PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

ESCUELA DE BIOANÁLISIS

DISERTACIÓN PREVIA PARA OBTENER EL TÍTULO DE LICENCIADA EN MICROBIOLOGÍA CLÍNICA Y APLICADA

"Genotipificación de factores de virulencia de *Escherichia coli* Uropatógena (UPEC) por medio de la técnica Multiplex PCR, en infecciones de vías urinarias, no complicadas, complicadas y recurrentes en mujeres mayores de 18 años, del Hospital Carlos Andrade Marín durante los años 2010 y 2011"

EMILIA GABRIELA ENRÍQUEZ RECALDE

DIRECTORA: Dra. Sonia Ontaneda Luna

QUITO, 2013

DEDICATORIA

A Dios mi Padre Celestial y a Jesucristo, a quienes les debo todo desde antes de nacer.

A mis padres y hermana sin cuyo amor y apoyo este trabajo todavía seguiría inconcluso.

Y a mis amigos quienes con su ejemplo han sido una motivación para seguir progresando.

"… La fe no es tener un conocimiento perfecto de las cosas; de modo que si tenéis fe, tenéis esperanza en cosas que no se ven y que son verdaderas"

Alma 32:21

AGRADECIMIENTO

Agradezco primeramente a Dios, por ser un Padre Celestial amoroso que ha confiado invariablemente en mí, y a lo largo de mi carrera. A mi Salvador Jesucristo, que con su amor me ha dado la oportunidad de un día, mediante mi fe, llegar a ser como Él.

Mi agradecimiento muy particular a la Doctora Sonia Ontaneda Luna, es usted un ejemplo de trabajo, de constancia, de esfuerzo y de amor por el conocimiento. Gracias por su dedicación desinteresada en esta investigación y su apertura conmigo, reconozco inmensamente su paciencia, su apoyo y su amistad.

A mis amados padres, Víctor Manuel y Lupita, por la infinita paciencia, apoyo y abnegación. Gracias por sus esfuerzos para darme lo mejor, cada día lo he tenido, aunque no siempre mereciéndolo. Cada letra de este trabajo es para ustedes, recuerden que los amo, y que las familias son eternas.

A mi hermana Samantha, eres mi mejor amiga. Gracias por tu buen humor y abrazos constantemente, espero haber sido un buen ejemplo para ti en todos estos años que estamos juntas.

A mi abuelita, María Griselda, eres el mejor modelo de sacrificio, entrega y amor para toda la familia. Gracias.

Agradezco de manera especial a la Doctora Isabel Narváez Black, quien siempre fue un apoyo, y una mano amiga durante la realización del proyecto y sobretodo quien facilitó el inicio del proyecto en el HCAM.

TABLA DE CONTENIDOS

DEDICATORIA I

AGRADECIEMIENTO II

TABLA DE CONTENIDOS III

ÍNDICE DE TABLAS VIII

ÍNDICE DE FIGURAS IX

ÍNDICE DE ANEXOS X

RESUMEN 1

ABSTRACT 3

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 JUSTIFICACIÓN 7

1.2 PROBLEMA 9

1.3 OBJETIVO 10

1.3.1 Objetivo General 10

1.3.2 Objetivos Específicos 10

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 ANTESCEDENTES.....11

2.2 MARCO REFERENCIAL 12

2.3 EPIDEMIOLOGÍA 13

2.4 CLASIFICACIÓN CLÍNICA 14

2.4.1 Infección de vías urinarias no complicada 14

2.4.2 Infección de vías urinarias complicada 14

2.4.3 Infección de vías urinarias recurrente 15

2.4.4 Por su localización 15

2.5 ETIOLOGÍA 17

2.6 PATOGÉNESIS 22

2.7 FACTORES DE RIESGO.....24

2.7.1 Pre menopausia.....24

2.7.2 Post menopausia 24

2.8 FACTORES DE VIRULENCIA.....25

2.9 FACTORES DE VIRULENCIA DE *Escherichia coli* Uropatógena.....27

2.9.1 Factores de virulencia de superficie 27

2.9.2 Factores de virulencia exportados desde el interior de la célula 31

2.10 SISTEMAS DE SECRECIÓN 34
2.10.1 Sistemas de Secreción Tipo I (SST1) 36
2.10.2 Sistemas de Secreción Tipo II (SST2) 37
2.10.3 Sistemas de Secreción Tipo III (SST3) 38
2.10.4 Sistemas de Secreción Tipo IV (SST4) 41
2.10.5 Sistemas de Secreción Tipo V (SST5) 43

2.11 MODULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE 45

2.12 FACTORES DE PROTECCIÓN 49

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 METODOLOGÍA 55

3.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO Y MUESTRA 55
3.2.1 Criterios de inclusión 56
3.2.2 Criterios de exclusión 56

3.3 HIPÓTESIS 49

3.4 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES 50

3.5 EQUIPOS Y MATERIALES 56

3.5.1 Equipos 56
3.5.2 Materiales 57
3.6 REACTIVOS Y MEDIOS 57
3.6.1 Reactivos para el análisis molecular 57
3.6.2 Medios de cultivo 57
3.7 PROCEDIMIENTOS 58
3.7.1 UROCULTIVO 58
3.7.2 IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE LA *Escherichia coli* 59
3.7.3 RECOLECCIÓN DE LAS CEPAS 61
3.7.4 TRANSPORTE 62
3.7.5 ALMACENAMIENTO 62
3.7.6 SIEMBRA DE LA MUESTRA Y EXTRACCIÓN DEL ADN TOTAL 62
3.7.7 TÉCNICAS MOLECULARES 63
3.7.7.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) 63
3.7.7.2 Multiplex PCR 66
3.7.7.3 Condiciones para la PCR 66
3.7.8 CONFIRMACIÓN DE LA EXTRACCIÓN DEL ADN BACTERIANO 67
3.7.9 DETECCIÓN MOLECULAR DE LOS GENES DE VIRULENCIA 68
3.7.10 ELECTROFORESIS 69

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 ANÁLISIS DE PRESENCIA O AUSENCIA DE LOS GENES DE VIRULENCIA 72
4.2 GRÁFICAS DE RESULTADOS 75

4.3 FOTOGRAFÍAS DE LAS AMPLIFICACIONES DE LOS GENES CODIFICANTES PARA LOS FACTORES DE VIRULENCIA DE *Escherichia coli* Uropatógena. 77
4.4 TABLAS DE RESULTADOS DE LAS PACIENTES.....81
4.5 DISCUSIÓN.....92

CONCLUSIONES 94
BIBLIOGRAFÍA.....96
ANEXOS.....101

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N° 1 33
Tabla N° 2 34
Tabla N° 3 52
Tabla N° 4 59
Tabla N° 5 60
Tabla N° 6 69
Tabla N° 7 74
Tabla N° 8 74
Tabla N° 9 75
Tabla N° 10 69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.....29
Figura 2.....37
Figura 3.....40
Figura 4.....44
Figura 5.....45
Figura 6.....59
Figura 7.....61
Figura 8.....65
Figura 9.....68
Figura 10.....71
Figura 11.....72
Figura 12.....78
Figura 13.....79
Figura 14.....80
Figura 15.....81
Figura 16.....105
Figura 17.....105
Figura 18.....106
Figura 19.....106
Figura 20.....107
Figura 21.....107
Figura 22.....107

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica N° 1 18
Gráfica N° 2 76
Gráfica N° 3 77

RESUMEN

La *Escherichia coli* Uropatógena (UPEC) es el agente etiológico principal de las infecciones de vías urinarias no complicadas, complicadas y recurrentes. Estas bacterias han desarrollado e incluido en su genoma una serie de factores de virulencia y habilidades que facilitan la colonización, el crecimiento y la persistencia de la bacteria en el tracto urinario del hospedador.

Los factores de virulencia de *Escherichia coli* son principalmente de dos tipos: los producidos en la superficie celular y los que son producidos dentro de la célula y que luego salen al sitio de acción. Aquellos producidos en la superficie celular incluyen diferentes tipos de factores de adherencia, los cuales participan en la adhesión a la superficie de las células huésped pero también pueden tener funciones adicionales como la invasión a los tejidos, la formación de biopelículas e inducción de citoquinas. Dentro de las actividades de los componentes de la pared celular del microorganismo se discuten otros factores de virulencia exportados que tienen actividades importantes contra los hospedadores, y otros factores permiten que las bacterias crezcan en ambientes críticos con restricciones de hierro.

Varios estudios han demostrado que los factores de las Adhesinas, como la fimbria P, fimbria S, fimbria tipo 1 y adhesina afimbrial; las toxinas: α-hemolisina y el factor citotóxico necrotizante; los sistemas de adquisición de hierro ó sistema aerobactina; y la cápsula o lipopolisacáridos; tienen una alta prevalencia en la *Escherichia coli* Uropatógena la cual está asociada con IVUs especialmente en mujeres.

En este trabajo se utilizó la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), se caracterizaron 142 cepas de *Escherichia coli* las cuales fueron aisladas de urocultivos de pacientes atendidas en el Hospital Carlos Andrade Marín (HCAM) con IVUs no complicadas, complicadas y recurrentes. Los ensayos fueron desarrollados para los genes: *fimH*, *hlyA*, *usp, pap GI, pap GII* y *pap GII*, por medio de la PCR convencional para los genes *fimH, hlyA* y *usp,* y Multiplex PCR para los tres alelos *pap G.* Alrededor del 85% de las cepas aisladas tuvieron resultados positivos para los genes característicos de la UPEC: *fimH* 74,6%, *usp* 2,1%, *pap GI* 0,7%, *pap GII* 5,6%, *pap GIII* 2,1%, y ninguna cepa fue positiva para el gen *hlyA.*

Con los resultados obtenidos se demuestra que las adhesinas son los factores de virulencia más frecuentes e influyentes en la *Escherichia coli* Uropatógena en la población involucrada en las infecciones de vías urinarias en este estudio.

Palabras clave:

Escherichia coli Uropatógena, factores de virulencia, Multiplex PCR.

ABSTRACT

Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) Uropathogenic E. coli (UPEC) is the main etiological agent of urinary tract infections no complicated, complicated and recurrent. These bacteria have evolved and include in their genome a number of virulence factors (VFs) and abilities that facilitate bacterial growth and persistence within the adverse settings of the host urinary tract.

Virulence factors of *Escherichia coli* are of two main types; those produced on the surface of the cell and those produced within the cell and then exported to the site of action. Those produced on the cell surface include different types of adhesion factors, which are involved in adhesion to the surface of host cells but may also have additional functions such as tissue invasion, biofilm formation and induction of cytokines (L. Emödy, 2003). The activities of cell wall components and several exported virulence factors are described that have anti host cell activities. Others virulence factors enable the bacteria to grow in an environment of iron restriction.

Several studies have been shown that Adhesins (P-fimbriae, S-fimbriae, type 1 fimbriae and afimbrial adhesin), toxins (α-hemolysin and cytotoxic necrotizing factor type 1), iron acquisition systems (aerobactin) and capsule or lipopolysaccharide, have a great prevalence in Uropathogenic *Escherichia coli* strains associated with urinary tract infections specially in women (Ribeiro Tiba Monique, 2008).

In this work 142 Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) strains isolated from urine culture of women at the Hospital Carlos Andrade Marín in Quito with UTIs no complicated, complicated and recurrent were genotypically characterized by conventional PCR and Multiplex PCR assays. We developed the PCR assays for virulence-related genes: *fimH, hlyA, usp,* and de Multiplex PCR for the *pap G* alelles.

About 85% of the isolates carried genes characteristic of Uropathogenic *Escherichia coli* and the results were: 74.6% *fimH*, 2.1% *usp*, 2.1% *pap GI* 0.7%, *pap GII* 5.6%, *GIII pap* 2.1%, and no strain was positive for *hlyA* gen. With the results obtained is shown that the adhesins are

the virulence factors more frequent and influential in Uropathogenic *Escherichia coli* in the population involved in urinary tract infections in this study

Key words:

Uropathogenic *Escherichia coli*, virulence factors (VFs), Multiplex PCR.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

La *Escherichia coli* es uno de los microrganismos más comunes aislados de infecciones de vías urinarias (IVUs) no complicadas, complicadas y recurrentes en mujeres. Se ha demostrado que la mayoría de estas cepas patógenas presentan factores de virulencia que incrementan la patogenicidad de estos gérmenes implicados en las IVUs, Se define como virulencia a la habilidad de un organismo para causar enfermedad en un huésped en particular, en el caso de la *E. coli* Uropatógena (UPEC) la virulencia que manifiesta es el resultado de la combinación de una o más propiedades especiales o factores de virulencia (FV). Los factores de virulencia presentes en las UPECs son: adhesinas, sistemas de captación de hierro, síntesis de citoquinas y serotipos específicos para ciertos antígenos somáticos, capsulares y flagelares (O: K: H) respectivamente; que la distinguen de los otros patógenos intestinales y de las cepas inofensivas presentes en la flora intestinal. Las cepas de *Escherichia coli* Uropatogénicas (UPECs) son un grupo genéticamente heterogéneo que presentan varios factores de virulencia asociados con la colonización y persistencia de las bacterias en el tracto urinario. Las adhesinas pueden contribuir a la virulencia, la promoción de la colonización, invasión y replicación dentro de las células uroepiteliales. Además de la adhesión bacteriana, varios factores de virulencia pueden contribuir a la patogenicidad de las UPECs, facilitando la capacidad de adherirse específicamente a las células uroepiteliales y la expresión de otros productos bacterianos a los tejidos del hospedador, tales como toxinas, sistemas de adquisición de hierro y los mecanismos que ayudan a evadir el sistema inmune del huésped. Los factores de virulencia (VFs) asociados con la UPEC incluyen adhesinas (fimbrias: P, tipo 1, S y F1C, adhesina afimbrial), toxinas (hemolisina, y el factor citotóxico necrotizante), sideróforos (el sistema aerobactina), cápsulas y la proteína específica uropatógenica recién descubierta *usp* (Ribeiro Tiba Monique, 2008).

Las IVUs son la infecciones más comunes detrás de las infecciones respiratorias y la *E. coli* Uropatógena es el agente etiológico principal causante de éstas y también es el principal miembro facultativo de la flora normal intestinal humana. Alrededor del 10- 50% de las mujeres padecerán una infección urinaria en algún momento de su vida y del 25 al 33% reportarán recurrencia en el mismo año. Las IVUs son una fuente considerable de morbilidad y mortalidad,

y en algunos países conllevan enormes costos de atención en salud. En los reportes de los últimos años se ha notificado el incremento del número IVUs, causadas por de *E. coli* resistentes a los antibióticos lo cual es de gran preocupación para el sector médico (Duplessis Christopher, 2011).

El objetivo principal de este trabajo fue detectar mediante las técnicas moleculares PCR y Multiplex PCR los genes de virulencia en las cepas de UPEC aisladas en mujeres mayores de 18 años con IVUs no complicadas, complicadas y recurrentes atendidas en el Hospital Carlos Andrade Marín.

1.1 JUSTIFICACIÓN

En general en la población femenina las infecciones de vías urinarias (IVUs) ocupan el segundo lugar en frecuencia y manifestación superadas sólo por las infecciones respiratorias (Hans, 2002). Algunos autores indican que hasta el 50% de mujeres tendrán uno o más episodios de infecciones de vías urinarias durante su vida (Potenziani Bigelli Julio César, 2010) y un 25-33% presentarán IVUs recurrentes (Duplessis Christopher, 2011). Con esta referencia podemos decir que las infecciones urinarias son uno de los padecimientos más comunes en mujeres y son causa importante de las Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud (IAAS) (Lloarach, 2002). Las IVUs están ampliamente distribuidas en el mundo y la prevalencia elevada de estas infecciones ha motivado la realización de varias investigaciones sobre esta patología en Europa, Estados Unidos y Latinoamérica, mientras que en el Ecuador no se han realizado muchos estudios de este tipo con respecto a las IVUs.

