



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

DIFERENTES PATRONES DE GENOTIPOS DE
VIRULENCIA DE CEPAS CLÍNICAS DE

Escherichia coli AISLADAS DE

INFECCIONES EN VÍAS URINARIAS

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LIC. EN BIOLOGÍA

PRESENTA:

REYES SOLIS JOSÉ ROGELIO

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. GLORIA LUZ PANIAGUA CONTRERAS

PROYECTO FINANCIADO POR LA DGAPA

UNAM, PAPIIT IN218614

2015



Los Reyes Iztacala, Tlalnepanitla, Estado de México



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.

LA CIENCIA ES EL ALMA DE LA PROSPERIDAD
DE LAS NACIONES
Y LA FUENTE DE VIDA DE TODO PROGRESO

Louis Pasteur

Dedicatoria

- *A mis padres: Por el apoyo incondicional en todos los sentidos, por ser mi fuente de inspiración. Todos mis logros son sus logros. Gracias, los amo.*
- *A mis hermanas: Por siempre mostrarme el camino a seguir, por todo el apoyo y los regaños, por estar siempre a mi lado. Gracias, las amo.*
- *A Karla y Rubén: Por brindarme su amistad y ayuda desinteresada durante la carrera. Gracias, los aprecio.*
- *A mi tía Ángela Sofís: Por enseñarme en una etapa insipiente que la vida se trata de retos. Gracias, La estimo.*
- *A Andrea: Por ser esa luz que ilumina mi camino, por tu apoyo y tus consejos, por todo lo vivido y lo que nos falta por vivir Amor. Merci, Je t'aime.*

Agradecimientos

- *A la Dra. Gloria Luz Paniagua Contreras cuya dirección, consejos y conocimiento fueron fundamentales para la realización de este trabajo.*
- *Al Dr. Erik Monroy Pérez cuyo apoyo, consejos y buena crítica fueron fundamentales para la realización de este trabajo.*
- *Al comité revisor de este trabajo:*
Dr. Sergio Vaca Pacheco
M.en C. Alina Uribe García
Biol. Susana González Asmazán
Su ayuda brindada, comentarios y asesoramiento fueron de gran importancia para la realización de este trabajo.
- *A la Biol. Patricia Sánchez Yáñez cuyo apoyo y consejos me ayudaron durante la estancia en el laboratorio. Sobre todo gracias por tu amistad.*

Para la realización del presente trabajo se contó con el apoyo económico de la DEGAPA.

UNAM-DGAPA-PAPIIT IN218614.

ÍNDICE

1. RESUMEN	7
2. INTRODUCCIÓN	8
2.1 Características de <i>Escherichia coli</i>	8
2.2 Patologías causadas por <i>Escherichia coli</i>	10
2.3 Composición antigénica y factores de virulencia	12
2.4 Tratamiento	17
3. ANTECEDENTES	19
4. JUSTIFICACIÓN	22
5. OBJETIVOS	23
5.1 Objetivo General	23
5.2 Objetivos Particulares	23
6. MATERIALES Y MÉTODOS	24
6.1 Origen de las cepas.	24
6.2 Extracción del DNA.	24
6.3 Identificación de <i>Escherichia coli</i> por PCR.	25
6.4 Detección de los genes <i>irp2</i> , <i>tsh</i> , <i>cva</i> , <i>iss</i> y <i>vat</i> por PCR multiplex.	25
6.5 Detección de los genes <i>astA</i> , <i>sigA</i> , <i>sap</i> y <i>pic</i> por PCR multiplex.	26
6.6 Detección del gen <i>kpsMT</i> en las cepas de <i>E. coli</i> por PCR.	27
6.7 Detección del gen <i>usp</i> en las cepas de <i>E. coli</i> por PCR.	27
6.8 Detección de los genes <i>iha</i> y <i>OmpT</i> por PCR multiplex.	28
6.9 Detección del gen <i>sen</i> en las cepas de <i>E. coli</i> por PCR.	28
6.10 Análisis de los amplicones por electroforesis en geles de agarosa.	30
6.11 Análisis estadístico.	30
7. RESULTADOS	31
7.1 Pacientes analizados.	31
7.2 Edad de los pacientes analizados.	31
7.3 Diagnóstico de los pacientes analizados.	32
7.5 Identificación de los genes de virulencia en las cepas de <i>E. coli</i> por PCR de punto final.	33

7.6 Patrones de asociación de los genes de virulencia en las cepas <i>E. coli</i>	41
7.7 Análisis Estadístico.....	43
8. DISCUSIÓN	44
8.1 Pacientes estudiados.....	44
8.2 Identificación de <i>E coli</i> en los urocultivos de los pacientes con infecciones en vías urinarias.	45
8.3 Identificación de diversos marcadores de virulencia en cepas UPEC.....	46
8.3.1 Adhesinas.....	47
8.3.1.1 Gen <i>tsh</i> (temperature-sensitive hemagglutinin).	47
8.3.1.2 Gen <i>iha</i> (non hemagglutinating adhesin).	48
8.3.2 Sistemas de adquisición de hierro.....	48
8.3.2.1 Gen <i>irp2</i> (iron-repressible protein).....	49
8.3.3 Evasión de la respuesta inmune.....	49
8.3.3.1 Gen <i>kpsMT II</i> (K-antigen).....	50
8.3.3.2 Gen <i>pic</i> (protein involved in the intestinal colonization).	51
8.3.3.3 Gen <i>OmpT</i> (the outer membrane protease T).....	51
8.3.3.4 Gen <i>sap</i> (sensitive to antimicrobial peptide).	52
8.3.3.5 Gen <i>SigA</i> (factor sigma A).	52
8.3.3.6 Gen <i>iss</i> (increased serum survival protein).....	53
8.3.4 Toxinas.....	53
8.3.4.1 Gen <i>usp</i> (uropathogenic specific protein).....	54
8.3.4.2 Gen <i>vat</i> (vacuolating autotransporter toxin).	54
8.3.4.3 Gen <i>cva</i> (colicin V plasmid operon gen).....	55
8.3.4.4 Gen <i>astA</i> (EnteroAggregative heat Stable Toxin).....	55
8.3.4.5 Gen <i>sen</i> (ShET-2 toxin).	56
8.4 Patrones de asociación de los genes de virulencia en las cepas UPEC.....	56
9. CONCLUSIONES	58
10. LITERATURA CITADA.....	59

1. RESUMEN

Escherichia coli es responsable de la mayoría de las infecciones en vías urinarias entre la población mexicana y del mundo. La capacidad de las cepas de *E. coli* Uropatógenas (UPEC) para causar los distintos tipos de enfermedades procede de la expresión de múltiples factores de virulencia incluyendo adhesinas, sideróforos, sistemas para la evasión de la respuesta inmune del hospedero y toxinas, que contribuyen conjuntamente a potenciar su patogenicidad. El objetivo de este trabajo fue caracterizar molecularmente y correlacionar la presencia de genes que codifican para factores de virulencia en cepas clínicas UPEC aisladas de urocultivos de pacientes con infecciones del tracto urinario de dos hospitales públicos del Estado de México. Se analizaron 194 cepas de *Escherichia coli* Uropatógena aisladas de urocultivos de casos clínicos de pacientes con infecciones del tracto urinario, se extrajo el DNA de todas las cepas y 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 y por PCR multiplex, posteriormente fueron analizados por electroforesis y relevados en luz UV. Los genotipos identificados con mayor frecuencia en las cepas de *E. coli* fueron *KpsMT* 91.7% (n=178), seguido de *usp* 87.1% (n=169) e *irp2* 79.3% (n=154); porcentajes menores presentaron los siguientes genotipos: *iha* 64.9% (n=126), *astA* 33.5% (n=65), *ompT* 10.3% (n=20), *vat* 5.6% (n=11), *tsh* 5.1% (n=10) y *cva* e *iss* con un 4.6% (n=9); Los genotipos con la menor prevalencia fueron: *sigA* 4.1% (n=8), *pic* 2.5% (n=5) y *sap* 1.5% (n=3); El gen *sen* (0%) no fue identificado en ninguna cepa de *E. coli*. Las cepas UPEC presentaron 50 patrones distintos de asociación: El patrón con la más alta prevalencia fue *KpsMT/usp/irp2/iha* (23.2%, n=45); No se determinó la presencia de la isla de patogenicidad (PAI) en las cepas de *E. coli*. La distribución geográfica es un factor determinante que condiciona la prevalencia de los factores de virulencia; La elevada prevalencia colectiva de estos elementos genéticos durante la patogénesis de las infecciones en el tracto urinario en los pacientes posiblemente podría desencadenar patologías más severas como cistitis y/o pielonefritis.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Características de *Escherichia coli*

Escherichia coli es una bacteria increíblemente diversa con la habilidad de colonizar y persistir en numerosos nichos tanto en el medio ambiente como principalmente en el tracto gastrointestinal de animales y humanos. *E. coli*, y otras bacterias comensales de la flora intestinal frecuentemente forman una relación simbiótica benéfica con su hospedero, proporcionando sustancias nutritivas, señales clave para la regulación y desarrollo de la respuesta inmune además de protección contra patógenos extraños (Yan & Polk, 2004).

Escherichia coli es un bacilo Gram negativo, móvil, de 1-3 μ m de largo por 1-1.5 μ m de ancho (Figura 1). Es una bacteria anaerobia facultativa que constituye el principal componente de la flora intestinal normal de los seres humanos. Las cepas comensales contribuyen a la salud de sus portadores debido a que inhiben el crecimiento de otras bacterias patógenas y a que sintetizan vitaminas aprovechables por los seres humanos (Levine, 1987).

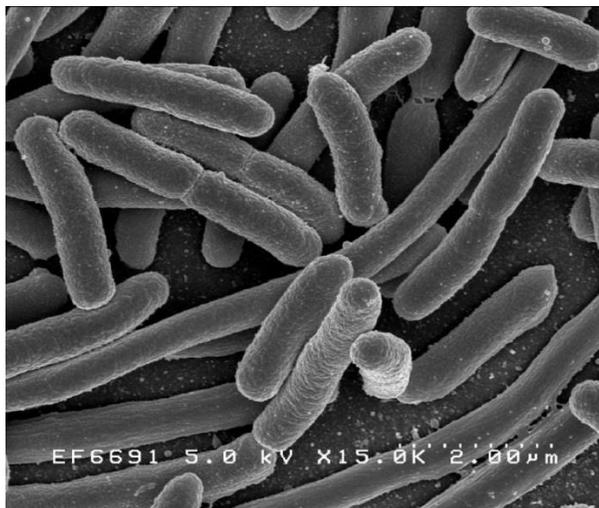


Figura 1. Micrografía electrónica de barrido de *Escherichia coli* (Consejo Superior de Investigaciones Científicas; Cataluña)

Esta bacteria puede cultivarse con facilidad a partir de muestras biológicas, en Agar MacConkey donde forma colonias de 2-3mm de diámetro, de color rosado, suaves, redondas, lisas y con bordes regulares (Paniagua *et al.*, 2007).

Según el manual de Bergey de Bacteriología sistemática y conforme a la definición general de la familia *Enterobacteriaceae* a la que pertenecen, son bacterias quimioheterótrofas facultativas teniendo los metabolismos fermentativo y respiratorio, no forman esporas, están desprovistas de oxidasa, producen catalasa y β -galactosidasa, pueden ser móviles por flagelos peritricos y normalmente reducen nitratos a nitritos.

El estudio de distintas reacciones bioquímicas puede ayudar en la diferenciación entre las especies bacterianas. Las principales pruebas fisiológicas que distinguen a *E. coli* de las demás especies son producción de indol, reacción negativa para el citrato de Simmons, producción de lisina descarboxilasa, y fermentación de glucosa, lactosa y D-manitol (Scheutz *et al.*, 2005).

E. coli es utilizada como indicador de contaminación fecal. Se puede encontrar en el medio ambiente ya que es capaz de sobrevivir algunos días en el agua y los alimentos, de manera que su aislamiento es un indicador de contaminación fecal reciente (Blanco *et al.*, 2002).

El intestino humano es colonizado por *E. coli* en las primeras 40 horas tras el nacimiento, siendo la bacteria ingerida en agua y alimentos u obtenida directamente de otros individuos en contacto con el recién nacido; La bacteria se adhiere al moco que recubre el intestino grueso y una vez establecida una misma cepa puede persistir indefinidamente, aunque constituya solo aproximadamente el 0.1% de la población total (Todar, 2008).

2.2 Patologías causadas por *Escherichia coli*

E. coli es una especie bacteriana de considerable importancia científica, económica y médica. Están incluidas en esta especie cepas no patógenas y otras que son capaces de causar enfermedades entéricas y diversos tipos de infecciones extraintestinales en humanos y animales (Johnson, 2002).

Algunas cepas de *E. coli* tienen la capacidad de divergir de su estado comensal y adquirir una naturaleza patógena causando enfermedades serias, tanto en el tracto digestivo como en otras partes del huésped. Estas cepas patógenas se clasifican como *E. coli* diarreogénicas y *E. coli* patógenas extraintestinales (ExPEC; Kaper *et al.*, 2004).

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 patologías fuera del tracto 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 huésped incluyendo sangre, sistema nervioso central y tracto urinario ocasionando enfermedad (Foxman, 2003).

Algunas cepas son patógenas y pueden producir infecciones entéricas (diarrea, disentería, colitis hemorrágica, síndrome urémico hemolítico) o extraintestinales (infecciones urinarias, bacteriemias o septicemias, meningitis, peritonitis, abscesos, mastitis, infecciones pulmonares y de heridas). *E. coli* provoca en seres humanos del orden de 630 millones de casos de diarrea en el mundo y aproximadamente 775 mil muertes al año, afectando fundamentalmente a la población infantil de países en desarrollo. Además, es el patógeno oportunista más frecuentemente asociado con infecciones urinarias y septicemias en humanos (Blanco *et al.*, 2002).

El tipo de interacción resultante entre microorganismo y hospedero, permite clasificar las cepas de *E. coli* como comensales avirulentos, como patógenos oportunistas o altamente especializados, que a su vez son frecuentemente clasificados en patotipos de acuerdo al tipo de enfermedad que causan y por su conjunto de factores de virulencia (Sousa, 2006).

Entre las ExPEC se encuentran las cepas de *E. coli* uropatógenas (UPEC) que son la causa principal de infecciones del tracto urinario (UTIs). Las infecciones del tracto urinario son una de las enfermedades más frecuentes alrededor del mundo, se caracterizan por la presencia de microorganismos en el tracto urinario (Momtaz *et al.*, 2013). Entre el 40 y 50% de las mujeres presentan UTIs a lo largo de sus vidas (Foxman, 2003). En algunos casos, la transmisión de cepas de *Escherichia coli* uropatógenas puede ocurrir dentro de una comunidad a través de alimentos contaminados (Manges *et al.*, 2001). Además, las cepas aisladas de pacientes sexualmente activos a menudo coinciden con aislamientos fecales de sus parejas, lo que indica que las infecciones urinarias se puede transmitir sexualmente (Johnson & Delavari, 2002).

Una vez en el interior del tracto urinario, UPEC coloniza preferentemente la vejiga causando cistitis, pero también puede ascender a través de los uréteres de los riñones y ocasionar pielonefritis. 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). Las cepas de *E. coli* Uropatógenas son la causa primaria de infecciones del tracto urinario, incluyendo tanto cistitis como pielonefritis (Wiles *et al.*, 2007).

La diversidad de mecanismos patogénicos de esta bacteria en individuos aparentemente sanos es atribuida a la propiedad de una gran variedad de factores de virulencia específicos (Donnenberg, 2002; Johnson, 2002; Scheutz *et al.*, 2005).

2.3 Composición antigénica y factores de virulencia

La capacidad de las cepas patógenas de *E. coli* para causar los distintos tipos de enfermedades intestinales y extraintestinales procede de la expresión de múltiples factores de virulencia incluyendo adhesinas, toxinas, sideróforos, sistemas de secreción, entre otros (Blanco *et al.*, 2002; Johnson, 2002). La virulencia bacteriana es un fenómeno multifactorial. Las cepas patógenas de *E. coli* poseen diferentes tipos de factores de virulencia que contribuyen conjuntamente a potenciar su patogenicidad (Blanco *et al.*, 2002).

Las bacterias (incluyendo las cepas UPEC) poseen mecanismos de patogenicidad específicos que emergen al superar las defensas de un hospedero. Un microorganismo patógeno posee la capacidad de producir un daño, a cualquier nivel, en un organismo hospedero susceptible. La virulencia es una medida cuantitativa de la patogenicidad y se mide por el número de microorganismos necesarios para causar una enfermedad, es decir, es el grado de patogenicidad (Sánchez, 2011). Las bacterias a lo largo de su evolución han adquirido características que les permiten invadir el ambiente del hospedero, expresar receptores superficiales especializados para su adhesión (Meylan *et al.*, 2006), permanecer en estos sitios a través de procesos de colonización, evadir al sistema inmune (Diacovich & Gorvel, 2010), y finalmente causar daño tisular con el fin de lograr acceso a fuentes de nutrientes necesarios para su crecimiento y reproducción. Por lo que el factor determinante de virulencia es un componente microbiano que favorece el crecimiento o supervivencia durante la infección (Wu *et al.*, 2008).

Las cepas de *E. coli* uropatógenas son las causantes de infecciones extraintestinales más comunes entre las ExPEC. Aunque solo seis serogrupos causan el 75% de las infecciones urinarias y muchas de las cepas parecen ser clonales, no hay un único perfil fenotípico que cause estas infecciones (Kaper *et al.*, 2004). Las cepas de *E. coli* son identificadas serológicamente por los antígenos de superficie O (somático), K (capsular) y H (flagelar). Se han descrito

174 serogrupos O de *E. coli* (Liu *et al.*, 2008). Los serogrupos O de las cepas UPEC están relacionados con ciertos patrones de genes de virulencia. Estudios previos han reportado que múltiples serogrupos O están preferencialmente asociados con cepas UPEC (Bidet *et al.*, 2007; Blanco *et al.*, 1996).

