



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**IDENTIFICACIÓN DE LOS FACTORES DE VIRULENCIA DE CEPAS  
DE *ESCHERICHIA COLI* UROPATÓGENA AISLADAS DE  
PACIENTES MASCULINOS CON INFECCIÓN DE TRACTO  
URINARIO.**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA  
ALFREDO ESQUIVEL CHÁVEZ**



**MÉXICO, D.F.**

**2012**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Rodolfo Pastelín Palacios  
**VOCAL:** Tzvetanka Dimitrova Dinkova  
**SECRETARIO:** María del Rosario Morales Espinosa  
**1er. SUPLENTE:** Santiago Ávila Ríos  
**2° SUPLENTE:** Rigoberto Hernández Castro

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:** Laboratorio de Genómica Bacteriana. Nuevo Edificio de Investigación, 5to piso. Facultad de Medicina.

**ASESOR DEL TEMA:**

---

Dra. María del Rosario Morales Espinosa

**SUPERVISOR TÉCNICO:**

---

cDra. Gabriela Delgado Sapién

**SUSTENTANTE:**

---

Alfredo Esquivel Chávez

## Agradecimientos



## Índice

	<u>Página</u>
<b>Resumen</b> .....	8
<b>Introducción</b> .....	10
1 Epidemiología de las Infecciones de Tracto Urinario.....	10
1.1. Frecuencia de las Infecciones de Tracto Urinario.....	10
1.2. Agentes patógenos frecuentes en las Infecciones de Tracto Urinario.....	12
1.3. Formas de transmisión en las Infecciones de Tracto Urinario.....	15
2 <i>Escherichia coli</i> .....	16
2.1 Características morfológicas y bioquímicas de <i>Escherichia coli</i> Uropatógena.....	16
2.2 Factores de Virulencia de <i>Escherichia coli</i> Uropatógena.....	17
2.2.1 Sistemas de obtención de Hierro.....	18
2.2.2 Sistemas de Adhesión.....	19
2.2.3 Toxinas secretadas.....	20
2.3 Patogénesis.....	22
3 Métodos de Caracterización.....	24
3.1 Métodos de Caracterización Convencionales.....	24
3.1.1 Urocultivo.....	24
3.1.1.1 Recolección de muestras.....	24
3.1.1.2 Análisis de Muestras: Método del asa calibrada.....	26
3.1.1.3 Análisis de Muestras: Método de las Diluciones.....	29
3.2 Métodos de Caracterización Moleculares.....	31
3.2.1 Métodos basados en la secuenciación del ADN bacteriano.....	31
3.2.2 Métodos basados en la amplificación por PCR.....	32

	<u>Página</u>
3.2.3 Métodos basados en el análisis de restricción del ADN bacteriano.....	32
4 Electroforesis en Gel de Campos Pulsados (PFGE).....	33
<b>Objetivo General</b> .....	38
<b>Objetivos Particulares</b> .....	38
<b>Hipótesis</b> .....	38
<b>Metodología</b> .....	39
1 Cepas de <i>Escherichia coli</i> Uropatógena.....	39
2 Serotipificación de las cepas de <i>Escherichia coli</i> Uropatógena.....	40
3 Protocolo de Electroforesis en Gel de Campos Pulsados (PFGE) para bacterias patógenas.....	40
3.1 Preparación de los bloques de agarosa de PFGE a partir de cultivo en agar.....	40
3.2 Formación de los bloques de agarosa .....	41
3.2.1 Lisis de las células en los bloques de agarosa de agarosa.....	42
3.3 Lavado de los bloques de agarosa de agarosa posterior a Lisis celular.....	42
3.4 Restricción del ADN en los bloques de agarosa con <i>Xba</i> I.....	43
3.5 Producción del gel de agarosa.....	45
3.6 Condiciones de Electroforesis.....	47
3.7 Teñido y documentación del gel de agarosa del PFGE.....	47
4 Detección por Quimioluminiscencia de los factores de virulencia a partir de membranas de nylon-H <sup>+</sup> con el ADN de cepas de UPEC.....	48
4.1 Protocolo de extracción de ADN bacteriano por técnica de GES.....	48

4.2 Impresión del ADN de cepas de UPEC en membranas de nylon-H <sup>+</sup> .....	49
4.3 Obtención del producto de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de los genes de virulencia.....	50
	<u>Página</u>
4.4 Elaboración de la sonda marcada con Digoxigenina-dUTP a partir del producto de PCR de los genes de virulencia.....	51
4.5 Hibridación y Detección por Quimioluminiscencia.....	52
<b>Resultados</b> .....	54
Serotipificación.....	54
Determinación de los genes de virulencia.....	54
Perfiles Cromosomales.....	58
<b>Discusión de Resultados</b> .....	65
<b>Conclusión</b> .....	69
<b>Perspectivas</b> .....	69
<b>Bibliografía</b> .....	70
<b>Apéndice</b> .....	77



## Resumen

Las Infecciones de Tracto Urinario (ITUs) son la 3ª infección más común en los humanos después de las infecciones respiratorias y las gastrointestinales (Najar et al., 2009). Cerca del doble de las mujeres, en comparación con los hombres, han visitado al médico debido a una ITU sintomática, y del 40 al 50% de las mujeres han experimentado al menos una infección de este tipo en su vida (Davis et al., 2005).

La *Escherichia coli* Uropatogénica (UPEC) es el agente responsable del 70-90% de las Infecciones de tracto urinario (Dielubanza et al., 2011; Foxman B, 2010 & Ronald A, 2003). A pesar de que cepas UPEC existen dentro del tracto intestinal de los humanos, son muy distintas de la mayoría de las cepas de *E. coli* comensales o de las causantes de diarrea, ya que las colonias de UPEC contienen factores específicos que permiten su transición exitosa desde el tracto intestinal hasta el tracto urinario. Una gran variedad de genes han sido identificados en las UPEC que permiten a estos microorganismos resistir las defensas del hospedero y establecer una infección en este sitio blanco específico. Estos factores incluyen adhesinas fimbriales (tipo 1, P y S/F1C), toxinas (factor necrozante citotóxico tipo 1 [*cnf1*] y hemolisinas), mecanismos de evasión de las defensas del hospedero (capsula y antígeno O), y múltiples sistemas de obtención de hierro (aerobactina, enterobactina, similares a enterobactina incluyendo *iroN* y yersiniabactina) (Brzuszkiewicz et. al., 2006; Wiles et al., 2007; & Marrs et al., 2005).

La caracterización genotípica de las bacterias patógenas ha llegado a ser un importante objetivo en las investigaciones epidemiológicas de agentes infecciosos. Métodos moleculares aplicados a la Epidemiología molecular se usan para determinar la relación entre los microorganismos asociados a una enfermedad mediante el rastreo de sus fuentes de infección, estableciendo su

origen geográfico y distribución, identificando la ruta y los factores genéticos responsables de patrones específicos de transmisión y detectando los genes responsables de su virulencia y resistencia a antibióticos (Karama et al., 2010).

La Electroforesis en Gel de Campos Pulsados (ó Pulsed-Field Gel Electroforesis, PFGE) es una técnica molecular en la cual el genoma bacteriano es digerido con una enzima de sitio de corte poco frecuente, para generar fragmentos de ADN de una gran variedad de tamaños (en kilobases). Estos fragmentos son separados durante la electroforesis donde la polaridad de la corriente es cambiada a intervalos regulares permitiendo la separación de 10-20 fragmentos de ADN, con un rango de 20 a 800 kb. (Foley et al., 2009; & Karama et al., 2010) Este método es reconocido como uno de los más comunes y de mejor opción para generar datos en el seguimiento y vigilancia de infecciones bacterianas o en un brote particular (Karama et al., 2010).

En este estudio se caracterizó genótipicamente un grupo de cepas de *Escherichia coli* Uropatógena (UPEC) aisladas de mujeres diagnosticadas con cistitis y de hombres diagnosticados, en su mayoría, con prostatitis. Para estas cepas se determinaron los perfiles cromosomales por medio de la Electroforesis en Gel de Campos Pulsados (PFGE) y la presencia de genes de virulencia por medio de la hibridación de un macroarreglo que contiene los ADN cromosómicos de 47 cepas UPEC con cada uno de los productos de PCR de los genes de virulencia marcados con digoxigenina, los cuales fueron usados como sondas

La población de cepas estudiadas mostró que las cepas aisladas de mujeres presentan un perfil cromosómico más homogéneo, compartiendo entre ellos un número significativo de bandas que permiten la agrupación de las cepas en una rama principal. La determinación de los genes de virulencia entre nuestras cepas mostró que no hay diferencia significativa entre el contenido de genes de virulencia de la cepa y la patología clínica de la que se aísla.

## Introducción

### 1 Epidemiología de las Infecciones de Tracto Urinario

Una Infección de Tracto Urinario (ITU) es la invasión patogénica del urotelio con una inflamación resultante, en la cual un microorganismo (en nuestro caso una bacteria, *Escherichia coli* Uropatógena) se ha establecido y se está multiplicando dentro del tracto urinario (Dielubanza et al., 2011).

Una ITU puede clasificarse como infección de vías urinarias inferiores (confinado a la vejiga, próstata o uretra) o infección de vías urinarias superiores (pielonefritis). También puede clasificarse como complicada o no complicada. Una ITU no complicada es aquella que ocurre en un huésped normal, el cual no tiene anomalías estructurales o funcionales, no está embarazada, ni ha sido quirúrgica o instrumentalmente intervenido (por ejemplo, una sonda urinaria). Las ITU complicadas son aquellas que se presentan en personas con una enfermedad de base que predisponga a sufrir algún tipo de ITU y en aquellas personas que presentan una sonda urinaria (Foxman B., 2010).

Las ITU son la 3ª infección más común en los humanos, después de las infecciones respiratorias y las gastrointestinales. De hecho, las infecciones del tracto urinario son las más comunes de las infecciones adquiridas en una comunidad y de las infecciones nosocomiales (Najar et al., 2009).

#### 1.1 Frecuencia de las Infecciones de Tracto Urinario

Cerca del doble de las mujeres, en comparación con los hombres, han visitado al médico debido a una ITU sintomática, y del 40 al 50% de las mujeres han experimentado al menos una infección de este tipo en su vida (Davis et al., 2005).

Esto se debe principalmente a diferencias anatómicas entre los 2 géneros. La mayor susceptibilidad femenina a las ITU se encuentra en función de factores anatómicos básicos, así como fisiológicos y de comportamiento que van cambiando durante la vida de las mujeres. La corta uretra de las mujeres provee un puente ideal para patógenos invasores y su rápido ingreso a la vejiga, además, la cercanía de la vagina con el ano permite un ingreso más fácil al tracto urinario femenino. La uretra de los hombres es más larga y facilita la expulsión de bacterias que ascienden antes que logren entrar en contacto con la vejiga, lo que probablemente sea el factor protector más importante contra las infecciones en los hombres (Dielubanza et al., 2011).

Una ITU puede presentarse a cualquier edad. Entre los recién nacidos e infantes, los niños son más afectados que las niñas (Najar et al., 2009). Durante la niñez, bacteriurias persistentes con o sin sintomatología repetitiva llegan a ocurrir en un pequeño grupo (menos del 2%) de las niñas en edad escolar. Estas niñas, y también niños en edad escolar que presenten bacteriuria, deben tener evaluaciones urológicas para detectar anomalías estructurales que pudieran corregirse cuando una ITU es documentada (Krieger et al., 2011).

Mujeres sexualmente activas tienen un incrementado riesgo de contraer cistitis. Es importante recalcar que la mayoría de las infecciones agudas involucran a mujeres jóvenes (Najar et al., 2009). En ausencia de prostatitis (Inflamación de la próstata usualmente causada por una infección, caracterizada por fiebre, dolor perineal, o en espalda baja y en ocasiones, frecuencia urinaria y urgencia. Forbes, S 2007), una ITU en los hombres es inusual. El riesgo de adquirir una cistitis (Inflamación de la vejiga causada por una infección bacteriana. Forbes, S 2007) causada por la bacteria *Escherichia coli* Uropatógena (UPEC) en los hombres jóvenes aumenta debido a la falta de circuncisión o a tener una pareja con una colonización vaginal por esta bacteria (Krieger et al., 2011).

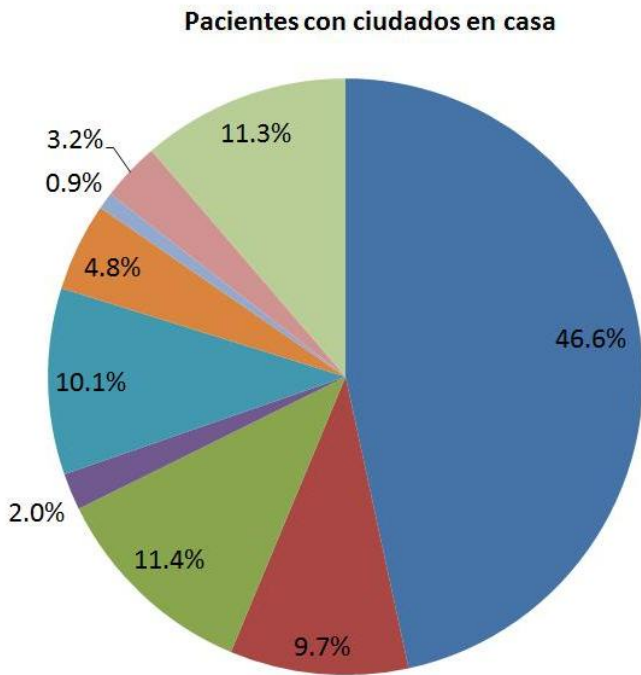
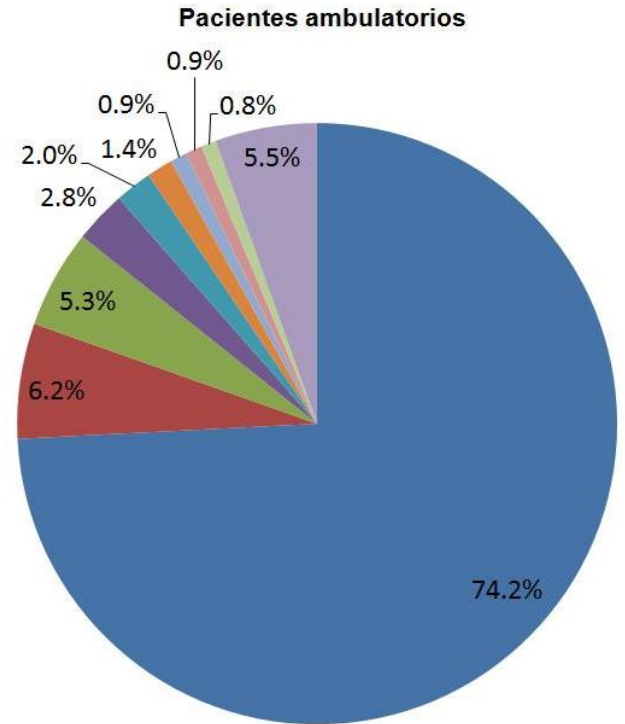
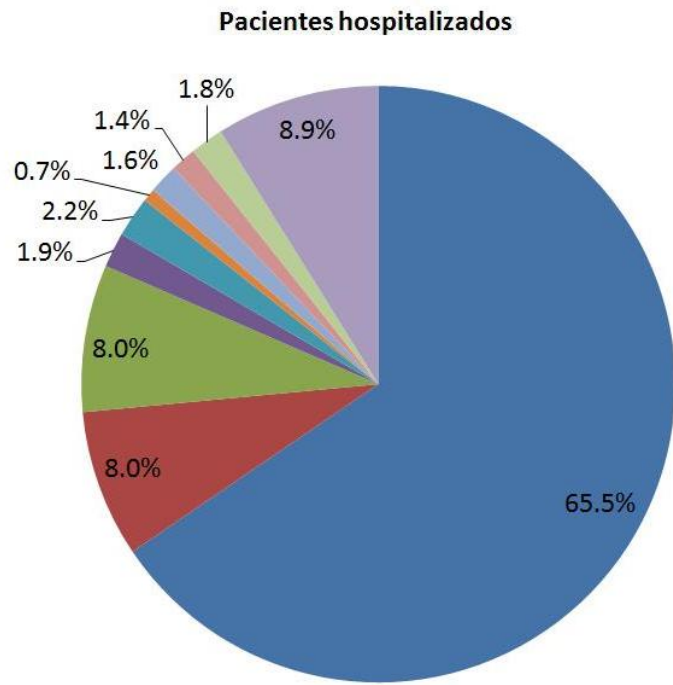
Se debe mencionar que a cualquier edad, ambos géneros pueden desarrollar una ITU en presencia de factores de riesgo que alteren el flujo urinario. Estos incluyen (Najar et al., 2011):

1. Anomalías congénitas
2. Cálculos renales
3. Oclusión ureteral (parcial o total)
4. Reflujo vesico-ureteral
5. Orina residual en vejiga
  - Vejiga Neurogénica
  - Constricción uretral
  - Hipertrofia prostática
6. Instrumentación del tracto urinario
  - Cateterización
  - Dilatación uretral
  - Cistoscopia

## **1.2 Agentes patógenos frecuentes en las Infecciones de Tracto Urinario**

La etiología de una Infección del Tracto Urinario (ITU) es el resultado del ascenso de las bacterias del intestino o mucosa vaginal, por lo que los patógenos más comunes son bacterias facultativas, anaerobias, Gram negativas (Dielubanza et al., 2011).

A pesar de ello, la mayor parte de las ITU son causadas por la bacteria *Escherichia coli* Uropatógena (UPEC), de hecho, es el agente causal del 70-90% de las ITU. Otros microorganismos que causan ITU incluyen miembros de la familia Enterobacteriaceae, estreptococos, estafilococos y algunas levaduras (Dielubanza et al., 2011; Foxman B, 2010 & Ronald A, 2003). Figura 1



- Escherichia coli
- Klebsiella pneumoniae
- Enterococcus sp.
- Streptococcus agalactiae
- Proteus mirabilis
- Staphylococcus saprophyticus
- Streptococcus viridans
- Klebsiella oxytoca
- Pseudomonas aeruginosa
- Otros

**Figura 1.** Variación de la etiología de las ITU de acuerdo a los tipos de población más comunes (Tomado de Foxman B, 2010)

Es importante remarcar que la etiología de las Infecciones de Tracto Urinario se ve afectada por factores subyacentes del hospedero que complican la infección, tales como la edad, diabetes, lesiones de espina dorsal ó cateterización. Por ende, las ITU complicadas tienen una etiología más diversa en comparación a las ITU no complicadas. Además, organismos que rara vez causarían una enfermedad en personas sanas, pueden causar enfermedades significativas en pacientes con alguna enfermedad anatómica, metabólica o inmunológica subyacente (Ronald A., 2003).Tabla 1

**Tabla 1.** Principales patógenos de Infecciones de Tracto Urinario (UTI) complicadas versus las de no complicadas. (Tomado y modificado de Ronald A., 2003)

Patógenos de ITU no complicadas	Patógenos de ITU complicadas
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Enterococcus sp.</i>	<i>Klebsiella sp.</i>
<i>Klebsiella sp.</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	<i>Serratia marcescens</i>
	<i>Proteus mirabilis</i>
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	<i>Enterococcus faecalis</i>
	Estreptococos del grupo B

Existen una gran cantidad de estudios que reportan a *E. coli* como el agente etiológico de las Infecciones de Tracto Urinario. Un estudio realizado por Eshwarappa et al., 2011 buscó determinar la distribución de cepas bacterianas patógenas dentro de un hospital en la India, y encontró que de 510 casos diagnosticados con ITU el 66.9% fue causado por *E. coli*.

