



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES IZTACALA**

**FRECUENCIA DE GENES INVOLUCRADOS EN LA VIRULENCIA  
DE *Escherichia coli* UROPATÓGENA**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL GRADO DE**

**BIÓLOGA**

**PRESENTA:**

**MARLENNE ZARIÑANA SOTO**

**Director de tesis : Dr. SERGIO VACA PACHECO**

**Proyecto financiado por la UNAM-DGAPA- PAPIIME PE203714.**

**Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, 2017**



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.

## INDICE

1. RESUMEN
2. INTRODUCCIÓN
  - 2.1 Características de *Escherichia coli*
  - 2.2 Patologías causadas por *Escherichia coli*
  - 2.3 Composición antigénica
  - 2.4 Factores de virulencia
    - 2.4.1 Mecanismos de acción de los factores de virulencia
3. ANTECEDENTES
4. JUSTIFICACIÓN
5. OBJETIVOS
  - 5.1 Objetivo general
  - 5.2 Objetivos particulares
6. MATERIALES Y MÉTODOS
  - 6.1 Origen de las cepas
  - 6.2 Extracción del DNA
  - 6.3 Identificación de *Escherichia coli* por PCR convencional
  - 6.4 Detección de los genes por PCR convencional
  - 6.5 Identificación de *ibeA*, *papEF* y *papA* por PCR convencional
7. RESULTADOS
  - 7.1 Distribución de los pacientes por sexo
  - 7.2 Edad de los pacientes analizados
  - 7.3 Diagnóstico de los pacientes
  - 7.4 Identificación de *E. coli* mediante el gen rRNA
  - 7.5 Identificación de los genes de virulencia en las cepas de *E. coli*

## **7.6 Patrones de genes de virulencia en las cepas UPEC**

## **7.7 Análisis estadístico**

# **8. DISCUSIÓN**

## **8.1 Pacientes estudiados**

## **8.2 Identificación de *E. coli* en las infecciones urinarias de los pacientes**

## **8.3 Identificación de los diferentes marcadores de virulencia en cepas UPEC**

### **8.3.1 Adhesinas**

### **8.3.2 Sistemas de adquisición de hierro**

### **8.3.3 Toxinas**

## **8.4 Frecuencia de los genes en cepas UPEC**

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

# **9. CONCLUSIONES**

# **10. REFERENCIAS**

## RESUMEN

Las infecciones de las vías urinarias por cepas de *Escherichia coli* uropatógenas (UPEC) son consideradas un serio problema de salud. La patogenicidad de las cepas UPEC va a depender de los múltiples factores de virulencia que posean. Debido a que en nuestro país existe poca información sobre la caracterización molecular de cepas de *E. coli* uropatógenas (UPEC), el presente estudio contribuirá a establecer las diferentes asociaciones de genes que codifican para adhesinas, sistemas de adquisición de hierro, protectinas, y toxinas en un grupo de cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con infecciones del tracto urinario. Se analizaron 194 cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con infecciones de las vías urinarias de la consulta externa de una clínica del IMSS ubicada en el municipio de Tlalnepantla, Edo. de México. Las cepas de *E. coli* se identificaron por pruebas bioquímicas y por biología molecular mediante la amplificación por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) del gen *rRNA*. La identificación de los diferentes genes de virulencia en las cepas de *E. coli* se realizó mediante PCR convencional. Los genotipos identificados con mayor frecuencia en las cepas de *E. coli* fueron *feoB* 91.7% (n=178), *traT* 73.1% (n=142), *sitA* 61.8% (n=120), *papEF* 29.3% (n=57), *papA* 20.1% (n=39) y *hlyD* 17% (n=33), mientras que los genotipos menos frecuentes fueron *ireA* 15.9% (n=31) e *ibeA* 1.5% (n=3). El gen *bmaE* no fue identificado en ninguna de las cepas de *E. coli*. Las cepas UPEC presentaron 47 diferentes patrones de asociación de los marcadores de virulencia, dentro de los cuales el patrón más frecuente fue *traT-feoB-sitA* con el 19.0% (n=37). La elevada frecuencia de los genes de virulencia identificados en las cepas de *E. coli* uropatógenas demostró el alto riesgo de que estas bacterias ocasionen infecciones crónicas o más agudas de las vías urinarias altas como la cistitis y/o pielonefritis.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Características de *Escherichia coli*

*Escherichia coli* es una enterobacteria Gramnegativa, saprófita, que forma parte de la microbiota intestinal del tubo digestivo del hombre en concentración de  $10^{10}$ -  $10^{11}$  microorganismos por gramo del intestino delgado. *E. coli* también se encuentra en la materia fecal de animales con homeostasis térmica y reptiles. En el ambiente se encuentra en el suelo, agua y vegetación; se utiliza como bioindicador de la presencia de materia fecal en cuerpos de agua, debido a que estos ambientes son propicios para el desarrollo óptimo de bacterias saprofitas dependientes de nutrientes y de la temperatura **(Puerta-García, 2010; Tenailon, 2010)**.

*E.coli* es una bacteria mesófila (20-45°C), con temperatura óptima de desarrollo de 37°C, crece a pH de 6-8 y no se desarrolla en medio de cultivo con NaCl **(Koneman, 1999; Puerta-García, 2010; Sánchez-Veja, 2003)**. Su tamaño es de 1-3  $\mu\text{m}$  de largo, posee forma de bastón, puede encontrarse de forma aislada o en parejas y posee movilidad debido a sus flagelos peritricos. Son bacterias quimioheterótrofas facultativas, anaerobias facultativas, no forman esporas, no lícuan el alginato, regularmente reducen el nitrito a nitrato, producen catalasa y  $\beta$ -galactosidasa **(Faleiro, 2010; Puerta-García, 2010)**. Muchas de ellas (las que portan el plásmido F) poseen el pili sexual para la conjugación, el cual está compuesto por subunidades polimerizadas acomodadas en  $\alpha$ -hélice con 3 y 1/8 por vuelta **(Johnson, 1991)**.

En cuanto a la membrana citoplasmática tiene doble capa de fosfolípidos, su función es regular el paso de los nutrientes y macromoléculas; además posee una capa de peptidoglucano más un espacio periplasmático que tiene una gran concentración de proteínas. De acuerdo a su estructura la envoltura celular es multilaminada, la membrana citoplasmática es una bicapa fosfolipídica; la membrana externa es una bicapa fosfolipídica incluyendo lipopolisacaridos “LPS” los cuales benefician a la bacteria en cuanto a la colonización del huésped, ya que son un factor de virulencia, lipoproteínas, proteínas porinas multiméricas **(Puerta-García, 2010)**.

*E. coli* es miembro de la familia *Enterobacteriaceae*, conformada por 50 géneros y más de 500 especies, las cuales se clasifican de acuerdo a sus propiedades bioquímicas, estructura antigénica, hibridación DNA-DNA y secuenciación del 16S rRNA (Murray, 2014).

*E. coli* permanece en el lumen intestinal y en hospederos inmunodeprimidos cuando la barrera gastrointestinal se encuentra dañada y por ende ocasiona patogenicidad (Boop, 1999; Farmer, 1995). Algunas cepas son patógenas porque producen infecciones entéricas o extraintestinales provocando 630 millones de casos de diarrea en el mundo y 775 mil muertes al año. Dentro de las cepas patógenas extraintestinales se encuentra a *E. coli* uropatógena (UPEC), que es la bacteria más frecuente asociada a infecciones del tracto urinario (UTIs) y a las cepas que causan septicemias en humanos (Faleiro, 2010).

*E. coli* puede actuar como simbiote en el hospedero, aportando nutrientes y sintetizando cofactores para protegerlo contra otros patógenos. *E. coli* promueve la estabilidad de la flora bacteriana luminal y mantiene una homeostasis normal intestinal (Wiles, 2008; Bien, 2012).

*E. coli* posee características distintivas de la familia *Enterobacteriaceae*, mediante las cuales se puede identificar bioquímicamente (Tabla 1; Rodríguez-Angeles, 2002).

**Tabla 1.** Identificación bioquímica de *E. coli* (Rodríguez-Angeles, 2002):

PRUEBA BIOQUÍMICA	% DE POSITIVIDAD
Oxidasa	0
Producción de indol	98
Rojo de metilo	99
Voges-Proskauer	0
Citrato de Simmons	1
H <sub>2</sub> S (TSI)	1
Hidrólisis de urea	1
Utilización de malonato	0
Ácido a partir de glucosa	100
Gas a partir de glucosa	95

Fenilalanina desaminasa	0
Lisina descarboxilasa	90
Arginina dihidrolasa	17
Ornitina descarboxilasa	65
Movilidad a 36°C	95
Hidrólisis de gelatina a 22°C	0
Crecimiento en KCN	3
Fermentación de lactosa	95
Fermentación de sacarosa	50
Fermentación de D-manitol	98
Fermentación de D- sorbitol	94
Fermentación de mucato	95
Fermentación de dulcitol	60
Fermentación de salicina	40
Fermentación de adonitol	5
Fermentación de inositol	1
Fermentación de L-arabinosa	99
Fermentación de la rafinosa	50
Fermentación de L-ramnosa	80
Fermentación de maltosa	95
Fermentación de D-xilosa	95
Fermentación de trealosa	98
Fermentación de celobiosa	2
Fermentación de $\alpha$ -metil-D glucósido	0
Fermentación de eritritol	0
Hidrólisis de la esculina	35
Fermentación de melobiosa	75
Fermentación de D-arabitol	5
Fermentación de D-manosa	98
Fermentación de glicerol	75
Nitrato a nitrito	100
Tartrato de Jordán	95
Utilización de acetato	90

Lipasa (aceite de maíz)	0
DNasa a 25°C	0
ONPG	95

## 1.2 Patologías causadas por *Escherichia coli*

Las cepas de *E. coli* se clasifican como patógenas intestinales y patógenas extraintestinales (Abe *et al.*, 2008). Las cepas de *E. coli* patógenas intestinales o también conocidas como *E. coli* diarreogénicas “DEC” se agrupan en 6 diferentes patotipos: *E. coli* Enteropatógena (EPEC), *E. coli* productora de la toxina Shiga (STEC), *E. coli* Enteroagregativa (EAEC), *E. coli* Enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* Enteroinvasiva (EIEC) y *E. coli* de Adherencia difusa (DAEC). Por otro lado las patógenas extraintestinales se dividen en 3 tipos NMEC (causa meningitis neonatal), SEPEC (causa sepsis) y UPEC (*Escherichia coli* uropatógena) responsables de infecciones en el tracto urinario “UTI” (Toval, 2014).

Las UTIs se caracterizan por inflamación del urotelio como consecuencia de la colonización bacteriana, mayormente asociada a bacteriuria y piuria. (Valdevenito, 2008).

Las UTIs son la segunda causa más frecuente de infecciones, encontrándose por debajo de las infecciones del tracto respiratorio, con una estimación a nivel mundial de 150 millones de personas por año. De los casos de UTIs, el 90% se le atribuye a *E.coli* (UPEC). El rango de las UTIs va desde cistitis, pielonefritis y urosepsis (Mobley, 2015; Sewifi, 2015).

*E. coli* es el agente etiológico del 50-80% de las infecciones de vías urinarias, constituyéndose como un gran problema de salud. La orina es una barrera muy importante para la colonización microbiana por las cepas UPEC en el tracto urinario (Tarchouna, 2013). Más del 20% de las mujeres en América reciben al menos una vez atención médica debido a infecciones en el tracto urinario y casi 3% tienen más de una infección al año (Sussman, 1997).

El 50% de las mujeres experimentan UTI's a lo largo de su vida y en el 25-40% recurre dicha enfermedad pese al buen suministro de antibióticos durante el tratamiento (Conover,

**2016).** Las infecciones urinarias recurrentes “UTI-R” ocurren por episodios de 3 o más veces en un lapso de 12 meses; la recurrencia se debe a una re-infección en aproximadamente el 95% de los casos o a una recaída en el 5%, ambas se presentan 2 semanas después del tratamiento (Tabla 2; **Valdevenito, 2008**).

**Tabla 2.** Principales causas de recaída bacteriana

<b>RECAIDA BACTERIANA</b>
Litiasis infecciosa
Riñón atrófico unilateral infectado
Duplicación uretral uréter ectópico
Cuerpos extraños
Divertículo uretral y glándulas peri-uretrales infectadas
Riñón esponjoso medular unilateral
Muñón uretral infectado posterior a la nefroctomía
Quiste del uraco infectado
Quistes de los cálices renales comunicantes infectados
Necrosis papilar
Absceso perivesical fistulado a vejiga

Las UTIs generan al año 7 millones de visitas a consulta médica, lo que representa una pérdida económica relevante en el sector salud con \$3.5 miles de millones de dólares (**Berry, 2009**).

