSS, al Hospital No.72 del IMSS y al Laboratorio de Análisis Clínicos de la CUSI, FES Iztacala, ubicados en el Municipio de Tlalnepantla, Estado de México.

Siembra de las Muestras de orina

Las muestras de orina de los pacientes de la UMF 64 y del hospital 72 del IMSS fueron sembradas en sus respectivos laboratorios por medio de asas estériles en los medios de cultivo de Agar sangre y EMB (Eosina-azul de metileno) y se incubaron a 37° C por 24 horas. Una vez crecidas las cepas con características morfológicas de *E. Coli* fueron transportadas al Laboratorio Clínico de la CUSI-Iztacala, FESI.

Identificación de *E. coli* por Pruebas Bioquímicas

Las cepas de la especie de *E. coli* fueron identificadas mediante la prueba del indol, utilizando medio de cultivo SIM y rojo de metilo en medio MR-VP (Voges Proskauer).

Susceptibilidad a antibióticos por el Método Kirby-Bauer

Para probar la susceptibilidad y/o resistencia a los antibióticos en cada una de las cepas de *E. coli* se utilizó la técnica de Bauer- Kirby (Bauer *et al.*, 1966). Para lo cual se tomaron por medio de un hisopo estéril 5 colonias de cada cepa crecida en MH (Mueller Hinton) y se inocularon sobre la totalidad de la superficie de agar Mueller-Hinton.

Por último se tomó un sensidisco con los doce antimicrobianos a determinar (BIO-RAD) con una pinza estéril y se colocó sobre el agar de Mueller-Hinton. Así el antimicrobiano se difundió formando un gradiente de concentración, que inhibió ó permitió el crecimiento de la bacteria en un tiempo de 24 horas a 37°C. De ésta manera las cepas se clasificaron como susceptibles (S) o resistentes (R) dependiendo del diámetro del halo de inhibición (el cual se midió con un vernier), conforme a las recomendaciones del fabricante respecto a los puntos de corte.

Extracción del DNA Bacteriano

Las cepas de *E. coli* fueron sembradas en el medio de Mueller-Hinton e incubadas a 37°C por 24 horas. Al término se realizó la extracción del DNA bacteriano por el método de ebullición, para lo cual varias de las colonias fueron tomadas por medio de un asa estéril y posteriormente suspendidas en tubos de rosca de 16x150 que contenían 2 ml de solución salina estéril. Las muestras se agitaron en un vortex durante 20 segundos y posteriormente los tubos se colocaron en baño María (100°C) por 25 minutos. Al término los tubos se colocaron en hielo por 10 minutos 1.5 ml de cada muestra fue depositado en un tubo eppendorf nuevo y estéril y fueron centrifugados por 10 minutos a 14,000 rpm. El sobrenadante que contenía el DNA bacteriano fue separado en otro tubo eppendorfy se guardó a -20° C, hasta su utilización para las reacciones de la PCR.

Identificación de *E. coli* y de los distintos marcadores de virulencia por PCR convencional y PCR multiplex.

Las cepas de *E. coli* fueron identificadas por PCR mediante la amplificación del gen *16SrRNA* (Tabla 1), para lo cual se utilizaron las perlas PuRetaq Ready-To-Go™ PCR (GE Health care), que contenían 1.5 mmol de MgCl₂, 0.5 U de AmpliTaq polimerase y 100 nmol de dNTPs, para un volumen final de 25 µl por cada muestra de reacción; 1 microlitro de cada uno de los oligonucleótidos (Integrated DNA Technologies; Tabla 1) a la concentración de 10 pmol (Paniagua *et al*, 2007), 20 microlitros de agua libre de nucleasas estéril y 3 microlitros de ADN. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos (desnaturalización a 95°C por 30 segundos, alineación a 55°C por 60 segundos y extensión a 72°C por 60 segundos). Finalmente la extensión se prolongó por 5 minutos a 72°C. La cepa de *E. coli* ATCC 25922 fue utilizada como control positivo.

La identificación de los genes *pap*, *cnf1*, *hlyA* y *sfa* se realizó por PCR multiplex conforme a lo descrito por Yamamoto (1995), para lo cual el volumen final por cada mezcla de reacción fue de 25 µl; 1 microlitro de cada uno de los oligonucleótidos (Integrated DNA Technologies; Tabla 1) a la concentración de 10 pmol, 14 microlitros de agua libre de nucleasas estéril y 3 microlitros de ADN. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94°C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos (desnaturalización a 94°C por 60 segundos, alineación a 63°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 3 minutos). Finalmente la extensión se prolongó por 7 minutos a 72°C.

La identificación de *afa* se realizó por PCR sencillo conforme a lo descrito por Yamamoto (1995), para lo cual el volumen final por cada mezcla de reacción fue de 25 μ l; 1 microlitro de cada uno de los oligonucleótidos (Integrated DNA Technologies; Tabla 1) a la concentración de 10 pmol, 20 microlitros de agua libre de nucleasas estéril y 3 microlitros de ADN. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 25 ciclos (desnaturalización a 94°C por 2 minutos, alineación a 65°C por 1 minuto y extensión a 72°C por 2 minutos). Finalmente la extensión se prolongó por 7 minutos a 72°C.

La identificación de *iuc* se realizó por PCR sencillo, para lo cual el volumen final por cada mezcla de reacción fue de 25 μ l; 1 microlitro de cada uno de los oligonucleótidos (Integrated DNA Technologies; Tabla 1) a la concentración de 10 pmol (Paniagua *et al.*, 2007), 20 microlitros de agua libre de nucleasas estéril y 3 microlitros de ADN. Las condiciones de amplificación fueron las mismas que se utilizaron para la amplificación del gen *16SrRNA* (Tabla 1).

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:

Gen	Oligo-nucleótido	Secuencia5'-3'	Tamaño del amplicón (pb)	Referencia
16SrRNA	wl-3110 wl-3111	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG CCGTCAATTCATTTGAGTTT	919	Momtaz <i>et al.</i> , 2013.
<i>pap</i>	pap3 pap4	GCAACAGCAACGCTGGTTGCATCAT AGAGAGAGCCACTCTTATACGGACA	336	Yamamoto <i>et al.</i> , 1995
<i>cnf1</i>	cnf1 cnf2	AAGATGGAGTTTCCTATGCAGGAG TGGAGTTTCCTATGCAGGAG	498	Yamamoto <i>et al.</i> , 1995
<i>hlyA</i>	hly1 hly2	AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT ACCATATAAGCGGTCATTCCCGTCA	1177	Yamamoto <i>et al.</i> , 1995
<i>sfa</i>	sfa1 sfa2	CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA	410	Yamamoto <i>et al.</i> , 1995
<i>afa</i>	afa1 afa2	GCTGGGCAGCAAACCTGATAACTCTC CATCAAGCTGTTTGTTCGTCCGCCG	750	Yamamoto <i>et al.</i> , 1995
<i>iuc</i>	iuc1 iuc2	ATGAGAATCATTATTGACATAATTG CTCACGGGTGAAAAATATTTT	1482	Momtaz <i>et al.</i> , 2013.

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para la caracterización molecular de *E. coli*.

Identificación de los serogrupos de *E. coli* mediante PCR multiplex.

La identificación de los serogrupos O2, O4, O15, O18, O22, O25 y O83 en las cepas UPEC se realizó por PCR multiplex, para lo cual el volumen final por cada mezcla de reacción fue de 25 µl; 1 microlitro de cada uno de los oligonucleótidos (Integrated DNA Technologies; Tabla 2) a la concentración de 10 pmol, 8 microlitros de agua libre de nucleasas estéril y 3 microlitros de ADN. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos (desnaturalización a 95°C por 30 segundos, alineación a 55°C por 60 segundos y extensión a 72°C por 60 segundos). Finalmente la extensión se prolongó por 5 minutos a 72°C.