La transferencia horizontal de material genético bacteriano es un fenómeno importante en el entorno sanitario, la transmisión de genes de resistencia a antibióticos y factores de virulencia son un ejemplo clásico de transferencia horizontal. La transferencia horizontal en bacterias puede realizarse mediante tres procesos diferentes: transformación, transducción y conjugación.

El proceso de transformación refiere a la introducción de DNA exógeno (generalmente a manera de plásmidos) en las bacterias, y este DNA pasa a ser parte del material genético bacteriano, pudiendo ser heredado cuando ocurra la recombinación genética de la bacteria (Wolska, 2003).

Por otro lado la transducción es la transferencia de genes de una bacteria a otra por medio de un virus. La incorporación de genes bacterianos al interior de la cápside de un fago se produce como consecuencia de errores cometidos durante el ciclo duplicativo del virus. Cuando el virus que contiene estos genes infecta a una nueva bacteria, éste tiene la capacidad de transferirlos al cromosoma de ésta. La transducción es el mecanismo más frecuente de intercambio y recombinación genética en las bacterias. (Wolska, 2003).

La conjugación consiste en la unión de dos bacterias de la misma o diferentes especies para la transferencia del material genético. Las bacterias se unen por medio de un puente citoplasmático llamado *Pili*, por el cual pasa el plásmido a la célula receptora y así el plásmido de conjugación puede integrarse al cromosoma bacteriano (Llosa & De la Cruz, 2005).

La exitosa colonización de las UPEC en el tracto urinario depende de la expresión de múltiples factores de virulencia adquiridos a través del intercambio horizontal de material genético, que muchas veces facilitan la unión de la bacteria al urotelio, y de la presencia de genes bacterianos específicos que codifican factores de

virulencia (Svanborg & Godaly, 1997). 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 a 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).

Las cepas UPEC son las más comúnmente asociadas a enfermedades infecciosas en humanos (Foxman, 2003); Dentro del tracto urinario, *E. coli* necesita superar múltiples líneas de defensa (Chromek & Brauner, 2008); resistir el flujo de la orina, sustancias en la orina producidas y secretadas por las células epiteliales de la vejiga, afluencia de neutrófilos y exfoliación de células superficiales; En consecuencia, la estricta e irreversible adherencia a las células uroteliales es el primer paso para establecerse una infección, seguido de la invasión y multiplicación bacteriana dentro de las células del hospedero, es decir, la presencia de toxinas para invadir dichas células y sistemas de adquisición de hierro para la multiplicación bacteriana (Justice *et al.*, 2004).

Una vez en contacto con la bacteria, el hospedero reacciona con una respuesta inflamatoria; Mientras que los compartimentos intracelulares ofrecen un nicho a *E. coli* para protegerse de la defensa inicial del hospedero, la supresión de la respuesta inmune es otra estrategia de *E. coli* para evadir los mecanismos de defensa; En consecuencia los factores de virulencia encontrados en las cepas UPEC están involucrados y dan soporte a los diferentes pasos en la patogénesis de las infecciones en vías urinarias (Samuelsson *et al.*, 2004; Figura 2).

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, protectinas, citotoxinas, enterotoxinas, entre otros (Tabla 1). Estos genes a menudo se encuentran en regiones llamadas Islas de patogenicidad (PAIs; Gal-Mor & Finlay, 2006; Hacker & Kaper, 2000; Lloyd *et al.*, 2007).

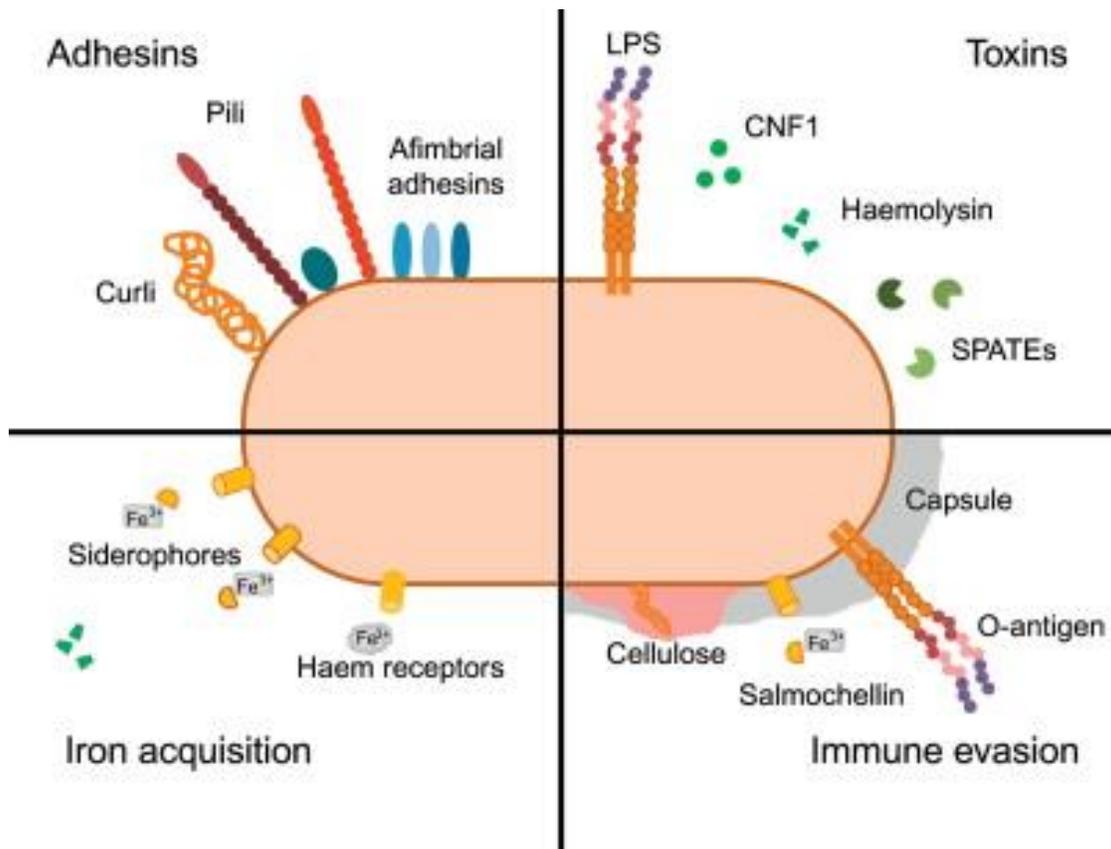


Figura 2. Factores de virulencia de *E. coli* Uropatógena. Las cepas UPEC emplean diferentes estrategias para infectar el tracto urinario, para evadir la respuesta inmune, para persistir y multiplicarse dentro del hospedero (Lüthje & Brauner, 2014).

Tabla 1. Principales factores de virulencia de las cepas de *Escherichia coli* involucradas en infecciones de vías urinarias.

Factor de virulencia	Naturaleza/Función
<p>(<i>pap</i>) pilus associated with pyelonephritis (<i>sfa</i>) S fimbriae (<i>afal</i>) afimbrial adhesin I (<i>fim</i>) type-1 fimbriae (<i>tsh</i>) temperature-sensitive hemagglutinin (<i>iha</i>) non hemagglutinating adhesin</p>	Adhesinas
<p>(<i>iuc</i>) aerobactin (<i>iroN</i>) iron (<i>irp2</i>) iron-repressible protein</p>	Sistemas de adquisición de hierro
<p>(<i>kpsMT II</i>) K-antigen (<i>pic</i>) protein involved in the intestinal colonization (<i>OmpT</i>) the outer membrane protease T (<i>sap</i>) sensitive to antimicrobial peptide (<i>SigA</i>) factor sigma A (<i>iss</i>) increased serum survival protein</p>	Protectinas
<p>(<i>cnf1</i>) cytotoxic necrotizing factor I (<i>usp</i>) uropathogenic specific protein (<i>hly</i>) haemolysin (<i>vat</i>) vacuolating autotransporter toxin (<i>cva/cvi</i>) colicin V plasmid operon genes</p>	Citotoxinas
<p>(<i>set1A</i> y <i>set1B</i>) Shigella enterotoxin 1 (<i>astA</i>) EnteroAggregative heat Stable Toxin (<i>sen</i>) ShET-2 toxin</p>	Enterotoxinas

(Adaptado de Momtaz *et al.*, 2013)

2.4 Tratamiento

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). La identificación de genes de resistencia a antibióticos en cepas UPEC es esencial hoy en día para reducir los costos del tratamiento y sobre todo el periodo de duración de la infección (Sáenz *et al.*, 2004).

Las UTIs están entre las infecciones más comunes. Los patógenos pueden ser aislados de la vejiga (cistitis), riñones (pielonefritis), orina (bacteriuria) o próstata (prostatitis), además las cepas UPEC son los patógenos más frecuentes en estas infecciones (Smith *et al.*, 2008).

E. coli es la causa del 70 a 95% de las UTIs, especialmente de cistitis no complicadas y de pielonefritis agudas. Los grupos de riesgo para UTIs incluyen neonatos, niñas en edad preescolar, mujeres sexualmente activas y ancianos de ambos sexos (Bahrani-Mougeot *et al.*, 2002). Otro importante factor de riesgo es la utilización de sondaje vesical o presencia de material inerte en el tracto urinario, puesto que esa bacteria puede adherirse a la superficie del dispositivo y crecer asociada a biopelículas lo que puede originar infecciones refractarias a la terapia antimicrobiana (Vila *et al.*, 2008).

Un agente antimicrobiano muestra toxicidad selectiva, y actúa mediante diferentes mecanismos de acción; existen los β -lactámicos que inhiben la síntesis del peptidoglucano (componente esencial de la pared celular), algunos ejemplos son: penicilinas, vancomicinas, meticilinas, ampicilinas u oxalicias, agentes bactericidas que poseen alta toxicidad selectiva, los aminoglucósidos como gentamicina y estreptomina poseen una toxicidad selectiva baja y actúan como bactericidas alterando las funciones de membrana, modificando su permeabilidad y permitiendo que moléculas vitales salgan de la célula; los macrólidos como tetraciclina y eritromicina actúan inhibiendo la síntesis de proteínas y actuando sobre los ribosomas bacterianos, algunos antimetabolitos como el trimetoprim con

sulfametoxazol bloquean una etapa de la biosíntesis de ácidos nucleicos o inhiben la síntesis de ácido fólico (componente necesario para la formación de proteínas estructurales y hemoglobina; Jawetz *et al.*, 1990).

Las cepas de *E. coli*, como las otras bacterias Gram negativas, son intrínsecamente resistentes a los antimicrobianos hidrofóbicos, tales como macrólidos, novobiocinas, rifamicinas, actinomicina D y ácido fusídico (Scheutz & Strockbine, 2005). Los antimicrobianos más frecuentemente empleados en el tratamiento de las infecciones por cepas de *E. coli* patógenas extraintestinales son la amoxicilina, ácido clavulánico, cefalosporinas, aminoglucósidos, cotrimoxazol y quinolonas. Sin embargo, la capacidad de *E. coli* para adquirir genes de resistencia hace impredecible su sensibilidad, por lo que ésta debe determinarse siempre mediante un antibiograma (Blanco *et al.*, 2002).

Resistencia adquirida a los aminoglucósidos, β -lactámicos, cloranfenicol, sulfonamidas, tetraciclinas y trimetoprim se ha descrito para cepas de *E. coli* por cuatro mecanismos distintos: alteración de diana, inactivación enzimática, menor acumulación intracelular del antimicrobiano y desvío de una etapa metabólica (Scheutz & Strockbine, 2005).

Una proporción elevada (40 a 90%) de las cepas de *E. coli* son resistentes a la ampicilina, estreptomina, tetraciclinas y sulfamidas. También son muchas las cepas resistentes a las cefalosporinas de primera generación, neomicina, kanamicina, cloranfenicol y quinolonas (15 a 30%). Entre los antibióticos que presentan menores tasas de resistencias se dispone de amoxicilina-ácido clavulánico, cefalosporinas de segunda y tercera generación, gentamicina, tobramicina, ampicilina, colistina y polimixina B (Blanco *et al.*, 2002).

A pesar de la amplia cobertura de antibióticos existentes para tratar la UTIs, en ocasiones la sintomatología urinaria no desaparece por factores de riesgo o más aún por un fenómeno creciente y que preocupa a la comunidad médica nacional e internacional, denominado resistencia bacteriana (Abelson *et al.*, 2004).

3. ANTECEDENTES

Abe *et al.*, (2008) en Brazil, realizaron un estudio con 225 cepas de *E. coli* Uropatógenas (UPEC) para la identificación de diversos factores de virulencia; las cepas fueron aisladas de pacientes con sintomatología de infecciones del tracto urinario (UTIs), La identificación de los factores de virulencia se realizó por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La prevalencia de los genotipos de virulencia fue la siguientes: *irp2* 68.9%, *iha* 40.4%, *pic* 13.8% y *astA* 7.1%.

Bauer *et al.*, (2002) en USA, llevaron a cabo un estudio para la identificación, distribución y asociación de dos genes (*usp* e *iha*) con otros reportados previamente (*KpsMT* y *ompT*). Realizaron el estudio con 924 cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con infecciones del tracto urinario (n=508) y aisladas de pacientes sin la infección (n=416). Las cepas fueron aisladas e identificadas por biología molecular, La identificación de los factores de virulencia se realizó por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Estos autores describieron que el gen *usp* mostró una distribución del 68.5% de las cepas obtenidas de las UTIs, mientras que en cepas aisladas sin infección la frecuencia de este gen fue de 57.9%; por otro lado el gen *iha* tuvo una frecuencia del 37.4% en pacientes con UTIs, mientras en pacientes sin UTIs, la frecuencia fue del 30.6%; Estos autores también reportaron una asociación entre los genes *usp* y *KpsMT* en infecciones del tracto urinario, concluyendo que no hay diferencias significativas para el gen *iha* entre las dos poblaciones analizadas y ninguna asociación con alguno de los otros genes estudiados.

Boerlin *et al.*, (2005) en Ontario, Canadá investigaron la distribución del gen *astA* en 318 cepas de *Escherichia coli*, las cepas fueron aisladas de la materia fecal de cerdos, La identificación de los factores de virulencia se realizó por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Estos autores reportaron la distribución del gen *astA* en cepas de *E. coli* Enteroxigénica (99%), en cepas ETEC negativas (27%) y en cepas de organismos sanos (30%).

Johnson y Stell, (2000) en Seattle, EUA efectuaron un estudio con 75 cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con urosepsis, realizaron la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la identificación de 29 factores de virulencia; Entre sus resultados destacó la presencia de los genes *KpsMT* y *cva* con una distribución de 63% y 15% respectivamente.

Johnson *et al.*, (2000) en EUA, llevaron a cabo un estudio con 67 cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con urosepsis; La identificación de los factores de virulencia se realizó por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En este estudio se describió que la prevalencia de dos genes que codifican para el sistema de adquisición de hierro, *ironN_E* e *iha* se identificaron en el 39% y 55% respectivamente; Además reportaron la posible asociación de estos genes con otros como lo son *KpsMT* y *cva*.

Karimian *et al.*, (2012) en Irán, efectuaron un estudio con 123 cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con infecciones del tracto urinario, La detección de los diversos factores de virulencia se realizó por PCR. El gen *irp2* que codifica para la adquisición de hierro fue del 11.3%. También se identificaron factores que codifican para adhesinas como los genes *usp* e *iha* con una distribución de 1.6% y 17.8% respectivamente, el gen *OmpT* que está involucrado en la evasión de la respuesta inmune presentó una frecuencia de 4.8%. El gen *tsh* (0.0%) que codifica para citotoxinas no fue reportado en este trabajo.

Momtaz *et al.*, (2013) en Irán, realizaron un estudio con 123 cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con infecciones del tracto urinario. La identificación de los factores de virulencia se realizó por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). De acuerdo a sus resultados obtenidos, reportaron que en general, los factores de virulencia *fim* y *set1* tuvieron la más alta prevalencia con 86.16% y 79.67% respectivamente mientras que *usp* y *KpsMT* tuvieron la más baja prevalencia con 1.62% y 4.06% respectivamente, también reportaron la distribución de los siguientes genes: *astA* (21.13%), *sigA* (21.13%), *sap* (26.01%), *pic* (13%), *iha* (17.88%), *ompT* (4.87%), *iss* (8.13%), *irp2* (10.56%), *vat* (9.75%) y

cva (4.87%) Los factores de virulencia *tsh* y *sen* no fueron detectados en ninguna cepa.

Soto *et al.*, (2009) en Barcelona, España efectuaron un estudio con 170 cepas clínicas de *E. coli* Uropatógenas. Las cepas fueron aisladas y tomadas de pacientes con cistitis, pielonefritis y prostatitis; La identificación de los factores de virulencia se realizó por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Estos autores describieron que *astA* fue identificado en un 8%, además se reportó la presencia de los genes *sap*, *pic* y *sigA* dentro de una isla de patogenicidad (PAI).

