



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**EXPRESIÓN DE MARCADORES DE VIRULENCIA EN CEPAS
DE *Escherichia coli* UROPATÓGENAS**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LIC. EN BIOLOGÍA

PRESENTA:

LAURA VERÓNICA RAMOS VEGA

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. GLORIA LUZ PANIAGUA CONTRERAS

Proyecto financiado por la UNAM-DGAPA-PAPIIT IN218614.

Noviembre, 2016





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

- A la **Universidad Nacional Autónoma de México** y a la **Facultad de Estudios Superiores Iztacala**. Por brindarme los recursos necesarios, sin restricciones, para lograr una formación académica, ética y moral plena, siendo mi segundo hogar y el recinto donde construí las bases que en el futuro me sostendrán.
- A la **Dra. Gloria Luz Paniagua Contreras**. Por Confiar en mí y darme la oportunidad de desempeñarme en el campo de la biología molecular. Por instruirme correctamente y darme el mejor ejemplo de lo que es ser un buen profesionalista, apasionado por su labor.
- Al **Dr. Eric Monroy Pérez**. Por asesorarme y apoyarme en todo momento. Por tener paciencia y buena disposición para aclarar mis dudas, y de igual forma, por creer en mí y darme las herramientas para desempeñar mi trabajo de la mejor forma posible.
- Finalmente, al comité Asesor: **Dr. Sergio Vaga Pacheco, Biol. Susana Esther González Almazán**, y **M. en C. David Segura Cobos**. Por sus atinadas observaciones y por la disposición que siempre mostraron.

Dedicatoria

- A mi **Familia**, por darme siempre palabras de aliento y apoyo incondicional. Por ayudarme a tomar ciertas decisiones, por la comprensión que necesité en momentos difíciles. Pero sobre todo, gracias por dejarme compartir con ustedes, la alegría de concluir esta etapa de mi vida.
- A **Alfonso, Daniela y Valeria**. Buenos amigos, que hombro a hombro fuimos superando los diferentes obstáculos que se nos presentaron. Les doy las gracias por no dejarme caer, aún en los peores momentos. Dándome motivos para no dejar de sonreír y avanzar. Gracias por su sincera amistad.
- A **Ismael**, gracias por ayudarme a sortear toda clase de problemas y por alentarme a dar siempre lo mejor. Por enseñarme a confiar en mí y a no darme por vencida nunca. Gracias por mostrarme siempre el mejor camino y por tus regaños.

Índice

1. Resumen.....	6
2. Introducción.....	7
2.1. Pared celular de las bacterias Gram negativas.....	7
2.2. Características de <i>Escherichia coli</i>	8
2.3. Grupos patógenos de <i>Escherichia coli</i> intestinales.....	9
2.3.1. <i>E. coli</i> Enteropatógena (EPEC).....	9
2.3.2. <i>E. coli</i> Enterotoxigénica (ETEC).....	9
2.3.3. <i>E. coli</i> Enterohemorrágica (EHEC).....	9
2.3.4. <i>E. coli</i> Enteroinvasiva (EIEC).....	10
2.3.5. <i>E. coli</i> con adherencia difusa (DAEC).....	10
2.3.6. <i>E. coli</i> Enteroagregativa (EAEC).....	10
2.4. Cepas patógenas de <i>Escherichia coli</i> extraintestinales.....	11
2.4.1. <i>E. coli</i> Uropatógena (UPEC).....	11
2.5. Factores de virulencia en UPEC.....	13
2.6. Mecanismos de invasión bacteriana.....	15
2.7. Infección en vías urinarias (IVU).....	16
2.8. PCR en Tiempo Real.....	17
2.8.1. Definición.....	17
2.8.2. Principio del ensayo.....	17
2.9. Análisis de la Melting point.....	18
3. Antecedentes.....	19
4. Justificación.....	20
5. Objetivos.....	21
5.1. General.....	21
5.2. Particulares.....	21
6. Materiales y Métodos.....	22
6.1. Origen de las cepas.....	22
6.2. Crecimiento bacteriano.....	22
6.3. Infección del cultivo de células vaginales humanas A431.....	22
6.4. Extracción y purificación del ARN.....	23
6.5. Reversotranscripción con eliminación del ADN genómico.....	24
6.5.1. Preparación de la Master mix para la reversotranscripción.....	24
6.6. Identificación de <i>Escherichia coli</i> por PCR en Tiempo Real.....	25

6.6.1. Preparación de la mezcla de reacción para PCR en Tiempo Real.....	25
7. Resultados.....	26
7.1. Pacientes estudiados.....	26
7.2. Identificación de <i>E.coli</i> por PCR en Tiempo Real.....	26
7.3. Expresión de los genes de <i>E. coli</i> por PCR en Tiempo Real, utilizando un modelo de infección <i>in vitro</i> de la línea celular A431	27
7.4. Patrones de expresión de los marcadores de virulencia en las cepas uropatógenas de <i>E. coli</i>	35
8. Discusión.....	36
8.1. Expresión de genes de virulencia.....	36
8.1.1. Sistemas de adquisición de hierro.....	36
8.1.2. Adhesinas.....	37
8.1.3. Toxinas.....	37
8.1.4. <i>malX</i> y <i>fliC</i>	38
8.1.5. Patrones de expresión de los genes de virulencia en las cepas de <i>E.</i> <i>coli</i>	38
9. Conclusiones.....	39
10. Apéndices.....	40
10.1. Apéndice 1.....	40
10.1.1. BD EMB Agar (Eosin Methylene Blue Agar), Modified.....	40
10.2. Apéndice 2.....	41
10.2.1. BD BHI Infusion (Brain Heart Infusion).....	41
10.3. Apéndice 3.....	42
10.3.1. Amortiguador de pH TE para bacterias.....	42
11. Bibliografía.....	43

1. Resumen.

Las infecciones de las vías urinarias por cepas de *Escherichia coli* uropatógenas (UPEC) son consideradas un serio problema de salud en nuestro país. Debido a que actualmente no se han determinado los diferentes patrones de expresión de los genes de virulencia en cepas UPEC, el propósito de este trabajo fue establecer los diferentes perfiles de expresión de los marcadores que codifican para adhesinas, toxinas y sistemas de adquisición de hierro en un grupo de cepas de UPEC. Para promover la expresión de los genes se utilizó un modelo *in vitro* de infección en un cultivo de células vaginales de la línea celular A431. La expresión de los genes de virulencia en las cepas UPEC se determinó por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) en tiempo real. Los genes de UPEC expresados con mayor frecuencia fueron *iutA* 91.7% (n= 178), *fimH* 71.9% (n=139) *fyuA* 36% (n=70) y *papC* 33.5% (n=65), mientras que los genes expresados con menor frecuencia fueron *malX* 12.8% (n=25) y *focG* 4.6% (n=9). Se identificaron diferentes patrones de expresión de los genes de adhesión y de sistemas de adquisición de hierro. Los resultados demostraron la participación colectiva de varios de los marcadores de virulencia durante el modelo *in vitro* de infección de la línea celular A431 con las cepas UPEC, lo que podría ocasionar infecciones más agudas, como cistitis o pielonefritis.

2. Introducción.

2.1. Pared celular de las bacterias Gram negativas.

Las bacterias Gram negativas presentan una membrana plasmática formada de fosfolípidos, proteínas y enzimas, cuya función principal es la protección de la presión osmótica y el transporte celular. Se diferencian de las Gram positivas por la pared celular, ya que esta es más compleja. Está formada por una capa de peptidoglicano, el cuál proporciona la rigidez, debajo se encuentra el espacio periplasmático que contiene enzimas hidrolíticas necesarias para metabolizar macromoléculas, junto con los sistemas de transporte de azúcares. Además, dentro de la pared celular existe una membrana externa que impide el paso de grandes moléculas por medio de canales como porinas, proteínas de transporte y lipoproteínas. Finalmente, estas bacterias tienen lipopolisacáridos para reconocimiento, cápsula, que las protege contra la fagocitosis del sistema inmune, flagelos para la movilidad y fimbrias que les facilitan la colonización al tejido del huésped (Mollinedo *et al.*, 2014). La parte más importante de las Gram negativas es el Lipopolisacárido (LPS), que consta básicamente de un lípido A, un núcleo o región central "R" (rugosa) y el antígeno O. Estas moléculas son estimuladoras de las respuestas inmunitarias, causantes de los síntomas de la infección (Lázaro, 2003) (Figura 1).

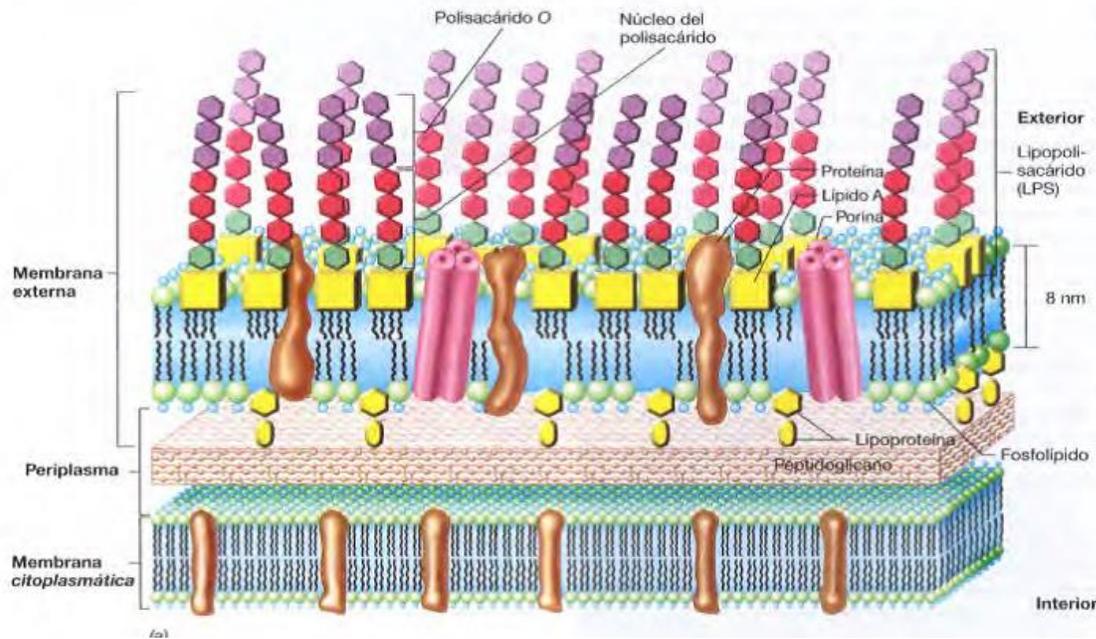


Figura 1. Estructura de la pared celular en Gram negativas. Tomado de Gonzales *et al.*, 2008.

2.2. Características de *Escherichia coli*.

Escherichia coli es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. Se caracteriza por tener flagelos peritricos, ser formadora de fimbrias, pilis y microcápsula, pero no forman esporas (**Figura 2**). Es una bacteria indol y lactosa positiva, así como fermentadoras de manitol. Comparten la información genética por medio de plásmidos que acarrean genes de toxinas y de resistencia a los antimicrobianos. Se sabe que el genoma de *E. coli* contiene un total de 5,000 genes (Rodríguez-Ángeles, 2002).

La morfología colonial de estas bacterias en agar EMB (Eosina Azul de Metileno) se caracteriza por formar colonias de entre 2 a 4 mm de diámetro, con un centro grande oscuro y alrededor un color verde metálico. En agar MacConkey las colonias son rojas con un halo turbio (Astrith *et al.*, 2013).

Esta bacteria coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento y se le considera un microorganismo de flora normal, pero hay cepas que pueden ser patógenas y causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos, entre ellos diarrea (Granizo *et al.*, 2006).

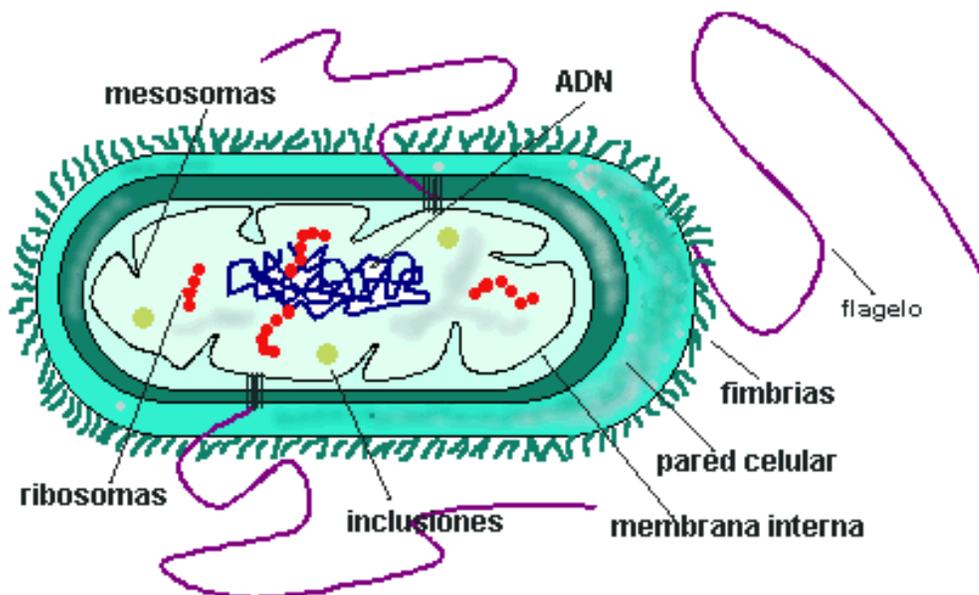


Figura 2. Estructura de *Escherichia coli*. Tomado de Jiménez. 2015.

