



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**IDENTIFICACIÓN DE GENES DE VIRULENCIA
DE *Escherichia coli* DE ORIGEN URINARIO**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LIC. EN BIOLOGÍA

PRESENTA:

VICENTE MENDOZA ANDREA

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. GLORIA LUZ PANIAGUA CONTRERAS

PROYECTO FINANCIADO POR LA DGAPA

UNAM, PAPIME PE203714

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México

Noviembre 2016





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.

NO DEBEMOS TENER MIEDO A EQUIVOCARNOS
HASTA LOS PLANETAS CHOCAN Y DEL CAOS
NACEN LAS ESTRELLAS

Charles Chaplin

Dedicatoria

- A mi hijo: Gracias por llegar en el momento adecuado para hacerme feliz, 2 años de aprendizaje, y de volver a estar sola nunca. Cuando tu naciste no fue como lo decían, no me quitaste mi futuro, me diste uno nuevo y mejor, por que tengo que esforzarme más para ser la mejor para ti, ser un ejemplo y ganarme tu respeto y admiración. Marcaste un camino, ese que no tiene otro propósito que la superación y el éxito. Gracias por hacerme crecer, amar verdaderamente; por darme tantas lecciones y enseñarme a ser mejor día a día, te amo mi amor, eres el mejor hijo que pude tener. Eres mi compañía en las buenas y mi bendición en las malas. y cada logro mío es también tuyo te amo tanto <3
- A mi madre Gracias por siempre estar a mi lado saber que puedo contar contigo en cualquier momento, y por hacerme ver mis equivocaciones, y ayudarme a ser mejor por Daniel y por mí. Eres mi gran ejemplo a seguir, eres la persona que admiro. Y por supuesto este logro también es tuyo te amo mucho mami
- A mi padre: Por el apoyo que me has brindado

- A mi hermano: Andres gracias por hacerme ver que todo pasa y después no pasa nada. Tienes razón la vida solo hay una y hay que dar lo máximo en ella.
- A mi chula: Mi hermana bonita gracias por siempre estar, por hacerme ver mis errores y sobre todo siempre tratar de entenderme y nunca juzgarme. te amo Mary
- A Mito: Gracias por tu apoyo, y por ser parte de mi vida.
- A Zay, Sol y : Gracias por siempre saberme escuchar y por sus consejos, por todos esos momentos vividos, las practicas de campo, los enojos y ante todo siempre juntas .
- A YazZz : Gracias por brindarme tu amistad desinteresadamente.
- A Chava: Gracias por tu amistad, y espero siempre poder contar contigo y tu conmigo

- A Bruno: Gracias por siempre contagiarme con tu alegría, optimismo y sobre todo por tu amistad
 - A Rogelio: Gracias por cada momento que compartiste conmigo, y te he de confesar que si algo me hace sentir feliz, es verte a ti, como cuando te conocí.
- 

Agradecimientos

- **A la Dra. Gloria Luz Paniagua Contreras** por todo el apoyo durante la elaboración de este proyecto que me ha hecho crecer profesionalmente, por las enseñanzas de vida que me deja y por ser una buena persona, gracias.
- **Al Dr. Eric Monroy Pérez** por todos sus consejos y siempre buena disposición. Fueron fundamentales para la realización de éste trabajo.
- **Al comité revisor de este trabajo:**

Dr. Sergio Vaca Pacheco

M. en C. David Segura Cobos

Biol. Susana González Almazán

por su ayuda y gran disposición, fueron esenciales para la elaboración de éste proyecto.

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

UNAM-DGAPA-PAPIIT IN218614



ÍNDICE

1. RESUMEN	8
2. INTRODUCCION	9
2.1 Características de Escherichia coli	9
2.2 Hábitat	10
2.3 Patologías causadas por Escherichia coli	10
2.4 Vía de transmisión de Escherichia coli	12
2.5 Determinación de serotipos en aislamientos E. coli	13
2.6 Factores de virulencia	14
2.7 Tratamiento	17
3. ANTECEDENTES	18
4. JUSTIFICACIÓN	20
5. OBJETIVOS	21
5.1 Objetivo General	21
5.2 Objetivos Particulares	21
6. MATERIALES Y MÉTODOS	22
6.1 Origen de las cepas.	22
6.2 Extracción del DNA por ebullición.	22
6.3 Identificación de Escherichia coli por PCR.	22
6.4 Detección de los genes de virulencia en las cepas de E. coli por PCR.	23
6.13 Análisis de los amplicones por electroforesis en geles de agarosa.	25
6.14 Análisis estadístico.	25
7. RESULTADOS	26
7.1 Pacientes analizados.	26
7.2 Edad de los pacientes analizados.	26
7.3 Diagnóstico de los pacientes analizados.	26
7.4 Identificación de E. coli por PCR de punto final.	27
7.6 Patrones de asociación de los genes de virulencia en las cepas clínicas de E. coli.	31
7.7 Análisis Estadístico	33
8. DISCUSIÓN	34
9. CONCLUSIONES.	39
10. LITERATURA CITADA	40

1. RESUMEN

Las cepas de *E. coli* uropatógenas (UPEC) son la principal causa de infecciones en el tracto urinario, incluyendo cistitis y pielonefritis. Las cepas UPEC actúan como patógenos intracelulares oportunistas favoreciendo la colonización del tracto urinario. *E. coli* uropatógena posee distintos genes de virulencia que incluyen sistemas de adquisición de hierro, adhesinas, protectinas y toxinas que contribuyen a potenciar la patogenicidad. El objetivo de este trabajo fue caracterizar molecularmente y correlacionar la presencia de genes que codifican para factores de virulencia en cepas clínicas de 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* Uropatógenas. Las cepas fueron identificadas por pruebas bioquímicas y por PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) mediante amplificación del gen rRNA. Los genes de virulencia se identificaron por PCR convencional. Los genotipos identificados con mayor frecuencia entre las cepas de *E. coli* fueron *iutA* (aerobactin siderophore receptor) 95.3%, *fimH* (type 1 fimbriae) 74%, *fyuA* (yersiniabactin siderophore receptor) 50% y *papC* (P fimbriae) 35%, Los genotipos con la menor prevalencia fueron: *malX* (PAI) (12.3%) y *focG* (F1C fimbriae) 4%. Los genes *cdtB* (cytolethal distending toxin), *fliC* (flagellin protein associated with the H7 antigen group) y *gafD* (G fimbriae) no fueron identificados en ninguna de las cepas de *E. coli*. Las cepas UPEC presentaron 29 patrones distintos de asociación. El patrón con la más alta prevalencia fue *iutA/fimH* (19.5%). La elevada frecuencia de asociación de los genes de virulencia detectados en las cepas de *E. coli*, refleja la virulencia de las bacterias para ocasionar patologías más severas como cistitis y/o pielonefritis.

2. INTRODUCCION

2.1 Características de *Escherichia coli*

Escherichia coli es una bacteria Gram negativa, que pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*, es anaerobia facultativa, crece en agar EMB (eosina y azul de metileno) formando colonias de 2 a 4 mm de diámetro, un centro grande de color negro, y tienen brillo verde metálico. En agar MacConkey crece como colonias de 2-3 mm de diámetro, de color rosado, suaves, redondas, lisas y con bordes regulares (Paniagua *et al.*, 2007).

Su tamaño promedio es de 0.5μ de un ancho por 3μ de largo, algunas especies de ésta familia son móviles ya que presentan flagelos peritricos, fermenta la glucosa y la lactosa son catalasa positivos, oxidasa negativos y reduce nitratos a nitritos. El género *Escherichia* incluye siete especies (*E. adecarboxylata*, *E. alberti*, *E. blattae*, *E. fergusonii*, *E. hermanni*, *E. vulneris* y *E.coli*) (Figura 1). *E. coli* es la única especie que posee significado clínico (Blanco *et al.*, 2002)

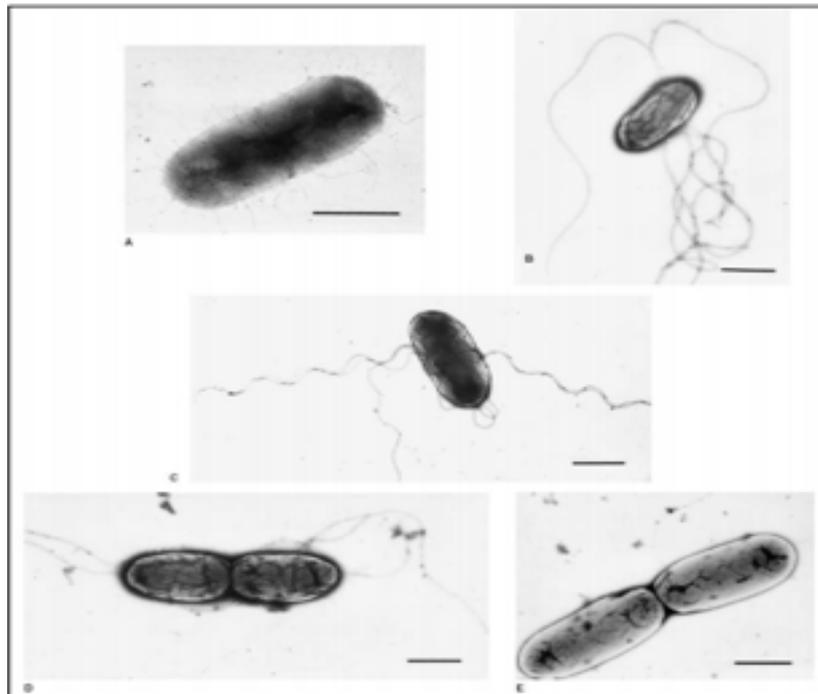


Figura 1. Fotomicrografía electrónica de *E. blattae* (A), *E. coli* (B), *E. fergusonii* (C), *E. Herrman* (D) y *E. vulneris* (E). Barra = $1 \mu\text{m}$ (tomado de: Scheutz y Strockbine, 2005).