En el año 2009 en la provincia de Chimborazo se realizó un trabajo dirigido a determinar los perfiles de resistencia bacteriana en pacientes embarazadas y hospitalizadas con infecciones de vías urinarias, los resultados obtenidos demostraron que *Escherichia coli* es la bacteria más común en las IVUs y presenta una alta tasa de resistencia a los antimicrobianos como: la ampicilina, fosfomicina, gentamicina, amoxicilina, cefotaxima, amoxicilina más ácido clavulánico y trimetoprima más sulfametoxazol (Santana Mera, 2009). Sin embargo, no se reportan trabajos relacionados con la determinación de los genes factores de virulencia de UPEC, tampoco hay datos sobre la resistencia a los antimicrobianos que presentan estas cepas. La literatura señala que una característica de las UPECs es la elevada tasa de resistencia a los antibióticos.

En nuestro país no se tienen datos estadísticos sobre estudios moleculares para la identificación de genes de virulencia sin embargo, en Brasil hay varios estudios que demuestran la presencia de uno o más factores de virulencia en la mayoría de las muestras por medio de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Tornieporth Nadia G., 1995) (Wanderley Dias da Silveira, 2001). Se reportaron resultados en 162 muestras, con una alta frecuencia para los genes: *fimH* (97,5%), *kpsMTII* (53,1%), *papC/papEF/papG* (32,7%), *sfa* (27,8%), *iucD* (25,9%), *hlyA* (25,3%), *usp* (22,2%) (Ribeiro Tiba Monique, 2008).

El objetivo de este trabajo fue genotipificar y conocer cuál es la frecuencia de los genes (factores de virulencia): *fimH, hlyA, usp, pap GI, pap GII* y *pap GIII* en urocultivos de mujeres mayores de 18 años atendidas en el Hospital Carlos Andrade Marín (HCAM). Se tomó en cuenta a estos factores de virulencia para nuestro estudio porque en la literatura mundial se los reporta como los más inmunógenos (Rondón Nucete, Orence Onett, & Rondón Guerra, 2007).

Los genes a identificar se caracterizan principalmente por codificar a los factores de virulencia de la UPEC. El gen *fimH* codifica para el factor de virulencia Fimbria tipo 1, cuya función es la de adhesión al epitelio de la mucosa y matriz tisular formando un biofilm. El gen *hlyA* es codificador de α-hemolisina productora de citotixicidad y hemólisis. El gen *usp* es el, codificante para la proteína específica uropatógena, recientemente, se demostró que mejora de forma significativa la capacidad de infección por *E. coli* en el modelo del ratón con IVU, de igual forma otros estudios indican que el gen *usp* desempeña un papel importante en la manifestación de pielonefritis y la colonización de la zona periuretral (Bauer Richard J., 2002). El tipo *papG I* codifica a un lipopolisacárido con efectos endotóxicos, antígeno O, inducción de citocinas, resistencia sérica, inmunoadyuvante (Faleiro Naves, 2009) (Johnson R., 1991). El tipo *papG II* y *pap GIII* son codificantes del sistema de aerobactina cuya función es la captación de hierro, a los que se les atribuye su participación en la pielonefritis aguda y cistitis aguda respectivamente (Rijavec Matija, 2008).

También se recalca que este proyecto es una investigación piloto que impulsará estudios posteriores relacionados con factores de virulencia y con genes de resistencia a los antibióticos de *Escherichia coli* Uropatógena.

1.2 PROBLEMA

Estadísticamente se indica que las IVUs en las mujeres de todas las edades alcanzan del 10% al 20% de las consultas diarias en los centros médicos asistenciales (Vallejos Medic Clotilde, 2010), tomando en cuenta que las infecciones del tracto respiratorio tienen el primer lugar en frecuencia.

Las IVUs son muy comunes en el ser humano y suelen ser catorce veces más frecuentes en la mujer que en el hombre. De acuerdo a reportes de diversas investigaciones se conoce que entre el 10 y el 50% de las mujeres tendrán al menos una IVU en el transcurso de su vida (Álvarez Barranco, 2007) (Potenziani Bigelli Julio César, 2010) y de este total un 25-33% manifestará infecciones recurrentes, que pueden o no estar relacionadas con anormalidades del tracto urinario, ya sean estas funcionales o anatómicas (Duplessis Christopher, 2011).

Las IVUs recurrentes son aquellas que se repiten con frecuencia y se alternan con períodos de esterilidad urinaria causada por persistencia bacteriana o por reinfección (Potenziani Bigelli Julio César, 2010). Se resalta que la frecuencia en la repetición de infecciones es aún mayor en la mujer embarazada ya que el embarazo puede contribuir para el empeoramiento de las enfermedades renales y sus secuelas, entre las que se resaltan las IVUs, las cifras indican que alrededor de 2-7% de embarazadas presentan IVUs en algún momento de la gestación (Álvarez Barranco, 2007) (Vallejos Medic Clotilde, 2010).

Escherichia coli es el patógeno aislado con mayor frecuencia en muestras provenientes de IVUs. Esta bacteria es considerada como el principal agente etiológico de las infecciones del tracto urinario y representa el 70- 95% de los gérmenes aislados en urocultivos (Travis J. Wiles, 2008). La *E.* coli es un bacilo Gram-negativo, miembro facultativo más abundante de la flora intestinal humana (R. A. Welch, 2002) (Chung Amanda, 2010). En muchas ocasiones los clones de *E. coli* que salen de la flora fecal, colonizan la zona vaginal y periuretral infectando de forma ascendente el tracto urinario. Las cepas de *Escherichia coli* que tienen preferencia por las células del tracto urinario son conocidas como *Escherichia coli* Uropatógena (Travis J. Wiles, 2008).

Diversos estudios realizados alrededor del mundo demuestran que estas bacterias que infectan el uroepitelio que son causantes de las IVUs comunes y difíciles de tratar, están formadas de algunos factores de virulencia asociados con la colonización y persistencia de la bacteria en el tracto urinario. Esta es la razón por la que la siguiente investigación aporta con información sobre los factores de virulencia y su patogénesis en las bacterias de las muestras recolectadas de mujeres atendidas en el HCAM en la ciudad de Quito.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo General

Identificar la presencia de los genes de virulencia de *Escherichia coli* Uropatógena en urocultivos positivos de mujeres seleccionadas para el estudio.

1.3.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar mediante la técnica de PCR la presencia o ausencia de los genes de virulencia de la *Escherichia coli* Uropatógena en las muestras seleccionadas para la investigación.
- Conocer la prevalencia de *Escherichia coli* Uropatógena en las pacientes atendidas en el Hospital Carlos Andrade Marín.
- Correlacionar los resultados obtenidos con la problemática presente a nivel mundial.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 ANTECEDENTES

Los primeros estudios realizados sobre genes de virulencia en el mundo fueron realizados en Estados Unidos y Japón y han proporcionado un conocimiento más detallado acerca de este problema de salud pública. Estas investigaciones detectaron los primeros genes de virulencia de *E. coli* mediante una técnica molecular conocida como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Dicha técnica se ha convertido en la base para el diagnóstico de enfermedades e identificación de genotipos, es usada fundamentalmente para la amplificación de genes, y desde sus inicios ha ganado suma importancia por su gran especificidad, eficiencia y fidelidad (Yamamoto Shingo, 1995). Con el paso de los años se ha desarrollado la Multiplex PCR que consiste en amplificar varias secuencias blanco deseadas en una sola reacción.

Muchos estudios se han realizado en todo el mundo acerca de IVUs, sin embargo en Latinoamérica hay muy pocas investigaciones moleculares, con excepción de Brasil que ha hecho varias con respecto a los factores de virulencia que presenta la UPEC tanto en IVUs en población infantil como en adultos y comparando con otras cepas de *E. coli* causantes de otros tipos de infecciones extraintestinales. Los resultados encontrados en estos trabajos indicaron la presencia de genes de virulencia en la *Escherichia coli* Uropatógena (UPEC) y su intervención en la patogénesis de las infecciones del tracto urinario no complicadas, complicadas y recurrentes.

El Hospital Carlos Andrade Marín (HCAM) es el lugar donde se realizó la recolección de las muestras. Se ha determinado que en el laboratorio de Bacteriología del hospital diariamente se procesan alrededor de 120 urocultivos provenientes de los servicios de Consulta Externa, Hospitalización y Urgencias. De este número total diario se estima que existen de seis a 10 cultivos positivos (cuantificación de al menos 10^5 UFC/ml de orina) para *Escherichia coli*

(Echevarría-Zarate Juan, 2006). Lo que indica la alta prevalencia de la bacteria en las infecciones del tracto urinario dentro de nuestro medio, en la ciudad de Quito.

2.2 MARCO REFERENCIAL

La infección urinaria (IU) constituye una de las patologías infecciosas más significativas en el género femenino debido a su prevalencia creciente a partir de los primeros días de vida. En los niños se asocia a cicatrices e insuficiencia renal, en la mujer adulta es una de las causas más frecuentes de consulta médica, es además la localización más frecuente de infección hospitalaria asociada a instrumentación como el sondaje vesical y adquieren particular importancia durante el embarazo, que es uno de los factores predisponentes de las mismas (Farinati Alicia E., 1996).

Las infecciones de vías urinarias (IVUs) se describen como la presencia, invasión, colonización y multiplicación de uno o más microorganismos patógenos habitualmente bacterianos en los lugares que normalmente son estériles en el aparato urinario; seguido de esto se manifestará una reacción inflamatoria típica de la infección, a pesar de que en algunos casos puede o no haber síntomas que manifiesten el problema (Echevarría-Zarate Juan, 2006). Los síntomas que suelen acompañar a la infección son: disuria, polaquiuria, tenesmo, dolor suprapúbico, síndrome miccional, hematuria, fiebre, dolor en flanco si se trata de una infección alta. Pero las IVUs también pueden ser asintomáticas.

Las IVUs no constituyen una única entidad sino que se reconocen hasta 20 diferentes tipos de infecciones de acuerdo al grupo etario, sexo, hábitos sexuales, características anatómicas y funcionales de las vías urinarias, obstrucciones, enfermedad de base y sobre todo localización de la infección y estado ambulatorio u hospitalización del paciente (Casellas, 2008).

Las infecciones del aparato urinario plantean un problema sanitario grave, esencialmente debido a la frecuencia con la que se manifiestan y presentan índices altos de mortalidad y morbilidad, muchas pueden ser leves y otras complicadas y recurrentes con consecuencias graves como sepsis o involucrar daños renales.

Las pruebas clínicas y experimentales respaldan la idea de que el mecanismo causal más común de IVUs es el ascenso por la uretra de los microorganismos, especialmente de origen intestinal. Dicho mecanismo nos da una explicación lógica para la mayor tasa de IVUs en las mujeres y al aumento del riesgo de reinfección, después del uso de catéteres o instrumentación vesical (M. Grabe, 2010).

La incidencia de las IVUs varía principalmente con la edad y sexo del paciente. En la primeras etapas de recién nacidos y lactantes hay un porcentaje alto en los varones y esto puede ser por defectos anatómicos. En la niñez las IVUs predominan en las mujeres y así permanece hasta la edad adulta, a esta condición se añade la etapa de embarazo y la diabetes que incrementan la incidencia como determinantes de las posibles IVUs (Torres M. 2008).

2.3 EPIDEMIOLOGÍA

Las IVUs son las infecciones más importantes en el ser humano después de las infecciones de tracto respiratorio, son las más frecuentes en el ámbito nosocomial como en el comunitario constituyéndose así en un importante problema de salud pública a nivel mundial. La incidencia anual en el reporte de las infecciones de vías urinarias en la mujer es de 12%, con un pico de incidencia de 18,6% en mujeres de 20 a 24 años. Hay poca disminución en la incidencia de las infecciones entre el 10% y 15% a través de todos los grupos de edades. Investigaciones recientes en Estados Unidos mostraron que alrededor del 10% al 50% de mujeres, experimentaran un episodio de IVU a lo largo de su vida, y de un 25% al 33% reportaran recurrencia en un período de 6 a 12 meses (Álvarez Barranco, 2007) (Duplessis Christopher, 2011) (Oelschlaeger Tobias A., 2002).

A pesar de los estudios realizados con referencia a patogénesis y epidemiología de las IVUs, estas continúan como una causa importante de morbilidad lo que produce un número significativo de consultas médicas al año y con ello gastos sustanciales, en especial entre mujeres adultas con IVUs recurrentes.

Considerando todas las IVUs, las que afectan a las vías bajas son las de mayor incidencia (80%), la cistitis es la más frecuente en la mujer y la prostatitis en el hombre. Se calcula que una de cada tres mujeres padecerá como mínimo un episodio de IVUs bajas en el curso de su vida y con mayor probabilidad entre los 20 y 40 años, requiriéndose tratamiento antes de los 24 años de edad (Chung Amanda, 2010) (Potenziani Bigelli Julio César, 2010).

Las IVUs motivan con frecuencia la solicitud de asistencia médica, suponen hasta el 10% del total de consultas al médico de atención primaria y más del 30% de las visitas al urólogo. Pero además de su incidencia elevada, estas infecciones son importantes por su morbilidad, puesto que la infección urinaria evolucionada, por fracaso diagnóstico y/o terapéutico puede conducir a la aparición de una pielonefritis crónica. Un dato importante también es el hecho de que la IVU es una de las principales fuentes de sepsis que, hasta hoy, reportan una elevada mortalidad, no inferior al 15−20% de los afectos. Además constituyen la primera causa de IASS (Lloarach, 2002).

2.4 CLASIFICACIÓN CLÍNICA

2.4.1 Infección de vías urinarias no complicada.- Esencialmente, son infecciones del tracto urinario no complicadas las del tracto inferior (cistitis/uretritis). Se engloban en este grupo las infecciones con mínimo riesgo de invasión tisular y con prevención de respuesta a un tratamiento estándar corto, se observan en mujeres jóvenes de edad fértil, sanas, no embarazadas y que refieren manifestaciones clínicas de menos de una semana de evolución (González Monte, 2011).

2.4.2 Infección de vías urinarias complicada.- Se presentan en hombres y mujeres que poseen una anormalidad estructural y funcional ó también en individuos que ya presentan una disposición a manifestar la infección por una enfermedad de base ó que se encuentren inmunocomprometidos. En estos casos la supresión del agente comprometido suele ser más difícil, sobre todo si no se atienden las enfermedades de base (Gómariz M, 1998).

2.4.3 Infección de vías urinarias recurrente (IVU-R). Se considera IVU recurrente cuando hay más de dos episodios de IVU no complicada en los últimos seis meses o tres urocultivos positivos en el año anterior. La recurrencia puede darse debido a recidiva, es decir a una nueva infección por el mismo germen que ocasionó la infección anterior; o a una reinfección por un germen diferente al del episodio anterior (Sánchez, 2011). En la gran mayoría de los casos la IVU-R se debe a una re-infección (95%), la cual es producida por una bacteria proveniente desde fuera del tracto urinario, cuyo reservorio es la microbiota intestinal, y generalmente se presenta después de dos semanas del tratamiento del episodio inicial. (Valdevenito Sepúlveda, 2008).

Bacteriuria Asintomática (ABU).- Es el aislamiento cuantitativo de bacterias de una muestra de orina apropiadamente recolectada, obtenida de una persona sin signos ni síntomas atribuibles a una infección de las vías urinarias. La bacteriuria asintomática es un hallazgo común y, la mayoría de las ocasiones, benigno. Si se presenta bacteriuria asintomática debemos hablar de infección de las vías urinarias, la mayoría de las veces no complicada y en mujeres sexualmente activas; sin embargo, es importante conocer si se está manejando una pielonefritis aguda no obstructiva, una infección complicada de las vías urinarias, una recaída o una reinfección, para garantizar el tratamiento apropiado (Díaz, 2008).