Diferentes factores, entre los que se encuentran los que contribuyen a una mala higiene personal, provocan el incremento de bacteriuria en mujeres ancianas como la disminución de la función cognitiva, dificultad para caminar, demencia, accidentes cerebrovasculares, cambios en el tracto genitourinario, incontinencia urinaria y fecal, cambios hormonales, malnutrición y diabetes (**Marques, 2012**).

El desarrollo de UTIs depende de factores anatómicos, integridad de los mecanismos de defensa del huésped y la virulencia de los organismos (**Bien, 2012**).

La UTI comienza con una infección en la vejiga (cistitis), la cual puede desarrollarse en una infección renal aguda (pielonefritis), y posteriormente ocasionar falla renal (**Ulett, 2013**).

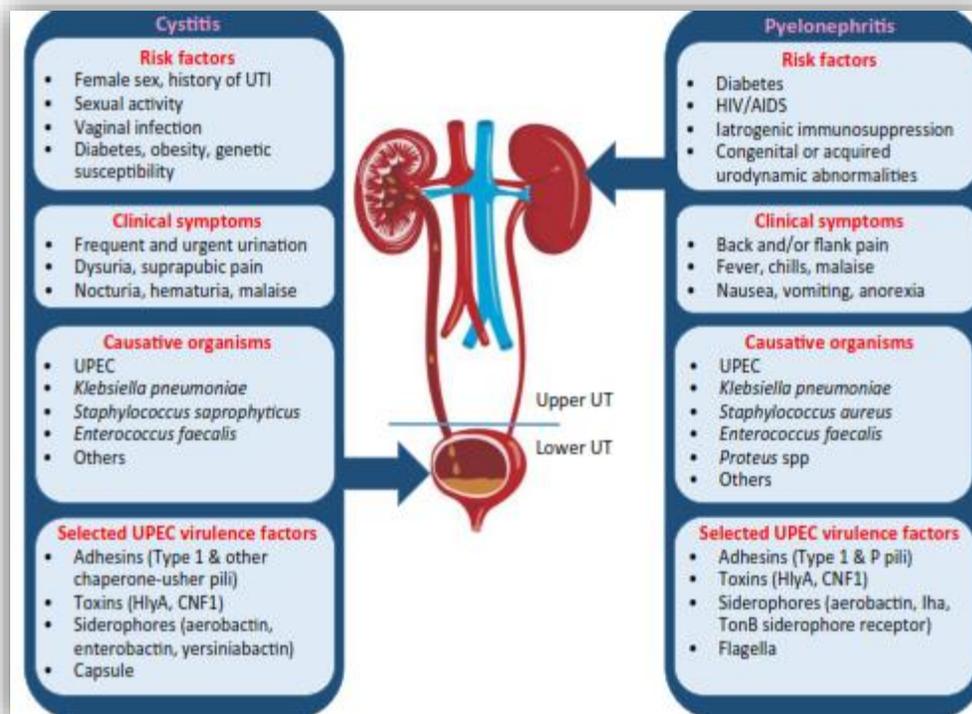
Se ha descrito que las UTIs ocurren porque UPEC migra del tracto gastrointestinal hacia el área periuretral, posteriormente a la uretra hasta llegar a la vejiga (**Chen, 2013**). En el caso de las mujeres la distancia hacia la vejiga y la apertura uretral es más cercana al recto comparada con la del hombre, lo que hace más propicia la colonización de las bacterias (**Geerlings, 2016**).

Las UTIs se desarrollan después de la colonización de UPEC en el área peri-uretral y ascienden hacia la uretra (Figura 1; **McLellan, 2016**).

Existen 3 mecanismos de infección en las vías urinarias:

- 1) **Ruta ascendente:** Es la más común en cuanto a incidencia, debido a la microbiota perianal, vaginal y uretral, que migra a lugares muy cercanos como uretra, vejiga y ureteros.
- 2) **Diseminación hematológica.**
- 3) **Diseminación linfática (Guzmán, 1997)**

La patogenicidad de las cepas de UPEC se debe a los múltiples factores de virulencia (VF) que poseen (**Johnson, 1991; Blanco, 2002**), entre los cuales se encuentran los genes que codifican para sistemas de adquisición de hierro, adhesinas, citotoxinas y protectinas (**Momtaz, 2013**).



**Figura 1.** Infecciones del tracto urinario, características de la cistitis y pielonefritis, asociadas con los factores de virulencia (Tomada de Mclellan, 2016)

### 1.3 Composición antigénica

Las cepas de *E. coli* se identifican serológicamente de acuerdo a los antígenos flagelares (H), al lipopolisacárido (O) y a los antígenos capsulares de superficie (K). Se han descrito 174 grupos O en las cepas UPEC (Momtaz, 2013).

Actualmente existen 174 antígenos somáticos (O), 118 flagelares (H) y 60 capsulares (K). Los antígenos O indican el serogrupo y la unión de los antígenos O:H indica el serotipo (Rodríguez-Angeles, 2002).

Los grupos O1, O2, O4, O6, O7, O8, O15, O16, O18, O21, O22, O25, O75 y O83 se asocian frecuentemente con las cepas UPEC (Li et al. 2016).

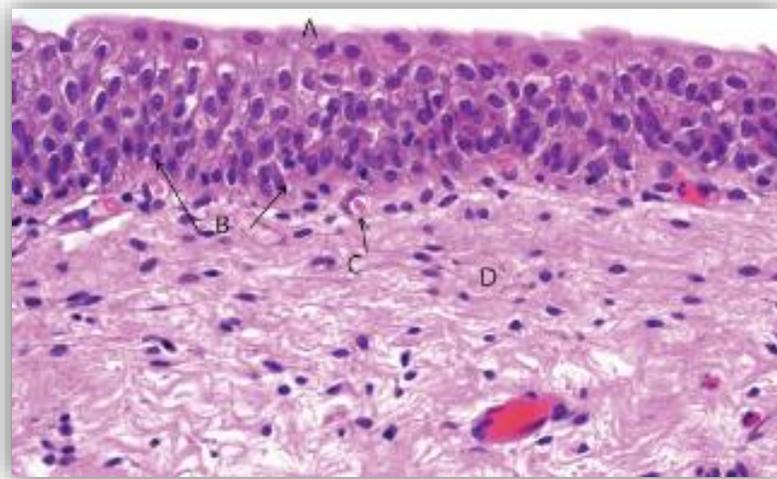
#### 1.4 Factores de virulencia

Las cepas UPEC poseen numerosos mecanismos para adherirse y posteriormente invadir el tejido (Mulvey, 2002). La presión selectiva en el hábitat de las cepas comensales promueve la aparición de los factores de virulencia (Tenailon et al. 2010). La adquisición de factores de virulencia se debe a diferentes mecanismos como la transferencia horizontal de transposones, plásmidos, bacteriófagos e islas de patogenicidad; lo que incrementa la adaptación hacia nuevos nichos y la habilidad de causar enfermedades (Bien, 2012).

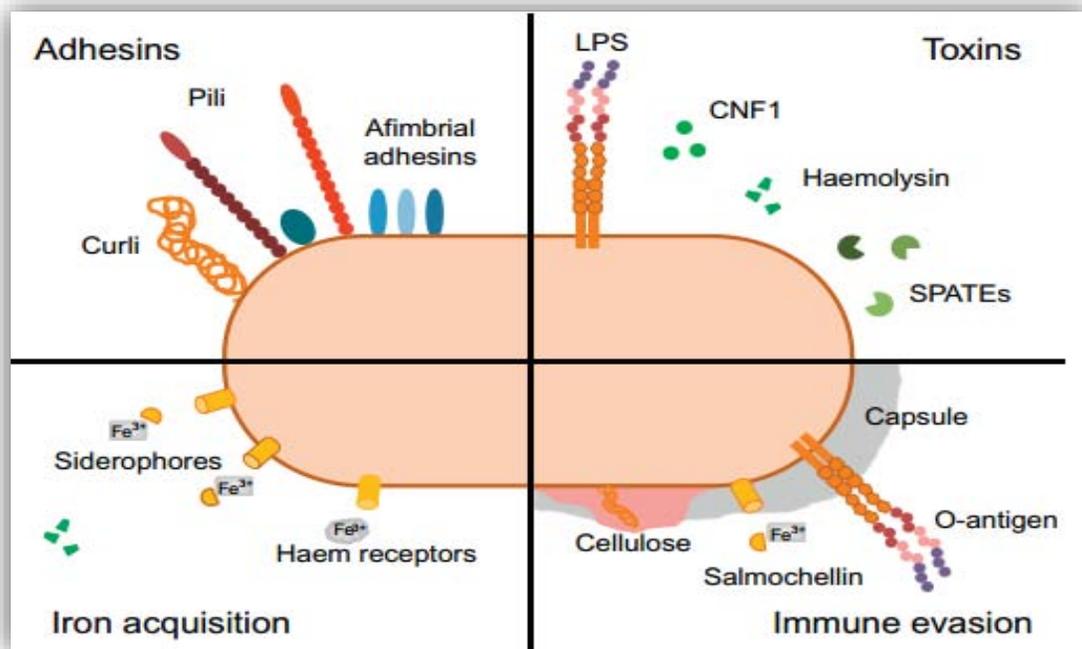
Las cepas de *E. coli* tienen una gran variedad genética, por lo que la diferencia entre las patógenas y las comensales se fundamenta con sus antecedentes filogenéticos (Millán, 2014).

Filogenéticamente las cepas patógenas extraintestinales de los grupos B2 y D poseen factores de virulencia que participan en la colonización, adherencia, invasión y evasión de mecanismos de defensa del hospedero (Millán, 2014). Los genes que codifican varios factores de virulencia contribuyen con el aumento de la patogenicidad de la bacteria (Yun, 2014).

Los factores de virulencia se distribuyen en dos grupos: 1) asociados a la superficie bacteriana, en donde se encuentran las fimbrias para la adhesión y 2) secretados y exportados hacia el sitio de acción (Bien, 2012). Entre los factores de virulencia presentes en las cepas UPEC se encuentran las adhesinas, toxinas, sistemas de adquisición de hierro, estructuras capsulares, flagelos, islas de patogenicidad y genes asociados a la formación de la biopelícula (Chen, 2013). En la Figura 3 y en la Tabla 4 se aprecian los principales genes de virulencia de las cepas UPEC (Momtaz, 2013; Derakhshandeh, 2015).



**Figura 2.** Representación del epitelio de transición en la vejiga donde A) células de la umbrella, B) son las basales, C) Capilares, D) Lamina propia (Tomado de Orchard, 2015)



**Figura 3.** Factores de virulencia de *Escherichia coli* (UPEC) (Tomado de Luthje, 2014).

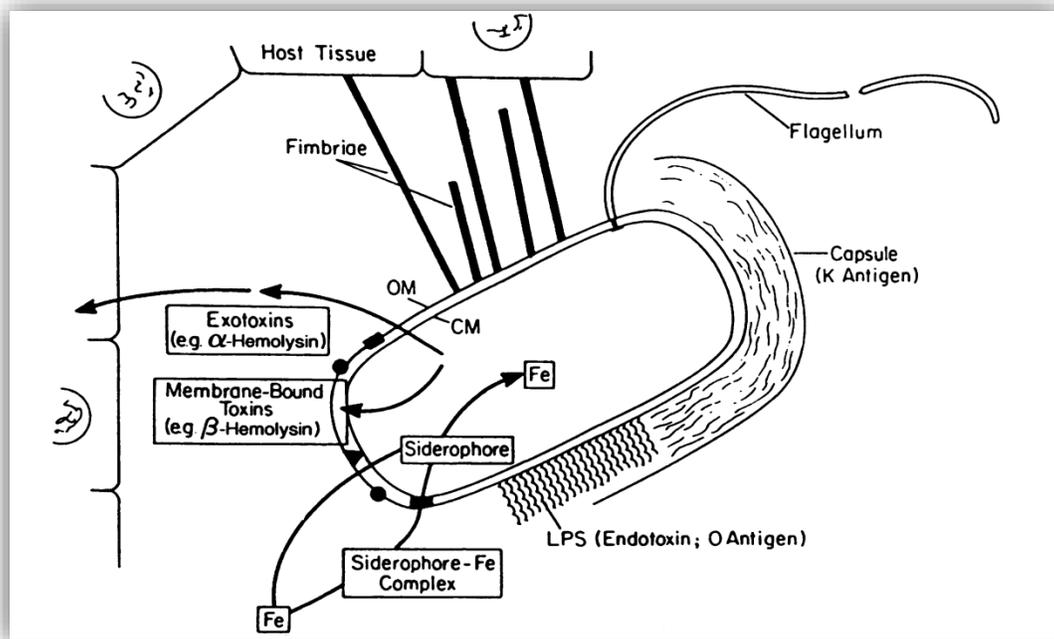
**Tabla 4.** Factores de virulencia de *E. coli* uropatógenas involucrados en las infecciones de vías urinarias “UPEC” (Tomado de Yun, 2013; Rodriguez-Siek, 2005):