El análisis de distintas reacciones bioquímicas puede ayudar en la diferenciación de las diferentes especies. Las principales pruebas fisiológicas que distinguen a *E. coli* de las demás especies son: Producción de indol, reacción negativa para citrato de Simmons, producción de lisina y fermentación de glucosa, lactosa y D-manitol (Scheutz y Strockbine, 2005).

2.2 Hábitat

Escherichia coli es una bacteria que posee la habilidad de colonizar y persistir en diferentes nichos, como el medio ambiente ya que es capaz de sobrevivir algunos días en el agua y en los alimentos, de manera que su aislamiento es un indicador de contaminación fecal.

También se puede encontrar principalmente en el intestino del hombre y de los animales, colonizando el canal alimenticio durante el primer día de vida. 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).

2.3 Patologías causadas por *Escherichia coli*

E. coli es una especie bacteriana ampliamente distribuida en el ambiente y en el intestino de mamíferos, se le considera un microorganismo de la microbiota normal, algunas cepas benefician a sus hospederos sintetizando cofactores y hasta lo protegen de la invasión por microorganismos patógenos; sin embargo, existen otros tipos patógenos para el hombre como son: *E. coli* enteropatógena (EPEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroinvasiva (EIEC), enterotoxigénica (ETEC) y enteroagregativa (EAEC), todos ellos involucrados en cuadros diarreicos importantes (Tabla 1) (Welch *et al.*, 2002). Las *E. coli* patógenas extraintestinales (ExPEC) son otro grupo variado de patógenos que están involucrados en el desarrollo de meningitis neonatal, sepsis y de infecciones del tracto urinario (Najar *et al.*, 2009; Foxman, 2010 & Krieger *et al.*, 2011).

Las cepas ExPEC difieren de las cepas comensales por la presencia de cierto grupo de genes de virulencia (Bonnet *et al.*, 2009). Genéticamente se consideran diferentes tanto, las cepas comensales como las cepas intestinales. Un requisito para presentar una infección por

ExPEC, es su adquisición y posterior colonización en sitios estériles del hospedero (vejiga, riñones, cavidad peritoneal, pulmones) (Rasko *et al.*, 2008).

Patotipos	EPEC	ETEC	EIEC	EHEC	EAEC
Edad afectada	Lactantes	Mayores de cinco años	Todas las edades	Todas las edades	Todas las edades
Tipo de diarrea	Secretora	Secretora	Inflamatoria	Inflamatoria	Persistente y aguda
Serotipos o serogrupos	O26:H11 O55:H6 O86:H34 O111:H2 O114:H O127:H9	O6:H11 O8:H9 O11:H27 O20:NM O25:H42 O78:H11	O28ac:NM O29:NM O112ac:NM O115:NM O124:H30	O26:H11 O45:H2 O111:H8 O121:H19 O157:H7	O44:H18 O55 O111 O125 O126 O128
Factores de virulencia	Adherencia localizada Adherencia íntima Esfacelamiento	Enterotoxinas ST Factores antigénicos de colonización	Invasividad	Citotoxinas similares a la toxina de shiga	Adherencia agregativa Toxinas Pet Sideróforos
Distribución geográfica	Distribución Mundial	Mundial	Países en vías de desarrollo	Mundial	Mundial
Codificación de virulencia	Plásmidos de 60 mDa genes <i>eae</i> cromosómicos	Plásmidos de 60 mDa	Plásmidos de 130 mDa	Fagos	Plásmidos de 60 mDa

Tabla 1. Características de los patotipos de *E. coli* diarrogénica para el humano

Los patotipos de origen extraintestinal se clasifican en cuatro grupos, *E. coli* asociada a meningitis (NMEC), *E. coli* asociada a septicemia (SEPEC), *E. coli* patógena aviar (APEC) y *E. coli* uropatógena (UPEC). UPEC es responsable de infecciones en el tracto urinario (UTIs), incluyendo cistitis y pielonefritis (Wiles *et al.*, 2007). Las infecciones del tracto urinario son una de las enfermedades infecciosas más frecuentes alrededor del mundo (Momtaz *et al.*, 2013), en donde el 40%-50% de las mujeres han tenido UTIs a lo largo de

sus vidas, ocasionando costos médicos substanciales y morbilidad en todo el mundo (Foxman, 2003).

La orina en los individuos sanos es estéril, frecuentemente es contaminada por comensales de la uretra anterior (Greenwood y Slack, 1982). La corta longitud de la uretra en la mujer permite que las bacterias que forman parte normal de la microbiota intestinal, colonicen la región anal y asciendan al área periuretral, uretra, vejiga y finalmente a los riñones (Franz y Hörl, 1999; Hooton, 2003). La defensa principal del hospedero contra la infección por bacterias es el flujo de orina a través de la uretra (Norris y Young, 2008). El tracto urinario también cuenta con otros mecanismos para prevenir la colonización, como respuesta inmune al antígeno fimbrial y el moco que actúa como una barrera a la adherencia (Kaper *et al.*, 2004).

Las cepas de *E. coli* uropatógenas actúan como patógenos intracelulares oportunistas, produciendo una biopelícula en el citoplasma de las células epiteliales del hospedero. La virulencia de UPEC se debe a los múltiples factores de virulencia que poseen, lo que les permite la adhesión y la colonización de otros sitios anatómicos. Entre los marcadores de virulencia se encuentran los que codifican para sistemas de adquisición de hierro, adhesinas, toxinas, y protectinas (Kaper *et al.*, 2004).

2.4 Vía de transmisión de *Escherichia coli*

Una posible vía de transmisión para cualquier bacteria que colonice el intestino, es por vía fecal-oral. Esta vía implicaría que las cepas de APEC colonicen el intestino del humano cuando este ingiere un alimento contaminado, las cepas APEC pueden emerger como cepas virulentas si hay un cambio en el ambiente en la inmunidad del hospedero causando posteriormente infección extraintestinal en el humano y mamíferos dando como resultado un riesgo potencial zoonótico (Figura 2) (Ewers *et al.*, 2009; Rofriguez-Siek *et al.*, 2005a).



Figura 2. Vía de contaminación con *E. coli* a través de la interacción entre animales, humanos, cultivos y medioambiente (tomado de Jeffrey Lejeune, 2008)

2.5 Determinación de serotipos en aislamientos *E. coli*

Las cepas de *E. coli* uropatógenas (UPEC) suelen diferir de otras cepas de *E. coli* que integran la flora fecal. En 1947 Kauffmann propuso una forma de diferenciar las cepas de *Escherichia coli* para determinar el grupo patógeno al que pertenecen con base en determinación de los antígenos superficiales O (somáticos), K (capsulares), H (flagelares) y F (fimbriales). En la actualidad se conocen 181 antígenos O. Con los que se define el serogrupo, la combinación específica O:H determina el serotipo (Blanco *et al.*, 2000) (Fig. 3), los serotipos pueden dividirse en dos grupos, (i) serotipos asociados a enfermedades diarreogénicas y (ii) serotipos de enfermedades extraintestinales (Orskov y Orskov, 1992).

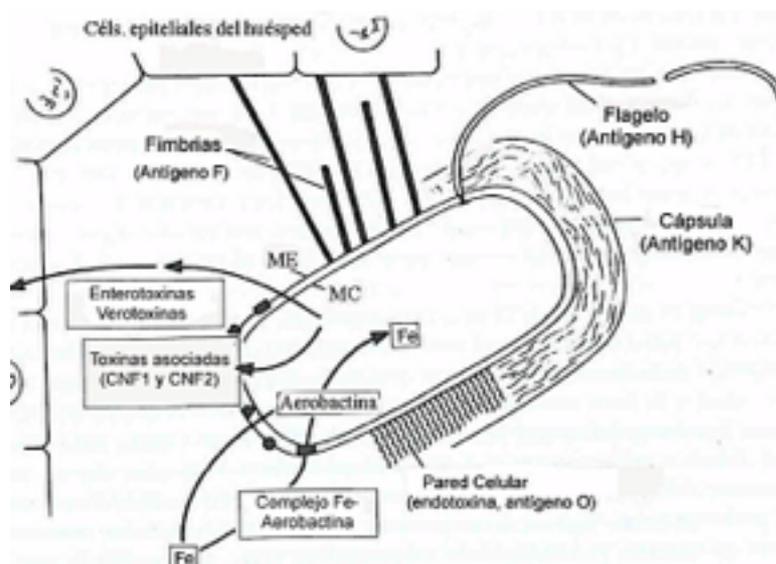


Figura 3. Esquema de *Escherichia coli* en el que se representan los principales antígenos de superficie (O, K, H y F) y algunos factores de virulencia (Tomado de Johnson, 1991).

2.6 Factores de virulencia

Las bacterias 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.(Weigel *et al.*, 2003 y Sánchez 2011). Debido a la eficiencia de esos mecanismos una bacteria puede ser poco virulenta o muy virulenta.Las bacterias han adquirido durante el proceso evolutivo características de virulencia que les permiten iniciar el proceso infeccioso en el hospedero mediante proteínas de adhesión expresadas en la superficie bacteriana (Meylan *et al.*, 2006). Después de la adhesión ocurre la colonización, la evasión de la respuesta inmune del hospedero y el daño tisular. Todos estos procesos permiten alcanzar el acceso a fuentes de nutrientes necesarios para su crecimiento y reproducción. Por lo que los factores de virulencia son favorecen el crecimiento y/o sobrevivencia durante la infección (Tortora *et al.*, 2007 y Wu *et al.*, 2008).