Ui-Yoon Choi *et al.*, (2012) en Korea, investigaron las diferencias filogenéticas de dos grupos de *E. coli* en dos poblaciones de niños con infecciones del tracto urinario. Un total de 138 cepas de *E. coli* Uropatógenas fueron colectadas de dos regiones, La identificación de los factores de virulencia se realizó por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR); En este estudio se describió que el gen *KpsMT* fue identificado en el 69.6%. De acuerdo a sus resultados (grupo 1: distribución de 61.6% y grupo 2: distribución de 26.8%) ellos confirman que la ubicación geográfica es un determinante muy importante en la distribución de los grupos filogenéticos y en los factores de virulencia que presentan las cepas de *E. coli* Uropatogenas.

Van *et al.*, (2008) en Vietnam, investigaron la presencia de genes de virulencia de cepas de *E. coli* extraintestinales en 180 muestras de carne cruda y mariscos. La identificación de los factores de virulencia se realizó por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Identificaron 56 genes de virulencia, entre los que se encuentran *iss*, *cva*, *iha* y *OmpT* con una distribución entre las muestras analizadas en un rango de 2.5% a 10.5%.

4. JUSTIFICACIÓN

Debido a que en los últimos años en nuestro país las infecciones del tracto urinario ocasionadas por cepas de *Escherichia Coli* Uropatógenas (UPEC) se han incrementado, aunado a los pocos o nulos estudios realizados con respecto a los factores de virulencia que presentan las cepas UPEC, se considera necesario un estudio como el presente, que contribuirá a establecer los diferentes patrones de asociación de los genotipos de virulencia que codifican para adhesinas, sistemas de adquisición de hierro (nutrición), sistemas para la evasión de la respuesta inmune del hospedero (protectinas) y toxinas (enterotoxinas y citotoxinas) en un grupo de cepas Uropatógenas de *E. coli* aisladas de pacientes con infecciones en el tracto urinario.

5. **OBJETIVOS**

5.1 **Objetivo General**

- Caracterizar molecularmente y correlacionar la presencia de genes que codifican para factores de virulencia en cepas clínicas de *Escherichia coli* Uropatógenas (UPEC) aisladas de pacientes con infecciones del tracto urinario de dos hospitales públicos del Estado de México.

5.2 **Objetivos Particulares**

- Determinar la prevalencia de 14 genes (*iha*, *tsh*, *usp*, *vat*, *iss*, *cva*, *irp2*, *astA*, *kpsMT*, *pic*, *sap*, *OmpT*, *sigA*, *sen*) en 194 cepas clínicas de *E. coli* Uropatógena aisladas de urocultivos de pacientes con infecciones en el tracto urinario.
- Identificación de los genes de adhesión *iha* y *tsh* en las cepas de *E. coli*.
- Detección del genotipo *irp2* involucrado en el sistema de adquisición de hierro (nutrición) en las cepas UPEC.
- Caracterización del gen *OmpT*, del gen *iss* y del gen *kpsMT* responsables de la evasión de la respuesta inmune en las cepas de *E. coli*.
- Detección de los genes que codifican citotoxinas *usp*, *vat* y *cva* en las cepas de *E. coli*.
- Identificación de los genes que codifican enterotoxinas *astA* y *sen* en las cepas clínicas de *E. coli*.
- Determinar la presencia de la isla de patogenicidad (PAI) mediante la detección de *sigA*, *pic* y *sap* en las cepas de *E. coli*.
- Establecer los patrones de asociación de los genes que codifican para adhesinas, sistemas de adquisición de hierro, evasión de la respuesta inmune y toxinas en las cepas UPEC.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Origen de las cepas.

Para el desarrollo del presente trabajo se utilizaron 194 cepas de *Escherichia coli* Uropatógenas aisladas de urocultivos de pacientes mayores de edad con infecciones del tracto urinario de dos hospitales públicos (Clínica oficial N. 64 del IMSS, Unidad Tequesquihuac y clínica oficial N. 72 del IMSS, Unidad Tlalnepantla) ubicadas en el municipio de Tlalnepantla de Baz, Edo. De México. A los pacientes seleccionados se les aplicó un cuestionario para obtener información como edad, sexo, antecedentes de infecciones del tracto urinario, etc. Pacientes con tratamiento previo de antibióticos fueron excluidos del estudio. Los pacientes que participaron en el proyecto se les recolectó en frascos estériles la primera orina de la mañana y se llevaron al Laboratorio de Análisis Clínicos de la Clínica Tequesquihuac para cultivo de orina; Al término las cepas bacterianas fueron transportadas al Laboratorio de Análisis Clínicos de la CUSI (Clínica Universitaria de la Salud Integral), FES Iztacala para su posterior manipulación.

6.2 Extracción del DNA.

Las cepas fueron sembradas en agar EMB (Eosina azul de metileno) por el método de la estría cruzada; se incubaron a 37°C durante 24h. Después de obtenido el crecimiento óptimo bacteriano se tomó una muestra de cada cepa por medio de una asa de siembra estéril (Asa calibrada, 10µl) y se depositó en un tubo de ensaye de 16x150mm, estéril, con tapón de rosca con 2ml de agua deionizada estéril Ultrapure™. El inóculo fue agitado por medio de un agitador Apollo Vortex Mixer® por 30 segundos y se colocó en baño maría durante 20 minutos a una temperatura de 100°C. Al término, la muestra se colocó en hielo (0°C) por 10 minutos y se centrifugó en una microcentrifuga Microfuge Beckman Coulter™ a 14,000rpm durante 10 minutos. El sobrenadante que contenía el DNA fue

transferido a un tubo eppendorf de 200µl estéril, y se guardó a -20°C hasta su utilización para la reacción por PCR (Paniagua *et al.*, 2007).

6.3 Identificación de *Escherichia coli* por PCR.

Las cepas bacterianas de *Escherichia coli* fueron identificadas por PCR mediante la detección del marcador cromosómico rRNA (Lane *et al.*, 1985). Los oligonucleótidos utilizados fueron: wl-3110 (AGAGTTTGATCGTGGCTACG) y wl-3111 (CCGTCAATTCATTTGAGTTT; Integrated DNA Technologies™). Para la amplificación por PCR del gen se utilizó el kit Kapa Taq Ready Mix™ (Kapa Biosystems™) que contenía DNA polimerasa (0.5u/µl), reacción buffer con Mg²⁺ como cofactor, 0.4mM de dNTPs (deoxinucleósidos trifosfato) como sustrato. Para la mezcla de reacción por separado se utilizaron 10µl del kit Kapa Taq Ready Mix™, 1µl de cada oligonucleótido (10pmol; Integrated DNA Technologies™), 5µl de agua estéril libre de nucleasas y 3µl de DNA molde para un volumen final de 20µl. La amplificación del DNA se realizó en un termociclador marca BIO-RAD T100® modelo CGI-96 bajo las siguientes condiciones: Desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, 30 ciclos (Desnaturalización a 95°C por 30 segundos, alineación a 55°C por 1 minuto y extensión a 72°C por 1 minuto). Finalmente la extensión se prolongó por 5 minutos a 72°C. El tamaño de los Amplicones (productos de la reacción en cadena de la polimerasa) para el gen rRNA fue de 919 pb (pares de bases; Lane *et al.*, 1985).

6.4 Detección de los genes *irp2*, *tsh*, *cva*, *iss* y *vat* por PCR multiplex.

La detección de estos genes en las cepas de *Escherichia coli* se llevó a cabo por el método de PCR multiplex descrito por Ewers *et al.*, 2005. Para lo cual se utilizó el kit Kapa Taq Ready Mix™ (Kapa Biosystems™) que contenía DNA polimerasa (0.5u/µl), reacción buffer con Mg²⁺ como cofactor, 0.4mM de dNTPs

(deoxinucleósidos trifosfato) como sustrato. Para la mezcla de reacción por separado se utilizaron 7µl del kit Kapa Taq Ready Mix™, 1µl de cada oligonucleótido (10pmol; Integrated DNA Technologies™; Tabla 2), y 3µl de DNA molde para un volumen final de 20µl. La amplificación del DNA se realizó en un termociclador marca BIO-RAD T100® modelo CGI-96 bajo las siguientes condiciones: Desnaturalización inicial a 94°C por 3 minutos, 25 ciclos (Desnaturalización a 94°C por 30 segundos, alineación a 58°C por 30 segundos y extensión a 68°C por 3 minutos). Finalmente la extensión se prolongó por 10 minutos a 72°C. (Ewers *et al.*, 2005).

6.5 Detección de los genes *astA*, *sigA*, *sap* y *pic* por PCR multiplex.

La detección de estos genes en las cepas de *Escherichia coli* se llevó a cabo por el método de PCR multiplex descrito por Soto *et al.*, 2009. Para lo cual se utilizó el kit Kapa Taq Ready Mix™ (Kapa Biosystems™) que contenía DNA polimerasa (0.5u/µl), reacción buffer con Mg²⁺ como cofactor, 0.4mM de dNTPs (deoxinucleósidos trifosfato) como sustrato. Para la mezcla de reacción por separado se utilizaron 9µl del kit Kapa Taq Ready Mix™, 1µl de cada oligonucleótido (10pmol; Integrated DNA Technologies™; Tabla 2), y 3µl de DNA molde para un volumen final de 20µl. La amplificación del DNA se realizó en un termociclador marca BIO-RAD T100® modelo CGI-96 bajo las siguientes condiciones: Desnaturalización inicial a 94°C por 3 minutos, 30 ciclos (Desnaturalización a 94°C por 30 segundos, alineación a 55°C por 1 minuto y extensión a 72°C por 1 minuto). Finalmente la extensión se prolongó por 5 minutos a 72°C. (Soto *et al.*, 2009).

6.6 Detección del gen *kpsMT* en las cepas de *E. coli* por PCR.

La detección del gen capsular *kpsMT* en las cepas de *Escherichia coli* se llevó a cabo por el método de PCR descrito por Kanamaru *et al.*, 2003. Para lo cual se utilizó el kit Kapa Taq Ready Mix™ (Kapa Biosystems™) que contenía DNA polimerasa (0.5u/μl), reacción buffer con Mg²⁺ como cofactor, 0.4mM de dNTPs (deoxinucleósidos trifosfato) como sustrato. Para la mezcla de reacción por separado se utilizaron 10μl del kit Kapa Taq Ready Mix™, 1μl de cada oligonucleótido (10pmol; Integrated DNA Technologies™; Tabla 2), 5μl de agua estéril libre de nucleasas y 3μl de DNA molde para un volumen final de 20μl. La amplificación del DNA se realizó en un termociclador marca BIO-RAD T100® modelo CGI-96 bajo las siguientes condiciones: Desnaturalización inicial a 94°C por 10 minutos, 30 ciclos (Desnaturalización a 94°C por 1 minuto, alineación a 60°C por 1 minuto y extensión a 72°C por 1 minuto). Finalmente la extensión se prolongó por 5 minutos a 72°C. (Kanamaru *et al.*, 2003).

6.7 Detección del gen *usp* en las cepas de *E. coli* por PCR.

La detección del gen *usp* que codifica para citotoxinas en las cepas de *Escherichia coli* se llevó a cabo por el método de PCR descrito por Bauer *et al.*, 2002. Para lo cual se utilizó el kit Kapa Taq Ready Mix™ (Kapa Biosystems™) que contenía DNA polimerasa (0.5u/μl), reacción buffer con Mg²⁺ como cofactor, 0.4mM de dNTPs (deoxinucleósidos trifosfato) como sustrato. Para la mezcla de reacción por separado se utilizaron 10μl del kit Kapa Taq Ready Mix™, 1μl de cada oligonucleótido (10pmol; Integrated DNA Technologies™; Tabla 2), 5μl de agua estéril libre de nucleasas y 3μl de DNA molde para un volumen final de 20μl. La amplificación del DNA se realizó en un termociclador marca BIO-RAD T100® modelo CGI-96 bajo las siguientes condiciones: Desnaturalización inicial a 94°C por 2 minutos, 30 ciclos (Desnaturalización a 94°C por 30 segundos, alineación a

58°C por 30 segundos y extensión a 73°C por 30 segundos). Finalmente la extensión se prolongó por 10 minutos a 73°C. (Bauer *et al.*, 2002).

6.8 Detección de los genes *iha* y *OmpT* por PCR multiplex.

La detección de los genes *iha* y *OmpT* en las cepas de *Escherichia coli* se llevó a cabo por el método de PCR multiplex descrito por Johnson & Stell, 2000. Para lo cual se utilizó el kit Kapa Taq Ready Mix™ (Kapa Biosystems™) que contenía DNA polimerasa (0.5u/μl), reacción buffer con Mg²⁺ como cofactor, 0.4mM de dNTPs (deoxinucleósidos trifosfato) como sustrato. Para la mezcla de reacción por separado se utilizaron 10μl del kit Kapa Taq Ready Mix™, 1μl de cada oligonucleótido (10pmol; Integrated DNA Technologies™; Tabla 2), 3μl de agua estéril libre de nucleasas y 3μl de DNA molde para un volumen final de 20μl. La amplificación del DNA se realizó en un termociclador marca BIO-RAD T100® modelo CGI-96 bajo las siguientes condiciones: Desnaturalización inicial a 95°C por 12 minutos, 25 ciclos (Desnaturalización a 94°C por 30 segundos, alineación a 63°C por 30 segundos y extensión a 68°C por 30 segundos). Finalmente la extensión se prolongó por 10 minutos a 72°C. (Johnson & Stell, 2000).

6.9 Detección del gen *sen* en las cepas de *E. coli* por PCR.

La detección del gen *sen* que codifica para enterotoxinas en las cepas de *Escherichia coli* se llevó a cabo por el método de PCR descrito por Ewers *et al.*, 2005. Para lo cual se utilizó el kit Kapa Taq Ready Mix™ (Kapa Biosystems™) que contenía DNA polimerasa (0.5u/μl), reacción buffer con Mg²⁺ como cofactor, 0.4mM de dNTPs (deoxinucleósidos trifosfato) como sustrato. Para la mezcla de reacción por separado se utilizaron 10μl del kit Kapa Taq Ready Mix™, 1μl de

Tabla 2. Oligonucleótidos que fueron utilizados para la identificación de genes de *Escherichia coli* que codifican diversos factores de virulencia.

Gen	Nombre del primer	Secuencia del primer (5`-3`)	Tamaño del amplicón (pb)	Referencia
<i>tsh</i>	tsh-F	ACTATTCTCTGAAGGAAGTC	824	(19)
	tsh-R	CTTCCGATGTTCTGAACGT		
<i>iha</i>	IHA-F	CTGGCGGAGGCTCTGAGATCA	827	(36)
	IHA-R	TCCTTAAGCTCCCGCGGCTGA		
<i>Irp2</i>	Irp2-F	AAGGATTCGCTGTTACCGGAC	413	(19)
	Irp2-R	AACTCCTGATACAGGTGGC		
<i>KpsMT</i>	KpsMT-F	CCATCGATACGATCATTGCACG	400	(41)
	KpsMT-R	ATTGCAAGGTAGTTCAGACTCA		
<i>pic</i>	pic-F	ACTGGATCTTAAGGCTCAGGAT	500	(73)
	pic-R	GACTTAATGTCACTGTTTCAGCG		
<i>OmpT</i>	OmpT-F	ATCTAGCCGAAGAAGGAGGC	559	(36)
	OmpT-R	CCCGGGTCATAGTGTTTCATC		
<i>sap</i>	sap-F	TACCCTCCAACAACAGAGAATG	832	(73)
	sap-R	TACCCTCCACAACAGAGAATG		
<i>sigA</i>	sigA-F	TCCTCGGTATTATTTTATCC	110	(73)
	sigA-R	CGTAACCCCTGTTGTTTCCAC		
<i>usp</i>	usp-F	ACATTCACGGCAAGCCAG	440	(6)
	usp-R	AGCGAGTTCCTGGTGAAAGC		
<i>vat</i>	vat-F	TCCTGGGACATAATGGTCAG	981	(19)
	vat-R	GTGTCAGAACGGAATTGT		
<i>iss</i>	iss-F	ATCACATAGGATTCTGCCG	309	(19)
	iss-R	CAGCGGAGTATAGATGCCA		
<i>cva</i>	cva-F	TGGTAGAATGTGCCAGAGCAAG	1181	(19)
	cva-R	GAGCTGTTTGTAGCGAAGCC		
<i>astA</i>	astA-F	ATGCCATCAACACAGTATAT	408	(73)
	astA-R	GCGAGTGACGGCTTTGTAGT		
<i>sen</i>	sen-F	ATGTGCCTGCTATTATTTAT	799	(19)
	sen-R	CATAATAATAAGCGGTCAGC		

(Adaptado de Momtaz *et al.*, 2013).

cada oligonucleótido (10pmol; Integrated DNA Technologies™; Tabla 2), 5µl de agua estéril libre de nucleasas y 3µl de DNA molde para un volumen final de 20µl. La amplificación del DNA se realizó en un termociclador marca BIO-RAD T100® modelo CGI-96 bajo las siguientes condiciones: Desnaturalización inicial a 94°C por 3 minutos, 25 ciclos (Desnaturalización a 94°C por 30 segundos, alineación a 58°C por 30 segundos y extensión a 68°C por 3 minutos). Finalmente la extensión se prolongó por 10 minutos a 72°C. (Ewers *et al.*, 2005).

6.10 Análisis de los amplicones por electroforesis en geles de agarosa.

Una vez realizada la amplificación por PCR de los múltiples factores de virulencia los amplicones (3µl) fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 2% teñidos con el colorante Midori Green (0.7%; Nipon Genetics, Europe Gmph) y Tris-Borato 1x (TBE) como buffer para conducir la corriente eléctrica y poder así separar los fragmentos de DNA según su tamaño. La electroforesis se realizó bajo las siguientes condiciones: 120volts, 94 miliamperes durante 60 minutos. Los geles de agarosa fueron fotografiados bajo luz UV (312 nm) utilizando el sistema de fotodocumentación GEL LOGIC 100™ KODAK®. (Paniagua *et al.*, 2007).