	GEN	FACTOR DE VIRULENCIA
<b>ADHESINAS</b>	<i>bmaE</i>	group M- specific adhesin
	<i>afa</i>	Afimbrial adhesin I
	<i>fimH</i>	Type I fimbriae
	<i>papA</i>	pilus associated with pyelonephritis
	<i>sfa/foc</i>	S fimbriae
<b>TOXINAS</b>	<i>cdtb</i>	Cytolethal distending toxin
	<i>cnf1</i>	cytotoxic necrotizing factor 1
	<i>vat</i>	vacuolating autotransporter toxin
	<i>hlyA</i>	Alpha-hemolysin
<b>ADQUISICIÓN DE HIERRO</b>	<i>feoB</i>	Ferrous iron transporter
	<i>fyuA</i>	Yersiniabactina sideróforo
	<i>iutA</i>	Aerobactin receptor gene
<b>PROTECTINAS</b>	<i>kpsMTII</i>	K-antigen
	<i>iss</i>	increased serum survival protein
<b>OTROS</b>	<i>ibeA</i>	invasion of brain epithelium
	<i>malX</i> (PAI)	pathogenicity islands

#### 2.4.1 Mecanismo de acción de los factores de virulencia:

En las cepas UPEC la adherencia a los tejidos del tracto urinario es el primer paso para llevar a cabo la colonización (Figura 4; Johnson, 1991). El número de adhesinas varía dependiendo de cada bacteria, ya que puede tener 1 ó más tipos de fimbrias y su clasificación es de acuerdo a su funcionalidad (1, P y S). (Wein, 2008). Fimbria tipo 1 participa en la colonización de la vejiga durante la cistitis, mientras que P participa durante la pielonefritis, y S para la meningitis (Conover, 2016). Las fimbrias están compuestas por chaperones-usher pathway “CUP” que beneficia a la bacteria para el reconocimiento de los receptores con especificidad esteroquímica (Chen, 2013). La importancia de la adherencia bacteriana radica en que permite la proliferación durante las UTIs, las bacterias permanecen en el tracto urinario pese al flujo que tenga la orina y la activación de vías de señalización. (Yun, 2014).

El hierro es esencial en las células, la bacteria lo adquiere por medio de los sideróforos, dicho proceso contribuye a la patogenicidad de *E. coli* (Ling, 2013). Las cepas secretan toxinas para destruir las células del epitelio urinario del hospedero, y la toxina citolítica  $\alpha$ -hemolisina es la principal ya que provoca lisis de los eritrocitos, desencadenando la liberación de nutrientes, como el hierro, lo cual aprovecha la bacteria para sobrevivir y multiplicarse (Ullet, 2013). La actividad hemolítica de  $\alpha$ -hemolisina se compone de proteínas con una baja concentración de fosfolípidos o lipopolisacaridos (Johnson, 1991). Otra toxina de gran importancia es el factor citotóxico necrotizante 1 “CNF1”, que promueve la invasión a las células del hospedero; CNF1 y  $\alpha$ -hemolisina contribuyen a la sintomatología de cistitis (Ullet, 2013).



**Figura 4.** Interacción de *E.coli* patógena con el tejido del hospedero (Tomado de Johnson, 1991).

## 2. ANTECEDENTES

Abe *et al.*, (2008) realizaron un trabajo para estudiar en 225 cepas de *E. coli* uropatógenas la distribución de los distintos marcadores de virulencia. Las frecuencias de los genotipos de virulencia fueron: *fim* 93.8%, *irp2* 68.9%, *kps* 51.5%, *pap* 45.8%, *hly* 44%, *iha* 40.4%, *aer* 39.6%, *sfa* 29.8% y *cnf* 23.6%.

Derakhshandeh *et al.*, (2015) determinaron la frecuencia de factores de virulencia en 85 cepas de *E. coli* uropatógenas. Los genes con mayor frecuencia en las cepas fueron *fimH* 34.1% y *papA* 9.4%. Se encontró una asociación significativa de los genes *papA-fimH*, *papA-tsh-sitA*, *hlyD-papA* y *sitA-tsh* en las cepas estudiadas. *hlyD* se identificó en el 21.2%, *sitA* en el 15.3%, *tsh* (temperatura sensible a la hemoaglutinación) en el 27.1% y el gen *cnf-1* en el 3.5% de las cepas.

Firoozeh *et al.*, (2014) realizaron un estudio para identificar 8 factores de virulencia en 150 cepas de *E. coli* mediante PCR. El 22.6% (n=41) presentó 1 gen de virulencia, 34.6% (n=52) 2 genes, 26% (n=39) 3 y 3.5% (n=5) 4 factores. PAI se detectó en el 61.3% las cepas (n=92), *aer* 30.7% (n=46), *pap* 25% (n=16.7), y el gen *traT* se correlacionó en pacientes con pielonefritis en un 80.6% (n=58) y en pacientes con cistitis en 67.9% (n=53), sin embargo, los genes *sfa* y *afa* no se presentaron en las cepas. Se encontraron 19 patrones de asociación, 17 para pielonefritis y 12 para cistitis.

Millán *et al.*, (2014) determinaron la distribución de los diferentes grupos filogenéticos y de los marcadores de virulencia en 28 cepas UPEC productoras de  $\beta$ -lactamasa colectadas de pacientes con infecciones del tracto urinario. El grupo B2 se encontró con mayor frecuencia asociado con 4 combinaciones de genes (7/12) y con 5 combinaciones diferentes (2/12); el gen *fyuA* fue el de mayor prevalencia con 67.8% (n=19), seguido de *fymH* 50% (n=14), *kpsMTII* 35.7% (n=10), *PAI* 21.4% (n=6), *ups* 25% (n=7) y *papA* 7.1% (n=2).

Momtaz *et al.*, (2013) realizaron mediante PCR un estudio para identificar 24 genotipos de virulencia, 14 serogrupos O, y genes de resistencia a antibióticos en 123 cepas UPEC aisladas de pacientes con UTI's. La frecuencia de los genotipos de virulencia principales fueron: *fim* 86% (n=106), *setI* 79% (n=98) y *sfa* 53% (n=66), sin embargo los genes *sen* y *tsh* no se presentaron en las cepas.

Shookohi *et al.*, (2016) realizaron un estudio para detectar 10 genes de virulencia en 100 cepas UPEC aisladas de pacientes con infecciones en el tracto urinario. La frecuencia de los genotipos fue la siguiente; *iutA* 99%, *kpsII* 98%, *neuS* 96%, *ibeA* 67%, *iss* 47%, *astA* 29%, *cvi/cva* 19%, *vat* 18% y *tsh* 1%.

Yamamoto *et al.*, (1995) realizaron un estudio para identificar 6 factores de virulencia en 194 cepas de *E. coli* uropatógenas aisladas de pacientes con cistitis. Las frecuencias de los genotipos de virulencia fueron: *pap* 64% (n=125), *aer* 47% (n=93), *hly* 41% (n=80), *sfa* 36% (n=71), *cnfI* 31% (n=61) y *afaI* 8% (n=17).

Yun *et al.*, (2014) compararon la presencia de 18 genes de virulencia en 64 cepas (15 de UTI's y 49 de bacteriuria asintomática "ABU") en pacientes menores de 18 años. Las frecuencias de los genotipos de virulencia fueron: *fimH* 96% (n=62), *kpsMTII* 84% (n=54) y *feoB* 67.2% (n=43). Los genes *papGI*, *cdtB* y *kpsMTIII* no fueron identificados en ninguna de las cepas. En las cepas aisladas de pacientes con diagnóstico de UTI's, los genes fueron; *fimH* 100% (n=15), *kpsMTII* 93.3% (n=14), *fyuA* 80% (n=12), *iutA* 60% (n=9) y *papA* 60% (n=9); en las cepas aisladas de pacientes diagnosticadas con ABU los genes encontrados fueron; *fimH* 95.9% (n=47), *feoB* 81.6% (n=40), *kpsMTII* 81.6% (n=40), *iutA* 51% (n=25) y *papA* 40.8% (n=20). Las cepas aisladas de UTI' presentaron menos factores de virulencia comparadas con las aisladas de ABU.

### 3. JUSTIFICACIÓN

Debido a que en nuestro país existe poca información sobre la caracterización molecular de cepas de *E. coli* uropatógenas (UPEC), el presente estudio contribuirá a establecer las diferentes asociaciones de genes que codifican para adhesinas, sistemas de adquisición de hierro, protectinas, y toxinas en un grupo de cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con infecciones del tracto urinario.

### 4. OBJETIVOS

#### 4.1 Objetivo general

Caracterizar molecularmente un grupo de cepas de *Escherichia coli* aisladas de pacientes con infecciones del tracto urinario.

#### 4.2 Objetivos particulares

- I. Determinar la frecuencia de los genes de adhesión *bmaE*, *papa*, *sitA* y *papEF*.
- II. Determinar la frecuencia de los genes que codifican para toxinas *hlyD* y *traT*
- III. Determinar la frecuencia de los genes de adquisición de hierro *feoB*, *ireA*
- IV. Determinar la frecuencia del gen misceláneo *ibeA* en las cepas de *E. coli*.
- V. Establecer los patrones de asociación de los genes que codifican para adhesinas, sistemas de adquisición de hierro, protectinas, y toxinas en las cepas UPEC.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Origen de las cepas

Se analizaron 194 cepas de *E. coli* uropatógenas previamente aisladas de pacientes con infecciones urinarias del Hospital General Regional No. 72 “Lic. Vicente Santos Guajardo” y de la Unidad de Medicina Familiar No. 64 ubicados en Tlalnepantla de Baz, Edo. de México. Se recuperó información de los pacientes como edad, sexo, antecedentes de infecciones urinarias, etc.

### 5.2 Extracción del DNA

Las cepas de *E. coli* (UPEC) se sembraron en el agar EMB por el método de estría cruzada y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Para evitar que los colorantes del EMB pudieran interferir con la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), las cepas fueron resembradas en el medio Mueller Hinton (MH) y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Posteriormente se tomaron por medio de un asa de siembra estéril varias colonias del crecimiento bacteriano y se depositaron en un tubo con tapón de rosca de 16 X 150 mm que contenía 2 mL de agua desionizada estéril. Las muestras se agitaron durante 30 segundos en un Vortex Mixer®. Posteriormente los tubos se colocaron en baño maría por 20 minutos, al término las muestras se incubaron en hielo por 10 minutos. Finalmente 2 mL de las muestras fueron depositados en tubos eppendorf estériles y centrifugados (Microfuge Beckman Coulter™) a 14,000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante (DNA) se separó en un tubo eppendorf estéril y se guardó a -20°C hasta la realización de la PCR (**Paniagua et al., 2007**).

### 5.3 Identificación de *Escherichia coli* por PCR convencional

Las cepas de *E. coli* fueron identificadas por PCR mediante la amplificación del gen 16S *rRNA* (**Rodicio et al., 2004**). Para lo cual se utilizó la Kapa Taq Ready Mix™ (Kapa Biosystems™). Para un volumen final de 20 µl por cada muestra de reacción se utilizó 1 microlitro de cada uno de los oligonucleótidos (forward y reverse; Integrated DNA

Technologies; Tabla 5) a la concentración de 10 pmol, 10 µl de la Kapa Taq Ready Mix <sup>TM</sup>, 5 µl de agua libre de nucleasas estéril y 3 microlitros de ADN. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos (desnaturalización a 95°C por 30 segundos, alineación a 55°C por 60 segundos y extensión a 72°C por 60 segundos). Finalmente la extensión se prolongó por 5 minutos a 72°C. La cepa de *E. coli* ATCC 25922 fue utilizada como control positivo.

#### **5.4 Detección de los genes *feoB*, *traT*, *sitA*, *hlyD*, *ireA* y *bmaE* en las cepas de *E. coli* por PCR convencional**

Para un volumen final de 20 µl por cada muestra de reacción se utilizó 1 microlitro de cada uno de los oligonucleótidos (Integrated DNA Technologies; Tabla 1) a la concentración de 10 pmol, 10 µl de la Kapa Taq Ready Mix <sup>TM</sup>, 5µl de agua libre de nucleasas y 3 microlitros de ADN. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes (**Jhonson & Stell 2000**); desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, seguido de 25 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, alineación a 63°C por 30 segundos, y una extensión a 68°C por 3 minutos. Por último una extensión final a 72°C por 10 minutos.

