



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Función de los plásmidos de *Escherichia coli* (*E. coli*)
uropatógena en la adherencia e invasividad a células epiteliales**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

Juárez Espíndola Raquel Nayelli



CIUDAD DE MÉXICO

2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesora: Carmen Adriana Mendoza Rodríguez

VOCAL: Profesor: Luciano Hernández Gómez

SECRETARIO: Profesor: H. Ángel Manjarrez Hernández

1er. SUPLENTE: Profesor: Francisco Javier Díaz García

2° SUPLENTE: Profesora: Sara Margarita Garza Aguilar

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO DE PATOGÉNESIS BACTERIANA, DEPARTAMENTO DE SALUD PÚBLICA, FACULTAD DE MEDICINA, UNAM. UBICADO EN EL HOSPITAL GENERAL “DR. MANUEL GEA GONZÁLEZ”.

ASESOR DEL TEMA:

Dr. H. Ángel Manjarrez Hernández

SUPERVISOR TÉCNICO:

Dra. Sandra Gavilanes Parra

SUSTENTANTE:

Juárez Espíndola Raquel Nayelli

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química, que me dieron las herramientas para mi formación académica.

Al comité del programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), por el apoyo al proyecto IN228916.

A mi asesor de tesis Dr. H. Ángel Manjarrez Hernández y mi supervisor técnico Dra. Sandra Gavilanes Parra, por todo el tiempo, enseñanzas, consejos y apoyo.

Al Laboratorio de Patogénesis Bacteriana del Departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina ubicado en el Hospital General “Dr. Manuel Gea González”

A los miembros del jurado, por sus consejos y la atención que presentaron al revisar éste trabajo.

A Pedro, mi compañero de laboratorio, por sus aportaciones y consejos en éste trabajo.

ÍNDICE

Resumen	7
Introducción.....	8
Marco Teórico	9
1. Infección del tracto urinario (ITU)	9
1.1 Clasificación de las ITU	10
1.2 Epidemiología de las ITU	11
1.3 Infección recurrente del tracto urinario (IRTU)	11
2. <i>E. coli</i>	11
2.1 Patotipos intestinales	12
2.2 <i>E. coli</i> patógenas extraintestinales (ExPEC)	14
2.2.1 <i>E. coli</i> uropatógena (UPEC)	14
2.2.1.1. Generalidades de UPEC	14
2.2.1.2. Factores de virulencia de UPEC.....	15
2.2.1.3. Adherencia de UPEC a células epiteliales.....	17
2.2.1.3.1. Fimbria P (pili asociado a pielonefritis, <i>pap</i>).	17
2.2.1.3.2. Fimbria tipo 1.	18
2.2.1.4 Invasividad de UPEC a células epiteliales	19
3. Plásmidos	21
3.1 Plásmidos en ExPEC.....	23
Justificación	24
Hipótesis	25
Objetivos.....	25
Materiales y Métodos.....	26
1. Cepas y condiciones de crecimiento	26
2. Perfil plasmídico	27
3. Ensayo de invasividad de protección con gentamicina	27
4. Selección de subclonas a partir de una cepa de <i>E. coli</i> 1162Ori.	29
5. Ensayo de adherencia a células epiteliales	29
6. Obtención de la huella molecular de subclonas a partir de la amplificación aleatoria de DNA polimórfico (RAPD-PCR)	31
7. Aparatos.....	32
8. Reactivos.....	33
Resultados	34
Discusión	40
Conclusiones	46
Referencias.....	47
Apéndice	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la Fimbria P y Fimbria tipo 1	19
Figura 2. Eventos que promueven el establecimiento y recurrencia de las infecciones del tracto urinario (ITU)	21
Figura 3A y 3B. Perfil plasmídico de cepas de <i>E. coli</i> aisladas de IRTU	34
Figura 4. Perfil plasmídico de las subclonas obtenidas a partir de la cepa de <i>E. coli</i> 1162Ori.....	37
Figura 5. Perfil electroforético (huella molecular) obtenido por RAPD-PCR.....	39
Figura 6. Dendograma construido con la cepa 1162Ori y las subclonas InvT2, MM206, 1162C y 1162RC.....	40

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Identificación de <i>E. coli</i>	12
Tabla 2. Patotipos intestinales de <i>E. coli</i>	13
Tabla 3. <i>E. coli</i> causante de infecciones extraintestinales	14
Tabla 4. Factores de virulencia de UPEC	15
Tabla 5. Clasificación para el tipo de invasividad	28
Tabla 6. Clasificación para el tipo de adherencia	31
Tabla 7. Volúmenes de reactivos y condiciones para la realización de análisis de RADP	32
Tabla 8. Relación entre la capacidad de invadir células HEp-2 y la presencia de plásmidos en las 26 cepas de <i>E. coli</i>	36
Tabla 9. Invasividad de las subclonas obtenidas a partir de la cepa de <i>E. coli</i> 1162Ori	38
Tabla 10. Adherencia de las subclonas a células HEp-2.	38
Tabla 11. Subclonas derivadas de la cepa <i>E. coli</i> 1162Ori causante de IRTU	38

LISTA DE ABREVIATURAS

- APEC: *Escherichia coli* patogénica aviar
- BLEE: Betalactamasas de espectro extendido
- DAEC: *Escherichia coli* de adherencia difusa
- DNA: Ácido desoxirribonucleico.
- EHEC: *Escherichia coli* enterohemorrágica
- EIEC: *Escherichia coli* enteroinvasiva
- EPEC: *Escherichia coli* enteropatógena
- ETEC: *Escherichia coli* enterotoxigénica
- ExPEC: *Escherichia coli* patogénica extraintestinal
- HEp-2: Células epiteliales de carcinoma de laringe humano.
- IBC: Comunidades bacterianas intracelulares
- IPA: Isla de patogenicidad.
- IRTU: Infecciones recurrentes del tracto urinario
- ITU: Infecciones del tracto urinario
- kb: kilobases
- MNEC: *Escherichia coli* causante de meningitis y septicemia
- MRHA: Manosa resistente a hemoaglutinación
- MSHA: Manosa sensible a hemoaglutinación
- PBS: Solución buffer de fosfatos
- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
- RAPD-PCR: Análisis de amplificación aleatoria de DNA polimórfico
- SFB: Suero fetal de bovino
- SSTIII: Sistema de secreción tipo III
- UFC: Unidades formadoras de colonias.
- UPEC: *Escherichia coli* uropatógena
- µL: microlitros
- X g: Fuerza relativa centrífuga

RESUMEN

Las Infecciones del Tracto Urinario (ITU) son una de las enfermedades infecciosas bacterianas más frecuentes y en la mayoría de los casos es causada por *E. coli* uropatógena (UPEC). Un problema adicional de las ITU son las infecciones recurrentes (IRTU), las cuales son muy comunes en mujeres aún después de tratamientos con los antimicrobianos apropiados. Investigaciones recientes muestran que la capacidad de invadir células uroepiteliales de la vejiga, por parte de algunas cepas UPEC, contribuyen a las recurrencias.

Se ha observado que algunas cepas de *E. coli* aisladas de ITU presentan plásmidos grandes (mayores a 40 kb). Sin embargo, se desconoce si las cepas aisladas de IRTU portan plásmidos, y si éstos tienen genes que codifiquen para fimbrias o adhesinas u otros factores de virulencia que le permitan a la bacteria permanecer en el hospedero. El objetivo del presente estudio es conocer los perfiles plasmídicos de cepas de *E. coli* aisladas de IRTU e investigar la posible participación de los plásmidos en la invasividad a células epiteliales.

Metodología: Se estudiaron 26 cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con IRTU. La extracción de plásmidos se realizó por el método de Lisis Alcalina y el perfil plasmídico se obtuvo por medio de electroforesis en geles de agarosa. Los ensayos de invasividad se realizaron mediante la técnica de protección con gentamicina en células epiteliales humanas HEp-2. Para demostrar la relevancia de un plásmido en la invasividad se seleccionaron subclonas (con plásmidos de diferente tamaño) a partir de una cepa de IRTU invasiva que porta 3 plásmidos. Los resultados mostraron que 22 cepas (80%) de las 26 estudiadas poseen algún plásmido grande; el ensayo de invasividad mostró que de estas 22 cepas 21 cepas (81%) fueron invasivas en células epiteliales HEp-2. Una cepa (1162Ori) presentó 3 plásmidos, y de esta cepa se obtuvieron 4 subclonas con las siguientes características: 2 subclonas tienen un solo plásmido de ≈ 90 kb (InvT2 y MM206) las cuales son capaces de invadir células; las otras dos subclonas (1162RC y 1162C) portan otro plásmido de ≈ 50 kb y resultaron incapaces de invadir células. Las subclonas no mostraron cambio en la adherencia a las células HEp-2.

Los resultados indican que posiblemente hay una relación entre la presencia del plásmido de ≈ 90 kb y la capacidad de invadir células epiteliales.

INTRODUCCIÓN

Las Infecciones del Tracto Urinario (ITU) representan en frecuencia una de las enfermedades infecciosas bacterianas más importantes del mundo. Las mujeres que presentan su primer episodio de ITU tienen la probabilidad de desarrollar un segundo episodio en un 25% a 44% y 3% de presentar un tercer episodio en los siguientes 6 meses de la UTI inicial (Cusumano *et al.*, 2010).

La recurrencia ocurre a pesar de un adecuado tratamiento antimicrobiano. Un gran porcentaje (77%) de las ITU recurrentes son causadas por la misma cepa que causó la primera infección, dichos resultados apoyan el hallazgo de reservorios de *E. coli* uropatógena (UPEC) dentro de las células del individuo afectado (Ejrnaes *et al.*, 2006).

Utilizando la cepa clínica UPEC UTI89 en el modelo de cistitis de ratón, se ha demostrado que en la patogénesis de las ITU pueden existir bacterias intracelulares y extracelulares, las cuales pueden dar origen a la formación de Comunidades Intracelulares Bacterianas (IBC). La formación de estas IBC son un mecanismo de defensa por parte de UPEC ante de la respuesta inmunitaria del hospedero ya que escapan hacia el citoplasma de las células del uroepitelio donde son capaces de replicarse formando comunidades bacterianas intracelulares parecidas a una biopelícula (Glover *et al.*, 2014).

Se han descrito las características de cepas de UPEC aisladas de ITU recurrentes donde se observó que el 75% son multiresistentes a los antimicrobianos, esto es que son resistentes a 3 o más familias de antimicrobianos, 37% de las cepas expresan enzimas tipo BLEE (betalactamasas de espectro extendido), 75% son formadoras de biopelícula de tipo fuerte y moderada, en relación al perfil plasmídico 84% de las cepas aisladas de las ITU mostraron plásmidos de alta masa molecular, mayores a 50 kb (Chavero, 2015).

La capacidad de invisibilidad por parte de UPEC no solo ha sido observada en el modelo de cistitis de ratón. En estudios recientes con biopsias de vejiga de 32 mujeres se observó que después del tratamiento con antimicrobianos y

teniendo ya muestras de orina estériles se identificaron que 6 de las 32 muestras (18.75%) presentaban UPEC. Estos resultados dan evidencia que la formación de las IBC puede ocurrir también en humanos y juega un papel importante en las ITU recurrentes (Liu *et al.*, 2016).

Referente a los plásmidos, se ha descrito que estos pueden contener genes de invasividad, como es el caso de *Shigella sp* donde las proteínas denominadas Ipa (por “invasión Plasmid antigen”) están involucradas directamente con la invasividad celular. Estas proteínas son exportadas al exterior por medio del Sistema de Secreción tipo III (SSTIII) (Schroeder *et al.*, 2008). El tamaño del plásmido de *Shigella sp* (pINV) es de 220 kb y es esencial para el proceso de invasión, ya que las cepas que carecen de él son incapaces de internalizarse en las células, mientras que al ser transferido este plásmido a otras especies, estas ganan la capacidad de invadir células (Barrantes *et al.*, 2009).

En este trabajo se estudiará si los plásmidos que contienen algunas cepas de *E. coli* aisladas de IRTU tienen relación con el proceso de invasividad a células epiteliales y ser, por consecuencia, un factor importante en la recurrencia de la infección.

MARCO TEÓRICO

1. Infecciones del tracto urinario (ITU)

Las ITU son un proceso inflamatorio que se presenta por la colonización y multiplicación microbiana en el tracto urinario (riñón, uréteres, vejiga, uretra, etc.) que sobrepasa la capacidad de defensa inmunitaria del individuo afectado.

Una serie de patógenos han sido implicados en las infecciones urinarias, tanto bacterias gram-positivas, bacterias gram-negativas y ciertos hongos: *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus saprophyticus* y *Enterococcus faecalis*, así también el género de *Candida* puede causar ITU de manera oportunista. Sin embargo, las ITU son causadas principalmente por *E. coli*

uropatógena (UPEC) con una frecuencia de 85% en todos los casos (Foxman, 2002; Hultgren, 2002; Kucheria *et al.*, 2005).

1.1 Clasificación de las ITU

Las ITU se clasifican como complicadas o no complicadas, de acuerdo al tipo de infección y la duración de la terapia antimicrobiana administrada al paciente. Las infecciones urinarias no complicadas suelen afectar a los niños, las mujeres y los ancianos que no presentan anomalías estructurales del tracto urinario, raramente causan daño serio y se dividen en ITU no complicada superior como es la pielonefritis (riñón) y las ITU no complicada inferior como es la cistitis (vejiga). Por otro lado, las ITU complicadas se asocian con un mayor riesgo de infección crónica y/o recurrente, pueden estar relacionadas con anomalías del tracto urinario tales como la obstrucción urinaria, retención, inmunosupresión, exposición previa a antibióticos e insuficiencia renal, por lo que se aumenta el riesgo a que el tratamiento no sea exitoso (Hooton, 2012; Flores-Mireles *et al.*, 2015; Mann *et al.*, 2017).

1.2 Epidemiología de las ITU

A nivel mundial, se ha reportado que más del 80% de las mujeres presentan un episodio de ITU a lo largo de su vida, siendo esta enfermedad en muchos casos asintomática. Las ITU pueden ser adquiridas en la comunidad por falta de higiene o bien cuando el paciente se encuentra inmunocomprometido. Ocurren en ambos géneros, hombres y mujeres, siendo las mujeres propensas a presentar ITU con mayor frecuencia por su anatomía, ya que el recto se encuentra más cerca de la uretra, 50% de las mujeres han presentado al menos una vez ITU durante su vida, o bien, de 11 a 3 mujeres han presentado una ITU antes de los 24 años (Foxman, 2002), y aproximadamente 2-7% de embarazadas presentan ITU en algún momento de la gestación.