Ghenghesh et al., 2009 determinó los organismos causantes de ITU en pacientes con diabetes mellitus en Libia, concluyendo que de 77 (57%) pacientes donde se logró identificar al uropatógeno, en 18 casos (13%) el

principal agente etiológico fue *E. coli* e incluso fue el principal agente etiológico en pacientes sin Diabetes mellitus con 29 (18%) de 110 casos (67%).

Otro estudio realizado en la universidad de ciencias médicas de Tabriz en Irán, encontró que *E. coli* se presentó en el 74.6% de los casos positivos de urocultivos de pacientes diagnosticados con ITU (Farajnia et al., 2009).

### **1.3 Formas de transmisión en las Infecciones de Tracto Urinario**

*E. coli* normalmente coloniza el tracto gastrointestinal, por lo que se presume que una ITU es el resultado del movimiento de esta bacteria del intestino hacia el tracto urinario (Manger et al., 2008).

Otra forma de transmisión puede deberse a una persona que ya se encuentra infectada. Dado que grandes cantidades de bacterias pueden crecer en la orina, es probable que las manos se contaminen durante la micción, las cuales pueden transferir directamente la bacteria a la pareja o a otra persona durante alguna actividad íntima o indirectamente transmitirla vía comida o agua (Foxman B., 2010).

El intestino de animales es considerado un reservorio de UPEC. De hecho, cepas de UPEC aisladas de perros, gatos y humanos están muy relacionadas filogenéticamente. Además, estas cepas pueden cruzar las barreras entre especies y colonizar exitosamente tanto humanos como a los animales de compañía, como lo son los perros y gatos. Por lo que estos animales deben ser considerados reservorios potenciales para la transmisión de UPEC a humanos (Bélanger et al., 2011).

La forma de transmisión más común de las ITU nosocomiales son atribuibles a sonda urinaria, además de que la manipulación urogenital durante cirugías o cuidados médicos incrementando el riesgo de transmisión (Foxman B., 2010).



## **2. *Escherichia coli***

*Escherichia coli* es uno de los microorganismos mejor y más profundamente estudiados. Esta bacteria es una especie ampliamente distribuida en el ambiente y en el intestino de mamíferos; sin embargo, existen tipos patógenos para el hombre como son: *E. coli* enteropatógena (EPEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroinvasiva (EIEC), enterotoxigénica (ETEC) y enteroagregativa (EAEC), todos ellos involucrados en cuadros diarreicos importantes (Welch et al., 2002). Las *E. coli* patógenas extraintestinales (ExPEC) son otro grupo variado de patógenos que están involucrados en el desarrollo de meningitis neonatal, sepsis y de infecciones del tracto urinario (Najar et al., 2009; Foxman B., 2010 & Krieger et al., 2011).

### **2.1 Características morfológicas y bioquímicas de *Escherichia coli* Uropatógena**

*Escherichia coli* es un bacilo gramnegativo que mide de 1 a 3  $\mu\text{m}$  por 0.5  $\mu\text{m}$ , móvil por poseer flagelos peritricos, aunque existen variantes inmóviles no flageladas, no forma esporas, y generalmente no presenta capsula. En cultivos jóvenes la forma cocobacilar es bastante frecuente y en los cultivos viejos se presenta la forma bacilar (Murray P et al., 2006).

Este microorganismo crece bien en los medios de cultivo comunes de laboratorio. Forma colonias lisas, circulares, convexas con bordes bien definidos, algunas cepas producen hemólisis en Agar Sangre. Por lo general ocasiona reacciones positivas para indol, lisina descarboxilasa y fermentación del manitol, y produce gas a partir de la glucosa (Brooks G.F. et. al., 2008). La tabla 2 resume las reacciones bioquímicas más importantes de *E. coli* que son utilizadas para la diferenciación e identificación de la especie.

**Tabla 2.** Patrón bioquímico de *Escherichia coli*.

(Tomado y modificado de Garza R., 2005.)

Microorganismo	Glu	Lac	Gas	Sul	Ind	Mov	Cit	Sac	Ure	Man	V-P
<i>E. coli</i>	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-

Clave: Glu = fermentación de glucosa; Lac = fermentación de lactosa; Gas = H<sub>2</sub> + CO<sub>2</sub>; Sul = producción de ácido sulfhídrico; Ind = indol; Mov = movilidad; Cit = utilización de citrato; Sac = fermentación de sacarosa; Ure = ureasa; Man = fermentación de Manitol; V-P = Voges Prokauer

## 2.2 Factores de Virulencia de *Escherichia coli* Uropatógena

La tabla 3 presenta un conjunto de genes de *E. coli* que han sido potencialmente implicados en *Escherichia coli* Uropatógena (UPEC) para establecer una infección de tracto urinario. Es importante recalcar que incluso entre distintas cepas de UPEC existen diferencias en el repertorio y niveles de expresión de los factores de virulencia, estas diferencias pueden afectar el crecimiento bacteriano y la persistencia del microorganismo en el tracto urinario (Wiles et al., 2008).

**Tabla 3.** Principales factores de virulencia relacionados con *Escherichia coli* Uropatógena

Gen (Factor de virulencia)	Función u homología	Referencia
<i>fyuA</i> (receptor a yersiniabactina)	Receptor de membrana externa para yersiniabactina	Feldmann et al., 2007
<i>iroN</i> (receptor a salmoquelina)	Receptor de membrana externa a salmoquelina	Feldmann et al., 2007
<i>iroB</i> y/o <i>iroE</i> (salmoquelina)	Sideróforo Salmoquelina	Wiles et al., 2008
<i>ybtS</i> , <i>ybtE</i> , <i>ybtT</i> y/o <i>ybtU</i> , (yersiniabactina)	Sideróforo Yersiniabactina	Wiles et al., 2008
<i>fim</i> (pili tipo 1)	Adherencia a células uroepiteliales e invasión mediada por FimH	Wiles et al., 2008
<i>fimC</i> (chaperona)	Chaperona para ensamble de pili tipo 1	Marrs et al., 2005
<i>papG</i> (pili tipo P)	Adherencia a células uroepiteliales	Wiles et al., 2008
<i>papD</i> (chaperona)	Chaperona para ensamble de pili tipo P	Vitagliano et al., 2007

**Tabla 3.** (Continuación) Principales factores de virulencia relacionados con *Escherichia coli* Uropatogénica

Gen (Factor de virulencia)	Función u homología	Referencia
<i>sfa</i> (familia de fimbria S)	Factores de adherencia	Marrs et al., 2005
<i>foc</i> (familia de fimbria F1C)	Factores de adherencia	Wiles et al., 2007
<i>cnf1</i> (Factor citotóxico necrozante tipo 1)	Causa deformaciones y daño en citoquinesis de células eucariontes	Marrs et al., 2005
<i>hly</i> ( $\alpha$ -hemolisina)	Lisis de células rojas sanguíneas	Marrs et al., 2005
<i>sat</i> (Sat)	Toxina autotransportadora, serin-proteasa.	Marrs et al., 2005

### 2.2.1 Sistemas de obtención de Hierro:

Para el crecimiento, las bacterias requieren una concentración citoplasmática de hierro de aproximadamente  $10^{-6}$  M. Consecuentemente, bacterias patógenas incluyendo las *Escherichia coli* Patógenas Extraintestinales (ExPEC, por sus siglas en inglés) y más específicamente UPEC han desarrollado múltiples estrategias para tomar el hierro del hospedero. Estas incluyen la expresión de sistemas de adquisición de hierro que utilizan sideróforos (moléculas de bajo peso molecular que presentan una alta afinidad por el ión hierro III,  $Fe^{3+}$ ) que toman el hierro del ambiente y subsecuentemente lo concentran en el citosol de la bacteria (Wiles et al., 2008). Dos de estos sistemas son: el sistema del sideróforo yersiniabactina con el receptor de membrana externa FyuA (codificado por el gen *fyuA*) y el sistema de salmoquelina, el cual es caracterizado por el receptor catecolato IroN (codificado por el gen *iroN*). (Feldmann et al., 2007).

Un estudio realizado en el 2007 por Feldmann y colaboradores demostró que el receptor IroN está involucrado en la invasión in vitro de células uroteliales por *Escherichia coli*, sugiriendo así su posible participación en la infección in vivo.

Henderson y col. en 2009 compararon la producción de sideróforos entre cepas de *E. coli* aisladas de la orina y las cepas aisladas del intestino de pacientes con una ITU recurrente, encontrando que mientras que todas las cepas producen enterobactina, las cepas aisladas de orina producen en mayor proporción los sideróforos yersiniabactina y salmoquelina.

### **2.2.2 Sistemas de Adhesión:**

La colonización de las vías urinarias por UPEC depende de su capacidad de unirse a las células y tejidos del huésped. La adherencia también estimula la entrada de la bacteria en las células del hospedero, un proceso que parece promover la supervivencia de las UPEC en el tracto urinario (Bower et al., 2005).

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

El Pili tipo 1 y el tipo S son los organelos más estudiados, los cuales son codificados por muchas de las cepas de UPEC.

El pili P de las UPEC se ensambla mediante una vía altamente conservada conocida como “chaperone-usher pathway” (Verger et al., 2006 & Vitagliano et al., 2007) el cual involucra una gran cantidad de componentes proteínicos del grupo de genes *pap*. Uno de estos componentes es la proteína PapD, la cual es una chaperona requerida para ensamblar el pili puesto que cataliza el plegamiento de las subunidades que son incorporadas al organelo, y también transporta las subunidades a lo largo del espacio periplásmico (Bann et al., 2004; Hedenström et al., 2005 & Vitagliano et al., 2007). De hecho, en ausencia de PapD estas subunidades son degradadas (Bann et al., 2004).

La expresión del pili P está frecuentemente asociada con las cepas de UPEC aisladas de pacientes con pielonefritis (Wiles et al., 2008), con la presencia de bacteriuria y una respuesta inmune activa en modelos animales y en el tracto urinario humano (Klemm et al., 2006).

Una adhesina específica llamada PapG, que está localizada en el extremo distal del pili P y media la adhesión de la bacteria a las células del hospedero (Klemm et al., 2006; Wiles et al., 200; Marrs et al., 2005 & Rasko et al., 2001).

El grupo de genes *fim* codifican para las proteínas responsables de la producción del pili tipo 1, la proteína Fim C presenta una actividad similar a PapD (codificada por *fimC*). Aunque los genes *fim* no se encuentran expresados de una manera significativamente alta en las UPEC (en comparación con las cepas intestinales), diversas investigaciones han demostrado el importante rol que el pili tipo 1 lleva a cabo en la colonización inicial en la vejiga (Rasko et al., 2001; Welch et al., 2002; Klemm et al., 2006; Marrs et al., 2005 & Wiles et al., 2008)

Otra estructura de importancia en la adherencia es la fimbria S de *E. coli*, la cual se une a los sialilgalactosidos y está implicada en las Infecciones de tracto urinario *in vivo* en ratas (Marrs et al., 2005). De hecho, cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con una ITU son por lo menos 2 veces más propensos a portar genes de fimbria S que las cepas de origen intestinal (Wiles et al., 2008).

### **2.2.3 Toxinas secretadas:**

Las toxinas son factores de virulencia importantes en una gran variedad de enfermedades causadas por *E. coli*. La producción de toxinas por *E. coli* Uropatógena, puede causar una respuesta inflamatoria, responsable de los síntomas de las Infecciones del Tracto Urinario (Marrs et al., 2005).

Algunas toxinas son secretadas por el sistema de secreción tipo V y son conocidas como autotransportadoras. La toxina Sat (toxina secretada autotransportadora) es una toxina que se ha demostrado que induce un daño severo al riñón en modelos ratones con ITU, causando la disolución de la membrana glomerular, pérdida de las células epiteliales tubulares y la vacuolización del tejido renal (Wiles et al., 2008 & Guyer et al., 2002).

La Hemolisina  $\alpha$  (Hly $\alpha$ ) y el Factor Citotóxico Necrozante 1 (CNF1) se encuentran asociadas a vesículas de membrana externa.

CNF1 es una proteína de 115 kDa con una actividad *in vivo* altamente letal y necrotóxica, lo cual se atribuye a su habilidad para activar constitutivamente la familia de Rho GTPasas: Rho A, Rac y/o Cdc42 (Wiles et al., 2008). La activación de estas GTPasas afecta diversas funciones de la célula eucarionte, como es la inducción de la formación de una membrana rugosa, la formación de fibras de estrés de actina, el bloqueo en la citoquinesis y la modulación de vías de señalización inflamatorias (Kouokam et al., 2006).

Las hemolisinas contribuyen al daño tisular a través de efectos citolíticos a células como eritrocitos, leucitos y plaquetas, además de promover la invasión bacteriana y la persistencia del microorganismo en el tracto urinario del hospedero. Provee al microorganismo de fuentes de hierro y actúa sobre células fagocíticas causando su lisis favoreciendo de esta manera la evasión de la respuesta inmune (Guidoni et al., 2006).

Diversos estudios fundamentan la participación de las toxinas como importantes factores de virulencia en pacientes con ITU, determinando la presencia y/o expresión del gen, así como la actividad del producto del mismo e incluso han observado la producción simultánea de 2 o más de estas toxinas.

Maroncle et al., 2006 encontró que la toxina Sat se expresaba con mucho mayor frecuencia en cepas de *E. coli* asociadas a pacientes con pielonefritis aguda (68% de las cepas) en comparación con el 14% en las cepas de origen intestinal.

El estudio realizado por Idress y colaboradores en 2010 demuestra que los genes *sat* y *hly* tuvieron la misma frecuencia de presencia del gen, con el 59.52% en los casos de pielonefritis y de 28.81% en los casos de cistitis.

En 2006 Guidoni y col. reportaron que el 57% de las *E. coli* aisladas de muestras de pacientes con pielonefritis y el 55% de los aislados de cistitis, presentaron actividad de  $\alpha$  hemolisina, además de que el 18% de las cepas producían CNF1 en ambos casos.

El estudio realizado por Mitsumori y colaboradores en 1999 arrojó que el 69% de las cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con prostatitis aguda presentaron genes de *hly* y el 64% de los mismos el gen de *cnf1*.

Un estudio similar realizado por Krieger et al., 2011 observó la prevalencia de distintos genes de virulencia en cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con prostatitis aguda, encontrando que el 72.2% de los aislados presentaron el gen *hly* y el 61.1% el gen de *cnf1*.

### **2.3 Patogénesis.**

La patogénesis de una ITU causada por las UPEC no está completamente dilucidada, pero probablemente involucra la expresión de una serie de factores de virulencia que facilitan la colonización y evasión de la respuesta inmune. En la figura 2, se muestra una visión general de muchos de los eventos clave que tienen lugar durante el transcurso de una infección de la vejiga.



**Figura 2.** Interacción entre la UPEC invasora y el huésped durante una infección del tracto urinario. (Tomado de Wiles et al., 2008)

Las UPEC además de expresar los factores de adherencia como son el pili tipo 1, S, P y F1C (1, estructuras en verde) secretan toxinas y otros factores de virulencia (2) ya sea solas o con asociación a vesículas de membrana externa (Wiles et al., 2008).

Sideróforos como salmoquelina y yersiniabactina (3, estructuras en azul) liberadas por UPEC toman el hierro libre del hospedero (Feldmann et al., 2007) en competencia con moléculas quelantes de hierro del hospedero (discos blancos) (Wiles et al., 2008).

El pili tipo 1 media la unión bacteriana a las células epiteliales de la vejiga y también facilita la invasión intracelular de la bacteria (4) (Dielubanza et al., 2011).

Las células epiteliales superficiales, las cuales son binucleadas y tienen formas hexagonales o pentagonales muy características, forman el lumen de la vejiga y son los blancos primarios de la invasión por UPEC (Wiles et al., 2008). Las UPEC pueden multiplicarse rápidamente dentro de las células superficiales, formando grandes comunidades rodeadas por biopelículas (Foxman B., 2010).



El desprendimiento de las células superficiales infectadas de la vejiga facilitan la eliminación de las bacterias intracelulares, pero deja más susceptibles a infección a las células inmaduras subyacentes (5) (Svanborg et al., 2006)

La liberación o eflujo de las bacterias a partir de las células infectadas del hospedero promueve la diseminación y persistencia de las UPEC dentro del tracto urinario (6) (Svanborg et al., 2006).

### **3. Métodos de Caracterización**

Existen diversos métodos de caracterización que se pueden aplicar para la detección e identificación de bacterias patógenas. Estos métodos se dividen principalmente en métodos convencionales y métodos moleculares, se hará una breve descripción de los mismos y la aplicación correspondiente para caracterizar a *E. coli*:

#### **3.1 Métodos de Caracterización Convencionales:**

Los métodos convencionales se basan principalmente en técnicas de cultivo, las cuales utilizan medios enriquecidos, seguido por el aislamiento de colonias en un medio selectivo e identificación bioquímica. (Gugliandolo C. et al., 2011)

##### **3.1.1 Urocultivo:**

###### **3.1.1.1 Recolección de muestras:**

La recolección de las muestras que se analizan microbiológicamente en el laboratorio, ésta se puede lograr mediante varios métodos, entre los que destacan la micción media, el cateterismo, la punción suprapúbica, la habilitación de los catéteres permanentes y el empleo de colectores pediátricos (Garza R., 2005).

Sin embargo, es el método de la micción media el que se utiliza regularmente, debido a que no representa mayores problemas para el paciente, cuando éste es aleccionado convenientemente. Cabe subrayar que la confiabilidad de este método depende de que el enfermo realice de manera adecuada la limpieza de las zonas cercanas a la uretra, a fin de que se elimine a la mayor parte de los microorganismos que conforman la flora habitual de la región, de incorporarse a la muestra, imposibilitará la lectura e interpretación de los resultados (American Academy of Pediatrics, 2011).

Por este motivo, se deberán emplear agua jabonosa, esponjas y agua estériles, enjuagando lo suficiente para que no queden trazas de jabón que puedan impedir el desarrollo de los probables agentes etiológicos.

Una vez efectuada la limpieza, se descarta en el inodoro la primera parte de la micción y, sin que ésta se suspenda, se recogen los 20 a 30 mL siguientes en el depósito correspondiente (Subcommittee on Urinary Tract Infection, 2011).

Por su parte, la técnica de cateterismo era la más utilizada hace algunas décadas, empero, se demostró que con cierta frecuencia actuaba como vehículo para que los microorganismos (presentes en la sonda o en la porción externa de la uretra) alcanzaran vejiga, uréteres y riñón, agravando la condición de los enfermos. Por tales razones se sustituyó por el método de micción media, limitándose su empleo a los pacientes que presentan disuria o se encuentran en el periodo de menstruación (Finnell et al., 2011).

Por lo que respecta a la punción con aspiración suprapúbica, ésta presenta los inconvenientes de resultar dolorosa para el enfermo y de que sólo los especialistas pueden llevarla a cabo. Sin embargo, representa el mejor recurso cuando el paciente se encuentra en estado de coma o cuando los resultados obtenidos con otras técnicas sean confusos, ya que la muestra se obtiene

directamente de la vejiga, y bajo estas condiciones, no se contamina con microorganismos provenientes de otros sitios, siempre y cuando la asepsia previa en la región de la punción se haya realizado cuidadosamente.

En relación con el cateterismo permanente, es importante establecer que la mejor elección radica en cambiar la sonda para recolectar la muestra; no obstante, cuando se decida emplear el mismo catéter, la orina no debe recogerse de la bolsa colectora ni de la punta de aquél, sino de su parte media, con una jeringa estéril cuya aguja se introduzca con dirección a la uretra (Garza R., 2005).