#### **5.5 Detección de los genes *ibeA*, *papEF* y *papA* por PCR multiplex**

Para amplificar los genes *ibeA*, *papEF* y *papA* se utilizó 1 microlitro de cada uno de los oligonucleótidos (Integrated DNA Technologies; Tabla 5) a la concentración de 10 pmol, 10 µl de la Kapa Taq Ready Mix <sup>TM</sup>, 1µl de agua libre de nucleasas y 3 microlitros de ADN. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes (**Jhonson & Stell, 2000**); desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 25 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, alineación a 63°C por 30 segundos, y una extensión a 68°C por 3 minutos. Por último una extensión final a 72°C por 10 minutos. Posteriormente los amplicones obtenidos se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% teñidos con el colorante Midori Green y fotografiados bajo luz UV utilizando el sistema Kodak (GeLlogic 100).

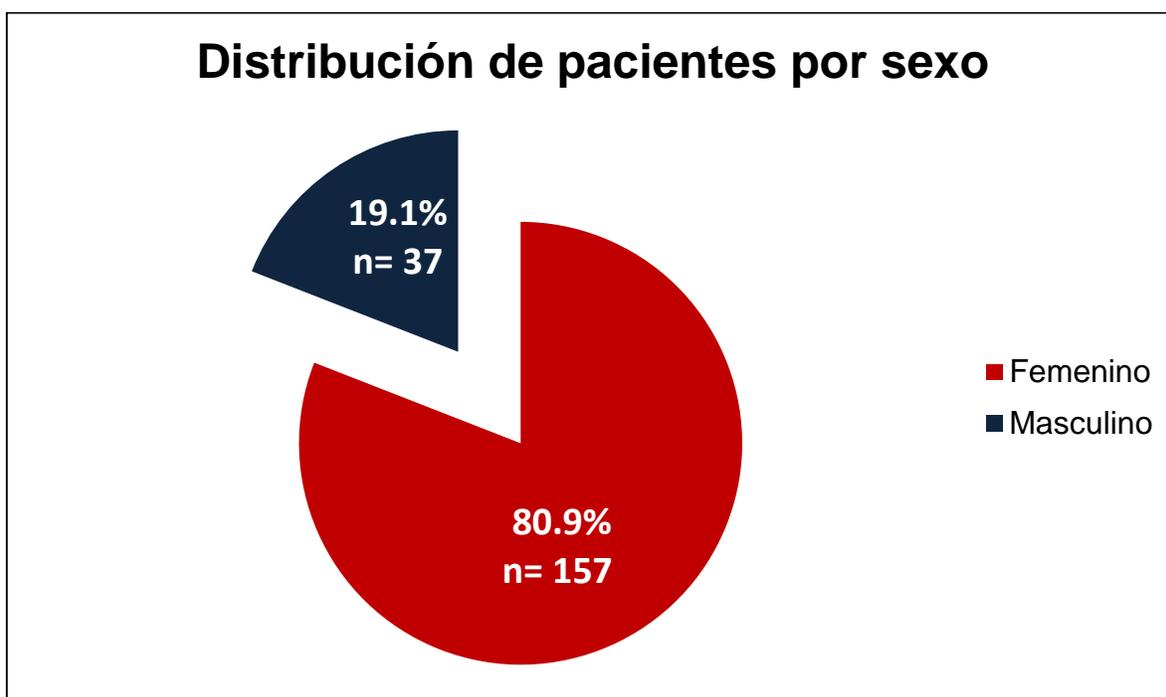
**Tabla 5.** Oligonucleotidos utilizados para amplificar los genes de virulencia en las cepas de *E. coli* (Tomado de Rodríguez-Siek *et al.*, 2005).

GEN	SECUENCIA DEL PRIMER (5'-3')	Tamaño del amplicón (pb)	REFERENCIA
<b><i>feoB</i></b>	F aattggcgtgcatgaagataactg R agctggcgacctgatagaacaatg	470	Runyen-Janecky <i>et al.</i> , (2003)
<b><i>traT</i></b>	F ggtgtggtgcatgagcacag R cacggttcagccatccctgag	290	Johnson & Stell (2000)
<b><i>sitA</i></b>	F agggggcacaactgattctcg R taccgggccgttttctgtgc	608	Runyen-Janecky <i>et al.</i> , (2003)
<b><i>papEF</i></b>	F gcaacagcaacgctggttgcacat R agagagagccactcttatacggaca	326	Johnson & Stell (2000)
<b><i>papA</i></b>	F atggcagtggtgttttggtg R cgtcccaccatacgtgctcttc	717	
<b><i>hlyD</i></b>	F ctccggtacgtgaaaaggac R gccctgattactgaagcctg	904	Johnson & Stell (2000)
<b><i>ireA</i></b>	F gatgactcagccacgggtaa R ccaggactcacctcacgaat	254	
<b><i>ibeA</i></b>	F aggcaggtgtagccgcgtac R tgggtctccgcaaaccatgc	171	Johnson & Stell (2000)
<b><i>bmae</i></b>	F atggcgctaactgcatgctg R agggggacatatagcccccttc	507	
<b><i>16SrRNA</i></b>	F agagtttgatcmtggctcag R ccgtcaattcattgagttt	919	Momtaz <i>et al.</i> , 2013

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Distribución de los pacientes por sexo

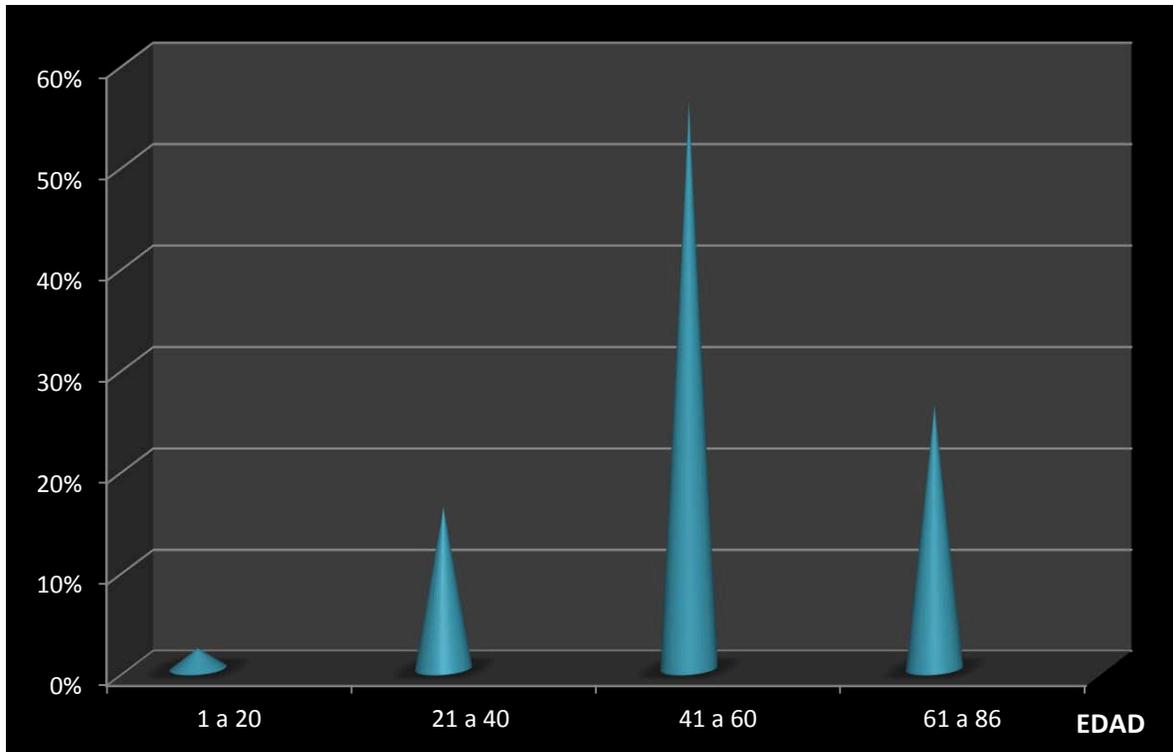
De los 194 pacientes con UTIs ocasionadas por *E. coli* se encontró que el 80.9% (n=157) correspondió a pacientes del sexo femenino y el 19.1% (n=37) a pacientes del sexo masculino.



**Figura 5.** Distribución de los pacientes analizados por sexo.

### 6.2 Edad de los pacientes analizados

La distribución de los pacientes por rango de edad se muestra en la figura 6. El rango de mayor abundancia fue el de 41-60 años con 56% (n=86), seguido de 61-86 años con 26% (n= 40), 21-40 años con 16% (n= 24) y el de 1-20 años con 2% (n=4). Del 20.6% (n=40) no se determinó la edad.



**Figura 6.** Distribución de los pacientes por rango de edad.

### **6.3 Diagnóstico de los pacientes**

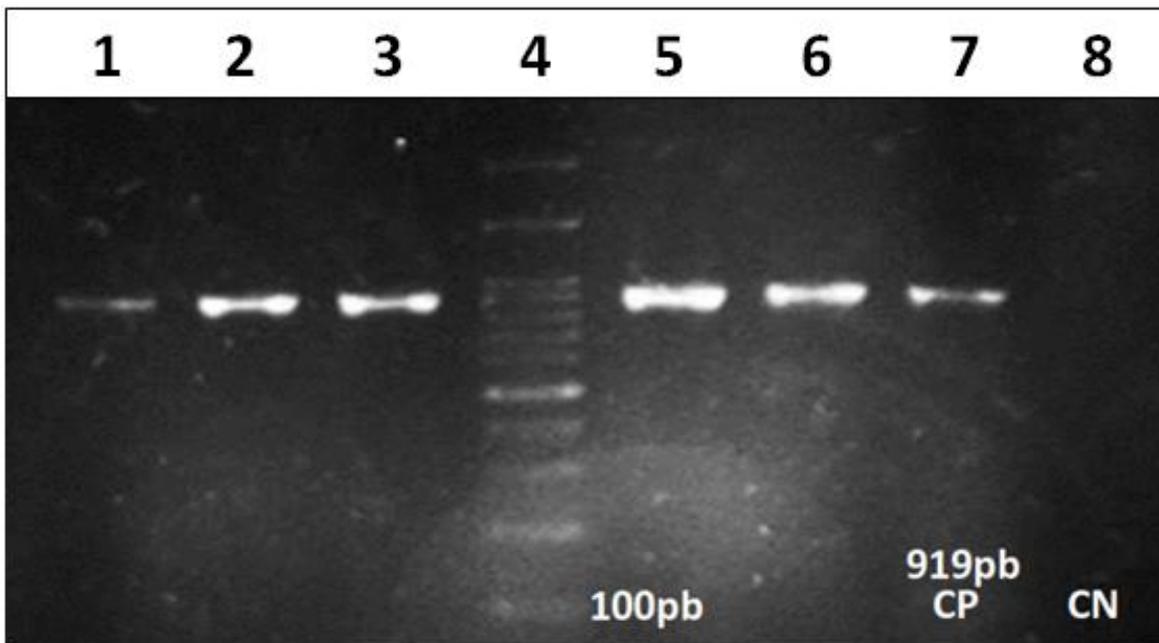
El diagnóstico con mayor frecuencia en los pacientes estudiados fue el de infecciones en las vías urinarias bajas (UTIs) con el 95.3% (n=185), seguido por el de pielonefritis, urosepsis e infección vaginal con el 1% (n= 2), en cada caso; lupus eritematoso, cervicovaginitis y litiasis renal con el 0.5% (n=1), en cada caso.

**Tabla 6.** Diagnósticos clínicos de los pacientes estudiados

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

#### 6.4 Detección de *E. coli* mediante el gen 16S *rRNA*

El 100% de las cepas UPEC (n=194) fue identificada como *E. coli* mediante la amplificación del gen gen 16S RNA (Figura 7).