Otros factores que ayudan a que se presente una ITU es la obstrucción del tracto, micción incompleta y defectos en la anatomía de las personas. Los factores de riesgo adicionales incluyen el historial previo de infecciones urinarias, uso de

anticonceptivos con espermicida, bajos niveles de estrógenos vaginales y antecedentes genéticos.

1.3 Infecciones recurrentes del tracto urinario (IRTU)

Se define que un paciente tiene una infección urinaria recurrente (IRTU) cuando presenta tres o más ITUs sintomáticas en un plazo de 12 meses o cuando presenta dos o más ITUs sintomáticas en seis meses. La recurrencia puede deberse a una reinfección o a una recaída. En la mayoría de los casos las IRTU se debe a una recaída o persistencia bacteriana (77%) en este caso la bacteria que causa el segundo episodio es la misma que causó el primer episodio, por lo que se encuentra alojada en el tracto urinario y sigue causando la infección aún después del tratamiento con antimicrobianos. La reinfección es menos frecuente (23%), la cual es producida por una bacteria externa al tracto urinario, cuyo reservorio es la microbiota intestinal, y generalmente se presenta después de dos semanas del tratamiento del episodio inicial (Valdevenito, 2008; Ejnaes *et al.*, 2006).

2. *E. coli*.

E. coli fue descrita por primera vez en el siglo XIX por el Dr. Theodor Escherich como un microorganismo habitual en la microbiota del intestino de los individuos sanos. Sin embargo, tanto su descubridor como posteriores investigadores demostraron que “*Bacterium coli comune*”, tal como fue denominada inicialmente, podía encontrarse también asociada a infecciones intestinales y extraintestinales (Kaper, 2005).

E. coli es un bacilo Gram negativo, oxidasa negativo, con un tamaño promedio de 1,1-1,5 μm de ancho y 2,0-6,0 μm de largo, anaerobio facultativo y puede ser móvil por la presencia de flagelos peritricos o no móviles (Sheutz *et al.*, 2005). Pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, tribu Escherichia, cuyas principales características bioquímicas se indican en la tabla 1.

Tabla 1. Identificación mediante pruebas bioquímicas de *E. coli*

Prueba bioquímica	Resultado	Prueba bioquímica	Resultado
Fermentación de glucosa	+	Fermentación de lactosa	+
Producción de indol	+	Movilidad a 36°C	+
Fermentación de sacarosa	+	Gas	+
Citrato de Simmons	-	Voges-Proskauer	-
Ácido sulfhídrico H ₂ S	-	Hidrólisis de urea	-

Tomado y modificado de Rodríguez-Ángeles, 2002.

2.1 Patotipos intestinales

Una forma de clasificar a las *E. coli* patógenas es dividir las de acuerdo al tipo de infección que producen. Un primer grupo está constituido por las cepas de *E. coli* intestinales responsables de un elevado número de infecciones gastrointestinales (Gómez- Duarte, 2015).

Con base a su mecanismo de patogenicidad y cuadro clínico, las cepas de *E. coli* causantes de infecciones intestinales se clasifican en seis grupos: Enterotoxigénica (ETEC), Enterohemorrágica también conocidas como productoras de toxina Vero o toxina semejante a Shiga (EHEC), Enteroinvasiva (EIEC), Enteropatógena (EPEC), Enteroagregativa (EAEC), y *E. coli* de adherencia difusa (DAEC), cuyas características se encuentran en la tabla 2 (Bekal *et al.*, 2003).

Tabla 2. Patotipos intestinales de *E. coli*.

Patotipo	Cuadro clínico	Mecanismo de Patogenicidad
EPEC, <i>E. coli</i> enteropatogénica	Diarrea acuosa sanguinolenta	Se adhiere a los enterocitos del intestino delgado, destruye las microvellosidades, produce lesiones de “adherencia y borramiento”(A/E), se incrementa la permeabilidad intestinal.
ETEC, <i>E. coli</i> enterotoxigénica	Diarrea acuosa	Se adhiere a los enterocitos del intestino delgado, secreta enterotoxinas. Estimulación de la secreción de cloro e inhibición de la absorción de sodio
EHEC, <i>E. coli</i> enterohemorrágica	Diarrea acuosa sanguinolenta	Se adhiere a los enterocitos del intestino grueso, destruye las microvellosidades, produce lesiones de “adherencia y borramiento”, causa apoptosis, respuesta inflamatoria.
EIEC, <i>E. coli</i> enteroinvasiva	Diarrea acuosa sanguinolenta	Invade células epiteliales del colon, lisa fagosomas, se multiplica, se mueve a través de las células, migra a las células adyacentes, y causa colitis invasiva inflamatoria
EAEC/ EaggEC <i>E. coli</i> enteroagregativa	Diarrea acuosa mucoide (puede ser persistente)	Se adhiere al epitelio del intestino delgado y grueso, causa incremento en la producción de moco, produce enterotoxinas secretorias y citotoxinas.
DAEC, <i>E. coli</i> de adherencia difusa	Diarrea acuosa	Se adhiere e induce efectos citopáticos que hacen que los enterocitos del intestino delgado crezcan alargados.

Tomado y modificado de Rodríguez- Ángeles, 2002; Robins-Browne et al., 2016; Gomes et al., 2016.

2.2 *E. coli* patógenas extraintestinales

Un segundo grupo de las *E. coli* patógenas son las responsables de las infecciones extraintestinales como son las ITU, sepsis y meningitis neonatal, su cuadro clínico y su mecanismo de patogenicidad se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. *E. coli* causante de infecciones extraintestinales

ExPEC	Cuadro clínico	Mecanismo de patogenicidad
UPEC, <i>E. coli</i> uropatógena	Cistitis, Pielonefritis	Coloniza la mucosa uretral, asciende desde la uretra hasta la vejiga, se adhiere e invade las células epiteliales y puede ascender hasta riñón
MNEC, <i>E. coli</i> causantes de meningitis/septicemia	Meningitis neonatal, Septicemia	Se dispersa hematológicamente, utilizando la sangre como medio de transporte para alcanzar el Sistema Nervioso Central y no causar daño en la barrera hematoencefálica

Tomado y modificado de Smith *et al.*, 2007.

2.2.1 *E. coli* uropatógena (UPEC)

UPEC es un tipo de *E. coli* extraintestinal patógena (ExPEC) y originalmente es parte del microbiota intestinal. UPEC raramente causa complicaciones en el intestino y puede existir en él en una relación simbiótica benéfica con la microbiota intestinal. Sin embargo, esta bacteria posee la habilidad de diseminarse y colonizar otras partes del organismo del hospedero como es el tracto urinario y torrente sanguíneo (Mann *et al.*, 2017).

2.2.1.1 Generalidades de UPEC

UPEC es el agente etiológico más comúnmente involucrado en las ITU. Se estima que entre un 70% a 95% de las ITU son de inicio comunitario y aproximadamente un 50% de las ITU de origen nosocomial son producidas por UPEC (Schwartz *et al.*, 2015). Las cepas de UPEC son genéticamente diversas

debido a que sus genes que codifican factores de virulencia se encuentran localizados en elementos genéticos móviles como son las Islas de Patogenicidad (Chakraborty *et al.*, 2017), de manera que las diferencias entre los aislados patógenos y comensales se fundamentan en sus antecedentes filogenéticos. Las cepas comensales pertenecientes a los filogrupos A y B1 son consideradas de bajo poder virulento, mientras que las patógenas extraintestinales, además de albergar genes que codifican factores de virulencia responsables de promover las etapas de colonización, adherencia, invasión y evasión de los mecanismos de defensa del hospedero humano, derivan principalmente de los filogrupos B2 y D. Las cepas de UPEC del grupo B2 producen 69% de las cistitis, 67% de las pielonefritis y el 72% de las sepsis con punto de partida en el tracto urinario (Milla *et al.*, 2014).

2.2.1.2 Factores de virulencia de UPEC

UPEC no puede ser considerada un patotipo de las *E. coli* patógenas ya que es un grupo heterogéneo donde no todas siguen el mismo proceso patógeno, además de que el cuadro clínico y los síntomas no son expresados en todas las infecciones por UPEC, aunque por analogía se les designa como UPEC a este grupo de bacterias. (Roy *et al.*, 2016). Los factores de virulencia más frecuentemente detectados en UPEC se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Factores de virulencia de UPEC

Categoría funcional	Nombre	Gen	Función del factor de virulencia
Adhesinas	Fimbria tipo 1	<i>fimH</i>	Adhesión, media la adherencia y la invasión al urotelio y tiene un papel en la formación de IBC
	Fimbria P	<i>papAH</i>	Adhesión, media la unión con el urotelio y se asocia con pielonefritis
	Fimbria S/F1C	<i>Sfa/facDE</i>	Adhesión, se relaciona con pielonefritis y cistitis

	Adhesina afimbrial	<i>Afa/draBC</i>	Adhesión e invasión al urotelio
Biopelícula	Antígeno 43	<i>Agn43</i>	Adhesión, autotransportador, agregación y se relaciona con la formación de biopelícula
Sideróforos	Hemo receptor	<i>chuA</i>	Captación de grupos hemo
	Receptor siderofoero aerobactina	<i>iutA</i>	Receptor de hierro férrico
	Receptor siderofoero Yersiniabactina	<i>fyuA</i>	Receptor de hierro férrico
Toxinas	Factor citotóxico necrotizante 1 (CNF)	<i>Cnf1</i>	Reorganización del citoesqueleto.
	α -hemolisina (HlyA)	<i>hlyD</i>	Lisis celular, exfoliación del urotelio y lesión tisular
	Toxina secretada autotransportadora (SAT)	<i>sat</i>	Crea anomalías en la función y morfología de las células del hospedero, detiene el ciclo celular.
Protectinas	Resistencia al suero (TraT)	<i>traT</i>	Proteína de membrana externa resistente a la actividad bactericida del suero
	Resistencia al suero (Iss)	<i>iss</i>	Proteína de membrana externa resistente a la actividad bactericida del suero
	Capsula (Grupo I, grupo II, Grupo III)	<i>kpsMII</i> <i>kpsMIIK2</i> <i>kpsMTIII</i>	Protección antagonista en la fagocitosis. Opsonización y lisis.

Tomado y modificado de Ejrnaes, 2011; Lüthje *et al.*, 2014; Subashchandrabose *et al.*, 2015.

2.2.1.3 Adherencia de UPEC a células epiteliales

El primer paso para el desarrollo de la infección es la interacción del patógeno con la célula hospedera. Estos microorganismos han desarrollado mecanismos de adherencia a los tejidos y la capacidad para superar la presión ejercida por los sistemas de defensa del hospedero (Frömmel *et al.*, 2013).

La adherencia de las bacterias a la superficie del urotelio es la primera fase en la patogenia de las infecciones urinarias, esta cualidad permite a la bacteria no ser eliminada por el flujo de orina y así alcanzar la vejiga o el riñón (Rice *et al.*, 2009).

La adherencia se caracteriza por la interacción específica entre las estructuras proteicas bacterianas (adhesinas) denominadas “pilis o fimbrias” con estructuras celulares superficiales del epitelio del tracto urinario conocidas como receptores proteicos, ejemplo de estos son las uroplaquinas (Ribert *et al.*, 2015). Las adhesinas más estudiadas en el caso de *E. coli* son la fimbria P (*pap*) y la fimbria tipo 1.

2.2.1.3.1 Fimbria P (pili asociado a pielonefritis, *pap*).

La fimbria P o Manosa Resistente a Hemoaglutinación (MRHA) es denominada así por su similitud estructural con componentes de los glucoesfingolípidos neutros que constituyen los antígenos del grupo sanguíneo. Esta fimbria adquiere este nombre debido a que es asociada a pacientes con pielonefritis cuya sigla es *pap* (Lüthje *et al.*, 2014).

- Estructura

La fimbria P es cilíndrica, hueca y está compuestas por miles de subunidades de *pilus* (singular de pili, proviene del griego cabello). Las subunidades que forman la fimbria P se encuentran estrechamente unidas, son flexibles, presentan en el extremo distal una proteína denominada adhesina. (Klemm *et al.*, 2000). Dentro de sus subunidades se encuentra el *pap* A que es la subunidad mayor; el *pap* E tiene la función de adaptador/iniciador para la punta de

la estructura en la que se incorpora la subunidad del *pap* F y G. La subunidad C es un poro que facilita a la chaperona la traslocación y unión de las subunidades que cruzan la membrana externa, el *pap* D es una chaperona periplasmática que facilita importar las subunidades que se encuentran en el periplasma. Por último, la terminación del *pap* H pone fin a la unión fimbrial y ayuda a formar el ancho de la fibra (Pizarro-Cerda *et al.*, 2006). Su estructura se observa en la figura 1.

2.2.1.3.2 Fimbria tipo 1.

La fimbria tipo 1 o Manosa Sensible a Hemoaglutinación (MSHA). Esta fimbria tiene la habilidad de aglutinar eritrocitos. Cabe resaltar que en el tracto urinario la proteína Tamm Horsfall (uromucoide rico en manosa excretado por células epiteliales urinarias) actúa como un mecanismo de defensa inespecífico (Lan Mo *et al.*, 2004) debido a que evita la unión de *E. coli* a sus dos receptores urinarios principales; las uroplaquinas Ia e Ib. Por lo tanto, la unión de la proteína Tamm Horsfall favorece, la eliminación de *E. coli* por orina.

- Estructura

La fimbria tipo 1, está compuesta por la chaperona periplasmática (FimC) que se encarga de la formación de complejos con las subunidades de fimbria recién translocados (FimA, FimG, FimF, FimH), luego estas se dirigen a la FimD que es la plataforma de ensamblaje cuya función principal es reconocer específicamente al complejo. Posteriormente, Fim C es devuelta al periplasma y la subunidad es translocada por el poro de FimD; finalmente salen a la superficie de la célula en forma de hélice (Lilington *et al.*, 2015). Su estructura se observa en la figura 1.