2.3. Grupos patógenos de *Escherichia coli* intestinales.

Las cepas de *E. coli* que causan infecciones intestinales se han clasificado en 6 diferentes grupos patógenos según los síntomas que se presenten en la infección; *E. coli* enteropatógena (EPEC); *E. coli* enterotoxigénica (ETEC); *E. coli* enterohemorrágica (EHEC); *E. coli* enteroinvasiva (EIEC); *E. coli* con adherencia difusa (DAEC), y *E. coli* enteroagregativa (EAEC) (Margal *et al.*, 1997).

2.3.1. *E. coli* Enteropatógena (EPEC).

Infecta principalmente a niños menores de dos años, provoca diarreas de diversos grados. Induce en el intestino una alteración histopatológica, conocida como lesión A/E (Adherencia y esfacelamiento), que se caracteriza por la lesión de las microvellosidades del enterocito.

La diarrea secretoria causada por EPEC está relacionada con la salida masiva de iones, lo cual parece ser una consecuencia del desarreglo del citoesqueleto, la destrucción de las microvellosidades y la secreción de alguna enterotoxina (Vidal-Graniel, 2003).

2.3.2. *E. coli* Enterotoxigénica (ETEC).

Colonizan la mucosa del intestino delgado por medio de pilis o fimbrias que tienen diversas formas denominadas CFA (colonization factor antigens), siendo su principal mecanismo de patogenicidad, la síntesis de alguna o ambas enterotoxinas llamadas toxina termolábil (LT) y toxina termoestable (ST). Este grupo afecta principalmente a niños menores de dos años, aunque también puede afectar a niños en edad escolar y adultos, siendo asintomática o produciendo la diarrea del viajero.

El cuadro clínico se caracteriza por diarrea aguda, generalmente sin sangre, sin moco, sin pus y en pocos casos se presentan fiebre y vómito, aunque pueden presentarse cuadros más agudos (Rodríguez-Angeles, 2002).

2.3.3. *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC)

Genera el Síndrome Urémico Hemolítico (SUH), que se caracteriza por el daño de las células endoteliales de los pequeños vasos del colon, riñón y sistema nervioso central. Como esos tejidos están alejados de la mucosa colónica donde coloniza EHEC, se postula que el daño endotelial es una consecuencia directa de la acción de la toxina Shiga (Stx) que liberada, traspasa la barrera intestinal y accede a la circulación sanguínea, causando anemia hemolítica microangiopática, plaquetopenia y daño renal. Puede seguir o no a un episodio de diarrea con sangre o sin ella.

Afecta principalmente a lactantes y niños en la primera infancia, pero puede afectar también a ancianos. Las manifestaciones más comunes son: palidez, petequias,

hematomas, oliguria, edema, hipertensión arterial y cambios neurológicos, como letargia o convulsiones (Ibarra *et al.*, 2008).

2.3.4. *E. coli* Enteroinvasiva (EIEC).

Su mecanismo de patogenicidad es la invasividad a la célula, a través de una fagocitosis, lo que afecta el borde de cepillo del enterocito. Ya libre en el citoplasma, se multiplica e invade a las células vecinas.

Además ocasiona la destrucción de las células, junto con la movilización de polimorfonucleares y macrófagos, desencadenando el proceso de inflamación y con esto la aparición de diarrea con moco y sangre (Cortés-Ortiz *et al.*, 2002).

2.3.5. *E. coli* con adherencia difusa (DAEC).

Estudios morfológicos han descrito que las cepas DAEC generan un fenotipo inusual de adherencia celular, observándose la inducción de algunas proyecciones de la membrana celular. Por lo que causa gran controversia su relación con las diarreas.

Se ha observado también, un patrón asociado a estas cepas fue la liberación de interleuquina 8 (IL-8) y su asociación con la motilidad. Lo que puede ser un método sencillo a tomar en cuenta para predecir la capacidad patogénica de DAEC.

Además, se conoce que ocasiona la lesión A/E (Adherencia y Esfacelamiento), causada por las cepas EPEC, provocando daños similares en el citoesqueleto, afectando a niños menores de 5 años (Riveros *et al.*, 2011).

2.3.6. *E. coli* Enteroagregativa (EAEC).

Además de la adherencia localizada, existen otros 2 mecanismos que utilizan estas cepas: Uno difuso, que se produce cuando las bacterias se unen al citoplasma celular, y otro agregativo, que se forma cuando las bacterias se acumulan en forma de empalizada en la superficie celular.

Se conoce la capacidad de las EAEC, para sobrevivir largo tiempo en el intestino humano, ocasionando diarrea crónica, gracias a la producción de una o más toxinas. Aunque, se desconoce si existen diferentes cepas agregativas relacionadas con diarreas persistentes u otras en relación con diarrea con sangre (Riverón, 1999).

2.4. Cepas patógenas de *Escherichia coli* extraintestinales.

2.4.1. *E. coli* Uropatógena (UPEC)

Además de los grupos de *E. coli* ya mencionadas, también se encuentran las cepas extraintestinales, conocidas como UPEC, causantes de hasta el 90% de las infecciones urinarias en mujeres. La patogenicidad se inicia por la adherencia a las mucosas uretrales mediante fimbrias, posteriormente la colonización y la internalización (Marss *et al.*, 2005).

Las cepas de UPEC, pueden causar infecciones urinarias más severas, como cistitis (infección de la vejiga) o pielonefritis (infección renal). UPEC tiene la capacidad de invadir células epiteliales de la vejiga (células de sombrilla), con ayuda del *pili* tipo 1 que se enlaza a residuos de manosa de las uroplaquinas en las células epiteliales de la vejiga, ocasionando que estas las envuelvan. Siendo el evento inicial más importante para que las bacterias se internalicen en el epitelio. Una vez que las células de sombrilla están llenas de bacterias, se activa la apoptosis y el desprendimiento celular por medio de la orina. Sin embargo, un pequeño número de bacterias no causan este efecto y quedan dentro de las células en estado de latencia para infecciones posteriores (Castro, 2014).

En la Tabla 1 se aprecian los diferentes grupos patógenos de *E. coli*

Grupo	Cuadro clínico
Intestinales	
<i>E. coli</i> enteropatógena (EPEC).	Diarrea sanguinolenta o no. Principalmente en lactantes.
<i>E. coli</i> enterotoxigénica (ETEC).	Diarrea aguda no sanguinolenta (Diarrea del viajero).
<i>E. coli</i> enterohemorrágica (EHEC)	Síndrome Urémico Hemolítico (SUH), diarrea sanguinolenta, afecta a lactantes y ancianos principalmente
<i>E. coli</i> enteroinvasiva (EIEC).	Gran capacidad de invasividad, que ocasiona Diarrea Sanguinolenta
<i>E. coli</i> con adherencia difusa (DAEC).	Causan lesión similar a las EPEC, principalmente en niños menores de 5 años
<i>E. coli</i> enteroagregativa (EAEC).	Ocasiona Diarrea crónica, sanguinolenta o no.
Extraintestinales	
<i>E. coli</i> uropatógena (UPEC)	Infecciones urinarias urinarias leves hasta cistitis, pielonefritis y daño renal. Principalmente en mujeres.

Tabla 1. Grupos patógenos de *Escherichia coli*

2.5. Factores de virulencia en UPEC.

Los factores de virulencia se refieren a las propiedades que permiten que un microorganismo se establezca sobre un huésped y aumente su potencial para producir una enfermedad.

Una importante característica reside en el hecho de que distintos subgrupos de cepas UPEC presentan diferentes combinaciones de factores de virulencia que participan en la etiología de las infecciones del aparato urinario, tales como adhesinas específicas, incluyendo las fimbrias P (Pap), tipo 1 y otras fimbrias (F1C, S, M y Dr), además de toxinas como las hemolisinas y el factor citotóxico. (Fareiro, 2010)

Aunque también, los patógenos extraintestinales pueden compartir factores genéticos de virulencia para poder causar este tipo de enfermedades. Lo que genera interés para investigar ciertos genes que se encuentran en gran cantidad en plásmidos de bacterias que infectan estas zonas. (Rodríguez-Siek, *et al.*, 2005)

Se ha encontrado que las cepas UPEC son portadoras de diferentes genes que codifican para adhesinas como por ejemplo: *fimH*, *papC*, *gafD*, *afa*. Protectinas: *kpsMT (K1)*; *kpsMT II*; *kpsMT III*. Toxinas: *cdtB*, *cnf-1*, *hlyD* (Jonhson, *et al.*, 2000) y Sistemas de adquisición de hierro: *iutA*, *fyuA*, *feoB* (Runyen-Janecky, *et al.*, 2003). Entre los genes de adhesión se encuentran los que codifican para fimbrias (*fimA*; *fimH*) (Struve y Krogfelt., 1999).

La expresión de estos genes ayuda a las bacterias a evadir al sistema inmune y facilita el establecimiento, lo cual favorece la severidad de las infecciones y promueve la colonización bacteriana de los tejidos, ocasionando desde una bacteriuria asintomática, hasta cistitis y pielonefritis. (Agarwal, *et al.*, 2013).

Existe una clara relación entre la capacidad de adherencia *in vitro* y la severidad de la infección *in vivo*. La presencia de adhesinas, favorecen la unión a receptores celulares específicos. La adherencia a las células epiteliales facilita la transferencia de toxinas al huésped. Esto junto con los antígenos O, H y K, polisacáridos capsulares, favorecen la resistencia a la fagocitosis; las hemolisinas ayudan a destruir eritrocitos y otras células; la aerobactina, que se localiza cada vez más en los serotipos uropatógenos de la *E. coli*, compite por el hierro libre; las endotoxinas, como el factor citotóxico necrotizante tipo I, la ureasa y las islas de patogenicidad, le confieren a UPEC gran ventaja sobre el hospedero (Rondón *et al.*, 2007). En la Tabla 2 se observan los principales factores de virulencia de UPEC.

Gen	Nombre
Relacionados con la captación de Hierro	
<i>traT</i>	Outer-membrane protein gene; serum resistance
<i>iutA</i>	Ferric aerobactin; iron transport
<i>feoB</i>	ferric iron uptake
<i>ireA</i>	Iron-responsive element
<i>fyuA</i>	Ferrichrome receptor FiuA
Adhesinas	
<i>afa</i>	Afimbrial adhesin I
<i>fimH</i>	Fimbriae
<i>gafD</i>	Fimbriae of diarrhea-associated
<i>papC</i>	Pyelonephritis-associated protein
<i>papA</i>	Pyelonephritis-associated protein
<i>papG</i>	Pyelonephritis-associated protein
<i>sfa</i>	S fimbrial adhesins
<i>focG</i>	F1C minor fimbrial subunit protein G
Protectinas	
<i>kpsMT II</i>	Group II capsule
<i>kpsMT III</i>	Group III capsule
<i>rfc</i>	Replication factor C
Toxinas	
<i>cdtB</i>	Cytolethal distending toxin B
<i>cnf-1</i>	Cytotoxic necrotizing factor 1
<i>hlyD</i>	hemolysin D
Varias funciones	
<i>malX</i>	Maltodextrina
<i>fliC</i>	Flagella
<i>ibeA</i>	Invasion protein

Tabla 2. Genes de virulencia detectados en UPEC

2.6. Mecanismo de la Invasión bacteriana.

La adhesión es el primer paso para el desarrollo de la infección. Los microorganismos patógenos aprovechan las características del tracto urogenital, digestivo y respiratorio así como la conjuntiva ocular (Krogfelt *et al.*, 1991).

Esta primera fase, la bacteria debe resistir el flujo urinario para alcanzar la vejiga o el riñón. La adherencia se realiza gracias a las fimbrias o pilis (Johnson, 1991) (**Figura 3**).

Una vez fija la bacteria al tejido, ocurre el proceso de invasión, que es la capacidad de la bacteria para internalizarse, multiplicarse y dispersarse a células adyacentes (Parson, *et al.*; 1996). Adicionalmente los microorganismos como *E. coli* utilizan un antígeno de invasión codificado en genes plásmidicos (Ipa), que son proteínas de membrana externa, encargadas de la internalización (Brumfitt *et al.*, 1987).

La colonización al huésped, permite que la bacteria invada las superficies mucosas alterando el flujo del calcio en las células epiteliales; liberando toxinas, proteasas y otros exoproductos. Durante este proceso el sistema inmune del huésped rara vez combate la infección. (Herrera, 2004)

En la etapa final, definida como la proliferación bacteriana, es importante que la información genética pase de generación a generación. (Frost *et al.*, 2005).

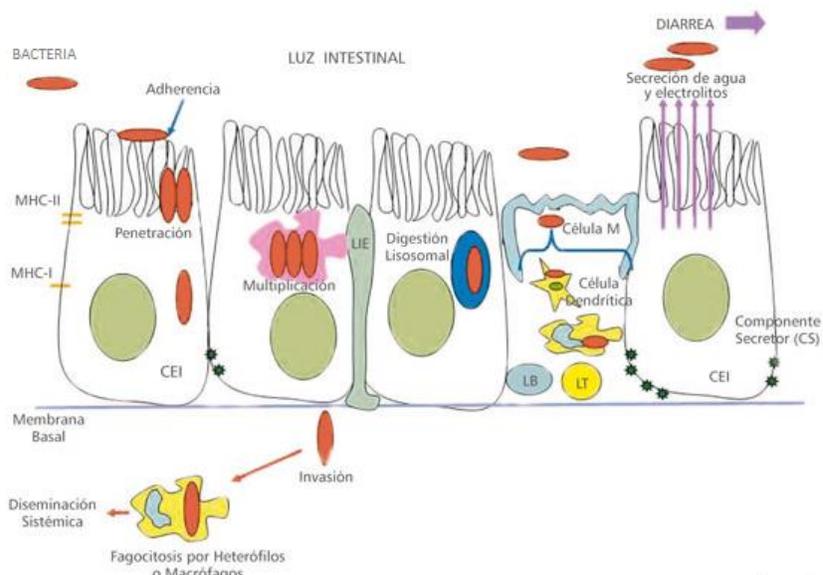


Figura 3. Mecanismo de la Invasión bacteriana. Tomado de Revuelto, 2014.