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:

Serogrupo	Gen	Oligo-nucleótido	Secuencia 5'-3'	Tamaño del amplicón (pb)	Referencia
02	wzy	wl-3110	AGTGAGTTACTTTTTAGCGATGGAC	770	Li, <i>et al.</i> , 2010.
		wl-3111	AGTTTAGTATGCCCTGACTTTGAA		
04	wzx	wl-14642	TTGTTGCGATAATGTGCATGTTCC	664	Li, <i>et al.</i> , 2010.
		wl-14643	AATAATTTGCTATACCCACACCCTC		
015	wzy	wl-14672	TCTTGTTAGAGTCATTGGTGTATCG	183	Li, <i>et al.</i> , 2010.
		wl-14673	ATAAACGAGCAAGCACACACC		
018	wzx	wl-14656	GTTCCGGTGGTTGGATTACAGTTAG	551	Li, <i>et al.</i> , 2010.
		wl-14657	CTACTATCATCCTCACTGACCACG		
022	wzx	wl-14660	TTCATTGTCGCCACTACTTTCCG	468	Li, <i>et al.</i> , 2010.
		wl-14661	GAAACAGCCCATGACATTACTACG		
025	wzy	wl-14666	AGAGATCCGTCTTTTATTTGTTTCGC	230	Li, <i>et al.</i> , 2010.
		wl-14667	GTTCTGGATACCTAACGCAATACCC		
083	wzx	wl-14668	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	362	Li, <i>et al.</i> , 2010.
		wl-14669	CCGTCAATTCATTTGAGTTT		

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para la detección de los serogrupos de *E. coli*.

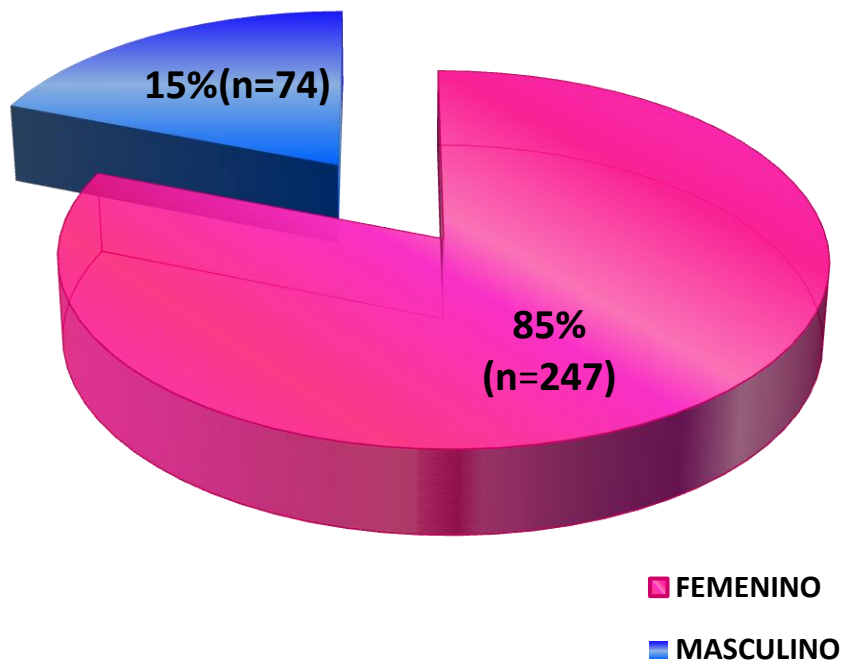
Análisis de los amplicones por electroforesis en geles de Agarosa

Los amplicones obtenidos de la PCR fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 o 2% según el tamaño del amplicón (Tabla 1). A la agarosa se le agregó 0.3 μ L de colorante Midori Green (BIORAD) para su visualización. Las condiciones de corrimiento fueron: 120 volts, 94 miliampers por un tiempo de 35 minutos. Los tamaños de los fragmentos analizados fueron comparados con marcadores de tamaño molecular de 100 pb y 200 pb. Los geles fueron analizados bajo luz UV y fotografiados con el sistema de foto documentación GEL LOGIC 100(KODAK).

RESULTADOS

Pacientes Analizados

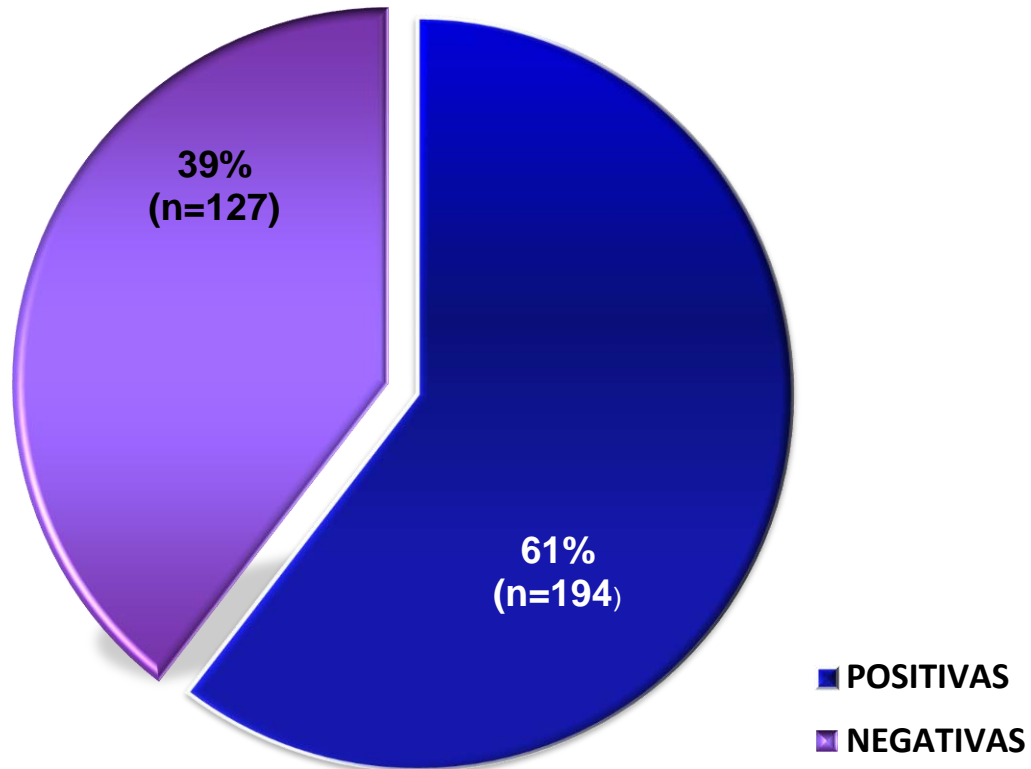
Para el desarrollo de este estudio se analizaron las muestras de orina de 321 pacientes con infecciones del tracto urinario que acudieron a la Unidad Médica Familiar (UMF) No.64 del IMSS, al Hospital No.72 del IMSS y al Laboratorio de Análisis Clínicos de la CUSI, FES Iztacala, ubicados en el Municipio de Tlalnepantla, Estado de México. El 81% (n=247) de los pacientes correspondió al sexo femenino y el 19% (n=74) al sexo masculino (Gráfica 1).



Gráfica 1. Distribución de los pacientes analizados por sexo.

Identificación de *Escherichia coli* por PCR convencional.