6.11 Análisis estadístico.

Para el análisis de los datos se utilizó una X^2 (Bondad de ajuste) para encontrar diferencias significativas entre los diferentes patrones de asociación de los genes que codifican factores de virulencia de las cepas clínicas de *E. coli* aisladas de pacientes con infecciones en las vías urinarias. La significancia estadística fue considerando un *P* value < 0.05.

7. RESULTADOS

7.1 Pacientes analizados.

A partir de los 194 pacientes con sintomatología de infección en vías urinarias que acudieron a la Clínica oficial N. 64 del IMSS, Unidad Tequesquihuac y a la clínica oficial N. 72 del IMSS, Unidad Tlalnepantla y que resultaron positivas para *Escherichia coli*, se encontró que el 80.9% (n=157) de los pacientes correspondió al sexo femenino y el 19.1% (n=37) correspondió al sexo masculino (Figura 3).

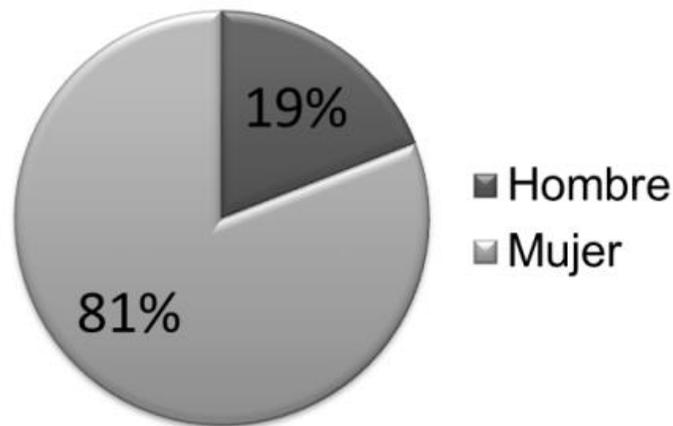


Figura 3. Distribución de pacientes analizados por sexo.

7.2 Edad de los pacientes analizados.

La distribución de los pacientes según el rango de edad se observa en la figura 4. El rango de edad más abundante fue el de 41 a 60 años (n=19), seguidos por los rangos de 61 a 86 años (n=11) y de 21 a 40 años (n=5). En el 82% (n=159) de los pacientes analizados no se pudo determinar la edad.

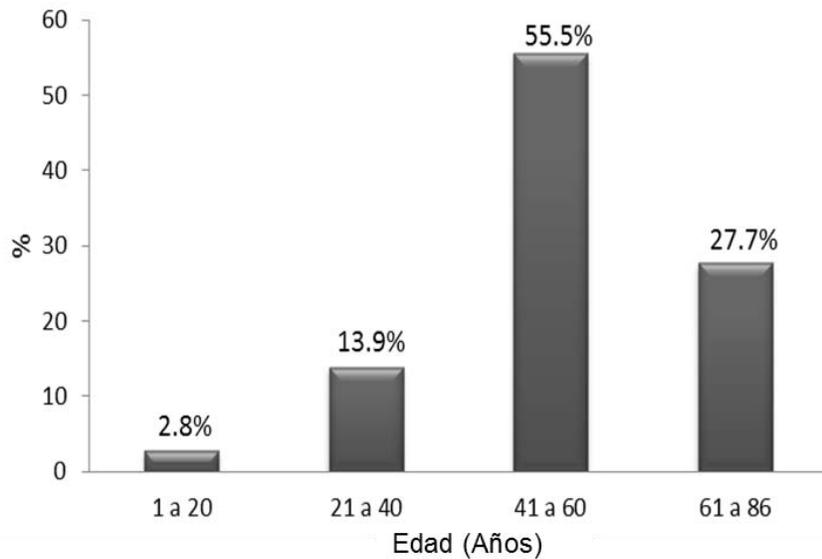


Figura 4. Distribución de pacientes analizados por rango de edades.

7.3 Diagnóstico de los pacientes analizados.

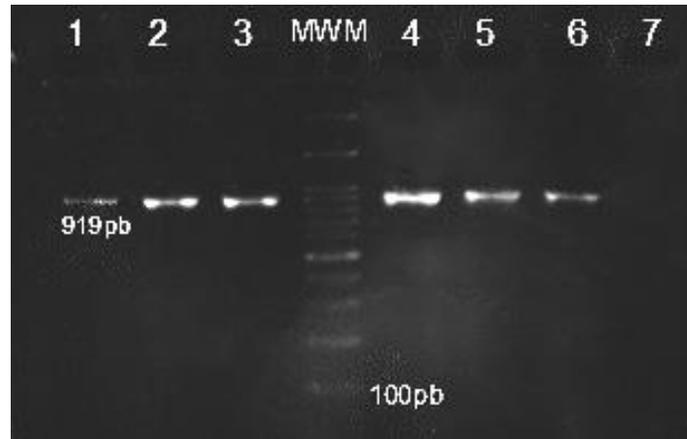
A continuación se presentan los diagnósticos de los 194 pacientes analizados. El diagnóstico más frecuente fue infecciones en las vías urinarias bajas (UTIs) con el 95.3% (n=185), seguido de pielonefritis, urosepsis e infección vaginal con el 1% (n=2) para cada caso, por otro lado lupus eritematoso, cervicovaginitis y litiasis renal prevalecieron con el 0.5% (n=1) para cada caso (Tabla 3).

Tabla 3. Porcentaje de los diagnósticos de los pacientes analizados

Diagnóstico	Número	%(N=194)
Infección en vías urinarias	185	95.3
Pielonefritis	2	1
Urosepsis	2	1
Infección vaginal	2	1
Lupus eritematoso	1	0.5
Cervicovaginitis	1	0.5
Litiasis renal	1	0.5

7.4 Identificación de *E. coli* por PCR de punto final.

Las 194 cepas de *Escherichia coli* se identificaron molecularmente por la presencia del gen *16SrRNA* (Fotografía 1).



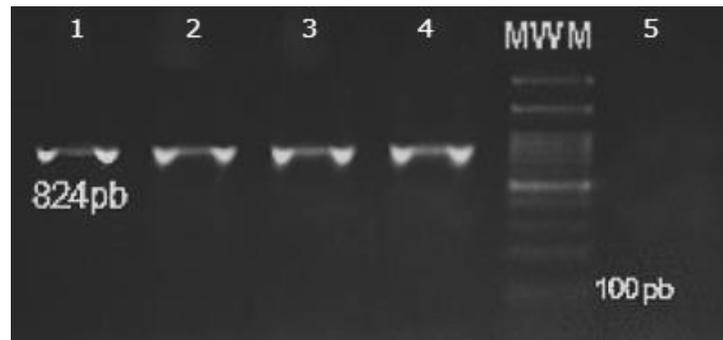
Fotografía 1. Identificación de las cepas de *E. coli* mediante la detección del gen *rRNA* por PCR. Carriles 1 a 3, 4 y 5, gen *rRNA* (919 pb, Amplicón) en cepas clínicas de *E. coli*; MWM, Marcador de peso molecular (100 pb); Carril 6, control positivo (Obtenida del cepario del Lab. CUSI); Carril 7, control negativo (Mezcla de reacción sin DNA molde).

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

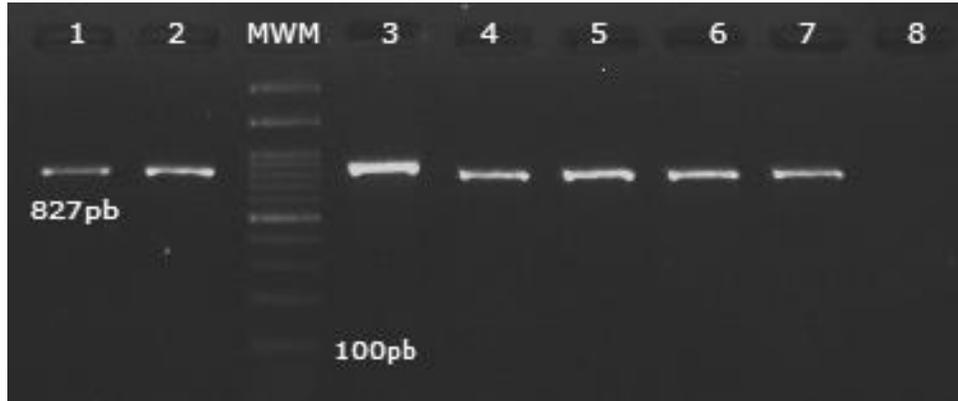
De los 14 genes identificados en las 194 cepas de *E. coli* el gen con mayor prevalencia fue el gen *KpsMT* con el 91.7% (n=178; Fotografía 5), seguido por los genes *usp* con el 87.1% (n=169; Fotografía 11), *irp2* con el 79.3% (n=154; Fotografía 4), *iha* con el 64.9% (n=126; Fotografía 3), *astA* con el 33.5% (n=65; Fotografía 14), *OmpT* con el 10.3% (n=20; Fotografía 7); Los siguientes genes presentaron una prevalencia menor a 10%: *vat* con el 5.6% (n=11; Fotografía 12), *tsh* con el 5.1% (n=10; Fotografía 2), *iss* y *cva* con el 4.6% (n=9; Fotografías 10 y 13 respectivamente), *sigA* con el 4.1% (n=8; Fotografía 9), *pic* con el 2.5% (n=5; Fotografía 6), *sap* con el 1.5% (n=3; Fotografía 8), mientras que el gen *sen* no se identificó en ninguna de las 194 cepas de *E. coli* (Tabla 4).

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

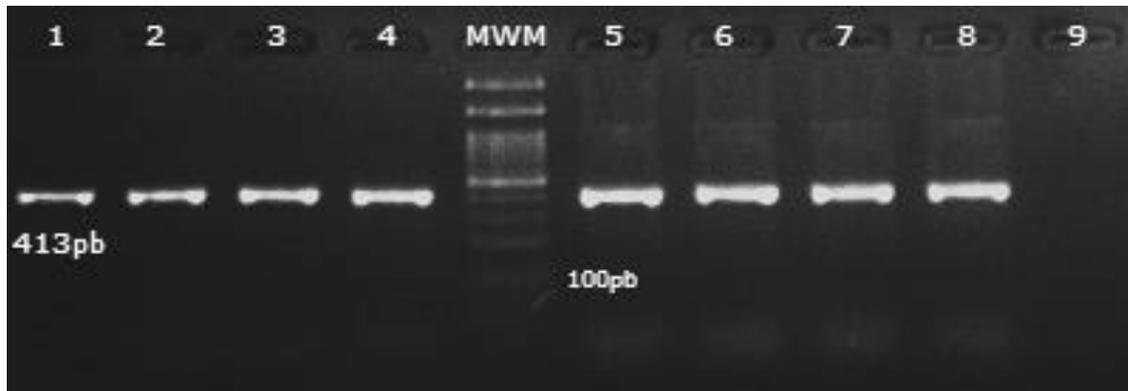
Gen	N. de cepas	Porcentaje
<i>tsh</i>	10	5.1
<i>iha</i>	126	64.9
<i>irp2</i>	154	79.3
<i>KpsMT</i>	178	91.7
<i>pic</i>	5	2.5
<i>OmpT</i>	20	10.3
<i>sap</i>	3	1.5
<i>sigA</i>	8	4.1
<i>usp</i>	169	87.1
<i>vat</i>	11	5.6
<i>iss</i>	9	4.6
<i>cva</i>	9	4.6
<i>astA</i>	65	33.5
<i>sen</i>	0	0



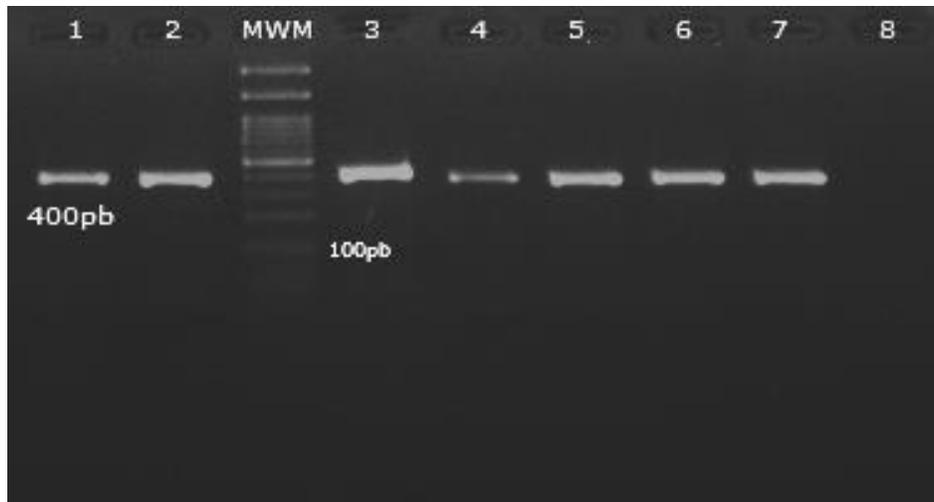
Fotografía 2. Detección por PCR multiplex del gen de Adhesión *tsh* (824 pb, Amplicón) en cepas de *E. coli* Uropatógenas. Carriles 2 a 4, gen *tsh* (Amplicón); MWM, Marcador de peso molecular (100 pb); Carril 1, control positivo (Obtenida del cepario del Lab. CUSI); Carril 5, control negativo (Mezcla de reacción sin DNA molde).



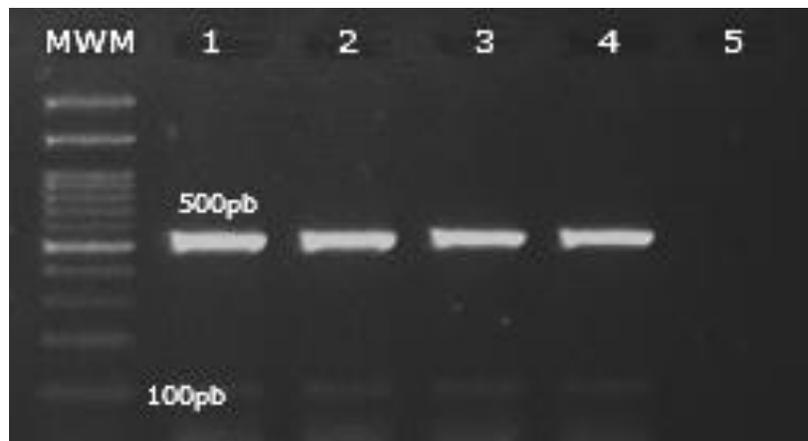
Fotografía 3. Detección por PCR multiplex del gen de Adhesión *iha* (827 pb, Amplicón) en cepas de *E. coli* Uropatógenas. Carriles 2 y 3 a 7, gen *iha* (Amplicón); MWM, Marcador de peso molecular (100 pb); Carril 1, control positivo (Obtenida del cepario del Lab. CUSI); Carril 8, control negativo (Mezcla de reacción sin DNA molde).



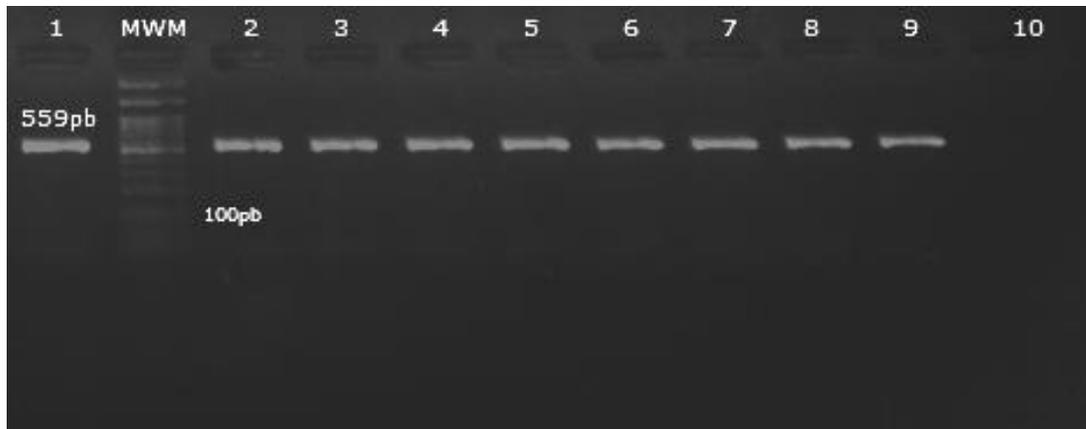
Fotografía 4. Detección por PCR multiplex del gen con sistema de adquisición de hierro *irp2* (413 pb, Amplicón) en cepas de *E. coli* Uropatógenas. Carriles 2 a 4 y 5 a 8, gen *irp2* (Amplicón); MWM, Marcador de peso molecular (100 pb); Carril 1, control positivo (Obtenida del cepario del Lab. CUSI); Carril 9, control negativo (Mezcla de reacción sin DNA molde).