La adquisición de los factores de virulencia ocurre por elementos genéticos móviles que modifican los genomas de las bacterias patógenas por transferencia genética horizontal, la cual puede realizarse mediante tres procesos diferentes: transformación, transducción y conjugación.

El proceso de transformación ocurre por la introducción de DNA exógeno, generalmente de plásmidos en las bacterias, (Wolska, 2003).

Por otro lado la transducción se presenta por 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 replicativo del virus. Cuando el virus que contiene estos genes infecta a una nueva bacteria, éste tiene la capacidad de transferirlos al cromosoma de ésta (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 conjugativo se incorpora a la bacteria receptora (Llosa & De la Cruz, 2005).

La exitosa colonización de las UPEC en el tracto urinario depende de la expresión de múltiples factores de virulencia tales como: adhesinas (P y pili tipo 1), factores que evaden o revierten los mecanismos de defensa del hospedero (cápsula, lipopolisacáridos), mecanismos de captación de hierro (sideróforos) y toxinas (hemolisinas, factor necrotizante citotóxico1), entre otros (Tabla 1)(Russo y Johnson, 2003), adquiridos a través del intercambio horizontal de material genético, que muchas veces facilitan la unión de la bacteria al urotelio (Svanborg & Godaly, 1997).

La colonización de las vías urinarias por UPEC depende de su capacidad de unirse a las células y tejidos del huésped. La adherencia también estimula la entrada de la bacteria en las células del hospedero, un proceso que parece promover la supervivencia de las UPEC en el tracto urinario. La adhesión es uno de los principales factores de virulencia para la colonización, lo que le permite resistir el flujo de la orina para promover posteriormente la invasión de las células uroteliales (Bower *et al.*, 2006).

Los factores de adherencia primaria codificados por las UPEC, y muchos otros microorganismos, son organelos adhesivos, filamentosos, supramoleculares conocidos como pili o fimbrias. Los más comúnmente producidos por UPEC son el pili tipo 1, el tipo P, tipo S y F1C, codificados por los operones *fim*, *pap*, *sfa* y *foc*, respectivamente (Wiles *et al.*, 2008).

Las cepas UPEC han desarrollado múltiples estrategias para adquirir el hierro ya que este es un elemento fundamental para procesos biológicos como la respiración y división celular, a las bacterias patógenas les permite colonizar y establecerse en el hospedero. En el mamífero, el hierro se encuentra principalmente dentro de las células; su modulación y mantenimiento se lleva a cabo a partir de la absorción intestinal, posteriormente es transportado a diversos órganos para su absorción y utilización celular o puede ser almacenado en tres proteínas, transferrina (sangre), lactoferrina (fluidos secretores) y ferritina (dentro de las células) (Eisenstein y Blemings, 1998; Braun y Killmann, 1999). Un desbalance en la homeostasis del hierro en el hospedero se debe a la patogénesis de alguna enfermedad infecciosa. En el proceso de inflamación, el hospedero reduce el hierro disponible, no obstante, las bacterias han desarrollado mecanismos

para su adquisición a partir de las proteínas del hospedero transferrina, ferritina y grupo hemo por dos sistemas (Doherty, 1996). 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).

Es importante recalcar que incluso entre distintas cepas de UPEC existen diferencias en el repertorio y niveles de expresión de los factores de virulencia, estas diferencias pueden afectar el crecimiento bacteriano y la persistencia del microorganismo en el tracto urinario (Wiles *et al.*, 2008).

Factor de virulencia	Naturaleza/Función
<p>(<i>pap</i>) pilus associated with pyelonephritis (<i>sfa</i>) S fimbriae (<i>focG</i>) F1C fimbriae (<i>fimH</i>) type 1 fimbriae (<i>papC</i>) P fimbriae (<i>gafD</i>) G fimbriae</p>	Adhesinas
<p>(<i>iuc</i>) aerobactin (<i>iutA</i>) aerobactin siderophore receptor (<i>fyuA</i>) yersiniabactin siderophore receptor</p>	Sistemas de adquisición de hierro
<p>(<i>kpsMT II</i>) K-antigen (<i>pic</i>) protein involved in the intestinal colonization (<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>cdtB</i>) cytolethal distending toxin (<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

Tabla 2. Principales factores de virulencia de *Escherichia coli* uropatógenas (Adaptado de Momtaz *et al.*, 2013)

2.7 Tratamiento

Las características de la enfermedad son el resultado del desbalance entre los mecanismos de defensa del hospedero y la virulencia del uropatógeno. El cuadro clínico depende en parte, de la edad, localización e intensidad de la infección, y del tiempo transcurrido entre ésta y la infección previa, si es que la hubo.

Las UTIs están entre las infecciones más comunes. Los patógenos pueden aislarse de la vejiga (cistitis), riñón (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 pre-escolar, mujeres sexualmente activas y ancianos de ambos sexos (Bahrani-Mougeot *et al.*, 2002). Otro importante factor de riesgo es la utilización de sondaje vesical es la presencia de material inerte en el tracto urinario, puesto que *E. coli* puede adherirse a la superficie del dispositivo y formar biopelículas, lo que puede originar infecciones refractarias a la terapia antimicrobiana (Vila *et al.*, 2008). Las cepas de *E. coli*, como otras bacterias Gram negativas, son intrínsecamente resistentes a los antimicrobianos hidrofóbicos, tales como macrólidos, novobiocinas, rifamicinas, actinomicina D y ácido fusídico (Scheutz y Strockbine, 2005). Los antimicrobianos más frecuentemente empleados en el tratamiento de las infecciones por cepas de *E. coli* patógenas extraintestinales son la amoxicilina, 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 antibiograma (Blanco *et al.*, 2002).

Una proporción elevada (40 a 90%) de las cepas de *E. coli* son resistentes a la ampicilina, estreptomicina, tetraciclinas y sulfamidas. También son muchas (15 a 30%) las cepas resistentes a las cefalosporinas de 1a generación, neomicina, kanamicina, cloranfenicol y quinolonas. Entre los antibióticos que presentan menores tasas de resistencia se dispone de amoxicilina-ácido clavulánico, cefalosporinas de 2a y 3a generación, gentamicina, tobramicina, amikacina, colistina y polimixina B (Blanco *et al.*, 2002).

3. ANTECEDENTES

Johnson y Stell, (2000) en Seattle, EUA, realizaron un estudio en 75 cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con urosepsis para determinar por PCR la frecuencia de 29 factores de virulencia. Los genes que codifican para sistemas de adquisición de hierro *fyuA* y *irp2* se detectaron en el 93% y 11.3%, respectivamente. La frecuencia para *gafD* y *focG* fue del 20%, en ambos casos.

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 PCR, *pap* fue detectado en el 45.8% de las cepas, *fim* en el 97.5% y *cdtB* en el 0.9%.

Zhao *et al.*, (2009) en Jiangsu, China, analizaron por biología molecular 33 factores de virulencia en 202 cepas de *E. coli* aisladas de UTIs. El gen *iutA* fue detectado en el 83% de las cepas, mientras que los genes menos frecuentes fueron *cdtB* (12%), *malX* (46%) y *focG* (11%).

Agarwal *et al.*, (2012) en India, realizaron un estudio en 172 cepas UPEC asociadas a cistitis en mujeres. La identificación de los factores de virulencia se realizó por PCR. El gen *fimH* (fimbria tipo 1) fue el más prevalente con 87.2% de las cepas, seguido por el gen *iutA* (aerobactina) con el 47.7%. *papG* (3.5%) y *hlyA* (4.6%) fueron los menos frecuentes.

Karimian *et al.*, (2012) en Irán, realizaron 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. *fimH* fue detectado en el 79.6%, y los genes que codifican para sistemas de adquisición de hierro *irp2* e *iha* fueron identificados en el 11.3% y 17.8%, respectivamente

Ki Wook Yun *et al.*, (2013) en Korea, analizaron 64 cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con infecciones del tracto urinario., El gen de virulencia identificado con mayor frecuencia fue *fimH* (100 %), seguido por *iutA* (53.1%), *fyuA* (45.3%), y *papA* (45.3%) Los genes *papGI*, *cdtB*, y *kpsMTIII* no fueron identificados en ninguna de las cepas.

Sargol Fattahi *et al.*, (2015) realizaron un estudio en 100 cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con infección del tracto urinario, La identificación de los factores de virulencia *fimA*, *papC* y *hly* se realizó por PCR. Los genes *papC* y *hly*, fueron identificados en el 100 %, y *fimA* en el 93 %.

4. JUSTIFICACIÓN

Debido a que en nuestro país existe poca información sobre la frecuencia y las propiedades de virulencia de *Escherichia coli* Uropatógena (UPEC), el presente trabajo contribuirá en determinar los diferentes patrones de asociación de los genes que codifican para adhesinas, sistemas de adquisición de hierro y toxinas en un grupo de cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con infecciones del tracto urinario

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

- Identificar las propiedades de virulencia en un grupo de cepas de *Escherichia coli* Uropatógenas (UPEC) aisladas de pacientes con infecciones del tracto urinario.