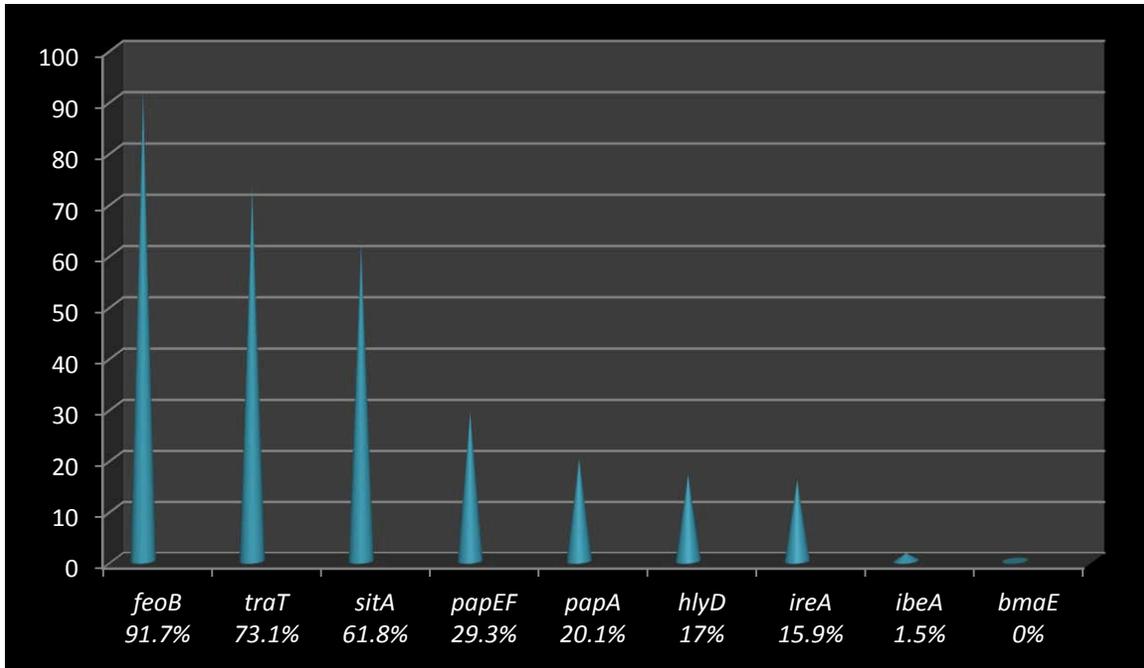
**Figura 7.** Identificación de las cepas de *E. coli* mediante la detección del gen 16S *rRNA* por medio de la PCR convencional. Carriles 1-3, 5 y 6 gen *rRNA* en cepas de *E. coli* (919 pb, el amplicón); Carril 4 MWM (100 pb); Carril 7, control positivo (*E. coli* ATCC 25922); Carril 8, control negativo (sin DNA molde).

### 6.5 Identificación de los genes de virulencia en las cepas de *E.coli*

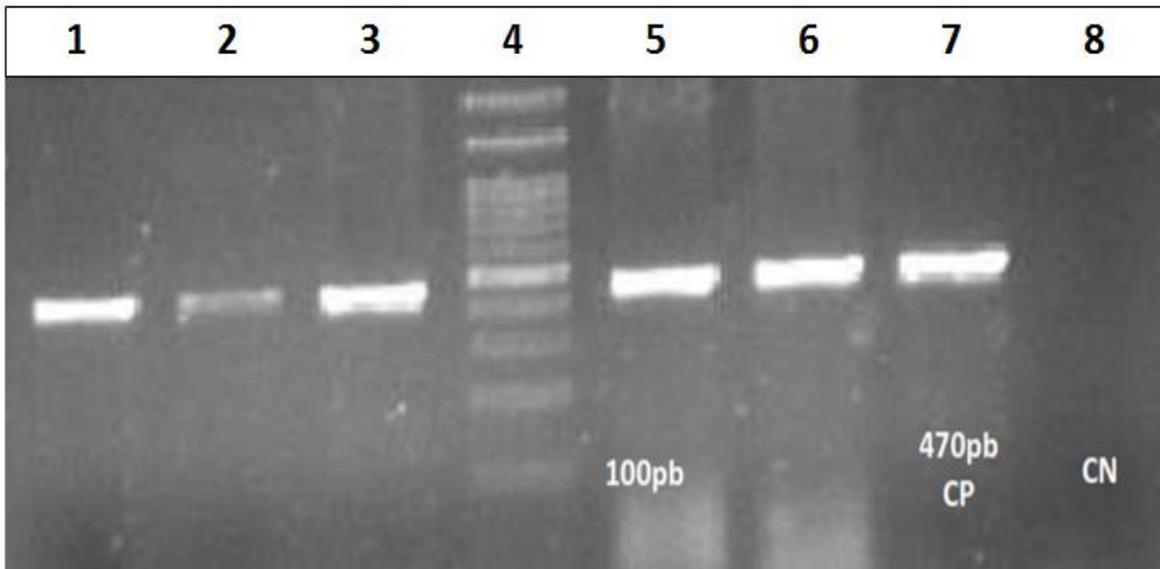
El gen identificado con mayor frecuencia en las cepas de *E. coli* (Tabla 7 y Figura 8) fue *feoB* con el 91.7% (n=178; Figura 9), seguido de los genes *traT* 73.1% (n=142; Figura 10), *sitA* 61.8% (n=120; Figura 11), *papEF* 29.3% (n=57; Figura 12), *papA* 20.1% (n=39; Figura 13), *hlyD* 17% (n=33; Figura 14), *ireA* 15.9% (n=31; Figura 15) e *ibeA* 1.5% (n=3; Figuras 16). El gen *bmaE* no fue identificado en ninguna de las cepas (Tabla 7 y Figura 8).

**Tabla 7.** Frecuencia de los genes en las cepas de *E. coli*

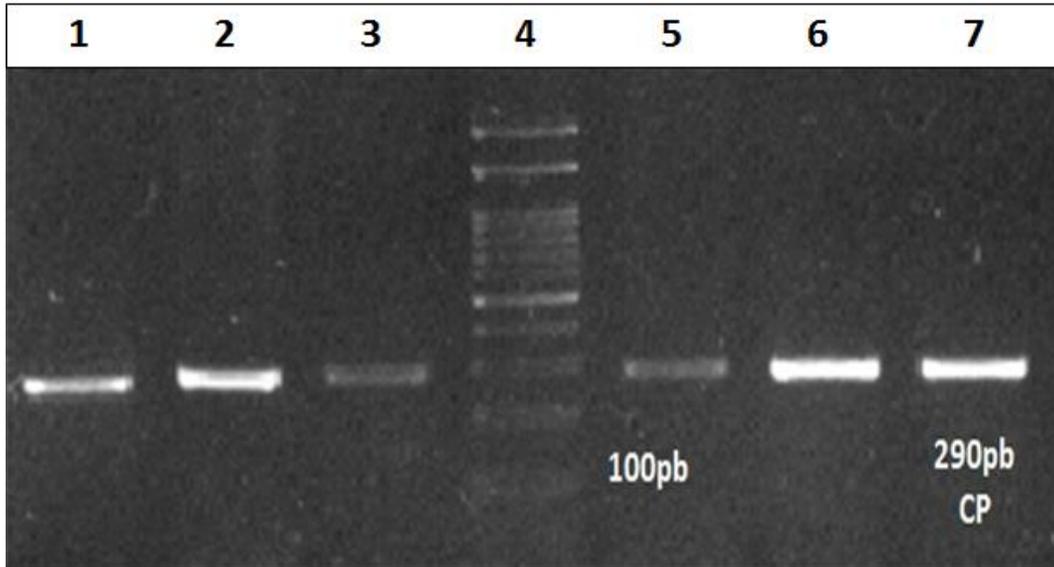
Gen	No. de cepas	Porcentaje
<i>feoB</i>	178	91.7
<i>traT</i>	142	73.1
<i>sitA</i>	120	61.8
<i>papEF</i>	57	29.3
<i>papA</i>	39	20.1
<i>hlyD</i>	33	17
<i>ireA</i>	31	15.9
<i>ibeA</i>	3	1.5
<i>bmaE</i>	0	0



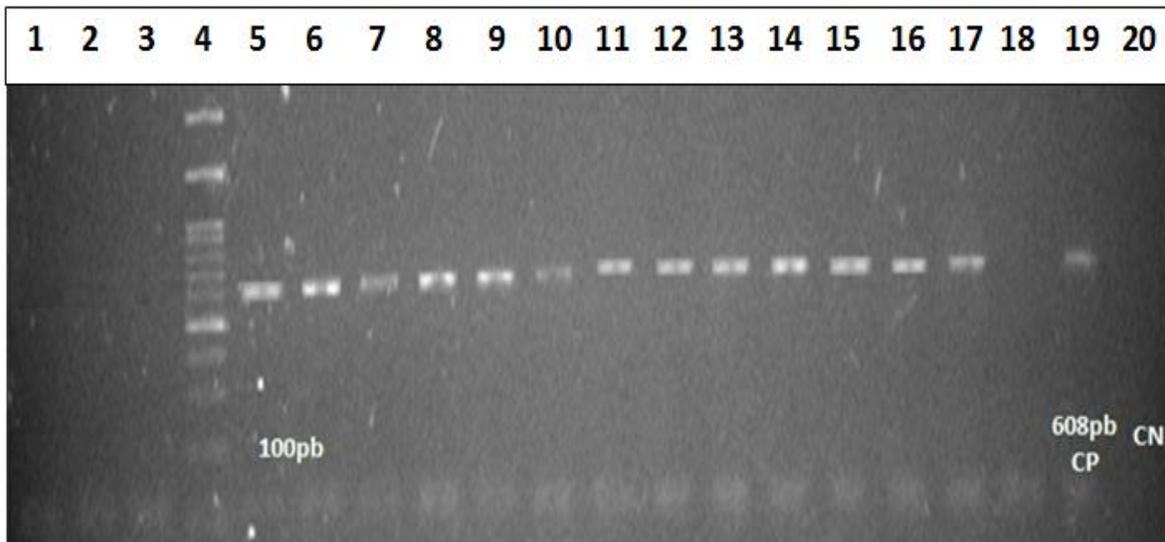
**Figura 8.** Distribución de los factores de virulencia en las cepas de *E.coli*



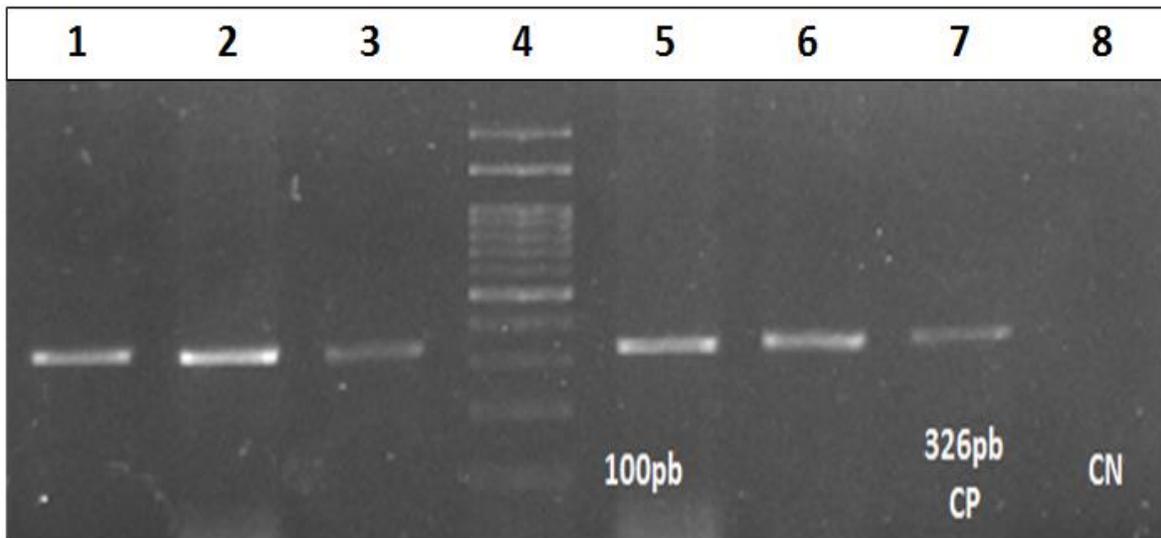
**Figura 9.** Detección por PCR convencional del gen de hierro *feoB* (470 pb, el amplicón) en cepas UPEC. Carriles 1-3, 5 y 6, gen *feoB* (470 pb) en cepas de *E. coli*; Carril 4, MWM (100 pb); Carril 7, control positivo (cepa de *E. coli* del cepario de Lab. Clínico); carril 8, Control negativo (sin DNA molde).