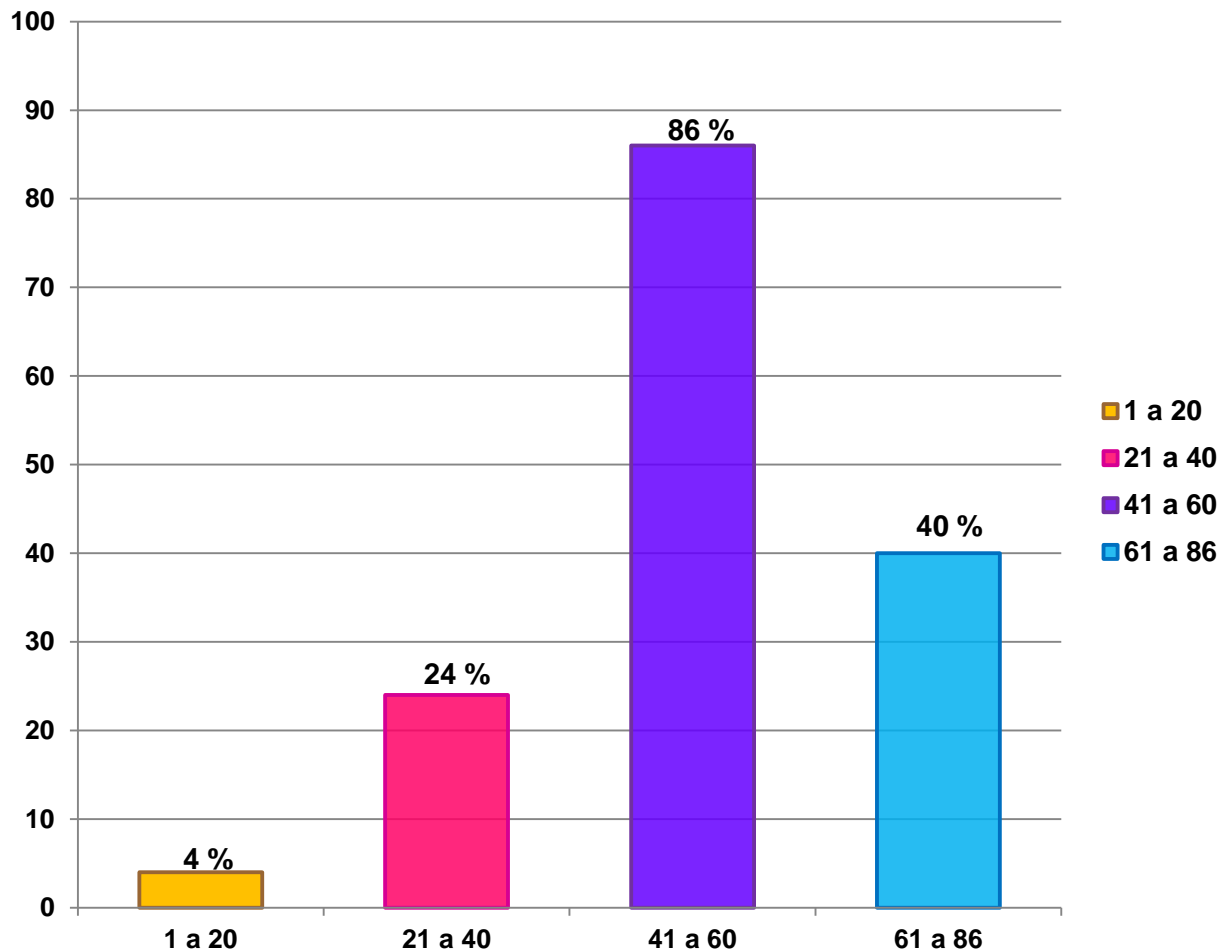
El 61 % de las cepas analizadas (n =194) por PCR convencional fueron positivas para el gen *16SrRNA*, mientras que el 39% (n=127) fueron negativas (Gráfica 2 y figura 1).



Gráfica 2. Porcentaje de cepas positivas para *E. coli* y cepas uropatógenas (negativas).

Edad de los pacientes analizados

En la Gráfica 3 se observa la distribución de los pacientes por edad. El grupo de edad más frecuente fue de 41 a 60 años (n=86) y con el mayor porcentaje con 88%. Los rangos menos frecuentes fueron de 61 a 86 años (n=40) y 21 a 40 años (n=24), mientras que en el rango con solo un paciente fue de 1 a 20 años (n=4).



Gráfica 3. Distribución de los pacientes por rangos de edad.

En la Tabla 3, se observa el diagnóstico clínico de los pacientes estudiados. El 94% (n=183) correspondió a infecciones de vías urinarias, seguido por pielonefritis y urosepsis con el 0.6% (n=2), lupus eritomatoso, cervico vaginitis y litiasis renal con el 0.3% (n=1), en cada caso.

Diagnóstico clínico	No.	Porcentaje
Infección de Vías Urinarias	312	97.2%
Infección Vaginal	2	0.6%
Pielonefritis	2	0.6%
IVU/Urosepsis	2	0.6%
Lupus Eritomatoso	1	0.3%
IVU y Cervico vaginitis	1	0.3%
Litiasis Renal	1	0.3%

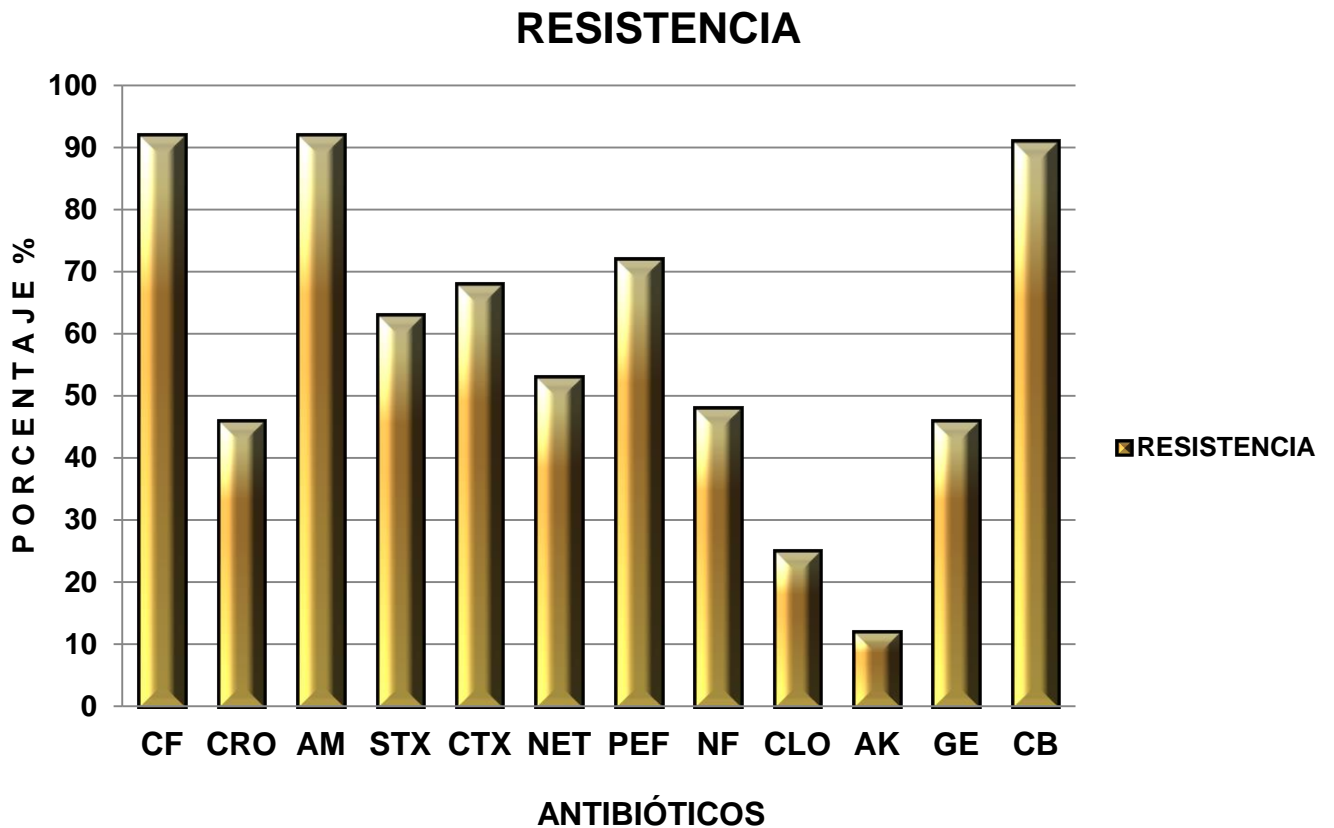
Tabla 3. Diagnóstico de los pacientes.