5.2 Objetivos Particulares

- Identificación de los genes de adhesión *fimH*, *papC*, *focG* y *gafD* en las cepas de *E. coli*.
- Detección de los genotipos *iutA* y *fyuA* involucrado en el sistema de adquisición de hierro en las cepas UPEC.
- Detección del gen de toxina *cdtB* en las cepas de *E. coli*.
- Detección del gen q codifica una proteína flagelar *fliC* y el genotipo *malX* (PAI) en las cepas de *E. coli*.
- Establecer los patrones de asociación de los genes que codifican para adhesinas, sistemas de adquisición de hierro y toxinas en las cepas UPEC.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Origen de las cepas.

Para el desarrollo del presente trabajo se analizaron 194 cepas de *Escherichia coli* Uropatógenas obtenidas previamente de pacientes con infección del tracto urinario de la Clínica oficial N. 64 del IMSS, Unidad Tequesquihuac y del Hospital General Regional N. 72 del IMSS, Unidad Tlalnepantla, ubicados en el municipio de Tlalnepantla de Baz, Edo. de México.

Las cepas bacterianas pertenecientes al cepario del Laboratorio de Análisis Clínicos de la CUSI (Clínica Universitaria de la Salud Integral), FES Iztacala, fueron sembradas en BHI (infusión-cerebro-corazón) e incubadas a 37° C por 24 horas. Al término las bacterias fueron sembradas en el agar sólido de EMB (Eosina azul de metileno).

6.2 Extracción del DNA por ebullición.

A partir de un crecimiento bacteriano en EMB durante 24 h a 37°C, se tomaron varias colonias por medio de una asa de siembra estéril (Asa calibrada, 10 µL) y se depositaron en un tubo estéril de rosca de 16x150mm que contenía 2 mL de agua desionizada estéril Ultrapure™. El inóculo fue agitado en un Vortex Mixer® por 30 segundos y posteriormente la muestra se colocó en baño maría durante 20 minutos. Al término, la muestra se incubó 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 200 µL 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 y 0.4mM de dNTPs (deoxinucleósidos trifosfato) como

sustrato. Para la mezcla de reacción por separado se utilizaron 10 μL del kit Kapa Taq Ready Mix™, 1 μL de cada oligonucleótido (10 pmol), (Integrated DNA Technologies™), 5 μL de agua estéril libre de nucleasas y 3 μL de DNA molde para un volumen final de 20 μL . 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 minutos 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 (Lane *et al.*, 1985).

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

La detección del gen *iutA*, *fimH*, *gafD*, *focG*, *cdtB*, *papC*, *fyuA*, *fliC* y *malX* en las cepas de *Escherichia coli* se llevo a cabo por el método de PCR descrito por Jhonson (1998). Para lo cual se utilizó el kit Kapa Taq Ready Mix™ (Kapa Biosystems™) que contenía DNA polimerasa (0.5u/ μL) reacción buffer con Mg^{2+} como cofactor, 0.4mM de dNTPs (deoxinucleósidos trifosfato) como sustrato. Para la mezcla de reacción por separado se utilizaron 10 μL del kit Kapa Taq Ready Mix™, 1 μL de cada oligonucleótido (10 pmol) (Integrated DNA Technologies™; Tabla 3), 5 μL de agua estéril libre de nucleasas y 3 μL de DNA molde para un volumen final de 20 μL . La amplificación del DNA se realizó en un termociclador marca BIO-RAD T100® modelo CGI-96 con las condiciones descritas en la Tabla 4 (Jhonson & Stell, 2000).

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para la identificación de los genes de virulencia en las cepas de *Escherichia coli* uropatógenas (Adaptado de Momtaz *et al.*, 2013).

Gen	Secuencia (5'-3')	Tamaño del producto (pb)	Referencia
<i>iutA</i>	F ggctggacatcatgggaactgg R cgctcggaacgggtagaatcg	302	Johnson & Stell (2000)
<i>fimH</i>	F tcgagaacggataagccgtgg R gcagtcacctgccctccgta	502	Johnson & Stell (2000)
<i>gafD</i>	F tgttgaccgtctcagggtct R tcccggaactcgtgttact	952	Johnson & Stell (2000)
<i>focG</i>	F cagcacaggcagtgatagca R gaatgctgcctgccattgct	364	Johnson & Stell (2000)
<i>papC</i>	F gtggcagtatgagtaatgaccgtta R atatcctttctgcagggatgaata	205	Johnson & Stell (2000)
<i>fyuA</i>	F tgattaaccccgcgacgggaa R cgcagtaggcacgatgttgta	787	Johnson & Stell (2000)
<i>cdtB</i>	F gaaaataaatggaacacacatgtccg F' gaaagtaaatggaatataaatgtccg R aaatctcctgcaatcatccagta R' aaatcaccaagaatcatccagta	430	Johnson & Stell (2000)
<i>fliC</i>	F acgatgcaggcaacttgacg R gggttggtcgttgacagaacc	547	J. R. Johnson protocols
<i>malx</i>	F ggacatcctgttacagcgcgca R tcgccaccaatcacagccgaac	925	Johnson & Stell (2000)

Tabla 4. Condiciones de PCR para amplificar los diferentes marcadores en las cepas de *E. coli*

Genes	Desnaturalización inicial (° C/min)	Desnaturalización (° C/s)	Alineamiento (° C/s)	Extensión (° C/min)	Extensión final (° C/min)	Ciclos
<i>iutA</i>	95/6	94/30	63/30	68/3	72/10	25
<i>fimH</i>	95/6	94/30	63/30	68/3	72/10	25
<i>gafD</i>	95/6	94/30	63/30	68/3	72/10	25
<i>focG</i>	95/6	94/30	63/30	68/3	72/10	25
<i>papC</i>	95/6	94/30	63/30	68/3	72/10	25
<i>fyuA</i>	95/6	94/30	63/30	68/3	72/10	25
<i>cdtB</i>	95/6	94/30	63/30	68/3	72/10	25
<i>fliC</i>	95/6	94/30	63/30	68/3	72/10	25
<i>malx</i>	95/6	94/30	63/30	68/3	72/10	25

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

Después de la amplificación de los genes de *E. coli* por PCR, 3 μ l de cada muestra fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 2% con Midori Green (0.7%) (Nipon Genetics, Europe Gmph) y Tris-Borato 1x (TBE) como buffer para conducir la corriente eléctrica. La electroforesis se realizó bajo las siguientes condiciones: 120 volts, 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®.

6.14 Análisis estadístico.

Para establecer si existían diferencias estadísticamente significativas entre la frecuencia de aparición de los genes encontrada en cada uno de los patrones de *E. coli*, se utilizó una prueba de X^2 (P value < 0.05).

7. RESULTADOS

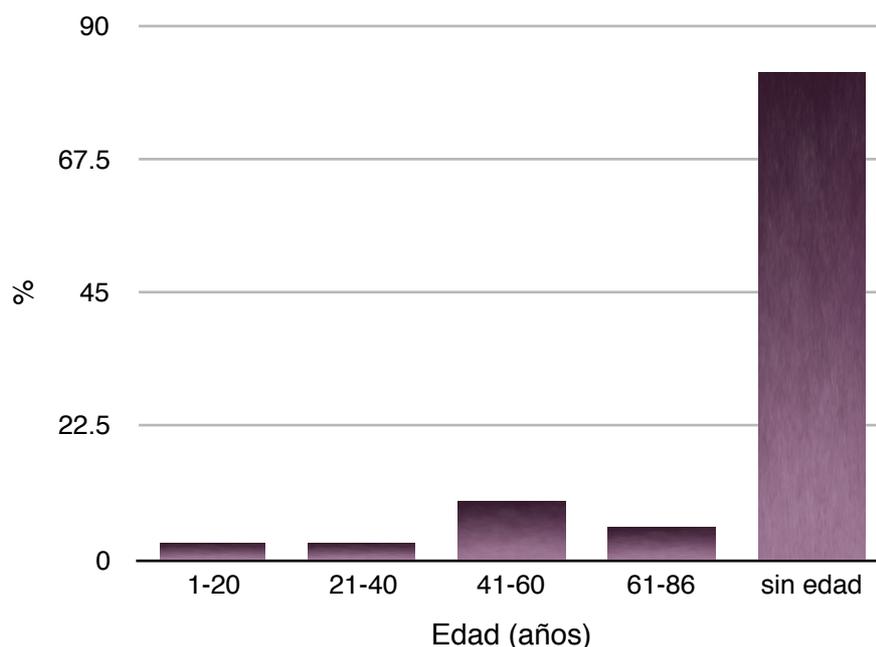
7.1 Pacientes analizados.

Se estudiaron 194 cepas de *Escherichia coli* (UPEC) aisladas de pacientes con sintomatología de infección de 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*. El 80.9% (n=157) de los pacientes correspondió al sexo femenino y el 19.1% (n=37) correspondió al sexo masculino.

7.2 Edad de los pacientes analizados.

El rango de edad más frecuente entre los paciente estudiados fue el de 41 a 60 años (9.7%, n=19), seguidos por los rangos de 61 a 86 años (5.6%, n=11) y de 21 a 40 años (2.5%, n=5). En el (82% n=159) de los pacientes analizados no se logró determinar la edad (figura 4).