2.7. Infecciones en vías urinarias (IVU)

Las infecciones de vías urinarias, pueden afectar a niños y adultos de ambos sexos. Sin embargo, se presentan con mayor frecuencia en mujeres por ciertas características de la anatomía femenina, que predisponen a la infección. En primer lugar, la vecindad entre la vagina, uretra y el ano y en segundo lugar, la longitud de la uretra. Otros factores incluyen el incremento de orina residual secundaria a problemas de estática pélvica y la actividad sexual, ya que el coito favorece la colonización de vías urinarias por microorganismos vulvo-perineales. De los cuales, se conoce que el microorganismo que infecta más comúnmente esta zona es *Escherichia coli* (Calderón-Jaimes *et al.*, 2013).

Previamente a un episodio de infección urinaria (IU), se produce una colonización vaginal y periuretral persistente a partir de microorganismos que provienen del colon. Desde estas localizaciones, un pequeño número de bacterias ascienden a la vejiga o hasta la pelvis y al parénquima renal. En circunstancias normales estas bacterias son eliminadas por el flujo y las propiedades antibacterianas de la orina y, en menor medida, por la presencia de IgA secretora. Si dichas bacterias no pueden ser eliminadas, se inicia la colonización (adhesión del microorganismo al uroepitelio y reproducción).

Y posteriormente comienza la infección (implica lesión del epitelio vesical), dependiendo del equilibrio entre la virulencia de la bacteria, el tamaño del inóculo, los mecanismos defensivos locales y la presencia o no de alteraciones anatómicas o funcionales del tracto urinario (**Figura 4**) (Andreu, 2005).

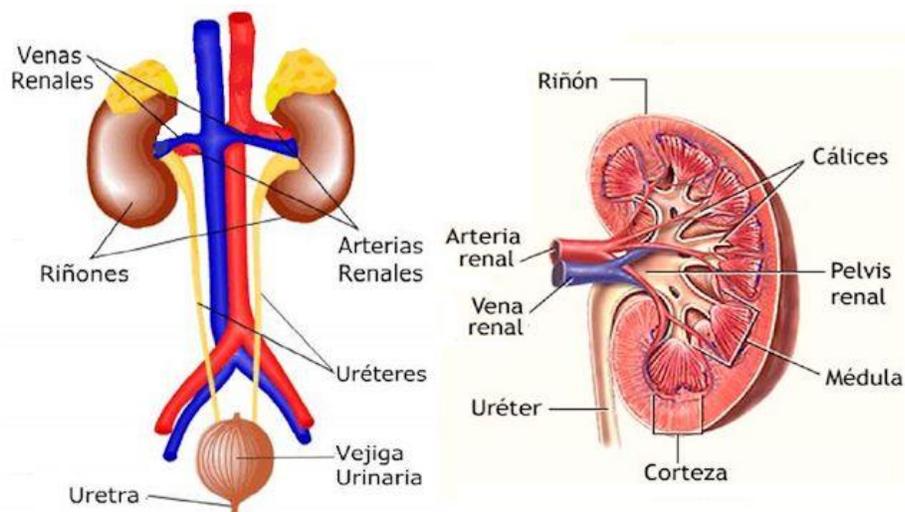


Figura 4. Sistema urinario. Tomado de Ortega, s.a.

2.8. PCR en Tiempo Real

2.8.1. Definición

La Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real, también conocida como Real Time PCR (RT-PCR) muestra la capacidad de monitorear el progreso de la reacción de PCR a medida que esta ocurre. Los datos son colectados a lo largo del proceso de PCR y no al final como se realizaba antes. Este método revolucionó la forma en que se usaba la técnica de PCR para cuantificación de ADN y ARN. El RT-PCR usa moléculas de un reportero fluorescente para monitorear la amplificación de productos durante cada ciclo de reacción. Esta técnica combina los pasos de amplificación de ADN y la detección en un único ensayo y evita tener que preparar geles de electroforesis para detectar los productos amplificados. Un análisis apropiado de los datos y/o de la química también permite eliminar la necesidad de realizar pruebas de Southern Blot o secuenciación de ADN para identificación de los amplicones. Su simplicidad, especificidad y sensibilidad junto con su potencial como técnica en aplicaciones futuras y la evolución hacia nuevos conocimientos de la química, además de la confiabilidad en la instrumentación y protocolos mejorados, han hecho del RT-PCT una tecnología altamente competitiva para la detección de ADN y ARN.

2.8.2. Principio químico del ensayo

El RT-PCR puede utilizar fluoróforos generales de unión no específica a ADN como el Bromuro de Etidio o el SYBR Green I, sondas de hidrólisis (Sondas 5' nucleasa), sondas de hibridización, molecular beacon o sondas de secuencias específicas (Ejemplo; Scorpions®).

En general, los agentes intercalantes usados en la química no específica son fluoróforos que aumentan notablemente la emisión de fluorescencia cuando se unen a ADN de doble cadena (ADNdc). El más utilizado en RT-PCR es el SYBR Green I el cual interacciona con el surco menor del ADNdc, emitiendo 1000 veces más fluorescencia que cuando está libre en solución. El incremento de ADN en cada ciclo se refleja en un aumento proporcional de la fluorescencia emitida. El SYBR Green I absorbe luz en una longitud de onda de 480 nm y la emite a 520 nm. (**Figura 5**) (Valesek y Repa 2005)

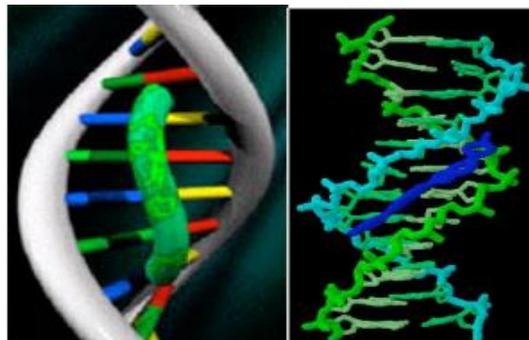


Figura 5. interacción del SYBR Green con el ADN Tomado de Stock, 2006.

2.9. Análisis de la Melting point.

El SYBR Green es un agente que se intercala en los productos específicos, o amplicones, de la PCR, y en los inespecíficos, o dímeros de los primers que se generan en la reacción. Para distinguir unos de otros, es necesario verificar que los amplicones se disocien a temperaturas más elevadas, que los inespecíficos.

Esto se comprueba mediante la curva de fusión (Melting point), a través de una curva, cuya forma se relaciona con el contenido de guanina-citocina (GC), el tamaño de los amplicones y la secuencia de los mismos.

La medida de la fluorescencia dependiente de la temperatura se realiza mientras se va aumentando de 50 a 95°C, donde la fluorescencia es detectada por la presencia de secuencias de doble cadena de ADN o ADNc, siendo separadas por efecto de la alta temperatura, la fluorescencia disminuye porque el colorante deja de estar unido al producto de la PCR (ADN de doble cadena, en el que se intercala el colorante).

La mayoría de los instrumentos, proporcionan un análisis de estos datos teniendo en cuenta el punto en donde aparece el primer diferencial negativo de la señal de la fluorescencia, con respecto a la temperatura y a la temperatura de fusión. Este punto aparece como uno o varios picos que representan las temperaturas a las que los máximos niveles de cambio de la fluorescencia donde se producen, correspondiendo estos a un producto particular en la PCR.

3. Antecedentes.

Sainz *et al.*, en 2008 realizaron la identificación de serotipos y genes de virulencia en 168 cepas de *E. coli*, aisladas de muestras de heces y de orina provenientes de pacientes en un hospital psiquiátrico. El análisis mostró que el 51.25% (n=41) fueron positivas a la presencia de los genes *pic* y *sat* y 35% (n=28) positivas para *pic*, *pap* y *sat*.

Tarchouna *et al.*, en 2013 evaluaron el papel de los factores de virulencia de *E. coli* en la patogénesis de la infección del tracto urinario. Analizaron 90 cepas de UPEC por PCR para detectar la prevalencia de siete genes: Fimbrias tipo 1 (*fimH*), pili asociada con pielonefritis (*pap*), *s* y *f1C*, Fimbrias (*sfa* y *foc*), Adhesinas (*afa*), cytotoxina necrotizante (*cnf*), hemolisinas (*hly*) y aerobactinas (*aer*). La prevalencia para *fimH* fue del 68 %, del 41% para *pap* y del 34% para *sfa/foc*. Los operones que codifican para las adhesinas fimbriales *afa* se identificaron en el 20 % de las cepas. *hly* y los genes que codifican para las toxinas *cnf* se amplificaron en el 19% y 3% de las cepas, respectivamente. La prevalencia para el gen *aer* fue del 52 %.

Millán *et al.*, en 2014 observaron la distribución de los grupos filogenéticos y factores de virulencia en un grupo de cepas de *Escherichia coli* uropatógenas (n=28) aisladas de pacientes de la comunidad en Mérida, Venezuela. Estos autores detectaron los genes de virulencia *fimH*, *fyuA*, *kpsMTII*, *usp*, PAI y *papAH* por medio de PCR. También encontraron que el patrón de genes de virulencia más frecuente se encontró conformado por la asociación de *fimH*, *fyuA* y *kpsMTII* y en menor frecuencia, *usp*, PAI y/o *papAH*. Estos resultados indicaron que la mayoría de las cepas UPEC presentaron genes de adhesión, captación de hierro y evasión de la fagocitosis, favorecieron las ITUs recurrentes.

Firoozeh *et al.*, en 2014 detectaron los genes de virulencia presentes en 150 cepas de *E. coli* aisladas de pacientes hospitalizados por pielonefritis y cistitis en Kashan. Por medio de PCR se estableció la presencia de los genes de virulencia: *hly*, *aer*, *sfa*, *cnf*, *afa*, *trat* y la isla de patogenicidad (PAI). Encontraron que el 86.7% de las cepas fueron portadores de estos genes, y hallaron diecinueve patrones de virulencia diferentes, de los cuales el más frecuente fue *trat*-PAI. Los genes *pap*, *trat*, *aer*, *hly* y PAI prevalecieron más en pacientes con pielonefritis y los genes *sfa*, *afa* y *cnf* no se detectaron en ninguna de las cepas.

4. Justificación.

Debido a que actualmente no se han determinado los diferentes patrones de expresión de los genes de virulencia en cepas UPEC, el propósito de este trabajo será establecer los diferentes perfiles de expresión de los marcadores que codifican para adhesinas, toxinas y sistemas de adquisición de hierro en un grupo de cepas de UPEC, utilizando un modelo *in vitro* de infección en células epiteliales vaginales humanas.

5. Objetivos.

5.1. General.

Implementar un modelo *In vitro* de infección en cultivo de células epiteliales vaginales humanas (A431), para la expresión de marcadores de virulencia en cepas de *Escherichia coli* uropatógenas.

5.2. Particulares.

- Determinar por PCR de Tiempo Real la expresión de los genes de adhesión (*papC*, *fimH*, *gafD*, *focG*), de sistemas de adquisición de hierro (*fyu* y *iutA*) y toxinas (*cdtB*) en un grupo de cepas de UPEC.
- Establecer los diferentes patrones de expresión de los genotipos de virulencia en las cepas uropatógenas de *E. coli*.

6. Materiales y métodos.

6.1. Origen de las cepas.

En este estudio se analizaron 194 cepas de *E. coli* aisladas de pacientes diagnosticados con infección de vías urinarias provenientes de la Clínica Oficial No. 64 del IMSS Unidad Tequesquihuac y del Hospital General regional No. 72 del IMSS Unidad Tlalnepantla.

6.2. Crecimiento bacteriano

Se crecieron las 194 cepas en agar Eosina Azul de Metileno (EMB, Bloxon) a 37°C durante 24h. Posteriormente se tomó una colonia de cada cepa de *Escherichia coli* y sembró al medio líquido BHI (Infusión cerebro-corazón, Bioxon), nuevamente se incubaron a 37°C durante 24h.

Se determinó el uso del agar Eosina Azul de Metileno (EMB), porque este es un medio selectivo utilizado para el aislamiento de bacilos Gram negativos de rápido desarrollo y escasas exigencias nutricionales. El cual, permite el desarrollo de todas las especies de la familia *Enterobacteriaceae*. La preparación se describe en el **Apéndice 1**.

En el caso del caldo nutritivo BHI, es un medio de uso general adecuado para el cultivo de una amplia variedad de tipos de organismos, incluidos las bacterias, levaduras y hongos filamentosos, a partir de muestras clínicas, promocionando la proliferación de los mismos. El método de preparación, así como los ingredientes son descritos en el **Apéndice 2**.

6.3. Infección del cultivo de células vaginales humanas A431

Cada una de las cepas de *E. coli* fueron crecidas en el medio de BHI y se incubaron a 37°C por 24h. Al término se realizó una dilución 1:100 en PBS (Sodium Phosphate Buffer) para obtener una concentración de 1×10^9 células por mL. Los cultivos fueron centrifugados a 10,000 rpm por 5 minutos y las pastillas obtenidas fueron lavadas con PBS (Sodium Phosphate Buffer) (Green *et al.*, 2004). Finalmente la pastilla se resuspendió en 1mL del Medio de Cultivo Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) rico en glucosa y 50 microlitros fueron depositados sobre la superficie de la monocapa de la línea celular epitelial vaginal humana A431, adquirida del Laboratorio Skin Ethic (Francia). La placa que contenía los pozos con las monocapas de células epiteliales fue incubada a 37°C durante 72 h en 5% de CO₂ con humedad saturada.

6.4. Extracción y purificación del ARN.

Para la extracción del RNA bacteriano las cepas de *E. coli* fueron recolectadas de la superficie de la monocapa de las células epiteliales vaginales humanas (A431) y depositadas en tubos Eppendorf con 500 μ L de PBS. A partir de este volumen, se prepararon diluciones en el mismo buffer, hasta obtener una concentración de 1×10^9 células/ml, que correspondió a una $DO_{600nm}=0.4$.