Finalmente, la utilización de bolsas colectoras pediátricas es adecuada en los niños en quienes, debido a su corta edad, no se puede emplear el método de la micción media; dichos colectores se fijan a los genitales sin resultar incómodos, dado que el material con el que se confeccionan es blando y plegable (Subcommittee on Urinary Tract Infection, 2011).

Una vez obtenidos los especímenes, existen 2 técnicas principales mediante las cuales el laboratorio lleva a cabo el análisis correspondiente seleccionando, de acuerdo con sus recursos y filosofía, la más conveniente: Método del asa calibrada y Método de las diluciones.

#### **3.1.1.2 Análisis de las muestras: Método del asa calibrada**

Las asas calibradas se distribuyen comercialmente presentando características específicas que las habilitan para recoger, si sólo se introduce a la muestra la parte circular, un volumen conocido de orina. Por ello, con descargar su contenido en la superficie del medio seleccionado (trazando una estría recta a la mitad de la placa) y distribuir la descarga en toda la superficie del medio, con otra asa previamente esterilizada, se habrá finalizado la etapa referente a la siembra.

Como en todo análisis microbiológico, la elección de los medios es sumamente importante. En este sentido, no deben faltar una gelosa sangre u otro medio en el que pueda desarrollar el agente etiológico y algunos otros medios con características diferenciales y/o selectivas, que permitan el desarrollo del o los patógenos, inhibiendo a los contaminantes. En este rubro, los más utilizados son el agar sal manitol (para estafilococos) y el agar Mac Conkey o algún equivalente (para enterobacterias y *P. aeruginosa*), aunque es oportuno incorporar una cuarta placa con Brolacín, dado que en éste pueden desarrollar los estafilococos, *E. faecalis*, las enterobacterias y *P. aeuroginosa*, pudiéndose diferenciar las colonias fermentadoras y no fermentadoras de lactosa e inhibiéndose el swarming de *Proteus* (Garza R., 2005).

A continuación, previa incubación de las placas a 35°C, en atmósfera normal de aerobiosis y durante 24 a 48 horas, se procede a analizar las características macroscópicas obtenidas del cultivo puro.

Como las asas comerciales más utilizadas son las que recogen un volumen de 0.001 mL de orina, el número de colonias de cada caja deberá multiplicarse por 1000, para conocer la cantidad de microorganismo (o unidades formadoras de colonias, UFC) que la muestra contiene por mililitro.

Adicionalmente, las colonias que por su considerable cantidad resulten sospechosas de integrarse por participantes de la afección del paciente, deben de someterse a pruebas de identificación. En este punto, es importante recordar: 1) que la muestra puede contener algunos contaminantes, y 2) que los medios selectivos sólo permiten el desarrollo de ciertos microorganismos (Garza R., 2005).

Otra de las partes fundamentales de un análisis microbiológico, consiste en la interpretación que se debe hacer de los resultados obtenidos. En este caso, 2 parámetros se contemplan de manera conjunta.

- La identidad del microorganismo obtenido.
- Los denominados criterios de Kass, en atención al investigador que estudió las cifras con significado diagnóstico en un urocultivo cuantitativo.

En el primer punto, es importante tomar en cuenta los agentes etiológicos más frecuentes, que como se vio anteriormente, son bacterias tales como *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. faecalis*, algunos estafilococos entre otros, aunque sin olvidar que éstas pueden presentarse como contaminantes de la muestra. Ello viene a colación porque, con regularidad, se presentan casos en los que no llegan a alcanzar las cifras reconocidas como significativas, según Kass, pero la historia clínica, la sintomatología o la avanzada edad del paciente, entre algunos otros factores previamente discutidos, apuntan hacia la firme posibilidad de una patología urinaria.

En cuanto a los criterios de Kass, éstos establecen lo siguiente:

**Tabla 4.** Criterios de Kass (tomados de Garza R., 2005)

No. De UFC/mL	Interpretación
100,000 o más	Infección activa
Alrededor de 10,000	Dudosa*
1,000 ó menos	Contaminación de la muestra

\*Debe analizarse otra muestra del paciente

De acuerdo con lo mencionado anteriormente, lo óptimo consiste en manejar, conjuntamente las cifras obtenidas y el tipo de microorganismo encontrado. No obstante, adicionalmente debe considerarse que:

- Los falsos negativos pueden obtenerse cuando: 1) el paciente se encuentra bajo tratamiento antimicrobiano poco antes o durante la recolección de la muestra; 2) el causante del cuadro es incapaz de desarrollar en los medios utilizados o bajo las condiciones de incubación que se seleccionaron; 3) la muestra analizada no fue la primera de la mañana; 4) el depósito en el que se recoge el espécimen contiene restos de detergente o desinfectante; 5) el enfermo se encontraba recibiendo líquidos intravenosos; 6) la calidad y/o la preparación de los medios no es la adecuada; 7) el asa “calibrada” recogía volúmenes menores a los esperados; 8) la muestra no se homogeneizó antes de introducir el asa; 9) la alícuota descargada en la superficie del medio no se distribuyó adecuadamente.
- Los falsos positivos suelen ocurrir cuando; 1) el paciente no efectúa la limpieza previa en forma adecuada; 2) el espécimen se siembra después de haber permanecido 1 hora o más a temperatura ambiente; 3) el depósito en el que se recoge la muestra se encuentra contaminado; 4) el asa “calibrada” recoge mayores cantidades que las esperadas; 5) el paciente suspendió la micción para recolectar la parte media; 6) el catéter se encontraba contaminado.
- La metodología seleccionada debe incluir, a fin de que se complemente la información, análisis microscópicos (en fresco) del sedimento, para detectar la probable presencia de eritrocitos, leucocitos, cristales, cilindros o *Trichomonas vaginalis*.

### 3.1.1.3 Análisis de las muestras: Método de las diluciones

Este se considera más confiable que el del asa calibrada, si bien requiere de más material, reactivos, manipulaciones y tiempo. Esto origina que su uso

resulte limitado o nulo en la mayor parte de los laboratorios clínicos (Garza R., 2005).

Se realiza preparando diluciones 1:10, 1:100, 1:1000 a partir de la muestra, empleándose Solución Salina Isotónica (SSI) estéril como diluyente y, posteriormente, se colocan 1 mL de la última dilución en 3 cajas de Petri estériles, a las que después se les vierten 20 mL de los medios seleccionados, entre los que destacan el manitol sal agar, agar MacConkey y Brolacín, respectivamente, cuando éstos se han esterilizado y se encuentran a una temperatura de 45 a 50°C.

A continuación, los contenidos de las cajas se mezclan, de manera de que la alícuota se distribuya uniformemente; finalmente, se permite que los medios solidifiquen y las placas se incuban a 35°C en aerobiosis, durante 24 a 48 h.

El procedimiento restante es similar al descrito para el método de asa calibrada, incluyendo lo referente a la interpretación de resultados, a cuyas consideraciones se debe sumar la posibilidad de falsos negativos cuando los medios se vierten a temperaturas mayores a las señaladas, y la de los falsos positivos cuando las diluciones se preparan con una misma pipeta o sin condiciones asépticas (Garza R., 2005).

Es bien sabido que el crecimiento exitoso de una bacteria depende en gran medida de su distribución en el medio ambiente y en el estado de crecimiento de las bacterias en el momento de muestreo, ya sea que se encuentre activa o inactiva. Los métodos moleculares pueden ser usados para complementar o reemplazar las técnicas de cultivo, y prescindir de algunos de sus sesgos y limitaciones. (Gugliandolo C. et al., 2011)

## **3.2 Métodos de Caracterización Moleculares**

La caracterización genotípica de las bacterias patógenas ha llegado ser un importante objetivo en las investigaciones epidemiológicas de agentes infecciosos. Los métodos de caracterización moleculares se usan para determinar la relación entre los microorganismos asociados a una enfermedad mediante el rastreo de sus fuentes de infección, estableciendo su origen geográfico y distribución, identificando la ruta y los factores genéticos responsables para patrones específicos de transmisión y detectando los genes responsables de su virulencia y resistencia a antibióticos (Karama et al., 2010).

Los métodos de caracterización moleculares se dividen en 3 categorías principales: Aquellos métodos basados en la secuenciación del genoma bacteriano; aquellos basados en la amplificación de genes específicos por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR); y los que se basan en el análisis de restricción del ADN bacteriano (Foley et al., 2009).

### **3.2.1 Métodos basados en la secuenciación del ADN bacteriano**

Estos métodos se basan en la identificación de secuencias polimórficas en un loci específico del genoma bacteriano. Puesto que el ADN de las bacterias está sujeto a la variabilidad en su secuencia debido a mutaciones o recombinaciones, la variabilidad en las secuencias dentro de genes particulares puede ser usado en esquemas de tipificación molecular para determinar la relación existente entre las bacterias (Foley et al., 2009).

Los genes requeridos para las funciones básicas celulares, también conocidos como “genes housekeeping”, son secuenciados más a menudo puesto que se encuentran presentes en todas las clonas dentro de las especies y no están sujetos a una presión selectiva intensa que pueden conducir a cambios relativamente rápidos en su secuencia (Karama et al., 2010)



### **3.2.2 Métodos basados en la amplificación por PCR**

El conjunto de genes presentes dentro de una cepa particular es muy probable que varíe y estas diferencias pueden ser usadas para distinguir entre cepas. En este tipo de métodos, múltiples genes, como aquellos asociados a utilización de nutrientes, virulencia y resistencia a antibióticos, son analizados mediante la amplificación del ADN por ensayo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detectar la presencia o ausencia de los factores genéticos (Foley et al., 2009).

### **3.2.3 Métodos basados en el análisis de restricción del ADN bacteriano**

Estos métodos se caracterizan en el uso de enzimas de restricción, ya sea que tengan un sitio de corte frecuente o poco frecuente, para generar fragmentos del ADN bacteriano y posteriormente separarlos mediante una electroforesis en gel y obtener patrones de bandeo que pueden ser comparados para distinguir entre cepas de una misma especie bacteriana (Foley et al., 2009.)

En la tabla 5 se muestran los principales métodos de caracterización moleculares. De estos métodos, el que nos interesa en particular es la Electroforesis en Gel de Campos Pulsados (PFGE, por sus siglas en inglés) del cual hablaremos más adelante.

**Tabla 5.** Principales métodos de caracterización moleculares

Tipo de método	Método	Referencias
Métodos basados en Secuenciación	Multilocus sequence typing (MLST)	1, 2, 3, 5, 6
	Single nucleotide polymorphism (SNP) analysis	1, 5, 6
Métodos basados en Amplificación por PCR	Amplification profiling	4, 6
	Amplified fragment length polymorphisms (AFLP)	5, 6
	Random amplified polymorphic DNA PCR (RAPD-PCR)	5, 6
	Repetitive element PCR (Rep-PCR)	4, 6
	Variable number of tandem repeat (VNTR) analysis	1, 6
	multiple locus VNTR analysis (MLVA)	1, 5, 6
Métodos basados en la Restricción del ADN	Plasmid analysis	5, 6
	Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis	5, 6
	Ribotyping	5, 6
	Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)	1, 2, 3, 5, 6

Clave: 1. Baker et al., 2010; 2. Tartof et al., 2005; 3. Lau et al., 2008; 4. Gugliandolo et al., 2011; 5. Karama et al., 2010; 6. Foley et al., 2009

#### 4. Electroforesis en Gel de Campos Pulsados (PFGE)

La Electroforesis en Gel de Campos Pulsados (ó Pulsed-Field Gel Electroforesis, PFGE) es una técnica molecular en la cual el genoma bacteriano es digerido con una enzima de sitio de corte poco frecuente, para generar fragmentos de ADN de gran tamaño (aproximadamente de 20 a 1000 kb) que pueden ser separados usando técnicas especializadas de electroforesis. (Foley et al., 2009; & Karama et al., 2010)

Diferencias en los perfiles de restricción son usados para llevar a cabo comparaciones genéticas entre las cepas de una bacteria. Actualmente, PFGE es considerado como el “estándar de oro” de los métodos de caracterización moleculares para patógenos bacterianos, tales como *Salmonella*, *E. coli*, *Campylobacter*, *Listeria*, *Yersinia* y *Vibrio* (Foley et al., 2009). Es utilizado por el programa PulseNet para identificar brotes generalizados de enfermedades bacterianas debidas a alimentos contaminados (Baker et al., 2010).

En general, el proceso involucra la inmovilización de la bacteria, mediante la mezcla de una suspensión de células bacterianas con una densidad óptica conocida, embebidas en agarosa derretida antes de la lisis celular. Esta incorporación de las células en la matriz de agarosa protege el ADN cromosómico de la ruptura mecánica que puede ocurrir con la manipulación de ADN libre. Las células inmovilizadas se lisan con detergentes (sarcosina) y enzimas (proteínasa K), y el ADN liberado se inmoviliza en los bloques de agarosa (Foley et al., 2009).

Los bloques de agarosa son posteriormente lavados con agua y buffer TE (Trizma base-EDTA) para remover restos celulares, y el ADN purificado es digerido con una enzima de restricción con sitio de corte poco frecuente. Las enzimas más comúnmente utilizadas se encuentran en la tabla 6. Los bloques de agarosa son colocados en un gel de agarosa y sujetos a electroforesis (Foley et al., 2009). Durante la electroforesis, la polaridad de la corriente es cambiada a intervalos regulares, permitiendo la separación de 10-20 fragmentos de ADN, con un rango de 20 a 800 kb. Los fragmentos de ADN son visualizados tiñendo los geles con un colorante fluorescente, como bromuro de etidio, u otros colorantes para ácidos nucleicos, y las imágenes del gel de PFGE son capturados en un sistema de imagen adecuado y guardado como un archivo TIFF (Tagged Image File Format) el cual puede ser analizado posteriormente usando un software adecuado el cual calcula coeficientes de similitud, análisis de clústeres, y genera árboles genéticos o dendogramas (Karama et al., 2010).

**Tabla 6.** Protocolos de tipificación con PFGE para algunas bacterias. (Tomado de Foley et al., 2009)

Bacteria	Enzimas de restricción	Condiciones de corrimiento de Electroforesis		
		Tiempo de Switch inicial (s)	Tiempo de Switch Final (s)	Tiempo de corrida (h)
<i>Salmonella enterica</i>	<i>XbaI, BlnI, y/o SpeI</i>	2.2	63.8	19-20
<i>Escherichia coli</i>	<i>XbaI, BlnI, y/o SpeI</i>	2.2	54.2	18-19
<i>Shigella spp.</i>	<i>XbaI, BlnI, y/o SpeI</i>	2.2	54.2	18-19
<i>Yersinia spp.</i>	<i>AscI</i>	1.79	18.66	20-22
<i>Campylobacter spp.</i>	<i>SmaI</i>	6.76	35.38	18

El ADN de *Salmonella* entérica serovar Branderup, digerida con *XbaI*, es usada como el estándar universal de peso molecular para normalizar los patrones de bandas del PFGE en una base de datos de patógenos bacterianos, tales como *Salmonella* y *E. coli*. (Foley et al., 2009)

Se han desarrollado diversos criterios para ayudar a determinar la relación genética entre cepas bacterianas por PFGE. De acuerdo con Tenover et al., 1995, cepas bacterianas que difieren por un solo evento genético (ya sea delección o inserción), reflejado por 2-3 bandas diferentes, son definidas como “estrechamente relacionadas”. Cepas con 2 diferencias genéticas (4-6 bandas diferentes) son “posiblemente relacionadas”, mientras que aquellas con  $\geq 3$  diferencias genéticas ( $\geq 7$  bandas diferentes) comparadas con la “cepa original” son consideradas como “diferentes o no relacionadas”.

La reproducibilidad del método de PFGE para una bacteria específica, la calidad del gel de PFGE (bandas nítidas y libres de artefactos causados por digestiones parciales), la variabilidad del organismo a tipificar, y la prevalencia del patrón en las diferentes cepas analizadas debe ser considerado en la interpretación de los resultados (Tartof et al., 2005).

El poder discriminatorio y reproducibilidad del PFGE lo ha convertido en un método ampliamente aplicable para la comparación de la mayoría de las especies bacterianas (Karama et al., 2010). La inmovilización in situ del ADN bacteriano evita el daño mecánico, y los perfiles genéticos son generados en base al genoma completo. Además, los protocolos estandarizados de PFGE pueden ser usados para alcanzar una alta reproducibilidad interlaboratorio, lo cual puede ser útil en el desarrollo, mantenimiento y el intercambio entre bases de datos nacionales e internacionales, tales como PulseNet-USA y PulseNet-Europa (Foley et al., 2009).

Por estas razones, PFGE es reconocido como uno de los métodos más comunes y de mejor opción para generar datos en el seguimiento y vigilancia de infecciones bacterianas o en un brote particular (Karama et al., 2010).

Este método se ha usado ampliamente alrededor del mundo en el seguimiento e investigación de brotes causados por *E. coli* O157:H7, delimitación de las vías de transmisión y rastreo de las fuentes de brotes de restaurantes, agua contaminada, animales, otros humanos y/o equipos (Foley et al., 2009). Levert et al., 2010 determinó la heterogeneidad genética de 226 cepas de *Escherichia coli* aisladas de 19 pacientes con diversas infecciones extraintestinales, observando que 11 pacientes se encontraban infectados por 12 clonas de *E. coli*, representadas por 104 cepas analizadas mediante los patrones generados por PFGE. Mora y colaboradores en 2009 realizaron una caracterización genética comparativa de cepas de *Escherichia coli* Patógena Aviar (APEC), *E. coli* causante de Meningitis neonatal (NMEC), *E. coli* Uropatógena (UPEC) y *E. coli* septicémica pertenecientes al serotipo patógeno O1:K1:H7/NM, obtenidas de 4 países, para caracterizar sus genes de virulencia, grupos filogenéticos, tipos de MLST y perfiles de restricción de PFGE para entender mejor las similitudes o diferencias que pueden presentar estos patotipos de *E. coli*. En 2006 Ejnaes realizó un estudio con 156 mujeres con una infección del tracto urinario (ITU) de vías urinarias bajas adquirida en la comunidad para determinar mediante el uso

de PFGE si la infección con *E. coli* durante el seguimiento de la enfermedad se debía a una recaída o persistencia de la cepa infectante principal o de una reinfección con una cepa nueva de *E. coli*. Manges y col. en 2008 realizaron un estudio en mujeres universitarias de Montreal, Canadá, con ITU causada por *E. coli* para comparar estos organismos con aquellos aislados de mujeres con ITU en California, y así, determinar la distribución de los grupos clonales con ayuda de métodos moleculares como MLST y PFGE.

## Objetivo General

Determinar si hay relación clonal entre cepas de *Escherichia coli* Uropatógena aisladas de pacientes masculinos y cepas aisladas de pacientes femeninos diagnosticados con infección de vías urinarias, así como identificar si comparten entre ellas factores de virulencia.

## Objetivos Particulares

- Obtener los perfiles de restricción del cromosoma de las cepas UPEC utilizando las endonucleasas *XbaI* y *NotI* y la técnica de electroforesis en gel de campos pulsados.
- Obtener el genotipo de la cepa de acuerdo a su patrón de restricción por *XbaI* y *NotI*
- Caracterizar los genes de virulencia de la UPEC utilizando un macroarreglo y un protocolo de hibridación con sondas específicas de genes de virulencia característicos de las *Escherichia coli* Uropatógenas.
- Determinar la clonalidad o los grupos clonales de las cepas aisladas de pacientes masculinos y pacientes femeninos con infección de tracto urinario, con base en el análisis de los perfiles del cromosoma y los genes de virulencia presentes en las cepas.