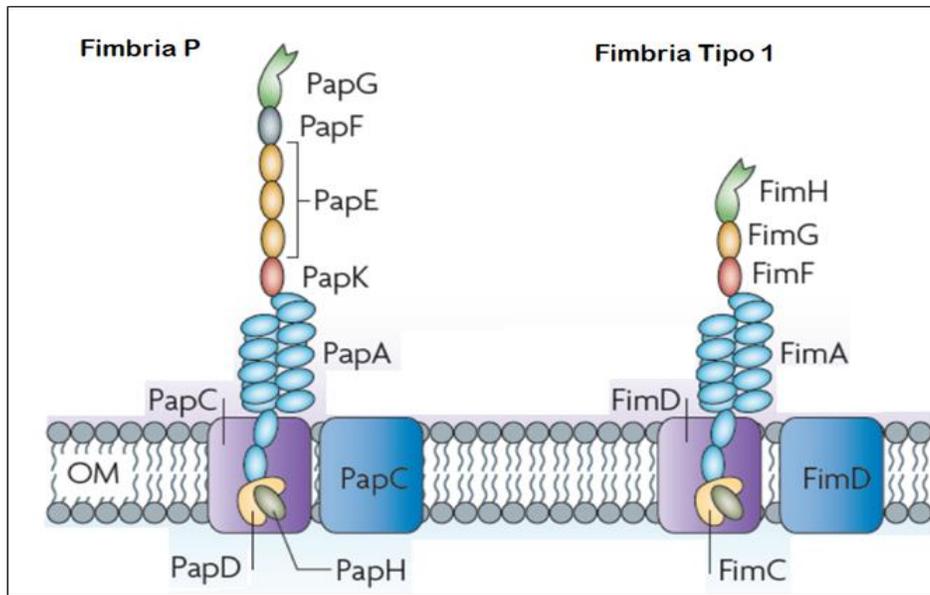


Figura 1. Estructura de la Fimbria P y Fimbria tipo 1 (Hospenthal *et al.*, 2017).

2.2.1.4 Invasividad de UPEC a células epiteliales

La invasividad bacteriana es la capacidad que tiene una bacteria de internalizarse, multiplicarse dentro de la célula hospedera y diseminarse a las células adyacentes. En recientes estudios se ha observado que UPEC es invasiva a células epiteliales de vejiga (Anderson *et al.*, 2003; Berry *et al.*, 2009) y a células epiteliales renales (Pichon *et al.*, 2009).

La entrada de UPEC al tracto urinario, por lo general es de manera ascendente, coloniza la uretra y continua hacia la vejiga, la adherencia a las células lo hace por medio de la interacción de estructuras proteicas con las células del hospedero, la siguiente etapa es la entrada a la célula. Investigadores han propuesto que el mecanismo de entrada es por medio de endosomas o vesículas propias del hospedero (Mysorekar *et al.*, 2006).

Una de las primeras evidencias de la invasividad por parte de UPEC a células epiteliales se observó en el modelo de cistitis de ratón donde por medio de microscopia electrónica se observaron comunidades bacterianas de UPEC en el citosol de las células del hospedero.

Estudios recientes sugieren que UPEC se internaliza en el hospedero mediante un proceso de endocitosis utilizando a RAb27 (un miembro de la subfamilia Rab de las GTPasas), las cuales son vesículas fusiformes que normalmente entran y salen de la membrana apical de las células de la vejiga, y cuya función es regular el área de superficie de la vejiga durante la acumulación de orina. Como resultado de este tráfico vesicular un porcentaje de las bacterias internalizadas regresa al medio extracelular por exocitosis. El tratamiento de las células epiteliales con Forskolina disminuye la carga bacteriana debido a que este agente induce la exocitosis de las vesículas fusiformes (mediante la elevación de AMPc intracelular), y aunque no erradica completamente a la bacteria puede ayudar al tratamiento de ITU (Hunstad *et al.*, 2010).

La población de UPEC dentro de la célula pasa a ser finalmente una persistencia bacteriana ya que los tratamientos con antimicrobianos que no atraviesan la membrana celular, no eliminan gran parte de las bacterias. Posterior a esto, el crecimiento de UPEC dentro de la célula está restringido y pueden entrar a un estado inactivo, es decir un estado quiescente donde no hay replicación bacteriana. Sin embargo, UPEC puede también multiplicarse de forma desenfrenada dentro del citosol y formar comunidades bacterianas intracelulares (IBC) que pueden contener más de 10,000 bacterias (DS *et al.*, 2006; Martínez *et al.*, 2000). Se ha observado que las IBC forman filamentos grandes que llegan a cruzar el citosol de la célula (evento que se puede observar en la figura 2), con lo que también logran protegerse contra la respuesta inmunitaria del hospedero. Las UPEC que formaron IBC finalmente logran tener un alto crecimiento lo que hace que la célula del hospedero entre en apoptosis y libere las bacterias, de esta manera logran infectar otras células adyacentes o se lavan por medio del flujo de la orina. Así, las IBCs son importantes para la difusión y persistencia de UPEC en el tracto urinario (Lewis *et al.*, 2016).

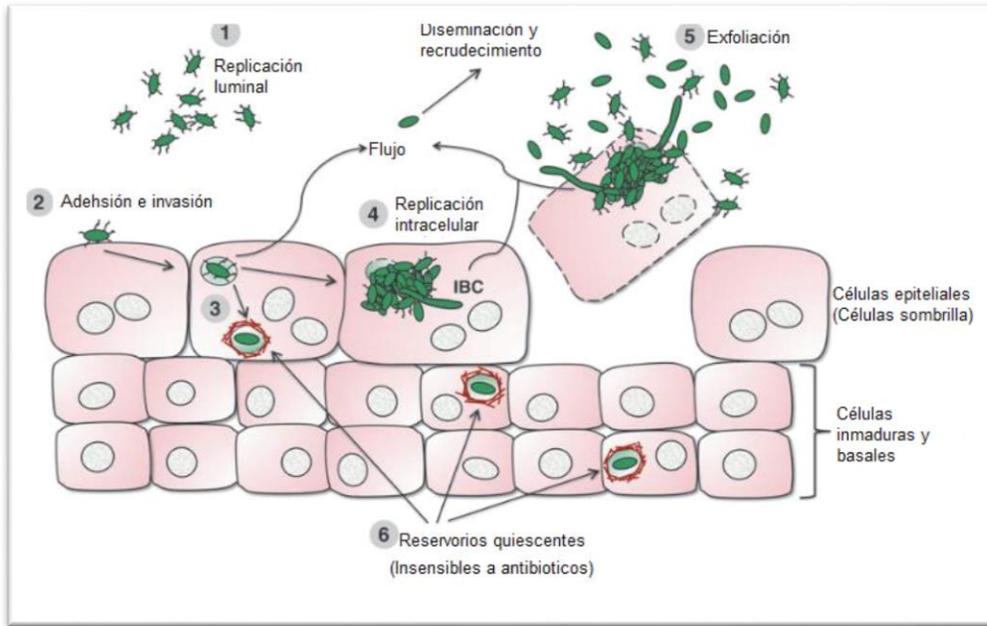


Figura 2. Modelo de eventos que promueven el establecimiento y recurrencia de las infecciones del tracto urinario (ITU). 1) Durante la infección UPEC puede replicarse en el lumen de la vejiga o 2) adherirse a las células epiteliales. 3) Continuando con la invasión, UPEC ingresa a las células formando compartimentos parecidos a endosomas cubiertos por filamentos de actina. 4) La alteración a estos compartimentos, permite a UPEC la entrada al citosol de la célula, permitiendo una rápida replicación intracelular y la formación de comunidades bacterianas intracelulares (IBC). Durante estos eventos, la morfología de las bacterias puede variar como la formación de células parecidas a filamentos largos que pueden evadir la respuesta inmunitaria de los neutrófilos. 5) La infección puede desencadenar la exfoliación de las células dado que este proceso puede ayudar a la eliminación de las bacterias adheridas e internalizadas. El flujo que siguen las bacterias después de la exfoliación puede promover la diseminación de los patógenos provocando el recrudescimiento de la ITU. 6) UPEC permanece en reservorios quiescentes de larga duración dentro de las células, gracias a los compartimentos parecidos a endosomas rodeados de actina que formaron al internalizarse. Esto hace que sea extremadamente difícil erradicar las bacterias dada su insensibilidad a los tratamientos con antibióticos. El resurgimiento de UPEC desde estos reservorios puede iniciar ITU recurrentes. (Tomado y editado de Barber *et al.*, 2013).

3. Plásmidos

Los plásmidos son elementos de DNA extracromosómico que constituyen entre el 1% y menos del 10% del genoma de muchas especies bacterianas. Se replican intracelularmente de manera autónoma y, aunque en la mayoría de las

ocasiones no son esenciales para la viabilidad de la célula, contienen genes que confieren distintas propiedades como la resistencia a antibióticos, virulencia o actividades metabólicas (Murray *et al.*, 2009; Loeza *et al.*, 2004).

El número promedio de moléculas de un plásmido particular por bacteria se denomina número de copia. Plásmidos mayores a 40 kilo pares de bases (kb) son frecuentemente conjugativos y tienen un bajo número de copias (1 a 10 por bacteria). Estos codifican para todas las funciones requeridas para su replicación y partición en las células hijas. En cambio, plásmidos menores de 7.5 kb, normalmente no son conjugativos y tienen un alto número de copias (entre 20 a 50 por bacteria) (Funnell *et al.*, 2004). Muchos plásmidos controlan importantes propiedades patógenas de las bacterias, como la resistencia a los antibióticos, la producción de toxinas y la síntesis de estructuras celulares de superficie requeridas para la adherencia e invasión (Lawrence *et al.*, 2003).

De acuerdo a las características que pueden conferir a las bacterias que los portan, los plásmidos pueden ser clasificados como: Plásmidos R: aquellos que codifican para resistencia a antibióticos; Plásmidos Col: los que expresan factores que actúan como bacteriocinas; Plásmidos Metabólicos: los que portan los genes necesarios para el metabolismo de moléculas complejas; plásmidos de virulencia: que codifican factores de virulencia; plásmidos conjugativos: aquellos que tienen la información necesaria para promover su propia transferencia a otra bacteria receptora (Frots *et al.*, 2005).

Los plásmidos están constituidos por una región constante que incluye determinantes genéticos para sus funciones esenciales (replicación, mantenimiento y transferencia) y una región variable de DNA heterólogo (ej. genes de resistencia) (Boyd, 1996).

Los plásmidos suelen existir como moléculas circulares de ADN de doble cadena (dsADN) cerradas covalentemente (conocidas como formas CCC, Covalently Closed Circular). Las alteraciones por rotura de la dsADN dan lugar a las configuraciones plasmídicas abierta circulares (formas OC, Open Circular) o

lineal (formas L) según se afecte una o las dos hebras. Estas tres configuraciones migran a distinta velocidad en los geles de agarosa: la forma CCC más rápidamente que la OC y ésta más rápidamente que la L.

3.1 Plásmidos en ExPEC.

En cepas de *E. coli* extraintestinales se han encontrado diferentes plásmidos que están asociados a factores de virulencia, Islas de Patogenicidad (IPA) y producción de toxinas y sideróforos

- Plásmido ColV (pAPEC-O2-ColV); se encuentra principalmente en cepas de *E. coli* patogénica aviar (APEC) pertenecientes al serogrupo O2. Este plásmido confiere a la bacteria la capacidad de lisar células, contiene genes asociados a la adquisición de hierro y suero lo que contribuye a la virulencia de estas cepas (Johnson *et al.*, 2009), además de una isla de patogenicidad que presenta genes que codifican para proteasas, hemolisinas y un sistema de transporte de hierro.
- Plásmido ColBM (pAPEC-O1-ColBM): es un plásmido encontrado en una cepa APEC perteneciente al serogrupo O1. Está asociado a la producción de colicina B y M, contiene una región que las hace MDR.
- Plásmido Vir; se encuentra en cepas de *E. coli* que producen Factor Necrotizante Citotóxico (CNF), estas cepas son responsables tanto de infecciones intestinales como de extraintestinales, como son las ITU. Contiene genes que codifican para la adherencia e invasividad y están relacionados a la agregación de bacterias y formación de biopelícula (Sherlock *et al.*, 2005).
- Plásmido pLV501; este plásmido se encuentra en EPEC. Al ser transferido a la cepa *E. coli* K12 incrementa su invasividad a células HEp-2, este plásmido contiene dos genes (*tniA2* y *pecM*) implicados en la supervivencia de EPEC dentro de las células epiteliales (Burska *et al.*, 2014).

JUSTIFICACIÓN.

Las ITU causadas por *E. coli* uropatógena (UPEC) son un grave problema de salud pública a nivel mundial. Otro problema adicional de las ITU son las infecciones recurrentes, las cuales son muy comunes, especialmente en mujeres quienes son propensas en recurrir aún después de tratamientos con los antimicrobianos apropiados.

Investigaciones recientes muestran que la capacidad de invadir células uroepiteliales de la vejiga, por parte de algunas cepas UPEC, contribuyen a las recurrencias (Rosen *et al.*, 2007). La presencia de comunidades bacterianas intracelulares en la vejiga del hospedero, les brinda a las bacterias una gran ventaja para sobrevivir, les permite evadir la detección de los mecanismos de defensa inmunitarios, así como evitar ser eliminadas por los tratamientos antimicrobianos. Poco se sabe sobre las características de las *E. coli* causantes de infecciones recurrentes. Al respecto, no se conoce si los aislados de recurrencias presentan plásmidos, y si los presentan, no sabemos si estos plásmidos portan genes que codifiquen para fimbrias o adhesinas u otros factores de virulencia que le permiten a la bacteria permanecer en el hospedero. Nuestra investigación se enfoca en conocer si los plásmidos contribuyen de alguna manera al proceso de invasión a células epiteliales. *Shigella flexneri* posee un plásmido de virulencia de 220 kb, cepas curadas de este plásmido redujeron significativamente su adherencia e invasividad a células HeLa (Guhathakurta *et al.*, 1999). Por otro lado, Girón y colaboradores demostraron que cuando EPEC fue curada del plásmido EAF perdió su capacidad de adherirse a células HEP-2 (Giron *et al.*, 1993).

Por lo que es importante conocer si existe alguna relación entre la presencia de plásmidos y el proceso de adherencia e invasividad a células epiteliales en los aislados de las IRTU, ya que estos plásmidos pueden contener los genes que codifiquen para fimbrias o pilis.

La capacidad de UPEC de invadir las células del hospedero puede incidir en el establecimiento de infecciones persistentes o recurrentes.

HIPÓTESIS

Las cepas de *E. coli* aisladas de IRTU portan plásmidos, los cuales pueden contribuir a la invasividad a células epiteliales.