2.4.4 Por su localización

Infecciones inferiores o de vías bajas:

- **Cistitis.-** Se caracteriza por la aparición brusca de disuria, polaquiuria y urgencia miccional. Con menor frecuencia se observa incontinencia, tenesmo y dolor suprapúbico que a veces aumenta con la micción (estranguria). La fiebre obliga a sospechar la existencia de pielonefritis o de prostatitis en el caso de los hombres. Puede haber hematuria macroscópica en un 30% de los casos. Una característica de la orina puede ser turbia y maloliente. El urocultivo muestra bacteriuria significativa desde 10^3 UFC/mL.

- **Uretritis.-** La uretritis es una inflamación de la uretra que suele cursar con liberación de un exudado uretral mucoso o purulento y sensación de quemazón durante la micción, aunque también puede ser asintomática. Se distingue entre uretritis gonocócica (UG), cuando es causada por *Neisseria gonorroheae*, y uretritis no gonocócica (UNG), cuando la causa no es el gonococo, que según autores suponen del 20 al 30% de las uretritis en nuestro medio. En las mujeres en edad reproductiva está asociada a un 3 al 10 % de los casos de disuria (Evelyn, 2006).

Infecciones superiores o de vías altas

- **Pielonefritis aguda.-** Trata de una infección aguda parenquimatosa del riñón por lo general de origen ascendente y que abarca también la pelvis renal, característicamente los pacientes se presentan con dolor en fosas lumbares, asociado a síntomas sistémicos como fiebre, vómitos, etc., pudiendo o no presentar síntomas concomitantes de cistitis. El cuadro clínico puede ser de gravedad variable, incluyendo sepsis y shock séptico. Alrededor del 50% de los enfermos tienen antecedentes de infecciones urinarias bajas en los meses anteriores (González Monte, 2011).

- **Nefritis bacteriana aguda focal.-** La nefritis aguda focal o nefronia lobar aguda constituye un cuadro poco común caracterizado por una infección localizada en el riñón la cual generalmente es producida por *Escherichia coli*, Posee una clínica variable, siendo la tomografía computada (TAC) la prueba más sensible y específica para el diagnóstico de esta enfermedad. Esta patología se diferencia histológicamente de la pielonefritis aguda por no presentar un infiltrado inflamatorio difuso (Cano Sch Francisco, 2010).

- **Absceso intrarrenal y perinéfrico.-** El absceso renal es una forma de IVU un poco inusual y puede ser intrarrenal (cortical o corticomedular) o periférico, que en su mayor parte es causado por *Staphylococcus aureus* y enterobacterias. Puede desencadenar una complicación como infección ascendente asociada a obstrucción

del flujo tubular o del tracto urinario, cicatriz de infecciones previas, reflujo vesico-uretral, cálculo renal, diabetes y otras alteraciones como la diseminación hematógena. Su localización típica es la unión corticomedular, manifestándose con fiebre, pérdida de peso, diaforesis nocturna, anorexia y dolor en el flanco comprometido. Puede presentarse síntomas como polaquiuria, disuria, hematuria y retención urinaria, con evidencia de masa palpable o dolor a la palpación en el ángulo costovertebral. El diagnóstico definitivo se hace mediante urografía excretora, nefrograma, ecografía o tomografía axial computarizada o gamagrafía renal con galium (Borrero R. Jaime, 2004).

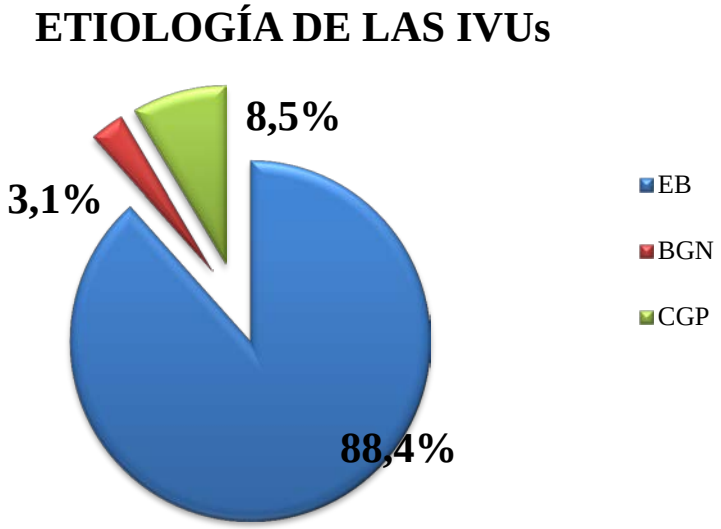
2.5 ETIOLOGÍA

La etiología varía con cada una de estas circunstancias. El 95-98% de las IVUs ambulatorias son bacterianas, siendo las restantes debidas a protozoos y hongos. Las infecciones micóticas se incrementan en pacientes instrumentados, transplantados o con intenso tratamiento antibacteriano (Casellas, 2008). Cabe recalcar que puede haber una gran diferencia entre los aislamientos que se obtienen a partir de un episodio inicial, de una IVU complicada y una IVU recurrente. El origen más común de estas infecciones es bacteriano y el microorganismo patógeno envuelto en un 70-95% de los casos es sin duda la *Escherichia coli* (Travis J. Wiles, 2008). Pero es importante saber que los patógenos tradicionalmente asociados con la infección del tracto urinario están cambiando muchas de sus características, en particular debido a la resistencia a los antimicrobianos (Allan Ronald, 2002).

La etiología de las IVUs varía según la complicación, sexo y grupo etario. También está relacionada con la complicación de las infecciones, considerando infecciones complicadas a aquellas que se presentan en pacientes hospitalizados y/o con malformaciones anatómicas, fallas funcionales (ej: reflujo vésico-uretral), obstrucciones de la vía urinaria (ej: litiasis), que han sido sometidos a instrumentación de la vía urinaria o a cirugía o que presentan enfermedades basales que favorecen la IU, (diabetes, injuria espinal). En ausencia de estos factores se consideran las IVUs como no complicadas.

La etiología de las IVUs también se ve afectada por factores subyacentes del hospedador que complican la infección, como la edad, la diabetes, lesiones de la médula espinal, o cateterismo. Por consiguiente, las IVUs complicadas tienen una etiología más diversa que las IVUs no complicadas, y los organismos que raramente causan la enfermedad en pacientes sanos pueden causar enfermedad significativa en hospedadores con antecedentes de enfermedades con anormalidades anatómicas, metabólicas o inmunológicas. En las IVUs recurrentes, en especial las que están asociadas a anormalidades congénitas, aumenta el número de aislamientos de otras especies bacterianas como: *Proteus spp, Klebsiella spp, Enterobacter spp, Pseudomonas spp,* e inclusive *Acinetobacter spp,* cocos Gram positivos como *Enterococcus spp, S. saprophyticus* y *S. epidermidis.*

En presencia de alteraciones fisiológicas o anatómicas del tracto urinario se aíslan microorganismos menos frecuentes, también es posible obtener cultivos polimicrobianos, tomando en cuenta que el 85-90% de las IVUs son monomicrobianas, y esto puede ser por causa de que estos pacientes son sometidos a tratamientos antimicrobianos repetidos y/o instrumentales (Farinati Alicia E., 1996) *Ver Gráfica 1*.



***Gráfica N° 1*:** Distribución general de los diferentes microorganismos en la etiología de las IVUs. EB: Enterobacterias, BGN: Bacilos Gram negativos No fermentadores, CGP: Cocos Gram Positivos (Farinati Alicia E., 1996).

La *Escherichia coli* es una bacteria parte de la familia *Enterobacteriaceae*. Morfológicamente es un bacilo Gram (-) aerobio-anaerobio facultativo, no esporulan, son mótiles debido a que poseen flagelos perítricos; crecen en medios con lactosa, glucosa, entre otros carbohidratos, la investigación de estos azúcares constituye parámetros importantes para su investigación. Es un habitante común del tracto intestinal y no sólo está presente en seres humanos sino en muchas especies de animales, mamíferos especialmente. Es uno de los organismos de vida libre más estudiados en el campo de la microbiología y biotecnología, tanto por sus características bioquímicas como metabólicas y patológicas (Tenaillon Olivier, 2010).

Escherichia coli es un grupo muy diverso de especies bacterianas con la habilidad de colonizar y persistir en el ambiente y en hospedadores animales. *E. coli* y otras bacterias comensales de los mamíferos frecuentemente forman una relación simbiótica muy estrecha con sus hospedadores, proveyendo de nutrientes, señales clave para el desarrollo de la regulación de la inmunidad y protección contra agentes extraños (Travis J. Wiles, 2008).

Generalmente *E. coli* juega un papel importante promoviendo la estabilidad de la flora microbial luminal y manteniendo la homeostasis intestinal. Como comensal la *E. coli* permanece sin causar daño limitada al lumen intestinal y rara vez causa una enfermedad, sin embargo, en huéspedes debilitados e inmunosuprimidos, o cuando las barreras gastrointestinales son violadas, incluso las cepas comensales no patógenas de *E. coli* pueden causar una infección (Bien Justyna, 2012). Existe una gran variedad de cepas de *Escherichia coli* caracterizadas por las propiedades clínicas, por las patologías que provocan y por sus factores de virulencia. Las cepas de *E. coli* pueden ser clasificadas en comensales, patógenas intraintestinales y patógenas extraintestinales (Abe Cecilia M., 2008).

Algunas cepas de *E. coli* pueden divergir de las cepas comensales, por su carácter más patógeno y la capacidad de causar graves enfermedades tanto en el tracto intestinal y en otros lugares dentro del hospedador. A estas cepas patógenas se las ha colocado dentro de otra categoría, las cepas patogénicas de *E. coli* se clasifican ya sean *E. coli* entéricas/diarreogénicas o *E. coli* extraintestinales (ExPEC). Varios de los patotipos entérico/diarreogénicas de *E. coli* dan lugar a gastroenteritis pero rara vez causan enfermedad fuera del tracto intestinal. Por otro lado, las cepas ExPEC mantienen la capacidad de sobrevivir en el intestino sin causar daño, sin

embargo también tienen la capacidad de difundir y colonizar otros nichos incluyendo la sangre, el sistema nervioso central y el tracto urinario, provocando una infección e inclusive sepsis mortales (Bien Justyna, 2012) (Travis J. Wiles, 2008). Las cepas patógenas entéricas y extraintestinales son las siguientes:

Escherichia coli Enterotoxigénica (ETEC)

Escherichia coli Enteropatógena clásica (EPEC)

Escherichia coli Enteroinvasiva (EIEC)

Escherichia coli de Adherencia difusa (DAEC)

Escherichia coli Enteroagregativa (EAEC)

Escherichia coli de Meningitis neonatal (NMEC)

Se ha identificado a la *Escherichia coli* Uropatógena (UPEC) con características fenotípicas idénticas y características genotípicas compartidas con las cepas bacterianas de la flora fecal y las patógenas entéricas, pero con la diferencia de que manifiestan una alta preferencia y potencial de adherencia a las células constitutivas del epitelio vaginal y urinario (Duplessis Christopher, 2011). Estas cepas uropatógenas son las causantes más frecuentes de IVUs, éstas constituyen infecciones extraintestinales. La mayoría de cepas UPECs son las responsables de las IVUs, muchas de éstas son clonales, es decir cepas idénticas, razón por la que no existe un perfil fenotípico que las identifique como las causantes de estas infecciones (Kaper James B, 2004).

Los distintos patotipos de *E. coli* tienden a ser grupos que se distinguen por compartir algunos tipos de antígenos, por tanto se las ha separado en distintos serogrupos (Wanderley Dias da Silveira, 2001). Se define serogrupo como el conjunto de cepas que comparten una variedad antigénica teniendo en cuenta sólo los antígenos O (lipopolisacáridos); por otro lado los

serotipos son definidos por la combinación de los antígenos O y H (flagelar) y a veces del antígeno capsular o K (Kaper James B, 2004).

Como ya se nombró con anterioridad la UPEC es el microorganismo más frecuente con un 70-95% de los asilamientos en las IVUs, el resto de las infecciones son producidas por otras enterobacterias, como *Proteus mirabilis* y *Klebsiella* spp. También se ha encontrado *Streptococcus saprophytus* como un agente causal frecuente de IVUs en mujeres con actividad sexual. La UPEC también interviene en un gran porcentaje en las IVUs nosocomiales (50%) (Zhang Lixin, 2003), en otras infecciones se puede mencionar otros agentes etiológicos como: *Enterobacter, Citrobacter, Pseudomonas aeruginosa, Serratia, Providencia, Morganella* y gérmenes grampositivos como *Enterococcus, Streptococcus* y *Staphylococcus epidermidis.* La proporción de infecciones causadas por *Candida* está incrementada (González Monte, 2011).

Las diferencias entre la IVU en la comunidad y la nosocomial se deben básicamente al aumento de las resistencias bacterianas, el déficit inmunológico en general, los cambios en la composición de la flora gastrointestinal de los pacientes ingresados, la frecuente instrumentación urológica y las propias alteraciones estructurales u obstructivas del aparato urinario (González Monte, 2011); pero en ambos tipos de infecciones el agente etiológico principal es la UPEC, por lo que se concluye que son las bacterias más comúnmente asociadas a las enfermedades humanas, a diferencia de las otras cepas patógenas (Travis J. Wiles, 2008).

En Ecuador se desconocen los datos estadísticos reales de prevalencia e incidencia de las IVUs. El estudio realizado en la Provincia de Chimborazo en el año 2009 en una población de mujeres embarazadas y hospitalizadas, indicó una incidencia de IVUs del 52%. Los gérmenes aislados en mayor número fueron *Escherichia coli* en un 73% y *Proteus spp* en un 27% (Santana Mera, 2009). Demostrando así que en nuestra población *E. coli* es el agente causal de IVUs más importante.

2.6 PATOGÉNESIS

Las vías urinarias son normalmente estériles, con excepción de la uretra, que es el conducto de comunicación entre las demás vías urinarias y la vagina. Dicha esterilidad es

conservada por un conjunto de mecanismos de defensa, de los cuales el más importante es el vaciamiento sin impedimentos del contenido vesical, las causas que impiden el paso normal de la orina pueden ser anatómicas como: cicatrices renales, uréteres mal formados, etc., fisiológicas como: modificaciones de la capacidad peristáltica de excreción durante el embarazo ó retención urinaria de cualquier etiología, o por presencia de cuerpos extraños como cálculos y sondas. Sin embargo, la presencia de IVUs asintomáticas o sintomáticas y la relevante presencia de *E. coli* nos hace suponer que existen otros factores que influyen en la aparición de IVUs (Farinati Alicia E., 1996).

La capacidad de las UPECs para causar IVUs sintomáticas se asocia con la expresión de un amplio espectro de factores de virulencia, las moléculas de adhesión son sin duda los más importantes determinantes de patogenicidad. Un establecimiento exitoso de la infección bacteriana necesita de la adhesión a las células huésped, la colonización de los tejidos y en ciertos casos, la invasión celular, seguida de la multiplicación intracelular, la difusión a otros tejidos, y/o la persistencia bacteriana. (Bien Justyna, 2012).

Diversos estudios sobre el tema evidencian la capacidad patógena de las bacterias y se han referido de forma casi exclusiva a *E. coli* por su alta prevalencia en las IVUs en particular en las no obstructivas. La mayoría de las IVUs son causadas por la flora bacteriana normal que entran en el tracto urinario en forma ascendente a través de la uretra desde el intestino a la vagina. Las cepas de *E. coli* que tienen predilección por el sistema urinario son conocidas como uropatógenas, ellas tienen factores únicos que contribuyen a su capacidad de causar infecciones urinarias, como la promoción de estructuras de adherencia, toxinas y recubrimientos de polisacárido, dichos factores de virulencia tienen la habilidad para producir infecciones de vías urinarias, estos factores permiten al microorganismo atacar, invadir, encontrar nutrientes e inclusive eludir al sistema inmune (Duplessis Christopher, 2011). No es la presencia, sino más bien la expresión de estos factores de virulencia del organismo que permiten su adherencia en el epitelio. Esto es seguido por la migración dentro de la vejiga con invasión del uroepitelio que conduce a síntomas secundarios y a la respuesta inflamatoria (Chung Amanda, 2010).