## Hipótesis

Las cepas de *Escherichia coli* Uropatógena asociadas a diferentes patologías del tracto urinario, presentarán diferente contenido en sus genes de virulencia y en su patrón de PFGE pudiendo compartir bandas entre ellas cuando provienen de pacientes con la misma patología.

## Metodología

### 1. Cepas de *Escherichia coli* Uropatógena (UPEC)

Se recibieron 24 cepas de *Escherichia coli* Uropatógena (UPEC) previamente aisladas e identificadas a partir de pacientes femeninas con Infección de Tracto Urinario, por parte del Dr. Manjarrez del Departamento de Salud Pública de la Unidad de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina, UNAM.

Las 20 cepas restantes fueron proporcionadas por el Dr. Rigoberto Hernández Castro del Hospital General Manuel Gea González, dichas cepas también fueron aisladas e identificadas previamente a partir de pacientes masculinos con Infección de Tracto Urinario.

Se utilizaron 3 cepas UPEC de referencia (28E, 57E y CFT073) como controles positivos para los factores de virulencia estudiados en este proyecto y también se incluyeron en el análisis realizado con la Electroforesis en Gel de Campos Pulsados (PFGE).

En el laboratorio, todas las cepas fueron nuevamente sembradas, por la técnica de agotamiento de asa en Agar Sangre (AS) y Agar MacConkey (MAC), para comprobar la pureza de la cepa. A partir de colonia única del agar MAC, se sembraron las pruebas bioquímicas para la identificación de *Escherichia coli* (ver **Tabla 2. Patrón Bioquímico de *Escherichia coli* y Apéndice 2)** corroborando el género y especie de todas las cepas.

A 3 de los cultivos se les encontraron 2 colonias morfológicamente distintas, las cuales se aislaron, y realizaron las pruebas bioquímicas corroborando el género y especie, por lo que se mantuvieron dentro del análisis de los factores de virulencia para descartar posible contaminación o comprobar que se trataba de una variación morfológica de la misma cepa.



Todas las cepas se guardaron en viales con gelosa especial a temperatura ambiente y forman parte del ceparo del laboratorio de Referencia de Patógenos Entéricos de la Facultad de Medicina de la UNAM.

## **2. Serotipificación de las cepas de *Escherichia coli* Uropatógena**

La serotipificación de las cepas fue realizada en el laboratorio de Referencia de patógenos entéricos de la Facultad de Medicina de la UNAM.

## **3. Protocolo de Electroforesis en Gel de Campos Pulsados (PFGE) para bacterias patógenas.**

### **3.1 Preparación de los bloques de agarosa de PFGE a partir de cultivo en agar**

Día 1

Se inoculó una asada del cultivo de *Escherichia coli* en un tubo con 5 mL de caldo Luria (previamente etiquetado), se incubó de 14-18 h a 37°C con agitación de 150 rpm.

Día 2

1. Se prendió el baño de agua estacionario a 55- 60°C y un Espectrofotómetro.
2. Se etiquetaron tubos Eppendorf de 1.5 mL con el número del cultivo de *E. coli*.
3. Se centrifugó toda la muestra a 13000 rpm por 2 min en los tubos eppendorf.
4. Se lavó y resuspendió con 500 µL de Buffer de Suspensión Celular (CSB, para su preparación ver Apéndice I).

5. Se centrifugó nuevamente a 13000 rpm por 2 min y se resuspendió con 500  $\mu$ L CSB.
6. Por último, se centrifugó a 13000 rpm por 2 min y resuspendió en 200  $\mu$ L de CSB.
7. Se leyó la densidad óptica (D.O.) a 620 nm. (Debe tener una D.O. de 5) de la siguiente manera:
  - Se colocó en una celda de plástico 1 mL de CSB y 5  $\mu$ L del cultivo del paso 6, se agitó bien.
  - Se colocó en uno de los pozos (de una placa para ELISA) 300  $\mu$ L de CSB como blanco, y en otro pozo 300  $\mu$ L de la preparación de la celda de plástico.
  - Se obtuvo el volumen necesario de CSB para diluir el cultivo del paso 6 con la siguiente fórmula:
$$vol. CSB = Lectura D. O. \times 40 \times 210 - 210$$
  - Se añadió el volumen (en  $\mu$ L) calculado de CSB al tubo eppendorf (del paso 6) correspondiente.
8. Se ajustó nuevamente a una D.O. de 1.45, tomando 140  $\mu$ L de la suspensión del paso 7 y 260  $\mu$ L de CSB. (volumen final de 400  $\mu$ L)

### 3.2 Formación de los bloques de agarosa

Se etiquetaron los pozos de los moldes de los bloques de agarosa de PFGE e irradió con luz UV por 5 minutos.

1. A los 400  $\mu$ L de la suspensión obtenida en el paso 7 del apartado 3.1, se añadieron 20  $\mu$ L de proteinasa K (solución stock 20mg/mL) a cada tubo y se mezcló.
2. Se añadieron 400  $\mu$ L de la solución: 1% SeaKem Gold: 1% SDS previamente preparada (ver Apéndice I), y mezcló suavemente con el uso de la micropipeta.

3. Inmediatamente, se repartió la mezcla en los pozos de los moldes. (Se pueden preparar 4 bloques de agarosa a partir de cada mezcla de suspensión de células y agarosa.)
4. Se dejó solidificar a temperatura ambiente y posteriormente se metió en el refrigerador (4°C) por 5 minutos.

### **3.2.1 Lisis de las células en los bloques de agarosa**

1. Se etiquetaron tubos Falcon de 50 mL con el número del cultivo.
2. Se añadieron 7 mL del Buffer de Lisis Celular/Proteinasa K (ver Apéndice I) en cada tubo de 50 mL.
3. Se eliminó el exceso de agarosa de la parte superior de los bloques de agarosa y se transfirieron los bloques de agarosa del molde al tubo correspondiente.
4. Se colocaron los tubos en una gradilla y se incubaron a 54° C en el baño de agua toda la noche. (1ª Desproteínización)
5. Se cambió la solución del Buffer de Lisis Celular/Proteinasa K por una nueva para cada tubo (como se indicaba en el paso 2), se volvieron a colocar los tubos en una gradilla y se incubaron a 54° C en el baño de agua toda la noche. ( 2ª Desproteínización)

Día 4

### **3.3 Lavado de los bloques de agarosa de agarosa posterior a Lisis celular**

Bajar la temperatura del baño a 50° C

1. Se preparó buffer TE considerando que por cada lavado se utilizan 50 mL por tubo y son 10 lavados. (p ej. 50 mL x 10 lavados x 10 tubos= 5000 mL) y precalentó a 50° C.
2. Se quitaron los tubos del baño de agua, y cuidadosamente vació el buffer de lisis en un contenedor apropiado.
3. Se añadió a cada tubo 50 mL de buffer TE, colocando los tubos en un agitador de balancín con velocidad media por una hora.

- Se vació el buffer TE de cada tubo y se repitió el paso de lavado con buffer TE precalentado por 9 ocasiones más.

**Nota:** En los casos donde no podíamos realizar los lavados el mismo día, se vaciaba el buffer TE del último lavado y añadían 50 mL de buffer TE nuevo a cada tubo, refrigerando los tubos a 4° C. Cuando se continuaban los lavados, se vaciaba el buffer TE, y se añadía a cada tubo buffer TE precalentado a 50°C para continuar con el siguiente lavado.

- Se decantó el último lavado y añadió 50 mL de buffer TE, almacenando los bloques de agarosa en refrigeración (a 4° C) hasta su uso.

### 3.4 Restricción del ADN en los bloques de agarosa con *Xba*I

- Se etiquetaron tubos eppendorf de 1.5 mL con el número del cultivo; etiquetar 3 (para un gel con 10 pozos) o 4 (para un gel con 15 pozos) tubos para estándares de *Salmonella* ser. Braenderup H9812.

- Se diluyó el buffer H 10x (Roche Molecular Biochemicals) 1:10 con agua estéril ultrapura de acuerdo a la tabla 7:

**Tabla 7.** Proporción de buffer H en función del número de bloques de agarosa a utilizar.

Reactivo	μL/trozo de bloque de agarosa	μL/10 trozos de bloque de agarosa	μL/15 trozos de bloque de agarosa
<b>Agua ultrapura estéril</b>	90	900	<b>1350</b>
<b>Buffer H</b>	10	100	<b>150</b>
<b>Volumen total</b>	<b>100</b>	<b>1000</b>	<b>1500</b>

- Se añadieron 100 μL del buffer H diluido (1x) a los tubos eppendorf etiquetados.

- c) Cuidadosamente se removió el bloque de agarosa del TE con ayuda de una espátula o una asa y colocarlo en un portaobjetos limpio.
  - d) Se cortó un trozo del bloque de agarosa con una navaja y transferirlo al tubo que contiene el buffer H. Asegurándose que el trozo estuviera cubierto por el buffer. Se colocó el resto del bloque de agarosa en el tubo con TE.
  - e) Se cortaron los trozos de la cepa estándar de *S. ser. Braenderup H9812* y transferirlos a tubos con buffer H.
  - f) Se incubaron los bloques de agarosa de las muestras y de los controles en un baño de agua a temperatura ambiente por 30 min.
  - g) Después de la incubación, se removió el buffer del tubo, usando una micropipeta, aspirando todo el buffer desde el fondo. Teniendo cuidado de no cortar el trozo de bloque de agarosa con la punta de la micropipeta y que el bloque de agarosa no fuera absorbido por la punta de la pipeta.
2. Se diluyó el buffer H 10x a 1:10 con agua estéril ultrapura y añadió la enzima de restricción *Xba*I (30U/muestra) de acuerdo con la tabla 8. Se mezcló en el mismo tubo usado para la dilución del buffer H.

**Tabla 8.** Proporción de Buffer H y enzima en función del número de bloques de agarosa a utilizar.

Reactivo	$\mu\text{L}$ /trozo de bloque de agarosa	$\mu\text{L}$ /10 trozos de bloque de agarosa	$\mu\text{L}$ /15 trozos de bloque de agarosa
<b>Agua ultrapura estéril</b>	89	890	<b>1335</b>
<b>Buffer H</b>	10	100	<b>150</b>
<b>Enzima (30U/<math>\mu\text{L}</math>)</b>	1	10	<b>15</b>
<b>Volumen total</b>	<b>100</b>	<b>1000</b>	<b>1500</b>

3. Se añadieron 100  $\mu\text{L}$  del buffer de restricción a cada tubo. Se cerró el tubo y mezcló.
4. Se incubaron los tubos a 37° C en baño de agua durante toda la noche.

**Nota:** El procedimiento fue el mismo con la enzima de restricción *NotI*, utilizando solamente el buffer adecuado para la enzima.

### 3.5 Producción del gel de agarosa

**Nota:** Los trozos de bloque de agarosa fueron colocados sobre el peine.

1. Se preparó un volumen de buffer de Tris-Borato EDTA (TBE) a 0.5x necesario para el gel y el buffer de corrida de acuerdo con la tabla 9:

**Tabla 9.** Proporción de reactivos para la elaboración de TBE 0.5x

Reactivo	Volumen en mililitros (mL)
<b>TBE 5x</b>	<b>240</b>
<b>Agua estéril</b>	<b>2160</b>
<b>Volumen total de TBE 0.5 x</b>	<b>2400</b>

2. Se preparó el gel de agarosa al 1.5% con Agarosa NA en TBE 0.5x de la siguiente manera:
  - a) Se pesó apropiadamente 1.5 g de agarosa NA en un matraz con tapón de rosca.
  - b) Se añadieron 150 mL de TBE 0.5x y se agitó para dispersar la agarosa.
  - c) Se removió la tapa y se calentó el matraz, mezclando suavemente cada 15 segundos hasta que la agarosa estuviera completamente disuelta.
  - d) Se tapó el matraz y se colocó en el baño de agua a 55-60° C.
3. Se removieron los tubos con la restricción del baño de agua. Se removió el buffer de restricción y añadieron 200 µL de TBE 0.5x. Dejando a temperatura ambiente por 30 min.
4. Se removieron los trozos de bloque de agarosa de los tubos; colocando el peine sobre el molde del gel (previamente equilibrado) de tal manera que se pudieran colocar los trozos de bloque de agarosa en la punta de cada diente del peine, de la siguiente forma:
  - a) Se colocaron los bloques de agarosa de *Salmonella* serovar Braenderup H9812 en los dientes: 1, 5 y 10 si el gel era de 10 pozos ó en los dientes 1, 5, 10, 15 si el gel era de 15 pozos.
  - b) Se colocaron las muestras en los dientes restantes.
5. Se removió el exceso de TBE con ayuda de un papel filtro, permitiendo que los trozos de bloque de agarosa se secan al aire sobre el peine por 5 minutos.
6. Se colocó el peine en posición vertical sobre el molde del gel y se observó que los trozos de bloque de agarosa estuvieran en la posición correcta, sin caerse del diente del peine.

7. Cuidadosamente se vació la agarosa en el molde del gel, guardando un pequeño volumen (1-2 mL) para posteriormente sellar los pozos.
8. Se equilibró la cámara de electroforesis y colocó el marco negro para el gel. Se añadieron 2.2 L del TBE 0.5x preparado.
9. Se prendió el modulo de refrigeración (10-12° C), el suministro de energía y la bomba (ajustando a aproximadamente 70 para un flujo de 1L/minuto).
10. Se removió el peine del gel después de haber solidificado.
11. Se sellaron los pozos del gel con el volumen de agarosa guardado anteriormente.

### 3.6 Condiciones de electroforesis

Se ocupó el equipo “CHEF-DRII” de Bio-Rad con el siguiente programa:

**Tabla 10.** Programa de PFGE utilizado.

<b>Switch inicial</b>	2.2 seg.
<b>Switch final</b>	54.2 seg.
<b>Tiempo</b>	28 horas
<b>Volts</b>	6.0
<b>Temperatura</b>	10-12° C

Se colocó el gel en la cámara y se inició el programa.

### 3.7 Teñido y documentación del gel de agarosa del PFGE

1. Cuando terminó la electroforesis, se apagó el equipo, y removió el gel para teñirlo con bromuro de etidio. Colocando el gel en un contenedor grande con 300 mL de agua destilada y 100 µL de una solución de bromuro de etidio (1mg/mL).
2. Se mantuvo en agitación leve por 15-20 minutos.



3. Se siguieron las instrucciones del equipo de imágenes para salvar la imagen del gel.
4. Se drenó el buffer de la cámara de electroforesis, enjuagando la cámara con 2 L de agua destilada.

#### **4. Detección por Quimioluminiscencia de los factores de virulencia a partir de membranas de nylon-H<sup>+</sup> con el ADN de cepas de UPEC**

##### **4.1 Protocolo de extracción de ADN bacteriano por técnica de GES**

Se realizó el siguiente protocolo para todas las cepas analizadas:

1. Se incubó de 14 a 18 horas un cultivo bacteriano en un tubo de ensayo de 16x150 con 3 mL de caldo Luria.
2. Posteriormente a la incubación, se centrifugó toda la muestra en un tubo Eppendorf (Previamente etiquetado) a máxima velocidad por 5 min y removió el sobrenadante.
3. Se resuspendió en 100  $\mu$ L de buffer TE pH=8.
4. Se añadieron 500  $\mu$ L del reactivo de GES, se mezcló gentilmente a temperatura ambiente por 5 minutos (min.) y posteriormente se colocaron los tubos eppendorf en hielo.
5. Se añadieron 250  $\mu$ L de Acetato de amonio 7.5 M frío, se mezcló y dejó reposar por 5 min. en hielo.
6. Se añadieron 850  $\mu$ L de una solución 24:1 de Cloroformo: Alcohol isoamilico, se mezcló y centrifugó a máxima velocidad por 15 min.
7. Se removió la capa acuosa (capa superior, aproximadamente 600  $\mu$ L) y se pasó en un tubo Eppendorf nuevo (previamente etiquetado).
8. Se repitieron los pasos 6 y 7. (Pueden realizarse más si así se desea).
9. Se añadieron 0.54 x volumen de isopropanol (aproximadamente 324  $\mu$ L), se mezcló por 10 min., se dejó reposar en hielo por 5 min. para permitir la precipitación y se centrifugó por 2 min.
10. Se lavó el pellet de ADN 2 veces con 500  $\mu$ L de etanol al 70%. Se centrifugó a máxima velocidad por 1 min.

11. Se dejó secar al aire, invirtiendo el tubo sobre papel filtro.
12. Se disolvió en 100 en  $\mu\text{L}$  de buffer TE.
13. Una vez obtenido el ADN se corrió un gel de agarosa al 1% a 100V por 20 minutos para ver la calidad del ADN.
14. Se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.2 Impresión del ADN de cepas de UPEC en membranas de nylon- $\text{H}^+$

Se determinó la concentración del ADN obtenido de cada una de las cepas de UPEC observando en un gel de agarosa 1% en TBE 0.5x teñido con bromuro de etidio. Se tomó una alícuota de 4  $\mu\text{L}$  de cada ADN, mezclado con 2  $\mu\text{L}$  de Loading buffer y se depositó en cada uno de los pozos del gel corriendo en una electroforesis horizontal con buffer TBE 0.5x, la concentración del ADN fue determinado con base a un marcador de peso molecular de ADN: Low ADN Mass Ladder, visto bajo un transiluminador UV. Posteriormente se calculó el volumen necesario de la solución de ADN y de buffer TE para obtener una concentración final de 100  $\text{ng}/\mu\text{L}$  y un volumen final de 50  $\mu\text{L}$ .

Se colocaron los 50  $\mu\text{L}$  de la solución de ADN de cada una de las cepas de UPEC en cada uno de los pozos de una placa de 384 pozos Immobilizer® (Nunc® Cat. 264573).

Se cortaron membranas de nylon- $\text{H}^+$  (Millipore®) de 11.6 x 7.2 cm y por cada membrana se cortaron 4 papeles filtro del mismo tamaño. Las membranas y los papeles filtro se impregnaron con una solución de NaCl 1.5 M- NaOH 0.5M (ver **Apéndice 1**) posteriormente se colocaron los 4 papeles filtro en una placa Omnitray® (Nunc® Cat. 165218) y sobre de ellos la membrana.

Con ayuda del replicador Vitrek® y el cabezal de 384 pozos, se tomó el ADN de la placa Immobilizer® y se impregnó por duplicado en las membranas de Nylon- $\text{H}^+$  contenidas en las placas Omnitray®.

Posteriormente las membranas se colocaron en papel filtro saturado con la solución de NaCl 1.5 M - NaOH 0.5M por 5 minutos, seguido de papel filtro saturado con una solución de NaCl 1.5M – Tris-HCl 0.5 M, pH 7.5 (ver **Apéndice 1**) durante 5 minutos. Finalmente se lavaron con una solución de SSC 5x (ver **Apéndice 1**), se dejaron secar al aire y se almacenaron cuidadosamente hasta su uso.