OBJETIVOS

Objetivo General:

Conocer los perfiles plasmídicos de cepas de *E. coli* aisladas de IRTU e investigar su posible participación en la invasividad a células epiteliales.

Objetivos particulares:

- Conocer el perfil plasmídico (plásmidos grandes, mayores a 50 kb) de 26 cepas de *E. coli* obtenidas de IRTU.
- Evaluar la capacidad invasiva de los aislados de *E. coli* por medio de ensayos de invasividad a células epiteliales HEP-2
- Elegir una cepa representativa proveniente de los aislados de *E. coli* de IRTU, que porte plásmidos y presente alta capacidad invasiva
- Seleccionar subclonas con diferentes perfiles plasmídicos de la cepa previamente seleccionada y evaluar la capacidad invasiva y adherente de las subclonas.
- Relacionar la capacidad invasiva y adherente de las subclonas con el plásmido que portan.
- Conocer la identidad de las subclonas por medio de su huella molecular, mediante RAPD-PCR.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cepas y condiciones de crecimiento

En el estudio se incluyeron 26 cepas de *E. coli* aisladas de pacientes ambulatorios con infecciones recurrentes del tracto urinario (IRTU), los aislados se obtuvieron del Hospital General “Dr. Manuel Gea González”. La identificación de las cepas bacterianas se realizó en el laboratorio clínico del mismo hospital por medio del sistema automatizado MicroScan WalkAway. La identidad de las cepas se confirmó por medio del crecimiento en Agar Cromogénico (Apéndice), selectivo para *E. coli*, obteniéndose colonias rosadas. Cada cepa fue conservada en caldo Luria con glicerol al 60% (Apéndice) a -70°C. En la extracción del perfil plasmídico cada cepa se sembró previamente en Gelosa especial (Apéndice) y se conservaron a temperatura ambiente.

2. Perfil Plasmídico

La obtención del DNA plasmídico se realizó por el método de Lisis Alcalina en preparación-mini (mini-prep) según *Birnboim y Doly* (Birnboim *et al.*, 1979). Las 26 cepas se crecieron en 2 mL de caldo Luria (Apéndice) durante 16-18 h a 37°C, se centrifugaron a 16, 000 x g durante 1 min a 6°C. Finalizado el tiempo se removió por aspiración el medio y se le agregó al botón 100 µL de la solución de lisis alcalina I fría (Apéndice) y se resuspendió hasta deshacer el botón. Se le agregó 200 µL de la solución de lisis alcalina II (Apéndice) (preparada al momento) y se invirtió el tubo 5 veces. A la suspensión bacteriana se le agregó 150 µL de solución de lisis alcalina III fría (Apéndice) y nuevamente se invirtió el tubo 5 veces, se dejó reposar durante 5 min en frío.

La suspensión de cada muestra se centrifugó a 16, 000 x g durante 5 min a 6°C, se transfirió el remanente a un tubo, se le añadió una mezcla de fenol-cloroformo (1:1 v/v) se mezcló con vortex y la emulsión se centrifugó a 16, 000 x g durante 2 min a 6°C. Cuidadosamente se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo. A la fase acuosa resultante se le agregaron 2 volúmenes de etanol absoluto a temperatura ambiente, se mezcló con vortex y se dejó reposar durante 2 min, posteriormente se centrifugó la mezcla a 16, 000 x g durante 5 min a 6°C,

se removió por aspiración el etanol absoluto teniendo cuidado de no aspirar el botón; se agregó 1 mL de etanol al 70% y se mezcló por inversión 5 veces. Finalmente, se centrifugó a 16 000 x g durante 2 min a 6 °C, se removió el remanente por aspiración y se dejó evaporar el etanol durante 10 min a temperatura ambiente, al botón se le agregó 30 µL de Tris-EDTA (TE) (Apéndice) y se mezcló nuevamente con vortex, se guardó a -20 °C para su uso posterior.

Los plásmidos se corrieron en un gel de agarosa al 0.4 % a 55 V aproximadamente por 2 h. En cada pozo se colocaron 10 µL de muestra con 2 µL de buffer de carga.

3. Ensayo de invasividad de protección con gentamicina

El ensayo de invasividad se realizó según el método de Luke *et al.*, 2005, el tratamiento de las células epiteliales y del cultivo bacteriano fue en dos días de la siguiente manera:

Día 1.

Cultivo bacteriano. De cada una de las cepas se sembró una asada en 1 mL de caldo Luria y se incubaron por 18 h a 37 °C.

Células epiteliales. Las células HEP-2 (células epiteliales provenientes de carcinoma de laringe humano) se sembraron en una placa de poliestireno de 24 pozos (aproximadamente 150 000 células por pozo), las células se contaron en una Cámara de Neubauer. Las células se mantuvieron en Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Apéndice) suplementado con 5 % de suero fetal de bovino (SFB) y se incubaron a 37°C con 5 % de CO₂

Día 2.

Cultivo bacteriano. De cada cultivo se tomaron 200 µL y se resuspendieron en 800 µL de medio DMEM (Apéndice) sin SFB y sin antibiótico, se incubaron a 37 °C durante 1 h.

Células epiteliales. El medio DMEM se cambió en cada pozo que contenía las células epiteliales, posteriormente se lavaron con solución de buffer de fosfatos

(PBS) (Apéndice) y se le agregó 1 mL de medio DMEM fresco sin antibiótico a cada pozo. Después del lavado se le agregó 10 μ L (1×10^7 UFC) de la suspensión bacteriana y se incubó durante 3 h a 37 °C en 5 % de CO₂.

Terminado el tiempo de la incubación se retiró el medio DMEM que contiene la suspensión bacteriana con pipeta Pasteur y se lavó 3 veces con PBS (1 mL por pozo), se le agregó 1 mL de medio DMEM fresco que contenía 100 μ g/mL de gentamicina y se incubó durante 1 h más a 37 °C en 5 % de CO₂. Finalmente se lavaron los pozos 3 veces con PBS, se les añadió 200 μ L de Tritón X-100 al 0.1 % en PBS y después de 10 min se obtuvieron las células lisadas y despegadas de la superficie. Con esta solución que contiene las bacterias sobrevivientes (aquellas que se encontraban dentro de las células epiteliales), se realizaron diluciones para cuantificar Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en cajas Petri con Agar MacConkey (Apéndice).

Cálculos para los límites de invasividad.

El límite inferior de invasividad fue calculado con el promedio de las UFC/mL de la cepa K12 de 3 ensayos de invasividad, se consideró el doble de las UFC como invasividad baja, para la invasividad moderada se consideró el doble de las UFC de la capacidad baja y para la capacidad alta las UFC que fueran mayores al cálculo anterior. La siguiente tabla muestra los rangos establecidos para invasividad de tipo nula, baja, moderada y alta.

Tabla 5. Clasificación para el tipo de invasividad.

Rango	Tipo de invasividad
$700 < \text{UFC}$	Nula
$700 \leq \text{UFC} \leq 1,400$	Baja
$1,400 \leq \text{UFC} \leq 2,800$	Moderada
$\text{UFC} > 2,800$	Alta

4. Selección de subclonas a partir de la cepa 1162Ori

La cepa 1162Ori fue tomada del grupo de las 26 *E. coli* provenientes de IRTU, de esta UPEC provienen las siguientes clonas:

La subclona 1162C perdió de manera espontánea el plásmido de ≈ 90 kb, fue seleccionada por su sensibilidad a cloranfenicol. La cepa se sembró en Agar MacConkey sin antibiótico de tal manera que se obtuvieran colonias, posterior a esto cada colonia se sembró en caldo Luria con $100 \mu\text{g/mL}$ de cloranfenicol para detectar su sensibilidad.

La subclona 1162RC perdió de manera espontánea el plásmido de ≈ 90 kb, fue seleccionada por su resistencia a ciprofloxacino. La cepa se sembró en Agar MacConkey de tal manera que se obtuvieran colonias, cada colonia se sembró en caldo Luria con ciprofloxacino $20 \mu\text{g/mL}$,

La subclona MM206 se obtuvo a partir de la semi-curación de la cepa 1162Ori, el método que se siguió fue el descrito por Silhavy y Berman (Silhavy *et al.*, 1984) donde la cepa se sembró en caldo Luria suplementado con $100 \mu\text{g/mL}$ de naranja de acridina a 37°C durante 24h. La subclona InvT2 se obtuvo al seleccionar las bacterias intracelulares durante el ensayo de invasividad de la cepa 1162Ori. El nombre de esta subclona se refiere a que resultó invasiva y al número de tubo de dilución durante la cuantificación de las bacterias invasivas.

5. Ensayo de adherencia.

El ensayo de adherencia comprende la preparación de las células epiteliales, el cultivo bacteriano y la realización del ensayo, y se realiza en dos días:

Día 1.

Cultivo bacteriano. Las cepas a probar se sembraron en 1 mL de caldo Luria (Apéndice) y se incubaron a 37°C de 12 -15 h.

Células epiteliales. En una placa de 24 pozos se colocaron cubreobjetos circulares de 1 cm de diámetro previamente esterilizadas, se le añadió a cada pozo una suspensión celular homogénea (~150, 000 cel/mL), procurando que a las 24 h la confluencia fuera de 80%, se incubó durante 24 h a 37 °C con 5 % CO₂.

Día 2.

Cultivo bacteriano. El cultivo o solución bacteriana se centrifugó a 16 000 x g durante 3 min, se desechó el sobrenadante. El botón se resuspendió en 1mL de medio DMEM sin SFB y sin antibiótico, se incubó por 1 h a 37 °C.

Células epiteliales. Las células epiteliales se les cambia el medio por DMEM fresco, se lavaron con 1 mL de PBS, posteriormente se les agregó 1 mL de Medio DMEM y se les infectó con 20 µL de la suspensión bacteriana (aproximadamente 2 X 10⁷ bacterias). Se incubó durante 3 h a 37 °C. Pasado el tiempo se les removió el medio y se lavó 5 veces con PBS.

Prueba cualitativa: Se fijaron las células con gotas de metanol-ácido acético frío (3:1 v/v) durante 30 min, se tiñeron con colorante Giemsa (Apéndice) durante 30 min, se lavaron con agua destilada para eliminar el exceso de colorante, se deshidrataron las células con acetona-xileno (1:1 v/v) y se fijaron invirtiendo los cubreobjetos circulares en portaobjetos con Bálsamo de Canadá, se dejaron secar por un día y se observaron las bacterias adherentes a las células con ayuda de un microscopio de luz.

Prueba cuantitativa: Después de los lavados con PBS se realizaron diluciones para obtener UFC/mL de las bacterias adheridas a las células epiteliales y finalmente se sembraron en Agar MacConkey para el conteo de las colonias.

El control positivo para adherencia fue la cepa InvT2 y el control negativo la cepa K12.

Cálculos para los límites de adherencia.

El límite inferior de adherencia fue establecido por medio del conteo de las UFC/mL del control negativo de la cepa de *E. coli* K12. La tabla 6 muestra los rangos establecidos para la adherencia baja, moderada y alta.

Tabla 6. Clasificación para el tipo de adherencia.

Rango	Tipo de invasividad
$100,000 < \text{UFC}$	Baja
$100,000 \leq \text{UFC} \leq 500,000$	Moderada
$\text{UFC} > 500,000$	Alta

6. Obtención de la huella molecular de subclonas mediante la amplificación aleatoria de DNA polimórfico (RAPD-PCR).

El RAPD se basa en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), sin embargo cuenta con una modificación correspondiente a la utilización de un solo iniciador para la reacción, ya que se basa en la amplificación aleatoria de regiones del DNA, para lo cual se utilizan iniciadores compuestos de 10 bases, estos iniciadores pueden o no amplificar segmentos de DNA de la muestra, lo cual depende de diversos factores entre los que destacan los siguientes: que se encuentre una secuencia complementaria a los iniciadores y/o que los iniciadores se acoplen a la cadena de DNA en extremos alejados. Por lo tanto, si se han producido mutaciones en el DNA en sitios donde antes era complementario el iniciador, ya no se producirá este producto de PCR, lo que da por resultado un patrón diferente del amplificado.

El análisis de RAPD requiere de la obtención de DNA correspondiente a cada una de las cepas estudiadas. El DNA se obtuvo mediante la técnica de ebullición de Le Bouguenec (Le Bouguenec, 1992). Las muestras bacterianas se sembraron en 1 mL de caldo Luria (Apéndice), se incubaron por 18 h a 37 °C. Posteriormente se centrifugaron a 8000 x g durante 3 min en microcentrifuga de mesa, y el botón bacteriano se lavó una vez con 500 µL de agua destilada esterilizada. El botón se resuspendió en 200 µL de agua destilada estéril. Los tubos se dejaron incubar en hielo durante 5 min, posteriormente se colocaron en

baño maría a ebullición durante 10 min. Al término de este tiempo se colocaron nuevamente en hielo durante 2 min. Los tubos se centrifugaron a 8000 x g durante 5 min, finalmente el sobrenadante se colocó en un tubo estéril nuevo.

El DNA obtenido previamente es utilizado como el templado para el análisis RAPD. Las cantidades de los reactivos en la mezcla de reacción, así como las condiciones utilizadas para llevarla a cabo se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Volúmenes de reactivos y condiciones para la realización de análisis RAPD

Iniciador	Secuencia	Mezcla de reacción [final]	Programa
1254	5'- CCG CAG CCA A-3'	Vol. final 30µL dNTP: 0.2mM Sol. amortiguadora 10X: 1X Iniciador: 30pmol/µL Taq polimerasa: 12.5 U DNA: 10µL	1 ciclo: 94°C; 1min 4 ciclos: 94°C; 4 min 35°C; 4 min 72°C; 4 min 35 ciclos: 94°C; 1 min 35°C; 1 min 72°C; 2min 1 ciclo: 72°C; 10 min

(Bart *et al.*, 1998; Schmidt *et al.*, 1999).

7. Aparatos

Centrifugación: Centrífuga de mesa con refrigeración para microtubos cónicos (Sigma 1-15K).

Electroforesis en gel de agarosa: Cámara de electroforesis horizontal (Mini-sub CellGT, BIO-RAD); Fuente de poder para electroforesis (Fuente de poder–EPS3500, PHARMACIA); Transiluminador UV (UVP, upland, CA).

Ensayos con células epiteliales: Microscopio óptico (Carl Zeiss HBO50); Microscopio invertido (Nikon E-200); Incubadora de cultivos celulares (CellCulture CO₂ INCUBATOR, ESCO).