Se cree que un depósito principal de los aislamientos de UPEC está dentro del tracto intestinal humano, como germen aislado responsable de una IVU en un individuo dado a menudo coincide con aislamientos rectales de esa misma. En algunos casos, la difusión de un

único grupo clonal de las cepas UPEC puede ocurrir dentro de una comunidad a través de alimentos contaminados o de otros bienes de consumo. Además las cepas de UPECs aisladas de pacientes sexualmente activas a menudo coincide con aislamientos fecales de sus parejas, indicando que las IVUs pueden ser trasmitidas por vía sexual (Travis J. Wiles, 2008). La *E. coli* Uropatógena está relacionada con la mayoría de patologías urinarias ya sean no complicadas, complicadas y recurrentes por ejemplo con la bacteriuria asintomática, cistitis, pielonefritis severa. Puede producir insuficiencia renal aguda en individuos sanos así como en pacientes con trasplante renal (Bien Justyna, 2012).

Las IVUs no complicadas ocurren en personas con anatomía urinaria y sistema inmunológico intacto, son de las enfermedades más comúnmente atendidas en la consulta externa o primaria de salud y por lo general se manifiestan en mujeres jóvenes y adultas. La mayoría de las infecciones no complicadas responden bien al tratamiento antibiótico, siempre que éste sea el adecuado (Gómariz M, 1998). Las IVUs complicadas se diferencian de las anteriores en que se manifiestan en hombres y mujeres que presentan una anormalidad estructural y funcional ó también en individuos que presentan una disposición a manifestar la enfermedad y que se encuentran inmunocomprometidos. En muchos de estos casos la resistencia al tratamiento antibiótico es más difícil de controlar.

Se define que un paciente tiene una IVU recurrente (IVU-R) cuando presenta tres o más IVUs sintomáticas en el plazo de doce meses o cuando presenta dos o más IVUs sintomáticas en seis meses. La recurrencia puede deberse a una re-infección o a una recaída. En la gran mayoría de los casos (95%) la IVU-R se debe a una re-infección, la cual es producida por una bacteria proveniente desde fuera del tracto urinario, cuyo reservorio es la microbiota intestinal, y generalmente se presenta después de dos semanas del tratamiento del episodio inicial. La recaída o persistencia bacteriana es muy infrecuente (menos de 5%) y es producida por la misma bacteria desde un foco dentro del tracto urinario, en las primeras dos semanas después del tratamiento inicial y tiene la importancia que sus causas son curables (Valdevenito S., 2008).

2.7 FACTORES DE RIESGO

Al margen de situaciones fisiológicas como la edad, el sexo o el embarazo, existen otras circunstancias que favorecen el desarrollo de IVUs, y las alteraciones orgánicas y/o funcionales del aparato urinario se pueden asociar con relativa frecuencia a infección urinaria.

2.7.1 Pre menopausia

El 90 % de la flora vaginal la constituyen lactobacilos que previenen la colonización con uropatógenos, especialmente de *E. coli*. Los factores de riesgo pueden o no relacionarse entonces con ciertos hábitos o conductas.

- Factores conductuales: Frecuencia de relaciones sexuales, empleo de espermicidas o cambio de parejas. Estas circunstancias incrementan la colonización perineal y vulvovaginal por enterobacterias, sobre todo por *E. coli.*
- No conductuales: Alteración de la evacuación vesical: Mayor tono miccional del esfínter externo, historia de IVUs antes de los 15 años, historia materna de IVUs, diabetes mellitus.

2.7.2 Postmenopausia

La disminución de estrógenos produce adelgazamiento de la mucosa vulvovaginal y depleción de glucógeno que condiciona un ambiente hostil para los lactobacilos que decrecen en número, aumenta el pH vaginal y la propensión a que los uropatógenos colonicen. Las mujeres no secretoras de antígenos de compatibilidad de grupo sanguíneo tienen aumentado el riesgo de IVUs recurrentes, como resultado de la unión de las fimbrias P de la *E. coli* a los glucolípidos del epitelio vaginal y uroepitelio. El status no secretor es más significativo como factor de riesgo en la postmenopausia que en la pre menopausia (Annette Epp, 2010).

2.8 FACTORES DE VIRULENCIA

La *Escherichia coli* Uropatógena (UPEC) necesita de propiedades especiales que le permitan superar la barreras defensivas del huésped y las desventajas en nuevos entornos. Virulencia proviene de la palabra en latín *venenoso* se define como la capacidad de un organismo para causar enfermedad en un hospedador en particular, y en la *E. coli* la virulencia es el resultado de la combinación de una o más propiedades especiales o factores de virulencia (FVs) (Johnson, 1991).

La *E. coli* Uropatógena (UPEC) pertenece a un grupo muy diverso de bacterias que presentan algunos factores de virulencia relacionados con la agresividad, la colonización, hallazgo de nutrientes y la permanencia de la bacteria en la mucosa del uroepitelio, provocando una reacción inflamatoria y rompen la inercia de la primera barrera que es la mucosa epitelial. Estos factores de virulencia específicos se adquieren a través de la transferencia horizontal de ADN por medio de transposones, plásmidos, bacteriófagos, y las islas de patogenicidad (PAIs), que confieren una mayor capacidad de adaptación a nuevos nichos y ayudan a las bacterias a aumentar la capacidad de causar un amplio espectro de enfermedades (Bien Justyna, 2012). Estos factores de virulencia incluyen ciertos antígenos somáticos que determinan la variedad antigénica.

Los factores de virulencia de *E. coli* son de dos tipos principales: los producidos en la superficie de la célula y los producidos dentro de la célula que son luego exportados al sitio de acción (L. Emödy, 2003), y se los engloba en los siguientes grupos: Adhesinas (Fimbria P, Fimbria tipo 1, fimbria S y F1C, Adhesina afimbrial); Toxinas (Hemolisina, Factor Citotóxico Necrotizante; Sideróforo: El sistema Aerobactina); Capas de polisacáridos Grupo II capsular y Proteína específica uropatogénica (*usp*). Los factores de virulencia (VFs) identificados y asociados a la *Escherichia coli* Uropatógena se encuentran enlistados en la *Tabla N°1* y en la *Tabla N°2*.

Una característica importante reside en el hecho de que distintos subgrupos de cepas UPECs presentan distintas combinaciones de factores de virulencia que participan en la etiología de las IVUs, tales como adhesinas específicas, incluyendo las fimbrias P (Pap), fimbria

tipo 1 y otras fimbrias (F1C, S, M y Dr), además de toxinas como hemolisina, factor citotóxico necrotizante y de la proteasa autotransportada Sat.

Los genes analizados en este estudio son del tipo que se halla en la superficie bacteriana como también del tipo que es exportado desde el interior de la célula. Los alelos *papG* codificadores de las fimbrias P y el gen *fimH* que codifica a la fimbria tipo 1 son factores de virulencia que se encuentran en la superficie de la membrana de la bacteria; los genes *hlyA* y *usp* codificantes de la α-hemolisina y proteína uropatógena respectivamente, son factores de virulencia que se remiten desde el citoplasma de la *E. coli* hacia el exterior cuando es necesaria su acción sobre el hospedador.

Se ha demostrado recientemente que los genes responsables de la producción de los factores de virulencia que caracterizan a la *Escherichia coli* Uropatógena no se encuentran aislados en el cromosoma bacteriano, sino agrupados en fragmentos de ADN muy particulares denominados “islas de patogenicidad” o PAI (Andreu-Domingo, 2005), normalmente estas regiones de ADN exhiben un alto grado de diversidad genética, debido a la posesión de genes de virulencia especializados. Estos bloques son elementos genéticos móviles y que están formandos de grandes conjuntos de genes de virulencia que se insertan en el genoma de la *E. coli* (Bauer Richard J., 2002). Normalmente, estas secuencias son grandes bloques (mayores a 0,30 kb) de ADN insertados dentro o cerca de los genes del ARNt, contienen repeticiones directas y secuencias de inserción, por lo que tienen un gran porcentaje de GC que difiere del resto del genoma, codifican y definen los determinantes de virulencia, razón por la que tales secuencias están muy extendidas entre las cepas uropatógenas (Guyer M. Debra, 1998). Se conoce que las PAIs se forman de los mecanismos de transferencia horizontal de genes de virulencia entre los linajes dentro de muchas especies, esta transferencia se da por elementos móviles como transposones, plásmidos y fagos, todos estos elementos contribuyen a la creación de nuevos patotipos mucho más eficientes que provocan infecciones. (James R. Johnson, 2000) (Oelschlaeger Tobias A., 2002). Las cepas uropatogénicas de *E. coli* han demostrado que contienen estos bloques de ADN ó islas de patogenicidad (PAIs) de que contribuyen a su virulencia.

Existe una amplia variedad de elementos genéticos móviles, entre los cuales se encuentran los integrones, que no son sino cassettes de resistencia a los antibióticos (segmentos de ADN circular) que se unen a los genomas procariotas; en el caso de las UPECs, estudios han reportado una alta prevalencia cassettes de resistencia en estas cepas, promoviendo de esta manera un incremento en la tasa de resistencia.

2.9 FACTORES DE VIRULENCIA DE *Escherichia coli* Uropatógena.

Todas las especies de *Escherichia coli* están formadas de una gran variedad de factores de virulencia (FVs). Los FVs son componentes especiales o productos incluidos en el genoma bacteriano que contribuyen conjuntamente a potenciar la patogenicidad bacteriana. Estos factores pueden ser de adherencia, hemólisis, toxinas, sideróforos, sistemas de secreción y en muchos casos de resistencia. Pueden estar codificados por plásmidos, fagos y transposones. Las UPECs, son un grupo de bacterias genéticamente heterogéneo que presentan varios VFs asociados con la colonización y persistencia de las bacterias en el tracto urinario (Ribeiro Tiba Monique, 2008). Estos factores de virulencia son componentes o productos especiales que permiten a las UPECs colonizar selectivamente la mucosa del uroepitelio, provocando una reacción inflamatoria y eventualmente ascender de las vías urinarias inferiores a las cavidades renales y tejidos superiores (L. Emödy, 2003).

Los factores de virulencia (VFS) asociados con la UPEC incluyen adhesinas, toxinas, sideróforos y recubrimientos de polisacáridos como las cápsulas. Recientemente un nuevo gen codificador de urovirulencia fue encontrado con mayor frecuencia en las cepas de UPECs. Este gen codifica una proteína, *usp* (proteína específica uropatógena). Se ha demostrado que incrementa significativamente la capacidad de infección de *E. coli* en modelos hallados en ratones con IVUs (Ribeiro Tiba Monique, 2008).

2.9.1 Factores de virulencia de Superficie.

Los factores de virulencia de superficie incluyen un número de diferentes tipos de organelos de adhesión, principalmente de naturaleza fimbrial (Bartková G., 1994). Estas

fimbrias son estructuras en forma de varilla de 5-10 nm de diámetro que son distintos de los flagelos (Kaper James B, 2004), son proyecciones digitiformes, también llamadas Pili, que se unen a glicoproteínas en el uroepitelio a través de sitios conocidos como adhesinas, que promueven la unión bacteriana a los tejidos del huésped en el tracto urinario. Esta unión permite a las UPECs evitar ser arrastradas por la orina mientras está pasando por el sistema urinario.

La adherencia de un patógeno a la superficie epitelial representa un paso gigante en el inicio de la infección bacteriana. La presentación de las moléculas adhesivas (adhesinas) por las UPECs, es el determinante más importante de la patogenicidad bacteriana. Las adhesinas de esta bacteria pueden contribuir a la virulencia de diferentes maneras:

1) En la activación directa de las vías de señalización en células bacterianas.
2) Facilitar el suministro de otros productos bacterianos a los tejidos del huésped.
3) El impulso de la invasión bacteriana.

Entre las primeras adhesinas descubiertas están las Fimbrias tipo 1 o Pili tipo 1, que promueven la adhesión, la invasión y el crecimiento en forma de biofilms. Las fimbrias tipo 1 están implicadas como VFs en infecciones del tracto urinario en animales, aunque su función en las infecciones humanas todavía es un poco incierta. Las fimbrias reconocen los mano-oligosacáridos que se presentan de forma natural en las glicoproteínas de superficie de las células de los hospedadores. Las fimbrias tipo 1 se unen a las glicoproteínas uroteliales manosiladas, Uroplakina Ia y IIIa (UPIIIa) a través de la subunidad adhesina FimH, ubicada en el extremo fimbrial *(Véase Figura 1).* Las variaciones alélicas del gen *fimH* determinan la especificidad del azúcar de estas fimbrias. El receptor fisiológico primario para FimH en el tracto urinario es UPIa, una glicoproteína de alto contenido de manosa presente en abundancia en las células superficiales del epitelio de la vejiga, FimH puede unirse también a los mananos de las levaduras y mediar la aglutinación de éstas y de los glóbulos rojos en la sangre. (Bouckaert Julie, 2006). Dicha interacción conduce a la fosforilación en eventos moleculares, que son necesarios para la estimulación de las vías de señalización implicadas en la invasión y la apoptosis, también puede contribuir a la elevación del nivel de $Ca2^{+}$ intracelular en células uroteliales. Las mutaciones patoadaptativas juegan un papel muy importante en el tropismo tisular y la infectividad de fimbrias tipo 1 de *E. coli.* (Bien Justyna, 2012). El gen *fimH*

determina la invasión por las fimbrias de tipo 1 mediante un componente que está en el extremo de estas fimbrias y que adhiere los pilus tipo 1 no sólo a las células de la mucosa vesical sino además a los mastocitos donde las bacterias quedan protegidas de los anticuerpos y antibacterianos (Casellas, 2008).

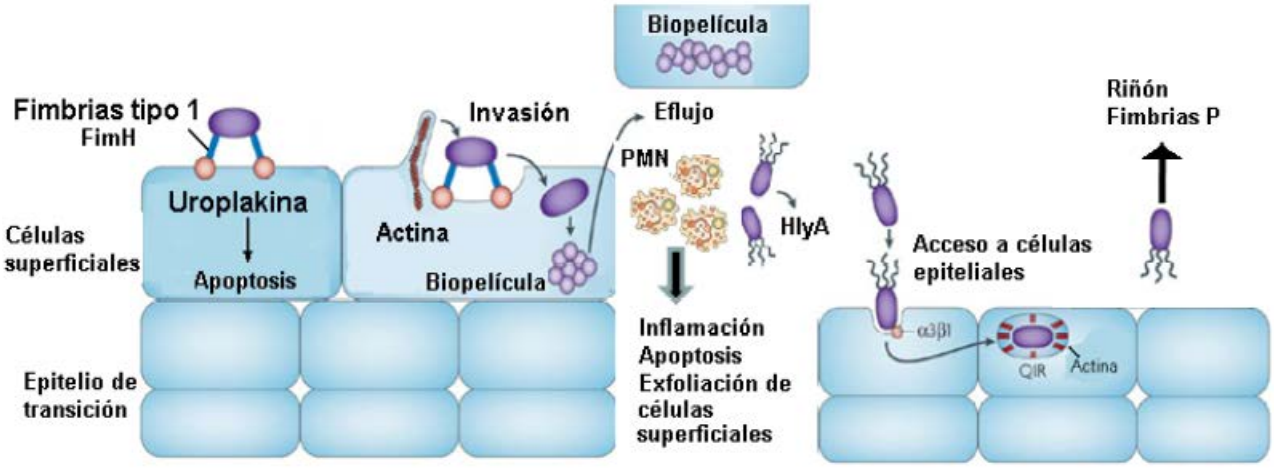


Fig 1: Ilustración de la acción de las Fimbrias tipo 1 de *Escherichia coli* Uropatógena en la células superficiales del riñón (Cerquetti, 2012)**.** La *E. coli* Uropatógena (UPEC) se une al epitelio de la vejiga a través de las fimbrias tipo 1 o pili tipo 1, que se unen a los receptores de la Uroplakina Ia y IIIa, lo que estimula la unión vías de señalización desconocidas que modulan la invasión celular y la apoptosis (Croxen Matthew A., 2010).