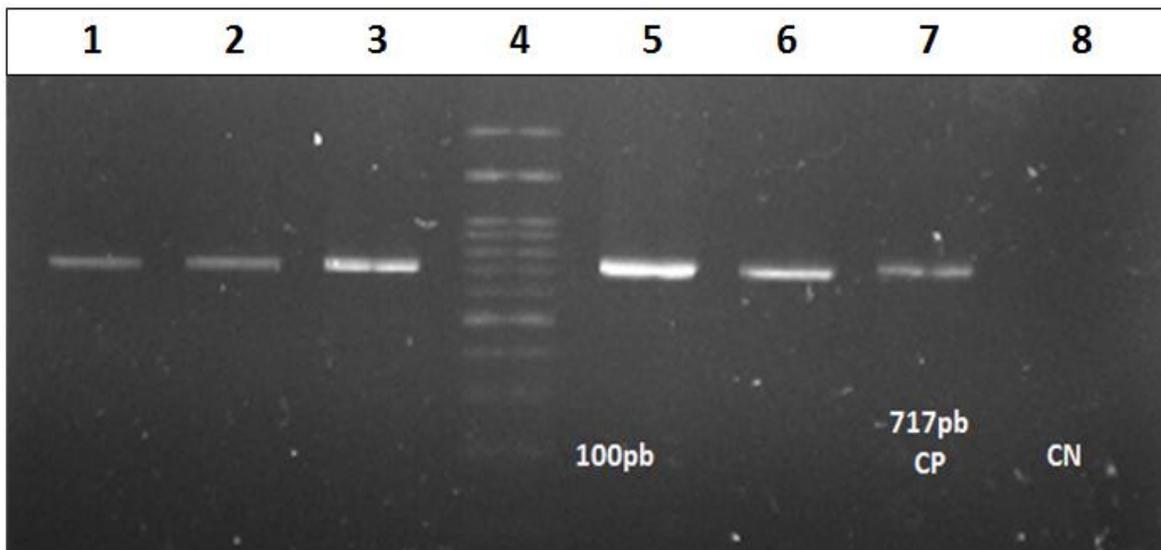
**Figura 10.** Detección por PCR convencional del gen de la protectina *traT* (290 pb, el amplicón) en cepas UPEC. Carriles 1-3, 5 y 6 gen *traT* (290 pb) en cepas de *E. coli*; Carril 4, MWM (100 pb); Carril 7, control positivo (cepa de *E. coli* del cepario de Lab. Clínico).



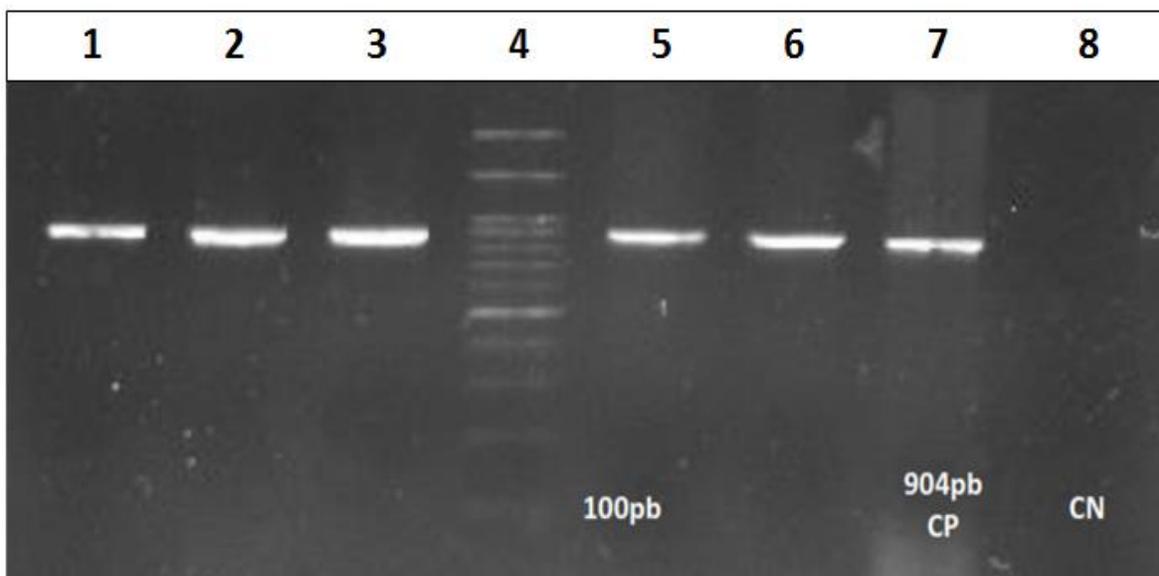
**Figura 11.** Detección por PCR convencional del gen de hierro *sitA* (608 pb el amplicón) en cepas UPEC; Carriles 5-17 gen *sitA* (608 pb) en cepas de *E. coli*; Carril 4, MWM (100 pb); Carril 19, control positivo (cepa de *E. coli* del cepario de Lab. Clínico); Carril 20, control negativo (sin DNA molde).



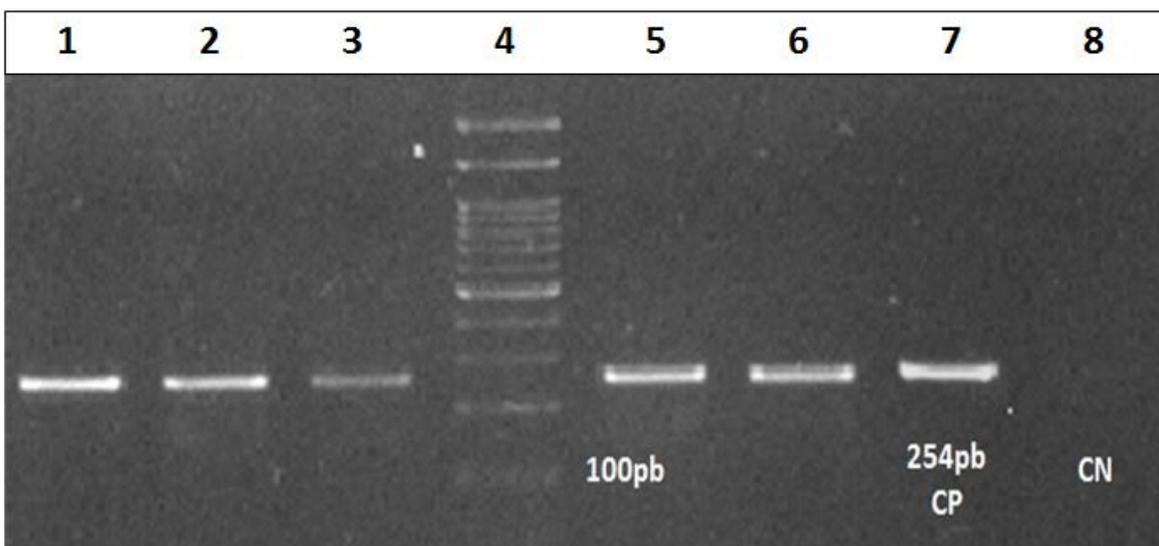
**Figura 12.** Detección por PCR convencional del gen de adhesión *papEF* (326 pb, el amplicón) en cepas UPEC. Carriles 1-3, 5 y 6, gen *papEF* (326 pb) en cepas de *E. coli*; Carril 4, MWM (100 pb); Carril 7, control positivo (cepa de *E. coli* del cepario de Lab. Clínico); carril 8, Control negativo (sin DNA molde).



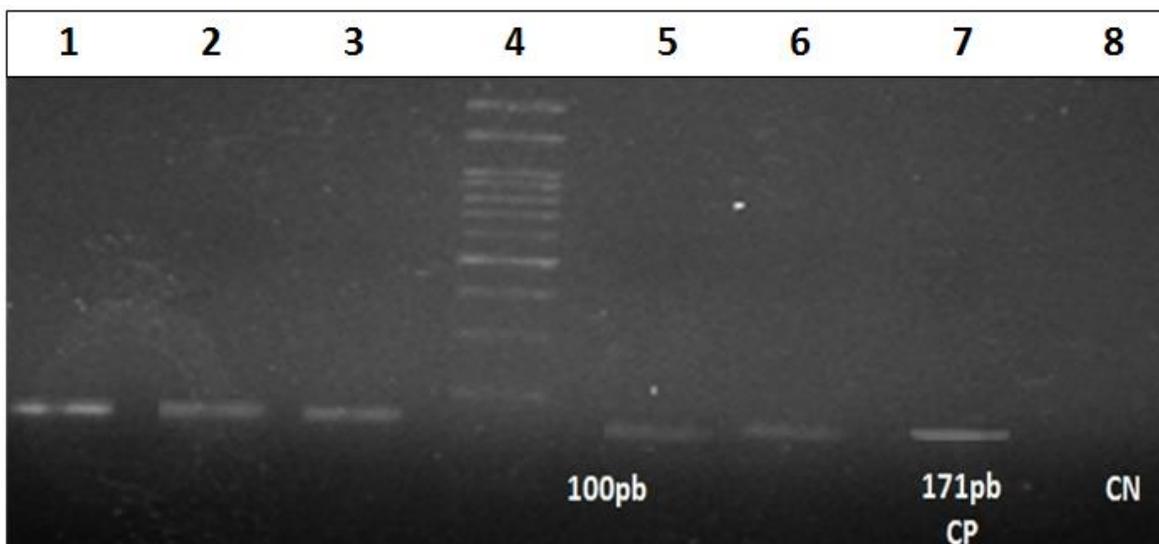
**Figura 13.** Detección por PCR convencional del gen de adhesión *papA* (717 pb, amplicón) en cepas UPEC. Carriles 1-3, 5 y 6 gen *papA* (717 pb) en cepas de *E. coli*; Carril 4, MWM (100 pb); Carril 7, control positivo (cepa de *E. coli* del cepario de Lab. Clínico); carril 8, Control negativo (sin DNA molde).



**Figura 14.** Detección por PCR convencional del gen de toxina *hlyD* (904 pb, el amplicón) en cepas UPEC. Carriles 1-3, 5 y 6 gen *hlyD* (904 pb) en cepas de *E. coli*; Carril 4, MWM (100 pb); Carril 7, control positivo (cepa de *E. coli* del cepario de Lab. Clínico); carril 8, Control negativo (sin DNA molde).



**Figura 15.** Detección por PCR convencional del gen *ireA* (254pb, amplicón) en cepas UPEC. Carriles 1-3, 5 y 6 gen *ireA* (254 pb); Carril 4, MWM (100 pb); Carril 7, control positivo (cepa de *E. coli* del cepario de Lab. Clínico); Carril 8, control negativo (sin DNA molde).



**Figura 16.** Detección por PCR convencional del gen *ibeA* (171 pb, amplicón) en cepas UPEC. Carriles 1-3, 5 y 6 gen *ibeA* (171 pb); Carril 4, MWM (100 pb); Carril 7, control positivo (cepa de *E. coli* del cepario de Lab. Clínico); Carril 8, control negativo (sin DNA molde).

### 6.6 Patrones de genes de virulencia en las cepas UPEC

En este estudio se encontraron 47 patrones diferentes de asociación de los genes de virulencia en las cepas UPEC (Tabla 8), dentro de los cuales el patrón más frecuente fue el No.1 (*traT-feoB-sitA*) con el 19.0% (n=37), seguido del patrón No. 2 (*traT-feoB*) con 12.3% (n=24), el patrón No.3 (*feoB-sitA*) con el 9.7% (n=19), el patrón No. 4 (*traT-ireA-feoB-sitA*) con 4.1% (n=8) y el patrón No.5 (*traT-papA-feoB-papEF-sitA*) con el 3.6% (n=7).