Resistencia a los antibióticos

En la Gráfica 4 se aprecian los porcentajes de resistencia de las cepas de *E. coli* a los 12 antibióticos probados. El 92% (n = 179) de las cepas fue resistente a la Ampicilina y Cefalotina, en cada caso, el 91% a Carbenicilina (n =177), seguido por Pefloxacina con 72% (n = 141), Cefotaxima con 68% (n=132), Trimetoprim/sulfametoxazol con 63% (n=123), Netilmicina con 53% (n=103), Nitrofurantoína con 48% (n =93), Gentamicina con 46% (n =90), Ceftriaxona con 46% (n =89), Cloranfenicol con 25% (n =48) y Amikacina con 12%, (n=23).

En la Gráfica 4 se aprecia la resistencia de las cepas de *E. coli*, la Ampicilina presentó una menor sensibilidad con solo 8%.

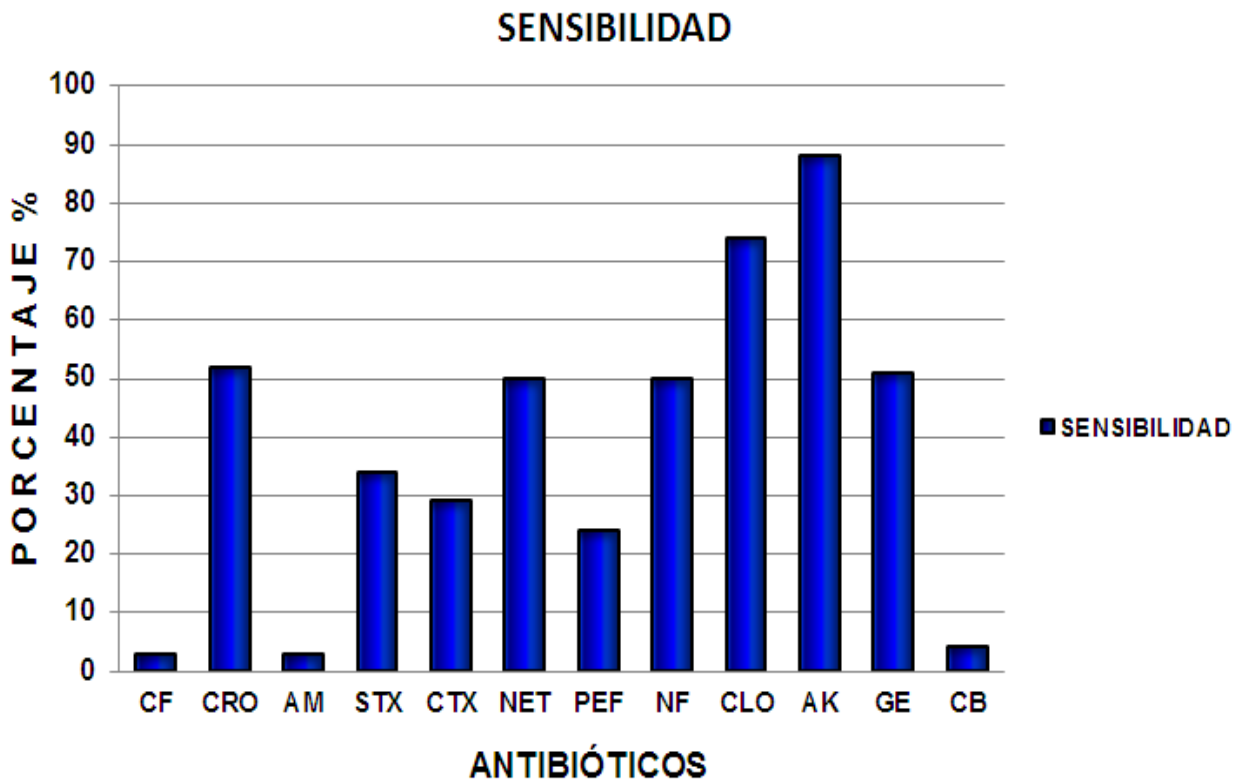
CF = Cefalotina, CRO = Ceftriaxona, AM= Ampicilina, STX=Trimetoprim/sulfametoxazol, CTX=Cefotaxima, NET=Netilmicina, PEF=Pefloxacina, NF=Nitrofurantoína, CLO=Cloranfenicol, AK= Amikacina, GE= Gentamicina CB=Carbenicilina



Gráfica 4. Resistencia de las cepas de *E. coli* a los a antibióticos.

En la Gráfica 5 se aprecia la sensibilidad de las cepas de *E. coli*, presentando una mayor sensibilidad la Amikacina con un 88%.

CF = Cefalotina, CRO = Ceftriaxona, AM= Ampicilina, STX=Trimetoprim/sulfametoxazol, CTX=Cefotaxima, NET=Netilmicina, PEF=Pefloxacina, NF=Nitrofurantoina, CLO=Cloranfenicol, AK= Amikacina, GE= Gentamicina CB=Carbenicilina



Gráfica 5. Sensibilidad de las cepas de *E. coli* a los a antibióticos.

Identificación de los genes de virulencia en las cepas de *E. coli* por PCR

Multiplex

En este trabajo el gen con mayor frecuencia identificado en las cepas de *E. coli* fue *pap* con 26% (n=48) (Tabla 4, figura 3), seguido por *iuc* con 19% (n=32)(figura 2), *hlyA* con 18%(n=30)(figura 3), *afa* con 15% (n=25)(figura 3),*sfa* con 14 %(n=24)(figura 3) y por último el de menor frecuencia fue *cnf* con 8% (n=14)(figura 3).

GEN	No	(%)
<i>pap</i>	48	(25 %)
<i>iuc</i>	32	(17 %)
<i>hlyA</i>	30	(15 %)
<i>afa</i>	25	(13 %)
<i>sfa</i>	24	(12 %)
<i>cnf</i>	14	(7 %)

Tabla 4. Porcentaje de los genes en las cepas de *E. coli*

Combinación de los marcadores de virulencia en las cepas de *E. coli*

La combinación de los genes de virulencia en las cepas de UPEC se aprecian en la Tabla 5, la combinación con mayor frecuencia fue *hlyA-pap* (n=8), seguido por *pap-iuc* (n=6).

COMBINACIÓN	CEPAS
<i>hlyA, pap</i>	8
<i>pap, iuc</i>	6
<i>hlyA, sfa, pap, cnf</i>	5
<i>pap, afa</i>	4
<i>hlyA, sfa</i>	4
<i>hlyA, sfa, pap</i>	2
<i>hlyA, sfa, cnf</i>	2
<i>hlyA, afa</i>	2
<i>afa, iuc</i>	2
<i>hlyA, cnf</i>	2
<i>sfa, iuc</i>	2
<i>sfa, cnf, iuc</i>	1
<i>pap, afa, iuc</i>	1
<i>hlyA, afa, iuc</i>	1
<i>hlyA, sfa, pap, iuc</i>	1

Tabla 5. Asociación de los genes de virulencia en las cepas de *E. coli* uropatógenas.

Identificación de los distintos serogrupos en las cepas de UPEC

En la Tabla 6, se observan la frecuencia de los serogrupos identificados en las cepas de *E. coli*. El 21% (n=41) de las cepas de *E. coli* correspondió al serogrupo O25, seguido del O15 con el 17% (n=33), los serogrupos O2 y O22 presentaron solo 0.5% (n=1), mientras que los serogrupos O4, O18 y O83 tuvieron 0% debido a que no se presentaron (n=0).

SERO-GRUPO	No	(%)
O2	1	(0.50 %)
O4	0	(0 %)
O15	33	(17 %)
O18	0	(0 %)
O22	1	(0.50 %)
O25	41	(21 %)
O83	0	(0 %)

Tabla 6. Porcentaje de los distintos serogrupos en las cepas de *E. coli*.

Combinación de genes de virulencia y serogrupos.

En la tabla 7 se aprecia la asociación de los diferentes genes de virulencia con los serogrupos en las cepas de *E. coli* UPEC, la asociación más frecuente fue con el gen *pap* y el serogrupos O25 (n=15), seguido por *hlyA* y el serogrupos O25 (n=14), *pap* en combinación con el serogrupos O15 (n=10). Las asociaciones menos frecuentes fueron por el gen *iuc* y el serogrupos O15 (n=4) y *cnf* el serogrupos O15 (n=4).