#### 4.3 Obtención del producto de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de los genes de virulencia

La amplificación por PCR de los factores de virulencia se llevó a cabo de la siguiente manera:

	Para los genes <i>uspA, papD &amp; sat</i>	Para los genes <i>cnf1, hly, sfa &amp; fimH.</i>
Reactivo	Por tubo (µL)	Por tubo (µL)
H2O	34.4	35.9
Buffer 10x	5	5
MgCl <sub>2</sub> [50 mM]	3	1.5
dNTP's [10 mM]	1	1
Primer F [10 µM]	2	2
Primer R [10 µM]	2	2
Taq pol [5u/µL]	0.6	0.6
ADN*	2	2
Total	50	50

**Tabla 11.** Preparación de los tubos de reacción de PCR para los distintos genes de virulencia. \*El ADN utilizado fue de 3 distintos controles positivos: CFT073, 28E y 57E (se realizó un tubo por cada ADN control). Ver **Apéndice 3: Secuencias de primers**

Se realizó con el siguiente programa en el termociclador:

# de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (min.)	Genes	Temperatura de Alineamiento (°C)	Tamaño de amplificado (pb)
1	95°	1	<i>cnf1</i>	63°	498
30	95°	1	<i>fimH</i>	63°	508
	Temperatura de Alineamiento	1	<i>hly</i>	63°	1177
	72°	1	<i>sfa</i>	55°	410
1	72°	5	<i>uspA</i>	56.5°	501
1	4°	5	<i>papD</i>	57.4°	455
1	10°	∞	<i>sat</i>	60.5°	412

**Tabla 12.** Programa de amplificación por PCR de los genes de virulencia con las distintas temperaturas de alineamiento para cada gen.

El producto amplificado por PCR se observó en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Se tomó una alícuota de 5  $\mu$ L del producto de PCR, mezclado con 2  $\mu$ L de Loading buffer y se depositó en uno de los pozos del gel corriéndose la muestra en una electroforesis horizontal con buffer TBE 0.5x, el tamaño del producto amplificado fue determinado con base a un marcador de peso molecular de ADN de 100 pb, visto bajo un transiluminador UV.

#### **4.4 Elaboración de la sonda marcada con Digoxigenina-dUTP a partir del producto de PCR de los genes de virulencia**

Los productos de PCR de los factores de virulencia obtenidos anteriormente se observaron en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Se tomó una alícuota de 4  $\mu$ L del producto de PCR, mezclado con 2  $\mu$ L de Loading buffer y se depositó en uno de los pozos del gel corriéndose la muestra en una electroforesis horizontal con buffer TBE 0.5x. Se purificaron los productos de PCR por medio del kit: "Ready-to-use system for fast purification of nucleic acids, NucleoSpin®". Posteriormente se determinó la concentración del producto de

PCR purificado corriendo un gel de agarosa como anteriormente se ha descrito, con base a un marcador de peso molecular de ADN: Low ADN Mass Ladder, visto bajo un transiluminador UV.

Posteriormente se procedió con lo descrito en el kit: "DIG High Prime ADN Labeling and Detection Starter Kit II"; se colocan 16  $\mu$ L del producto purificado de PCR desnaturalizado por calentamiento y 4  $\mu$ L de la solución Dig-High Prime (que contiene dUTP-11-Digoxigenina, una mezcla de dNTP's y la enzima) en un tubo Eppendorf para cada factor de virulencia. Se colocan los tubos Eppendorf en un baño de agua a 37°C toda la noche. La reacción se detiene agregando 2  $\mu$ L de EDTA 0.2 M.

#### **4.5 Hibridación y Detección por Quimioluminiscencia.**

Se realizó con respecto a lo descrito en el kit: "DIG High Prime ADN Labeling and Detection Starter Kit II"; Se colocó una membrana en un recipiente adecuado, de tal manera que pudiera contener la membrana y 10 mL de solución de prehibridación, se dejó en agitación durante 30 min. Se decantó esa solución y se procedió a agregar 10 mL de solución de prehibridación nueva y 4  $\mu$ L de la sonda. Se colocó en el horno de hibridación a 55°C toda la noche.

Se quitó la solución de hibridación y se almacenó en tubos Falcon de 50 mL a -20°C. Se realizaron lavados con soluciones de SSC 2x-0.1% SDS y SSC 0.5x-0.1% SDS, 3 lavados de 15 minutos con agitación constante para cada solución.

Posteriormente, se agregaron 15 mL de buffer de Lavado por 5 minutos. Se incubaron por 30 minutos con 50 mL de solución de bloqueo, seguido de 20 mL una solución de anticuerpo (Anti-Digoxigenina conjugado a fosfatasa alcalina) por 30 minutos. Se realizaron 2 lavados de 15 minutos con buffer de Lavado y se equilibró con 20 mL de Buffer de detección por 5 minutos.

Se colocó la membrana en una bolsa de plástico y se agregó 1 mL de la solución de CSPD (sustrato quimioluminiscente para la fosfatasa alcalina) procurando que el ADN entrara en contacto con la solución. Se cubrió inmediatamente la membrana evitando la formación de burbujas y se incubó a temperatura ambiente por 5 min. Posteriormente se eliminó el exceso de solución de CSPD y se selló la bolsa con la membrana, se incubó en oscuridad a 37°C por 10 minutos. Finalmente se expuso la membrana en una placa de rayos X a temperatura ambiente de 30-45 minutos.

## Resultados

Se trabajaron 44 cepas de *Escherichia coli* (UPEC) aisladas de pacientes con infección de vías urinarias y 3 cepas control. De las 44 cepas: 24 fueron aisladas de mujeres con diagnóstico de cistitis y 20 fueron aisladas de hombres (18 con diagnóstico de prostatitis, 1 con prostatitis y pielonefritis, y 1 con pielonefritis).

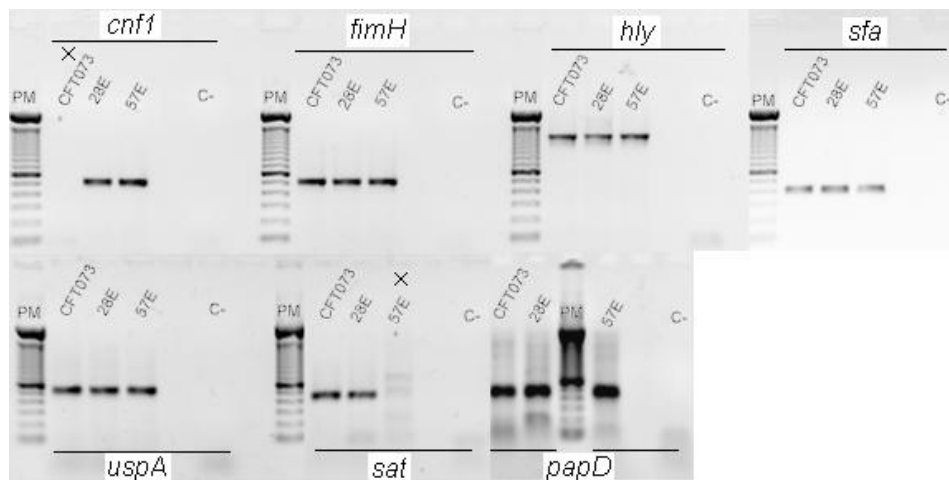
### Serotipificación:

De las 24 cepas UPEC aisladas de mujeres, 18 fueron del serotipo O25:H4 y en 6 cepas no fue posible asignar un serotipo, debido a que no fueron identificables con los antisueros disponibles en el laboratorio de la Facultad de Medicina UNAM, donde se realizó la serotipificación de las cepas. En relación al serotipo de las 20 cepas aisladas de hombres, éstas fueron de diferente serotipo: en 8 cepas no se pudo determinar el serogrupo O y en 7 el antígeno flagelar (H); 3 cepas fueron del serogrupo O25, otras cepas presentaron los serotipos O20, O29, O100, O101, O102 y O166; 7 cepas presentaron el antígeno H4, el resto de las cepas presentaron los antígenos flagelares H1, H5, H2, H9, H28 y H48. Solamente una cepa aislada de hombre presentó el serotipo O25:H4.

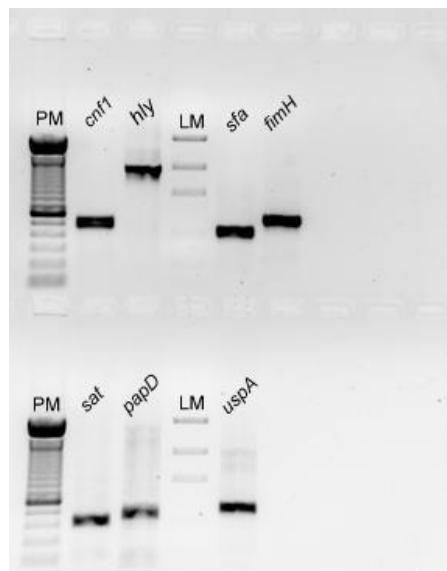
### Determinación de Genes de Virulencia:

La caracterización de los 7 genes de virulencia en todas las cepas UPEC por hibridación (Figuras 3 a la 5), mostró que el 100% de las cepas hibridaron con la sonda específica de los genes *uspA* y *papD*, el 97.8% hibridaron con la sonda para el gen *sat*, el 95.7% para *sfa*, el 93.6% para el gen *fimH* y el 80.8% de las cepas para los genes *hly* y *cnf1*.

El 61.7% (29) de las cepas presentaron los 7 genes de virulencia estudiados. El 25.5% (12) presentaron 6 genes de virulencia. El 8.5% (4) presentaron 5 genes de virulencia y solo una cepa presento 3 genes de virulencia. Para confirmar que no hubo diferencia estadística en la presencia de genes entre las cepas aisladas, se realizó un análisis estadístico de Chi cuadrada con el programa GraphPad Prim 5, el análisis mostró que tanto las cepas aisladas de hombres como de mujeres presentaron el mismo número de genes de virulencia sin diferencia estadística y sin asociación a alguna patología clínica del tracto urinario (Tablas 13 y 14 y Figura 6).

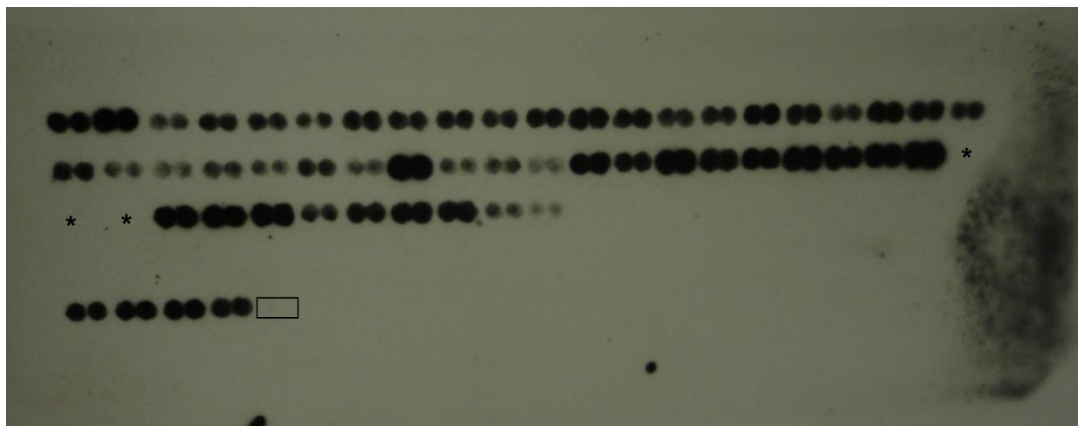


**Figura 3. Patrones de Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR de los factores de virulencia de controles positivos de UPEC.** PM: Marcador de peso molecular de ADN 100 bp. C-: Control negativo. x: No se purificó ese patrón para la formación de la sonda.



**Figura 4. Patrones de Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR purificados de los factores de virulencia de UPEC.** A partir de estos productos purificados se sintetizó la sonda para las hibridaciones. PM: Marcador de peso molecular de ADN 100 bp. LM: Marcador de peso molecular Low ADN Mass Ladder.





**Figura 5. Membrana de nylon-H<sup>+</sup> con ADN de las cepas UPEC estudiadas hibridado con la sonda para el gen *uspA*. El gen *uspA* codifica para la proteína universal de estrés específica para *Escherichia coli*. Los puntos de abajo representan las 3 cepas control: CFT073, 28E y 57E respectivamente., así como una *E. coli* comensal (K12) □: carril donde se colocó ADN de *Pseudomonas aeruginosa* como control negativo \*: espacios sin ADN.**

Gen de virulencia	Por ciento de genes presentes en 20 cepas UPEC aisladas de hombres (%)	Por ciento de genes presentes en 24 cepas UPEC aisladas de mujeres (%)
<i>uspA</i>	100	100
<i>papD</i>	100	100
<i>sat</i>	95	100
<i>fimH</i>	90	100
<i>hly</i>	85	75
<i>sfa</i>	90	100
<i>cnf1</i>	75	88

**Tabla 13. Porcentaje de genes de virulencia presentes en las cepas UPEC aisladas de pacientes femeninos y masculinos \*Porcentajes sin considerar las 3cepas UPEC control.**

Chi cuadrada	
Valor de Chi cuadrada, grados de libertad	2.240, 6
Valor de P	0.8964
Sumario del valor de P	No significativo
Una o dos vías	No Aplica
¿Estadísticamente significativo? (alfa<0.05)	No
Datos analizados	
Número de filas	7
Número de columnas	2

Tabla 14. Valores obtenidos con el programa GraphPad Prim 5 del análisis estadístico en el contenido de genes entre las cepas UPEC aisladas.

### Porcentaje de genes de virulencia presentes en cepas UPEC

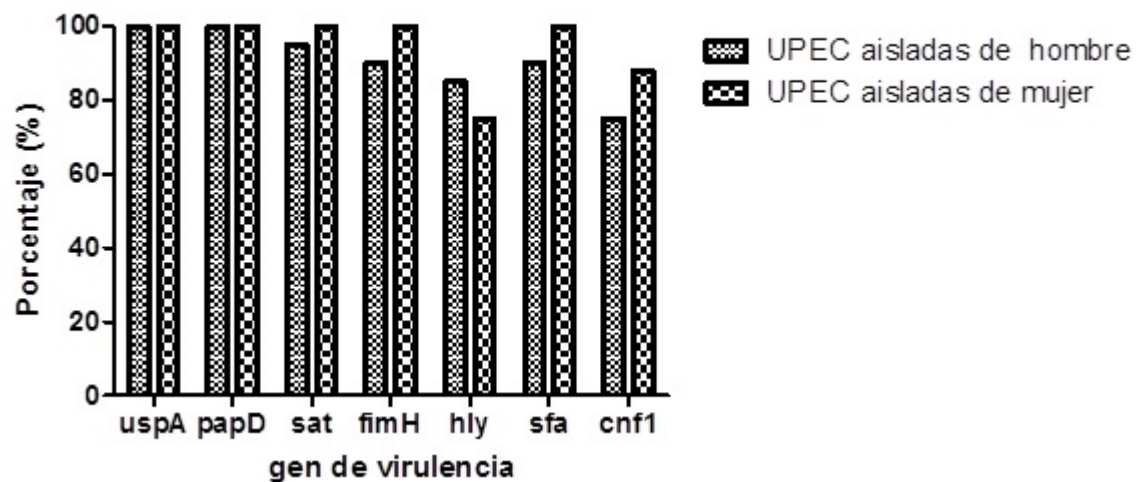


Figura 6. Porcentaje de genes de virulencia presentes en las cepas UPEC aisladas de pacientes femeninos y masculinos.

## Perfiles Cromosomales:

El análisis de los perfiles cromosómicos de las 47 cepas obtenidos por la enzima *XbaI* (Figura 7) y la técnica de electroforesis de Campos Pulsados, mostró que las cepas se agruparon en 3 principales ramas: La rama A (26 cepas), B (20 cepas) y C (1 cepa). En la rama A se agruparon 20 cepas UPEC de las 24 aisladas de vías urinarias de mujeres y 6 cepas UPEC aisladas de vías urinarias de hombre, de las cuales la gran mayoría eran las cepas con el serotipo O25:H4.

La rama B estuvo formada por 13 cepas UPEC aisladas de vías urinarias de hombres y 4 cepas aisladas de mujeres, las cuales presentaron patrones de bandeo más heterogéneos en relación a las cepas de la rama A. Y la rama C, integrada por una cepa aislada de hombre, la cual generó un patrón de bandeo completamente distinto a todas las demás cepas UPEC.

La rama A fue subdividida en tres grupos A1, A2 y A3 (**Figura 8**). El grupo A1 fue formado por 15 cepas: 11 cepas aisladas de mujeres y 3 cepas aisladas de hombre, con un porcentaje de similitud entre ellas de 65 a 72% y un perfil cromosómico generado de 13 a 21 bandas, compartiendo entre ellas de 9 a 12 bandas de aproximadamente el mismo tamaño molecular. El grupo A2 fue formado por 6 cepas: de las cuales 4 cepas fueron aisladas de mujer y 2 de hombre; las cepas agrupadas en A2 presentaron todos los genes de virulencia y un porcentaje de similitud entre ellas de 60 a 62%, con un perfil cromosómico generado de 15 a 23 bandas, compartiendo entre ellas de 5 a 10 bandas de aproximadamente el mismo tamaño molecular. El porcentaje de similitud entre las cepas del grupo A1 y las cepas del grupo A2 fue de 65%, compartiendo entre las cepas de ambos grupos aproximadamente 4 bandas del mismo tamaño molecular. El grupo A3 fue formado por 5 cepas: 4 aisladas de mujer y una cepa aislada de hombre, con un porcentaje de similitud entre ellas de 53 a 61% y un perfil cromosómico generado de 16 a 21 bandas, compartiendo entre ellas hasta 6 bandas de aproximadamente el mismo tamaño molecular. **Figura 8**

La rama B fue subdividida en tres grupos: B1, B2 y B3. El grupo B1 fue formado por 9 cepas que fueron aisladas de hombre, en 6 de las cuales no se pudo establecer el antígeno O y en 5 el antígeno H, en esta rama también se agrupó la cepa control CFT073 del serogrupo O6:H1 y una cepa aislada de mujer caracterizada con el serogrupo O39:H-, el porcentaje de similitud entre las cepas de este grupo fue de 45 a 57%, con un perfil cromosómico generado entre ellas de 14 a 20 bandas y compartiendo entre la mayoría de las cepas hasta 4 bandas de aproximadamente el mismo tamaño molecular. El grupo B2 fue conformado por 4 cepas, de las cuales 2 fueron aisladas de hombre y 2 de mujer, todas de diferente serogrupo, con un porcentaje de similitud entre ellas de 55 a 58% y un perfil cromosómico generado de 15 a 19 bandas, compartiendo entre ellas hasta 4 bandas de aproximadamente el mismo tamaño molecular. El grupo B3 fue formado por 5 cepas, de las cuales 2 fueron aisladas de diferentes pacientes del sexo masculino que presentaron el mismo patrón de restricción cromosómico pero diferente serogrupo, y una cepa aislada de mujer del serogrupo O25:H4, en este grupo estuvieron presentes las cepas control 28E y 57E, las cepas de este subgrupo presentaron un porcentaje de similitud entre ellas de 42 a 57% y un perfil cromosómico de 16 a 21 bandas, compartiendo entre ellas entre 1 a 2 bandas de aproximadamente el mismo tamaño molecular.

Por último, la rama C estuvo formada por solo una cepa aislada de paciente masculino con prostatitis cuyo serotipo fue O153:H?, esta cepa generó un patrón cromosómico de 14 bandas, y es la única cepa en que no se detectó el gen de virulencia *sat*.