La Fimbria P es el segundo factor de virulencia más común que cumple un papel importante en las IVUs ascendentes y la pielonefritis y son responsables de la adhesión en la mucosa y el tejido madre y de la producción de citoquinas. De las fimbrias P se sabe que contribuyen a la patogénesis fomentando la colonización bacteriana de los tejidos uroepiteliales y a la estimulación de una respuesta inflamatoria perjudicial para el huésped (Ribeiro Tiba Monique, 2008). La fimbria P está formada de fibras héteropoliméricas compuesta por diferentes subunidades proteicas. Estas fimbrias reconocen glucoesfingolípidos renales que llevan la α Gal (1-4) Gal, factor determinante en el epitelio renal a través de la adhesina *papG*. El contacto molecular entre la superficie de la mucosa y el lipopolisacárido (LPS) induce la

señalización transmembrana independiente y la activación de las células epiteliales (L. Emödy, 2003).

Algunos estudios han demostrado que un 90% de las cepas de *E. coli* aisladas en orina que causan pielonefritis (PNF) poseen fimbria P (M. Torres, 2008) mientras que las cepas aisladas de pacientes con cistitis y bacteriuria asintomática (ABU) expresan esta adhesina con menos frecuencia (Bartková G., 1994).

Las fimbrias P presentan tres variantes moleculares (I, II y III) que son codificadas por los correspondientes alelos (*papG* alelo I, *papG* alelo II, *papG* alelo III) (Gibreel, 2011) y se unen a receptores distintos. Posiblemente estas variantes ejercen funciones patogénicas distintas. El alelo *papG* clase II es el gen predominante de las fimbrias P, es de especial importancia en la producción de pielonefritis. Ello se debe a que sus receptores, constituidos por los glucoesfingolípidos Gal(α1-4)Gal contenidos en los antígenos del grupo sanguíneo P, se encuentran en la vagina, la vejiga, los uréteres y los túbulos renales, lo que facilita la ascensión de los *E. coli* con fimbrias P a la pelvis renal (Andreu-Domingo, 2005).

Recientemente se han definido funciones sinérgicas previamente desconocidas de ambos tipos de fimbrias, fimbria tipo 1 y fimbria P, que facilitan la colonización bacteriana. Las fimbrias P aumentan la colonización temprana del epitelio tubular, mientras que las fimbrias tipo 1 median la colonización del centro del túbulo a través de un mecanismo que involucra la unión interbacterial y la formación de biopelículas. Las fimbrias S y F1C también han sido implicadas en el proceso de ITU. Ambas muestran eficiencia al vincularse a las líneas celulares epiteliales y endoepiteliales derivadas del tracto urinario inferior y el riñón (L. Emödy, 2003). Las fimbrias S ayudan y facilitan la diseminación bacteriana dentro de los tejidos del huésped y se asocian a menudo con las cepas de *E. coli* que causan sepsis, meningitis, infecciones del tracto urinario ascendentes (Bien Justyna, 2012). Las fimbrias delgadas ó también conocidas como Curli, se expresan alrededor del 50% de las cepas de *E. coli.* Se expresan de forma óptima a temperatura ambiente y de esta manera ellas pueden promover la colonización del área perineal dando como inicio a la infección de vías urinarias (Kaper James B, 2004).

Todas las especias productoras de fimbrias antes expuestas son también capaces de unirse a varias matrices de componentes facilitando la invasión de los tejidos por el patógeno. Las unidades menores que se posicionan próximas a la subunidad de la adhesina son las responsables de esta función en el caso de las fimbrias P y S (L. Emödy, 2003).

Los lipopolisacáridos capsulares O y K, juntos sirven como una herramienta importante para diferenciar las UPECs de otras cepas de *E. coli,* su función es la de resistencia sérica y antifagocítica respectivamente. Ciertos tipos del antígeno O que exhiben una actividad anticomplementaria se asocian con *E. coli* aisladas de infecciones urinarias, (como los tipos O1, O2, O4, O6, O16, O18, O22, O25 y O75). Y otros tipos de antígeno K comúnmente detectado entre los aislados de pacientes con IVUs, en comparación con los aislados fecales K1 y K5 se detectaron en un 63% de los aislamientos de las mujeres con pielonefritis (Gibreel, 2011).

2.9.2 Factores de virulencia exportados desde el interior de la célula.

Los factores de virulencia que son exportados desempeñan varios papeles biológicos en la etiología de las infecciones por UPEC. Sus actividades incluyen el aumento en la disponibilidad y captación de hierro, invasión celular por medio de la lisis y ruptura de la capa de mucina y del epitelio, así como la modulación e inducción del ciclo celular, reacciones inflamatorias y apoptosis (Faleiro Naves, 2009).

El factor patógeno de virulencia exportado más importante de *E. coli* urinaria es α-hemolisina. Esta es una toxina formadora de poros ó “toxina de repetición” (RTX) con un espectro de células diana muy amplio incluyendo no solamente los eritrocitos, sino también leucocitos, células renales epiteliales y endoteliales, demostrando así que la virulencia de la α-hemolisina aporta de manera significativa a la nefropatogenicidad, de manera similar a la estreptolisina-O, la α-hemolisina de la UPEC provoca la síntesis de anticuerpos específicos durante el proceso de la infección y los datos de títulos elevados de anticuerpos anti-α-hemolíticos podrían ser detectados en pacientes que sufren de infección causada por cepas de *E. coli* α-hemolíticas. Este patógeno es el agente causal de la crisis hemolítica aguda en un hospedadores inmunocomprometidos.

Un factor candidato de virulencia uropatogénica tóxica es el factor citotóxico necrosante 1 (CNF1). Los estudios *in vitro* muestran que interfiere con la fagocitosis polimorfonuclear, y evoca la muerte apoptótica de las células epiteliales de la vejiga.

La toxina secretada autotransportada (SAT), es un autotransportador de serina proteasa, que está asociada con las cepas de UPECs que producen pielonefritis, y tienen una actividad tóxica agresiva frente a las células de la vejiga y el riñón.

La producción de la toxina de distensión citoletal (CDT) y citolisina A, se presentan en varios patógenos Gram-negativos clínicamente importantes y han sido también detectadas en las cepas de UPEC. La primera detiene el ciclo celular, y la segunda causa apoptosis de las células hospedador, papel patogénico, sin embargo, aún no ha sido dilucidado.

Las UPECs que crecen bajo condiciones restringidas de hierro necesitan de mecanismos bacterianos para obtener de una manera exitosa el hierro necesario del hospedador, para iniciar los procesos de cadena de transporte de electrones. Las moléculas conocidas como Sideróforos que tienen un bajo peso molecular, como el sistema aerobactina, enterobactina y yersiniabactina, están involucradas en el proceso de captación de hierro. Estos compuestos son exportados de la célula bacteriana para obtener el hierro férrico de las moléculas quelantes del huésped. Como se mencionó anteriormente, las moléculas receptoras en la membrana externa bacteriana organizan el transporte y la utilización del hierro unido a un sideróforo (L. Emödy, 2003).

La proteína específica uropatógena, codificada por el gen *usp* desempeña un papel en la pielonefritis y la colonización de la zona periuretral. Es homóloga al gen de Vibrio cholerae que codifica para la toxina zonula occludens, dicha toxina aumenta la permeabilidad intestinal mediante la interacción de un receptor con la célula de un mamífero provocando la posterior activación de la señalización intracelular que conduce al desmontaje de las estrechas uniones intercelulares (Di Pierro M, 2001).

Tabla Nº1

Factores de Virulencia de *Escherichia coli* Uropatógena de superficie

Factor de Virulencia	Función
1. En la Superficie	
1.1 Fimbria tipo 1	Adhesión al epitelio de la mucosa y a la matriz tisular, invasión, formación de biopelícula.
1.2 Fimbria P	Adhesión al epitelio de la mucosa y a la matriz tisular, inducción de citocinas.
1.3 Fimbria S	Adhesión a las células de la mucosa, células endoteliales y a la matriz tisular.
1.4 Fimbria F1C	Adhesión a las células de la mucosa y endoteliales.
1.5 Curli	Adhesión a las células de la mucosa y a la matriz tisular, formación de biopelícula.
1.6 Flagelo	Motilidad
1.7 Cápsula	Efectos antifagocitario y anticomplemento, resistencia sérica, evasión del reconocimiento inmune.
1.8 Lipopolisacarido	Efectos endotóxicos, antígeno O, inducción de citocinas, resistencia sérica, inmunoadyuvante.
1.9 Proteínas de Membrana externa	Receptor y transporte

Tabla Nº2

Factores de Virulencia de *Escherichia coli* Uropatógena exportados desde el interior de la célula

Factor de Virulencia	Función
2. Exportado desde el interior de la célula	
2.1 α – hemolisina	Citotoxicidad, hemólisis.
2.2 Factor Citotóxico Necrotizante 1	Interferencia en la fagocitosis y apoptosis.
2.3 Toxina secretada autotrasportadora	Citotoxicidad
2.4 Toxina dilatadora citoletal	Citotoxicidad
2.5 Citolosina A	Citotoxicidad
2.6 Enterobactina	Captación de hierro
2.7 Aerobactina	Captación de hierro
2.8 Yersiniabactina	Captación de hierro

2.10 SISTEMAS DE SECRECIÓN.

La secreción de proteínas en bacterias es un área de investigación que ha sido extensamente estudiada en las últimas décadas. Las bacterias secretan un gran número de proteínas al medio extracelular entre las que se incluyen toxinas, adhesinas y diversas enzimas hidrolíticas que se requieren en diferentes aspectos del ciclo de vida bacteriano, por ejemplo, en la biogénesis de organelos, la adquisición de nutrientes y la expresión de factores de virulencia. La mayor parte del trabajo se ha desarrollado en las bacterias Gram-negativas, en las que las proteínas que tienen que translocarse deben atravesar dos barreras lipídicas separadas por el

espacio periplásmico y la capa de peptidoglicano, la membrana citosólica o membrana interna (MI), y la membrana externa (ME) que es una bicapa asimétrica cuya cara exterior está compuesta principalmente por lipopolisacáridos.

Los componentes centrales de la maquinaria principal de translocación, denominada Sistema Sec, en bacterias Gram-negativas y Gram-positivas muestran un alto grado de similitud, lo que sugiere que el mecanismo funcional puede ser el mismo. La diversidad y la amplia variedad de funciones que desempeñan las proteínas secretadas como la proteólisis, hemólisis, citotoxicidad, reacciones de fosforilación, etc.; son translocadas utilizando un número limitado de mecanismos. (González-Pedrajo Bertha, 2003).

Las bacterias Gram-negativas han desarrollado una variedad de vías de secreción para secretar toxinas y enzimas en el medio extracelular. Estas vías son muy diferentes con respecto a su mecanismo funcional y complejidad, y cada sistema tiene sus propias ventajas y limitaciones, en cuanto al número, tamaño, plegamiento y destino de sus sustratos (Koster M, 2000). La secreción de proteínas a través de la membrana externa (ME) bacteriana se lleva a cabo a través de una variedad de mecanismos sencillos de un solo componente hasta sistemas complejos de componentes múltiples. Trabajos recientes han comenzado a revelar la estructura y función de los diversos componentes de secreción y sus mecanismos moleculares (Thanassi DG, 2000) permitiendo así ampliar mucho más a fondo la comprensión sobre los mecanismos de secreción bacteriana y su importancia en cuanto la manifestación de factores de virulencia. Las vías de secreción en las bacterias Gram-negativas han sido clasificadas en cinco grupos principales: secreción tipo I, II, III, IV y los autotransportadores. Dicha clasificación se basa en la naturaleza molecular de las maquinarias de transporte y las reacciones que éstas catalizan.

Los sistemas de secreción se pueden subdividir en dos grandes clases dependiendo del mecanismo que utilicen para el transporte a través de la membrana plasmática. Las vías Sec-dependientes, que utilizan el sistema de secreción denominado Sec, en el que las proteínas que se secretan presentan una secuencia señal o péptido líder en el extremo amino terminal; y las Sec-independientes en las que los sustratos se pueden translocar directamente desde el citosol

hasta el exterior celular sin que exista un intermediario periplásmico, es decir ni una secuencia señal en el amino terminal (González-Pedrajo Bertha, 2003).

A continuación se describen los sistemas de secreción presentes con más frecuencia en bacterias Gram-negativas, y consecuentemente en cepas de *Escherichia coli* Uropatogénica.

2.10.1 SISTEMA DE SECRECIÓN TIPO I (SST1)

Este mecanismo es utilizado por una amplia gama de bacterias para la secreción de toxinas, proteasas y lipasas. Es una vía Sec-independiente, por lo que no se requiere del procesamiento de un péptido líder para atravesar la membrana citoplásmica; la secreción protéica se da en un solo paso desde el citosol hasta el exterior celular. El TSS1 es un sistema simple, que consiste de tres subunidades de proteína: un canal en la membrana externa denominado PME (proteína de membrana externa), un transportador ABC (de sus siglas en inglés ATP *binding cassette*) en la membrana interna (MI) y una proteína periplásmica que también está anclada a la MI y que se denomina PF (proteína de fusión) *(Véase Figura 2)*. Este sistema de secreción transporta diversas moléculas, como iones, medicamentos y proteínas de varios tamaños (de 20 a 100 kDa).

Los sistemas de transporte ABC pertenecen a una superfamilia de transportadores que son también utilizados por bacterias Gram-positivas y que existen en eucariontes, desde la levadura hasta el ser humano (González-Pedrajo Bertha, 2003).

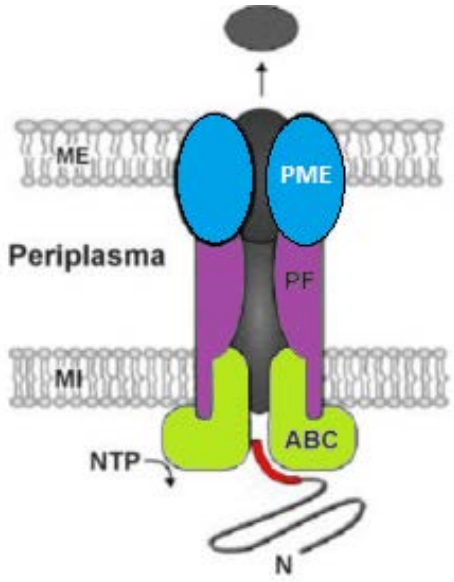


Fig 2: Componentes del TSS1. El sustrato se reconoce a través de una secuencia señal en el extremo carboxilo terminal (marcado en rojo). En este modelo de secreción, la proteína periplásmica de fusión PF interactúa con el transportador ABC en la MI y con la proteína PME que forma un canal en la ME.

El prototipo para ejemplificar este sistema es la secreción de la toxina α-hemolisina (HlyA) en *E. coli*. Dicha toxina se produce principalmente en cepas de *E. coli* que causan infecciones del tracto urinario (*E. coli* uropatógena), y es un factor de virulencia importante debido a su actividad citolítica y citotóxica. La secreción de la hemolisina HlyA requiere al transportador ABC HlyB, a la proteína periplásmica de fusión HlyD y a la proteína TolC que forma un poro en la ME.