Posteriormente los tubos se centrifugaron a 1000 g durante 5 minutos, los sobrenadantes fueron decantados y las pastillas celulares fueron utilizadas para la extracción del RNA. El RNA de las bacterias fue extraído utilizando el kit RNeasy® (Quiagen®; N. de catálogo 74106) y con ayuda del equipo automatizado QIAcube (QIAGEN®). Para lo cual, los tubos eppendorf, con las pastillas bacterianas, fueron colocados en la placa de agitación del Quiacube. Al mismo tiempo en la posición "A" de la sección correspondiente al bufer de lisis, se colocó un tubo Eppendorf con 2 mL de buffer TE con 1 mg/mL de lisozima (Sigma Catálogo L7651; ver preparación en el **Apéndice 3**).

Posteriormente, en la sección de reactivos se colocaron las botellas con 25 mL de bufer RPE, RW1, RLT, Etanol (100%) y agua libre de nucleasas (ver preparación en el **Apéndice 3**). Es importante mencionar que el buffer RLT utilizado en esta etapa contenía 10 μ L de β -mercaptoethanol (β -ME), por cada mililitro de buffer.

Se llenó el contenedor con puntas de 1 mL, y se depositaron los tubos de columna con los tubos de elución en el carrusel, se programó el equipo para la extracción de RNA con lisis celular y se inició la corrida.

El primer paso que realizó el robot fue tomar 200 μ L del buffer de lisis para depositarlo en los tubos con la pastilla de *E. coli*, lo incubó 20 minutos a 30°C en agitación suave. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 300 g (375 rpm) durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante. El equipo adicionó 350 μ L de buffer RLT al tubo y lo agitó vigorosamente. Al término el equipo adicionó 350 μ L de etanol al 70% para homogeneizar el lisado, lo mezcló suavemente, transfirió 700 μ L a una columna colocada dentro de un tubo de 2 mL, centrifugó a ≥ 8000 g ($\geq 10,000$ rpm) por 15 segundos y el líquido de flujo fue descartado.

Posteriormente, el equipo adicionó 700 μ L de buffer RW1 a la columna, centrifugó a ≥ 8000 g ($\geq 10,000$ rpm) por 15 segundos para lavar la membrana y el líquido de flujo lo descartó. Al término el equipo agregó 500 μ L de buffer RPE a la columna, centrifugó ≥ 8000 g ($\geq 10,000$ rpm) por 15 segundos para lavar la membrana y el líquido de flujo lo descartó. Nuevamente se adicionó 500 μ L de buffer RPE a la columna, centrifugó ≥ 8000 g ($\geq 10,000$ rpm) por 2 minutos para lavar la membrana y el líquido de flujo lo descartó. Al término colocó la columna en un tubo colector nuevo de 2 ml, centrifugó a máxima velocidad por 1 minuto. De nueva cuenta colocó la columna en un tubo colector nuevo de 1.5 mL, adicionó 50 μ L de agua libre de RNasas directamente sobre la membrana de la columna y centrifugó ≥ 8000 g ($\geq 10,000$ rpm) por 1 minuto para obtener el ARN. La

concentración y pureza total del ARN fue medida utilizando un espectrofotómetro Nanodrop 2000. El ARN esperado osciló en < 30 µg. El ARN es muy inestable, por lo que inmediatamente se realizó la reversotranscripción a ADNc.

6.5. Reversotranscripción con eliminación del DNA genómico

Se descongelaron los componentes del Kit a temperatura ambiente (15-25°C). Para un volumen final de 14 µL por mezcla de reacción se adicionaron en un tubo eppendorf de 0.2 mL. los siguientes componentes (**Tabla 3**).

Componente/ Reactivo	Volumen
gDna Wipeout buffer, 7X	2µL
ARN templado	5µL
Agua libre de RNasa	7µL

Tabla 3. Preparación de la mezcla de reacción para eliminación de DNA

Posteriormente se incubaron los tubos a 42° C por 2 minutos, e inmediatamente se colocaron en hielo.

6.5.1. Preparación de la Master mix para la reversotranscripción.

Una vez eliminado el ADN genómico se realizó la reversotranscripción de ARN a ADNc con la utilización del Kit Quantitec Reverse Transcription (Qiagen; No. de catálogo 205311), siguiendo las instrucciones del fabricante.

La Master mix contenía todos los componentes necesarios para la síntesis de la primera cadena de ADNc. Para un volumen final por mezcla de reacción de 20 microlitros, se depositaron en un tubo eppendorf de 0.2 mL cada uno de los siguientes componentes (**Tabla 4**):

Componentes/ Reactivos	Volumen
Master mix para reversotranscripción Quantiscript Reverse Transcriptasa (Contiene inhibidor de RNasa)	1µL
Quantiscript Rt buffer, 5X (Incluye Mg ²⁺ y Dntps)	4µL
Rt Primer Mix	1 µL
ARN Templado	14 µL

Tabla 4. Preparación de la *Master mix* para la Reverso transcripción.

6.6. Identificación de *Escherichia coli* por PCR en Tiempo Real

La identificación de la especie *E. coli* se realizó por PCR en tiempo real mediante la detección del marcador cromosómico 16SrRNA (Lane *et al.*, 1985). Los oligonucleótidos que se utilizaron fueron wl-3110 (AGAGTTTGATCGTGGCTACG) y wl-3111 (CCGTCAATTCATTTGAGTTT) integrated DNA Technologies TM.

6.6.1. Preparación de la mezcla de reacción para PCR en tiempo real

Para el ensayo de PCR en Tiempo Real se utilizó el kit Rotor Gene SYBR Green PCR (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. El volumen final de la mezcla de reacción fue de 25 microlitros. En la **Tabla 5**, se muestran las cantidades utilizadas.

Componente	Volumen/reacción	Concentración final
<i>Master mix SYBR Green I</i> (contiene DNTP, Taq AND polimerasa, MgCl ₂ y el SYBR Green I)	12.5 µL	1x
Primer <i>forward</i>	1 µL	1µM
Primer <i>reverse</i>	1 µL	1µM
AND molde	2 µL	≤100ng
Agua libre de RNasa	8.5 µL	

Tabla 5. Preparación de la mezcla de reacción para la PCR en tiempo real.

Las condiciones de amplificación se muestran en la **Tabla 6**. La cepa de *E. coli* ATCC 11775 fue utilizada como control positivo.

Pasos	Tiempo	Temperatura	N.º ciclos	Comentarios
Activación inicial de PCR	5 min	95°C	1	Se activa la HotStart Taq Plus ADN polimerasa
Desnaturalización	5s	95°C	40	Detección de Fluorescencia y colección de datos.
Combinación alineación/extensión	10s	60°C		

Tabla 6. Condiciones de ciclaje para la expresión de genes de virulencia en *E. coli*

7. Resultados.

7.1. Pacientes estudiados

En este estudio se analizó un total de 194 cepas de *E. coli* previamente aisladas de pacientes con infecciones urinarias, de la clínica oficial No. 64 del IMSS, unidad Tequesquihuac y del Hospital general Regional No. 72 del IMSS, Tlalnepantla, Edo. de México. El 80.9% (n= 157) de los pacientes correspondió al sexo femenino y el 19.1% (n= 37) al masculino. El 56% (n= 86) de los pacientes se encontró en el rango de edad de 41 a 60 años, 20% (n=40) de 61 a 86 años, 16% (n=24) de 21 a 40 años y 2% (n= 4) de 1 a 20 años. En el 20% (n= 40) de los pacientes no se logró determinar la edad.

El diagnóstico más frecuente entre los pacientes fue la infección en vías urinarias bajas (UTIs) con 95.3% (n= 185), pielonefritis, urosepsis e infección vaginal 1% (n= 2) respectivamente, lupus eritematoso, cervicovaginitis y litiasis renal 0.5% (n= 1) para cada caso.

7.2. Identificación de *E. coli* por PCR en Tiempo Real

El 100% (n=194) de las cepas analizadas fue identificada como *E. coli* debido a la amplificación del gen 16 SrRNA mediante PCR en Tiempo Real (Figuras 6 y 7)

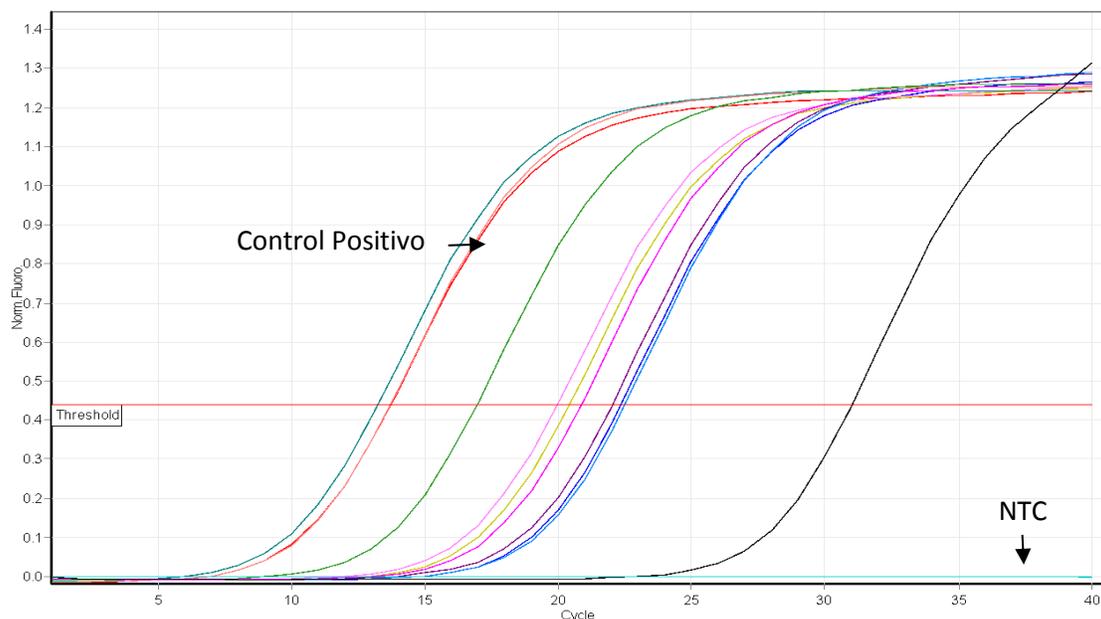


Figura 6. Detección del gen 16 SrRNA de *Escherichia coli*. La lectura se realizó en el canal verde, utilizando SYBR® Green. Control positivo =*E. coli* ATCC 25922, Control negativo = NTC (No Control Templado).

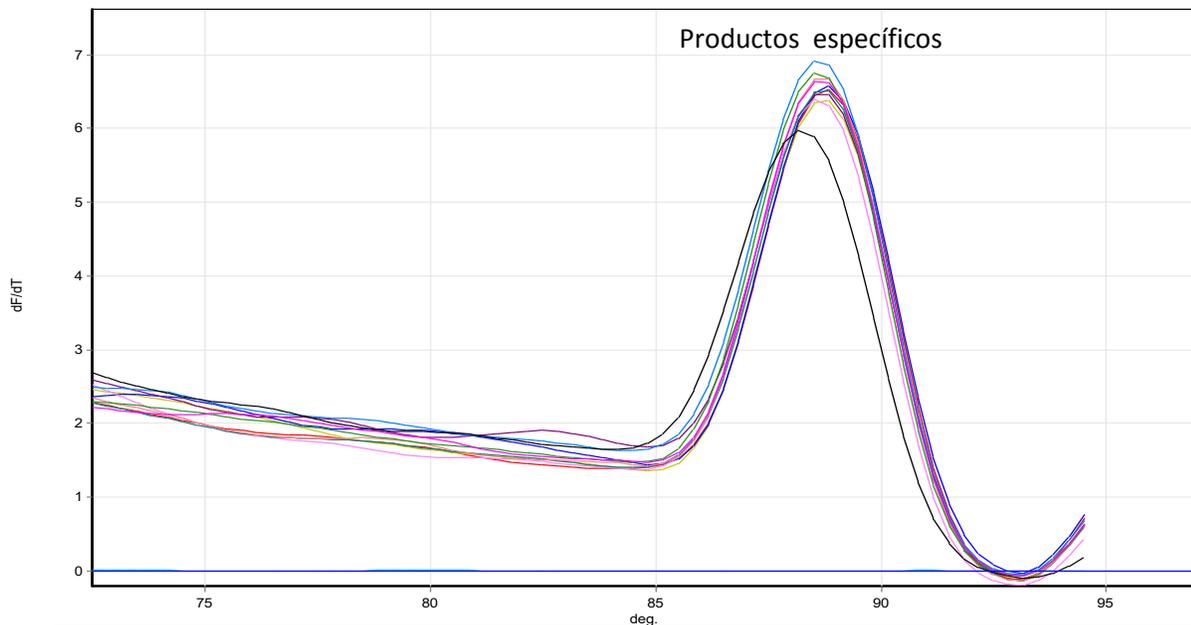


Figura 7. Curva de fusión (Melting point) del gen 16SrRNA de las cepas de *Escherichia coli*. Los productos específicos muestran una temperatura de disociación más elevada que los productos inespecíficos.

7.3. Expresión de los genes de *E. coli* por PCR en Tiempo Real, utilizando un modelo de infección *In vitro* de la línea celular HVE A431.

Durante la infección *In vitro* del cultivo celular A431 con las cepas de *E. coli* (n=194), el gen que se expresó con más frecuencia fue *iutA* con el 91.7% (n=178) de las cepas (Tabla 7, Figuras 8 y 9), seguido por *fimH* (Figuras 10 y 11) con el 71.9% (n=139), *fyuA* (Figuras 12 y 13) con 36% (n=70) y *papC* (Figuras 14 y 15) con el 33.5% (n=65), mientras que los genes expresados con menor frecuencia fueron *malX* (Figuras 16 y 17) y *focG* (Figuras 18 y 19) con el 12.8% (n=25) y 4.6% (n=9), respectivamente.