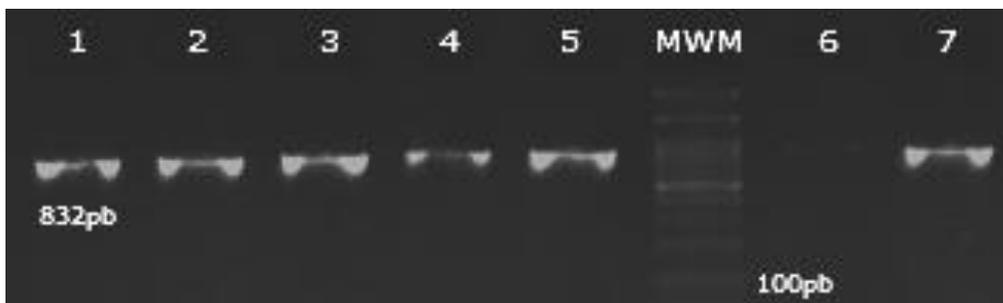
Fotografía 5. Detección por PCR convencional del gen de evasión de respuesta inmune *KpsMT* (400 pb, Amplicón) en cepas de *E. coli* Uropatógenas. Carriles 2 y 3 a 7, gen *KpsMT* (Amplicón); MWM, Marcador de peso molecular (100 pb); Carril 1, control positivo (Obtenida del cepario del Lab. CUSI); Carril 8, control negativo (Mezcla de reacción sin DNA molde).



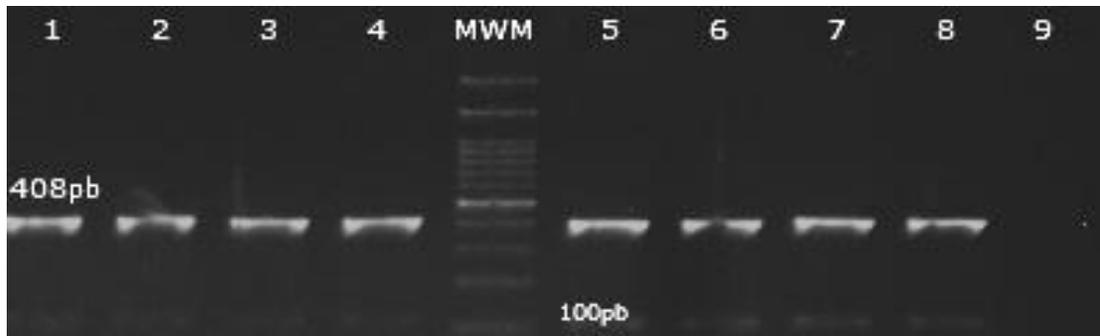
Fotografía 6. Detección por PCR multiplex del gen de evasión de respuesta inmune *pic* (500 pb, Amplicón) en cepas de *E. coli* Uropatógenas. Carriles 2 a 4, gen *pic* (Amplicón); MWM, Marcador de peso molecular (100 pb); Carril 1, control positivo (Obtenida del cepario del Lab. CUSI); Carril 5, control negativo (Mezcla de reacción sin DNA molde).



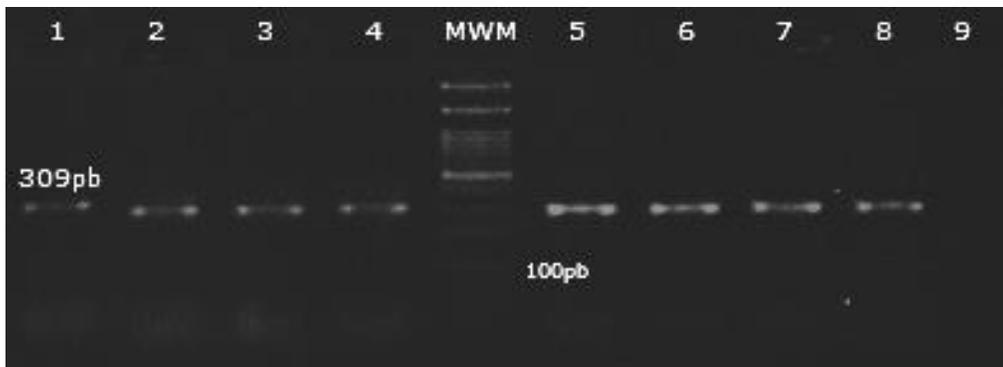
Fotografía 7. Detección por PCR multiplex del gen de evasión de respuesta inmune *OmpT* (559 pb, Amplicón) en cepas de *E. coli* Uropatógenas. Carriles 2 y 3 a 9, gen *OmpT* (Amplicón); MWM, Marcador de peso molecular (100 pb); Carril 1, control positivo (Obtenida del cepario del Lab. CUSI); Carril 10, control negativo (Mezcla de reacción sin DNA molde).



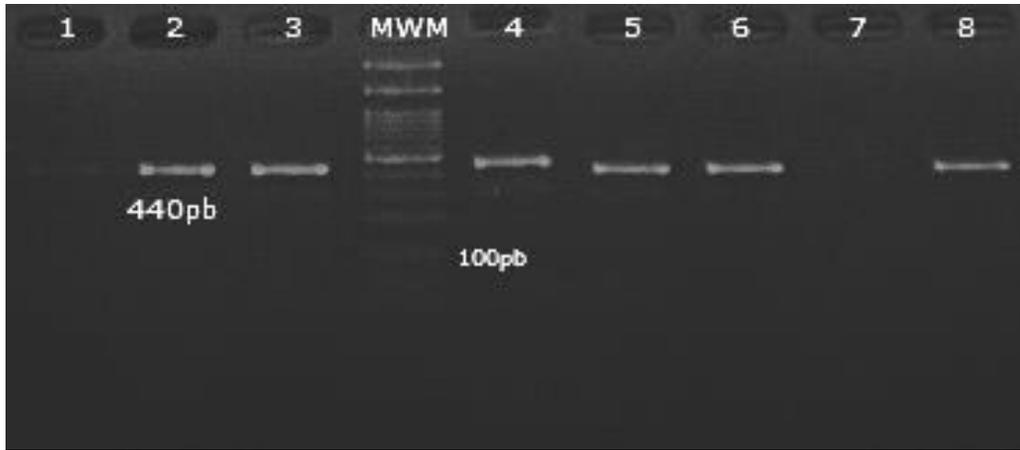
Fotografía 8. Detección por PCR multiplex del gen de evasión de respuesta inmune *sap* (832 pb, Amplicón) en cepas de *E. coli* Uropatógenas. Carriles 1 a 5, gen *sap* (Amplicón); MWM, Marcador de peso molecular (100 pb); Carril 7, control positivo (Obtenida del cepario del Lab. CUSI); Carril 6, control negativo (Mezcla de reacción sin DNA molde).



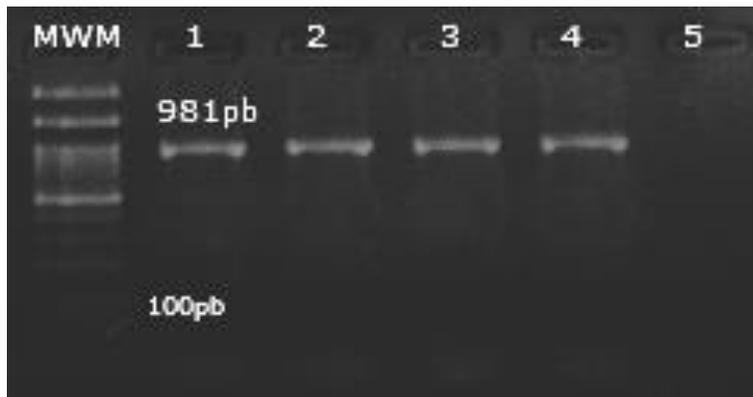
Fotografía 9. Detección por PCR multiplex del gen de evasión de respuesta inmune *sigA* (408 pb, Amplicón) en cepas de *E. coli* Uropatógenas. Carriles 2 a 4 y 5 a 8, gen *sigA* (Amplicón); MWM, Marcador de peso molecular (100 pb); Carril 1, control positivo (Obtenida del cepario del Lab. CUSI); Carril 9, control negativo (Mezcla de reacción sin DNA molde).



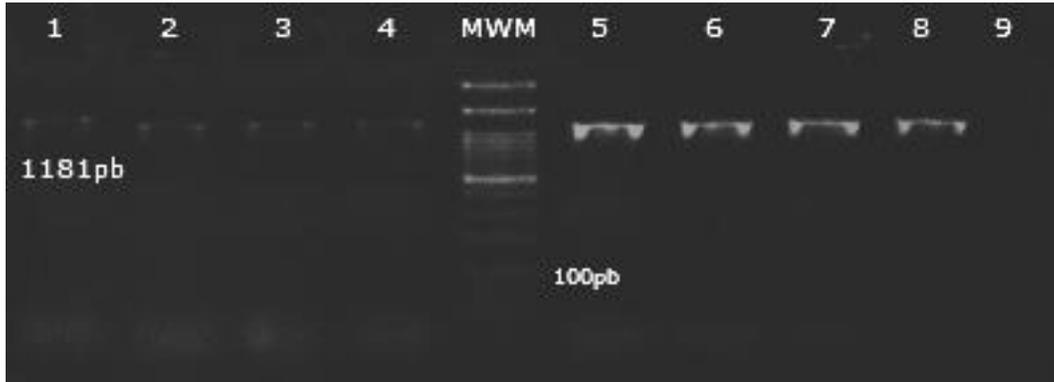
Fotografía 10. Detección por PCR multiplex del gen de evasión de respuesta inmune *iss* (309 pb, Amplicón) en cepas de *E. coli* Uropatógenas. Carriles 2 a 4 y 5 a 8, gen *iss* (Amplicón); MWM, Marcador de peso molecular (100 pb); Carril 1, control positivo (Obtenida del cepario del Lab. CUSI); Carril 9, control negativo (Mezcla de reacción sin DNA molde).



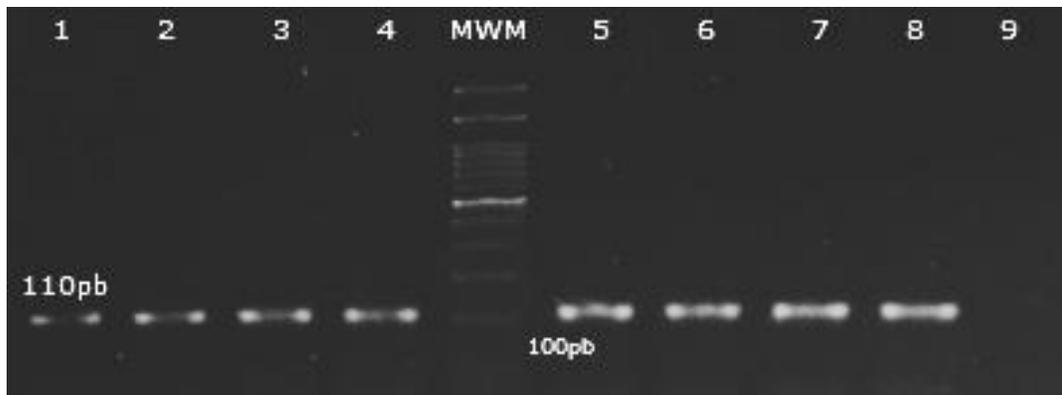
Fotografía 11. Detección por PCR convencional del gen con actividad tóxica *usp* (440 pb, Amplicón) en cepas de *E. coli* Uropatógenas. Carriles 2 a 6, gen *usp* (Amplicón); MWM, Marcador de peso molecular (100 pb); Carril 8, control positivo (Obtenida del cepario del Lab. CUSI); Carril 1, control negativo (Mezcla de reacción sin DNA molde).



Fotografía 12. Detección por PCR multiplex del gen con actividad tóxica *vat* (981 pb, Amplicón) en cepas de *E. coli* Uropatógenas. Carriles 2 a 4, gen *vat* (Amplicón); MWM, Marcador de peso molecular (100 pb); Carril 1, control positivo (Obtenida del cepario del Lab. CUSI); Carril 5, control negativo (Mezcla de reacción sin DNA molde).



Fotografía 13. Detección por PCR multiplex del gen con actividad tóxica *cva* (1181 pb, Amplicón) en cepas de *E. coli* Uropatógenas. Carriles 5 a 7, gen *cva* (Amplicón); MWM, Marcador de peso molecular (100 pb); Carril 8, control positivo (Obtenida del cepario del Lab. CUSI); Carril 9, control negativo (Mezcla de reacción sin DNA molde).



Fotografía 14. Detección por PCR multiplex del gen con actividad enterotóxica *astA* (110 pb, Amplicón) en cepas de *E. coli* Uropatógenas. Carriles 2 a 4 y 5 a 8, gen *astA* (Amplicón); MWM, Marcador de peso molecular (100 pb); Carril 1, control positivo (Obtenida del cepario del Lab. CUSI); Carril 9, control negativo (Mezcla de reacción sin DNA molde).

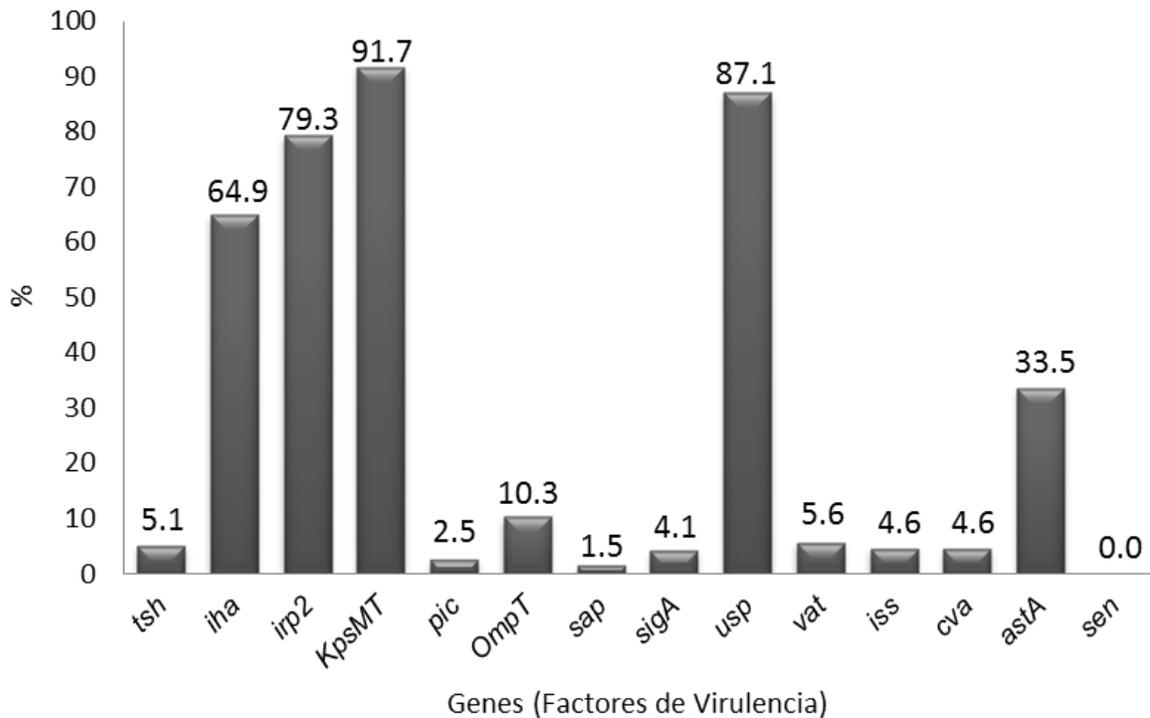


Figura 5. Prevalencia de genes de virulencia en las cepas de *E. coli*.

7.6 Patrones de asociación de los genes de virulencia en las cepas *E. coli*.

Se encontraron 50 patrones distintos de los genes de *E. coli*, dentro de los cuales el patrón N. 1 (*KpsMT/usp/ irp2/ iha*) se detectó en 45 cepas con una prevalencia de 23.19%, el patrón N. 2 (*KpsMT/usp/ irp2/ iha/ astA*) fue encontrado en 22 cepas con una prevalencia de 11.34%, el patrón N. 3 (*KpsMT/ usp/ irp2*) se reportó en 17 cepas con una prevalencia de 8.76%, el patrón N. 4 (*KpsMT/usp/ irp2/ astA*) se detectó en 13 cepas con una prevalencia de 6.70%; por otro lado, en 8 cepas (4.12%) no se encontró ningún patrón de asociación; Los patrones 6-50 fueron representados por menos de 10 cepas con una prevalencia que va del 3% al 0.51% (Tabla 5).