Análisis de amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD): Termociclador (BIO-RAD, T100 Thermal cycler).

Otros: Incubadora (ISOTEMP OVEN, Modelo 230, FISHER); Centrífuga de mesa (Spectrafuge 6C, Labnet, International Inc.); Vortex (Vortex-2Genie, Scientific Industries); Campana de flujo laminar (PCR Cabinet, ESCO); Autoclave (Modelo B-3, PB Internatinal); Agitador Orbital (BELLCO BIOTECHNOLOGY) ; Balanza analítica digital (Adventurer AR3130, Capacidad 310g, OHAUS); Refrigerador (Lab-line Instruments, Inc); Refrigerador (ASBER); Filtro de agua (MILLIPORE, Simplicity); Balanza granataria (Balance Harvard Trip, Capacidad 2kg, OHAUS); Medidor de pH (Microprocessor pH-Meter- pH 210, HANNA intruments); Centrífuga de mesa para tubos Eppendorf (Biofuge-pico, Heraeus).

8. Reactivos.

Identificación de *E. coli*: Agar cromogénico ITU (OXOID, Inglaterra); Agar Mac Conkey (MCD LAB, México).

Extracción de DNA plasmídico: Solución de lisis alcalina I, II y III (Apéndice); Fenol (Ultra-pure, Invitrogen); Cloroformo (Química Meyer) Etanol (Química Meyer); Tris-EDTA (TE) (Apéndice).

Electroforesis en gel de Agarosa: Agarosa grado biología molecular (Research organics, Inc) (Apéndice); TAE-1X (Apéndice), Buffer de corrida (DNA Loading Dye 6X, Thermo Scientific); Bromuro de etidio (BIO-RAD) (Apéndice).

Ensayos de invasividad y adherencia: Medio DMEM adicionado (Hyclone, Invitro) (Apéndice); Solución Buffer de Fosfatos (PBS)(Apéndice); Tritón X-100 (MERCK) (Apéndice); Solución de Gentamicina (SIGMA); Solución de Metanol- Ácido acético 3:1 (SIGMA); Colorante Giemsa (MERCK) (Apéndice); Solución Acetona-Xileno (SIGMA) (Apéndice); Bálsamo de Canadá (Sigma Aldrich), Tripsina 0.25% 1:250 (ICN biomedical, Inc).

Semicuración de plásmidos: Naranja de acridina (Sigma Aldrich, Inc); Cloranfenicol (IBI, Scientific), Ciprofloxacino (SIGMA).

Cultivo celular: HEp-2 (ATCC® CCL-23™), células epiteliales provenientes de carcinoma de laringe humano (*Homo sapiens*).

Cultivos bacterianos: Caldo Luria (Apéndice), Agar Gelosa Especial (Apéndice).

RESULTADOS

1. Perfil plasmídico de cepas de *E. coli* aisladas de IRTU

Para determinar la presencia de plásmidos en las diferentes cepas de *E. coli* se realizó la extracción de DNA plasmídico mediante la técnica de lisis alcalina, y después de una electroforesis en geles de agarosa se obtuvo el perfil plasmídico de cada una de las 26 cepas de *E. coli*; 22 de éstas cepas (80%) poseen algún plásmido de entre 60,000 y 90,000 pb; 7 cepas presentaron 2 plásmidos (27%); y 3 cepas no presentaron plásmido (11.5%). La cepa 1162Ori presentó 3 plásmidos. (Fig. 3A, 3B y Gráfica 1).

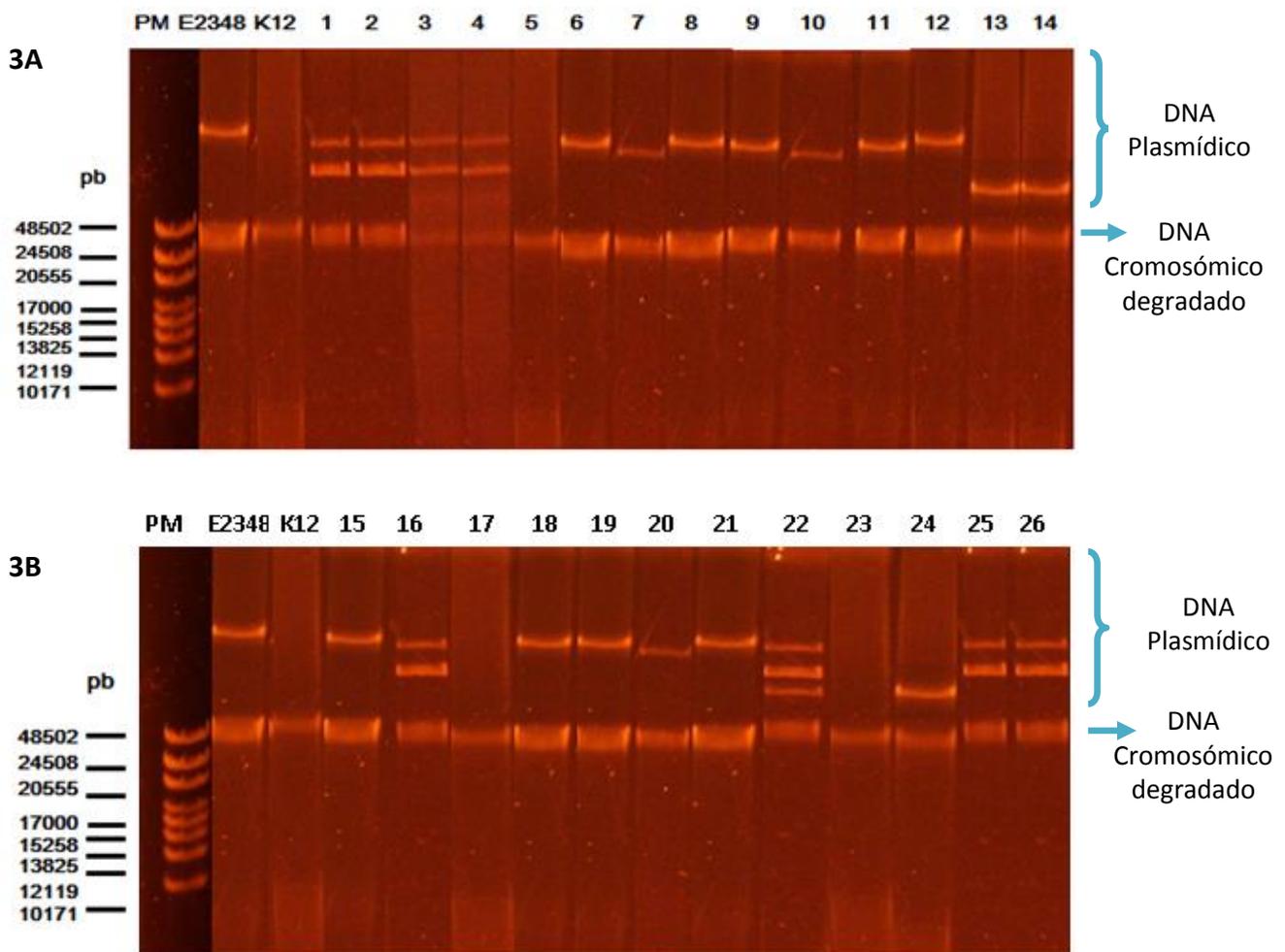
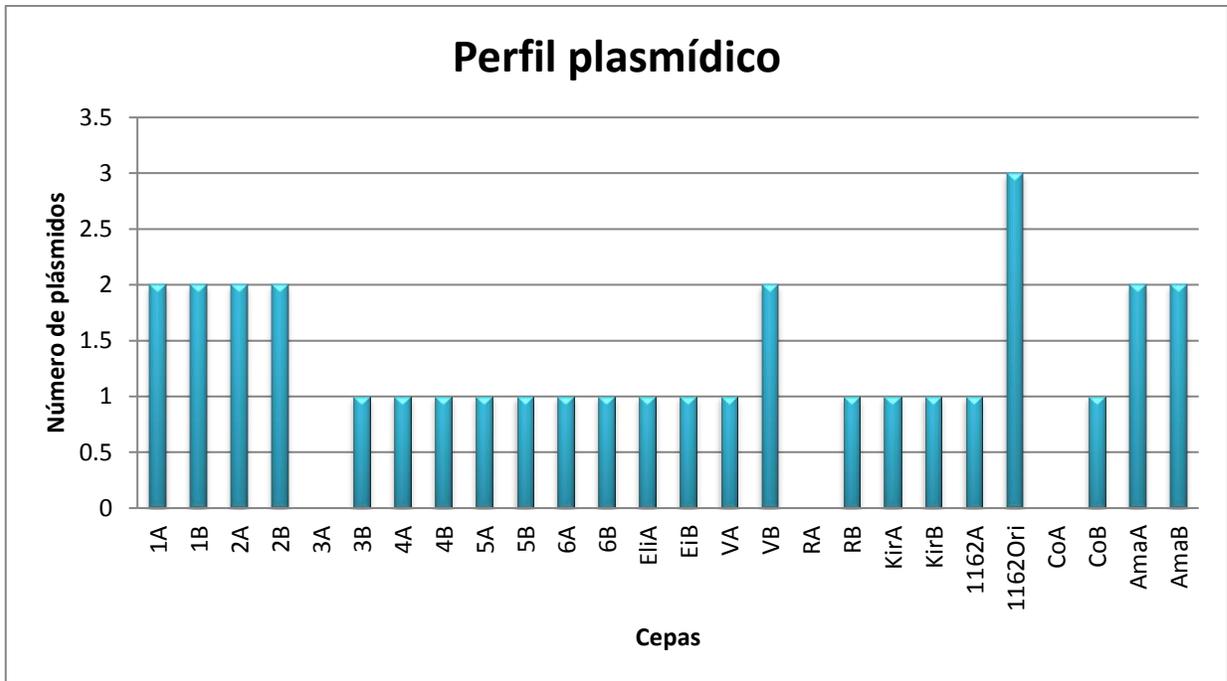


Figura. 3A y 3B: Perfil plasmídico de cepas de *E. coli* aisladas de IRTU. Electroforesis en geles de agarosa al 0.5%: E2348-69 (control positivo con plásmido); K12 (control negativo sin plásmido), Carriles 1) 1A, 2) 1B, 3) 2A, 4) 2B, 5) 3A, 6) 3B, 7) 4A, 8) 4B, 9) 5A, 10) 5B, 11) 6A, 12) 6B, 13) Eli A, 14) Eli B, 15) VA, 16) VB, 17) RA, 18) RB, 19) KirA, 20) KirB, 21) 1162A, 22) 1162Ori, 23) CoA, 24) CoB, 25) AmaA, 26) AmAB. Pares de bases (pb).



Gráfica 1. Relación del número de plásmidos aparente con cada una de las cepas de *E. coli* aisladas de IRTU

2. Invasividad de las cepas de *E. coli* a células epiteliales HEp-2.

Se probó la capacidad invasiva de las 26 cepas de *E. coli*, mediante el ensayo de invasividad en células epiteliales humanas (HEp-2) cultivadas. Se establecieron límites de invasividad a partir de la cepa control de *E. coli* K12, la cual no es patógena ni invasiva. De ésta cepa se estableció el promedio de 700 UFC/mL como nula en invasividad, se considera que este número de bacterias se deben a limitaciones del ensayo (ver métodos, tabla 5). De las 26 cepas de *E. coli* 21 (81%) fueron invasivas; 12 (46%) resultaron altamente invasivas, 5 (19 %) moderadamente invasivas, 4 (15%) baja invasividad y solo 5 (19%) no fueron invasivas (tabla 8).

Tabla 8. Relación entre la capacidad de invadir células HEp-2 y la presencia de plásmidos en las 26 cepas de *E. coli*.

Cepa	UFC/mL	Capacidad de invasión a células epiteliales HEp-2	Plásmido mayor a 48.502 kb
1A	2,200	Moderada	+
1B	3,400	Alta	+
2A	2,300	Moderada	+
2B	3,100	Alta	+
3A	400	Nula	-
3B	1,900	Moderada	+
4A	3,400	Alta	+
4B	1,000	Baja	+
5A	9,400	Alta	+
5B	8,700	Alta	+
6A	3,700	Alta	+
6B	300	Nula	+
EliA	1,800	Baja	+
EliB	1,000	Baja	+
VA	4,500	Alta	+
VB	7,200	Alta	+
RA	0	Nula	-
RB	3,600	Alta	+
KirA	0	Nula	+
KirB	1,900	Moderada	+
1162A	18,500	Alta	+
1162Ori	20,000	Alta	+
CoA	0	Nula	-
CoB	2,900	Alta	+
AmaA	2,000	Moderada	+
AmaB	1,200	Baja	+

Presencia de plásmido: +
Ausencia de plásmido: -

3. Relación entre la capacidad invasiva y la presencia de plásmidos en las cepas de *E. coli*.

De las 26 cepas de *E. coli* 21 (80%) presentaron algún tipo de invasividad y presencia de plásmidos; 5 cepas (19%) no fueron invasivas y solo 2 de éstas presentaron plásmido. La cepa 1162Ori que presentó 3 plásmidos es la que tuvo una mayor invasividad a células epiteliales (20,000 UFC/mL). Estos resultados se pueden observar en la tabla 8.

4. Selección de subclonas que espontáneamente perdieron plásmidos a partir de la cepa 1162Ori y una subclona semi-curada.

La cepa 1162Ori presentó 3 plásmidos y fue altamente invasiva, por lo cual se eligió para la eliminación de alguno de sus plásmidos (véase materiales y métodos) y con esto probar si la pérdida de algún plásmido afecta en su capacidad de adherirse e invadir células. Se obtuvieron cuatro subclonas, dos de ellas (1162C y 1162RC) se seleccionaron por susceptibilidad a antibióticos, una cepa (InvT2) se seleccionó por ser positiva en el ensayo de invasividad y la otra (MM206) se curó al ser tratada con naranja de acridina. El perfil plasmídico que resultó de las diferentes subclonas se muestra en la figura 4: Se observa que las subclonas InvT2 y MM206 solo presentaron el plásmido de mayor tamaño (≈ 90 kb), y las subclonas 1162RC y 1162C el plásmido de menor tamaño (≈ 50 kb).