Gen	No. de epas (n=194)	%
<i>iutA</i>	178	91.7%
<i>fimH</i>	139	71.9%
<i>fyuA</i>	70	36.0%
<i>papC</i>	65	33.5%
<i>malX</i>	25	12.8%
<i>focG</i>	9	4.6%
<i>gafD</i>	0	0%
<i>fliC</i>	0	0%
<i>cdtB</i>	0	0%

Tabla 7. Porcentajes de los genes de virulencia en las cepas de *E. coli* analizadas por PCR de Tiempo Real.

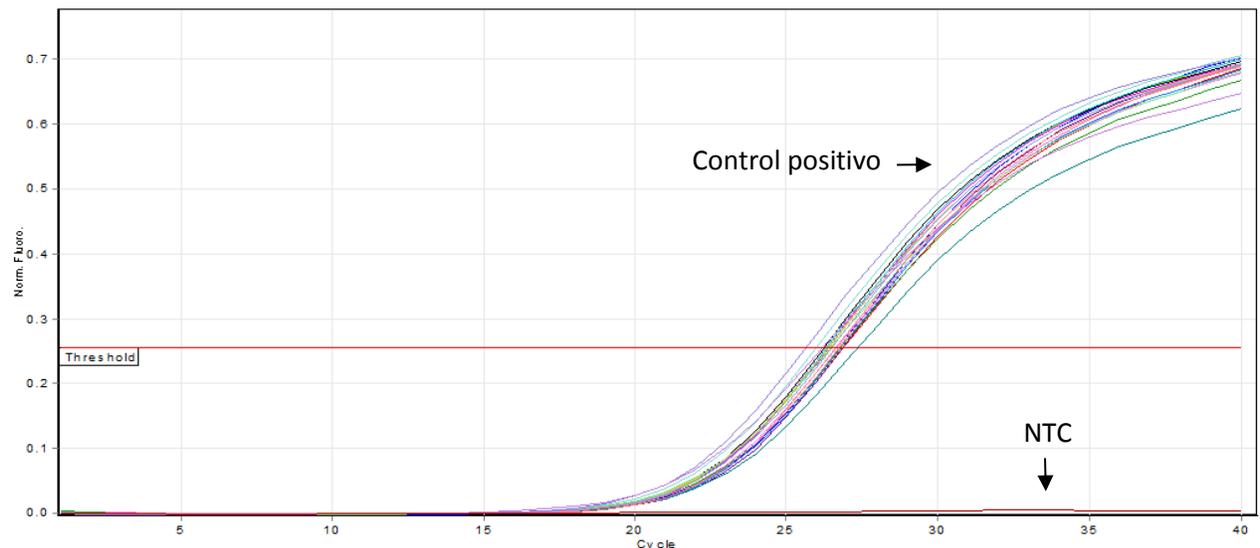


Figura 8. Expresión del gen *iutA* en cepas de *E. coli* Uropatógenas (UPEC). Control positivo = *E. coli* ATCC 25922, Control negativo = NTC (No Control Templado).

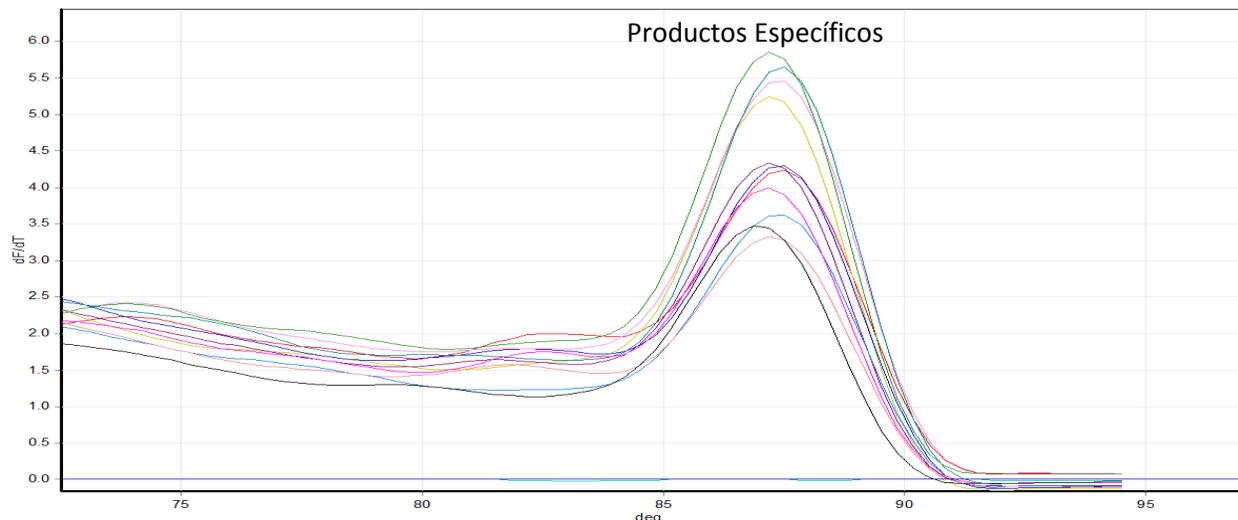


Figura 9. Curva de fusión (Melting point), del gen *iutA*. Los productos específicos muestran una temperatura de disociación más elevada que los productos inespecíficos.

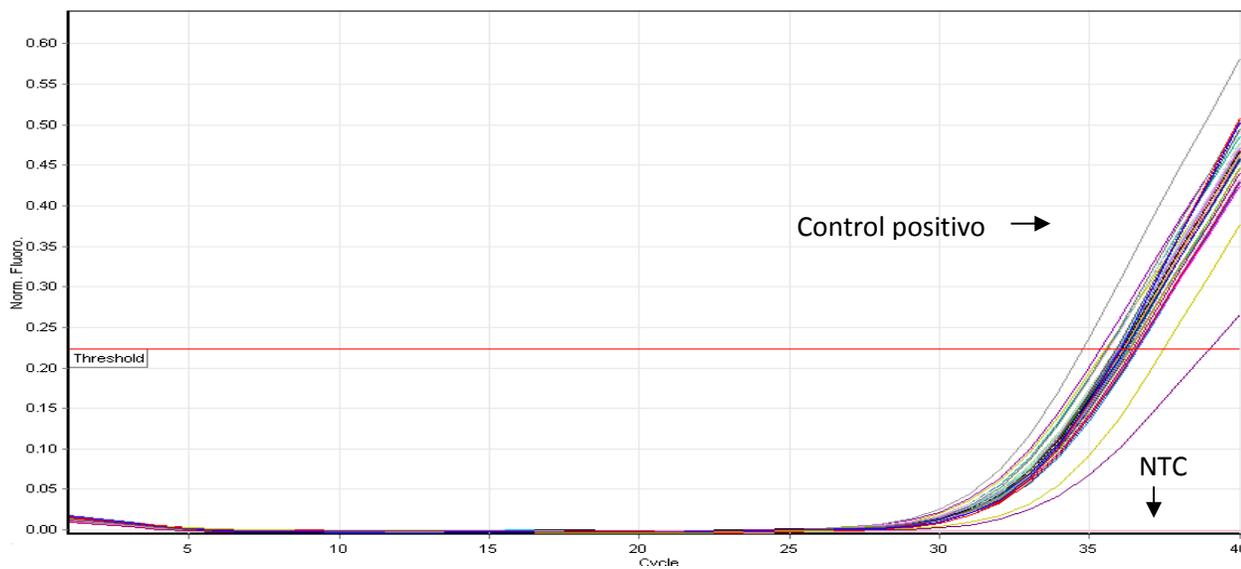


Figura 10. Expresión del gen *fimH* en cepas de *E. coli* Uropatógenas (UPEC). Control positivo = *E. coli* ATCC 25922, Control negativo = NTC (No Control Templado).

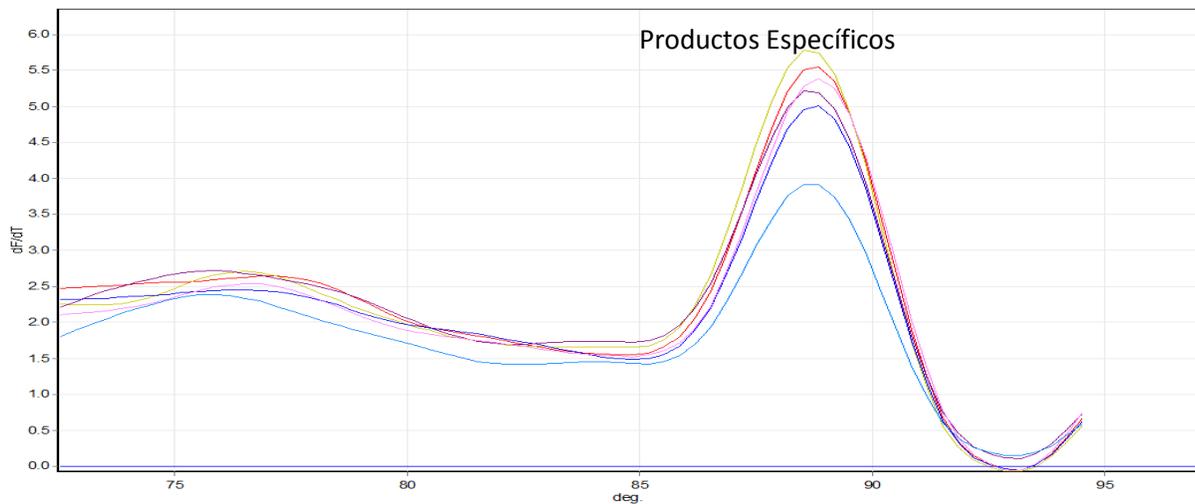


Figura 11. Curva de fusión (Melting point), del gen *fimH*. Los productos específicos muestran una temperatura de disociación más elevada que los productos inespecíficos.

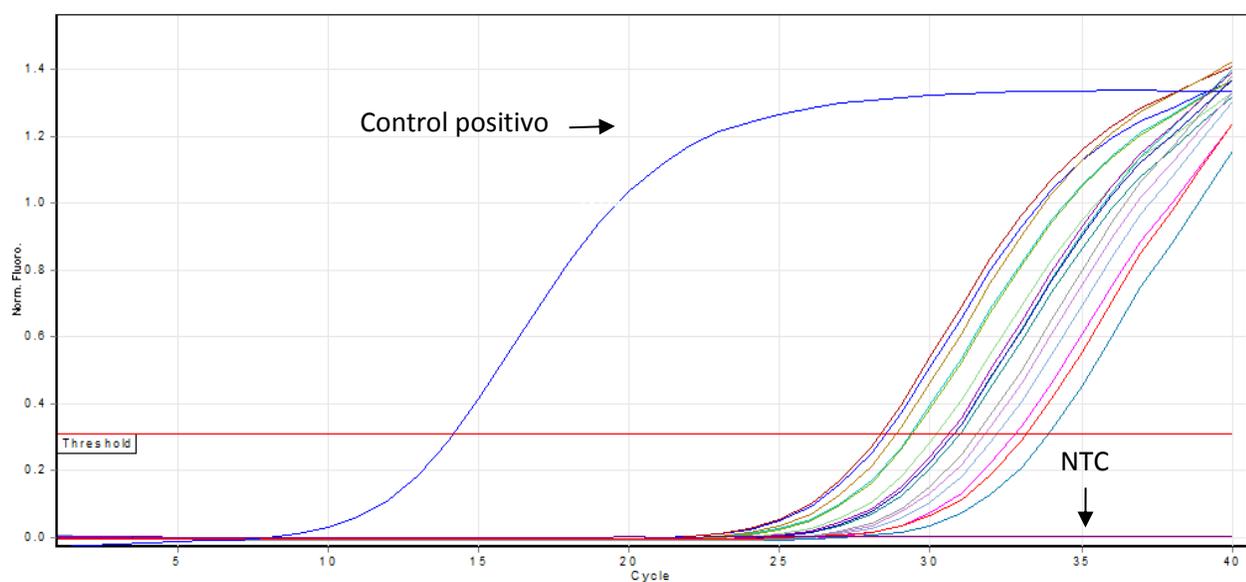


Figura 12. Expresión del gen *fuyA* en cepas de *E. coli* Uropatógenas (UPEC). Control positivo = *E. coli* ATCC 25922, Control negativo = NTC (No Control Templado).

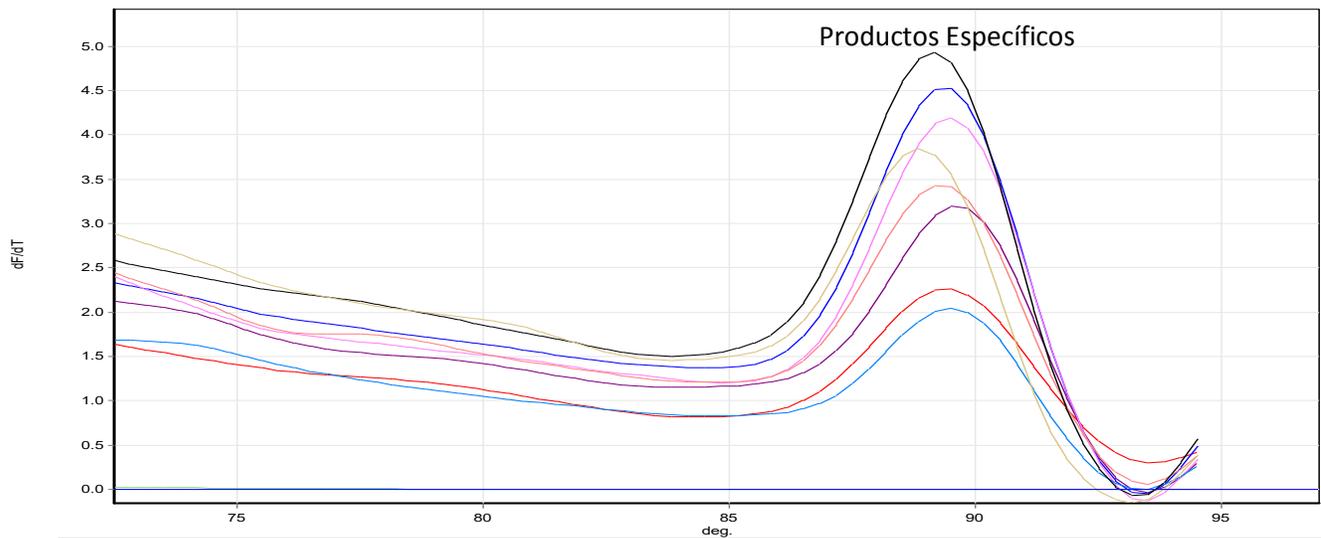


Figura 13. Curva de fusión (Melting point), del gen *fyuA*. Los productos específicos muestran una temperatura de disociación más elevada que los productos inespecíficos.