Con respecto a los patrones de restricción de los cromosomas de las 47 cepas generados con la enzima *NotI*, se encontró que cuatro cepas (115417, 115423, 115429 y 115431) aisladas de pacientes del sexo masculino no presentaron algún corte en su cromosoma. El análisis de los patrones de restricción del

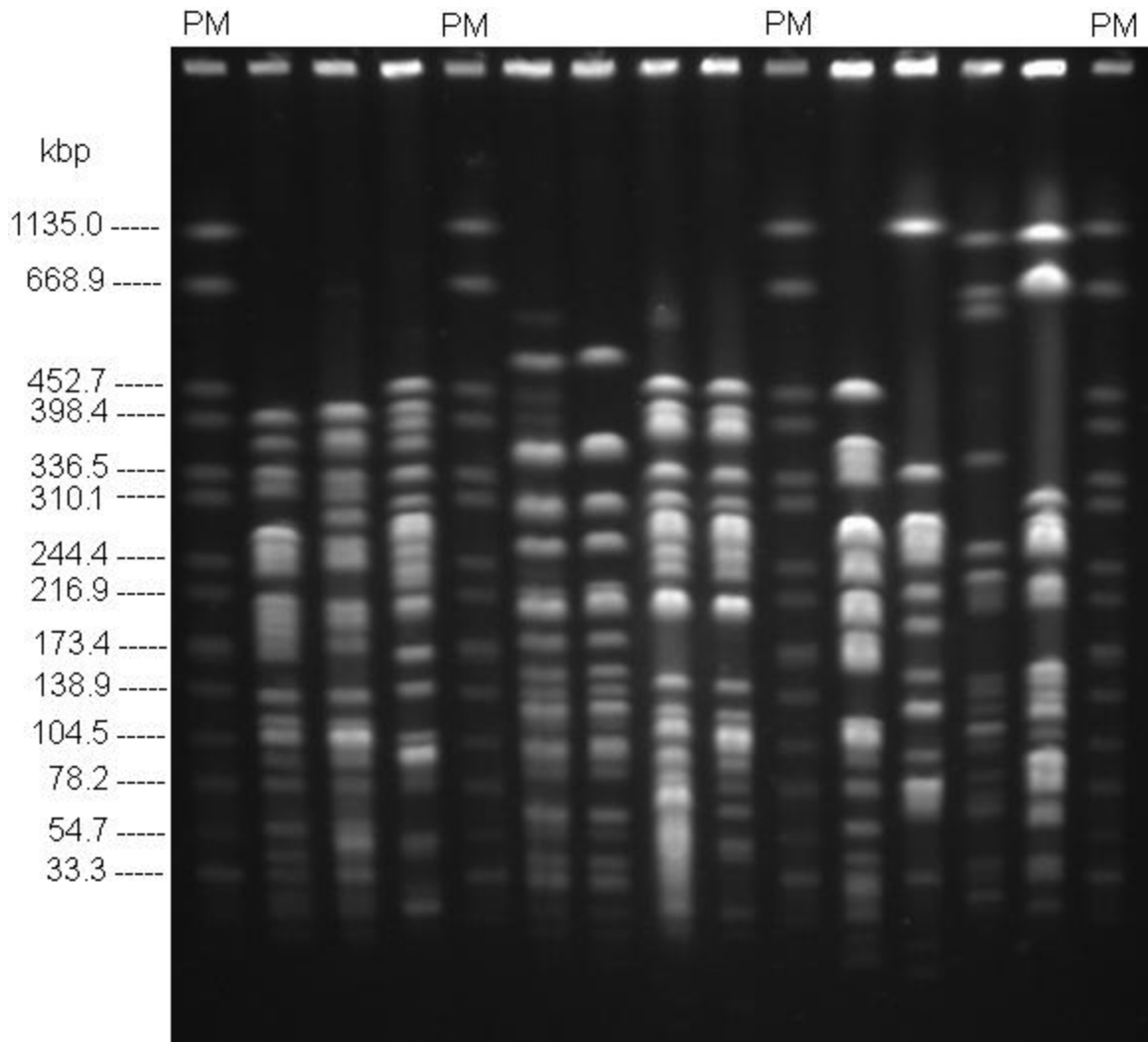
cromosoma, de las 43 cepas restantes, mostró 40 tipos diferentes de perfiles y una distribución y agrupación de las cepas muy semejante a lo observado con la enzima *XbaI*. El análisis de los patrones generados por las cepas mostró dos grupos principales A y B. El grupo A agrupó 20 cepas aisladas de mujeres, de las cuales 18 fueron agrupadas también en la rama principal A en el dendograma construido con la enzima *XbaI* (**Figuras 8 y 9**), además de 6 cepas aisladas de hombres, de las cuales 3 fueron agrupadas en la rama principal A y las otras 3 en la B con respecto al dendograma creado con *XbaI*. La rama B del dendograma construido con *NotI* agrupó 17 cepas, de las cuales 4 fueron aisladas de mujeres y 10 fueron aisladas de hombres, además de las 3 cepas control. Al igual que el análisis con *XbaI*, en el análisis con *NotI* las cepas de la rama B presentaron patrones de banda más heterogéneos en relación a las cepas de la rama A (**Figuras 8 y 9**) y de diferente serogrupo.

La rama principal A del dendograma construido con *NotI* fue dividida en dos subgrupos A1 (23 cepas) y A2 (3 cepas). Las cepas del subgrupo A1 muestran un patrón de restricción muy homogéneo compartiendo entre ellas una banda de gran tamaño molecular (**Figura 8**), con un porcentaje de similitud entre ellas de 72 a 80%. El grupo A2 fue formado por 3 cepas aisladas de vías urinarias de mujer, con un porcentaje de similitud entre ellas de 75%, y un perfil cromosómico generado de 16 a 18 bandas, compartiendo entre ellas de 14 a 15 bandas de aproximadamente el mismo tamaño molecular.

La rama B es subdividida también en 3 grupos: B1, B2 y B3. El grupo B1 está formado por 7 cepas, 3 aisladas de hombre, 2 de mujer y 2 de los controles, con un porcentaje de similitud entre ellas del 58 al 62% y un perfil cromosómico generado de 14 a 17 bandas, compartiendo entre ellas de 4 a 6 bandas de aproximadamente el mismo tamaño molecular. El grupo B2 contiene 7 cepas, una cepa control, 4 cepas aisladas de hombre y 2 de mujer, con un porcentaje de 59 al 65% de similitud y un perfil cromosómico generado de 13 a 21 bandas, compartiendo de 3 a 5 bandas de aproximadamente el mismo tamaño molecular.

Finalmente, el grupo B3 está conformado por 3 cepas, aisladas de vías urinarias de hombre, si bien, dos de ellas son una misma clona, el porcentaje de similitud con la cepa restante es del 48%, con perfiles cromosómicos de 11 a 14 bandas y compartiendo entre ellas de 3 a 6 bandas de aproximadamente el mismo tamaño molecular.

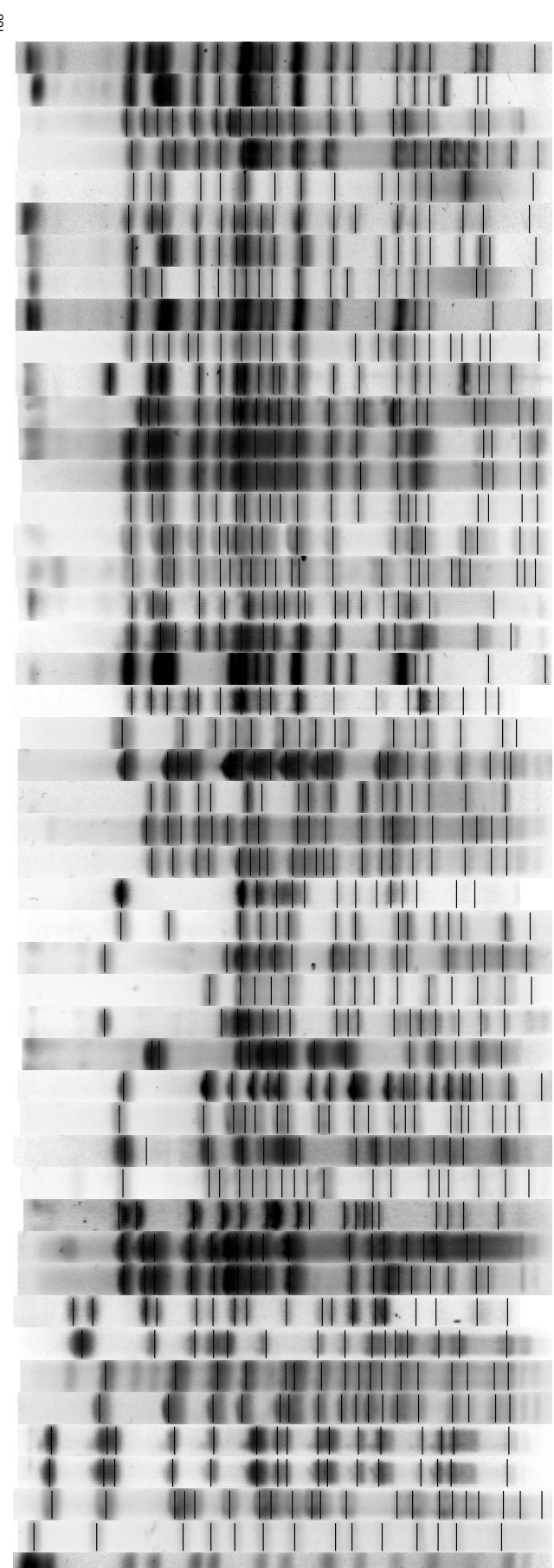
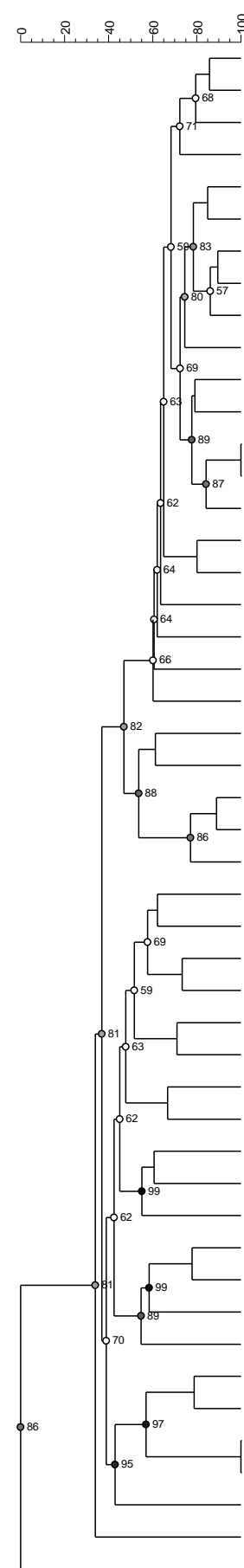
Observando ambos dendogramas, concluimos que se pudieron caracterizar perfectamente bien las cepas con el uso de ambas enzimas. En general, las cepas formaron dos grandes grupos: en uno se agruparon las cepas del serogrupo O25:H4 aisladas de mujeres con cistitis, que presentaron un patrón de restricción cromosómico más homogéneo. El otro grupo estuvo formado por cepas que en su mayoría fueron aisladas de hombres con prostatitis o pielonefritis, las cuales produjeron patrones de restricción heterogéneos y de diferente serogrupo y en alguno de los casos sin determinación del antígeno O y H. La mayoría de las cepas presentaron todos los genes de virulencia sin relación significativa con el serogrupo, la patología clínica ni el sexo del paciente.



**Figura 7. Patrones de Electroforesis en Gel de Campos Pulsados con *Xba*I de algunas de las cepas de UPEC aisladas de pacientes femeninas con Infección en Tracto Urinario. PM, estándar de Peso Molecular.**

PFGE-Xba

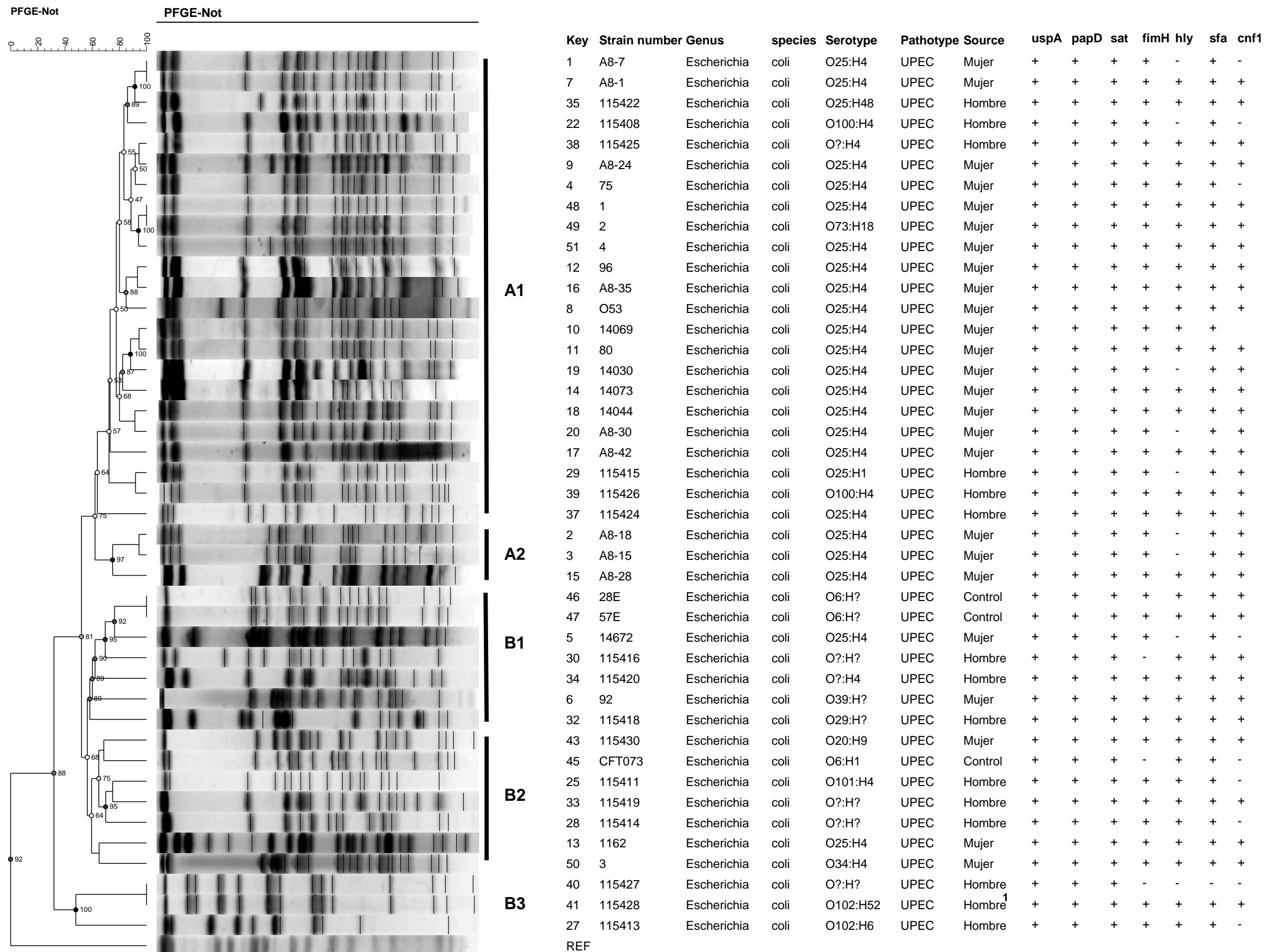
PFGE-Xba



Key	Strain number	Genus	species	Serotype	Pathotype	Source	uspA	papD	sat	fimH	hly	sfa	cnf1
11	80	Escherichia coli		O25:H4	UPEC	Mujer	+	+	+	+	+	+	+
14	14073	Escherichia coli		O25:H4	UPEC	Mujer	+	+	+	+	+	+	+
20	A8-30	Escherichia coli		O25:H4	UPEC	Mujer	+	+	+	+	-	+	+
29	115415	Escherichia coli		O25:H1	UPEC	Hombre	+	+	+	+	-	+	+
17	A8-42	Escherichia coli		O25:H4	UPEC	Mujer	+	+	+	+	+	+	+
4	75	Escherichia coli		O25:H4	UPEC	Mujer	+	+	+	+	+	+	-
12	96	Escherichia coli		O25:H4	UPEC	Mujer	+	+	+	+	+	+	+
16	A8-35	Escherichia coli		O25:H4	UPEC	Mujer	+	+	+	+	+	+	+
10	14069	Escherichia coli		O25:H4	UPEC	Mujer	+	+	+	+	+	+	+
9	A8-24	Escherichia coli		O25:H4	UPEC	Mujer	+	+	+	+	+	+	+
19	14030	Escherichia coli		O25:H4	UPEC	Mujer	+	+	+	+	-	+	+
22	115408	Escherichia coli		O100:H4	UPEC	Hombre	+	+	+	+	-	+	-
1	A8-7	Escherichia coli		O25:H4	UPEC	Mujer	+	+	+	+	-	+	-
7	A8-1	Escherichia coli		O25:H4	UPEC	Mujer	+	+	+	+	+	+	+
35	115422	Escherichia coli		O25:H48	UPEC	Hombre	+	+	+	+	+	+	+
18	14044	Escherichia coli		O25:H4	UPEC	Mujer	+	+	+	+	+	+	+
8	O53	Escherichia coli		O25:H4	UPEC	Mujer	+	+	+	+	+	+	+
37	115424	Escherichia coli		O25:H4	UPEC	Hombre	+	+	+	+	+	+	+
38	115425	Escherichia coli		O?:H4	UPEC	Hombre	+	+	+	+	+	+	+
13	1162	Escherichia coli		O25:H4	UPEC	Mujer	+	+	+	+	+	+	+
51	4	Escherichia coli		O25:H4	UPEC	Mujer	+	+	+	+	+	+	+
43	115430	Escherichia coli		O20:H9	UPEC	Mujer	+	+	+	+	+	+	+
50	3	Escherichia coli		O34:H4	UPEC	Mujer	+	+	+	+	+	+	+
15	A8-28	Escherichia coli		O25:H4	UPEC	Mujer	+	+	+	+	+	+	+
2	A8-18	Escherichia coli		O25:H4	UPEC	Mujer	+	+	+	+	-	+	+
3	A8-15	Escherichia coli		O25:H4	UPEC	Mujer	+	+	+	+	-	+	+
28	115414	Escherichia coli		O?:H?	UPEC	Hombre	+	+	+	+	+	+	-
42	115429	Escherichia coli		O?:H?	UPEC	Hombre	+	+	+	+	+	+	+
30	115416	Escherichia coli		O?:H?	UPEC	Hombre	+	+	+	-	+	+	+
33	115419	Escherichia coli		O?:H?	UPEC	Hombre	+	+	+	+	+	+	+
36	115423	Escherichia coli		O?:H28	UPEC	Hombre <sup>2</sup>	+	+	+	+	+	+	+
6	92	Escherichia coli		O39:H?	UPEC	Mujer	+	+	+	+	+	+	+
31	115417	Escherichia coli		O166:H2	UPEC	Hombre	+	+	+	+	+	-	+
34	115420	Escherichia coli		O?:H4	UPEC	Hombre	+	+	+	+	+	+	+
25	115411	Escherichia coli		O101:H4	UPEC	Hombre	+	+	+	+	+	+	-
32	115418	Escherichia coli		O29:H?	UPEC	Hombre	+	+	+	+	+	+	+
45	CFT073	Escherichia coli		O6:H1	UPEC	Control	+	+	+	-	+	+	-
48	1	Escherichia coli		O25:H4	UPEC	Mujer	+	+	+	+	+	+	+
49	2	Escherichia coli		O73:H18	UPEC	Mujer	+	+	+	+	+	+	+
27	115413	Escherichia coli		O102:H6	UPEC	Hombre	+	+	+	+	+	+	-
39	115426	Escherichia coli		O100:H4	UPEC	Hombre	+	+	+	+	+	+	+
46	28E	Escherichia coli		O6:H?	UPEC	Control	+	+	+	+	+	+	+
47	57E	Escherichia coli		O6:H?	UPEC	Control	+	+	+	+	+	+	+
40	115427	Escherichia coli		O?:H?	UPEC	Hombre	+	+	+	-	-	-	-
41	115428	Escherichia coli		O102:H52	UPEC	Hombre <sup>1</sup>	+	+	+	+	+	+	+
5	14672	Escherichia coli		O25:H4	UPEC	Mujer	+	+	+	+	-	+	-
44	115431	Escherichia coli		O153:H?	UPEC	Mujer	+	+	-	+	+	+	+
REF													

Figura 8. Dendrograma construido con la enzima de restricción *Xba*I y la técnica de PFGE con ayuda del programa BioNumerics. Key: Número designado por el programa; Strain number: Número designado por el laboratorio; Genus: Género; Specie: Especie; Serotype: Serotipo obtenido; Pathotype: Patotipo de la cepa; Source: Origen de aislamiento de la cepa, Mujer: cepa aislada de vías urinarias de pacientes femeninas diagnosticadas con cistitis, Hombre: cepa aislada de vías urinarias de pacientes masculinos diagnosticados con prostatitis, <sup>1</sup>: paciente con diagnóstico de prostatitis y pielonefritis, <sup>2</sup>: Paciente con diagnóstico de pielonefritis. Las columnas siguientes representan el gen de virulencia que se encuentra presente (+) ó ausente en dicha cepa (-).