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



7.3 Diagnóstico de los pacientes analizados.

El diagnóstico más frecuente entre los pacientes estudiados correspondió a las infecciones en las vías urinarias bajas (UTIs) con el 95.3% (n=185), seguido por pielonefritis, urosepsis e infección vaginal con el 1% (n=2), en cada caso. Los diagnósticos con frecuencia más

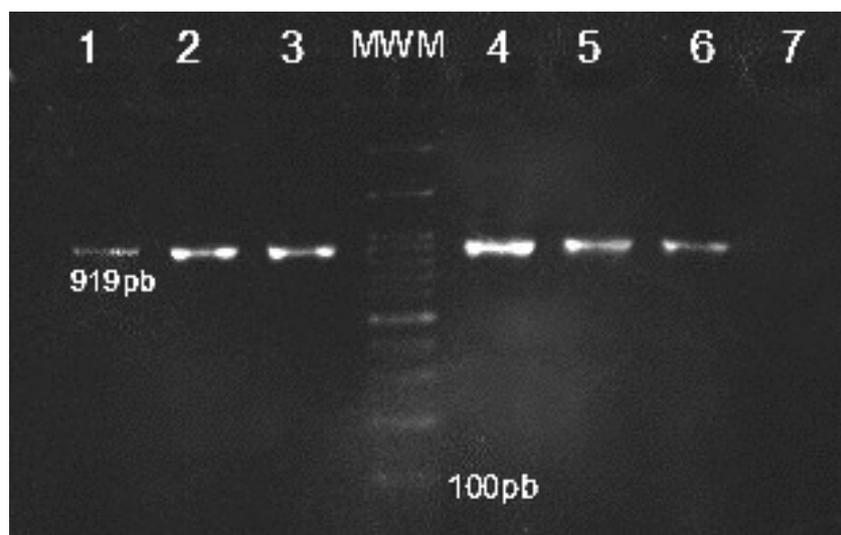
baja fueron para lupus eritematoso, cervicovaginitis y litiasis renal con el 0.5% (n=1) (Tabla 5).

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

Tabla 5. Porcentaje de los diagnósticos de los pacientes analizados

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

Todas las cepas de *Escherichia coli* (n=194) fueron identificadas molecularmente por la presencia del gen *16SrRNA* (Fotografía 1).



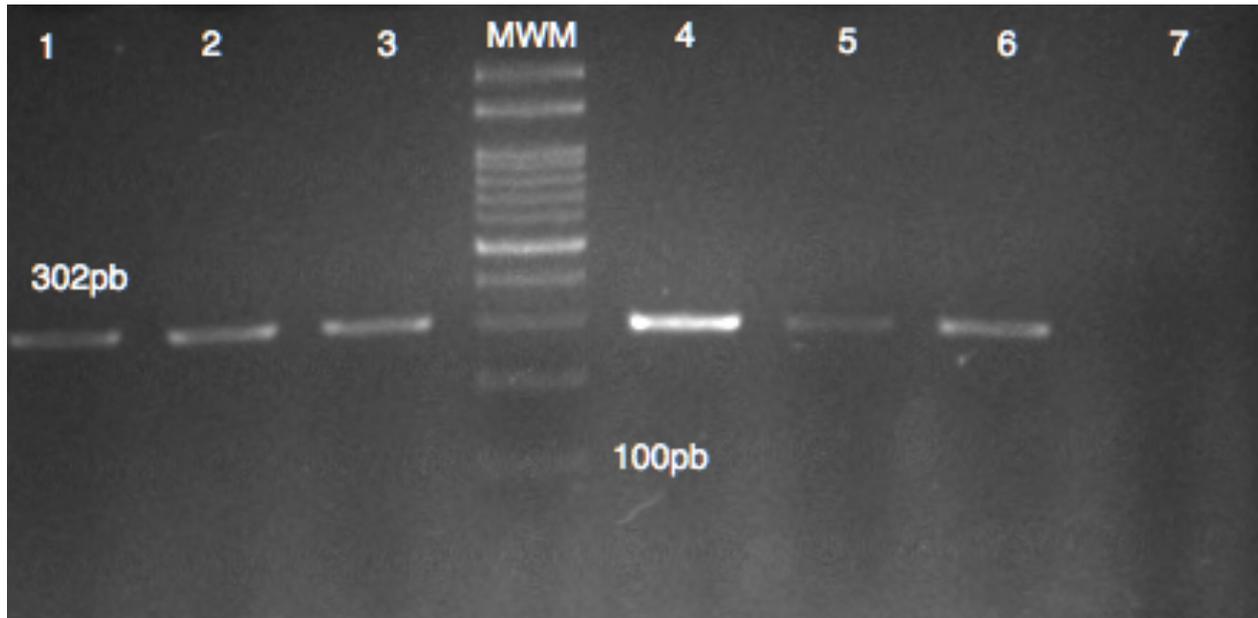
Fotografía 1. Identificación por PCR de las cepas de *E. coli* mediante la amplificación del gen *16SrRNA*. Carriles 1-3, 4-5, gen *rRNA* (919 pb, el amplicón) en cepas de *E. coli*; MWM, Marcador de tamaño molecular (100 pb); Carril 6, control positivo (cepa obtenida del cepario del Laboratorio clínico, CUSI); Carril 7, control negativo (sin DNA molde).

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

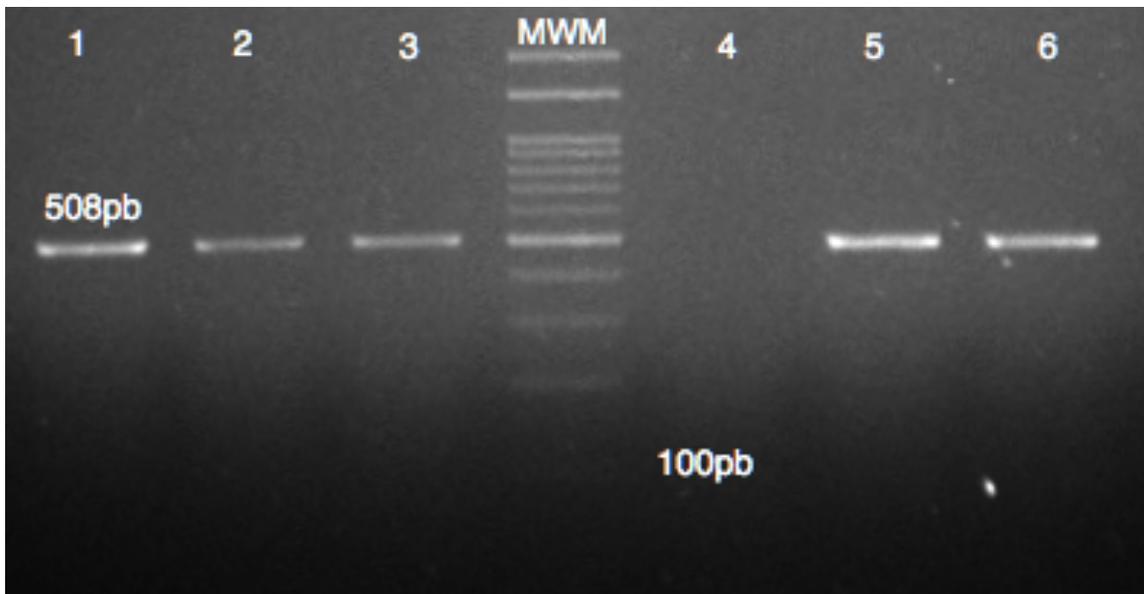
El gen identificado con mayor frecuencia en las cepas *E. coli* fue *iutA* (Tabla 6) con el 95.3% (n=185; Fotografía 2), seguido por el gen *fimH* con el 74% (n=144 Fotografía 3), , *fyuA* con el 50% (n=97; Fotografía 4) y *papC* con el 35% (n=68; Fotografía 5). Los genes menos frecuentes fueron *malX* con el 12.3% (n=24; Fotografía 6) y *focG* con el 4% (n=8; Fotografía 7). Los genes *cdtB*, *fliC* y *gafD* no fueron identificados en ninguna de las cepas de *E. coli*.

Gen	N. de Cepas	Porcentaje
Adhesinas		
<i>fimH</i>	144	74
<i>papC</i>	68	35
<i>focG</i>	8	4
<i>gafD</i>	0	0
Toxinas		
<i>cdtB</i>	0	0
Sistema de Adquisición de hierro		
<i>fyuA</i>	97	50
<i>iutA</i>	185	95.3
Otros		
<i>fliC</i>	0	0
<i>malX</i>	24	12.3

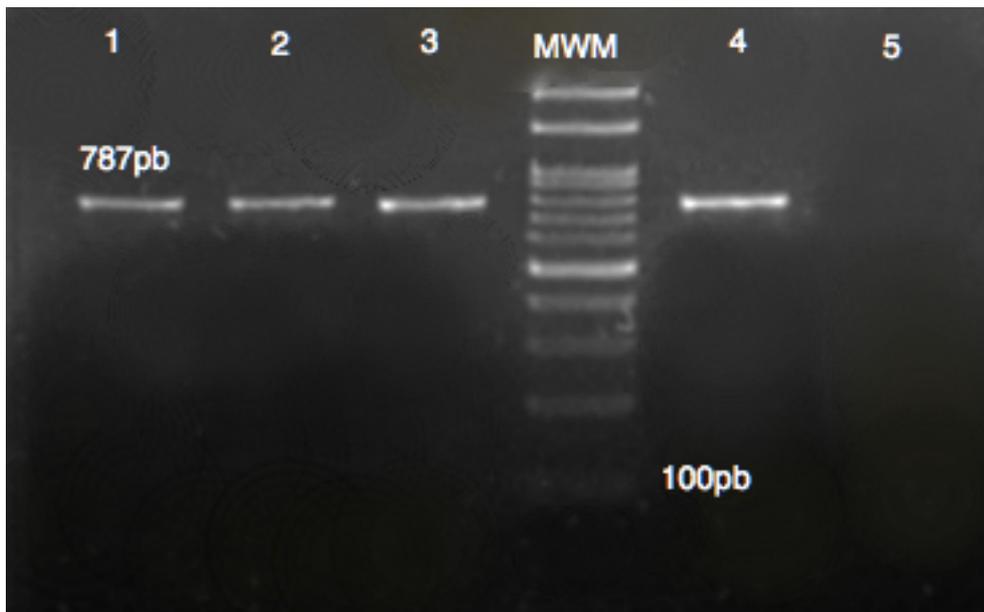
Tabla 6. Porcentaje de los diferentes genes de virulencia en las cepas clínicas de *E. coli*