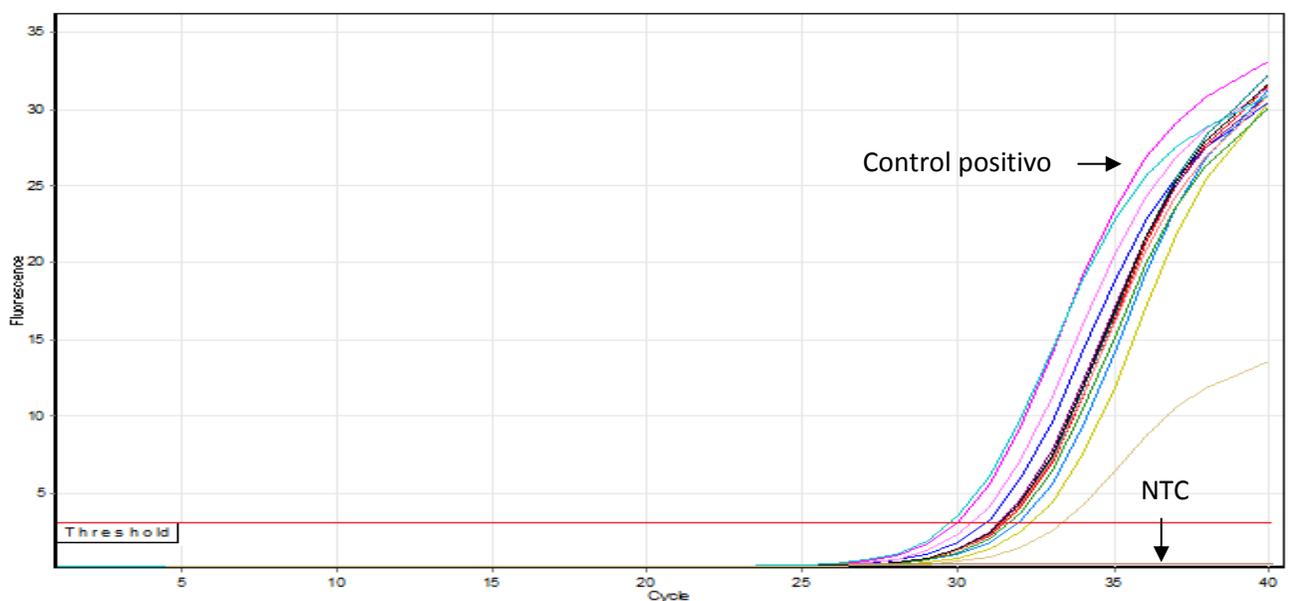


Figura 14. Expresión del gen *papC* en cepas de *E. coli* Uropatógenas (UPEC). Control positivo = *E. coli* ATCC 25922, Control negativo = NTC (No Control Templado).

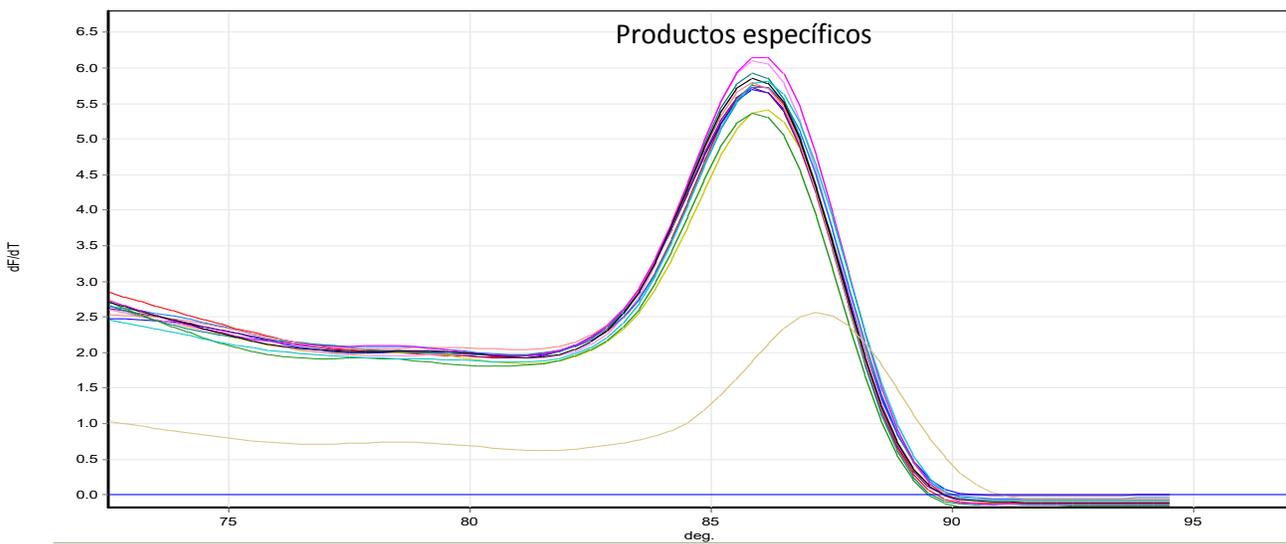


Figura 15. Curva de fusión (Melting point) del gen *papC*. Los productos específicos muestran una temperatura de disociación más elevada que los productos inespecíficos.

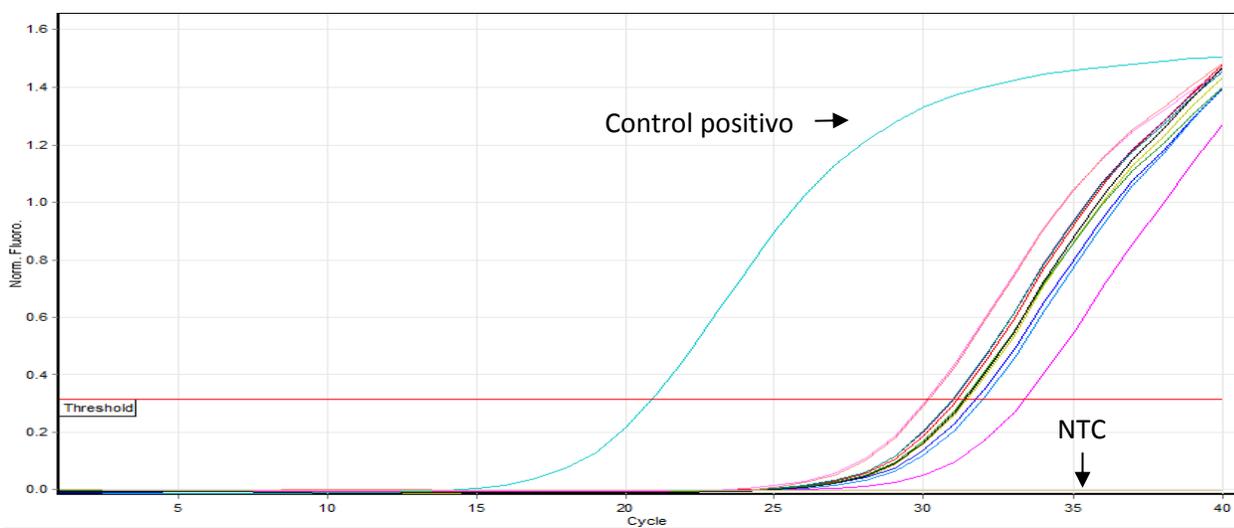


Figura 16. Expresión del gen *malX* en cepas de *E. coli* Uropatógenas (UPEC). Control positivo = *E. coli* ATCC 25922, Control negativo = NTC (No Control Templado).

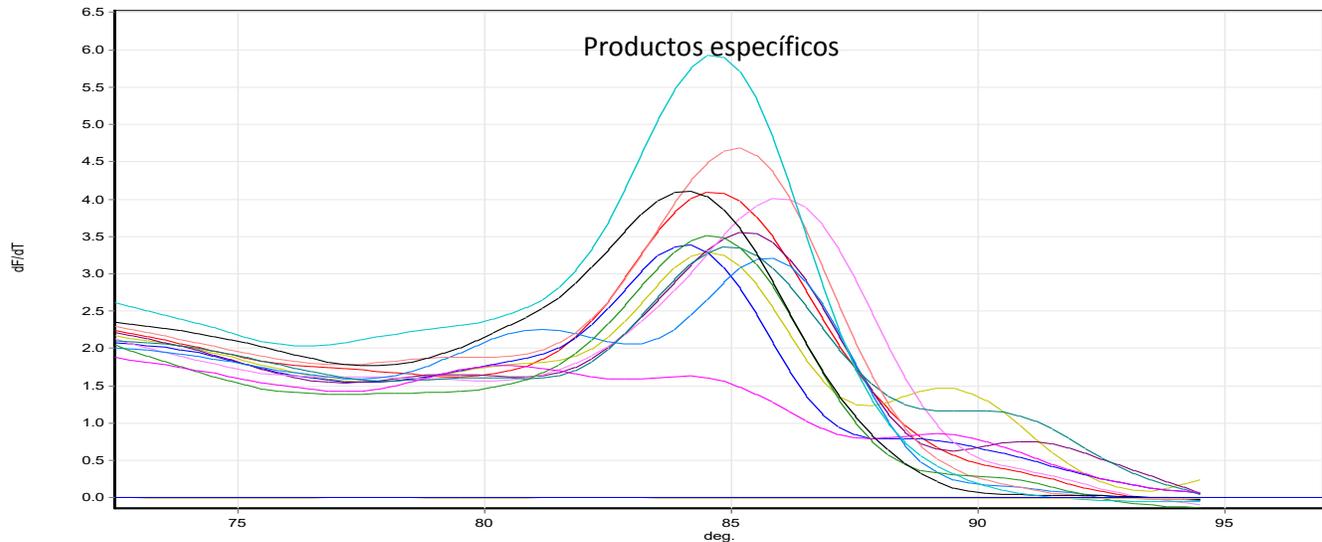


Figura 17. Curva de fusión (Melting point), del gen *malX*. Los productos específicos muestran una temperatura de disociación más elevada que los productos inespecíficos.

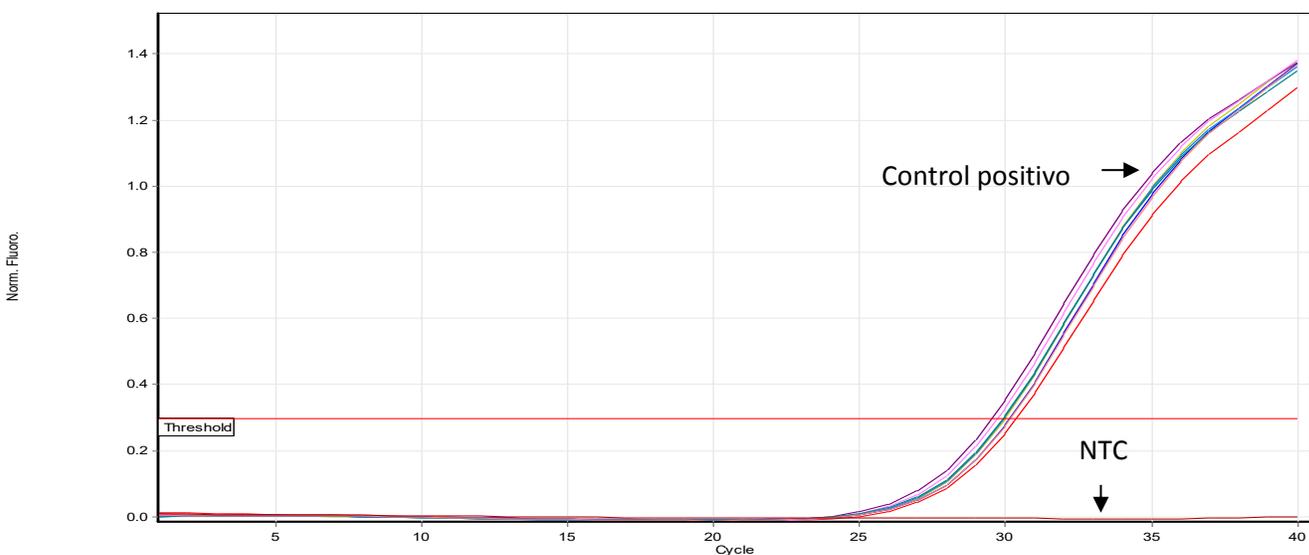


Figura 18. Expresión del gen *focG* en cepas de *E. coli* Uropatógenas (UPEC). Control positivo = *E. coli* ATCC 25922, Control negativo = NTC (No Control Templado).