Gen	O25	O15
<i>pap</i>	15	10
<i>hlyA</i>	14	7
<i>iuc</i>	9	4
<i>afa</i>	6	6
<i>sfa</i>	7	6
<i>cnf</i>	5	4

Tabla7. Asociación de los diferentes genes de virulencia con los serogrupos en las cepas de *E. coli* UPEC.

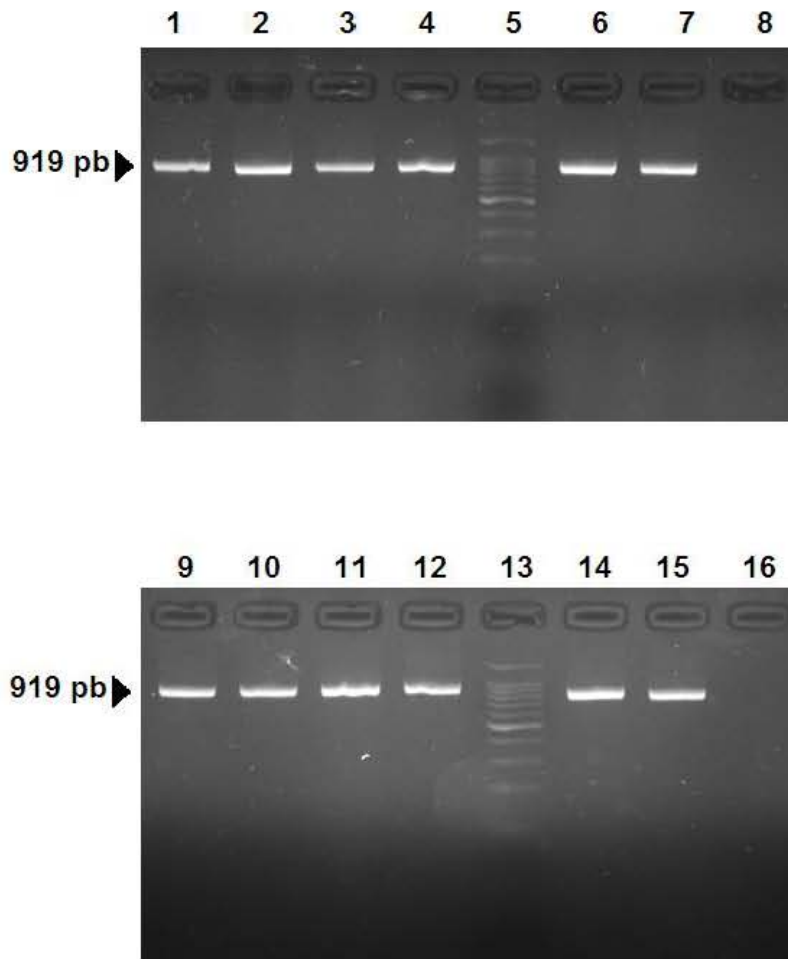


Figura 1. Identificación de las cepas de *E. coli* mediante la detección del gen *rRNA* por PCR. Líneas 1-4, 6 y 9-12 y 14 gen *rRNA* (919 pb) en cepas de *E. coli*. Líneas 5 y 13 MWM 100 pb. Carril 7 y 15 Control positivo (cepa de *E. coli* del cepario del Laboratorio. CUSI). Líneas 8 y 16 controles negativos (sin ADN molde).

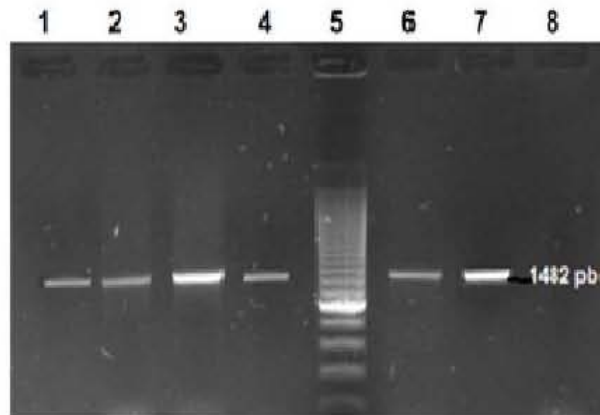


Figura 2. Detección por PCR convencional del gen *iuc* (aerobactina) en las cepas de *E. coli* uropatógenas. Líneas 1-4 y 6 *iuc* (amplicón de 1482 pb) en las cepas de *E. coli* aisladas de pacientes. Carril 5, MPM 200 pb. Línea 7 control positivo (cepa de *E. coli* del cepario del Lab. CUSI). Carril 8 control negativo (sin DNA)

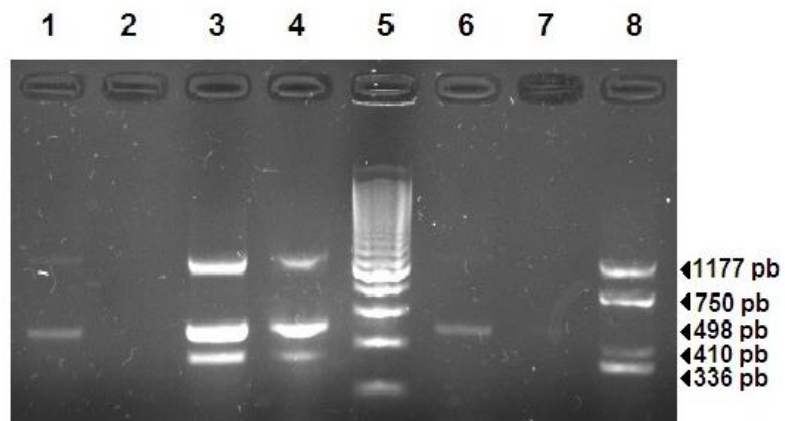


Figura 3. Detección por PCR multiplex de los genes *pap* (336 pb), *sfa* (410 pb), *cnf* (498 pb) *afa* (750 pb) y *hlyA* (1177 pb) en las cepas de *E. coli* aisladas de pacientes. Línea 1 *hlyA* y *sfa*, líneas 2 negativa (no se detecto ningún gen), línea 3 genes *hlyA*, *cnf*, *sfa* y *pap*, línea 4 genes *hlyA*, *cnf* y *pap*; línea 6 control positivo gen *cnf*, (cepa de *E. coli* del cepario del Lab. CUSI). Línea Carril 7 control negativo (sin DNA). Línea 8 control positivo para *hlyA*, *afa*, *sfa* y *pap* (cepa de *E. coli* del cepario del Lab. CUSI). Línea 5, MPM 100 pb (sin DNA).

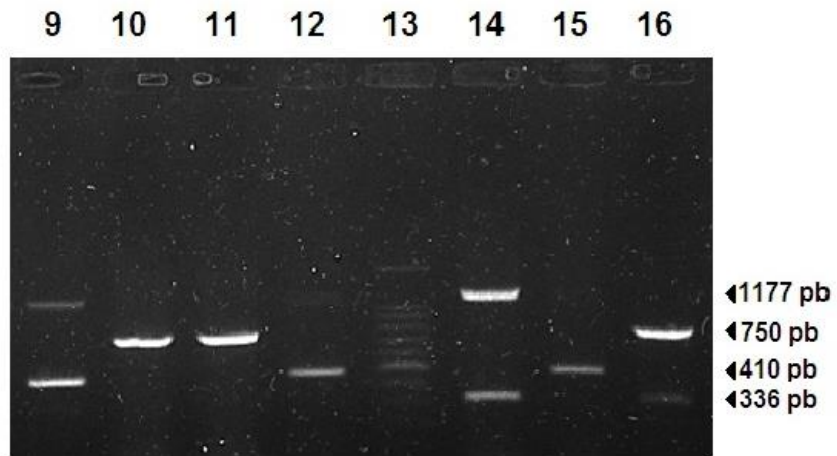


Figura 4. Línea 9 *hlyA* y *sfa*. Línea 14 control positivo para *hlyA* y *pap* (cepa de *E. coli* del cepario del Lab. CUSI). Líneas 10 y 11 *afa* en las cepas de *E. coli*. Línea 16 control positivo para *afa* y *pap* (cepa de *E. coli* del cepario del Lab. CUSI). Línea 13, MPM 100 pb (sin DNA).