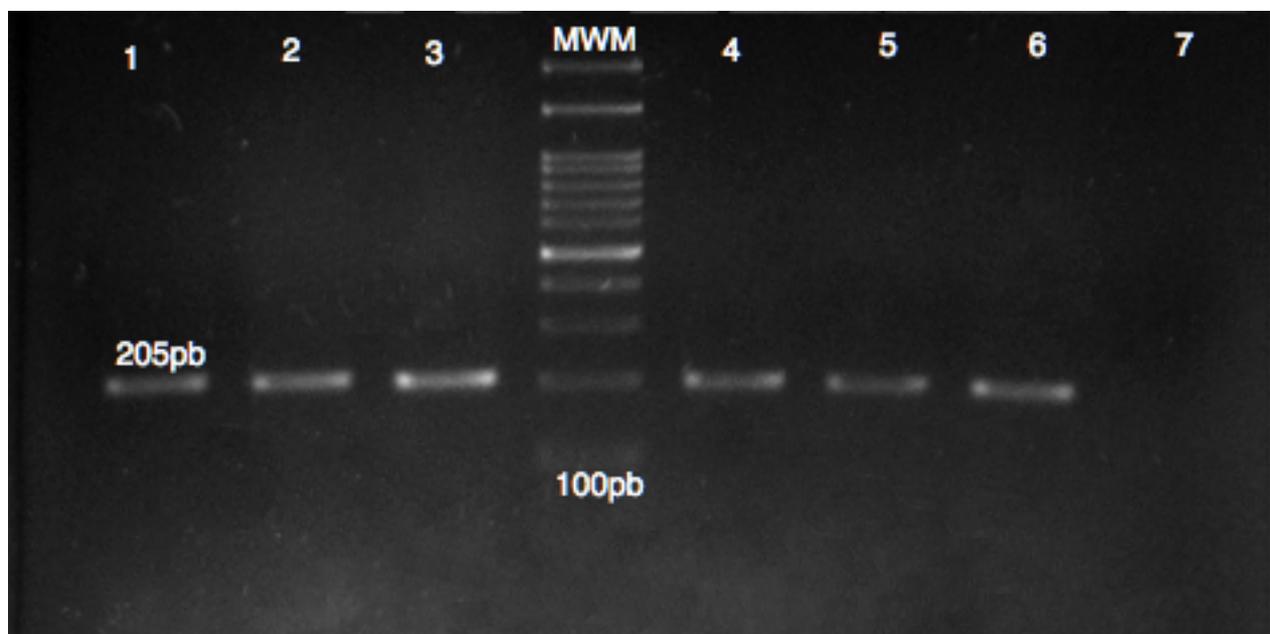
Fotografía 2. Detección por PCR convencional del gen *iutA* (302 pb, el amplicón) en cepas de *E. coli* Uropatógenas. Carriles 2-3 y 4-6 gen *iutA*; MWM, Marcador de tamaño molecular (100 pb); Carril 1, control positivo (cepa obtenida del cepario del Lab. CUSI); Carril 7, control negativo (sin DNA molde).



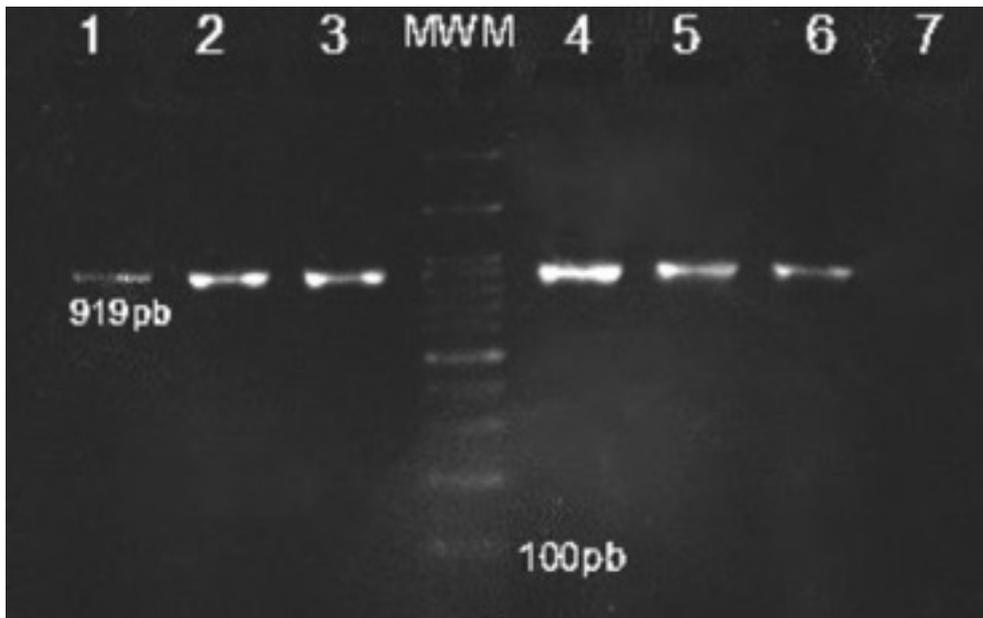
Fotografía 3. Detección por PCR del gen *fimH* (508 pb, el amplicón) en cepas de *E. coli* Uropatógenas. Carriles 2-3 y 5-6 *fimH*; MWM, Marcador de tamaño molecular (100 pb); Carril 1, control positivo (cepa obtenida del cepario del Lab. CUSI); Carril 4, control negativo (sin DNA molde).



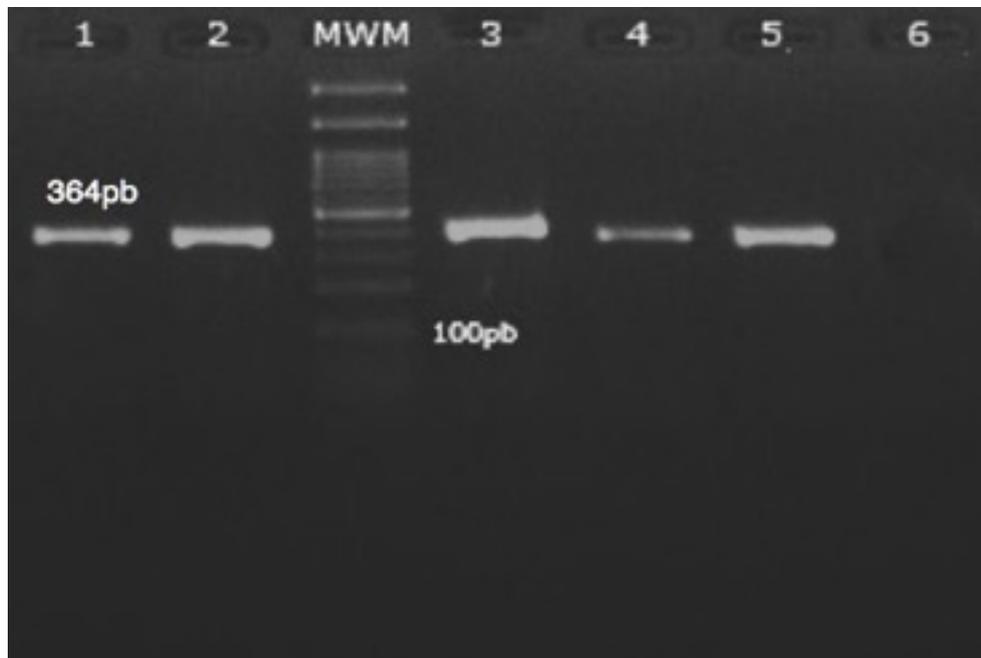
Fotografía 4. Detección por PCR convencional del gen *fyuA* (787pb, el amplicón) en cepas de *E. coli* Uropatógenas. Carriles 2-3 y 4 *fyuA*; MWM, Marcador de tamaño molecular (100 pb); Carril 1, control positivo (cepa obtenida del cepario del Lab. CUSI); Carril 5, control negativo (sin DNA molde).



Fotografía 5. Detección por PCR del gen *papC* (205 pb, el amplicón) en cepas de *E. coli* Uropatógenas. Carriles 2-3 y 4-6 *papC*; MWM, Marcador de tamaño molecular (100 pb); Carril 1, control positivo (cepa obtenida del cepario del Lab. CUSI); Carril 7, control negativo (sin DNA molde).



Fotografía 6. Detección por PCR convencional del gen *malX* (919 pb, el amplicón) en cepas de *E.coli* Uropatógenas. Carril 2-3 y 4-6 gen *malX* ; MWM, Marcador de peso molecular (100pb); Carril 1, control positivo (Cepa obtenida del cepario del Lab. CUSI); Carril 7, control negativo (Mezcla de reacción sin DNA molde).



Fotografía 7. Detección por PCR convencional del gen *focG* (364 pb, el amplicón) en cepas de *E.coli* Uropatógenas. Carril 2, 3-5 gen *focG*; MWM, Marcador de peso molecular (100 pb); Carril 1, control positivo (cepa obtenida del cepario del Lab. CUSI); Carril 6, control negativo (sin DNA molde).