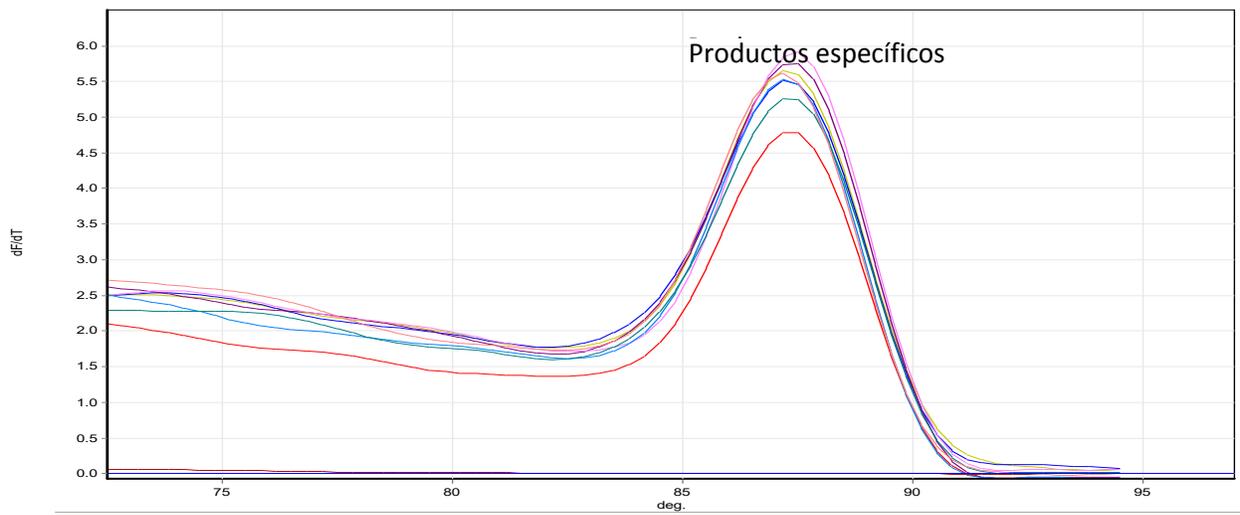


Figura 19. Curva de fusión (Melting point), del gen *focG*. Los productos específicos muestran una temperatura de disociación más elevada que los productos inespecíficos.

7.4. Patrones de expresión de los marcadores de virulencia en las cepas uropatógenas de *E. coli*.

Se identificaron nueve patrones diferentes de asociación de los genes de virulencia en las cepas UPEC (**Tabla 8**), dentro de los cuales, el más frecuente fue *iutA-fimH* (41.7%), seguido de *iutA-fyuA-fimH* (24.7%). Los patrones menos frecuentes fueron *iutA-focG*; *fyuA-focG* y *fimH-papC* con el 0.5%, en cada caso. El 16.4% (n=32) de las cepas no presentó patrones de asociación de los marcadores de virulencia.

No. De patrón	Patrón	Cepas/194	%
1	<i>iutA-fimH</i>	81	41.7%
2	<i>iutA-fyuA-fimH</i>	48	24.7%
3	<i>iutA-papC</i>	12	6.1%
4	<i>fyuA-iutA</i>	9	4.6%
5	<i>iutA-malX</i>	6	3.0%
6	<i>fyuA-fimH</i>	3	1.5%
7	<i>iutA-focG</i>	1	0.5%
8	<i>fyuA-focG</i>	1	0.5%
9	<i>fimH-papC</i>	1	0.5%

Tabla 8. Patrones de expresión de los marcadores de virulencia en las cepas UPEC.

8. Discusión.

8.1. Expresión de genes de virulencia.

8.1.1. Sistemas de adquisición de hierro.

El hierro es un elemento esencial como cofactor de enzimas que catalizan reacciones de óxido-reducción y de enzimas implicadas en la respiración y en la biosíntesis de macromoléculas como el ADN, por lo que las bacterias patógenas han desarrollado diferentes sistemas para la captación de hierro durante los procesos infecciosos (Drago-Serrano, 2009). En este estudio se encontró que durante la infección *in vitro* del cultivo celular A431 con las cepas de *E. coli* (n=194), el gen para adquisición de hierro que se expresó con más frecuencia fue *iutA* con el 91.7% (n=178) de las cepas (**Tabla 7, Figuras 8 y 9**), seguido por *fyuA* (**Figuras 12 y 13**) con el 36% (n=70). La expresión de los marcadores de virulencia, incluyendo los de hierro, no han sido estudiado de manera global en modelos *in vivo* o *in vitro*, sin embargo, se han realizado estudios sobre la frecuencia de estos genotipos en otras partes del mundo, en donde *iutA* y *fyuA* han sido detectados en el 83% (n=187) y en el 82% (n=186), respectivamente, en cepas UPEC aisladas de pacientes con UTIs de la provincia de Jiangsu, China (Zhao et al., 2009). Mientras que en otro estudio realizado en cepas UPEC aisladas de UTIs en infantes, los porcentajes de detección para *iutA* y *fyuA* fueron del 53.1% (n=34) y en el 45.3% (n=29) (Yun et al., 2014)

Los datos de expresión de *iutA* y *fyuA* en las cepas de *E. coli* encontrados en este estudio (Tabla 7) demuestran la participación conjunta de estos genotipos no solamente para la patogénesis de la línea celular A431, sino probablemente también para la formación de la biopelícula, como lo describe Argawal et al., (2013) en su estudio realizado sobre los genes asociados a la biopelícula en cepas UPEC aisladas de mujeres con cistitis aguda, en donde, la frecuencia de *iutA* y *fyuA* fueron del 47.7 % (n=82) y del 36.1% (n=62), respectivamente.

8.1.2. Adhesinas

La adherencia de *E. coli* a las células uroepiteliales del hospedero es considerada el primer paso para la colonización y el desarrollo de las infecciones de las vías urinarias bajas, o de infecciones más agudas como cistitis y/o pielonefritis (Bower *et al.*, 2005). Durante el modelo *in vitro* de infección del cultivo celular A431 con las cepas UPEC, se demostró que los genes de adhesión expresados más frecuentemente entre las cepas fueron *fimH* con el 71.9% (n=139) (**Tabla 7; Figuras 10 y 11**) y *papC* con el 33.5% (n=65) (**Tabla 7; Figuras 14 y 15**). El porcentaje de expresión de *fim* en las cepas UPEC coincide con lo reportado por Snyder *et al.*, (2004), quienes demostraron que la expresión de éste gen fue regulado durante un modelo de UTIs en ratón con cepas UPEC. Se ha descrito que el pili Tipo 1 codificado por el operón *fim* es responsable de la adherencia bacteriana y la invasión a las células epiteliales de la vejiga (Martínez *et al.*, 2000). La expresión global de los genes de adhesión de UPEC han sido poco estudiados, sin embargo, se han descrito porcentajes de detección para *fimH* y para *papC* del 86.1% y del 62%, respectivamente, en cepas de *E. coli* provenientes de mujeres con UTIs (López-Banda *et al.*, 2014), del 98% (n=26) para *fimH* en cepas UPEC (Millán *et al.*, 2014) y del 34.9% (n= 51) para *papC* en cepas patógenas cérvico-vaginales (Lobos *et al.*, 2013).

En éste estudio el gen de adhesión *focG* fue identificado en el 4.6% (n= 9) de las cepas UPEC (**Tabla 7 y figuras 18 y 19**), mientras que *gafD* no fue detectado en ninguna de las cepas (Tabla 7). Estos porcentajes son semejantes a los descritos en un estudio realizado en 200 cepas UPEC aisladas de UTIs en humanos, y en otras cepas de colibacilosis aviaria, en donde *focG* fue identificado en el 12% (n= 25) de las cepas UPEC, mientras que *gafD* no fue identificada en ninguna de las cepas (Kylie *et al.*, 2005). La baja presencia de estos marcadores puede deberse al hecho de que *focG* codifica para las subunidades de fimbrias menores (Riegman *et al.*, 1990), mientras que el gen de la fimbria *gafD* codifica para una lectina asociada a la diarrea (Tanskanen *et al.*, 2001).

8.1.3. Toxinas.

La mayoría de los genes de toxinas en las cepas UPEC se localizan en islas de patogenicidad incluidas en elementos genéticos móviles, como plásmidos o transposones, que son los responsables de la transferencia genética horizontal (Hacker *et al.*, 1997). La expresión de los genes de toxinas en UPEC puede causar extensivo daño a los tejidos, facilitando la diseminación bacteriana, así como la liberación de nutrientes del huésped. En éste estudio durante el modelo *in vitro* de infección de la línea A431 con las cepas UPE, el gen de la toxina *cdtB* no fue expresado en ninguna de las cepas analizadas (Tabla 7). La expresión de los genes de toxinas de cepas UPEC no han sido estudiados hasta el momento, sin embargo, existen reportes de detección en cepas UPEC en otros países, por ejemplo en un estudio realizado en 225 cepas UPEC aisladas de UTIs se encontró que el gen *cdtB* fue identificado en el 2.5 (n=2) de las cepas (Abe *et al.*, 2008), mientras que Kylie *et al.*, (2005) en su estudio en 200 cepas UPEC aisladas de UTIs encontró un porcentaje del 8% (n=16).

8.1.4. *malX* y *fliC*

Las Islas de Patogenicidad (PAIs) son segmentos de ADN bacteriano que portan uno o más genes de virulencia, que han sido adquiridos en bloque a través de elementos genéticos móviles. Los genes de virulencia incluidos en las PAIs, les permite a las bacterias resistir las defensas del huésped, favorece la colonización y la adquisición de nutrientes mediante la actividad de las toxinas. (Fernández *et al*, 2004). En este estudio el gen *malX* representativo de PAI fue expresado en este estudio por las cepas UPEC después de la infección de la línea celular A431 en el 12.8% (n=25) (**Tabla 7 y Figuras 16 y 17**). Estos hallazgos demuestran que durante la infección del cultivo de las células vaginales humanas con las cepas de *E. coli*, fue necesario que los genes incluidos en las PAIs fueran expresados con la utilidad de iniciar la invasión, la colonización y destrucción de las células epiteliales para la adquisición de los nutrientes por parte de las bacterias. Como ya se mencionó, la expresión de manera global de estos y otros genes de virulencia no han sido estudiados en cepas UPEC, sin embargo, Moreno *et al.*, (2005) describieron una frecuencia de detección de *malX* del 10% en un grupo de cepas de *Escherichia coli*, en donde se estudió la asociación de los grupos filogenéticos A y B1 causantes de infección extraintestinal.

Por otro lado el gen *fliC* no fue expresado en ninguna de las cepas UPEC estudiadas (Tabla 7), lo cual probablemente pueda deberse al hecho de que las bacterias se encontraban infectando una monocapa de cultivo celular A431, en donde la movilidad para infectar otros sitios anatómicos no fue necesaria. *fliC* codifica para una proteína flagelar estructural localizada extracelularmente en cepas de *E. coli* entéricas y que le permite la movilidad (Wang *et al.*, 2000). La presencia de *fliC* ha sido identificado en el 20% (n=40) de las cepas UPEC descritas por Kylie *et al.*, (2005) y al 100% (n=52) descritas por Lee *et al.*, (2015) en un grupo de cepas UPEC aisladas de pacientes con UTIs de Corea del Sur.

8.1.5 Patrones de expresión de los genes de virulencia en las cepas de *E. coli*

En este trabajo se identificaron nueve patrones diferentes de expresión de los genes de virulencia en las cepas UPEC (**Tabla 8**), dentro de los cuales, el más frecuente fue *iutA-fimH* (41.7%), seguido de *iutA-fyuA-fimH* (24.7%). Estos resultados demostraron que durante el modelo de infección *in vitro* del cultivo de células epiteliales vaginales (A431) con las cepas UPEC, las bacterias fueron capaces de expresar simultáneamente diferentes genes de adhesión y de sistemas de adquisición de hierro durante la patogénesis de la infección. La expresión de manera colectiva de los diferentes genotipos pone de manifiesto la virulencia de las cepas UPEC estudiadas para el desarrollo de infecciones más agudas como cistitis y/o piletonefritis.

9. Conclusiones.

1. *Escherichia coli* fue el patógeno responsable de las mayoría de las infecciones del tracto urinario de los pacientes estudiados.
2. Los genes de virulencia de las cepas UPEC expresados con mayor frecuencia durante el modelo *in vitro* de infección de la línea A431 fueron los sistema de adquisición de hierro *iutA* y *fyuA*, y las adhesinas *fimH* y *papC*,
3. En este trabajo se encontraron diferentes patrones de expresión de los marcadores de virulencia involucrados principalmente en la adhesión y en la adquisición y hierro.
4. Los resultados demostraron la participación colectiva de varios marcadores de virulencia durante la infección *in vitro* de la línea celular A431 con las cepas UPEC, demostrando la capacidad de las cepas para ocasionar infecciones más agudas, como cistitis o pielonefritis.

10. Apéndice.

10.1. Apéndice 1.

10.1.1. BD EMB Agar (Eosin Methylene Blue Agar), Modified

REACTIVOS

BD EMB Agar, Modified. Fórmula* por litro de agua destilada

Digerido pancreático de gelatina	10,0 g
Lactosa	5,0
Sacarosa	5,0
Fosfato dipotásico	2,0
Agar	13,5
Eosina Y	0,4
Azul de metileno	0,065

pH 7,2 +/- 0,2 *Ajustada o suplementada para satisfacer los criterios de rendimiento.

10.2. Apéndice 2.

10.2.1. BD BHI infusión (Brain Heart Infusion).

REACTIVOS BD

Brain Heart Infusion (BHI) Agar Fórmula* por litro de agua purificada

Infusión de cerebro y corazón de (sólidos)	8,0 g
Digerido péptico de tejido animal	5,0
Digerido pancreático de caseína	16,0
Cloruro sódico	5,0
Glucosa	2,0
Fosfato disódico de hidrógeno	2,5
Agar	13,5

pH 7,4 ± 0,2

*Ajustada y/o suplementada para satisfacer los criterios de rendimiento.

10.3. Apéndice 3.

10.3.1. Amortiguador de pH TE para bacterias

El amortiguador de pH de lisis celular TE se combina de la manera siguiente:

Se prepara una solución con 10 mM Tris-HCl y 1 mM de EDTA, el pH se ajusta a 8.0. Antes de usarse se adicionan 1 mg/mL de lisozima (Sigma Catálogo L7651).