Tabla 5. Patrones de asociación de los diferentes genes de virulencia en las cepas clínicas de *E. coli*

Patrón	Genes	Número de cepas	Porcentaje
1	<i>KpsMT, usp, irp2, iha</i>	45	23.19
2	<i>KpsMT, usp, irp2, iha, astA</i>	22	11.34
3	<i>KpsMT, usp, irp2</i>	17	8.76
4	<i>KpsMT, usp, irp2, astA</i>	13	6.70
5	Sin patrón de asociación (1 gen)	8	4.12
6	<i>KpsMT, usp, irp2, iha, tsh</i>	6	3.09
7	<i>KpsMT, usp</i>	5	2.57
8	<i>KpsMT, usp, astA</i>	5	2.57
9	<i>KpsMT, usp, iha</i>	5	2.57
10	<i>KpsMT, usp, irp2, iha, sigA</i>	5	2.57
11	<i>KpsMT, usp, iha</i>	4	2.06
12	<i>KpsMT, usp, irp2, iha, vat</i>	4	2.06
13	<i>KpsMT, usp, irp2, iha, astA, vat</i>	4	2.06
14	<i>KpsMT, iha, irp2</i>	3	1.54
15	<i>KpsMT, usp, irp2, iha, cva</i>	3	1.54
16	<i>irp2, astA</i>	2	1.03
17	<i>KpsMT, irp2</i>	2	1.03
18	<i>KpsMT, irp2, astA</i>	2	1.03
19	<i>usp, irp2, astA</i>	2	1.03
20	<i>KpsMT, astA, tsh</i>	2	1.03
21	<i>KpsMT, irp2, iha, OmpT</i>	2	1.03
22	<i>KpsMT, irp2, OmpT, iss</i>	2	1.03
23	<i>KpsMT, usp, irp2, iha, tsh</i>	2	1.03
24	<i>KpsMT, usp, irp2, iha, sap</i>	2	1.03
25	<i>KpsMT, usp, irp2, iha, astA, OmpT</i>	2	1.03
26	<i>usp, irp2</i>	1	0.51
27	<i>astA, tsh</i>	1	0.51
28	<i>KpsMT, astA</i>	1	0.51
29	<i>usp, astA</i>	1	0.51
30	<i>irp2, astA, OmpT</i>	1	0.51
31	<i>KpsMT, irp2, OmpT</i>	1	0.51
32	<i>usp, irp2, iha</i>	1	0.51
33	<i>usp, OmpT, iss</i>	1	0.51
34	<i>KpsMT, iha, OmpT</i>	1	0.51
35	<i>KpsMT, irp2, iha, tsh</i>	1	0.51
36	<i>KpsMT, usp, irp2, sigA</i>	1	0.51
37	<i>KpsMT, usp, vat, iss</i>	1	0.51
38	<i>KpsMT, usp, cva, iss</i>	1	0.51
39	<i>KpsMT, usp, irp2, OmpT, pic</i>	1	0.51
40	<i>KpsMT, irp2, iha, astA, OmpT</i>	1	0.51
41	<i>KpsMT, usp, irp2, iha, pic</i>	1	0.51
42	<i>KpsMT, usp, irp2, astA, tsh</i>	1	0.51
43	<i>KpsMT, usp, astA, OmpT, pic</i>	1	0.51
44	<i>KpsMT, usp, irp2, cva, iss</i>	1	0.51
45	<i>KpsMT, usp, irp2, iha, astA, tsh</i>	1	0.51
46	<i>KpsMT, usp, irp2, iha, tsh, sigA</i>	1	0.51
47	<i>KpsMT, usp, irp2, iha, vat, iss</i>	1	0.51
48	<i>KpsMT, irp2, iha, tsh, cva, iss</i>	1	0.51
49	<i>KpsMT, usp, irp2, iha, OmpT, cva, sap</i>	1	0.51
50	<i>KpsMT, usp, irp2, iha, OmpT, vat, cva, pic</i>	1	0.51

7.7 Análisis Estadístico

Los datos fueron analizados por la prueba de ajuste de bondad χ^2 ; De acuerdo a los resultados se encontraron diferencias significativas entre los diferentes patrones de asociación de los genes que codifican factores de virulencia de las cepas clínicas de *E. coli* aisladas de pacientes con infecciones en las vías urinarias, el nivel de confianza utilizado fue del 95% con un P value < 0.05 .

8. DISCUSIÓN

8.1 Pacientes estudiados.

Para el desarrollo de este estudio se analizaron las muestras de orina de 194 pacientes con sintomatología de infección en vías urinarias (157 mujeres y 37 hombres; Figura 3) que acudieron a la Clínica oficial N. 64 del IMSS, Unidad Tequesquihuac y a la clínica oficial N. 72 del IMSS, Unidad Tlalnepantla.

Las infecciones del tracto urinario constituyen una de las enfermedades infecciosas más comunes a nivel mundial. Las UTIs afectan principalmente a las mujeres, debido a que en las mujeres la distancia desde el colon a la abertura uretral es mucho más corta que en los hombres. En los hombres, las UTIs tienen una incidencia mucho menor; Esto coincide con los resultados obtenidos en el presente trabajo, en donde se presentó una mayor prevalencia de las UTIs en mujeres (81%; n=157) con respecto a los hombres (19%, n=37; Figura 3). La incidencia de UTIs varía fundamentalmente con la edad y sexo del paciente. Las mujeres menores de 10 años y las de 18 a 40 años (con vida sexual activa) son las que más frecuentemente adquieren estas infecciones, además, aproximadamente la mitad de todas las mujeres han tenido una UTI antes de alcanzar sus 30 años de edad (Calderón-Jaimes *et al.*, 2013). Casi el 26% de las mujeres con UTIs tendrán al menos una recurrencia dentro de los primeros seis meses de la UTI inicial y entre 5 y 10% tendrán múltiples recurrencias. *E. coli* Uropatógena (UPEC) es la bacteria implicada con mayor frecuencia en estas infecciones, siendo el agente responsable de la infección en un 70-95% de todos los casos no complicados y de 30% en infecciones nosocomiales (Calderón-Jaimes *et al.*, 2013).

E. coli Uropatógena es responsable de una elevada frecuencia en las infecciones en vías urinarias en todo el mundo, y dependiendo de la virulencia puede desencadenar en cistitis y/o pielonefritis, en cuyo caso el tratamiento médico debe ser oportuno y adecuado para evitar complicaciones durante la enfermedad o evitar la muerte del paciente (Eiros-Bouza *et al.*, 2007). La virulencia de las cepas

UPEC se debe en gran medida a la expresión de factores de virulencia específicos que le confieren a la bacteria una creciente capacidad de adaptación a nuevos nichos y permite causar un largo espectro de enfermedades (Kaper *et al.*, 2004).

8.2 Identificación de *E coli* en los urocultivos de los pacientes con infecciones en vías urinarias.

En este estudio las 194 cepas de *E. coli* estudiadas fueron sometidas a las pruebas bioquímicas de indol, reacción negativa para el citrato de Simmons, y fermentación de glucosa, lactosa y D-manitol, como lo describe Scheutz *et al.*, (2005). Adicionalmente todas las cepas fueron identificadas para la especie de *E. coli* mediante la amplificación por PCR convencional del gen 16S rRNA (Fotografía 1), de acuerdo a lo descrito por Janda *et al.*, (2007); donde describen que la amplificación del gen 16S rRNA es una poderosa herramienta de la biología molecular para la identificación de cultivos bacterianos. Se ha descrito que entre los métodos de biología molecular más precisos para identificar microorganismos se encuentra la amplificación del gen 16S rRNA (Lane *et al.*, 1985).

La elevada frecuencia de *E. coli* responsable de infecciones en las vías urinarias en este estudio, corrobora lo propuesto por Momtaz *et al.*, (2013) quienes describieron que las UTIs son una de las infecciones más frecuentes causadas por *E. coli* en todo el mundo. Las UTIs constituyen una de las causas más frecuentes de enfermedades infecciosas encontradas en la práctica médica y se caracterizan por alta tasa de incidencia y morbilidad en la población pediátrica y adulta en diferentes regiones del mundo (Hooton, 2003). En general la mayoría de estas infecciones son causadas por microorganismos presentes en la flora intestinal. El 93% de los casos son producidos por bacilos gramnegativos, entre los que destaca *E. coli* (Goldraich & Manfroi, 2002).

En dependencia de la localización en el sistema genitourinario, de la capacidad de virulencia de los microorganismos antes mencionados y de factores predisponentes como edad y sexo, se determinan diferentes formas clínicas de

presentación, entre las que se pueden mencionar las más severas como lo son pielonefritis y cistitis (Kenndy, 1996).

En el boletín Epidemiológico de la Secretaría de Salud se reportó en el año 2007 un total de 3,076,468 casos de infecciones del tracto urinario, de los cuales 2,294,451 (74.5%) fueron en mujeres y 749,755 (23%) se presentaron en hombres. Las infecciones urinarias ocurren tanto en hombres como en mujeres, sin embargo, las mujeres son las más afectadas ya que la uretra es más corta que la de los hombres, es decir, la uretra masculina es tres veces más grande que la femenina, además los microorganismos provenientes de la vagina o del recto adyacente colonizan la uretra con facilidad lo cual aumenta el riesgo de contraer una infección (Schmiemann *et al.*, 2010), lo cual coincide nuevamente con resultados descritos en este trabajo (Figura 3).

8.3 Identificación de diversos marcadores de virulencia en cepas UPEC.

Las bacterias (incluyendo las cepas UPEC) poseen mecanismos de patogenicidad específicos que emergen al superar las defensas de un hospedero (Sánchez, 2011). La adherencia a las células uroteliales es el primer paso para establecerse una infección, tal como se reportó en el presente trabajo con la prevalencia de los genes *iha* y *tsh* que codifican para adhesinas; seguido de la invasión y multiplicación bacteriana dentro de las células del hospedero, es decir, la presencia de toxinas para invadir dichas células y sistemas de adquisición de hierro para la multiplicación bacteriana (Justice *et al.*, 2004); En este trabajo se reportó la prevalencia de 4 genes que codifican para citotoxinas: *usp*, *vat*, *iss* y *cva*; Además del gen *astA* que codifica para una enterotoxina y que están directamente relacionados con la invasión celular, además del gen *irp2* que codifica para proteínas involucradas en la nutrición y multiplicación de UPEC. La supresión de la respuesta inmune es otra estrategia de *E. coli* para evadir los mecanismos de defensa; Tal como se reporta en este trabajo con la prevalencia de 5 genes que codifican proteínas involucradas en la evasión de la respuesta inmune: *KpsMT*, *pic*, *ompT*, *sap* y *sigA*.

8.3.1 Adhesinas.

La adherencia entre la bacteria y la superficie del tejido del hospedero se logra mediante moléculas de superficie del patógeno denominadas adhesinas o ligandos que se unen específicamente a receptores complementarios de ciertos tejidos del hospedero (Meylan *et al.*, 2006); Puede ser mediada por adhesinas fimbriales pero además también por adhesinas afimbriales (Welch *et al.*, 2002). Las adhesinas son por lo general lectinas. Pueden estar ubicadas en el glucocálix, o en otras estructuras de superficie microbiana (Pili, fimbrias, flagelos). Se llaman fimbriales por su estructura. Las adhesinas que no están en fimbrias son denominadas adhesinas afimbriales como las proteínas de membrana externa en UPEC (Wurpel *et al.*, 2013).

8.3.1.1 Gen *tsh* (temperature-sensitive hemagglutinin).

En el presente trabajo el gen *tsh* que codifica adhesinas afimbriales se encontró en el 5.1% (n=10; Tabla 4; Figura 5; Fotografía 2) de las cepas UPEC; Este porcentaje concuerda con lo descrito por Ewers *et al.*, (2007), en donde el gen *tsh* fue identificado en el 4.5% (n=3) de un total de 66 cepas UPEC; Por otro lado la prevalencia del gen *tsh* obtenida en el presente trabajo es mucho menor a la obtenida por Heimer *et al.*, (2004) que reportó una prevalencia de 63% (n=55) de un total de 87 cepas clínicas de pacientes con cistitis y/o pielonefritis en un hospital de Baltimore, USA; En otro trabajo se reportó una prevalencia de 31% (n=31) del homólogo de *tsh* (*hbp*) de cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con infecciones en las vías urinarias en un hospital de Ámsterdam, Holanda (Otto *et al.*, 1998). En los trabajos realizados por Karimian *et al.*, (2012) y Momtaz *et al.*, (2013), contrario a lo reportado en el presente trabajo, reportaron una prevalencia del 0% para el gen *tsh* de un total de 123 cepas UPEC de un hospital de Tehran, Irán; La diferencia entre los resultados se debe posiblemente a que la distribución geográfica es un factor determinante que condiciona la prevalencia de los diferentes factores de virulencia en cepas UPEC.

8.3.1.2 Gen *iha* (non hemagglutinating adhesin).

El gen *iha* se encontró en el 64.9% (n=126; Tabla 4; Figura 5; Fotografía 3) de las cepas UPEC analizadas; Porcentaje similar reportó Johnson (B) *et al.*, (2000), con un 55% (n=37) de prevalencia del gen *iha* de un total de 67 cepas clínicas de pacientes con urosepsis de un hospital de Seattle, USA; El resultado del presente trabajo, además, es similar a lo reportado por Abe *et al.*, (2008) que reportan para el gen *iha* una frecuencia del 40.4% (n=91) de un total de 225 cepas UPEC de un hospital de Sao Paulo, Brazil. El porcentaje obtenido en este trabajo (64.9%; n=126) es mayor al reportado por Bauer *et al.*, (2002) y Momtaz *et al.*, (2013), quienes reportan una prevalencia de 34.1% (n=133) de un total de 508 cepas UPEC y 17.8% (n=22) de un total de 123 cepas UPEC de hospitales de Michigan, USA y Tehran, Irán respectivamente. La importancia del gen *iha* en cepas UPEC durante la fase temprana de las infecciones en vías urinarias ha sido recientemente descrita (Lèveillé *et al.*, 2006).

8.3.2 Sistemas de adquisición de hierro.

El hierro es un factor importante para el crecimiento de la mayoría de las bacterias. Sin embargo, la concentración de hierro libre en el cuerpo es relativamente baja, porque la mayor parte del hierro está unido a proteínas transportadoras (transferrinas). Con el fin de obtener hierro libre, UPEC secretan proteínas denominadas sideróforos, los cuales son compuestos que quelan hierro con alta afinidad. Cuando la bacteria necesita hierro para nutrirse y poder multiplicarse libera sideróforos al medio que se unen al hierro de las proteínas transportadoras; Una vez formado el complejo hierro-sideróforo es captado por receptores en la superficie bacteriana; Consecuentemente el hierro es internalizado e incorporado a la bacteria. Como alternativa a la adquisición de hierro mediante los sideróforos algunas bacterias tienen receptores que se unen directamente con las proteínas transportadoras de hierro y hemoglobinas. Además, algunas bacterias producen toxinas cuando captan concentraciones bajas de hierro; Las toxinas causan muerte en las células vecinas del hospedero y

liberan hierro, que entonces queda disponible para las bacterias (Lambris *et al.*, 2008; Zipfel *et al.*, 2007). La adquisición de hierro de *E. coli* en el tracto urinario es una necesidad vital mediada por una fuerte regulación de genes que codifican para sistemas de adquisición de hierro durante las UTIs (Hagan *et al.*, 2010).

8.3.2.1 Gen *irp2* (iron-repressible protein).

La frecuencia para *irp2* en las cepas UPEC analizadas fue de 79.3% (n=154; Tabla 4; Figura 5; Fotografía 4); Ewers *et al.*, (2007) realizaron un estudio con 65 cepas UPEC aisladas de pacientes en un hospital de Alemania donde reportaron la prevalencia de un 81% (n=53) para este gen; Similar resultado obtuvieron Abe *et al.*, (2008) que realizaron un estudio en Sao Paulo, Brazil donde reportaron una prevalencia del 68.9% (n=155) del gen *irp2* de un total de 225 cepas UPEC; Además, En un hospital público de China se llevó a cabo un trabajo donde reportaron la prevalencia de este gen en un 87% (n=34) de un total de 39 cepas aisladas de pacientes UTIs (Luo *et al.*, 2012). La frecuencia obtenida en el presente trabajo (79.3%; n=154; Tabla 4; Fig. 4; Fotografía 4) es mayor a lo descrito por Maluta *et al.*, (2014) y Momtaz *et al.*, (2013) para el gen *irp2*, quienes reportaron una prevalencia de 52.8% (n=28) de un total de 53 cepas UPEC y 11.4% (n=14) de un total de 123 cepas UPEC de hospitales de Campinas, Brazil y Tehran, Irán respectivamente. Los sistemas de adquisición de hierro de las cepas UPEC son de suma importancia para persistir en el tracto urinario; La elevada presencia de genes que codifican para este tipo de sistemas en cepas UPEC comparadas con cepas causantes de infecciones esporádicas es notable (Ejrnaes *et al.*, 2011).

8.3.3 Evasión de la respuesta inmune.

Aunque la mayoría de las bacterias pueden causar daño directo en la superficie de los tejidos, la mayoría debe invadirlos y penetrar en las células, actividad que quedaría limitada sin un proceso eficiente de evasión de la respuesta inmune, proceso realizado por múltiples factores de virulencia (Finlay & McFadden, 2006);

Entre ellos se encuentran: La capsula; Que es una red de polímeros que cubre la superficie de la bacteria la cual protege a la bacteria de la respuesta inflamatoria del hospedero, esto es, activación del complemento y muerte mediada por fagocitosis; Con la capsula es menos probable que la bacteria pueda ser opsonizada por C3b y evitar la fagocitosis (Murray *et al.*, 2009); Resistencia en suero es otro mecanismo para evadir el sistema inmune del hospedero. *E. coli* es rápidamente opsonizada en suero por los sistemas del complemento, la bacteria es reconocida y fagocitada, sin embargo, con los genotipos involucrados en la evasión del sistema inmune este proceso no se lleva a cabo (Phan *et al.*, 2013).

8.3.3.1 Gen *kpsMT II* (K-antigen).

La prevalencia obtenida para el gen *KpsMT II* fue del 91.7% (n=178; Tabla 4; Figura 5; Fotografía 5); Este porcentaje es mayor al reportado por múltiples trabajos: Abe *et al.*, (2008) reportaron una prevalencia de 51.5% (n=116) de un total de 225 cepas UPEC de un hospital de Sao Paulo, Brazil; Por otro lado Johnson & Stell, (2000) reportaron una prevalencia del 63% (n=47) de un total de 75 cepas de pacientes con urosepsis realizado en Seattle, USA; Resultados menores son los reportados por Agarwal *et al.*, (2013) y Momtaz *et al.*, (2013) quienes reportaron frecuencias de 42% (n=72) de un total de 172 cepas de pacientes con cistitis y 4% (n=5) de un total de 123 cepas UPEC de hospitales de la India e Irán respectivamente; Además, en un trabajo realizado en Korea reportaron la prevalencia de 61.6% (n=85) y 26.8% (n=37) para el gen *KpsMT II* de dos grupos de diferentes regiones del país (138 cepas UPEC para cada grupo; Ui-Yoon Choi *et al.*, 2012); Con estos resultados se puede inferir que la ubicación geográfica es un determinante muy importante en la distribución de los factores de virulencia que presentan las cepas de *E. coli* Uropatogenas.