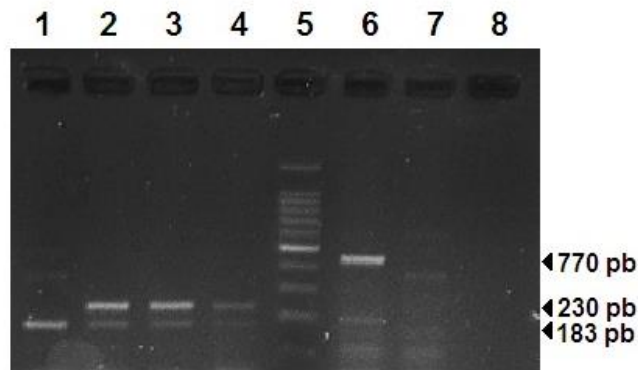


Figura 5 . Detección por PCR multiplex de serogrupos O15 (183 pb), O25 (230 pb) y O2 (770 pb) en las cepas de *E. coli* aisladas de pacientes. Línea 1 O15. Líneas 2 y 3 O25, Línea 4 control positivo O25 (cepa de *E. coli* del cepario del Lab. CUSI).Línea 6 O2, de cepa de *E. coli*. Línea 8 control negativo (sin DNA). Línea 5, MPM 200 pb (sin DNA).

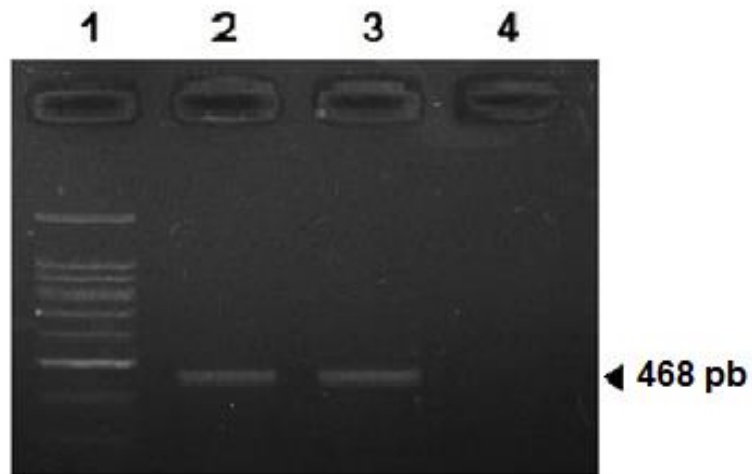


Figura 6. Detección por PCR multiplex de serogrupos O22 (468 pb), en cepas de *E. coli* aisladas de pacientes. Línea 2 Serogrupo O22, Línea 3 control positivo O22 (cepa de *E. coli* del cepario del Lab. CUSI). Línea 4 control negativo (sin DNA). Línea 1, MPM 200 pb (sin DNA).

DISCUSIÓN

Origen de los pacientes estudiados

En este estudio se analizaron las muestras de orina de 321 pacientes con infecciones del tracto urinario de la Unidad Médica Familiar (UMF) No.64 del IMSS, del Hospital No.72 del IMSS y del Laboratorio de Análisis Clínicos de la CUSI, FES Iztacala, UNAM, dentro de los cuales el 81% (n=247) correspondió al sexo femenino y el 19% al masculino (n =74) (Gráfica 1). Se ha descrito que la causa principal de las infecciones del tracto urinario (IsTU) adquiridas en la comunidad (70-95%) y de un amplio porcentaje de las IsTU nosocomiales (50%) son ocasionadas por *E. coli*, representando elevados costos médicos y en morbilidad por todo el mundo (Foxman, 2003). En este trabajo se detectó que el 61 % de las cepas analizadas (n =194) por PCR convencional fueron positivas para el gen *16SrRNA* de *E. coli*, mientras que el 39% (n=127) fueron negativas (Gráfica 2 y figura 1). Nuestros porcentajes corroboran lo propuesto por Momtaz (2013) y Johnson *et al.*, (2005) quienes han descrito que *E. coli* es la principal bacteria que causa infecciones de vías urinarias.

En este trabajo se describió que el diagnóstico del 97.2 % (n=312) de los pacientes estudiados correspondió a Infecciones de Vías Urinarias, seguido por pielonefritis, urosepsis e infección vaginal con 0.6% (n=2) (Tabla 3), cervico vaginitis, lupus eritomatoso y litiasis renal, con el 0.3% (n=1) (Tabla 3). Se ha descrito que las cepas de *E. coli* uropatógenas (UPEC) pueden ser transmitidas sexualmente por contaminación fecal (Foxman *et al.*, 2002; Johnson & Delavari, 2002). La patogénesis de las infecciones de vías urinarias por cepas UPEC no puede explicarse por la acción de un

único factor de virulencia, más bien es probable que varios factores de virulencia actúen en combinación durante el proceso infeccioso, por lo que recientemente se ha estudiado la relación de los genes de virulencia de cepas UPEC con la formación de la biopelícula en mujeres con cistitis (Agarwal *et al.*, 2013) y la distribución de marcadores de virulencia en cepas UPEC aisladas de IsTU. (Tarchouna *et al.*, 2013)

En este trabajo el gen identificado con mayor frecuencia en las cepas de *E. coli* fue *pap* con 25% (n=48) (Tabla 4, figura 3), seguido por *iuc* con 17% (n=32) (figura 2), *hlyA* con 15% (n=30) (figura 3), *afa* con 13% (n=25) (figura 3), *sfa* con 12 % (n=24) (figura 3) y por último *cnf* con 7% (n=14) (figura 3). Estos resultados contrastan con los descritos en un amplio estudio realizado en 123 cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con infecciones de vías urinarias (Momtaz *et al.*, 2013). Estos autores identificaron *sfa* en el 53.6% (n= 66) de las cepas, seguido de *cnf*, *hlyA* y *pap* con el 50.4% (n= 62), en cada caso, *iuc* con el 10.5% (n=13) y *afa* con el 8.13% (n=10). El gen *pap* que codifica para el pili asociado con la pielonefritis ha sido identificado por otros autores en el 54% de las cepas de *E. coli*. (Tay *et al.*, 2012)

Los factores determinantes de virulencia son las adhesinas (Tarchouna *et al.*, 2013).

Los resultados de frecuencia de los genes de virulencia de Tarchouna y colaboradores en 2013, fueron para el gen *pap* un 41%, al igual que para este trabajo *pap* obtuvo la frecuencia más alta; el gen *sfa* obtuvo 34%, *afa* con 20% y para el gen *hlyA* fue 19%, lo que muestra casi los mismos porcentajes obtenidos en este trabajo para estos genes. Mientras que *cnf* estaba presente en sólo el 3% y en el trabajo presente los resultados para el gen *cnf* también presentó la menor frecuencia.

Las fimbrias P son morfológicamente indistinguibles de la fimbrias tipo 1, sin embargo, se reconocen al unirse a la α -D-Galp- (1-4) - β -D-Galp carbohidratos de secuencia que se producen en la serie de grupos de P-sangre glucoesfingo lípidos y antígenos específicos (Korhonen *et al.*, 1982) y de ahí el nombre. Los genes que codifican el tipo pilis P se denominaron como los genes *pap* o genes pili asociado a pielonefritis ya que estos eran típicos de las cepas aisladas de infecciones del tracto urinario humanos (Hull *et al.*, 1981).

Las fimbrias S *sfa* se descubrieron como un grupo de fimbrias entre las cepas de *E. coli* (ácido siálico), estructuras que contienen manósidos y antígenos P de eritrocitos humanos (Parkkinen *et al.*, 1983). Se denominaron las fimbrias S en función de su especificidad por el receptor, es decir, sus específicos de unión a galactósidos sialil (Korhonen *et al.*, 1984). Morfológicamente, S fimbrias son similares a los de tipo 1 o P fimbrias de *E. coli*.