**Tabla 8.** Patrones de asociación de los factores de virulencia de *E.coli*

No. de patrón	Patrones de asociación	No. de cepas	%
1	<i>traT-feoB-sitA</i>	37	19.0
2	<i>traT-feoB</i>	24	12.3
3	<i>feoB-sitA</i>	19	9.7
4	<i>traT-ireA-feoB-sitA</i>	8	4.1
5	<i>traT-papA-feoB-papEF-sitA</i>	7	3.6
6	<i>hlyD-papA-feoB-papEF-sitA</i>	5	2.5
7	<i>hlyD-traT-feoB-sitA</i>	5	2.5
8	<i>traT-ireA-feoB</i>	4	2.0
9	<i>hlyD-traT-papA-feoB-papEF-sitA</i>	4	2.0
10	<i>traT-feoB-papEF-sitA</i>	4	2.0
11	<i>traT-feoB-papEF</i>	3	1.5
12	<i>hlyD-traT-feoB-papEF-sitA</i>	3	1.5
13	<i>hlyD-feoB-sitA</i>	3	1.5
14	<i>traT-feoB</i>	3	1.5
15	<i>traT-ireA-papA-feoB-papEF-sitA</i>	3	1.5
16	<i>traT-ireA-feoB-papEF-sitA</i>	3	1.5
17	<i>traT-sitA</i>	3	1.5
18	<i>papA-feoB-papEF-sitA</i>	2	1.0
19	<i>hlyD-traT-papA-feoB-papEF</i>	2	1.0
20	<i>traT-ireA-feoB-papEF</i>	2	1.0
21	<i>traT-papA-feoB-papEF</i>	2	1.0
22	<i>hlyD-feoB-papEF</i>	2	1.0
23	<i>traT-papA-feoB-papEF-sitA</i>	1	0.5
24	<i>feoB-papA-papEF</i>	1	0.5
25	<i>traT-papA-papEF-sitA</i>	1	0.5
26	<i>traT-papA-feoB-sitA</i>	1	0.5
27	<i>feoB-papEF</i>	1	0.5
28	<i>hlyD-traT-ibeA-sitA</i>	1	0.5
29	<i>traT-ireA-papEF-sitA</i>	1	0.5
30	<i>traT-ireA-papA-feoB-papEF</i>	1	0.5
31	<i>hlyD-traT-ireA-feoB-sitA</i>	1	0.5

32	<i>ireA-papA-feoB-papEF</i>	1	0.5
33	<i>ibeA-feoB-sitA</i>	1	0.5
34	<i>hlyD-traT-ireA-feoB</i>	1	0.5
35	<i>traT-ireA-papA-feoB</i>	1	0.5
36	<i>traT-ireA</i>	1	0.5
37	<i>hlyD-traT-ireA-feoB-papEF-sitA</i>	1	0.5
38	<i>hlyD-papA-feoB-sitA</i>	1	0.5
39	<i>hlyD-traT-feoB</i>	1	0.5
40	<i>papA-feoB</i>	1	0.5
41	<i>traT-papEF-sitA</i>	1	0.5
42	<i>traT-papA-papEF</i>	1	0.5
43	<i>traT-papEF</i>	1	0.5
44	<i>traT-ibeA-feoB-sitA</i>	1	0.5
45	<i>hlyD-traT-ireA-papA-feoB-papEF-sitA</i>	1	0.5
46	<i>hlyD-traT-ireA-papA-papEF</i>	1	0.5
47	<i>hlyD-ireA-papA-feoB-papEF-sitA</i>	1	0.5

## 7. DISCUSIÓN

### 7.1 Pacientes estudiados

Se analizaron molecularmente 194 cepas de *E. coli* aisladas de pacientes (157 mujeres y 37 hombres; Figura 5) provenientes de la Clínica oficial No. 64 del IMSS, Unidad Tequesquinhauac y del Hospital Regional No.72 del IMSS, Unidad Tlalnepantla, con signos y síntomas de infecciones en las vías urinarias (UTIs). Las infecciones en el tracto urinario frecuentemente ocurren en mujeres debido a la proximidad de la uretra-vagina-recto, pero también en niños, ancianos y en pacientes con el sistema inmune bajo; los cambios fisiológicos y anatómicos, la vida sexual activa y la edad contribuyen de manera importante para la aparición de las UTIs (Toval, 2014).

En este estudio se describió que el 95.3% (n= 187) de los diagnósticos en los pacientes estudiados correspondió a UTI's, seguido de pielonefritis, urosepsis e infección vaginal (1%, n=2) en cada caso (Tabla 6). Las cepas UPEC son el principal patógeno causante del 75% - 95% de las infecciones en las vías urinarias (UTI's), incluyendo cistitis y pielonefritis en la comunidad (Calderón *et al.*, 2013).

La incidencia de las UTI's en este trabajo fue mayor en mujeres (80.9%, n=157) con respecto a los hombres (19.1%, n=37; Figura 5). Estas infecciones afectan con mayor frecuencia al sexo femenino (Calderón *et al.*, 2013). La gran mayoría de las UTI's son producidas por microorganismos que provienen del colon y de la microbiota fecal del paciente (Andreua *et al.*, 2011).

En este estudio el rango de edad más frecuente fue el de 41 a 60 años (56%, n= 86), seguido de 61 a 86 años (26%, n=40) (Figura 6). La prevalencia de las UTI's aumenta con la edad, por ejemplo en las mujeres, después de la menopausia (disminución de estrógenos, atrofia de la mucosa vaginal e incontinencia) y debido al envejecimiento, se produce una alteración de los mecanismos fisiológicos y defensivos frente a las infecciones (Jiménez *et al.*, 2002). Se ha demostrado que la disminución de estrógeno en mujeres de entre 40 a 59 años disminuye la función del sistema retículo endotelial, el número de monocitos y de los macrófagos, haciendo deficiente el sistema inmune del hospedero (Baptista, 2006). Se ha

descrito que la ausencia de estrógenos incrementa el pH vaginal y reduce la concentración de *Lactobacillus acidophilus* favoreciendo el crecimiento de *E. coli* y otras enterobacterias.

## **7.2 Identificación de *E. coli* en las infecciones urinarias de los pacientes**

El 100% (n=194) de las cepas de *E. coli* fueron identificadas por las pruebas bioquímicas del Indol, reacción negativa para el citrato de Simmons, fermentación de glucosa, lactosa y D-manitol (Scheutz *et al.*, 2005) y mediante la detección del marcador cromosómico 16S RNA (Figura 7) por medio de PCR convencional (Lane *et al.*, 1985).

*Escherichia coli* es la principal agente de UTI's, cistitis, pielonefritis y prostatitis. Las cepas de *E. coli* patógenas derivan principalmente del grupo filogenético B2 (y en menor medida de Grupo D), estas bacterias poseen múltiples factores de virulencia que incluyen adhesinas, toxinas, sistemas de adquisición de hierro y protectinas que contribuyen a la colonización de superficies específicas del hospedado, evasión de las defensas inmunológicas, o daño directo a sus células y tejidos (Johnson & Stell, 2009). La frecuencia de las UTIs por cepas UPEC ha sido reportada recientemente en otros países (Derakhshandeh *et al.*, 2015; Mohajeri *et al.*, 2014).

## **7.3 Identificación de los marcadores de virulencia en cepas UPEC**

### **7.3.1 Adhesinas**

La adhesión bacteriana de las cepas UPEC es considerada el primer paso para la colonización, e internalización en las células epiteliales del tracto urinario. Ya en el interior de las células epiteliales, *E. coli* tiene la capacidad de formar una biopelícula que le protege contra la respuesta inmune del hospedero y frente la acción de los antibióticos. Actualmente se asocia la capacidad de formación de biopelículas con infecciones crónicas (Faleiro, 2009), causando un grave problema de salud pública en todo el mundo, incrementando los

gastos en los centros de salud, así como la morbilidad y mortalidad de los pacientes infectados (Zhao *et al.*, 2009).

La adhesión bacteriana es llevada a cabo mediante moléculas de superficie denominadas fimbrias P, fimbrias S, fimbrias F1C y fimbrias de tipo 1. La fimbria P asociada a pielonefritis es codificada por el gen *papA*. En este estudio se encontró que el gen *papA* fue encontrado en el 20.1% de las cepas (n=39) (Figura 13, tabla 7). Estos resultados coinciden con lo descrito por **Yun *et al.*, (2014)**, quienes identificaron *papA* en el 29% (n=64) de cepas UPEC aisladas de pacientes con UTIs de hospitales, y discrepan con lo descrito por **Rodriguez *et al.*, (2005)**, cuya frecuencia fue del 50% en cepas UPEC. **Derakhshandeh *et al.*, (2015)** describieron una frecuencia de *papA* del 9.4% en cepas UPEC, concluyendo que la mayor subunidad de la fimbria tipo B codificada por *papA* favorece la colonización en el tracto urinario y en el proceso de la pielonefritis.

El gen *papEF* está asociado a infecciones graves e invasivas del tracto urinario y es activo en la progresión de UTIs sintomática. En este estudio *papEF* fue encontrado en el 29.3% (n=57) (Figura 12) de las cepas de *E. coli*, mientras que **Rodriguez *et al.*, (2005)** lo detectó en el 51% de cepas UPEC.

En este estudio el gen *ibeA* fue identificado en el 1.5% (n=3, Tabla 7, Figuras 8 y 16) de las cepas UPEC, coincidiendo con lo descrito por **Johnson & Stell, (2011)**, quienes lo identificaron en el 4% de cepas UPEC. El gen *bmaE* no se presentó en ninguna de las cepas, sin embargo, **Yun *et al.*, (2014)** lo identificaron en el 1% de cepas UPEC.

### 7.3.2 Sistemas de adquisición de hierro (*feoB* y *sitA*)

El hierro es un nutriente esencial para el crecimiento y proliferación de *E. coli*, fungen su función como cofactor de proteínas en procesos como la síntesis de precursores de ADN (nucleótidos), reducción de peróxido, la respiración y el transporte de oxígeno. En el proceso de infección UPEC depende de la capacidad para adquirir hierro del ambiente (**Lau *et al.*, 2013**). El hierro presente en el espacio periplásmico puede ser transportado hacia el citosol contra gradiente de concentración, por el complejo proteico conocido como

Feo (**Drago, 2009**). Se ha descrito que la proteína FeoB es el principal transportador de hierro en la membrana citoplasmática en condiciones anaerobias (**Lau et al., 2013**). En este estudio se encontró que el gen *feoB* fue identificado en el 91.7% (n= 178) (Tabla 7, figura 9) de las cepas analizadas. Este porcentaje coincide con el 99% (n=198) descrito en un grupo de cepas UPEC aisladas de pacientes con UTIs (**Rodriguez et al., 2005**).

Las cepas de UPEC poseen receptores transmembranales para sideróforos como SitA e IreA que quelan los iones hierro. En este estudio se detectó el gen *sitA* en el 61. 8% (n=20) de las cepas (Tabla 7, figura 11) y el gen *ireA* en el 15.9% (n=31) (Tabla 7, figura 15). *sitA* ha sido descrito en el 15.3% de cepas UPEC (**Derakhshandeh et al., 2015**), mientras que el porcentaje de *ireA* se ha descrito en el 58.8% de cepas de *E. coli* de UTIs (**Li et al., 2016**).

### 7.3.3 Toxinas

UPEC posee diferentes factores de virulencia entre las que destacan diversas toxinas, como la toxina proteica alfa-hemolisina (HlyA) y el factor necrotizante citotóxico 1 (CNF-1), los cuales pueden alterar las cascadas de señalización de las células, así como la respuesta inflamatoria e inducir muerte celular. Se ha descrito que estas hemolisinas pueden causar lisis osmótica de las células, estimulan la ruptura de la barrera epitelial y son las responsables de la translocación de la bacteria desde el tracto digestivo al torrente sanguíneo para finalmente diseminarse y colonizar diferentes tejidos como el tracto urinario (**Bakas et al., 2013**). En este estudio se identificó el gen *hlyD* en el 17% (n=33) de las cepas UPEC (Tabla 7, Figura 14). Se han descrito porcentajes de detección de *hlyD* del 11% (n=21) y del 21.2% en cepas UPEC (**Zhao et al., 2009; Derakhshandeh et al., 2015**).

### 7.4 Protectinas en cepas UPEC

*Escherichia coli* uropatógena presenta diferentes genes de protección contra la fagocitosis, como *kpsmT* lo que les permite la supervivencia en suero, como *iss* y *trata* (outer-membrane protein gene; serum resistance). En este estudio se encontró que *trata* fue

identificado en el 73.1% (Tabla 7, figura 10). Este porcentaje es semejante el descrito por **Lopez-Banda et al., (2014)**, quienes describieron que *traT* fue identificado en el 77.8% de cepas UPEC, y también coincide con el 70.5% reportado por **Rodriguez-Siek et al., (2005)** en cepas de *E. coli* aisladas de UTIs.

### 7.5 Patrones de asociación de los genes de virulencia en las cepas UPEC

En este estudio se encontraron 47 patrones diferentes de asociación de los genes de virulencia en las cepas UPEC (Tabla 8), dentro de los cuales el patrón más frecuente fue el No.1 (***traT-feoB-sitA***) con el 19.0% (n=37), seguido del patrón No. 2 (***traT-feoB***) con 12.3% (n=24), el patrón No.3 (***feoB-sitA***) con el 9.7% (n=19), el patrón No. 4 (***traT-ireA-feoB-sitA***) con 4.1% (n=8) y el patrón No.5 (***traT-papA-feoB-papEF-sitA***) con el 3.6% (n=7). Estos resultados muestran que las cepas uropatógenas de *E. coli* poseen diferentes genes que codifican para adhesinas, sistemas de adquisición de hierro, toxinas y protectinas, lo que podría provocar infecciones más severas como cistitis o pielonefritis.

Los diferentes patrones de asociación de los marcadores de virulencia en las cepas UPEC han recibido recientemente especial atención, sobre todo asociados a los diferentes serogrupos (**Abe et al., 2008**) o en combinación con los fenotipos de resistencia a los antibióticos y con los serogrupos (**Paniagua et al., 2015**).