8.3.3.2 Gen *pic* (protein involved in the intestinal colonization).

En el presente trabajo el gen *pic* que está involucrado en la evasión de la respuesta inmune y que junto con los genes *sap* y *sigA* conforman una región genética denominada islas de patogenicidad (PAI) se encontró en el 2.5% (n=5; Tabla 4; Figura 5; Fotografía 6) de las cepas UPEC; Este porcentaje es menor a lo descrito por diversos autores: Abe *et al.*, (2008) y Momtaz *et al.*, (2013) reportaron la prevalencia del gen *pic* en un 13.8% (n=31) de un total de 225 cepas UPEC y 13% (n=16) de un total de 123 cepas UPEC de hospitales de Sao Paulo, Brazil y Tehran, Irán respectivamente; Ewers *et al.*, (2007) reportaron una frecuencia de 32% (n=21) de un total de 65 cepas UPEC obtenidas de diversos hospitales en Alemania; Además, en un trabajo realizado en Baltimore, USA se reportó la prevalencia en un 31% (n=21) de un total de 67 cepas clínicas de pacientes con cistitis y/o pielonefritis (Heimer *et al.*, 2004); Por otro lado, Soto *et al.*, (2009) reportaron la presencia de una PAI en cepas UPEC de un hospital de Barcelona, España; Esto es importante ya que el gen *pic* forma parte de los elementos genéticos móviles involucrados en las Islas de Patogenicidad (PAIs) y que posiblemente están relacionadas con UTIs y patologías más severas como cistitis y/o pielonefritis.

8.3.3.3 Gen *OmpT* (the outer membrane protease T).

El gen *OmpT* se encontró en el 10.3% (n=20; Tabla 4; Figura 5; Fotografía 7) de las cepas UPEC analizadas; resultados similares son los descritos por Momtaz *et al.*, (2013) y Van *et al.*, (2008) quienes reportaron una prevalencia de 4.8% (n=6) de un total de 123 cepas UPEC y 10% (n=18) de un total de 180 cepas ExPEC de un hospital de Tehran, Irán y de Mariscos de Vietnam respectivamente; El resultado reportado en el presente trabajo (10.3%; n=20) es menor a lo reportado por diversos autores: En un trabajo realizado en Alemania reportaron la prevalencia para el gen *OmpT* con un 92% (n=60) de un total de 65 cepas UPEC (Ewers *et al.*, 2007); Similar resultado es el reportado por Kanamaru *et al.*, 2003 quienes reportaron una frecuencia del 90% (n=339) de un total de 377 cepas de

pacientes UTIs de diversos hospitales de la región de Osaka, Japón; La baja prevalencia obtenida en el presente trabajo (10.3%; n=20) posiblemente se deba a la alta prevalencia de gen *KpsMT II* (91.7%; n=178) debido a que al parecer la prevalencia de uno disminuye consecuentemente la prevalencia del otro, la función que desempeñan estos genes al expresarse es similar y esto probablemente determine la alta prevalencia de uno u otro en las cepas UPEC.

8.3.3.4 Gen *sap* (sensitive to antimicrobial peptide).

El gen *sap* que junto con los genes *pic* y *sigA* conforman una región genética denominada islas de patogenicidad (PAI) se encontró en el 1.5% (n=3; Tabla 4; Figura 5; Fotografía 8) de las cepas UPEC; Momtaz *et al.*, (2013) reportaron una prevalencia mayor para el gen *sap* de 26% (n=32) de un total de 123 cepas UPEC de un hospital de Tehran, Irán; Por otro lado Farzaneh *et al.*, (2014) y Sabaté *et al.*, (2006) reportaron para PAI frecuencias de 54% (n=81) de un total de 150 cepas aisladas de pacientes con cistitis y/o pielonefritis y 93% (n=93) de un total de 100 cepas UPEC de hospitales de Kashan, Irán y Barcelona, España respectivamente; Soto *et al.*, 2009 reportaron la presencia de una PAI en cepas UPEC de un hospital de Barcelona, España; El gen *sap* posiblemente está relacionado con patologías más severas como cistitis y/o pielonefritis.

8.3.3.5 Gen *SigA* (factor sigma A).

En el presente trabajo el gen *sigA* que está involucrado en la evasión de la respuesta inmune y que junto con los genes *sap* y *pic* conforman una región genética denominada islas de patogenicidad (PAI) se encontró en el 4.1% (n=8; Tabla 4; Figura 5; Fotografía 9) de las cepas UPEC; Momtaz *et al.*, (2013) reportaron una prevalencia mayor para el gen *sigA* de 21.2% (n=26) de un total de 123 cepas UPEC de un hospital de Tehran, Irán; Mientras que Soto *et al.*, (2009) reportaron la presencia de una PAI en cepas UPEC de un hospital de Barcelona, España; *sigA* forma parte de los elementos genéticos móviles involucrados en las Islas de Patogenicidad (PAIs) y que de acuerdo a las prevalencias obtenidas para

estos genes en el presente trabajo (4.1% n=8, 1.5% n=3 y 2.5% n=5) se puede inferir que la región PAI se encuentra mínimamente en las cepas UPEC mexicanas.

8.3.3.6 Gen *iss* (increased serum survival protein).

La frecuencia para *iss* en las cepas UPEC analizadas fue de 4.6% (n=9; Tabla 4; Figura 5; Fotografía 10); Resultados similares son los reportados por Momtaz *et al.*, (2013) y Van *et al.*, (2008) quienes reportaron frecuencias de 8.1% (n=10) de un total de 123 cepas UPEC y 5% (n=9) de un total de 180 cepas ExPEC de un hospital de Tehran, Irán y de Mariscos de Vietnam respectivamente; Ewers *et al.*, (2007) y Maluta *et al.*, (2014) reportaron prevalencias mayores a las reportadas en el presente trabajo, 25% (n=16) de un total de 65 cepas UPEC obtenidas de diversos hospitales en Alemania y 30% (n=16) de un total de 53 cepas UPEC de hospitales de Campinas, Brazil respectivamente; En un trabajo realizado en Beijín, China se describió la prevalencia para el gen *iss* de un 13% (n=5) de un total de 39 cepas de pacientes con infecciones en las vías urinarias (Luo *et al.*, 2012). La mayoría de los factores de virulencia que generan la supervivencia en suero (Incluyendo *iss*) están relacionados con la biosíntesis de LPS (lipopolisacáridos; Phan *et al.*, 2013), la supervivencia en suero está asociada a ciertos antígenos-O frecuentemente encontrados en las cepas UPEC (Jacobson *et al.*, 1992).

8.3.4 Toxinas.

Las toxinas contribuyen a que UPEC pueda esparcirse dentro de los tejidos después de irrumpir en las células; Para obtener acceso a los nutrientes dentro de las células del hospedero o para destruir las células efectoras del sistema inmune y así evadir su potencial actividad bactericida. La actividad tóxica sin embargo, resulta en una fuerte reacción inflamatoria provocando generalmente necrosis de células tisulares (Lüthje & Brauner, 2014).

Todos los genotipos que codifican para toxinas están extensamente distribuidos y son preferentemente encontrados entre las cepas UPEC (Parham *et al.*, 2005),

además la presencia de marcadores de virulencia específicos han sido identificados como un fuerte parámetro para una elevada virulencia en cepas UPEC (Spurbeck *et al.*, 2012). La mayoría de las toxinas son expresadas durante las UTIs en modelos animales, pero aún no ha sido demostrado contundentemente en humanos (Guyer *et al.*, 2000).

8.3.4.1 Gen *usp* (uropathogenic specific protein).

En el presente trabajo el gen *usp* que codifica para una citotoxina se encontró en el 87.1% (n=169; Tabla 4; Figura 5; Fotografía 11) de las cepas UPEC; Este porcentaje es similar a lo reportado por Kanamaru *et al.*, (2003) y Ejrnaes *et al.*, (2011) quienes reportaron frecuencias de 84.9% (n=320) de un total de 377 cepas de pacientes con infecciones en las vías urinarias y 98% (n=152) de un total de 155 cepas de pacientes UTIs de un hospital de Osaka, Japón y de un hospital de Suecia respectivamente; Por el contrario, en un trabajo realizado en Tehran, Iran reportaron una prevalencia de tan solo 1.6% (n=2) para el gen *usp* de un total de 123 cepas UPEC (Momtaz *et al.*, 2013). Yamamoto *et al.*, (2001) realizaron un estudio en Japón con 194 cepas de pacientes con cistitis, 76 cepas de pacientes con pielonefritis y 107 cepas de pacientes con prostatitis, todas de cepas UPEC de mujeres con catéteres; Obtuvieron prevalencias de 79.4% (n=154), 93.4% (n=71) y 88% (n=94) respectivamente. El gen *usp* es específico de las cepas UPEC que están estrechamente relacionadas con las UTIs durante la fase tardía de la infección, por lo que la alta prevalencia reportada en este trabajo coincide con la mayoría de los resultados reportados en trabajos previos.

8.3.4.2 Gen *vat* (vacuolating autotransporter toxin).

La frecuencia para *vat* en las cepas UPEC analizadas fue de 5.6% (n=11; Tabla 4; Figura 5; Fotografía 12); Momtaz *et al.*, (2013) reportaron una prevalencia mayor (9.7%; n=12) de un total de 123 cepas UPEC de un hospital de Tehran, Iran; Ewers *et al.*, (2007) realizaron un estudio con 65 cepas UPEC aisladas de pacientes en un hospital de Alemania donde reportaron la prevalencia de un

54.5% (n=35) para este gen. La presencia del gen *vat* ha sido identificado como un indicador para predecir la alta virulencia en cepas UPEC (Spurbeck *et al.*, 2007).

8.3.4.3 Gen *cva* (colicin V plasmid operon gen).

La frecuencia para *cva* en las cepas UPEC analizadas fue de 4.6% (n=9; Tabla 4; Figura 5; Fotografía 13); Momtaz *et al.*, (2013) reportaron una prevalencia similar (4.8%; n=6) de un total de 123 cepas UPEC de un hospital de Tehran, Iran. La frecuencia obtenida para el gen *cva* es menor a lo reportado por otros autores: En un trabajo realizado en Seattle, USA reportaron una frecuencia de 15% (n=11) de un total de 75 cepas de pacientes con urosepsis (Johnson & Stell, 20010); Mientras que en un trabajo realizado en Alemania reportaron una frecuencia de 12% (n=8) de un total de 65 cepas UPEC (Ewers *et al.*, 2007); Por otro lado en Beijín, China reportaron una frecuencia de un 10% (n=4) de un total de 39 cepas de pacientes con infecciones en las vías urinarias (Luo *et al.*, 2012); Maluta *et al.*, (2014) reportaron una prevalencia de 20% (n=11) de un total de 53 cepas UPEC de hospitales de Campinas, Brazil. La proteína que es traducida a partir de este gen una vez que es liberada en el ambiente del hospedero ayuda a reducir la competencia por nutrientes con otras cepas bacterianas (Feldgarden & Riley, 1999).

8.3.4.4 Gen *astA* (EnteroAggregative heat Stable Toxin).

El gen *astA* que codifica para una enterotoxina se encontró en el 33.5% (n=65; Tabla 4; Figura 5; Fotografía 14) de las cepas UPEC analizadas; Similar porcentaje fue lo reportado por Momtaz *et al.*, (2013) con un 21.1% (n=26) de un total de 123 cepas UPEC de un hospital de Tehran, Iran. El porcentaje obtenido para el gen *astA* es mayor a los porcentajes reportados por otros autores: En un trabajo realizado en Sao Paulo, Brazil reportaron una prevalencia del 7.1% (n=16) del gen *astA* de un total de 225 cepas UPEC (Abe *et al.*, 2008); En Barcelona, España se llevó a cabo un trabajo con 170 cepas UPEC donde obtuvieron una

prevalencia del 8% (n=14; Soto *et al.*, 2009); Mientras que en un trabajo realizado en Campinas, Brazil reportaron una frecuencia de 9.4% (n=5) de un total de 53 cepas de pacientes con infecciones en las vías urinarias (Maluta *et al.*, 2014); Por otro lado, la presencia del gen *astA* en *Escherichia coli* Enterotoxigénica (ETEC) es muy elevada tal como lo reporta Boerlin *et al.*, (2005) con una prevalencia de 98% (n=312) en 318 cepas ETEC; La relación entre cepas ETEC y cepas UPEC se debe a la transferencia horizontal de material genético, el gen *astA* codifica para una enterotoxina por lo que la adquisición de esta toxina por parte de las cepas UPEC se debe posiblemente a este intercambio genético.

8.3.4.5 Gen *sen* (ShET-2 toxin).

El gen *sen* que codifica una enterotoxina propia de la bacteria shigella no fue posible identificarla (0%; n=0) en ninguna de las cepas UPEC analizadas; (Tabla 4; Figura 5; Fotografía 15); Este porcentaje es el mismo a lo obtenido por Momtaz *et al.*, (2013) y Soto *et al.*, (2009) quienes reportaron la ausencia del gen *sen* (0%; n=0) de un total de 123 cepas UPEC de un hospital de Tehran, Iran y de un total de 170 cepas UPEC de un hospital de Barcelona, España respectivamente; Por otro lado se reporta la prevalencia del 10% (n=17) para el gen *sen* de un total de 174 aislados de sangre de pacientes con Bacteriemia en un estudio realizado en Barcelona, España (Telli *et al.*, 2010), mientras que Momtaz *et al.*, (2013) reportaron una prevalencia del 79.6% (n=97) para el gen *set* que codifica la enterotoxina *shet-1* de shigella por lo que la prevalencia de la toxina *shet-1* en cepas UPEC es alta, sin embargo, la prevalencia de la toxina *shet-2* que es codificada por el gen *sen* en cepas UPEC ha sido nula (0%; n=0).

8.4 Patrones de asociación de los genes de virulencia en las cepas UPEC.

En este estudio se identificaron 50 patrones de asociación de los diferentes marcadores de virulencia entre las cepas UPEC analizadas (Tabla 5). El patrón más prevalente (23.19%; n=45) fue el que involucra a los genes *KpsMT II*, *usp*, *irp2* e *iha*, esto concuerda con lo reportado por Bauer *et al.*, (2002) quienes

reportaron una alta asociación entre el gen *KpsMT II* y el gen *usp* en un estudio llevado a cabo en USA con un total de 924 cepas de pacientes UTIs; Por otro lado los genes que prevalecieron entre los patrones más frecuentes fueron *KpsMT II*, *usp*, *irp2* e *iha*; Esto concuerda con lo reportado por Abe *et al.*, (2008) y Johnson *et al.*, (2000) quienes reportaron la asociación entre los genes *irp2* e *iha* de un total de 225 cepas UPEC de pacientes de un hospital de Sao Paulo, Brazil y de un total de 67 cepas de pacientes con urosepsis respectivamente; También en concordancia a los resultados reportados en este trabajo en un trabajo realizado en Osaka, Japón reportaron una alta asociación entre los genes *usp* y *KpsMT II* de un total de 377 cepas de pacientes UTIs (Kanamaru *et al.*, 2003); Por el contrario, en este trabajo no se reportó la asociación de los genes *pic* y *tsh* como lo reporta Heimer *et al.*, (2004) en un grupo de 67 cepas UPEC en un hospital de Baltimore, USA.

Los resultados anteriormente discutidos reflejan que posiblemente las cepas UPEC podrían presentar diferentes perfiles de expresión durante la patogénesis de las infecciones en vías urinarias que están directamente relacionados a los patrones de asociación de marcadores de virulencia, por lo que la alta prevalencia y asociación de múltiples marcadores genéticos en las cepas portadoras aunados a la resistencia a antibióticos podrían ocasionar infecciones más severas como cistitis y/o pielonefritis.

9. CONCLUSIONES

- I. Se identificaron 13 genes que codifican para diferentes factores de virulencia en las cepas de *E. coli*; Estos resultados revelan una elevada prevalencia de cepas UPEC en las infecciones en las vías urinarias de los pacientes estudiados.

- II. Los genes identificados con mayor frecuencia en las cepas de *E. coli* fueron *KpsMT II*, *usp* e *irp2*, mientras que los genes menos frecuentes fueron *sap*, *pic* y *sigA*; El gen *sen* no fue determinado en ninguna cepa de *E. coli*.

- III. Las cepas UPEC presentaron 50 patrones distintos de asociación de los genes de virulencia: El patrón con la más alta prevalencia fue *KpsMT/usp/irp2/ iha*.

- IV. No se determinó la presencia de la isla de patogenicidad (PAI) en las cepas de *E. coli* debido a la ínfima prevalencia de los genes *sap*, *pic* y *sigA*.

- V. La asociación colectiva de estos genes de virulencia durante la patogénesis de las infecciones en el tracto urinario en los pacientes posiblemente podría desencadenar patologías más severas como cistitis y/o pielonefritis.