**Figura 8. Dendrograma construido con la enzima de restricción *NotI* y la técnica de PFGE con ayuda del programa BioNumerics.** Key: Número designado por el programa; Strain number: Número designado por el laboratorio; Genus: Género; Specie: Especie; Serotype: Serotipo obtenido; Pathotype: Patotipo de la cepa; Source: Origen de aislamiento de la cepa, Mujer: cepa aislada de vías urinarias de pacientes femeninas diagnosticadas con cistitis, Hombre: cepa aislada de vías urinarias de pacientes masculinos diagnosticados con prostatitis, <sup>1</sup>: paciente con diagnostico de prostatitis y pielonefritis .Las columnas siguientes representan el gen de virulencia que se encuentra presente (+) ó ausente en la cepa (-).

## Discusión de Resultados

En este estudio se caracterizó fenotípica y genotípicamente un grupo de cepas de *Escherichia coli* Uropatógena (UPEC) aisladas de mujeres diagnosticadas con cistitis y de hombres diagnosticados, en su mayoría, con prostatitis. A este grupo de cepas se les determinó la presencia de genes de virulencia, serotipo y perfiles cromosomales por medio de la Electroforesis en Gel de Campos Pulsados (PFGE) e Hibridación del ADN.

Gracias a los perfiles cromosomales generados con ayuda de las enzimas de restricción y de la técnica de PFGE, se pudo observar que las cepas UPEC se distribuían de acuerdo a su perfil cromosómico, agrupándose entre ellas en relación a las bandas que comparten. Un análisis completo de todos los datos generados nos determinó que la agrupación de cepas por similitud entre perfiles de restricción se correlacionó con la presencia del serogrupo O25:H4. Con respecto a las cepas que no presentaron corte alguno en su cromosoma con la enzima de restricción *NotI*, puede ser debido a la metilación de bases en la secuencia de nucleótidos reconocida por la enzima ya que *NotI* solamente tiene actividad catalítica en sitios no metilados.

Se han realizado diversos estudios para identificar los factores de virulencia presentes en las cepas UPEC aisladas tanto en hombres como mujeres (Ruiz et al., 2002; Johnson et al., 2005; Yamamoto et al., 2007; Jadhav et al., 2011), también se han realizado estudios de PFGE para determinar si las cepas de una Infección de Tracto Urinario (ITU) están epidemiológica y/o genéticamente relacionadas (Krieger et al., 2011; Ejrnaes et al., 2006; Soto et al., 2011), así como también, se ha determinado el serogrupo de las cepas involucradas en las diferentes infecciones urinarias. Sin embargo, este es el primer trabajo donde se hace la caracterización genética y fenotípica completa de cepas aisladas de hombres y mujeres, buscando diferencias entre las cepas aisladas de cada género y entre la capacidad de producir una enfermedad determinada.

El potencial patológico de *E. coli* se piensa que es dependiente de la presencia de los factores de virulencia. (Tiba et al., 2008). Este estudio confirma la presencia de *fimH*, importante factor de virulencia implicado en la adherencia mediada con la fimbria tipo 1, se ha propuesto que juega un papel en la colonización de las células epiteliales de la vejiga además de inducir la inflamación, aumentando la virulencia de *E. coli* para el tracto urinario (Ruiz et al., 2002; Wiles et al., 2008 & Tiba et al., 2008). La elevada prevalencia de este factor concuerda con otros estudios donde se ha encontrado una alta prevalencia de este gen entre las cepas UPEC, de entre el 88% y 100% (Ruiz et al., 2002; Johnson et al., 2005; Yamamoto et al., 2007; Blanco et al., 2011; Krieger et al., 2011).

Otros genes que también presentaron una elevada frecuencia fueron *papD* y *sfa*. *papD* codifica para una proteína chaperona requerida para el ensamblaje de la fimbria P (Bann et al., 2004; Hedenström et al., 2005 & Vitagliano et al., 2007), dicha fimbria contribuye a la patogénesis promoviendo la colonización bacteriana en tejidos del huésped y estimulando la respuesta inflamatoria, a través de la liberación de interleucinas como la IL-6 y la IL-8 (Mills et al., 2000), contribuyendo a los signos y síntomas de la enfermedad (Tiba et al., 2008). Estudios previos han encontrado una frecuencia muy variable de este gen entre cepas aisladas de infecciones de vías urinarias, que va de 64.4% y 69.2% del gene *pap* en cepas aisladas de mujeres y hombres respectivamente (Yamamoto et al., 2007). Aunque Ruiz y colaboradores, en el 2002 reportaron una frecuencia menor del 18% en cepas aisladas de mujeres y del 70% en cepas aisladas de hombres. Krieger y col., en 2001, reportan también, una frecuencia muy diferente entre cepas aisladas en hombres jóvenes con prostatitis aguda que va del 38.9% al 77.8%, mientras que Tiba y col., en 2008, detectó una presencia del 32.7% en cepas aisladas de mujeres con cistitis. Contrario a la frecuencia reportada por los trabajos anteriores, se detectó una frecuencia muy alta de *papD* tanto en cepas aisladas de hombres y en cepas aisladas de mujeres, independientemente del cuadro clínico y del serogrupo de la cepa. Con respecto a *sfa*, este gene codifica para la fimbria S,

adhesina que reconoce el contenido de ácido siálico en la superficie sobre los receptores expresados en las células epiteliales y vasculares del riñón, mediando así la adherencia bacteriana (Marrs et al., 2005; Wiles et al., 2008 & Tiba et al., 2008). Estos resultados en la detección de este gen difieren ampliamente con los reportes hechos en estudios previos, mientras que en la población estudiada la frecuencia de este gen es alta, los diferentes estudios muestran una frecuencia del 33.3% en cepas de pacientes con prostatitis (Krieger et al., 2011), de 27.8% en cepas aisladas de pacientes con cistitis (Tiba et al., 2008), y del 36.6% y 64.5% de frecuencia en cepas pacientes con cistitis y con prostatitis, respectivamente (Yamamoto et al., 2007).

La producción de toxinas en las cepas UPEC favorece la colonización y permanencia de la bacteria en el tracto urinario (Wiles et al., 2008). CNF1, la cual es codificada por el gen *cnf1* es una proteína altamente letal y necrotóxica (Wiles et al., 2008), activa constitutivamente la familia de proteínas Rho GTPasas a través de la desaminación del residuo de glutamina en la posición 63, lo que afecta diversas funciones de la célula eucarionte, como la inducción de la formación de una membrana rugosa, la formación de fibras de estrés de actina, bloqueo en la citocinesis y la generación de una respuesta inflamatoria (Kouokam et al., 2006). Las hemolisinas contribuyen al daño tisular a través de efectos citolíticos, promueven la invasión bacteriana y la persistencia del microorganismo en el tracto urinario del hospedero. También presentan una acción hemolítica, proveyendo al microorganismo de fuentes de hierro, y pueden actuar sobre células fagocíticas causando su lisis, con una consecuente protección frente a la fagocitosis (Guidoni et al., 2006). La toxina Sat induce un daño severo al riñón, causando la disolución de la membrana glomerular, pérdida de las células epiteliales tubulares y la vacuolización del tejido renal (Wiles et al., 2008 & Guyer et al., 2002). Todas estas acciones de las toxinas producidas por las diferentes cepas de UPEC hacen que su presencia se haya asociado a cepas relacionadas con pielonefritis, prostatitis o infecciones de vías urinarias complicadas. Sin embargo, se encontró una alta frecuencia de los genes que codifican para estas

toxinas en todas las cepas estudiadas de cistitis y prostatitis sin significancia con el sexo del paciente o el serotipo de la cepa.

Johnson y col. en 2005, observó que los genes *hly* y *cnf1* fueron los genes más frecuentemente detectados en un total de 63 cepas UPEC aisladas de pacientes con diferentes ITUs en un 57% y 54% respectivamente. Maroncle en 2006, encontró una frecuencia del 68% para el gen *sat*. Mientras que Idress en 2010, demostró que los genes *sat* y *hly* tuvieron la misma frecuencia del 59.52% en cepas de pacientes con pielonefritis y del 28.81% en cepas de pacientes con cistitis. Sin embargo, la frecuencia de los genes reportada por estos investigadores es baja en relación a la frecuencia de *sat*, *hly* y *cnf1* encontrada en el presente estudio, que fue del 95% y 100% para el gen *sat*, 85% y 75% para el gen *hly* y del 75% y 88% para *cnf1* en las cepas aisladas de hombres y de mujeres, respectivamente.

Estudios anteriores concuerdan que cepas causantes de prostatitis presentan una mayor prevalencia de diversos factores de virulencia en comparación con las cepas causantes de cistitis, sugiriendo de esta manera que la cistitis podía ser causada por cepas que fueran menos virulentas que aquellas que causan síndromes más invasivos como la prostatitis (Ruiz et al., 2002; Johnson et al., 2005; Yamamoto et al., 2007 & Krieger et al., 2011). Sin embargo en las cepas en estudio, la presencia de genes de virulencia no mostró diferencia significativa dependiendo del origen del aislamiento.

En el presente estudio, se encontró que la mayoría de las cepas UPEC aisladas de mujeres presentaban el serogrupo O25:H4 (23 cepas) y las cepas aisladas de hombres presentaron serogrupos variados, e incluso hubo cepas sin caracterización del antígeno O y H. La población de cepas estudiadas mostró que las cepas aisladas de mujeres presentan un perfil cromosómico más homogéneo, compartiendo entre ellos un número significativo de bandas que permiten la agrupación de las cepas en una rama principal, pudiendo apreciarse esta

característica con las dos enzimas empleadas. La determinación de los genes de virulencia entre las cepas mostró que no hay diferencia significativa entre el contenido de genes de virulencia de la cepa y la patología clínica de la que se aísla.

### **Conclusión**

Con los resultados del presente estudio se concluye que las cepas UPEC del serogrupo O25:H4 están asociadas a cistitis y presentan un perfil cromosómico homogéneo. Este es el primer trabajo que documenta la marcada asociación del serotipo O25:H4 en cepas aisladas de mujeres con cistitis. Encontrando una diferencia importante entre las cepas aisladas de mujer y las aisladas de hombre.

### **Perspectivas**

Estudios posteriores permitirán determinar si este serogrupo es característico de cepas asociados a cistitis en mujeres o se encuentra también presente en cepas aisladas de hombres con la misma patología.

## Bibliografía

- Baker S., Hanage W.P. & Holt H.E.** 2010. Navigating the future of bacterial molecular epidemiology. *Curr Opin Microbiol.* 13 (5): 640-645.
- Bann J.G., & Frieden C.** 2004. Folding and Domain-domain interactions of the chaperone PapD measured by 19F NMR. *Biochemistry.* 43(43):13775-13786.
- Bélanger L., Garenaux A., Harel J., Boulianne M., Nadeau E., & Dozois C.M.** 2011. *Escherichia coli* from animal reservoirs as a potential source of human extraintestinal pathogenic *E. coli*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 62(1): 1-10.
- Blanco J., Mora A., Mamani R., López C., Blanco M., Dahbi G., Herrera A., Blanco J.E., Alonso M.P., García-Garrote F., Chaves F., Orellana M.A., Martínez-Martínez L., Calvo J., Prats G, Larrosa M.N., González-López J.J., López-Cerero L., Rodríguez-Baño J. & Pascual A.** 2011. National survey of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections reveals the spread of drug-resistant clonal groups O25b:H4-B2-ST131, O15:H1-D-ST393 and CGA-D-ST69 with high virulence gene content in Spain. *J Antimicrob Chemother*; 66: 2011–2021.
- Bower J.M., Eto D.S., & Mulvey M.A.** 2005. Covert operations of uropathogenic *Escherichia coli* within the urinary tract. *Traffic.* 6(1): 18-31.
- Brooks G.F., Carrol K.C., Butel J.S., & Morses A.** 2008. Microbiología Médica de Jawetz, Melnick, Adelberg. *El Manual Moderno.* 19ª Edición, México, pp. 261-266.
- Brzuszkiewicz E., Brüggemann H., Liesegang H., Emmerth M., Olschläger T., Nagy G., Albermann K., Wagner C., Buchrieser C., Emody L., Gottschalk G., Hacker J., & Dobrindt U.** 2006. How to become a uropathogen: comparative genomic analysis of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(34):12879-12884.
- Davis J.M., Rasmussen S.B., & O'Brien A.D.** 2005. Cytotoxic Necrotizing Factor type 1 production by uropathogenic *Escherichia coli* modulates polymorphonuclear leukocyte function. *Infect Immun.* 73(9): 5301-5310.
- Dielubanza E. J. & Schaeffer A.J.** 2011. Urinary tract infections in women. *Med Clin North Am.* 95 (1): 27-41.

- Ejnaes K., Sandvang D., Lundgren B., Ferry S., Holm S., Monsen T., Lundholm R., & Frimodt-Moller N.** 2006 Pulsed-Field Gel Eletroforesis typing of *Escherichia coli* strains from samples collected before and after pivmecillinam or placebo treatment of uncomplicated community-acquired urinary tract infection in women. *J Clin Microbiol.* 44(5): 1776-1781
- Eshwarappa M., Dosegowda R., Aprameya I.V., Khan M.W., Kumar P.S., & Kempegowda P.** 2011. Clinico-microbiological profile of urinary tract infection in south India. *Indian J Nephrol.* 21(1): 30-36.
- Farajnia S., Alikhani M.Y., Ghotaslou R., Naghili B. & Nakhband A.** 2009. Causative agents and antimicrobial susceptibilities of urinary tract infections in the northwest of Iran. *Int J Infect Dis.*13 (2): 140-144.
- Feldmann F., Sorsa L.J., Hildinger K., & Schubert S.** 2007. The Salmochelin siderophore receptor Iron contributes to invasion of Urothelial cells by Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* in vitro. *Infection and Immunity.*75(6):3183-3187.
- Finnell S.M., Carrol A.E., Downs S.M., & the Subcommittee on Urinary Tract Infection.** 2011. Technical Report-Diagnosis and Management of an initial UTI in Febrile Infants and Young children. *Pediatrics.*128( 3): 749-770.
- Foley S.L., Lynne A.M. & Nayak R.** 2009. Molecular typing methologies for microbial source tracking and epidemiological investigations for Gram-negative bacterial foodborne pathogens. *Infect. Genet. Evol.* 9(4):430-440.
- Forbes S., Salim D., & Weissfield A.** 2007. Bailey's & Scott's Diagnostic Microbiology, 12a. Ed. *Mosby Elsevier.*
- Foxman B.** 2010. The epidemiology of urinary tract infection. *Nat Rev Urol.* 7(12): 653-660.
- Garza Velasco, Raúl,** 2005. *Manual de Prácticas de Bacteriología.* Facultad de Química, Ciudad Universitaria, México, 67-78.
- Ghengesh K.S., Elkateb E., Berbash N., Abdel Nada R., Ahmed S.F., Rahouma A., Seif-Enasser N., Elkhambroun M. A., Belresh T., & Klena J.D.** 2011. Uropathogens from diabetic patients in Libya: virulence factors and phylogenetic groups of *Escherichia coli* isolates. *J Med Microbiol.* 58(Pt8): 1006-1114.



**Gugliandolo C., Lentini V., Spano A. & Maugeri T.L.** 2011. Conventional and molecular methods to detect bacterial pathogens in mussels. *Lett. Appl. Microbiol.* 52(1):15-21.

**Guidoni E., Dalpra V., Figueiredo P., Leite D., Mímica L., Yano T., Blanco J., & Toporovski J.** 2006. E. coli virulence factors in children with neurogenic bladder associated with bacteriuria. *Pediatr Nephrol.* 21:376–381

**Guyer D.M., Radulovic S., Jones F.E., & Mobley H.L.** 2002. Sat, the secreted autotransporter toxin of uropathogenic *Escherichia coli*, is a vacuolating cytotoxin of bladder and kidney epithelial cells. *Infect Immun.* 70(8): 4539-4546.

**Hedenström M., Emtenäs H., Pemberton N., Aberg V., Hultgren S.J., Pinkner J.S., Tegman V., Almqvist F., Sethson I., & Kihlberg J.** 2005. NMR studies of interactions between periplasmic chaperones from uropathogenic *E. coli* and pilicides that interfere with chaperone function and pilus assembly. *Org Biomol Chem.*3(23): 4193-4200.

**Henderson J.P., Crowley J.R., Pinkner J.S., Walker J.N., Tsukayama P., Stamm W.E., Hooton T.M., & Hultgren S.J.** 2009. Quantitative metabolomics reveals an epigenetic blueprint for iron acquisition in uropathogenic *Escherichia coli*. *PLoS Pathog.* 5(2).

**Hedenström M., Emtenäs H., Pemberton N., Aberg V., Hultgren S.J., Pinkner J.S., Tegman V., Almqvist F., Sethson I., & Kihlberg J.** 2005, NMR studies of interactions between periplasmic chaperones from uropathogenic *E. coli* and pilicides that interfere with chaperone function and pilus assembly. *Org. Biomol. Chem.* 3:4193-4200.

**Idress M., Mussarat U., Badshah Y., Qamar R. & Bokhari H.**2010. Virulence factors profile of drug-resistant *Escherichia coli* isolates from urinary tract infections in Punjab, Pakistan. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 29(12): 1533-1537.

**Jadhav S., Hussain A., Devi S., Kumar A., Parveen S., Gandham N., Wieler L., Ewers C., & Ahmed N.** 2011. Virulence Characteristics and Genetic Affinities of Multiple Drug Resistant Uropathogenic *Escherichia coli* from a Semi Urban Locality in India. *PLoS ONE* 6(3):e18063.