## 8. CONCLUSIONES

- I. *Escherichia coli* se encontró frecuentemente asociada a las infecciones de las vías urinarias de los pacientes estudiados.
- II. Los genes identificados con mayor frecuencia entre las cepas de *E. coli* fueron el gen que codifica para adquisición de hierro *feoB*, para la toxina *traT*, para la protectina *sitA* y para la adhesina *papEF*.
- III. El patrón de asociación con mayor frecuencia entre las cepas UPEC fue *traT-feoB-sitA*.
- IV. La elevada frecuencia de los genes en las cepas UPEC y los diferentes patrones de asociación de los marcadores de virulencia que codifican para adhesinas, sistemas de adquisición de hierro, toxinas y protectinas, demuestran la capacidad de las cepas para provocar patologías más agudas como cistitis y/o pielonefritis.

## 9. REFERENCIAS

1. Abe CM, Salvador FA, Falsetti IN, Vieira MAM, Blanco J, Blanco JE, Blanco M, Machado AMO, Elias WP, Hernandez RT, Gomes TAT. 2008. Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) strains may carry virulence properties of diarrhoeagenic *E. coli*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 52: 397-406
2. Andreu A, Cacho J, Coira A, Lepe JA. 2010. Diagnóstico microbiológico de las infecciones del tracto urinario. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 29: 52-57.
3. Bakás L, Maté S, Vazquez R, Herlax V. 2013. Mecanismo de acción de la toxina alfa hemolisina de *Escherichia coli*. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* 47: 353-361.
4. Baptista GH. 2006. Edad y menopausia. *Médica sur México* 13:1-3.
5. Berry RE, Klumpp DJ, Schaeffer AJ. 2009. Urothelial cultures support intracellular bacterial community formation by uropathogenic *Escherichia coli*. *Infec immun* 77: 2762-2772
6. Bien J, Sokolova O, Bozko P. 2012. Role of uropathogenic *Escherichia coli* virulence factors in development of urinary tract infection and kidney damage. *International Journal of Nephrology* 2012: 1-15
7. Boop CA, Brenner FW, Wells JG, Strockbine N. 1999. *Escherichia*, *Shigella*, and *Salmonella*. En: *Manual De Microbiología Clínica*. 459-474 p.
8. Calderón JE, Román CG, Galindo FA, Gutiérrez PE & Juárez LS. 2013. Diagnóstico y tratamiento de las infecciones en vías urinarias: un enfoque multidisciplinario para casos no complicados. *Bol Med Hosp Infant Mex* 70: 3-10.
9. Chen SL, Wu M, Henderson JP, Hooton TM, Hibbing ME, Hultgren SJ, Gordon JI. 2013. Genomic diversity and fitness of *E. coli* strains recovered from the intestinal and urinary tracts of women with recurrent tract urinary infection. *Science Translational medicine*. 5: 1-25
10. Conover MS, Ruer S, Taganna J, Kalas V, De Greve V, Pinkner JS, Dodson KW, Remaut H, Hultgren SJ. Inflammation-induced adhesin-receptor interaction

- provides a fitness advantage to uropathogenic *E. coli* during chronic infection. *Cell host & microbe* 20: 482-492
11. Derakhshandeh A, Firouzi R, Motamedifar M, Arabshahi S, Novinrooz A, Motamedi BA, Bahadori M, Heidari S. 2015. Virulence characteristics and antibiotic resistance patterns among various phylogenetic groups of uropathogenic *Escherichia coli* isolates. *Jpn. J. Infect. Dis.* 68: 428-431
  12. Derakhshandeh A, Firouzi R, Motamedifar M, Motamedi Boroojeni A, Bahadori M, Arabshahi S, Novinrooz A, Heidari S. 2015. Distribution of virulence genes and multiple drug-resistant patterns amongst different phylogenetic groups of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from patients with urinary tract infection. *Lett Appl Microbiol* 60:148-54.
  13. Drago SME. 2009. Sistemas de adquisición de hierro en *Salmonella entérica*. *Rev Biomed* 20: 41-54.
  14. Ejrnæs K. 2011. Bacterial characteristics of importance for recurrent urinary tract infections caused by *Escherichia coli*. *Danish medical bulletin* 58: 1-22
  15. Emamghorashi F, Farshad S, Kalani M. 2011. Relationship between O serotype and virulent genes in *Escherichia coli* causing urinary tract infections. *Iranian Journal of Kidney diseases* 5: 234-237
  16. Faleiro NPL. 2010. Formación de biopelículas por *Escherichia coli* y su correlación con factores de virulencia: Prevención y actividad de antimicrobianos frente a organismos planctónicos y asociados a biopelículas. Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid.
  17. Farmer JJ. 1995. *Enterobacteriaceae*: Introduction and identification. En: *Manual De Microbiología Clínica*. 440 pp.
  18. Firoozeh F, Saffari M, Neamati F, Zibaei M. 2014. Detection of virulence genes in *Escherichia coli* isolated from patients with cystitis and pyelonephritis. *International Journal of Infectious Diseases* 29: 219-222.
  19. Geerlings SE. 2016. Clinical presentations and epidemiology of urinary tract infections. *Microbiology spectrum American society for microbiology press*. 4:
  20. Guzmán DAM, Valdivieso DA. 1997. Infección urinaria: Diagnóstico y tratamiento. *Boletín Escuela de Medicina. Pontificia Universidad Católica de Chile*. 26:150-155

21. Hannaoui REJ, Bettina VL, Martínez NRE. 2009. *Escherichia coli* shigatoxigénica: Patogénesis, diagnóstico y tratamiento. Revista de la sociedad venezolana de microbiología 29: 13-20
22. Jiménez JF, Broseta E, Gobernado M. 2002. Infección urinaria. Actas Urol Esp 26: 563-573.
23. Johnson JR. 1991. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. Clinical microbiology reviews 4: 80-128
24. Johnson JR, Stell AL. 2000. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. The Journal of Infectious Diseases 181: 261-272
25. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schracken PC, Winn WC. 1999. Diagnóstico Microbiológico. Editorial Médica Panamericana. Cáp.4: Enterobacteriaceae. 171-200 p.
26. Lane DJ, Pace B, Olsen GJ, Stahl DA, Sogin ML & Pace NR. 1985. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. Proc Natl Acad Sci USA 82: 6955-6959.
27. Lau CKY, Ishida H, Liu Z, & Voge JH. 2013. Solution Structure of *Escherichia coli* *FeoA* and Its Potential Role in Bacterial Ferrous Iron Transport. University of Calgary, Canada. J Bacteriol 195: 46-55.
28. Li Y, Dai J, Zhuge X, Wang H, Hu L, Ren J, Chen L, Li D & Tang F. 2016. Ironregulated gene *ireA* in avian pathogenic *Escherichia coli* participates in adhesion and stress-resistance. BMC Veterinary Research 12: 1-10.
29. López-Banda DA, Carrillo-Casas EM, Leyva-Leyva M, Orozco-Hoyuela G, Manjarrez-Hernández AH, Arroyo-Escalante S, Moncada-Barrón D, Villanueva-Recillas S, Xicohtencatl-Cortes J, Hernández-Castro R. 2014. Identification of virulence factors genes in *Escherichia coli* isolates from women with urinary tract infection in México. BioMed Research International. 2014: 1-10
30. Lüthje P, Brauner A. 2014. Virulence factors of uropathogenic *E. coli* and their interaction with the host. Advances in microbial physiology 65: 338-372

31. Marques LPJ, Flores JT, Barros JOO, Rodrigues GB, Mourão CM, Moreira RMP. 2012. Epidemiological and clinical aspects of urinary tract infection in community-dwelling elderly women. *Braz J infec dis* 16: 436-441
32. McLellan LK, Hunstad DA. 2016. Urinary tract infection: Pathogenesis and Outlook. *Trends in molecular medicine* 22: 946-957
33. Millán Y, Hernández E, Millán B, Araque M. 2014. Distribución de grupos filogenéticos y factores de virulencia en cepas de *Escherichia coli* uropatógena productora de  $\beta$ -lactamasa CTX-M-15 aisladas de pacientes de la comunidad en Mérida, Yucatán. *Revista Arg microbiol* 46: 175-181
34. Mobley HLT, Alteri CJ. 2015. Development of a Vaccine against *Escherichia coli* urinary tract infections. *Pathogens* 5: 1-8
35. Mohajeri P, Khademi H, Ebrahimi R, Farahani A, Rezaei M. 2014. Distribution of uropathogenic virulence genes in *Escherichia coli* isolated from patients with urinary tract infection. *Int J Appl Basic Med Res* 42: 111-116.
36. Momtaz H, Karimian A, Madani M, Safarpour DF, Ranjbar R, Sarshar M, Souod N. 2013. Uropathogenic *Escherichia coli* in Iran: serogroup distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials* 12: 1-12
37. Mulvey MA. 2002. Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*. *Cell microbiol* 4: 257-271.
38. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. 2014. *Microbiología médica*. Edición Elsevier 7a edición. España. 872 pp .
39. Neidhardt FC, 1996. *Escherichia coli* and Salmonella cellular and molecular biology. USA. 1549 pp.
40. Orchard G, Nation B. 2015. *Cell structure & function*. Oxford university press. United Kingdom. 500 pp.
41. Paniagua CG, Monroy-Pérez E, Rodríguez MR, Domínguez TP, Vaca PF, Vaca S. 2015. Virulence factors, antibiotic resistance phenotypes and O-serogroups of *Escherichia coli* strains isolated from community- acquired urinary tract infection patients in Mexico. *J Microbiol, Immunity Infec.* S1684-1182(15)00827-0.

42. Paniagua CG, Monroy-Pérez E, Vaca S. 2007. PCR Manual de identificación de *Escherichia coli* y *Salmonella spp* en materia fecal. FES Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México. 75 pp.
43. Puerta-García A, Mateos-Rodríguez F. 2010. Enterobacterias. *Medicine* 10: 3426-3431
44. Rodicio MR, Mendoza MC. 2004. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: Fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 22: 238-245
45. Rodríguez-Angeles G. 2002. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud pública de México* 44: 464-475
46. Rodríguez-Siek KE, Giddings CW, Doetkott C, Johnson TJ, Fakhr MK, Nolan LK. 2005. Comparison of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis. *Microbiology* 151: 2097-2110
47. Runyen-Janecky LJ, Reeves SA, Gonzales EG, Payne SM. 2003. Contribution of the *Shigella flexneri* Sit, luc, and feo iron acquisition systems to iron acquisition *in vitro* and in cultured cells. *Infection and immunity* 71: 1919-1928
48. Sánchez-Veja JT, Zavala JT. 2003. Fundamento de Microbiología Médica. Méndez Editores. 238-246 p.
49. 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.
50. Shookohi M, Rashki A. 2016. Prevalence of toxigenic genes in *Escherichia coli* isolates from hospitalized patients in Zabol, Iran. *Int J Enteric Pathog.* 4: 11-15
51. Tarchouna M, Ferjani A, Ben-Selma W, Boukadida J. 2013. Distribution of uropathogenic virulence genes in *Escherichia coli* isolated from patients with urinary tract infection. *International Journal of Infectious Diseases* 17: 450-453
52. Tenailon O, Skurnik, D, Picard B, Denamur, E. 2010. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 8: 207-217
53. Toval F, Köhler CD, Vogel U, Wagenlehner F, Mellmann A, Fruth A, Schmidt MA, Karch H, Bielaszewska M, Dobrindt U. 2014. Characterization of *Escherichia coli*

- isolates from hospital inpatients or outpatients with urinary tract infection. *Journal of clinical microbiology* 52: 407-418
54. Ullet GC, Totsika M, Schaale K, Carey AJ, Sweet MJ, Schembri MA. 2013. Uropathogenic *Escherichia coli* virulence and innate immune responses during urinary tract infection. *Current opinion in Microbiology* 16: 100-107
55. Valdevenito SJP. 2008. Infección urinaria recurrente en la mujer. *Rev chil infectol* 25: 268-276
56. Wein AJ, Kavoussi LR, Novick AC, Partin AW. 2008. *Campbell-Wash Urología*. Editorial Medica Panamericana. Argentina. 1127 pp.
57. Wiles TJ, Kulesus RR, Mulvey MA. 2008. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Experimental and molecular pathology* 85: 11-19
58. Yamamoto S, Terai A, Yuri K, Kurazono H, Takeda Y, Yoshida O. 1995. Detección de factores de uro-virulencia de *E.coli* por medio de la reacción polimerasa multiplex. *Immunology Med Microbiol* 12: 85-90
59. Yun KW, Kim HY, Park HK, Kim W, Lim IS. 2014. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* of urinary tract infections and asymptomatic bacteriuria in children. *Journal of microbiology immunology and infection* 47: 455-461
60. Zhao L, Gao S, Huan H, Xu X, Zhu X, Yang W, Gao Q, Liu X. 2009. Comparison of virulence factors and expression of specific genes between uropathogenic *Escherichia coli* and avian pathogenic *E. coli* in a murine urinary tract infection model and a chicken challenge model. *Microbiol* 155: 1634– 1644.