2.10.2 SISTEMA DE SECRECIÓN TIPO II (SST2).

El SST2 es responsable de secretar una gran cantidad de enzimas hidrolíticas y toxinas, las sustancias secretadas por este sistema, dependen del sistema Sec para el transporte inicial en el periplasma. Esta vía también se conoce como sistema general de secreción y ocurre en dos etapas:

1) La maquinaria Sec transloca el sustrato con péptido líder a través de la membrana plasmática, por lo que el SST2 es una vía Sec-dependiente. Dicho péptido es generalmente una secuencia corta (de aproximadamente 30 aminoácidos), de los que uno o varios presentan carga positiva, además de una secuencia de 10 a 20 aminoácidos hidrofóbicos.
2) A continuación la proteína pierde el péptido señal y adquiere su conformación nativa en el espacio periplásmico, para posteriormente ser secretada a través de la ME por un complejo sistema multiprotéico llamado tipo II o secretón (González-Pedrajo Bertha, 2003).

La secreción a través de esta vía se diferencia de muchos de los otros sistemas de transporte de membrana en que sus sustratos consisten de proteínas plegadas, el SST2 está compuesto de al menos 12 productos génicos diferentes que se cree forman un complejo multiproteico, que abarca el compartimiento periplasmático y está específicamente requerido para la translocación de las proteínas secretadas a través de la membrana externa.

Los pili de las Gram negativas tipo IV usan una versión modificada del sistema tipo II para su biogénesis, y en algunos casos ciertas proteínas se comparten entre un complejo pilus y el sistema tipo II dentro de una misma especie bacteriana (Sandkvist, 2001).

2.10.3 SISTEMA DE SECRECIÓN TIPO III (SST3)

El estudio de este sistema de secreción constituye un área de investigación que ha sido extensamente estudiada en los últimos años. Es una vía Sec-independiente en la cual la secreción ocurre en un solo paso desde el citosol hasta el exterior celular, y desempeña un papel central en la patogenicidad de muchas bacterias Gram-negativas. Este sistema es homólogo al del cuerpo basal flagelar bacteriano. Se parece a una jeringuilla molecular por la cual una bacteria como *Salmonella*, *Shigella*, o *Yersinia*, puede inyectar proteínas en células eucarióticas. La maquinaria está conservada entre los diferentes patógenos, sin embargo las proteínas secretadas difieren completamente, por lo que el mismo mecanismo de transporte puede generar una amplia gama de enfermedades. Este sistema de secreción fue descubierto en la bacteria

Yersinia pestis, causante de la peste bubónica, y mostró que las toxinas podían ser inyectadas directamente desde el citoplasma bacteriano al citoplasma de las células del anfitrión más que a través del medio extracelular.

A los sistemas de secreción de proteínas tipo III también se los conoce como "injestisomas" los cuales modulan la secreción de un mecanismo de un solo paso y son utilizados por patógenos que interactúan con hospedadores vegetales y animales, ya sea como agentes patógenos o mutualistas, incluyendo *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Yersinia spp.*, *Escherichia coli* enterohemorrágica y enteropatógena y *Pseudomonas aeruginosa* (Fronzes Rémi, 2009) (Tseng Tsai-Tien, 2009). El SST3 transfiere los factores de virulencia de las bacterias Gram-negativas directamente desde el citoplasma bacteriano al citoplasma de una célula eucariota anfitrión en un proceso que puede comprender un solo paso de acoplamiento de energía, donde se pueden modular una gran variedad de funciones de las células huésped, incluyendo la respuesta inmune y defensa contra agentes extraños (Tseng Tsai-Tien, 2009). Algunos estudios apoyan la conclusión de que los aparatos genéticos que codifican estos sistemas han sido adquiridos de forma independiente por diferentes bacterias Gram-negativas, presumiblemente por transferencia lateral de genes. (Nguyen Lily, 2000).

- **Translocación de factores de virulencia**

Tanto el flagelo, como el translocón de secreción de moléculas efectoras, son sistemas complejos que requieren de más de 20 proteínas que se ensamblan en largas estructuras macromoleculares que atraviesan ambas membranas bacterianas, y en los sistemas de virulencia, también la membrana plasmática eucarionte. Es a través de dichos complejos macromoleculares que ocurre el proceso de secreción *(Véase Figura 2)*. El ejemplo prototipo del SSTIII de translocación de factores de virulencia está representado por la secreción de proteínas efectoras denominadas Yops, en la familia de patógenos *Yersiniae.*

- **Biogénesis flagelar**

Además de su papel en la patogénesis, el SST3 se requiere para la biogénesis flagelar. El tipo más común de movilidad bacteriana se da a través del flagelo, un largo filamento helicoidal o propela, que es impulsado por un motor rotatorio embebido en la superficie celular. El conocimiento que se ha generado con el estudio del aparato de exportación y la biosíntesis del flagelo, ha sido de gran importancia para el entendimiento de la biogénesis, regulación y mecanismos de secreción de los sistemas de virulencia, por ejemplo el aparato de exportación flagelar en *S. enterica* es el encargado de reconocer las proteínas a ser exportadas y así en otras especies bacterianas el flagelo cumple una función específica importante en la secreción de factores de virulencia *(Véase Figura 3)* (González-Pedrajo Bertha, 2003).

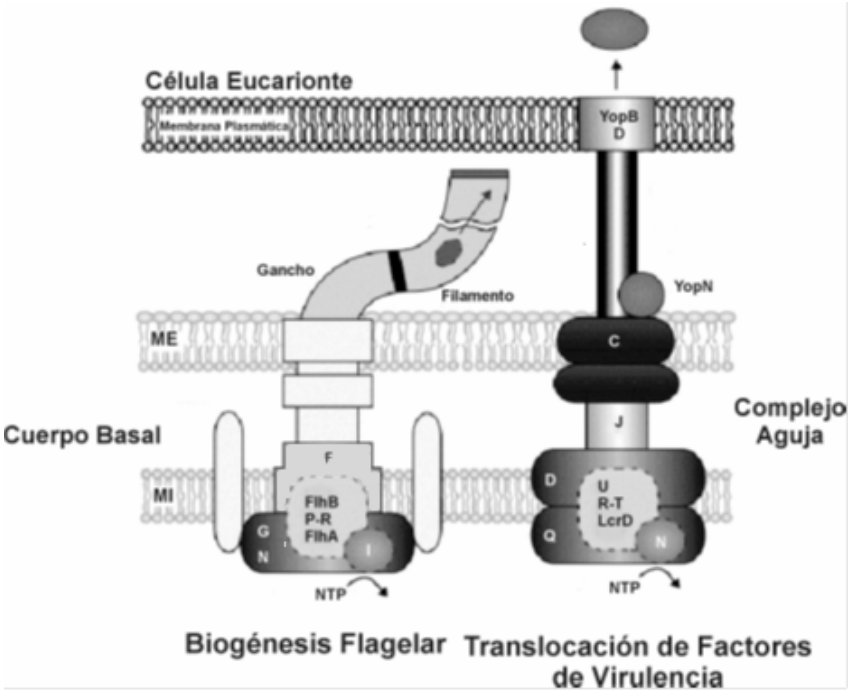


Fig 3: Modelos del sistema de secreción tipo III y la biogénesis flagelar. El SST3 se representa en el lado izquierdo y la biogénesis en el lado derecho. Los componentes del aparato de tipo III son etiquetados de acuerdo con la nomenclatura Yersinia (proteínas Ysc). Las etiquetas en el aparato flagelar corresponden a las proteínas de Fli. Se indican los componentes del cuerpo basal del flagelo bacteriano que son homólogos a los del complejo

aguja del sistema de translocación de factores de virulencia tipo III. Ambos sistemas presentan una serie de anillos en la MI y ME, conectados a través de un canal que cruza el periplasma. Las proteínas se translocan desde el citoplasma hasta el exterior celular por el interior de dichas estructuras. Para la secreción se requiere la energía de la hidrólisis del ATP.

2.10.4 SISTEMA DE SECRECIÓN TIPO IV (SST4)

La secreción de proteínas tipo IV se produce a través de una amplia gama de células procariotas como: las bacterias Gram negativas, Gram positivas, bacterias sin pared celular y algunas *archaeas*. Esta diversidad se refleja en la heterogeneidad de los componentes que constituyen las máquinas de secreción. Las macromoléculas son segregadas en un proceso dependiente de ATP usando un canal de multiproteínas de expansión. Similar a los sistemas de tipo III, este sistema se extiende más allá de la superficie de la célula como una estructura de pili, importante para el contacto directo y la penetración de la superficie de la célula receptora (Zechner Ellen L., 2012). En este sistema se secretan una amplia gama de sustratos, a partir de proteínas simples a complejos de proteína-proteína y proteína-ADN (Fronzes Rémi, 2009). En comparación con otros sistemas de secreción, el sistema de secreción de tipo IV (SST4) es único en su capacidad de transporte de los ácidos nucleicos, además de las proteínas en las células vegetales y animales, así como en las levaduras y otras bacterias. Muchos organismos tienen sistemas de secreción tipo IV homólogos, que incluyen a los siguientes patógenos: *Agrobacterium tumefaciens* C58 (Virb), *Helicobacter pylori* (CAG; COMB), *Pseudomonas aeruginosa* (TraS / TraB), *Bordetella pertussis* (Ptl), *E. coli* (Tra), *Legionella pneumophila* (Dot) y la fijadora de nitrógeno *Mesorhizobium loti* (Tseng Tsai-Tien, 2009). Es un sistema homólogo a la maquinaria de conjugación de las bacterias y los flagelos de *Archaea*. Es capaz de transportar tanto ácidos nucleicos como proteínas. Fue descubierto en *Agrobacterium tumefaciens*, que usa este sistema para introducir el plásmido Ti y proteínas en el anfitrión, lo que desarrolla un tumor. *Helicobacter pylori* usa este sistema de secreción para inyectar Cag A en células epiteliales gástricas. La exportación de la toxina pertussis (agente causante de la tos ferina) por *Bordetella pertussis* se lleva a cabo a través de esta vía y se han identificado sistemas homólogos en diferentes patógenos como *Legionella pneumophila*, causante de la

legionela, utiliza también este sistema para translocar numerosas proteínas efectoras a su anfitrión eucariótico y otros ejemplos como *Brucella suis,* etc. (González-Pedrajo Bertha, 2003).

Los sistemas de secreción tipo IV (SST4) se dividen en tres grupos de acuerdo con su función. El primer grupo transfiere ADN de una célula a otra en un proceso llamado conjugación. La conjugación aumenta la plasticidad del genoma procariótico, y tiene una enorme importancia en el cuidado de la salud humana como uno de los vehículos principales de resistencia extendida hacia los antibióticos entre los agentes patógenos y bacterias huésped por igual. La movilización en bloque de grandes regiones de genes puede transferir de manera eficiente arsenales enteros de módulos funcionales que promueven actividades de supervivencia e infección.

Un segundo subgrupo del SST4 dependiente de pili, es un transmisor de proteínas. Este proceso también depende del contacto directo entre la célula donante y las células receptoras. Una variedad de bacterias que interactúan estrechamente con los anfitriones, tanto los eucariotas patógenos y simbiontes han adoptado TSS4 para transmitir las proteínas bacterianas al citoplasma del huésped. Los ejemplos mejor estudiados son utilizados por patógenos Gram-negativos. Algunos establecen una interacción entre el patógeno y el huésped. Otros inyectan una o varias proteínas efectoras en las células huésped, donde ellas subvierten múltiples funciones celulares de beneficiarse del patógeno infeccioso. La secreción contacto independiente de la proteína es también parte del repertorio SST4 como se ejemplifica más claramente en la secreción de la toxina de la tos ferina por *Bordetella pertussis*. El SST4 de *Neisseria gonorrhoeae* segrega ADN hacia el medio extracelular en lugar de una célula receptora usando mecanismos evolutivamente relacionados con los sistemas de conjugación. El ADN movilizado no está desnudo, pero parece estar ligado a una proteína líder con homología para conjugar relaxasas.

La mayoría de SST4 comprenden tres subestructuras funcionales: pili de la superficie celular o adhesinas que median el contacto entre las células, un canal de transporte que lleva a cabo sustratos a través de la envoltura celular bacteriana, y una proteína de tipo IV de acoplamiento (T4CP) que actúa como sustrato del receptor a la entrada citoplásmica del canal

de secreción. La T4CPs media múltiples interacciones proteína-proteína con el citoplasma y los componentes del sistema de secreción de la membrana interna (IM). La actividad de ATPasa está asociada con la liberación y el despliegue de complejos entre sustratos y las chaperonas específicas y es muy necesaria para energizar el proceso de secreción.

Este sistema tiene un amplio significado clínico, no sólo para suministrar toxinas bacterianas o proteínas efectoras directamente en las células huésped específicas, sino también para la participación directa en fenómenos tales como la formación de biofilms y la rápida propagación horizontal de genes de resistencia a los antibióticos entre la comunidad microbiana (Zechner Ellen L., 2012).

Por otro lado, el hecho de que algunas vías de secreción estén relacionadas evolutiva y funcionalmente con los sistemas de ensamblaje de estructuras macromoleculares de la superficie celular, como el pili tipo IV o el flagelo, ha contribuido significativamente al entendimiento de los mecanismos moleculares que gobiernan la secreción. Sin embargo, son muchas las preguntas que quedan aún por contestar. A largo plazo se espera que con el estudio de los mecanismos en los que se basa la secreción, se puedan desarrollar novedosos agentes terapéuticos para la prevención de diversas enfermedades infecciosas (González-Pedrajo Bertha, 2003). Aunque los sistemas de secreción de tipo IV se han ganado especial atención debido a su rol en la patogénesis, es importante señalar que no todas las bacterias tienen un TSS4 (Tseng Tsai-Tien, 2009).

2.10.5 SISTEMA DE SECRECIÓN TIPO V (SST5)

A este sistema también se le llama sistema autotransportador, ya que la secreción de tipo V implica el uso del sistema Sec para cruzar la membrana interior. A través de este sistema se exportan proteínas con diferentes funciones incluyendo proteasas, toxinas, adhesinas e invasinas. Las proteínas que usan esta ruta tienen la capacidad de formar un barril beta con su terminal C, que se inserta en la membrana externa permitiendo al resto del péptido alcanzar el exterior de la célula. Algunos investigadores piensan que los remanentes de los autotransportadores dieron lugar a las porinas, que forman estructuras similares de barril beta.

Los autotransportadores representan una vía Sec dependiente ya que utilizan la maquinaria Sec para atravesar la MI; sin embargo, las proteínas no requieren de factores adicionales para transitar del periplasma hacia el exterior celular, como su nombre lo indica, dirigen su propia exportación. El extremo carboxilo terminal de la proteína dirige la secreción de la región amino terminal a través de la ME *(Véase Figura 4).*

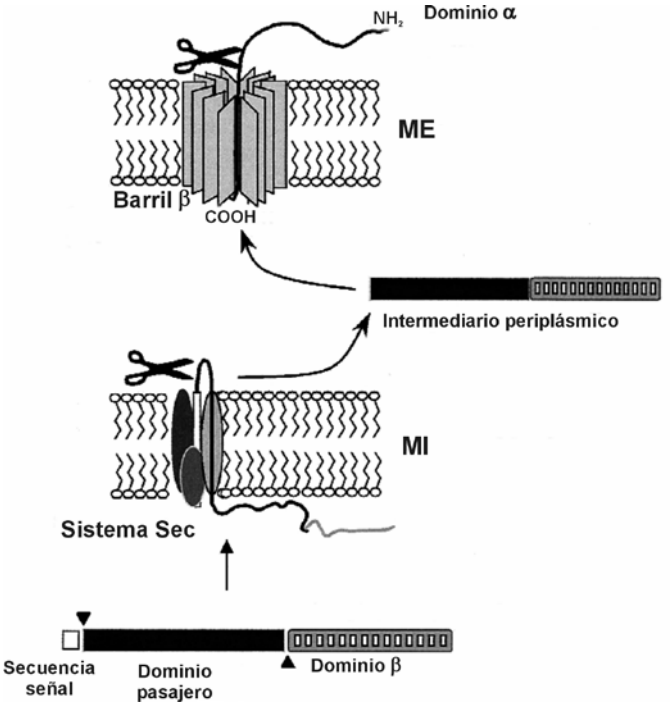


Fig 4: Mecanismo de secreción de un autotransportador. La proteína a secretarse tiene tres dominios: la secuencia señal, el dominio pasajero y el dominio β en el carboxilo terminal. El péptido líder dirige la secreción vía el sistema Sec y se procesa en la cara periplásmica de la MI. El dominio β del intermediario periplásmico adquiere la conformación de barril-β y se inserta en la ME para formar el poro. Por último se transloca el dominio pasajero a la superficie celular en donde puede permanecer unido o bien procesarse (González-Pedrajo Bertha, 2003).