- Johnson J., Owens K., Gajewski A., & Kuskowski M.A.** 2005. Bacterial Characteristics in relation to clinical source of *Escherichia coli* isolates from women with acute cystitis or pyelonephritis and Uninfected women. *J.Clin.Microbiol.*43(12):6064-6072.
- Karama M. & Gyles C.L.** 2010. Methods for Genotyping Verotoxin-producing *Escherichia coli*. *Zoonoses Public Health.* 57 (7-8) 447-452
- Klemm P., Roos V., Ulett G.C., Svanborg C., & Schembri M.A.** 2006. Molecular characterization of the *Escherichia coli* asymptomatic bacteriuria strain 83972: the taming of a pathogen. *Infect Immun.* 74(1): 781-785.
- Kouokam J.C., Wai S.N., Fällman M., Dobrindt U., Hacker J., & Uhlin B.E.** 2006. Active cytotoxic necrotizing factor 1 associated with outer membrane vesicles from uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 74(4): 2022-2030.
- Krieger J.N., Dobrindt U., Riley D.E. & Oswald E.** 2011. Acute *Escherichia coli* prostatitis in previously health young men: Bacterial virulence factors, antimicrobial resistance, and clinical outcomes. *Urology.* 77(6): 1420-1425
- Lau S.H., Kaufmann M.E., Livermore D.M., Woodford N., Willshaw G.A., Cheasty T., Stamper K., Reddy S., Cheesbrough J., Bolton F.J. & Upton M.** 2008. UK epidemic *Escherichia coli* strains A-E, with CTX-M-15 beta-lactamase, all belong to the international O25:H4-ST131 clone. *J Antimicrob Chemother.* 62 (6): 1241-1244
- Leveret M., Zamfir O., Clermont O., Bouvet O., Lespinats S., Hipeaux M.C., Branger C., Picard B., Saint-Ruf C., Norel F., Balliau T., Zivy M., Le Nagard H., Cruvellier S., Chane-Woon-Ming B., Nilsson S., Gudelj I., Phan K., Ferenci T., Tenailon O., & Denamur E.** 2010. Molecular and Evolutionary Bases of within-Patient genotypic and phenotypic diversity in *Escherichia coli* extraintestinal infections. *PLoS Pathog.* 6(9) pii: e1001125
- Manges A.R., Tabor H., Tellis P., Vincent C., & Tellier P.P.** 2008. Endemic and Epidemic lineages of *Escherichia coli* that cause urinary tract infections. *Emerg Infect Dis.* 14(10): 1575-1583.
- Maroncle N.M., Sivick K.E., Brady R., Stokes F.E. & Mobley H.L.** 2006. Protease activity, secretion, cell entry, cytotoxicity, and cellular targets of secreted

autotransported toxin of uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 74(11): 6124-6134.

**Marrs CF., Zhang L., & Foxman B.** 2005. *Escherichia coli* mediated urinary tract infections: Are there distinct uropathogenic *E. coli* (UPEC) pathotypes?. *FEMS Microbiology Letters* 252:183–190

**Mills M., Meysick K.C., O'Brien A.** 2000. Cytotoxic Necrotizing Factor Type 1 of Uropathogenic *Escherichia coli* kills cultured human uroepithelial 5637 cells by an apoptotic mechanism. *Infection and Immunity.* 68(10): 5869-5880.

**Mitsumori K, Terai A., Yamamoto S., Ishitoya S., & Yoshida O.** 1999. Virulence characteristics of *Escherichia coli* in acute bacterial prostatitis. *J Infect Dis.* 180(4): 1378-1381.

**Mora A., López C., Dabhi G., Blanco M., Alonso M.P., Herrera A., Mamani R., Bonacorsi S., Moulin-Schouler M., & Blanco J.** 2009. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* O1:K1:H7/NM from human and avian origin: detection of clonal groups B2ST95 and D ST59 with different host distribution. *BMC Microbiol.* 9:132

**Murrar P., Rosenthal K.S., & Pfaller M.A.** 2006. Microbiología Médica. Elsevier. 5a Edición, España, pp. 326-330.

**Najar M.S., Saldanha C.L., & Banday K.A.** 2009. Approach to urinary tract infections. *Indian J Nephrol.* 19(4): 129-139.

**Rasko D.A., Phillips J.A., & Mobley H.L.** 2001. Identification of ADN sequences from second pathogenicity island of uropathogenic *Escherichia coli* CFT073: probes specific for uropathogenic populations. *J Infect Dis.* 184(8): 1041-1049.

**Ronald A.** 2003. The etiology of urinary tract infection: Traditional and emerging pathogens *Dis Mon.* 49 (2): 71-82.

**Ruiz J., Simon K., Horcajada J.P., Velasco M., Barranco M., Roig G., Moreno-Martínez A., Martínez J.A., Jiménez de Anta T., Mensa J., & Vila J.** 2002. Differences in Virulence Factors among clinical isolates of *Escherichia coli* causing cystitis and pyelonephritis in women and prostatitis in men. *J. Clin. Microbiol.* 40(12): 4445-4449.

**Soto S.M., Zúñiga S., Ulleryd P., & J. Vila.** 2011. Acquisition of a pathogenicity island in an *Escherichia coli* clinical isolate causing febrile urinary tract infection. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect Dis.* 30:1543-1550.

**Subcommittee on Urinary Tract Infection.** 2011. Urinary Tract Infection: Clinical Practice Guideline for the Diagnosis and Management of the Initial UTI in Febrile Infants and children 2 to 24 months. *Pediatrics* 128(3): 595-610.

**Svanvorg C., Bergsten G., Fischer H., Godaly G., Gustafsson M., Karpman D., Lundstedt A.C., Ragnarsdottir B., Svensson M. & Wullt B.** 2006. Uropathogenic *Escherichia coli* as a model of host-parasite interaction. *Curr Opin Microbiol.* 9(1): 33-39.

**Tartof S.Y., Solberg O.D., Manges A. R. & Riley L.W.** 2005. Analysis of Uropathogenic *Escherichia coli* clonal group by Multilocus Sequence Typing. *J.Clin.Microbiol.* 43(12):5860-5864.

**Tenover F.C., Arbeit R.D., Goering R.V., Mickelsen P.A., Murray B.E., Persing D.H., & Swaminathan B.** Interpreting chromosomal ADN restrictions patterns produced by Pulsed-Field Electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 33(9): 2233 2239

**Tiba M.R., Yano T.,& Leite D.** 2008. Genotypic characterization of virulence factors in *Escherichia coli* strains from patients with cystitis. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo.* 50(5):255-260.

**Verger D., Miller E., Remaut H., Waksman G., & Hultgren S.** 2006. Molecular mechanism of P pilus in uropathogenic *Escherichia coli*. *EMBO Rep.* 7(12): 1228-1232.

**Vitagliano L., Ruggiero A., Pedone C., & Berisio R.** 2007. A molecular dynamics study of pilus subunits: insights into pilus biogenesis. *J Mol Biol.* 367(4): 935-941.

**Welch R.A., Burland V., Plunkett G 3<sup>rd</sup>., Redford P., Roesch P., Rasko D., Buckles E.L., Liou S.R., Boutin A., Hackett J., Stroud D., Mayhew G.F., Rose D.J., Zhou S., Schwartz D.C., Perna N.T., Mobley H.L., Donnenberg M.S., & Blattner F.R.** 2002. Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99(26): 17020-17024.

**Wiles T.J., Kulesus R.R. & Mulvey M.A.** 2008. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Experimental and Molecular Pathology* 85

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

## Apéndice

### Apéndice I:

#### Reactivos y Medios de Cultivo

##### 1. EDTA 0.5 M, pH 8.0:

- a. 186.1 g de EDTA dihidratado
- b. 800 mL de Agua desionizada estéril
- c. Agitar vigorosamente en agitador magnético y ajustar el pH a 8.0 con NaOH (aprox. 20 g)
- d. Aforar a 1000 mL con agua estéril o en caso contrario esterilizar la solución.

##### 2. Buffer TE (10mM Tris: 1mM EDTA, pH 8.0):

- a. 10 mL de Tris 1 M, pH 8.0
- b. 2 mL de EDTA 0.5 M, pH 8.0
- c. Aforar a 1000mL con agua estéril, o en caso contrario, esterilizar posteriormente la solución.

##### 3. Buffer TBE 5x:

- a. 54 g de Tris Base
- b. 27.5 g de Ácido bórico
- c. 20 mL de EDTA 0.5 M, pH 8.0
- d. Aforar a 1000 mL con agua estéril, o en caso contrario, esterilizar posteriormente la solución.

##### 4. Agarosa 1% SeaKem Gold: 1% SDS:

- a. Pesar 0.5 gramos de SeaKem Gold (SKG) en un matraz con tapón de rosca.
- b. Añadir 47 mL de buffer TE; agitar suavemente para dispersar la agarosa.

- c. Abrir la tapa de tal manera que pueda entrar aire, y meter a microondas por 30 segundos, mezclar suavemente y repetirlo en intervalos de 10 segundos hasta que la agarosa esté completamente disuelta. Colocar el matraz en el baño de agua a 55-60°C, 5 minutos antes de añadir SDS
- d. Añadir 2.5 mL de SDS al 20% (precalentado a 55°C) y mezclar bien.
- e. Colocar el matraz en el baño de agua a 55- 60°C hasta su uso.

**5. Buffer de Suspensión de Celular (Cell Suspension Buffer, CSB) 100mM**

Tris: 100mM EDTA, pH 8.0 de la siguiente manera:

- a. 10 mL de Tris 1 M, pH= 8.0
- b. 20 mL de EDTA 0.5 M, pH=8.0
- c. Aforar a 100 mL agua estéril, o en caso contrario, esterilizar posteriormente la solución.

**6. Buffer de Lisis Celular (Cell Lysis Buffer, CLB) 50 mM Tris: 50 mM**

EDTA, pH 8.0 + 1% Sarcosil:

- a. 25 mL de Tris 1 M, pH 8.0
- b. 50 mL de EDTA 0.5 M, pH 8.0
- c. 50 mL de Sarcosil al 10% (o pesar 5 g de sarcosil)
- d. Aforar a 500 mL con agua estéril

**7. Buffer de Lisis Celular/Proteinasa K:**

- a. Se requieren de 7 mL de CLB por tubo (por ej. 7 mL x 10 tubos= 70 mL)
- b. Se requieren de 35 µL de Proteinasa K (solución stock 20mg/mL) por tubo con CLB (por ej. 35 µL x 10 tubos= 350 µL).
- c. Medir los volúmenes correctos en un matraz o tubo con la capacidad apropiada y mezclar bien.

**8. Caldo Luria (LB):** (Miller's LB Broth Base). Invitrogen ®. Lote 80265079.

- a. Suspender 25.0 g del medio en un litro de agua destilada
- b. Dejar hidratar por 15 min.
- c. Hervir hasta completa disolución.
- d. Distribuir en tubos de ensayo de 16x150 mL con tapón de rosca (5 mL por tubo).
- e. Esterilizar en autoclave 15 min/121°C ó 15 lb.
- f. Conservar a 4°C.

**9. Medio de cultivo SIM:** Merk®. Lote 00802.

- a. Suspender 30 g de medio de cultivo SIM en un litro de agua destilada
- b. Dejar hidratar por 15 min.
- c. Hervir hasta completa disolución
- d. Distribuir en tubos de ensayo con tapón de algodón (3mL por tubo)
- e. Esterilizar en autoclave por 15 min/121°C o 15 lb.
- f. Dejar solidificar en posición vertical y conservar a 4°C.

**10. Agar MacConkey:** BD Bioxon®. Lote 8285472.

- a. Suspender 50 g del medio en un litro de agua destilada
- b. Mezclar bien hasta que se tenga una suspensión uniforme
- c. Dejar reposar de 10-15 min.
- d. Calentar suavemente agitando frecuentemente y hervir durante un minuto.
- e. Esterilizar en autoclave por 15 min/121°C o 15 lb.
- f. Vaciar en cajas petri estériles y dejar solidificar.
- g. Conservar a 4° C.

**11. Medio RMVP:** BD Bioxon ®. Lote 01112211.

- a. Suspender 17 g de polvo en un litro de agua destilada
- b. Dejar hidratar durante 10-15 min.
- c. Disuelva calentando y deje hervir aproximadamente un minuto.



- d. Distribuir en tubos de 13x75 mL con tapón de algodón (3 mL por tubo)
- e. Esterilizar en autoclave por 15 min/121°C o 15 lb.
- f. Conservar a 4° C.

**12. Agar Citrato de Simmons:** BD Bioxon ®. Lote 186B0A2

- a. Suspender 24.2 g de polvo en un litro de agua destilada.
- b. Dejar hidratar durante 10-15 min
- c. Mezclar y calentar suavemente agitando frecuentemente hasta que el medio hierva durante 1 min.
- d. Distribuir en tubos de ensayo de 13x75 mL con tapón de rosca (3 mL por tubo)
- e. Esterilizar por 15 min/121° C o 15 lb.
- f. Dejar enfriar en posición inclinada de tal manera que se genere un pico de flauta. Conservar a 4° C.

**13. Base de Agar Sangre:** BD Bioxon ®. Lote8273351.

- a. Suspender 40 g de polvo en un litro de agua destilada.
- b. Mezclar, calentar con agitación frecuente y hervir durante 1 min hasta disolución completa.
- c. Esterilizar en autoclave por 15 min/121° C o 15 lb.
- d. Para la preparación de placas con sangre, enfriar la base a 45-50°C y adicionar 5% de sangre estéril desfibrinada.
- e. Vaciar en cajas petri estériles y dejar solidificar. Conservar a 4° C.

**14. Gelosa Especial.** 1L pH= 7.2-7.4

- a. Base de agar sangre           20g. BD Bioxon ®. Lote 8273351
- b. Agar bacteriológico           15g. BD Bioxon ®. Lote H101617J
- c. Extracto de carne           1.5g. BD Bioxon ®. Lote C3016670
- d. Agua destilada 1000 mL

- e. Mezclar bien y calentar suavemente agitando frecuentemente hasta que el medio hierva durante 1 min. Ajustar el pH
- f. Distribuir en tubos de ensayo de 13x75 mL con tapón de rosca (4 mL por tubo) y esterilizar por 15 min/121° C o 15 lb
- g. Se deja enfriar en posición inclinada de tal manera que se genere un pico de flauta. Conservar a 4° C.

**15. Reactivo de Kovacs:**

- a. Disolver 10 g de *p*-dimetilaminobenzaldehído (DMAB) en 150 mL de alcohol amílico ó isoamílico puro. Calentar con suavidad en caso de ser necesario.
- b. Agregar lentamente 50 mL de HCl concentrado a la mezcla
- c. Conservar en un frasco ámbar, guardar en refrigeración cuando no esté en uso.

**16.  $\alpha$ -naftol al 5%:** Reactivo utilizado para la prueba de Voges-Proskauer. Actúa como intensificador de color.

- a. Disolver 5 g de  $\alpha$ -naftol en menos de 100 mL de alcohol absoluto (o al 95%). Transferir la solución a un frasco graduado de 100 mL y llevarlo a 100mL con etanol absoluto.
- b. Conservar en refrigeración cuando no se use.

**17. Hidróxido de potasio al 40%:** Reactivo utilizado en la prueba Voges-Proskauer, el cual ayuda a la absorción de CO<sub>2</sub> en el medio RMVP.

- a. Pesar con rapidez 40 g de KOH y disolver en menos de 100 mL de agua destilada.
- b. Transferir a un frasco graduado de 100 mL y llevar a 100 mL con agua destilada.
- c. Conservar en una botella de polietileno o recubierta con parafina. Vencimiento a las 2-3 semanas de preparación. Evitar la exposición directa con la piel ya que puede causar quemaduras dolorosas.

**18. Rojo de Metilo:** Indicador de pH ácido y denota los cambios en la acidez por reacciones de color por encima de un rango de pH 4.4-6 o menor en el medio, el reactivo permanece rojo, mientras que con la acidez disminuida a pH 6, el indicador vira a amarillo.

- a. Disolver 0.1 g de rojo de metilo en 300 mL de alcohol etílico al 95%
- b. Agregar 200 mL de agua desionizada a la mezcla de alcohol-indicador para obtener un volumen final de 500 mL
- c. Mantener en refrigeración cuando no se use.

**19. Bromuro de etidio 10mg/mL:**

- a. 1 g de Bromuro de etidio
- b. 100 mL de agua desionizada estéril
- c. Mezclar en agitador magnético por muchas horas hasta asegurar la disolución del colorante.

**20. Solución de NaCl 1.5M – NaOH 0.5M:**

- a. 43.83 g de NaCl
- b. 10 g de NaOH
- c. Disolver en 300 mL de agua estéril, agitando vigorosamente con ayuda de un agitador magnético.
- d. Aforar a 500 mL con agua estéril o en caso contrario esterilizar posteriormente la solución.

**21. Solución de Tris-HCl 1M , pH 7.5:**

- a. 121.14 g de Trizma base
- b. Disolver en 600 mL de agua estéril agitando vigorosamente con ayuda de agitador magnético.
- c. Medir el pH con un potenciómetro.
- d. Ajustar el pH a 7.5 con HCl 1N o HCl concentrado.

- e. Aforar a 1000 mL con agua estéril o en caso contrario esterilizar posteriormente la solución.

**22. Solución de NaCl 1.5 M – Tris-HCl 0.5 M, pH 7.5:**

- a. 87.66 g de NaCl
- b. Disolver en 300 mL de agua estéril, agitando vigorosamente con un agitador magnético.
- c. Agregar 500 mL de solución de Tris-HCl 1M, pH 7.5
- d. Aforar a 1000 mL con agua estéril o en caso contrario esterilizar posteriormente la solución.

**23. Solución de SSC 20x (Citrato de sodio 0.3 M y NaCl 3 M):**

- a. 175.3 g de NaCl
- b. 88.3 g de Citrato de Sodio
- c. Disolver en 800 mL
- d. Ajustar pH a 7.0 con NaOH 1N o lentejas de NaOH.
- e. Aforar a 1000 mL con agua estéril o en caso contrario esterilizar posteriormente la solución.

**24. Solución de SSC 3x:**

- a. 150 mL de solución SSC 20x
- b. Aforar a 1000 mL con agua estéril o en caso contrario esterilizar posteriormente la solución.

**25. Solución de SSC 5x:**

- a. 250 mL de solución SSC 20x
- b. Aforar a 1000 mL con agua estéril o en caso contrario esterilizar posteriormente la solución

## Apéndice 2:

### Identificación morfológica colonial e Identificación bioquímica

- Agar Sangre: En las placas de agar sangre se observaron colonias grises, redondas, de aspecto húmedo y algunas con hemólisis.
- Agar MacConkey: En algunas placas se aislaron dos tipos de colonias de distintos tonos de rosa, las cuales fueron trabajadas por separado en su confirmación bioquímica de *E. coli*. Las colonias aisladas de bacterias que fermentan lactosa, como *E. coli*, eran rosas, color producido por la acidificación del medio. Su morfología era redonda, de borde definido y presentaban un halo color turbio.

### Identificación bioquímica (Pruebas realizadas)

- Sulfuro Indol Movilidad (SIM): Incubar a 35°C por 24 horas en condiciones de aerobiosis, agregar posteriormente 5 gotas de reactivo de Kovacs.
- Agar Citrado de Simmons: Incubar a 35°C por 24-48 horas en condiciones de aerobiosis. Observar posteriormente.
- Caldo Rojo de Metilo-Voges Proskauer (RMVP): Incubar a 35°C por 48 horas en condiciones de aerobiosis. Dividir el medio para hacer las pruebas por separado. RM agregar de 4-5 gotas de rojo de metilo, agitar hasta homogenizar. VP agregar 12 gotas de  $\alpha$ -naftol 5% en etanol y 4 gotas de KOH al 40%, homogenizar, dejar reposar 10-15 minutos.

Las colonias fueron identificadas como *E. coli*, al presentar resultados de acuerdo a los característicos que presenta *E. coli* de acuerdo a la literatura citada anteriormente.

**SIM:** Se observó movilidad en base a la turbidez en el medio. Las cepas fueron Indol positivas al desarrollar un color rojo al agregar el reactivo de Kovacs, indicando la capacidad de formar indol.

**Citrato de Simmons y Voges Proskauer:** Para todas las cepas las dos pruebas fueron negativas.

**Rojo de metilo:** Fue positivo para todas las cepas. Se produjo una coloración roja en el medio al agregar el indicador rojo de metilo indicando la presencia de productos ácidos provenientes de la fermentación de glucosa.