Reactivos

Para la extracción y purificación del RNA total de bacterias y levaduras, el QIAcube debe alimentarse con los reactivos incluidos en el equipo comercial RNeasy mini Kit (Qiagen; No. de catálogo 74104) (**Figura 6**). El RNeasy contiene los siguientes solventes:

- A) Botella con 220 mL de RLT (amortiguador de pH de lisis que contiene tiocianato de guanidina).
- B) Botella con 220 ml de RW1 (amortiguador de pH de lavado conformado por etanol y una pequeña cantidad de tiocianato de guanidina).
- C) Botella con 55 ml de RPE concentrado (amortiguador de pH de lavado, antes de usar adicionar 4 volúmenes de etanol al 96%).
- D) Botella con 50 ml de agua libre de RNasas.



Figura 6. Equipo comercial RNeasy (Qiagen). Fotografía FES Iztacala,

11. Bibliografía.

1. Abe CM, Salvador FA, Falsetti IN, Vieira MA, Blanco J, Blanco JE, Blanco M, Machado AM, Elias WP, Hernandez RT, Gomes TA. 2008. Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) strains may carry virulence properties of diarrhoeagenic *E. coli*. FEMS Immunol Med Microbiol 52: 397-406.
2. Agarwal J, Mishra B, Srivastava S, Srivastava R. 2013. Genotypic characteristics and biofilm formation among *Escherichia coli* isolates from Indian women with acute cystitis. Trans R Soc Trop Med Hyg. 107: 183-187.
3. Andreu A. 2005. Patogenia de las infecciones del tracto urinario. Enferm Infecc Microbiol Clin. 23: 15-21.
4. ARN Método de ebullición. www.science.smith.edu/cmbs/wp-content/uploads/sites/36/2015/09/CWZMiniBoilingRNAPreparation.pdf
5. Astrith P, Anaya F, Ramírez L, Orozco M, López L. 2013. Determinación de *Escherichia coli* e identificación del serotipo O157:H7 en carne de cerdo comercializada en los principales supermercados de la ciudad de Cartagena. Rev Lasallista de la Inv. 10: 91-100.
6. BD Brain Heart Infusion (BHI) Agar Instrucciones de uso-Medios en placa listos para usar. www.bd.com/resource.aspx?IDX=8800
7. BD EMB Agar (Eosin Methylene Blue Agar), Modified Instrucciones de uso-Medios en placas listos para su uso. www.bd.com/resource.aspx%3FIDX%3D8765
8. Bielaszewska M, Fell M, Greune L, Prager R, Fruth A, Tschäpe H, Schmidt M, Karch H. 2004. Characterization of Cytolethal Distending Toxin Genes and Expression in Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains of Non-O157 Serogroups. Infect immune. 72: 1812-1816.
9. Bower JM, Eto DS, Mulvey MA. 2005. Covert operations of uropathogenic *Escherichia coli* within the urinary tract. Traffic 6: 18-31.
10. Brumfitt W, Gargan R, Hamilton-Miller J. 1987. Periurethral enterobacterial carriage preceding urinary infection. Lancet. 1: 824-826.
11. Carlderón-Jaimes E, Casanova-Román G, Galindo-Fraga A, Gutiérrez-Escoto P, Landa-Juárez S, Moreno-Espinosa S, Rodríguez-Covarrubias F, Simón-Pereira L, Valdez-Vazquez. 2013. Bol Med Hosp Infant Mex. 70: 3-10.
12. Castro A. 2014. Bacteriología médica basada en problemas segunda edición. México: Manual moderno
13. Cortéz-Ortiz I, Rodríguez-Angeles G, Moreno-Escobar E, Tenorio-Lara J, Torres-Mazadiego B, Montiel-Vazquez E- 2002. Brote causado por *Escherichia coli* en Chalco, México. Salud pública Méx 44: 297-302.
14. Drago-Serrano E. 2009. Sistemas de Adquisición de Hierro en *Salmonella entérica*. Rev Biomed. 20 : 41-54
15. Fareiro P. 2010. Formación de biopelículas por “*escherichia coli*” y su correlación con factores de virulencia: Prevención y actividad de antimicrobianos frente a organismos planctónicos y asociados a biopelículas. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Farmacia.

16. Fernández S, Alonso G, Toro E. 2004. Estructura de mosaico del cromosoma bacteriano: Islas patogénicas. *INHRR*. 35: 798-477.
17. Firoozeh F, Saffari M, Neamati F, Zibaei M. 2014. Detection of virulence genes in *Escherichia coli* isolated from patients with cystitis and pyelonephritis. *Int J Infect Dis*. 29: 219-222.
18. Frost L, Laplace R, Summers A, Toussaint A. 2005. Mobile genetic elements: The agents of open source evolution. *Rev. Nature*. 3: 722-732.
19. Gonzales L, de Cali S. 2008. Pared Bacteriana. <http://aexbe.es.tl/Pared-Bacteriana-.-Texto.htm>
20. Granizo J, Giménez M, Bascones A, Aguilar L. 2006. Impacto del tratamiento antibiótico de las infecciones odontológicas. *Rev Esp Quimioterap*. 19(1):14-20.
21. Green C, Cheng G, Chandra J, Mukherjee P, Ghannoum A, Hoyer L. 2004. RT PCR detection of *Candida albicans* ALS gene expression in the reconstituted human epithelium (RHE) model of oral candidiasis and n model biofilms. *Microbiology*. 150: 267-275.
22. Hacker J, Blum-Oehler G, Mühldorfer I, Tschäpe H. 1997. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol Microbiol*. 23: 1089-1097.
23. Herrera M. 2004. El papel del biofilm en el proceso infeccioso de la Resistencia. *ISSN 2*: 1-180.
24. Ibarra C, Goldstein J, Silberstein C, Zotta E, Belardo M, Repetto H. 2008, Síndrome urémico hemolítico inducido por *Escherichia coli* enterohemorrágica. *Arch Argent Pediatr* 106: 435-442.
25. Johnson J, Stell A. 2000. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *J Infect Dis*. 181: 261–272.
26. Johnson J. 1991. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Rev. Microbiol. Clin*. 4: 80-128.
27. Krogfelt K. 1991 Bacterial adhesion: genetics, biogenesis, and role in pathogenesis of fimbrial adhesins of *Escherichia coli*. *Rev Infect Dis*. 13: 721-35.
28. Lane D, Olsen G, Stahl D, Sogin M, Pace N. 1985. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proc Natl Acad Sci USA*. 82: 6955-6959.
29. Lázaro L. 2003. Biosíntesis del lipopolisacárido de *Klebsiella Pneumoniae*. Tesis doctoral. Universidad de Barcelona Facultad de Biología.
30. Lee JH1, Subhadra B2, Son YJ2, Kim DH2, Park HS2, Kim JM1, Koo SH3, Oh MH4, Kim HJ2, Choi CH2. 2016. Phylogenetic group distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties of uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from patients with urinary tract infections in South Korea. *Lett Appl Microbiol*. 62: 84-90.
31. Lobos O, Padilla A, Padilla C. 2013. Análisis genético y propiedades virulentas de cepas de *Escherichia coli* aisladas desde infección vaginal. *Rev chil infectol*. 30: 716-1018.

32. López-Banda D, Carrillo-Casas E, Leyva-Leyva M, Orozco-Hoyuela G, Manjarrez-Hernández Á, Arroyo-Escalante S, Moncada-Barrón D, Villanueva-Recillas S, Xicohtencatl-Cortes J, Hernández-Castro R. 2014. Identification of Virulence Factors Genes in *Escherichia coli* Isolates from Women with Urinary Tract Infection in Mexico. *Biomed. Res. Int.* 2014: [10 pantallas].
33. Mollinedo M, Gonzáles C. 2014. Bacterias Gram negativas. *Rev. Act. Clin. Med.* 49: 2609-2613.
34. Margal N, Domínguez A, Prats G, Salleras L. 1997. *Escherichia coli* Enterohemorrágica. *Rev. Esp. salud publica* 71: 131-159.
35. María J. 2008. Etiología (etiopatogenia) de las infecciones urinarias. *An. Fun. Villavicencio.* 106: 150-155.
36. Marrs C, Zhang L, Foxman B. 2005. *Escherichia coli* mediated urinary tract infections: distinct uropathogenic *E. coli* (UPEC) pathotypes?. *FEMS Microbiol Lett.* 28: 183-190.
37. Martinez JJ, Mulvey MA, Schilling JD, Pinkner JS, Hultgren SJ. 2000. Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells. *EMBO J.* 19: 2803-2812.
38. Millán Y, Hernández E, Millán B, Aranque M. 2014. Distribución de grupos filogenéticos y factores de virulencia en cepas de *Escherichiacoli* uropatógena productora de β -lactamasa CTX-M-15 aisladas de pacientes de la comunidad en Mérida, Venezuela. *Rev. Argent Microbiol.* 46: 175-181.
39. Moreno E, Prats G, Planells I, Planes A, Pérez T, Andreu A. 2005. Caracterización de *Escherichia coli* de los grupos filogenéticos A y B1 causantes de infección extraintestinal. *Enferm. Infec. Microbiol. Clin.* 24: 9-483.
40. Ortega O. 2006. Sistema urinario. <http://kerchak.com/sistema-urinario/>
41. Paniagua GL, Monroy E, Vaca S. 2011. PCR en tiempo real para detector candida Albicans. Fes Iztacala, UNAM. México.
42. PCR en tiempo real. http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/realtime_pcr.pdf
43. Reidi J, Voos W. 1991. The malX malY operon of *Escherichia coli* encodes a novel enzyme II of the phosphotransferase system recognizing glucose and maltose and an enzyme abolishing the endogenous induction of the maltose system. *J. Bacteriol.* 173: 76-4862.
44. Revollo L. 20014. Salmonelosis en la saves. Parte 1. Algunos conceptos importantes. http://patologiaaviarmidiagnostico.blogspot.mx/2014_02_01_archive.html
45. Riegman N, Kusters R, Van Veggel H, Bergmans H, Van Bergen P, Hacker J, Van Die I. 1990. F1C fimbriae of a uropathogenic *Escherichia coli* strain: genetic and functional organization of the foc gene cluster and identification of minor subunits. *J. Bacteriol.* 172: 20-1114.
46. Rivar-Traverso F, Hernández F. 2000. *Helicobacter pylori*: Factores de virulencia, patología y diagnóstico. *Rev Biomed.* 11: 187-205.
47. Riverón R. 1999. Fisiopatología de la diarrea aguda. *RevCubana Pediatr* 71: 1561-3119.
48. Riveros M, Barletta F, Cabello M, Durand D, Mercado E, Contreras C, Rivera F, Mosquito S, Lluque A, Ochoa T. 2011. Patrones de adherencia de cepas de

- Escherichia coli* difudamente adherente (DAEC) provenientes de niños con y sin diarrea. Rev Peru Med Exp Salud Publica 28: 1726-4642.
49. Rodríguez-Ángeles G. 2002. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. Salud Publica Mex. 44: 464-475
 50. Rodríguez-Siek K, Giddings C, Doetkott C, Johnson T, Fakhr M, Nolan L. 2005. Comparison of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis. J. Microbiology. 151: 2097–2110
 51. Romeu B. 2012. Caracterización de cepas de *Escherichia coli* de importancia clínica humana aislada de ecosistemas dulceacuícolas de la Habana. Tesis doctoral. Universidad de la Habana Facultad de Biología.
 52. Rondón M, Orence O, Rondón A. 2007 Infecciones del Tracto Urinario. Venezuela: Publicaciones vicerrectorado académico.
 53. Runyen-Janecky L, Reeves S, Gonzales E, Payne S. 2003. Contribution of the Shigella flexneri Sit, luc, and Feo iron acquisition systems to iron acquisition in vitro and in cultured cells. Infect Immun. 71: 1919–1928.
 54. Sainz. E, Reyes M, Vicente P, Serapio-Alva, Zárate M, Navarro A, Esñava C. 2008. Resistencia a antimicrobianos de cepas de *E. coli* de diversos serotipos aisladas de pacientes de un Hospital Psiquiátrico. Rev Mex Cienc farm. 30:18-25.
 55. Snyder JA, Haugen BJ, Buckles EL, Lockatell C, Johnson DE, Donnenberg MS, Welch RA, Mobley HL. 2004. Transcriptome of uropathogenic *Escherichia coli* during urinary tract infection. Infect. Immun. 72: 6373-6381.
 56. Struve C, Krogfelt A. 1999. In vivo detection of *Escherichia coli* type 1 fimbrial expression and phase variation during experimental urinary tract infection. J Microbiology. 145: 2683-2690.
 57. Tanskanen J, Saarela S, Tankka S, Kalkkinen N, Rhen M, Korhonen TK, Westerlund-Wikström B. 2001. The gaf fimbrial gene cluster of *Escherichia coli* expresses a full-size and a truncated soluble adhesin protein. J. Bacteriol. 183: 9-512.
 58. Tarchouna M, Ferjani A, Ben-Selma W, Boukadida J. 2013. Distribution of uropathogenic virulence genes in *Escherichia coli*. J. Infect. Dis. 17:10-1016.
 59. Vidal-Graniel J. 2003. *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC): Una causa frecuente de diarrea infantil. Salud en Tabasco. 9:188-193.
 60. Wang L, Rothmund D, Curd H, Reeves P. 2000. Sequence Diversity of the *Escherichia coli* H7 fliC Genes: Implication for a DNA-Based Typing Scheme for *E. coli* O157:H7. J. Clin. Microbiol. 38: 1786-1790.
 61. Yun KW, Kim HY, Park Hk, Kim W, Kim IS. 2014. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* of urinary tract infections and asymptomatic bacteriuria in children. Journal of microbiology, immunology and infection. 47: 455-461.
 62. Zamora J, Reinhardt G, Tadich N, Polette M, Jaramillo I. 1997. Propiedades hemaglutinantes de cepas de *Escherichia coli* aisladas de corderos diarreicos y su relación con su toxicidad. Arch. Med. Vet. 29:41-47.

63. Zhao L, Chen X, Zhu X, Yang W, Dong L, Xu X, Gao S, Liu X. 2009. Prevalence of virulence factors and antimicrobial resistance of uropathogenic *Escherichia coli* in Jiangsu province (China). *Urology*. 74: 702-707.