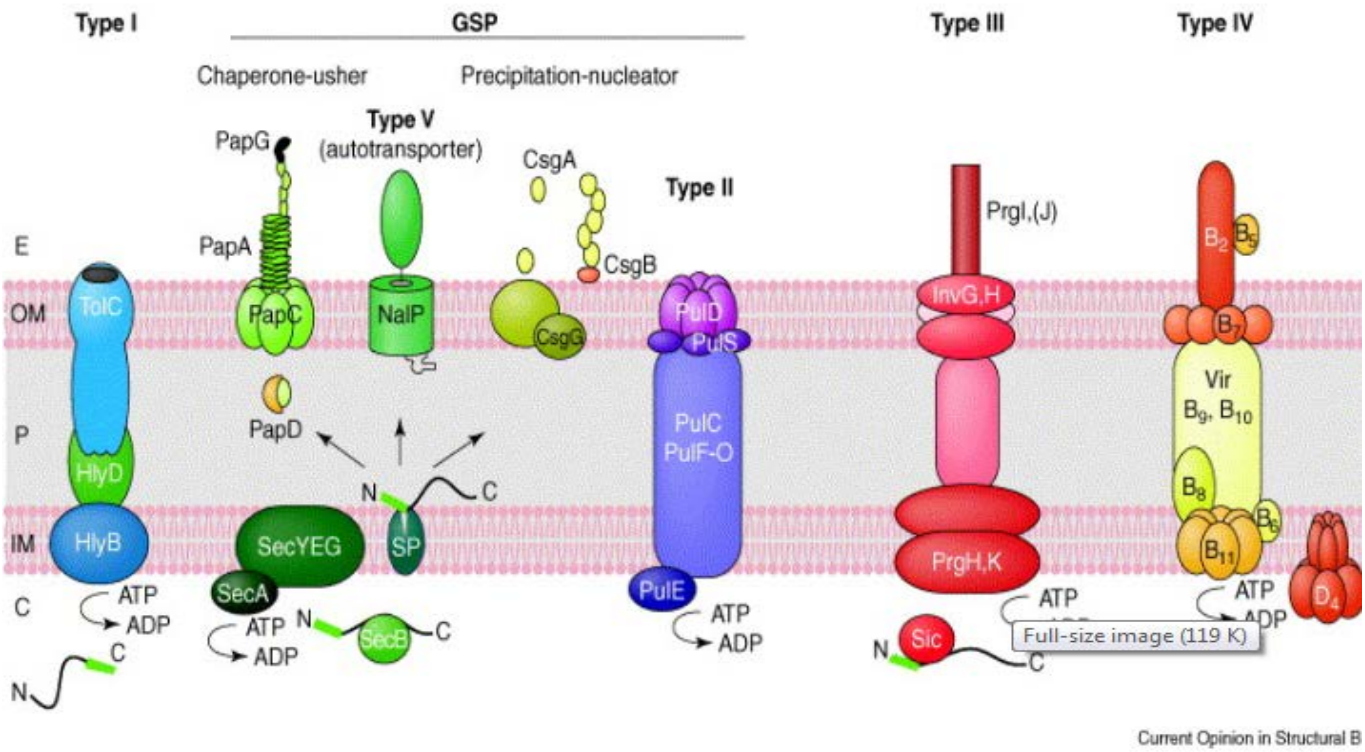


Fig 5: Esquema de la visión general de los principales sistemas de secreción de proteínas en bacterias Gram-negativas. Los sistemas de secreción están representados por los modelos de las siguientes vías: la secreción de hemolisina por el sistema de secreción tipo I; pili P de ensamblaje por la vía de tipo V (autotransportadores); Csg curli por la vía de secreción de tipo II, *Salmonella* y *Agrobacterium* poseen las vías tipo III y tipo IV respectivamente. Los sistemas de secreción Tipo I, Tipo III y Tipo IV segregan proteínas en un solo paso sin un intermedio periplásmico con el uso de una gran cantidad de energía. (Remaut Han, 2004).

2.11 MODULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE

El tracto urinario normalmente es un ambiente estéril y se lo mantiene así gracias a una gran variedad de mecanismos de defensa que previenen la colonización y la supervivencia de los agentes ajenos a este ambiente. La mayoría de patógenos que causan IVUs son de la flora propia del intestino e ingresan a la vejiga desde la uretra. La adherencia al uroepitelio es un paso crítico para el establecimiento de la infección urinaria. Las cepas de UPECs poseen un gran repertorio de adhesinas que ayudan a la bacteria a agregarse y adherirse a las superficies

celulares. Consecuentemente, la primera línea de defensa del hospedador contra las IVUs se concentra en prevenir la adherenca de las UPECs a la mucosa de la vejiga.

Defensas primarias de la vejiga

El tracto urinario tiene un número importante de defensas especializadas contra la colonización bacteriana que ayudan a mantener la orina estéril. La secreción de glucosaminas por las células transicionales de la vejiga previene la adherencia bacteriana formando una capa de mucina, también un pH bajo, la presencia de sales, urea y ácidos orgánicos en la orina reducen la supervivencia de las bacterias en el tracto urinario. Es probable que la proteína de Tamm-Horsfall, que es la proteína más abundante de la vía urinaria, colabore en la eliminación de algunos serotipos de *E. coli* que se fijan ávidamente a su superficie por la expresión de la fimbria tipo 1 (Bien Justyna, 2012) (López Arias , 2003). Dicha proteína es sintetizada en el riñón por una glucosilfosfatidilinositol (GPI), anclada a glicoproteínas de membrana, en el segmento proximal del asa de Henle, la glicoproteína es liberada por una proteasa específica. La glicoproteína de Tamm-Horsfall (THP) podría constituir un moco fijador de bacterias que contribuya a un mecanismo antiinfecciosos no inmunológico del tracto urinario inferior. La THP sirve como un receptor soluble para *Escherichia Coli* fimbria tipo 1, ayudando de esta manera a eliminar la bacteria del tracto urinario. La capacidad defensiva de THP radica en una sola cadena de alta manosa que se une a *Escherichia coli* fimbria tipo 1, y compite con receptores manosilados de la superficie vesical, esta unión se inhibe con D-manosa y se logra abolir con endoglucosidasas. Un estudio de microscopia electrónica mostró que la proteína solubilizada se adhiere a la fimbria tipo I y forma una pseudocápsula alrededor de la bacteria. En infecciones renales bacterianas los granulocitos son muy importantes en la defensa inmune primaria con la invasión de patógenos. Los mecanismos de la célula epitelial tubular renal que inducen activación de granulocitos y destrucción de bacterias, incluye la expresión de la proteína de Tamm-Horsfall (THP) que facilita la expresión de citocinas en monolitos. La THP se une a diferentes citoquinas y estimula varias células inmunocompetentes. La THP activa células dendríticas mieloides a través de TLR-4 (Toll-Like Receptor-4) para que adquieran un fenotipo maduro. La THP también es un blanco típico de la señalización TLR que culmina en la activación de NF-κB; se ha mencionado que la THP puede disminuir el daño renal por disminución de la inflamación posiblemente a través de TLR-4 (López-Cruz Gerardo, 2010).

Las defensinas también están incluidas en el grupo de barreras primarias, ellas son un grupo de pequeños péptidos antimicrobianos altamente conservados que son parte de la respuesta inmune innata, altamente catiónicos, en los seres humanos se sintetizan en los epitelios y leucocitos por lo que se producirán también en el tracto urinario después de la exposición a los agentes patógenos. Las defensinas tienen la capacidad para destruir bacterias, hongos y algunos virus encapsulados. Estos péptidos se unen a las fosfolípidos aniónicos sobre la pared celular de los patógenos y alteran la función de la membrana celular, aumentando la permeabilidad y por tanto la muerte celular.

Si un microorganismo se las arregla para eludir estas defensas constitutivas del hospedador y hace contacto con el uroepitelio, su presencia continua puede desencadenar la activación de los mecanismos adicionales de defensa del hospedador, dando lugar a la exfoliación de las células epiteliales de la vejiga infectadas y la posterior inflamación.

Tras la adhesión exitosa de las bacterias al epitelio de la vejiga (la presencia de bacterias y sus factores de virulencia dentro del tracto urinario) se puede desencadenar una respuesta fuerte y rápida desde el huésped. La infección por la UPEC provoca dos tipos de respuesta inmune (RI) tanto innata como adaptativa, aunque una defensa del hospedador eficaz contra las IVUs, es dependiente de una activación temprana de la respuesta inmune innata. Esta respuesta se caracteriza por la producción de un número de mediadores proinflamatorios, incluyendo citoquinas y quimioquinas, también la células de la vejiga y las células epiteliales renales parecen ser una fuente importante de la interleucina-6 (IL-6) y la interleucina-8 (IL-8) que después de la infección con UPEC, tienen un papel importante en el desarrollo del daño tisular local. El reclutamiento de neutrófilos al sitio de la infección se ha demostrado ser crucial para la eliminación de bacterias tanto de la vejiga y el riñón, y la presencia de neutrófilos en la orina es una característica de las infecciones urinarias. Sin embargo, su acción también puede conducir al daño del tejido local. La explicación de las vías de señalización implicadas en el reclutamiento de neutrófilos en la vejiga y los riñones pone de relieve la importancia de citocinas y quimiocinas. Es importante destacar que la activación de la respuesta inmune innata tiene un doble efecto: primero es necesario para la erradicación de bacterias patógenas, pero también puede conducir al daño tisular y la cicatrización.

La activación de la respuesta inmune innata en el tracto urinario es dependiente del reconocimiento de componentes bacterianos por los TLRs (Toll-Like Receptors) que son moléculas importantes en la respuesta inmune innata, recientemente se ha puesto de manifiesto que la activación inmunológica de las células epiteliales de la vejiga y del riñón dependen de TLRs, incluyendo los TLR4, TLR5 y TLR11. El reconocimiento de los factores de virulencia por parte de los TLR estimula las diferentes vías de señalización, que resultan en la activación y translocación del factor de transcripción NF-kB (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas) que es un complejo proteico que controla la transcripción de genes relacionados con el proceso de inflamación. En el núcleo celular el NF-kB activa la transcripción de genes proinflamatorios, tales como los que codifican las IL-6 e IL-8. El NF-kB es uno de los principales factores de transcripción necesarios para la inducción de la respuesta proinflamatoria, sin embargo, en respuesta a los productos bacterianos, las células epiteliales de la vejiga pueden activar el NF-kB independiente de una vía de señalización.

El TLR4 atrae la mayor parte de la atención en el contexto de los mecanismos de defensa inmune en el tracto urinario; reconoce a los lipopolisacáridos (LPS) de bacterias Gram-negativas. El TLR4 se expresa en las células epiteliales de todo el tracto urinario y se lo requiere para montar una respuesta inflamatoria efectiva después de la infección con UPECs. Estudios han afirmado que las células uroepiteliales son refractarias a la estimulación con LPS y han argumentado que, en cambio, fimbrias bacterianas tales como las fimbrias de tipo 1 inducen la generación de citocinas en estas células. La estimulación de los TLR4 por LPS y fimbrias tipo 1 se correlaciona con el nivel de expresión de un marcador CD14 (cluster of differentiation) en células de la vejiga, cuya función es reconocer al complejo LPS/LBP (lipopolysaccharid bind protein).

Los TLR5 también sjuegan un papel crucial en la defensa del huésped en las infecciones por UPEC por la mediación de flagelina inducida por las respuestas inflamatorias en la vejiga. Con respecto al TLR11, en los seres humanos no juegan un papel tan importante debido a la abundancia de codones de parada que se interponen al gen TLR11 (Bien Justyna, 2012).

2.12 FACTORES DE PROTECCIÓN

Existe inmunidad innata en el tracto urinario inferior por el lavado de organismos a través de la orina, así como captura de las bacterias por el revestimiento uretral. Estas células se eliminan en la orina que conduce a la eliminación de bacterias en el tracto urinario inferior. Además, la flora normal de una mucosa vaginal sana y el área perineal contienen microorganismos los lactobacilos y un medio de pH ácido, que impiden la adherencia de uropatógenos. Los factores que provocan estasis urinaria y alteran el ambiente vaginal y perineal como espermicidas o atrofia vaginal, pueden trastornar estos mecanismos de protección (Chung Amanda, 2010).

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 METODOLOGÍA

Se realizó un estudio de tipo transversal experimental descriptivo, para obtener la genotipificación de factores de virulencia de *Escherichia coli* Uropatógena (UPEC) por medio de la técnica Multiplex PCR, en infecciones de vías urinarias, no complicadas, complicadas y recurrentes en pacientes mujeres mayores de 18 años, del Hospital Carlos Andrade Marín.

3.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO Y MUESTRA

Este es un estudio transversal experimental descriptivo en el que se identificó la presencia o ausencia de los genes *fimh, usp, hlyA, pap GI, pap GII y pap GIII* de *Escherichia coli* Uropatógena, en urocultivos positivos para *E. coli* fermentadoras de lactosa positivas, lactosa negativas y fermentadoras lentas, de mujeres atendidas en el Hospital Carlos Andrade Marín *(Véase Tabla N°4)*.

Se analizaron 142 muestras clínicas de urocultivos positivos para *E. coli* fermentadoras de lactosa positivas, lactosa negativas y fermentadoras lentas, identificadas mediantes pruebas bioquímicas básicas, de mujeres mayores de 18 años atendidas en el Hospital Carlos Andrade Marín. Fueron recolectadas a partir de Junio de 2010 hasta finales de Septiembre del 2010. La parte experimental de la investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Diagnóstico Molecular y Citogenético del Diser-Lab de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Los aislados se mantienen almacenados en colección bacteriana en el laboratorio.

Las muestras ingresadas a este estudio cumplieron con los siguientes criterios:

3.2.1 Criterios de Inclusión

Muestras identificadas como *Escherichia coli* lactosa positiva, fermentadoras lentas de lactosa y no fermentadoras de lactosa, aisladas de pacientes mujeres mayores de 18 años de los servicios de hospitalización y consulta externa del HCAM, que serán sometidas al ensayo de PCR.

3.2.2 Criterios de Exclusión

- Todas las muestras positivas para *Escherichia coli* lactosa positivas, lactosa negativas y fermentadoras lentas, aisladas de pacientes hombres, niños, niñas y mujeres menores de 18 años del HCAM, a las cuales se las analizará con el ensayo de PCR convencional y Multiplex PCR.

- Otras especies bacterianas aisladas de urocultivos.

3.3 HIPÓTESIS

La presencia de los factores de virulencia de *Escherichia coli* Uropatógena influyen en la manifestación de infecciones de vías urinarias no complicadas, complicadas y recurrentes en mujeres mayores de 18 años.