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

Se encontraron 29 patrones distintos de asociación de los genes de *E. coli* (Tabla 7, dentro de los cuales el patrón No. 1 (*iutA/fimH/fyuA*) fue identificado en el 15.4% (n=30), el patrón No. 2 (*iutA/fimH*) en el 19.5% (n=28), y el patrón No.3 (*iutA/fimH/fiuA/papC*) en el 11.3% (n=22). Estos resultados demostrarán que las cepas UPEC analizados son portadoras de múltiples genes de virulencia capaces de ocasionar infecciones más agudas como cistitis y/o pielonefritis.

Patrón	Genes	Número de cepas	Porcentaje
1	<i>iutA/fimH/fyuA</i>	30	15.4
2	<i>iutA/fimH</i>	28	19.5
3	<i>iutA/fimH/fyuA/papC</i>	22	11.3
4	<i>iutA/fimH/papC</i>	17	8.76
5	<i>iutA/papC</i>	14	7.21
6	<i>iutA/fimH/malX/fyuA/papC</i>	13	6.7
7	<i>iutA/fiuA</i>	9	4.63
8	<i>iutA/fyuA/papC</i>	6	3.09
9	<i>iutA/fimH/malX/fyuA</i>	5	2.5
10	<i>fimH/fyuA</i>	3	1.54
11	<i>fimH/malX/fyuA</i>	3	1.54
12	<i>fimH/fiuA/papC</i>	2	1
13	<i>iutA/fimH/malX/fyuA/papC/focG</i>	2	1
14	<i>fimH/papC</i>	1	0.5
15	<i>iutA/fimH/malX</i>	1	0.5
16	<i>iutA/malX/papC</i>	1	0.5
17	<i>iutA/fimH/focG</i>	1	0.5
18	<i>iutA/papC/focG</i>	1	0.5
19	<i>iutA/malX/fyuA</i>	1	0.5
20	<i>iutA/malX/fyuA/papC</i>	1	0.5
21	<i>iutA/fimH/malX/papC</i>	1	0.5
22	<i>fimH/fyuA/papC/focG</i>	1	0.5
23	<i>iutA/fimH/fyuA/focG</i>	1	0.5
24	<i>iutA/fimH/papC/focG</i>	1	0.5

Tabla 7. Patrones de asociación de los diferentes genes de virulencia en las cepas de *E. coli*.

7.7 Análisis Estadístico

La frecuencia de aparición de los genes de virulencia entre los diferentes patrones de las cepas de *E.coli* aisladas de pacientes con infecciones en las vías urinarias fue estadísticamente significativa (χ^2 ; P value < 0.05).

8. DISCUSIÓN

8.1 Pacientes estudiados.

En este estudio se analizó un grupo de cepas (n=194) de *Escherichia coli* uropatógenas (UPEC) aisladas de pacientes con sintomatología de infección en vías urinarias (157 mujeres y 37 hombres) que acudieron a la Clínica oficial N. 64 del IMSS, Unidad Tequesquihuac y al HGR N. 72 del IMSS, Tlalnepantla, Edo. de México. Se ha descrito que las cepas de *E. coli* uropatógenas (UPEC) son la principal causa de infecciones en el tracto urinario (UTIs), incluyendo cistitis y pielonefritis (Wiles *et al.*, 2007), generando elevados costos económicos y de morbilidad en todo el mundo (Foxman, 2003). Las infecciones del tracto urinario son una de las enfermedades infecciosas más frecuentes alrededor del mundo (Momtaz *et al.*, 2013), en donde el 40%-50% de las mujeres han tenido UTIs a lo largo de sus vidas, lo cual coincide con lo descrito en este estudio, en donde se presentó una mayor prevalencia de las UTIs en mujeres (81%; n=157) con respecto a los hombres (19%, n=37; Figura 2) Las cepas de *E. coli* uropatógenas actúan como patógenos intracelulares oportunistas, teniendo ventajas dentro del hospedero por el uso de un diverso repertorio de factores de virulencia para la colonización del tracto urinario (Russo *et al.*, 1995).

Las cepas UPEC han demostrado diferentes propiedades de virulencia incluyendo sistemas de adquisición de hierro, adhesinas, sistema para evasión de la respuesta inmune del hospedero y síntesis de toxinas. Todas estas propiedades contribuyen a la colonización e invasión de la bacteria en el hospedero (Dobrindt *et al.*, 2001). La exitosa colonización de UPEC en el tracto urinario depende de la expresión de proteínas de adhesión, llamadas fimbrias que facilitan la adherencia de la bacteria al urotelio, y de la presencia de genes bacterianos específicos que codifican para diversos factores de virulencia (Connell *et al.*, 1997, Edén & Hansoon, 1978). 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 los marcadores de adhesión en las cepas UPEC.

8.2.1.1 Gen *fimH* (type 1 fimbriae).

En este estudio el gen, *fimH* se detectó en el 74% (n=144; Tabla 6; Fotografía 3) de las cepas UPEC. Este porcentaje coincide con lo reportado por Agarwal *et al.*, (2012) quienes realizaron un estudio con 72 cepas UPEC asociadas a Cistitis en mujeres de la India. Estos autores reportaron una prevalencia del 87.2%, mientras que Rodriguez-Siek *et al.*, (2005) y Zhao *et al.*, (2009) reportaron una prevalencias mayor a la encontrada en éste trabajo. La presencia de *fimH* en éste y otros estudios, se debe a que este gen es importante para la adhesión y la subsecuente invasión de *E. coli* a las células uroteliales (Graham *et al.*, 2001; Justice *et al.*, 2004). En UPEC, este proceso se desarrolla en la superficie luminal del epitelio vesical conocido como uroplaquinas, las cuales contienen receptores que promueven la persistencia de la bacteria y aumentan la respuesta inflamatoria en UTI s (Connell, 1996; Zhao *et al.*, 2001).

8.2.1.2 Gen *focG* (F1C fimbriae)

El gen *focG* que codifica para la fimbria F1C, se encontró en el 4% (n=2; Tabla 6; Fotografía 7) de las cepas UPEC. Este resultado es menor al 11% (n=22) descrito por Zhao *et al.*, (2009) en 202 cepas UPEC aisladas de UTIS de pacientes en Jiangsu, China, al 14.3% reportado por Johnson *et al.*, (2008) en cepas UPEC aisladas de pacientes con cistitis y pielonefritis y al 12.5% (n=25) descrito por Rodriguez-Siek *et al.*, (2005) en 200 cepas UPEC aisladas de infecciones del tracto urinario en USA. Por otro lado, Johnson *et al.*, (2005) reportaron un valor más elevado (40%) en cepas UPEC. La presencia de la adhesina *focG* se ha reportado tanto en aislamientos de pacientes con cistitis como con pielonefritis, esto se debe a que la adhesina tiene afinidad por receptores de células epiteliales en los túbulos renales distales y colectores, así como en células endoteliales del riñón y vejiga (Ott *et al.*, 1988).

8.2.1.3 Gen *papC* (P fimbriae).

El gen *papC* se encontró en el 35% (n=68; Tabla 6; Fotografía 5) de las cepas UPEC analizadas. Este porcentaje es inferior al 51% (n=102) reportado por Rodriguez-Siek *et al.*, (2005) en 2002 cepas UPEC aisladas de UTIS. La presencia de *papC* es de gran

importancia para *E. coli* durante la infección de la pielonefritis (Hultgren *et al.*, 1989; Kariyawasam *et al.*, 2006).

8.2.1.4 Gen *gafD* (G fimbriae)

El gen *gafD* no fue identificado en ninguna de las cepas UPEC analizadas (Tabla 6), coincidiendo con lo descrito por Rodríguez-Siek *et al.*, (2005), quienes reportaron la ausencia del gen *gafD* 0% (n=0) en un total de 200 cepas de casos de infecciones del tracto urinario en USA. Por otro lado el resultado encontrado en éste trabajo para *gafD* contrasta con el 20% (n=17) descrito por Johnson y Stell, (2000) en 75 cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con urosepsis en Seattle, EUA.

8.2.2 Identificación de los marcadores de sistemas de adquisición de hierro en las cepas UPEC.

8.2.2.1 Gen *iutA* (aerobactin siderophore receptor)

La frecuencia para *iutA* en las cepas UPEC analizadas fue del 95.3% (n=185; Tabla 6; Fotografía 4). Éste porcentaje es semejante al 83% (n=167) descrito por Zhao *et al.*, (2009) en 202 cepas UPEC en Jiangsu, China. Por otro lado Rodríguez-Siek *et al.*, (2005) reportaron una frecuencia del 33.5% (n=67) en cepas UPEC, mientras que Yun *et al.*, (2013), reportaron una prevalencia del 53.1% (n=33) en 64 cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con infecciones del tracto urinario en un hospital de Korea. 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).

8.2.3.1 *fyuA* (yersiniabactin siderophore receptor)

La prevalencia obtenida para el gen *fyuA* fue del 50% (n=97; Tabla 6; Fotografía 4). Este porcentaje es similar al 45.3% (n=28 reportado por Yun *et al.*, (2013) para cepas UPEC, mientras que Rodríguez-Siek *et al.*, (2005) y Ewers *et al.*, (2007) reportaron porcentajes del 80% (n= 160) en cepas UPEC. Por otro lado Johnson y Stell (2000) reportaron una prevalencia del 93% (n=69) en 75 cepas aisladas de pacientes con urosepsis en Seattle,

USA. La presencia de *fyuA* en las cepas estudiadas, pone de manifiesto los diversos sistemas de captación de hierro que las bacterias han desarrollado para lograr crecer y permanecer en durante las UTIs (Doherty et al., 1996),.