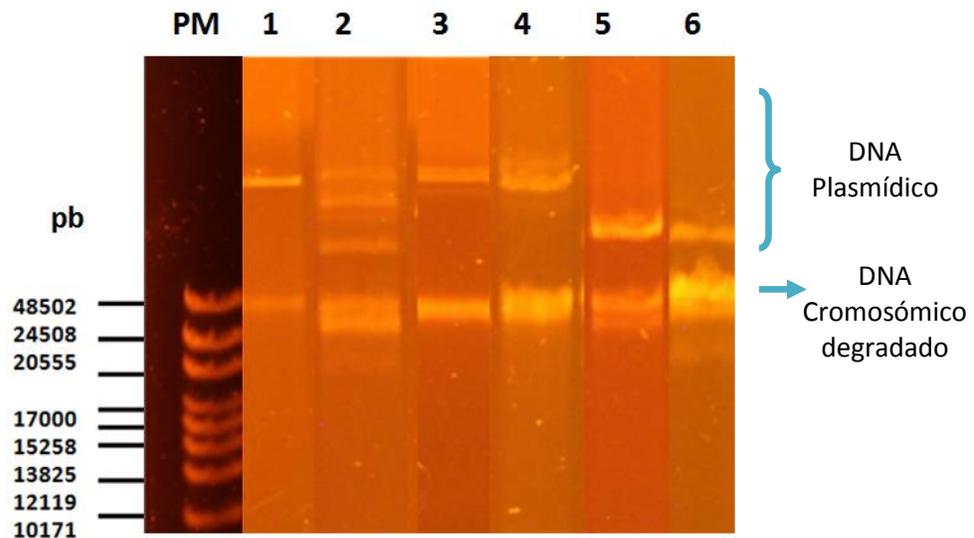


Figura 4. Perfil plasmídico de las subclonas obtenidas a partir de la cepa *E. coli* 1162Ori. Gel de Agarosa al 0.5% cargado con las siguientes muestras: 1) E2348-69 (control positivo), 2) 1162Ori 3) Subclona InvT2 4) Subclona MM206, 5) Subclona 1162RC, 6) Subclona 1162C.

5. Invasividad y adherencia de las subclonas, derivadas de la cepa 1162Ori, a células epiteliales HEp-2

Se realizó el ensayo de invasividad, en células epiteliales HEp-2, a las subclonas provenientes de la cepa *E. coli* 1162Ori, y se observó que las subclonas que poseen el plásmido grande ≈ 90 kb son altamente invasivas, aún más invasivas que su cepa de origen (1162Ori), las subclonas que tienen el plásmido de ≈ 50 kb no son invasivas, a pesar de tener un plásmido (tablas 9 y 11).

Tabla 9. Invasividad de las subclonas obtenidas a partir de la cepa 1162Ori

Cepa y subclonas	UFC/mL	Tipo de invasividad
1162Ori	20,600	Alta
InvT2	980,000	Alta
MM206	4,100	Alta
1162RC	700	Nulo
1162C	500	Nulo

El ensayo de adherencia que se realizó a las subclonas mostró que no existe diferencia entre la capacidad adherente en relación con el plásmido, y mostraron adherencia de moderada a alta a las células epiteliales, (tabla 10). Los límites de adherencia se encuentran en la tabla 6 (véase métodos).

Tabla 10. Adherencia de las subclonas a células HEp-2

Cepa y Subclonas	UFC/mL	Tipo de adherencia
1162Ori	220,000	Moderada
InvT2	1,290,000	Alta
MM206	490,000	Moderada
1162RC	2,600,000	Alta
1162C	1,170,000	Alta

Tabla 11. Subclonas derivadas de la cepa de *E. coli* 1162Ori causante de IRTU.

Subclona	Tipo de plásmido	Capacidad invasiva	Capacidad adherente
InvT2	≈ 90 kb	Alta	Alta
MM206	≈ 90 kb	Alta	Moderada
1162RC	≈ 50 kb	Nula	Alta
1162C	≈ 50 kb	Nula	Alta

6. Identidad de las subclonas derivadas de la 1162Ori mediante obtención de su huella molecular

Mediante RAPD-PCR (Amplificación aleatoria de DNA polimórfico) se obtuvo un patrón de bandas electroforético (huella molecular o genómica) de cada una de las subclonas. La figura 5 muestra los perfiles electroforéticos obtenidos, se observa el bandeo de las subclonas InvT2, MM206, 1162RC y 1162C, los cuales son prácticamente iguales al de la cepa 1162Ori (cepa de la que se originaron). La cepa de *E. coli* R2 muestra unas diferentes al de las otras *E. coli*.

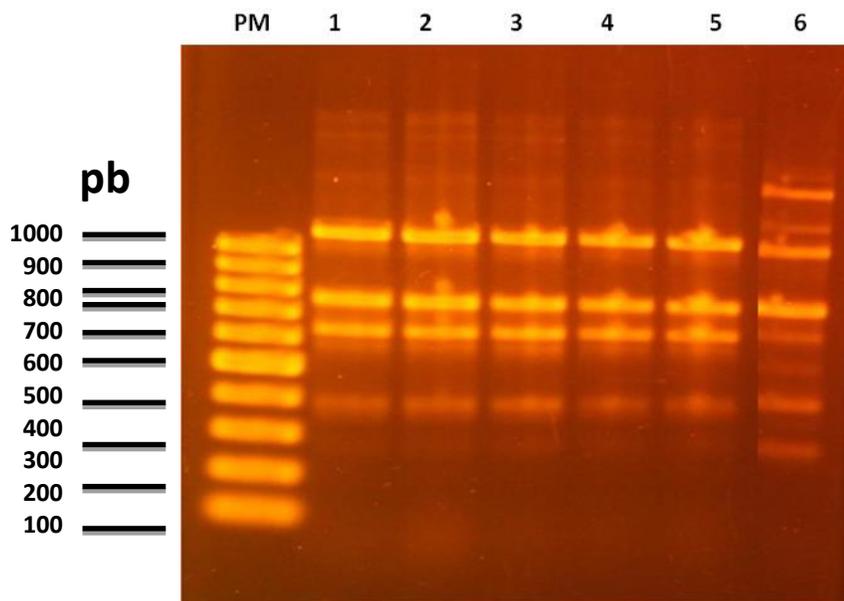


Figura 5. Perfil electroforético (huella molecular) obtenido por RAPD-PCR. Para el ensayo de PCR se utilizó el iniciador llamado 1254 y el amplificado se separó en un gel de agarosa al 1.7% cargado con las siguientes muestras: PM, 1) Cepa 1162Ori; 2) Subclona InvT2; 3) Subclona; MM206; 4) Subclona 1162RC; 5) Subclona 1162C; 6) Cepa de *E. coli* R2 que no es proveniente de la cepa 1162Ori.

6. Identidad de las subclonas derivadas de la cepa 1162Ori

Mediante el sistema de identificación y caracterización genotípica RAPD-PCR, se demostró que las cuatro subclonas efectivamente son derivadas de la cepa 1162Ori. En la Figura 6, se definen cinco patrones de amplificación, los cuales son muy similares, y corresponden a las subclonas InvT2, MM206, 1162RC, 1162C y a la cepa de origen 1162Ori. Se añadió el control negativo R2 (cepa de *E. coli* diferente a la 1162Ori) el cual presentó un patrón de amplificación diferente al de la otra cepa y subclonas de *E. coli*. Se observó que entre la cepa 1162Ori y las subclonas MM206, 1162RC, 1162C hay un 90% de similitud, y con la subclona InvT2 tiene un 100% de similitud lo que confirma que las subclonas

derivan de la misma cepa, mientras que con la cepa control R2 se tiene 70% de similitud.

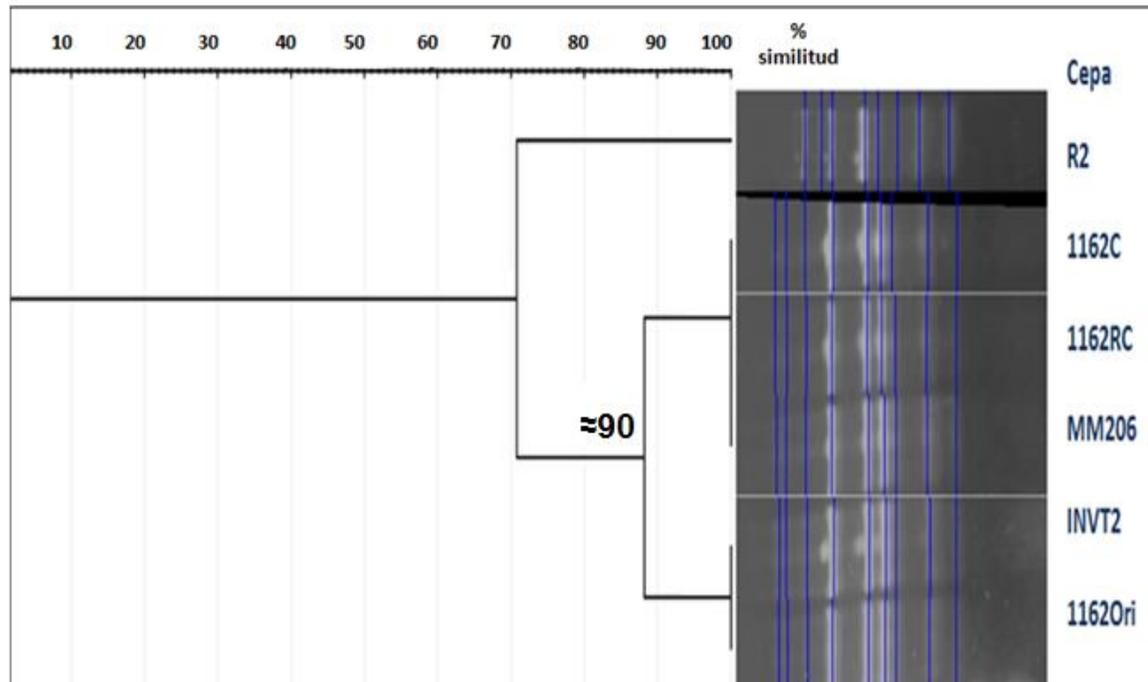


Figura 6. Dendrograma construido con la cepa 1162 Ori y las subclonas InvT2, MM206, 11662RC, 1162C. Control negativo cepa de *E. coli* R2. RAPD-PCR empleando el iniciador 1254, los amplificados se separaron en un gel de agarosa al 1.7% y se analizaron GelJ (Heras *et al.*, 2015).

DISCUSIÓN

■ Perfil plasmídico de cepas de *E. coli* provenientes de IRTU

E. coli uropatógena es causante de aproximadamente el 90% de las IRTU, esta bacteria tiene diversos factores de virulencia, además de que se ha observado que poseen la capacidad de adherirse e invadir al uroepitelio de la vejiga (modelo de cistitis en ratón) (Cusumano *et al.*, 2010). Dichas características de UPEC hacen que estas cepas puedan causar infecciones recurrentes, ya que las bacterias pueden alojarse dentro de las células y en consecuencia no son eliminadas por la respuesta inmunitaria o por el tratamiento con antimicrobianos (Glover *et al.*, 2014).

En este trabajo se estudiaron cepas de *E. coli* causantes de infecciones recurrentes. Se ha observado que este tipo de cepas pueden contener plásmidos de tamaño grande, sin embargo, Chakraborty y colaboradores mencionan que se desconoce si portan genes o islas de patogenicidad que codifiquen para factores de virulencia como adherencia o invasividad (Chakraborty *et al.*, 2017).

Estudios epidemiológicos y con animales *in vivo* mostraron diversas propiedades de UPEC que sugieren que la gran gama de factores de virulencia están codificados tanto en el cromosoma bacteriano como en plásmidos. Algunos factores de virulencia pueden ser exclusivos del cromosoma como *pap* y *hly* (que codifican para fimbrias P y hemolisina), y otros factores están asociadas principalmente a plásmidos como *iss* y *TraT* (que codifican para proteínas de membrana externa involucradas en la sobrevivencia de la bacteria en el suero) (Johnson, 2003).

En nuestros experimentos se encontró que de las 26 cepas de *E. coli* obtenidas de IRTU, 23 presentaron al menos un plásmido, estos plásmidos son grandes, de tamaño mayor a ≈ 50 kb. De estas cepas que contienen plásmidos, 15 presentaron 1 plásmido, 7 presentaron 2 plásmidos y 1 cepa mostró la presencia de 3 plásmidos. Estos resultados muestran que existe una alta presencia de DNA plasmídico entre las cepas de *E. coli* aisladas de IRTU. Se observó que un plásmido de ≈ 90 kb se presenta con mayor frecuencia entre los aislados, lo que puede sugerir que este plásmido es característico de cepas de este tipo. No podemos asegurar que sea el mismo plásmido entre las cepas, pero podemos decir que los plásmidos grandes (50-90 kb) son frecuentes en este tipo de cepas aisladas de IRTU.

Existen pocos estudios publicados sobre plásmidos de cepas que provengan de IRTU, no obstante, hay más estudios de cepas provenientes de ITU no-recurrentes (infecciones agudas), donde reportaron que 54 % de los aislados presentaron de 1 a 4 plásmidos con un tamaño promedio de 25-50 kb (Molina, 2011). En otro estudio, con cepas de ITU aguda, se menciona que los plásmidos se presentan de 79 a 88 % pero que en su mayoría son plásmidos pequeños (Ali

et al., 2014; Farshad *et al.*, 2012). Creemos que algunos de los plásmidos que detectamos en el presente estudio deben tener genes que le atribuyan características especiales a UPEC, ya que un porcentaje alto de estas cepas, aisladas de recurrencias, portan plásmidos. Hasta donde tenemos conocimiento, esta es la primera vez que se reporta que los aislados *E. coli* de IRTU frecuentemente portan plásmidos de gran tamaño. No sabemos si esto ocurra con cepas aisladas de pacientes de otras ciudades del mundo, o si es particular de países en vías de desarrollo, donde la multiresistencia a los antimicrobianos es un problema creciente.

■ Invasividad de cepas de *E. coli* provenientes de IRTU

El ensayo de invasividad de protección con gentamicina en células HEp-2, es un modelo *in vitro* en mono capa. En este estudio se demostró la confiabilidad del método por medio de la comparación de los resultados *in vivo* (modelo de cistitis de ratón) con los obtenidos *in vitro*. Se encontró que en ambos modelos los resultados fueron similares. Un control positivo (UTI 89, *E. coli* invasiva) resultó también invasivo en células HEp-2 y un control negativo (K12, *E. coli* no invasiva), por lo que el modelo *in vitro* y en mono capa se utilizó para conocer el potencial invasivo de las cepas aisladas de IRTU (Rochelle *et al.*, 2002).