Las adhesinas S-fimbrial (*sfa*) se encuentran en mayor frecuencia entre meningitis y sepsis asociada a *E. coli* aislados. (Ott *et al.*, 1986)

Se ha demostrado que el gen *sfa* de bacterias y el gen *sfa* purificado se unen específicamente a los epitelios humanos, por ejemplo, en el endotelio vascular en ambos de los grandes vasos del tejido del riñón, el endotelio capilar en el intersticio y el epitelio visceral del glomérulo que se sabe que tienen un recubrimiento de ácido siálico. Una observación importante es que *sfa* se produce en algunas cepas de *E. coli* pielonefrogénicas, pero se asocia principalmente con las cepas causantes de sepsis y meningitis neonatal (Korhonen *et al.*, 1986). También se han demostrado que a *sfa*, se

unen los componentes extracelulares de la matriz de fibronectina, laminina y las sialo glicoproteínas endoteliales, microvasculares en células del cerebro, una interacción que puede explicar la migración a través de barreras fisiológicas. (Wright *et al.*, 2006)

La citotoxina *hlyA* (hemolisina A) identificada en el 15% (n=30) (Tabla 4 y figura 3) de las cepas de *E. coli* analizadas posee la capacidad de lisar los eritrocitos, para lo cual se requiere de calcio para hacer competentes los agregados de hemolisina y poder de ésta manera, insertarse en las membranas lípidicas, produciendo orificios y canales en las células. La hemolisina también es tóxica para una variedad de células del hospedero, que probablemente contribuyen a la inflamación, daño al tejido y desacoplamiento de las defensas del hospedero. (Tay *et al.*, 2012).

El gen *cnf* identificado en el 7% (n=14) de las cepas de *E. coli* (Tabla 4 y figura 3) codifica para el factor necrotizante citotóxico, que induce cambios profundos en el citoesqueleto de las células epiteliales, incluyendo la organización de la actina y la formación de fibras que alteran la morfología de la membrana citoplasmática. (Tay *et al.*, 2012)

En este estudio el genotipo *iuc* fue identificado en el 17% (n=32) de las cepas de *E. coli* (Tabla 4 y figura 2), *iuc* codifica para un sistema de captación de hierro (aerobactina [hidroxamatos]) que es secretada al medio circundante y forma complejos con los iones de Hierro, y posteriormente son transportados hacia la bacteria. Se ha asociado a *iuc* con cepas causantes de pielonefritis. (Tay *et al.*, 2012)

El sistema aerobactina (*iuc*) se considera que está implicado en las propiedades invasivas de enteroinvasividad humana por *E. coli* y especies de *Shigella*. (Griffiths *et al.*, 1985; Lawlor *et al.*, 1984)

Los resultados de los genes reportados por Abe y colaboradores, en 2008, fueron *pap* (45.8%), *hly* (44.0%), *sfa* (29.8%) y *cnf* (23.6%), que fueron porcentajes más altos en comparación con los obtenidos en este trabajo. De igual manera el gen *pap* fue el gen con mayor frecuencia.

Los genes *pap*, *sfa*, *aer* y *hly* fueron detectados esencialmente en cepas causantes de pielonefritis. (Tarchouna *et al.*, 2013)

En este estudio se encontró que el serogrupo más frecuente fue O25 con el 21% (n= 41) (Tabla 6, figura 5), seguido por O15 con el 17% (n= 33) (Tabla 6, figura 5), mientras que los menos frecuentes fueron el O2 (Tabla 6, figura 5) y el O22 (Tabla 6, figura 6) con el 0.5% (n= 1), en cada caso. Se ha descrito que el serogrupo O25 de *E. coli* se ha asociado a casos de cistitis en mujeres (Lindberg, 1975), mientras que el serogrupo O15 se ha relacionado con casos de cistitis en mujeres jóvenes (Li *et al.*, 2010), Momtaz en su estudio realizado en 2013 en 123 cepas de *E. coli* uropatógenas reportó que los serogrupo más frecuente entre las cepas fueron O25 (26.0%) y el serogrupo O15 (21.3%).

Mientras que los serogrupos reportados por Abe y colaboradores, en 2008, fueron los serogrupo O2 con 7 % (n=16), O15 con 6% (n=13) y O25 con 4% (n=10); una menor frecuencia de los serogrupos O15 y O25 que en los resultados de este trabajo.

En este estudio el 61% (n=118) de las cepas UPEC estudiadas no pudieron ser identificadas para algunos de los serogrupos probados, por lo que probablemente estas cepas pudieran pertenecer a alguno de los más de 180 serogrupos existentes en las cepas de *E. coli*.

En este estudio se describió que la mayoría de las cepas de UPEC estudiadas fue resistente a la Ampicilina y Cefalotina (Gráfica 4), Carbenicilina, Pefloxacina, Ceftriaxona y Trimetoprim/sulfametoxazol. En los últimos años el tratamiento de las infecciones de vías urinarias por las cepas de *E. coli* se ha complicado debido a la selección de cepas resistentes a estos agentes, situación a la que todos hemos contribuido en el pasado, principalmente por la automedicación, el uso de antibióticos como promotores de crecimiento en animales o en plantas. En el estudio realizado por Momtaz en el 2013 en las 123 cepas de *E. coli* uropatógenas, reportó que el 52.8% (n=65) fue portadora del gen *aadA1* que codifica para la resistencia a gentamicina, el 43.8% (n=53) y 36.5% (n=45) acarrearon los genes *tetA* y *tetB* que codifican la resistencia a la tetraciclina, 21.9% (n=27) portaron el gen *dfrA1* que confiere la resistencia al Trimetoprim/sulfametoxazol.

La resistencia a ampicilina con 35% al 63% fue reportada por (Mathai *et al.*, 2008, Loureiro *et al.* 2006, Gulsun *et al.*, 2005). Para carbenicilina la resistencia fue del 63.2%. En el caso de las fluoroquinolonas (ciprofloxacina, ofloxacina y norfloxacina) la resistencia que han mostrado algunos estudios fue del 13 al 36% (Nys *et al.*, 2008, Loureiro *et al.*, 2006, Gulsun *et al.*, 2005). En los diversos estudios las bacterias presentan un porcentaje similar de resistencia similar a las que se encontraron en este estudio.

CONCLUSIONES

- *E. coli* fue responsable de la mayoría de las infecciones de vías urinarias de los pacientes estudiados.
- La mayoría de las cepas de UPEC estudiadas fue resistente a la Ampicilina, Cefalotina, Carbenicilina, Pefloxacina, Ceftriaxona y Trimetoprim/sulfametoxazol.
- La elevada resistencia a los antibióticos, muestra la consecuencia del uso indiscriminado y automedicación de antibióticos, ocasionando con el paso del tiempo la selección de bacterias multiresistentes a los diferentes antimicrobianos.
- Los genes identificados con más frecuencia en las cepas de UPEC fueron *pap* encargado de la adhesión, seguido por *iuc*, *hlyA*, *afa*, *sfa* y *cnf*.
- En este estudio se encontró que los serogrupos más frecuentes entre las cepas de UPEC fueron el O25 y el O15, ambos relacionados con cistitis.
- La asociación de varios de los marcadores de virulencia entre las cepas de *E. coli* analizadas podrían incrementar la virulencia y desencadenar en infecciones más severas como como cistitis o pielonefritis.