10. LITERATURA CITADA

1. Abe CM, Salvador FA, Falsetti IN, Vieira AM, Blanco J, Blanco JE, Blanco M, Machado AM, Elías WP, Hernandez RT, Gomez AT. 2008. Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) strains may carry virulence properties of diarrhoeagenic *E. coli*. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 52: 397-406.
2. Abelson Storby K, Osterlund A, Kahlmeter G. 2004. Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* in urine samples from children and adults: a 12 year analysis. *Acta Paediatr*. 93: 487-491.
3. 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.
4. Anderson GG, Palermo JJ, Schilling JD, Roth R, Heuser J, Hultgren SJ. 2003. Intracellular bacterial biofilm-like pods in urinary tract infections. *Science*. 301:105–107.
5. Bahrani-Mougeot F, Gunther NW, Donnenberg MS, Donnenberg MS, Mobley HLT. 2002. Uropathogenic *Escherichia Coli*: Virulence Mechanisms of a Versatile Pathogen. *Ed. Elsevier Science Inc*. 239-259.
6. Bauer RJ, Foxman B, Jantunen ME, Marrs CF, Saxen H, Siitonen A, Zhang L. 2002. Molecular Epidemiology of 3 Putative Virulence Genes for *Escherichia coli* Urinary Tract Infection, *usp*, *iha*, and *iroN*. *J Infect Dis*; 185:1521–1524.
7. Bidet P, Mahjoub-Messai F, Blanco J, Blanco J, Dehem M, Aujard Y, Bingen E, Bonacorsi S. 2007. Combined multilocus sequence typing and O serogrouping distinguishes *Escherichia coli* subtypes associated with infant urosepsis and/or meningitis. *J Infect Dis*; 196:297–303.
8. Blanco M, Blanco JE, Alonso MP, Blanco J. 1996. Virulence factors and O groups of *Escherichia coli* isolates from patients with acute pyelonephritis, cystitis and asymptomatic bacteriuria. *Eur J Epidemiol*; 12:191–198.
9. Blanco J, Blanco M, Blanco JE, Mora A, Alonso MP, González EA, Bernárdez MI. 2002. Enterobacterias: características generales. Género *Escherichia*. *Manual de Microbiología Veterinaria, Vadillo, Eds. McGraw-Hill Interamericana*. Barcelona, España: 301-325.
10. Boerlin P, Travis R, Gyles CL, Reid-Smith R, Janecko N, Lim H, Nicholson V, McEwen VA, Friendship R, Archambault M. 2005. Antimicrobial resistance and

- virulence genes of *Escherichia Coli* isolates from swine in Ontario. *Appl Environ Microbiol.* 71: 6753-6761.
11. Bower JM, Eto DS, Mulvey MA. 2006. Covert operations of uropathogenic *Escherichia coli* within the urinary tract. *Traffic.* 6:18–31.
 12. Calderón-Jaimes E, Casanova-Román G, Galindo A, Gutiérrez P, Landa S, Moreno S, Rodríguez F, Simón L, Valdez R. 2013. Diagnóstico y tratamiento de las infecciones en vías urinarias: un enfoque multidisciplinario para casos no complicados. *Boletín médico del hospital infantil de México.* 70: 3-10.
 13. Chromek M & Brauner A. 2008. Antimicrobial mechanisms of the urinary tract. *J Mol Med (Berl).* 86: 37-47.
 14. Diacovich L & Gorvel JP. 2010. Bacterial manipulation of innate immunity to promote infection. *Nat Rev Microbiol.* 8: 117-128.
 15. Donnenberg MS. 2002. *Escherichia Coli*: Virulence Mechanisms of a Versatile Pathogen. *Elsevier Science Inc.* 1: 401-413.
 16. Eiros Bouza JM, Ochoa C. 2007. Artículos especiales. Perfil etiológico de las infecciones urinarias y patrón de sensibilidad de los uropatógenos. *An Pediatr (Barc).* Nov. 67:461-8.
 17. Ejrnaes K, Stegger M, Reisner A, Ferry S, Monsen T, Holm SE. 2011. Characteristics of *Escherichia coli* causing persistence or relapse of urinary tract infection: Phylogenetic groups, virulence factors and biofilm formation. *Virulence.* 2: 528-537.
 18. Eto DS, Jones TA, Sundsbak JL, Mulvey MA. 2007. Integrin-Mediated Host Cell Invasion by Type 1-Piliated Uropathogenic *Escherichia coli*. *PLoS Pathog.* 3: 80-100.
 19. Ewers C, JanBen T, KieBling S, Philipp HC, WielerLH. 2005. Rapid detection of virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *Avian Dis.* 49: 269-273.
 20. Ewers C, Li G, Wilking H, Kiebling S, Alt K, Antáo EM, Laturus C, Diehl I, Glodde S, Homeier T, Bohnke U, Steinruck H, Philipp HC, Wieler H. 2007. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: How closely related are they? *Int J Med Microbiol.* 297: 163-176.
 21. Farzaneh F, Saffari M, Neamati F, Zibaei M. 2014. Detection of virulence genes in *Escherichia coli* isolated from patients with cystitis and pyelonephritis. *Int J Infect Dis.* 29: 219-222.

22. Feldgarden M, Riley MA. 1999. The phenotypic and fitness effects of colicin resistance in *Escherichia coli* K-12. *Evolution*. 53: 1019-1027.
23. Finlay BB & McFadden G. 2006. Anti-immunology: Evasion of the host immune system by bacterial and viral pathogens. *Cell*. 124: 7670-7682.
24. Foxman B. 2003. Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. *Dis Mon*. 49: 53-70.
25. Gal-Mor O, Finlay BB. 2006. Pathogenicity islands: a molecular toolbox for bacterial virulence. *Cell Microbiol*. 8:1707–1719.
26. Goldraich NP, Manfroi A. 2002. Febrile urinary tract infection: *Escherichia coli* susceptibility to oral antimicrobials. *Pediatr Nephrol*. 17:173-176.
27. Guyer DM, Henderson IR, Nataro JP, Mobley HL. 2000. Identification of sat, an autotransporter toxin produced by uropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*. 38: 54-66.
28. Hacker J, Kaper JB. 2000. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu Rev Microbiol*. 54:641–679.
29. Hagan EC, Lloyd AL, Rasko DA, Faerber GJ & Mobley HL. 2010. *Escherichia coli* global gene expression in urine from women with urinary tract infection. *PLoS Pathogens*. 38: 53-66.
30. Heimer SR, Rasko DA, Lockett CV, Johnson DE, Mobley HLT. 2004. Autotransporter genes *pic* and *ths* are associated with *Escherichia coli* strains that cause acute pyelonephritis and are expressed during urinary tract infection. *Inf and Immun*. 72: 593-597.
31. Hooton TM. 2003. The current management strategies for community-acquired urinary tract infection. *Infect Dis Clin North Am*. 17: 303 -32.
32. Janda J, Abbott S. 2007. 16S rRNA Gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory pluses, perils and pitfalls. *J Clin Microbiol*: 45: 2761-2764.
33. Jacobson SH, Ostenson CG, Tullus K, Brauner A.1992. Serum residence in *Escherichia coli* strains causing acute pyelonephritis and bacteraemia. *APMIS*. 100: 147-153.
34. Jawetz ME, Melnick JL, Adelberg EA, Brooks GF, Butel JS, Ornston LN, 1990. Microbiología Médica, 13 ed., Ed. *El manual moderno*, México D.F. 188-194, 142-173.

35. Johnson JR, Delavari P. 2002. Concurrent fecal colonization with extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in a homosexual man with recurrent urinary tract infection and in his male sex partner. *Clin Infect.* 35: E65–E68.
36. Johnson JR, Stell AL. 2000. Extended virulence genotypes of *Escherichia Coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *J Infect Dis.* 181:261-272.
37. (B) Johnson JR, Russo TA, Tarr PI, Carlino U, Bilge SS, Vary JC, Stell LA. 2000. Molecular Epidemiological and Phylogenetic Associations of Two Novel Putative Virulence Genes, *iha* and *iroNE*. Among *Escherichia coli* Isolates from Patients with Urosepsis. *Infect Immun.* 68: 3040-3047.
38. Johnson JR. 2002. Evolution of pathogenic *Escherichia coli* Virulence mechanisms of a versatile pathogen. *Ed. Elsevier Science Inc.* 1: 55-77.
39. Johnson JR, Kuskowski MA, O'bryan TT, Colodner R, Raz R. 2005a. 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.* 49:26–31.
40. Justice SS, Hung C, Theriot JA, Fletcher DA, Anderson GG, Footer MJ. 2004. Differentiation and developmental pathways of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract pathogenesis. *Proct Natl Acad Sci USA.* 101: 1333-1338.
41. Kanamaru S, Kurazono H, Ishitoya S, Terai A, Habuchi T, Nakano M, Ogawa O, Yamamoto S. 2003. Distribution and genetic association of putative uropathogenic virulence factors ironN, iha, kpsMT, ompT and usp in *Escherichia Coli* isolated from urinary tract infections in japan. *J Urol.* 170: 2490-2493.
42. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol.* 2:123–140.
43. Karimian A, Momtaz H, Mahbobe M. 2012. Detection of uropathogenic *Escherichia Coli* virulence factors in patients with urinary tract infections in Iran. *Afr J Microbiol Res,* 6: 6811-6816.
44. Kenndy TL. 1996. Renal Diseases. En: Dworkin PH, editor. *Pediatrics. USA: Williams & Wilkins.* pp. 419-454.
45. Lambris JD, Ricklin D & Geisbrecht BV. 2008. Complement evasion by human pathogens. *Nat Rev Microbiol.* 6: 132-142.

46. Lane DJ, Pace B, Olsen GJ, Stahl DA, Sogin MI, Pace NR. 1985. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82: 6955-6959.
47. Levine, MN. 1987. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J Infect Dis.* 155: 377-389.
48. Lèviellè S, Caza M, Johnson JR, Clabots C, Sabri M, Dozois CM. 2006. *Iha* from an *Escherichia coli* urinary tract infection outbreak clonal group a strain is expressed in vivo in the mouse urinary tract and functions as a catecholate siderophore receptor. *Infect Immun.* 74: 3427-3436.
49. Liu B, Knirel YA, Feng L, Perepelov AV, Senchenkova SN, Wang Q, Reeves PR, Wang L. 2008. Structure and genetics of *Shigella* O antigens. *FEMS Microbiol. Rev.* 32: 627–653.
50. Llosa, M., De la Cruz, F. 2005. Bacterial Conjugation: a potential Tool for Genomic engineering. *Res Microbiol.* 156: 1-6.
51. Lloyd AL, Rasko DA, Mobley HL. 2007. Defining genomic islands and uropathogen-specific genes in uropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 189: 3532–3546.
52. Luo Y, Ma Y, Zhao Q, Wang L, Guo L, Ye L. 2012. Similarity and divergence of phylogenies, antimicrobial susceptibilities, and virulence factors profiles of *Escherichia coli* isolates causing recurrent urinary tract infections that persist or result from reinfection. *J Clin Microbiol.* 50: 4002-4007.
53. Lüthje P & Brauner A. 2014. Virulence factors of Uropathogenic *E. coli* and their interaction with the host. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 65: 338-357.
54. Maluta RP, Logue CM, Tiba RM, Meng T, Lopes EA, Galvao CT, Montelli AC, Sadatsune T, Carvalho M, Nolan LK, Dias W. 2014. Overlapped sequence types (STs) and serogroups of avian pathogenic (APEC) and human extra intestinal pathogenic (ExPEC) *Escherichia coli* isolated in Brazil. *PLoS One.* 9: e105016.
55. Manges AR, James R, Johnson RD, Besty-Foxman D, O`Brian T, Fullerton E, Riley W. 2001. Wide spread distribution of urinary tract infections caused by a multidrug-resistant *Escherichia coli* clonal group. *N Engl J Med.* 345:1007–1013.
56. 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.

57. Meylan E, Tschopp J & Karin M. 2006. Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature*. 7098: 39-44.
58. Mulvey MA, Schilling JD, Hultgren SJ. 2001. Establishment of a persistent *Escherichia coli* reservoir during the acute phase of a bladder infection. *Infect Immun*. 69: 4572–4579.
59. Murray PR, Rosenthal KS & Pfaller MA. 2009. Microbiología Médica. 6ta Ed. Elsevier Mosby.
60. Otto BR, Van-Dooren JM, Nuijens JH, Luirink J, Oudega B. 1998. Characterization of a hemoglobin protease secreted by the pathogenic *Escherichia coli* strain. *J Exp. Med*. 188: 1091-1103.
61. Pallen MJ & Wren BW. 2007. Bacterial pathogenomics. *Nature*. 449: 835-842.
62. Paniagua GL, Monroy-Pérez E, Vaca S. 2007. PCR Manual de identificación de *Escherichia Coli* y *Salmonella spp* en materia fecal. Universidad Nacional Autónoma de México. p. 43-70.
63. Parham NJ, Pollar SJ, Desvaux M, Scott-Turker A, Liu C, Fivian A. 2005. Distribution of the serine protease of the autotransporters of the Enterobacteraceae among Extraintestinal clinical isolates of *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol*. 43: 4076-4082.
64. Phan MD, Peters KM, Sarkar S, Lukowski SW, Allsopp LP, Gomes-Moriel D. 2013. The serum resistome of a globally disseminated multidrug resistant uropathogenic *Escherichia coli* clone. *PLoS Genetics*. 9: e1003834.
65. Rosen DA, Hooton TM, Stamm WE, Humphrey PA, Hultgren SJ. 2007. Detection of intracellular bacterial communities in human urinary tract infection. *PLoS Med*; 4: e329.
66. Sabaté M, Moreno E, Pérez T, Andreu A, Prats G. 2006. Pathogenicity island markers in commensal and uropathogenic *Escherichia coli* isolates. *Clin and Microbiol Infect*. 12: 880-886.
67. 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.
68. Samuelsson P, Hang L, Wullt B, Irjala H & Svanborg C. 2004. Toll-likereceptor 4 expression and cytokine responses in the human urinary tract mucosa. *Infect Immun*. 72: 3179-3186.

69. Sánchez C. 2011. Bacterial pathogenesis: The importance of first impressions. *Nat rev Microbiol.* 8:117-128.
70. Scheutz F, Strockbine NA. Genus I. 2005. *Escherichia* Castellani and Chalmers. Bergey's Manual of systematic bacteriology. Second edition, volume two. Garrity GM, Ed., Bergey's Manual Trust USA, 607-624.
71. Schmiemann G, Kniehl E, Gebhardt K, Matejczyk MM, Hummers-Pradier E. 2010. The diagnosis of urinary tract infection: a systematic review. *Dtsch Arztebl Int.* 107: 361-7.
72. Smith JL, Fratamico PM, Gunther NW. 2008. Extraintestinal pathogenic *Escherichia Coli*. *Foodborne Pathog Dis.* 4: 134-162.
73. Soto SM, Guiral E, Bosch J, Vila J. 2009. Prevalence of the *set-1B* and *astA* genes encoding enterotoxins in uropathogenic *Escherichia coli* clinical isolates. *Microb Pathog.* 47: 305-307.
74. Sousa CP. 2006. The versatile strategies of *Escherichia coli* pathotypes: a mini review. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis.* 12: 363-373.
75. Spurbeck RR, Dinh PC, Walk ST, Stapleton AE, Hooton TM, Nolan NK. 2012. *Escherichia coli* isolates that carry *vat*, *fyuA*, *chuA* and *ycfV* efficiently colonize the urinary tract. *Infect Immun.* 80: 4115-4122.
76. Svanborg C, Godaly G. 1997. Bacterial virulence in urinary tract infection. *Infect Dis Clin North Am.* 11: 513-529.
77. Telli M, Guiral E, Martinez JA, Almela M, Bosch J, Vila J, Soto SM. 2010. Prevalence of enterotoxins among *Escherichia coli* isolates causing bacteraemia. *FEMS Microbiol.* 306: 117-121.
78. Todar K. 2008. Pathogenic *E. coli*. Online textbook of bacteriology. <http://textbookofbacteriology.net/e.coli.html> USA.
79. Ui-Yoon Choi, Seung BH, Soo YL, Jin HK, Sun MK, Sang HM. 2012. Regional differences in phylogenetic group of *Escherichia coli* strains isolated from children with urinary tract infection in Korea. *IDSA.* Ontario, Canada. 21-24.
80. Van TTH, Chin J, Chapman T, Tran LT, Coloe PJ. 2008. Safety of raw meat and shellfish in Vietnam: An analysis of *Escherichia Coli* isolations for antibiotic resistance and virulence genes. *Int J Food Microbiol.* 124: 217-223.
81. Vila J, Soriano A, Mensa J. 2008. Bases moleculares de la adherencia microbiana sobre los materiales protésicos. Papel de las biocapas en las infecciones asociadas a los materiales protésicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 26: 48-55.

82. Welch RA, Burland V, Plunkett G, Redford P, Roesch P, Rasko D. 2002. Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *E. coli*. *Proc Nat Acad Sci. USA*. 99: 17020-17024.
83. Wiles TJ, Kulesus RR, Mulvey MA. 2007. Origins and Virulence Mechanisms of Uropathogenic *Escherichia coli*. *NIH*. 85: 2-20.
84. Wolska, K. I. 2003. Horizontal DNA Transfer Between bacteria in the Environment. *Acta Microbiol Pol*. 52: 233-243.
85. Wu HJ, Wang AH & Jennings MP. 2008. Discovery of virulence factors of pathogenic bacteria. *Cur Open Chem Biol*. 12: 93-101.
86. Wurpel DJ, Totsika M, Allsopp LP, Hartley-Tasell LE, Day C, Peters KM. 2013. Chaperone-user fimbriae of *Escherichia coli*. *PLoS One*. 8: e52835.
87. Yamamoto S, Nakano N, Terai A, Yuri K, Nakata K, Nair GB, Kurazono H, Ogawa O. 2001. The presence of the virulence island containing the *usp* gene in uropathogenic *Escherichia coli* is associated with urinary tract infection in an experimental mouse model. *J Uro*. 165: 1347-1351.
88. Yan F, Polk DB. 2004. Commensal bacteria in the gut: learning who our friends are. *Curr Opin Gastroenterol. PubMed*. 20: 565–571.
89. Zipfel PF, Wurzner R & Skerk C. 2007. Review. Complement evasion of pathogens: Common strategies are shared by diverse organisms. *Mol Immun*. 16: 3850-3857.