Nuestros resultados muestran que los aislados de *E. coli* de IRTU frecuentemente invadieron las células HEp-2. UPEC no había sido considerada un patógeno intracelular pero se ha observado en experimentos *in vivo* (modelo de cistitis en ratón) que UPEC puede alojarse en el citosol de las células del epitelio de la vejiga y que esto puede ser causa de la recurrencia en este tipo de infecciones (Dhakal *et al.*, 2008).

En otros estudios con la cepa de UPEC UTI89 se encontró que contiene un plásmido grande (114 kb), que está involucrado con la invasividad de la bacteria a células epiteliales (modelo de cistitis en ratón). En dicho plásmido, llamado pUTI89, dominan dos regiones, una para el mantenimiento y su transmisión a otras cepas, y otra donde se encuentran pseudogenes e islas de patogenicidad.

También reportan que este plásmido está asociado a la parte de la infección temprana *in vivo*. Estos resultados se obtuvieron después de haber curado a la cepa del plásmido pUTI89, se observó, por medio de microscopia cofocal, la disminución de las comunidades bacterianas intracelulares después de la infección (de una a seis horas), por lo que se concluye que el plásmido puede estar involucrado en la unión, o invasión intracelular, o ayuda a la evasión de la respuesta inmunitaria (Cusumano *et al.*, 2010).

- Selección de subclonas y semi-curación de plásmido.

La cepa 1162Ori fue la que presentó mayor número de bacterias intracelulares en las células HEp-2, y en su perfil plasmídico presentó 3 plásmidos grandes. Dicha cepa fue seleccionada para probar si la presencia o ausencia de los plásmidos está relacionada con la capacidad de adherencia o invasividad a células epiteliales. Dicha cepa perdió de manera espontánea sus plásmidos y las subclonas resultantes fueron seleccionadas por medio de susceptibilidad a los antibióticos, de esta forma surgieron las subclonas 1162C (susceptible a cloranfenicol) y la 1162RC (resistente a ciprofloxacino). De la semi-curación con naranja de acridina se obtuvo la subclona MM206, y finalmente se seleccionó la subclona InvT2 al resultar invasiva en el ensayo de invasividad (Véase materiales y métodos).

- Capacidad invasiva de las subclonas de la cepa 1162Ori

En el ensayo de invasividad de las subclonas se encontraron diferencias en la capacidad invasiva de cada subclona. InvT2 y MM206 las subclonas que solo tienen el plásmido de ≈ 90 kb presentaron una capacidad invasiva alta, mientras que las subclonas 162C y 1162RC que perdieron el plásmido de ≈ 90 kb, pero mantuvieron el plásmido ≈ 50 kb perdieron la capacidad invasiva a células epiteliales. Este hecho descarta a los plásmidos menores de ≈ 90 kb como protagonistas en el proceso de invasividad. Faltan más experimentos para demostrar que el plásmido de ≈ 90 kb tiene un papel en la capacidad de invadir células.

Pasqua y colaboradores, encontraron que *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) requiere la adquisición de un plásmido grande tipo F (pINV) para poder invadir y sobrevivir intracelularmente y propagarse a través de la mucosa intestinal de la bacteria (Pasqua *et al.*, 2017). Dicho plásmido que contiene los genes necesarios para estas actividades, puede ser obtenido por las bacterias mediante transferencia horizontal.

En estudios con *Shigella spp*, se ha observado que las cepas que tienen un plásmido (pINV) de 213 kb pueden invadir células epiteliales y que las cepas que no lo tienen no son invasivas. Este plásmido es un elemento esencial para la virulencia de *Shigella*. Los genes presentes en pINV permiten a la bacteria invadir células epiteliales intestinales, escapar al citosol de la célula huésped, propagarse de célula a célula e inducir piroptosis en macrófagos. La mayoría de los genes de virulencia de este plásmido se encuentran en una isla de patogenicidad de 30 kb que codifica para componentes de sistema de secreción tipo III (SSTIII), la cual es una jeringa molecular que internaliza proteínas efectoras bacterianas en el citoplasma de la célula hospedera (Pilla *et al.*, 2017).

■ Capacidad de adherencia de las subclonas de la cepa 1162Ori

El ensayo de adherencia mostró que las 4 subclonas son adherentes a células epiteliales HEp-2, lo que sugiere que el proceso de adherencia de estas subclonas es ajeno a la presencia de plásmidos. Los genes codificados para adhesinas y otros factores de virulencia que ayudan a este proceso, posiblemente se encuentren en el DNA cromosómico. En estudios con *Salmonella entérica* se encontró que la adherencia no es importante para la patogénesis de la bacteria. Su ciclo infeccioso se basa en tres pasos: la capacidad de entrar a las células anfitrionas, su establecimiento en el nicho celular y su escape de la célula huésped (Knodler *et al.*, 2010). Esto nos hace pensar que la adherencia no tiene relación con el tipo de plásmido que porta la cepa, sino que es la invasividad la que se ve diferenciada por los plásmidos de las cepas de *E. coli*.

■ Análisis de huella molecular por medio de RAPD-PCR

Nos hicimos la pregunta si las supuestas subclonas provenientes de la cepa 1162Ori eran realmente derivadas de dicha cepa y no bacterias contaminantes. Por tal motivo, decidimos emplear la técnica de RAPD-PCR, que nos da un marcador genético y nos permite diferenciar entre diversas cepas, de tal manera que podemos saber si las cepas son iguales o diferentes. Esto se debe a que si entre dos cepas bacterianas existe polimorfismo, es decir variación en la secuencia, en alguna de las zonas de unión al iniciador empleado, este polimorfismo puede resultar en un fallo de amplificación de alguno de los fragmentos y producir un patrón multibanda diferencial entre ambos individuos. También las inserciones y deleciones entre sitios de unión del iniciador resultan en la amplificación de fragmentos de tamaño diferencial (Williams *et al.*, 1990; Bardakci, 2001).

El perfil electroforético obtenido mediante RAPD-PCR mostró el patrón de bandas de las subclonas InvT2, MM206, 1162RC, 1162C y la cepa de origen 1162Ori y se logró apreciar que los patrones de bandeo son iguales entre la cepa 1162Ori y las subclonas, existen algunas bandas predominantes con masa molecular aproximada de 1,000 pb, 800 pb, y 700 pb. La cepa R2 (*E. coli* control negativo) mostró diferentes bandas.

En el dendograma se observó que la cepa 1162Ori y la subclona InvT2 son iguales con un 100% de similitud, las subclonas MM206, 1162RC y 1162C presentaron un 100% de similitud entre ellas, por lo que también son idénticas entre sí.

El bandeo de la cepa 1162Ori junto con el de las subclonas en el dendograma prácticamente es el mismo a simple vista, lo cual concuerda con el análisis del programa GelJ (Software, tool for analyzing DNA fingerprint gel images) (Heras *et al.*, 2015).

El programa GelJ dio como resultado 90% de similitud entre las subclonas y la cepa original, la pequeña diferencia del 10% posiblemente se deba a las limitaciones del ensayo de RAPD-PCR, aunque también pueda deberse a

inserciones o deleciones en la secuencia de nucleótidos amplificados, lo que puede dar como resultado un cambio en el tamaño del fragmento amplificado y esto pueda generar diferencia en el corrimiento de las bandas (Deguang *et al.*, 2013). Este pequeño cambio en el genoma bacteriano también podría verse reflejado en la pérdida del fenotipo invasivo.

En nuestro estudio se consideró que el 90% de similitud entre el patrón de bandeo (huellas moleculares) es suficiente para determinar que las subclonas son provenientes de la cepa 1162Ori. Este porcentaje de similitud es adecuado ya que se observa a simple vista que el patrón de bandeo es similar.

CONCLUSIONES

- Las cepas de *E. coli* aisladas de IRTU de pacientes de la Ciudad de México frecuentemente portan plásmidos grandes (≈ 90 kb). Este dato nos indica que se debe investigar si dichos plásmidos tienen genes que codifiquen para factores de virulencia relevantes para el establecimiento de infecciones.
- Se encontró que la mayoría de las cepas que presentaron plásmido resultaron invasivas a células epiteliales HEp-2.
- Se encontró una posible relación entre la presencia de un plásmido de ≈ 90 kb en la cepa de *E. coli* (1162Ori) y su capacidad de invadir células epiteliales.

REFERENCIAS

- Ali, I., Kumar, N., Ahmed, S., Dasti, J.I., 2014. Antibiotic Resistance in Urpathogenic *E. coli* Strains isolated from Non-Hospitalized Patients in Pakistan. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 8(9):1-4.
- Barber, A.E., Norton, J.P., Spivak, M.A., Mulvey, A., 2013. Urinary Tract Infections: Current and Emerging Management Strategies. *Clinical Infectious Diseases*. 57(5):719-729.
- Bardakci, F., 2001. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Turkish Journal of Biology*, 25: 2185-2196
- Barrantes K., Achí, R., 2009. Interacciones celulares en el proceso de invasión de *Shigella sp.*, *Revista Panamericana de Infectología*. 11(2): 56-61.
- Bart A. *et al.*, 1998. Randomly Amplified Polymorphic DNA Genotyping of Serogroup A Meningococci Yields Results Similar to Those Obtained by Multilocus Enzyme Electrophoresis and Reveals New Genotypes. *Journal of Clinical Microbiology*. 1746-1749.
- Bekal, S., Brousseau, R., Masson, L., Prefontaine, G., Fairbrother, J., Harel, J., 2003. Rapid Identification of *Escherichia coli* Pathotypes by Virulence Gene Detection with DNA Microarrays. *Journal of Clinical Microbiology*. 41(5):2113-2115.
- Berry, R.E., Klumpp, D.J., Schaeffer, A.J., 2009. Urothelial cultures support intracellular bacterial community formation by uropathogenic *Escherichia coli*. *Infectology and Immunology*. 77:2762-72.
- Birnboim, H.C., Doly, J., 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*. 7(6): 1513-1523.
- Boyd, E.F., Hill, C.W., Rich, S.M., Hartl, D.L., 1996. Mosaic structure of plasmids from natural populations of *Escherichia coli*. *Genetics*. 143:101-110.
- Burska, U.L., Fletcher, J.N., 2014. Two plasmid-encoded genes of enteropathogenic *Escherichia coli* strain K798 promote invasion and survival within HEp-2 cells. *APMS*. 122:922-930.
- Chavero, P., 2015. Características de *Escherichia coli* Uropatógena (UPEC) causantes de infecciones recurrentes del tracto urinario (Tesis de Licenciatura) Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México.
- Ckkraborty, A., Adhikari, P., Shenoy, S., Baliga, S., Bhat, G., Rao, S., Biranthabail, D., Saralaya, V., 2017. Molecular characterization of

Escherichia coli isolates a tertiary care hospital on South India. Indian Journal of Medical Microbiology. 25(2): 305-310.

- Cusumano, C.K., Hung, C.S, Chen, S.L., Hultgren, S.J., 2010. Virulence Plasmid Harbored by Uropathogenic *Escherichia coli* Functions in Acute Stages of Pathogenesis. Infection and Immunity. 78(4): 1457-1467.
- Deguang, W., Xuewu, G., Jun, L., Xi, S., Feng, L., Yefu, C., Dongguang, X., 2013. A rapid and efficient one-step site-directed deletion, insertion, and substitution mutagenesis protocol. Analytical Biochemistry. 434:254-258.
- Dhakal, B.K., Mulvey, M.A., 2008. Uropathogenic *Escherichia coli* Invades Host Cells via an HDAC6-modulated Microtubule-dependent Pathway. The Journal of Biological chemistry. 284(1):446-454.
- Dodson, K.W., Pinkner, J.S., Rose, T., Magnusson, G., Hultgren, S.J., Waksman, G., 2001. Structural basis of the interaction of the pyelonephritic *E. coli* adhesion to its human kidney receptor. Cell. 105:733-743.
- Ejrnaes, K., 2011. Bacterial characteristics of Importance for Recurrent Urinary Tract Infections Caused by *Escherichia coli*. Danish Medical Bulletin. 54(4): 1-21.
- Ejrnaes, K., Sandvang, D., Lundgren, B., Ferry, S., Holm, S., Mosen, T., 2006. Pulsed-Field Gel Electrophoresis Typing of *Escherichia coli* Strains from Samples Collected before and after Pivmecillinam or Placebo Treatment of Uncomplicated Community-Acquired Urinary Tract Infection in Women. Journal Of Clinical Microbiology. 44(5): 1176-1781.
- Farshad, S., Ranjbar, R., Japoni, A., Hosseini, M., Anvarinejad, M., Mohammadzadegan, R., 2012. Microbial susceptibility, virulence factors and plasmid profiles of uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from children in Jahrom, Iran. Archives of Iranian Medicine. 15(5):312-316.
- Flores-Mireles, A.L., Walker, J.N., Caparon, M., Hultgren, S.J., 2015. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. Nature Reviews Microbiology. 13(5): 269–284.
- Foxman, B., 2002. Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. American Journal of Medicine. 113 (A): 5-13.
- Frömmel, U., Lehmann, W., Rödiger, S., Böhm, A., Nitschke, J., Weinreich, J., Groß, J., Roggenbuck, D., Zinke, O., Ansorge, H., Vogel, S., Klemm, P., et al., 2013. Adhesion of Human and Animal *Escherichia coli* Strains in Associated with Their Virulence-Associated Genes and Phylogenetic Origins. Applied and Environmental Microbiology. 79(9): 5814-5829.