REFERENCIAS

- Agarwal J, Mishra B, Srivastava S, Srivastava R. 2013. Genotypic characteristics and biofilm formation among *Escherichia coli* isolates from Indian women with acute cystitis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 107:183-187.
- Abe C, Salvador F, Falsetti I, Vieira M, Blanco J, Blanco JE, Blanco M, Machado A, Elías W, Hernández R, Gomes T. 2008. Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) strains may carry virulence properties of diarrheogenic *E. coli*. *Federation of European Microbiological Societies Immunol Med Microbiol* 52: 397–406
- Anderson G, Palermo J, Schilling D, Roth R, Heuser J, Hultgren J. 2003. Intracellular bacterial biofilm-like pods in urinary tract infections. *Science* 301:105–107.
- Berry R, Klumpp D, Schaeffer A. 2009. Urothelial Cultures Support Intracellular Bacterial Community Formation by Uropathogenic *Escherichia coli*. *Infection and immunity.* American Society for Microbiology. 77:2762-2772.
- Bower JM, Eto DS, Mulvey MA. 2005. Covert operations of uropathogenic *Escherichia coli* within the urinary tract. *Traffic* 6:18–31.

- Dan Li, Bin L, Min C, Dan G, Fenxia L, Lu F, Lei W. 2010. A multiplex PCR method to detected 14 *Escherichia coli* serogroups associated with urinary tract infections; 71-77.
- Depardieu F, Podglajen I, Leclercq R, Collatz E, Curvalin P. 2007. Modes and modulations of antibiotic resistance gene expression. Clin Microbiol Rev.20:79-114.
- Eto D, Jones T, Sundsbak J, Mulvey M. 2007. Integrin-Mediated Host Cell Invasion by Type 1-Piliated Uropathogenic *Escherichia coli*. PLoS Pathog; 3:100.
- Foxman B. 2003. Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. Dis Mon; 49:53–70.
- Griffiths E, Stevenson P, Hale TL, Formal SB. 1985. Synthesis of aerobactin and a 76,000-dalton iron-regulated outer membrane protein by *Escherichia coli* K-12-*Shigella flexneri* hybrids and by enteroinvasive strains of *Escherichia coli*. Infect Immun 49: 67–71.
- Gulsun S, Oguzoglu N, Inan A, Ceran N. 2005 The virulence factors and antibiotic sensitivities of *Escherichia coli* isolated from recurrent urinary tract infections. Saudi Med J. 26:1755-8.

- Hull A, Gill E, Hsu P, Minshew H, Falkow S. 1981. Construction and expression of recombinant plasmids encoding type 1 or Dmannose- resistant pili from a urinary tract infection *Escherichia coli* isolate. *Infect Immun*, 33; 3:933-938.
- Jawetz D. 1990. *Microbiología Médica*, Ediciones Manual Moderno 3 ed. P. 126-141.
- Johnson JR, Johnston B, Kuskowski A, Colodner R, Raz R. 2005. Spontaneous conversion to quinolone and fluoroquinolone resistance among wild type *Escherichia coli* isolates in relation to phylogenetic background and virulence genotype. *Antimicrob Agents Chemother*; 49:4739–4744.
- Johnson J, Kuskowski M, O'bryan T, Colodner R, Raz R. 2005. Virulence genotype and phylogenetic origin in relation to antibiotic resistance profile among *Escherichia coli* urine sample isolates from Israeli women with acute uncomplicated cystitis. *Antimicrob Agents Chemother a*; 49:26–31.
- Korhonen TK, Parkkinen J, Hacker J, Finne J, Pere A, Rhen M, Holthofer H. 1986. Binding of *Escherichia coli* S fimbriae to human kidney epithelium. *Infect Immun*, 54:322-327.

- Korhonen TK, Vaisanen-Rhen V, Rhen M, Pere A, Parkkinen J, Finne J. 1984. *Escherichia coli* fimbriae recognizing sialyl galactosides. J Bacteriol, 159:762-766.
- Korhonen K, Vaisanen V, Saxen H, Hultberg H, Svenson S. 1982. P-antigen recognizing fimbriae from human uropathogenic *Escherichia coli* strains. Infect Immun, 37, 1:286-291.
- Lane M, Mobley H.2007. Role of P-fimbrial-mediated adherence in pyelonephritis and persistence of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) in the mammalian kidney. Kidney Int. 72:19-25.
- Lawlor M, Payne M. 1984. Aerobactin genes in *Shigella* spp. J Bacteriol 160: 266–272.
- Lindberg U, 1975. Asymptomatic bacteriuria in school girls. V. The clinical course and response to treatment. Acta .Pediatric. Scand. 64,718-724.
- Loureiro B, Moure S, Fernandez A. 2006. Infecciones del tracto urinario. Pautas del tratamiento empírico de la infección no complicada según los datos de sensibilidad antimicrobiana en un área de salud. Farmacéuticas de atención primaria.

- Marrs CF, Zhang L, Foxman B. 2005. *Escherichia coli* mediated urinary tract infections: are there distinct uropathogenic *E. coli* (UPEC) pathotypes? FEMS Microbiol Lett; 252:183–190.
- Mathai E, Chandy S, Thomas K, Antoniswamy B, Joseph I, Mathai M, Sorensen TL, Holloway K. 2008. Antimicrobial resistance surveillance among commensally *Escherichia coli* in rural and urban areas in Southern India. Trop Med Int Health 13:41-5.
- Momtaz H, Karimian A, Madani M, Dehkordi F, Ranjbar R, Sarshar M y Souod N.2013. Uropatho genic *Escherichia coli* in Iran: Serogroup distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials. BioMed Central. P.1-12.
- Mulvey M, Schilling J, Hultgren S. 2001. Establishment of a persistent *Escherichia coli* reservoir during the acute phase of a bladder infection. InfectImm; 69:4572–4579.
- Mulvey M, Lopez Y, Wilson C, Roth R, Parks W, Heuser J, Hultgren S.1998. Induction and evasion of host defenses by type I-pili ateduro pathogenic *Escherichia coli*. Science; 282:1494-1497.

- Murray P. 1993. Microbiología Médica, Ediciones Mosby Year Book. P.103-108.
- Nys S, Terporten P, Hoogkamp J, Stobberingh E. 2008. Susceptibility Surveillance Study Group. Trends in antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolates from urology services in The Netherlands (1998-2005). J Antimicrob Chemother 62:126-32.
- Ott M, Hacker J, Schmoll T, Jarchau T, Korhonen TK, Goebel W. 1986. Analysis of the genetic determinants coding for the S-fimbrial adhesin (*sfa*) in different *Escherichia coli* strains causing meningitis or urinary tract infections. Infect Immun, 54:646-653.
- Parkkinen J, Finne J, Achtman M, Vaisanen V, Korhonen TK. 1983. *Escherichia coli* strains binding neuraminyl alpha 2-3 galactosides. Biochem Biophys Res Commun, 111:456-461.
- Poole K. 2004. Efflux-mediated multiresistance in gram-negative bacteria. Clin Microbiol Infect. 10:12-26.
- Rosen D, Hooton T Stamm W, Humphrey P, Hultgren S.2007. Detection of intracellular bacterial communities in human urinary tract infection. PLoS Med; 4:329.

- Russo T, Johnson J. 2000. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. J Infect Dis; 181:1753–1754.
- Sáenz Y, Briñas L, Domínguez E, Ruiz J, Zarazaga M, Vila J, Torres C. 2004. Mechanisms of Resistance in Multiple-Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* Strains of human, animal, and food origins. Antimicrob Agents Chemother: 48; 3996–4001.
- Saiki R, Scharf S, Faloona F, Mullis K, Horn G, Erlich H, Arnheim N. 1985. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science; 230.
- Somma M, Querci M, Van G. 2007. Análisis de la Presencia de Organismos Genéticamente Modificados en Muestras de Alimentos. European Commission; 1-24.
- Tarchouna M, Ferjani A, Ben-Selma W, Boukadida J. 2013. Distribution of uropathogenic virulence genes in *Escherichia coli* isolated from patients with urinary tract infection. International Journal of Infectious Diseases. 4: 1-4.

- Tay J. 2012. Microbiología y Parasitología Médica, Ediciones Méndez Editores 4ta ed. P. 1134.
- Wright J, Hultgren J . 2006. Sticky fibers and uropathogenesis: bacterial adhesins in the urinary tract. *Future Microbiology*, 1:75-87.
- Yan F, Polk DB. 2004. Commensal bacteria in the gut: learning who our friends are. *Curr Opin Gastroenterol*; 20:565–571.