8.2.4 Identificación de el marcador que codifica para toxina en las cepas UPEC.

8.2.4.1 Gen *cdtB* (cytolethal distending toxin).

En el presente trabajo el gen *cdtB* que codifica para una citotoxina no fue detectada en ninguna de las cepas estudiadas (Tabla 6), lo cual coincide con lo descrito por Yun *et al.*, (2013) en un estudio realizado en cepas UPEC aisladas de pacientes con infecciones del tracto urinario en Korea, sin embargo en Brasil se reportó una frecuencia del 0.9% (n=2) en 225 cepas UPEC aisladas de pacientes de un hospital de Sao Paulo. La frecuencia de *cdtB* en *E. coli* ha sido más elevada en otras partes del mundo, por ejemplo; Zhao *et al.*, (2009) reportaron una prevalencia del 12% (n=24) en 202 cepas UPEC de hospitales de Jiangsu, China. 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.

8.2.4.2 Gen *fliC* (flagellin protein associated with the H7 antigen group).

El gen *flic* que codifica una proteína flagelar no fue identificada en ninguna de las cepas UPEC analizadas (Tabla 6). Rodriguez-Siek *et al.*, (2005) reportaron una prevalencia del 20% (n=40) en 200 cepas de *E. coli* asociadas a infecciones del tracto urinario.

8.2.4.3 Gen *malX* (PAI)

La frecuencia para *malX* en las cepas UPEC fue de 12.3% (n=24; Tabla 6; Fotografía 6). Agarwal *et. al.*, (2012) reportaron una prevalencia del 23% (n=40) de un total de 172 cepas UPEC asociadas a Cistitis en mujeres de la India. La frecuencia obtenida para el gen *malX* es menor a lo reportado por otros autores. En un trabajo realizado en USA reportaron una frecuencia del 74.5% en un total de 200 cepas de casos de infecciones del tracto

urinario (Rodríguez- Siek *et al.*, 2005), mientras que en un trabajo realizado en Alemania reportaron una frecuencia de 65.2% (n=) en 66 cepas UPEC (Ewers *et al.*, 2007). Por otro lado Zhao *et al.*, (2009) reportaron una prevalencia del 12% en 202 cepas aisladas de UTIS en Jiangsu, China.

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

En este estudio se identificaron 24 patrones de asociación de los diferentes marcadores de virulencia entre las cepas UPEC analizadas (Tabla 7). El patrón más frecuente fue el No. 1 (*iutA/fimH/fyuA*) con el 15.4% (n=30). Se ha descrito que la asociación *fimH* e *iutA* ha sido encontrada en altos porcentajes en cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con infecciones del tracto urinario (Yun *et al.*, 2013). Por otro lado la asociación *fyuA* e *iutA* también ha sido descrita en cepas de *E. coli* aisladas de de pacientes con urosepsis (Johnson *et al.*, 2000). Los diferentes patrones de combinaciones de los genotipos de virulencia identificados en las cepas de *E. coli* estudiadas (Tabla 7), hace suponer que durante la patogénesis de las UTIS podrían existir diferentes perfiles de expresión, lo que conduciría a infecciones más agudas como cistitis y/o pielonefritis.

9. CONCLUSIONES.

- I. En este estudio se encontró que *E. coli* fue la responsable de la mayoría de las infecciones de las vías urinarias de los pacientes analizados
- II. Los genotipos *iutA* y *fyuA* involucrados en el sistema de adquirente de hierro fueron identificados con mayor frecuencia en las cepas UPEC
- III. Los genes de adhesión con mayor frecuencia en las cepas UPEC fueron *fimH* y *papC*.
- IV. Las cepas uropatógenas de *E. coli* presentaron diferentes patrones de asociación de los genotipos involucrados en la adhesión celular, sistemas de adquisición de hierro y evasión de la respuesta inmune, lo que demuestra la virulencia de las cepas para desarrollar 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*, 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. **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.
4. **Blanco J., Blanco M., Blanco J., Mora A., Alonso M., González E., Bernárdez H.,** 2000 *Escherichia coli* patógenos para seres humanos y animales. Edit. Laboratorio de Referencia de *E. coli* (LREC), Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela. España pág 1-22.
5. **Bower JM, Eto DS, Mulvey MA.** 2006. Covert operations of uropathogenic *Escherichia coli* within the urinary tract. *Traffic.* 6:18–31.
6. **Ewers C, Antão, E.M., Diehl, I., Philip, H.C., Wieler, L.H.** 2009. Intestine and environment of the chicken as reservoirs for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains with zoonotic potential. *Appl Environ Microbiol*, 75:184-192.
7. **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 Diseases.* 29: 219-222.

8. **Feldmann F, Sorsa L.J., Hildinger K., & Schubert S.** 2007. The Salmochelin siderophore receptor IroN contributes to invasion of Urothelial cells by Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli in vitro. *Infect Immun*, 75:3183-3187.
9. **Franz, M. and Hörl, W.H.** 1999. Common errors in diagnosis and management of urinary tract infection. Pathophysiology and diagnostic techniques. *Nephrol Dial Transplant* 14: 2746-2753.
10. **Greenwood, D. and Slack, R.** 1982. Urinary infection. *Br. J Clin Pharmac* 13: 619-630.
11. **Hooton TM.** 2003. The current management strategies for community-acquired urinary tract infection. *Infect Dis Clin North Am.* 17(2): 303 -32.
12. **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.
13. **Krieger J.N., Dobrindt U., Riley D.E. & Oswald E.** 2011. Acute Escherichia coli prostatitis in previously health young men: Bacterial virulence factors, antimicrobial resistance, and clinical outcomes. *Urology.* 77(6): 1420-1425
14. **Llosa, M., De la Cruz, F.** 2005. Bacterial Conjugation: a potential Tool for Genomic engineering. *Research in Microbiology* 156 (1): 1-6.
15. **Najar M.S., Saldanha C.L., & Banday K.A.** 2009. Approach to urinary tract infections. *Indian J Nephrol.* 19(4): 129-139.
16. **Norris, D.L. 2nd and Young, J.D.** 2008. Urinary tract infections: Diagnosis and management in the emergency department. *Emerg Med Clin North Am* 26(4): 413-430.

17. **Maluta RP, Logue CM, Tiba RM, Meng T, Lopes EA, Galvao CT, Montelli AC, Sadatsune T, Carvalho M, Nolan LK, Dias W.** 2014. Overlapped secuance types (STs) and serogroups of avian pathogenic (APEC) and human extra intestinal pathogenic (ExPEC) *Escherihcia coli* isolated in Brazil. *PLOsone*. 9(8): e105016.
18. **Meylan E, Tschopp J & Karin M.** 2006. Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature*. 7098: 39-44.
19. **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.
20. **Murray PR, Rosenthal KS & Pfaller MA.** 2009. Microbiología Médica. 6ta Ed. Elsevier Mosby.
21. **Orskov, F. Orskov, I.** 1992. *Escherichia coli* serotyping and disease in man and animals. *Can J Microbiol*. 38(7): 699-704
22. **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.
23. **Pallen MJ & Wren BW.** 2007. Bacterial pathogenomics. *Nature*. 449: 835-842.
24. **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.
25. **Rodríguez-Siek, K.E., Giddings, C.W, Doetkott, C., Jonson, T.J., Fakir, M.K., and Nolan, L.K.** 2005. Comparison of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis. *Microbiology* 151:2097- 2110.

26. **Rasko D.A., Phillips J.A., & Mobley H.L.** 2001. Identification of ADN sequences from second pathogenicity island of uropathogenic *Escherichia coli* CFT073: probes specific for uropathogenic populations. *J Infect Dis.* 184(8): 1041-1049.
27. **Russo, T.A. y Johnson, J.R.** 2003. Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes Infect.* 5(5): 449-456.
28. **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.
29. **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.
30. **Samuelsson P, Hang L, Wullt B, Irjala H & Svanborg C.** 2004. Toll-likereceptor 4 expression and cytokine responses in the human urinary tract mucosa. *Inf & Imm.* 72:3179-3186.
31. **Sanchez C.** 2011. Bacteria pathogenesis: The importance of first impressions. *Nat rev. Microbiol.* 8: 117-128.
32. **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.
33. **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(21):361-7.

34. **Smith JL, Fratamico PM, Gunther NW.** 2008. Extraintestinal pathogenic *Escherichia Coli*. *Foodborne Pathog Dis*, 4: 134-162.
35. **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.
36. **Todar K.** 2008. Pathogenic *E. coli*. Online textbook of bacteriology. <http://textbookofbacteriology.net/e.coli.html> USA.
37. **Tortora GJ, Berdell R, Funke BR and Case CL.** 2007. Mecanismos de patogenicidad bacteriana. Introducción a la microbiología. 9a. Ed. Editorial Panamericana (2007).
38. **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.
39. **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.
40. **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.
41. **Wiles TJ, Kulesus RR, Mulvey MA.** 2007. Origins and Virulence Mechanisms of Uropathogenic *Escherichia coli*. *NIH*. 85:2-20.
42. **Wiles T.J., Kulesus R.R. & Mulvey M.A.** 2008. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Experimental and Molecular Pathology* 85 Yamamoto

S. 2007. Molecular Epidemiology of uropathogenic *Escherichia coli*. *J. Infect. Chemother.* 13:68-73

43. **Wolska, K. I.** 2003. Horizontal DNA Transfer Between bacteria in the Environment. *Acta Microbiologica Polonica* 52 (3): 233-243.

44. **Wu HJ, Wang AH & Jennings MP.** 2008. Discovery of virulence factors of pathogenic bacteria. *Cur Open Chem Biol.* 12:93-101.