- Frost, L.S., Leplae, R., Summers, A.O., Toussaint, A., 2005. Mobile genetic elements: The agents of open source evolution. *Nature Reviews Microbiology*. 3(9) 722-732.
- Funnell B. E., 2004. Introduction to plasmid biology, Washington DC.
- Girón, J.A., Ho, A.S., Schoolnik, G.K., 1993. Characterization of fimbriae produced by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Journal Bacteriology*. 175: 7391–7403.
- Glover, M., Moreira C.G., Sperandio, V., Zimmern, P., 2014. Recurrent urinary tract infections in healthy and no pregnant women. *Urological Science*. 25(1):1-8.
- Gomes, T.A.T., Waldir, P.E., Scaletsky, I.C.A., Guth, B.E., *et al.*, 2016. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Brazilian Journal of Microbiology*. 47:3-30.
- Gómez–Duarte O. G., M.D., Ph.D., 2015. Enfermedad diarreica agua por *Escherichia coli* patógenas en Colombia. *Revista Chilena de Infectología*. 31(5) 577-586.
- Guhathakurta, B., Sasmal, D., Ghosh, A.N., Kumar, R., Saha, P., Biswas, D., Khetawat, D., Datta, A., 1999. Adhesion and invasion of a mutant *Shigella flexneri* to a eukaryotic cell line absence of the 220-kb virulence plasmid. *FEMS Microbiology Letters*. 181:267-275.
- Heras, J., Domínguez, C., Mata, E., Pascual, V., Lozano, C., Torres, C., Zarazaga, M., 2015. GelJ- a tool for analyzing DNA fingerprint gel images. *BMC Bioinformatics*. 16:270.
- Hooton, T.M., M.D., 2012. Uncomplicated urinary tract infection. *The New England Journal of Medicine*. 366: 1028–1037.
- Hospenthal, M.K., Costa, T.R.D., Waksman, G., 2017. A comprehensive guide to pilus biogenesis in Gram-negative bacteria. *Nature Reviews Microbiology*. 15: 365-379.
- Hultgren, S.J., Martinez, J.J., 2002. Requirement of Rho-family GTPases in the invasion of type 1-piliated uropathogenic *Escherichia coli*. *Cellular Microbiology*. 4(1): 19–28.
- Hunstad, D.A., Justice, S.S., 2010. Intracellular Lifestyles and Immune Evasion Strategies of Uropathogenic *Escherichia coli*. *The Annual Review of Microbiology*. 64:203-221.
- Johnson J.R., 2003. Microbial virulence determinants and pathogenesis of urinary tract infection. *Infectious Disease Clinics of North America*.17:261-78.
- Johnson, T.J., Nolan, L.K., 2009. Pathogenomics of the Virulence Plasmids of *Escherichia coli*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 73(4):750-774.

- Klemm, P., Schembri, M.A., 2000. Bacterial adhesins: function and structure. *Medical Microbiology*. 290: 27-35.
- Knodler, L.A., Vallance, B.A., Celli, J., Winfree, S., Hassen, B., Montero, M., Steele-Montimer, O., 2010. Dissemination of invasive *Salmonella* via bacterial-induced extrusion of mucosal epithelia. *Proceeding of the National Academy of Science of the Unoted States of America*. 107(41):17733-8.
- Kucheria, R., Dasgupta, P., Sacks, S.H., Khan, M.S., Sheerin, N.S., 2005. Urinary tract infections: new insights into a common problem. *Postgraduate Medical Journal*. 81(952): 83–86.
- Lawrence, J.G., Hendrickson, H., 2003. Lateral gene transfer: when will adolescence end?. *Molecular Microbiology*. 50(3):739-749.
- Le Bouguenec, C., Archambaud, M., Labigne, A., 1992. Rapid and Specific Detection of the pap, afa and sfa Adhesing- Encoding Operons in Uropathogenic *Escherichia coli* Strains by Polymerase Chain Reaction. *Journal of Clinical Microbiology*. 1189-1193.
- Lewis, A.J., Richards, A.C., Mulvey, M.A., 2016. Invasion of Host Cells and Tissues by uropathogenic Bacteria. *Microbiology Spectrum*, American society for Microbiology Press. 4(6): 1-18.
- Lillington, J., Geibel, S., Waksman, G., 2015. Reprint of “Biogenesis and adhesion of type 1 and P pili”. *Biochim Biophys Acta*. 1850(3): 554–564.
- Liu, S.C., Han, X.M., Shi, M., Pang, Z.L., 2016. Persistence of Uropathogenic *Escherichia Coli* in the Bladders of female Patients with Sterile Urine after Antibiotic Therapies. *Medical Sciences*. 36(5): 710-715.
- Loeza, P.D., Valdez, J.J., Baizabal, V.M., López, J.E., 2004. Mecanismos de Replicación de los plásmidos bacterianos. *REB*. 23(2): 71-78.
- Luck SN, *et al.*, Invasion of epithelial cells by locus of enterocyte attachment-negative enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*. 2005.73(5):3063–3071
- Lüthje, P., Brauner, A., 2014. Virulence Factors of Uropathogenic *E. coli* and Their Interaction with the Host. *Advances in Microbial Physiology*. 65:338-359.
- Mann, R., Mediati, D.G., Duggin, I.G., Harry, E.J., Bottomley, A.L., 2017. Metabolic adaptations of Uropathogenic *E. coli* in the Urinary Tract. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 7(241): 1-15.
- Martinez, J.J., Mulvey, M.A., Schilling, J.D., Pinkner, J.S., Hultgren, S.J., 2000. Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells. *EMBO*. 19:2803-2812
- 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 B- lactamasa CTX-M- 15 aisladas de pacientes

de la comunidad en Mérida, Venezuela. *Revista Argentina de Microbiología*. 46(3):175-181.

- Mo, L., Huang, H.Y., Zhu, X.H., Shapiro, E., Hasty, D.L., Wu, X.R., 2004. Tamm- Horsfall protein is a critical renal defense factor protecting against calcium oxalate crystal formation. *Kidney International*. 66(3):1159-1166.
- Molina, J., 2011. Papel de plásmidos e integrones en la multiresistencia a antimicrobianos en cepas de *Escherichia coli* uropatógenas y su posible asociación con adherencia e invasividad en células cultivadas (Tesis de Doctorado) Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, México.
- Murray, P., Rosenthal, K., Pfaller, M., 2009. *Microbiología Médica*, 26a Ed., Elsevier, España, 934-942.
- Mysorekar, I.U., Hultgren, S.J., 2006. Mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli* persistence and eradication from the urinary tract. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103(38):14170-14175.
- Parsot, C., Sansonetti, P.J., 1996. Invasion and the pathogenesis of *Shigella* infections. *Current Topics Microbiology and Immunology*. 209:25-42.
- Pasqua, M., Michelacci, V., Di Martino, M.L., Grossi, M., Colonna, B., Morabito, S., Prosseda, G., 2017. The intriguing Evolutionary Journey of Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) toward Pathogenicity. *Frontiers in Microbiology*. 8(2390): 1-12.
- Pichon, C., Héchard, C., Du Merle, L., Chaudray, C., Bonne, I., Guadagnini, S., Vandewalle, A., Le, Bouguéneq, C., 2009. Uropathogenic *Escherichia coli* AL511 requires flagellum to enter renal collecting duct cells. *Cell Microbiology*. 11:616–28.
- Pilla, G., McVicker, G., Tanq, C.M., 2017. Genetic plasticity of the *Shigella* virulence plasmid is mediated by intra. and inter-molecular events between insertion sequences. *PloS Genetics*. 13(9):1-19.
- Pizarro-Cerdá, J., Cossart, P., 2006. Bacterial Adhesion and Entry into Host Cells. *Cell Press*. 124(4): 715-727.
- Ribet, D., Cossart, P., 2015. How bacterial pathogens colonize their hosts and invade deeper tissues. *Microbes and Infection*. 17(1): 173-183.
- Rice, J.C., Safdar, N., 2009. Urinary Tract Infections in solid Organ Transplant Recipients. *American Journal of Transplantation*. 9(4): S267-S272.
- Robins-Browne, R.M., Holt, K.E., Ingle, D.J., Hocking, D.M., Yang, J., Tauschek, M., 2016. Are *Escherichia coli* Pathotypes Still Relevant in the Era of Whole-Genome Sequencing?. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 141(6): 1-9.

- Rodríguez-Ángeles, G., 2002. Principal characteristics and diagnosis of the pathogenic groups of *Escherichia coli*. Rev. Salud Pública de México. 44 (5): 464-475.
- Rosen, D.A., Hooton, T.M., Stamm, W.E., Humphrey, P.A., Hultgren, S.J., 2007. Detection of intracellular bacterial communities in human urinary tract infection. PLoS Medicine. 4(12): 1949-1958.
- Schmidt, H., Scheef, J., Huppertz, H.I., Frosch, M., Karch, H., 1999. *Escherichia coli* O157:H7 and O157:H2 Strains that do not Produce Shiga Toxin: Phenotypic and Genetic characterization of Isolates Associated with diarrhea and Hemolytic-Uremic Syndrome. Journal of Clinical Microbiology. 37(11): 3491-3496.
- Schroeder, G.N., Hilbi, H., 2008. Molecular Pathogenesis of Shigella spp.: Controlling Host Cell Signaling, Invasion, and Death by Type III Secretion. Clinical Microbiology Reviews. 21(1):1344-156.
- Schwartz, D.J., Conover, M.S., Hannan, T.J., Hultgren, S.J. 2015. Uropathogenic *Escherichia coli* Superinfection Enhances the Severity of Mouse Bladder Infection. PLOS Pathogens. 11(1): 1-12.
- Sherlock, O., Munk, R., Klemm, P., 2005. The TibA adhesin/invasin from enterotoxigenic *Escherichia coli*: the *fas* genes link both phenotypes. Infection and Immunity. 173: 1230-1240.
- Silhavy, T.J., Berman, M. L., Enquist, L.W., 1984. Experiments with Gene fusions. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1a Edición, NY. 1984. 61-62
- Smith, J.L., Fratamico, P.M., Gunther, N.W., 2007. Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*. *Foodborne Pathogens and Disease*. 4 (2): 134-163.
- Stadler, J., Lemmens, R., Nyhammar, T., 2004. Plasmid DNA purification. The Journal of Gene Medicine. 6: S54-S56.
- Subashchandrabose, S., Mobley, H.L., 2015. Virulence and Fitness determinants of Uropathogenic *Escherichia coli*. Microbiology Spectrum. 3(4): 1-32.
- Valdevenito, J.P., 2008. Infección urinaria recurrente en la mujer. Revista chilena de infectología. 25(4): 268-276.
- Williams, K., Kubelik, A., Livak, K., Rafalski, A., Tingey, V., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetics markers. Nucleic Acids Research, 18: 6531-5.
- Rochelle, P., Marshall, M., Mead, J., Johnson, A., Korich, D., Rosen J., De Leon, R., 2002. Comparasion of In vitro Cell Culture and a Mouse Assay for Measuring Infectivity of *Cryptosporidium parvum*. Applied and Enviroment Microbiology. 68(8):3809-3817.

APÉNDICE

Soluciones para obtención de plásmidos

✚ Solución de lisis alcalina I:
Glucosa 50 mM
Tris-Cl 25mM (pH 8.0)
EDTA 10mM (pH 8.0)
Agua destilada: 100 mL
Se esteriliza 15 min a 120°C, 120lb/in

✚ Solución de lisis alcalina II:
NaOH 0.2 N (previamente se prepara un stock de 2 N)
SDS 1% (w/v)
Se toman 100 µL de NaOH stock y 100 µL de SDS y se lleva a 1 mL de H₂O destilada

✚ Solución de lisis alcalina III:
Acetato de potasio 5M: 60 mL
Ácido acético glacial: 11.5 mL
H₂O destila: 28.5 mL

✚ Solución amortiguadora Tris-EDTA (TE) pH 8.0
Tris-HCl 10mM: 500µL
EDTA 1mM pH 8.0: 100µL
Agua bidestilada 440 mL para 500mL totales, previamente se esteriliza el frasco y el agua en autoclave a 15 min a 120°C, 120lb/in.

Electroforesis

✚ Agarosa 0.5 %
Agarosa grado Biología Molecular: 0.5 g
TAE 1X: 100 mL

✚ TAE 1X
Tris base: 4.84 g
Ácido acético: 1.142 mL
EDTA pH=8, 0.5 M: 2 mL

H₂O bidestilada: 1000 mL

✚ Bromuro de etidio
El stock se encuentra a 10 mg/mL, a partir de este se prepara
Bromuro de etidio: 5 µL
Agua destilada: 100 mL

Ensayo de invasividad y adherencia

✚ Solución Buffer de fosfatos (PBS)
NaCl: 8 g
KCl: 0.2 g
Na₂HPO₄ (dibásico): 1.44 g
KH₂PO₄ (monobásico): 0.24 g
Se disuelve en 800 mL de H₂O destilada y se ajusta pH a 7.2, se afora a 1 L
Se esteriliza 15 min a 120 °C, 120 lb/in

✚ Tritón X-100 0.1 %
Tritón X-100: 5 µL
PBS: 5 mL
Mezclar en vortex.

✚ Colorante Giemsa
Azur Eosina – Azul de metileno: 1 g
Glicerol: 54 mL
Se mezcla, se calienta y se agrega:
Metanol: 4 mL
Se filtra

Medios

✚ Medio de conservación bacteriológico
Glicerol: 60 mL
Caldo Luria: 40 mL
Se esteriliza 15 min a 120 °C, 120 lb/in

✚ Caldo Luria
Tripton: 10 g

Extracto de levadura: 5 g
NaCl: 10 g
H₂O: 1000 mL
Se esteriliza 15 min a 120 °C, 120 lb/in

L-glutamina (200 mM, 100 X): 1 mL
SFB (Suero Fetal Bovino, inactivado): 5 mL
Se prepara en campana de flujo laminar.

✚ Medio gelosa especial
Base gelosa sangre: 20 g
Extracto de carne: 1.5 g
Agar bacteriológico: 15 g
H₂O: 1000 mL
Se esteriliza 15 min a 120 °C, 120 lb/in

✚ Agar cromogénico ITU
Peptona: 15 g
Cromogénico Mix: 26.3 g
Agar bacteriológico: 15 g
Se esteriliza 15 min a 120 °C, 120 lb/in

✚ Agar MacConkey
Digerido pancreático de gelatina: 17.0 g
Digerido péptico de Tejido animal: 1.5 g
Digerido pancreático de Caseína: 1.5 g
Lactosa: 10 g
Sales biliares: 1.5 g
Cloruro de sodio: 5.0 g
Cristal violeta: 0.001 g
Rojo neutro: 0.030 g
Agar bacteriológico: 13.5 g
pH final 7.1±0.2
Se esteriliza 15 min a 120 °C, 120 lb/in

✚ Agar Müeller-Hinton
Extracto de carne: 2.0 g
Digerido ácido de caseína: 17.5 g
Almidón: 1.5 g
Agar: 17.0 g
pH final 7.3±1
Se esteriliza 15 min a 120 °C, 120 lb/in

✚ DMEM adicionado
Cada 100 mL contiene:
Bicarbonato (7.5 %): 1 mL
HEPES (1 M): 1mL