3.4 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

Tabla N° 3

Hipótesis	**Variable Dependiente**	**Definición**	**Indicador**	**Dimensiones**	**Instrumento de Medida**
La presencia de los factores de virulencia de *Escherichia coli* Uropatógena influyen en la manifestación de infecciones de vías urinarias no complicadas, complicadas y recurrentes en mujeres mayores de 18 años.	Identificación de los factores de virulencia de *Escherichia coli* Uropatógena.	Componentes especiales o productos incluidos en el genoma bacteriano que contribuyen conjuntamente a potenciar la patogenicidad bacteriana.	Frecuencia de *Escherichia coli* Uropatógena	Alto nivel de expresión del gen *fim H* Bajos niveles de genes *usp, pap GII y pap GIII* Niveles nulos de genes *hlyA* y *pap GI*	PCR, Multiplex PCR

	Variable Independiente				
	Infecciones de vías urinarias no complicadas, complicadas y recurrentes.	**Infecciones de vías urinarias no complicadas.** Son las que su población afligida son personas con anatomía urinaria y sistema inmunológico normal e intacto, es uno de los padecimientos más comunes atendidos en la consulta externa o primaria y por lo general están en mujeres jóvenes y adultas. **Infecciones de vías urinarias complicadas.** Se presentan en hombres y mujeres poseen una anormalidad estructural y funcional ó también en	Porcentaje de infecciones de vías urinarias producidas por *E. coli.*	Alto nivel de amplificación del gen *fim H.* Bajos niveles de genes *usp, pap GII y pap GIII.* Niveles nulos de genes *hlyA y pap GI.*	Identificación de la cepa bacteriana por técnicas microbiológicas. Cultivo Pruebas bioquímicas Antibiograma. Registro de datos y resultados del hospital.

		individuos que ya presentan una disposición a manifestar la enfermedad y que se encuentren inmunocomprometidos.			
	Variables de estudio				
	Escherichia coli Uropatógena.	Bacterias patógenas que manifiestan una alta preferencia y potencial de adherencia a las células constitutivas del epitelio urinario.	Crecimiento de Cepas	Si / No	Urocultivo en agar MacConkey: Lactosa negativa o fermentadoras lentas Pruebas bioquímicas Multiplex PCR.
	Mujeres con infecciones de	Son las que su población afligida son personas con	Frecuencia de mujeres con IVUs	Si / No	Urocultivo, antibiograma.

	vías urinarias no complicadas.	anatomía urinaria y sistema inmunológico normal e intacto, es uno de los padecimientos más comunes atendidos en la consulta externa o primaria y por lo general están en mujeres jóvenes y adultas.	no complicadas.		
	Mujeres con infecciones de vías urinarias complicadas.	Se presentan en hombres y mujeres que poseen una anormalidad estructural y funcional ó también en individuos que ya presentan una disposición a manifestar la infección por una enfermedad de base ó que se encuentren inmunocomprometidos.	Frecuencia de mujeres con IVUs complicadas.	Si / No	Urocultivo, antibiograma.

	Mujeres con infecciones de vías urinarias recurrentes.	Se considera IVU recurrente cuando hay más de dos episodios de IVU no complicada en los últimos 6 meses o 3 urocultivos positivos en el año anterior. La recurrencia puede darse debido a recidiva, es decir a una nueva infección por el mismo germen que ocasionó la infección anterior; ó a una reinfección por un germen diferente al del episodio anterior.	Frecuencia de mujeres con IVUs recurrentes.	Si / No	Urocultivo, antibiograma.

3.5 EQUIPOS Y MATERIALES

3.5.1 Equipos

- Incubadora 35- 37ºC Isotemp Fisher Scientific[MR]
- Balanza Analítica Sartorius[MR]
- Termociclador TECHNE[MR] y TECHNE Flexigene[MR]
- Transiluminador de luz azul Invitrogen[MR]
- Vortex Eppendorf[MR]
- Cámara de electroforesis Labnet International. Inc
- Agitador Labnet International. Inc
- Micropipetas Eppendorf[MR]
- Cámara de flujo laminar Labconco[MR]
- Termobloque Accublock TM Labnet International. Inc

3.5.2 Materiales

- Asa bacteriológica metálica
- Cajas Petri
- Tubos Eppendorf
- Puntas

3.6 REACTIVOS Y MEDIOS

3.6.1 Reactivos para el análisis molecular

- Agua destilada estéril y agua destilada grado molecular
- Supermix Invitrogen[MR]
- TE (Tris + EDTA) buffer
- Syber safe Invitrogen[MR]
- TAE (Tris-Acetate-EDTA) buffer 1X, 50X
- Ladder de 100 pb Invitrogen[MR]

- DYE buffer
- Primers para PCR forward y reverse (*fimH, hlyA, usp, pap GI, pap GII, pap GIII*)

3.6.2 Medios de cultivo

- Caldo Infusión Cerebro Corazón (BBL^{MR})
- Agar MacConkey (Difco^{MR})

3.7 PROCEDIMIENTOS

3.7.1 UROCULTIVO

Esta es una técnica microbiológica mediante la cual se realizó la identificación fenotípica de *Escherichia coli*. Las siembras iniciales según el protocolo del Laboratorio de Microbiología del HCAM fueron realizadas en Agar MacConkey y Agar Sangre (*Véase Figura 6*). A partir de estos cultivos se tomaron tanto colonias lactosa positivas y como lactosa negativas y fermentadoras lentas para obtener cultivos puros de *E. coli (Véase Tabla N°4).* Las bacterias que fermentan lactosa tienen tanto lactosa permeasa como β-galactosidasa, dos enzimas necesarias para la producción de ácido en la prueba de fermentación de la lactosa. La permeasa es necesaria para que la molécula de lactosa pueda ingresar al interior de la célula bacteriana, donde la β-galactosidasa puede degradar el puente galactósido y producir glucosa y galactosa. Las bacterias no fermentadoras de lactosa carecen de ambas enzimas y son incapaces de producir ácido a partir de la lactosa. Algunas especies bacterianas parecen ser no fermentadoras de lactosa debido a que carecen de permeasa, pero que si poseen β-galactosidasa y dan una reacción de ONPG positivas. Estas denomidas fermentadoras lentas de lactosa pueden producir ácido en forma tardía a partir de la lactosa debida a la actividad permeasa deficiente. En estos casos una prueba ONPG positiva puede proporcionar una identificación rápida de la fermentación retardada de la lactosa (Koneman Elmer, 2006).

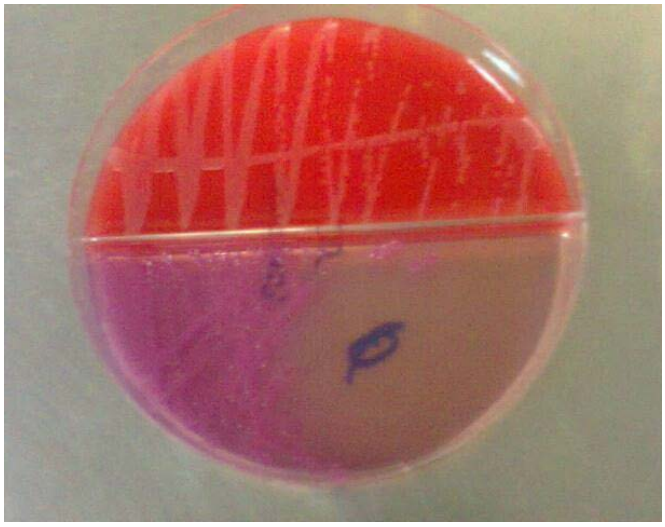


Fig 6: Muestra de urocultivo positivo para *Escherichia coli.* Se evidencia un crecimiento $>10^5$ UFC/ ml. La siembra se realizó en los medios de agar MacConkey y agar Sangre de cordero de acuerdo a los estándares que se manejan dentro del laboratorio de Microbiología del HCAM.

Tabla N° 4

Número de cepas analizadas según la fermentación de la Lactosa

Fermentación de Lactosa	Positiva	Negativa	Lenta	Total
N° de muestras	117	15	10	142

La detección de bacteriuria significativa en pacientes asintomáticos es decir, $>10^5$ UFC/mL en mujeres, en ausencia de manifestaciones clínicas se denomina bacteriuria asintomática. En pacientes sintomáticos, la presencia de más de 10^3 UFC/ml se considera significativa y debe instaurarse tratamiento antibiótico (M. Torres, 2008). La presencia de más de dos tipos de gérmenes usualmente se debe a contaminación, sin embargo, en un paciente sondado, con vejiga neurógena o con fístulas vaginales o intestinales, cuando se encuentra más

de una bacteria, según criterio médico estas bacterias deberían ser analizadas y con el respectivo antibiograma (López Arias , 2003).

3.7.2 IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE *Escherichia coli*

Para la identificación de las colonias y la confirmación del género y especie de *Escherichia coli* se efectuó la identificación bioquímica en base a ensayos de fermentación de carbohidratos, motilidad y uso de aminoácidos, según los protocolos ya establecidos para identificación de enterobacterias. Las pruebas bioquímicas establecidas para la identificación de *E. coli* son: Citrato, TSI, Lisina, Úrea, SIM y Rojo de metilo *(Véase Tabla N° 5 y Figura 7).*

Tabla Nº 5

Ensayos Bioquímicos para la identificación de *E. coli*

Prueba Bioquímica	**Resultado**	**Positivo o Negativo**
CITRATO	Sin viraje de color	(-)
TSI	A/A Viraje de color a amarillo	(+)
LIA	Decarboxilación positiva y Deaminación negativa Sin viraje de color	--
ÚREA	Viraje de color a Fucsia	(-)
SIM	Indol positivo con formación	(+)

	anillo color rosado. Motilidad positiva	
ROJO DE METILO	Cambio de color a rojo intenso	(+)

Fig 7: Resultado del ensayo de pruebas bioquímicas típicas para *E. coli*. Las pruebas van en orden de izquierda a derecha, TSI: A/A con viraje de color a amarillo, Citrato: Negativo, sin viraje de color, LIA: Decarboxilación positiva y Deaminación negativa, sin viraje de color, ÚREA: Negativa, sin viraje de color, SIM: Indol positivo con formación anillo color rosado y motilidad positiva, ROJO DE METILO: Positivo, con cambio de color a rojo intenso.

3.7.3 RECOLECCIÓN DE LAS CEPAS

Se recolectaron 142 muestras de *E. coli*, en pacientes mujeres cuyas edades estaban comprendidas entre los 18 y 65 años de edad con IVUs no complicadas, complicadas y recurrentes, estas pacientes fueron atendidas en el Hospital Carlos Andrade Marín (HCAM) de los servicios de consulta externa, hospitalización y urgencias. Para la recolección se siguió este protocolo:

1) Las cepas fueron recolectadas del laboratorio de bacteriología del hospital con un resultado $\geq 10^3$-10^5 UFC de *E. coli*/ml (Echevarría-Zarate Juan, 2006) y se tomó la siguiente información: Registro de los datos de las pacientes en fichas de trabajo utilizadas en el proyecto, los datos fueron tomados de las hojas de trabajo del laboratorio de bacteriología del hospital: nombres completos de las pacientes, edad, número de historia clínica, número de identificación en el laboratorio, fecha de procesamiento de la muestra, servicio del que proviene la muestra y el respectivo antibiograma *(Véase Anexo 2 Figura 16)*. A estos datos se añadieron la fecha de recolección de la cepa y código de identificación dentro del proyecto para cada una de las cepas.
2) Selección de colonias puras de (5 – 6 colonias) del urocultivo positivo para *E. coli* identificada por las pruebas bioquímicas básicas *(Véase Anexo 2 Figura 19).*
3) Inocular en 1 ml de Caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI) en los tubos Eppendorf de 1.5 ml, e identificar con la respectiva numeración *(Véase Anexo 2 Figura 22).*
4) Incubar por 24 horas a 37°C.

3.7.4 TRANSPORTE

Las muestras fueron transportadas del hospital hasta el laboratorio de la universidad, en el medio de cultivo BHI en tubos Eppendorf de 1,5 ml, manteniendo una temperatura de 4°C (cooler).

3.7.5 ALMACENAMIENTO

Las colonias de las cepas seleccionadas fueron recolectadas, almacenadas y preservadas para posteriores estudios. Se tomó de 3 a 5 colonias del cultivo puro original y se las sembró en 1 ml de Caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI) BBL^{MR}, la temperatura de incubación fue de 37°C, a las 24 horas del crecimiento bacteriano se repartió en cuatro alícuotas de 200 ul, añadiendo a cada una 20% de glicerol (40 ul) como criopreservante. Se identificó cada alícuota

con la numeración correspondiente y almacenó en la congeladora de -20 °C (*Véase Anexo 2 Figura 21 y 22).*

3.7.6 SIEMBRA DE LA MUESTRA Y EXTRACCIÓN DEL ADN TOTAL

Para la extracción del ADN que se usó en la prueba de PCR, previamente se sembró cada cepa tomando una alícuota almacenada en la congeladora de -20°C, la siembra se realizó empleando la técnica de agotamiento en caja Petri en el medio de agar MacConkey (Difco^{MR}). Después de 24 horas de incubación a 37ºC se tomó de 3-5 colonias (Mac Farland aproximando de 4 equivalente a 1,2 x 10^9 UFC/ml. *Véase Anexo3*) de cada muestra y se colocaron en un tubo Eppendorf con 300 ul de agua destilada estéril y se llevó a ebullición a 95°C por 10 minutos *(Véase Figura 15).* Se tomó 200 ul de la suspensión que sirvió como templado de ADN y se almacenó nuevamente en la congeladora de -20°C para el posterior ensayo de PCR.

3.7.7 TÉCNICAS MOLECULARES

Las técnicas moleculares utilizadas para la identificación de los genes codificadores de los factores de virulencia de la *Escherichia coli* Uropatógena fueron: La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) convencional y la Multiplex PCR que es una variante de la PCR convencional. La descripción de cada técnica se detalla a continuación.

3.7.7.1 Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

Es una técnica básica en biología molecular, fue desarrollada por Kary Mullis en el año de 1983 en California. Éste es un método *in vitro* que hace posible el diagnóstico de enfermedades mediante el análisis y estudio de los genes y se la emplea además en las secuenciaciones de dichos genes. También permite la amplificación de un gen de manera exponencial es decir que el propósito de la PCR es hacer muchas copias de un fragmento específico de ADN y distinguirlo del resto del ADN total extraído, para después poder visualizar este fragmento y utilizarlo en otras aplicaciones si es necesario. La PCR es una técnica de biología molecular altamente específica, rápida, sensible y versátil para detectar

cantidades ínfimas de un cierto ADN específico, posibilitando su fácil identificación (Rodríguez Sánchez Iram Pablo, 2004).

Componentes de la PCR

1) El ADN que queremos amplificar. Este ADN se conoce como ADN molde.
2) Una ADN polimerasa termoestable. La reacción se lleva a cabo en un tampón apropiado para el funcionamiento de la enzima polimerasa. También como cofactores de la polimerasa se añaden cationes divalentes, generalmente en forma de cloruro de magnesio (MgCl2).
3) Iniciadores de la reacción: Las enzimas ADN polimerasas únicamente son capaces de añadir nucleótidos al extremo 3' libre de una doble cadena de ADN. Son necesarios por tanto moléculas cortas (entre 10 y 30 bases) de ADN de cadena sencilla. Estas moléculas son los cebadores o primers de la reacción. Son los cebadores los que van a delimitar el fragmento a amplificar.
4) Nucleótidos libres: las enzimas ADN polimerasas van a crear una cadena complementaria a la cadena molde mediante la incorporación de nucleótidos al extremo 3' libre del cebador que se ha unido a la cadena molde. Los nucleótidos se añaden en forma de desoxirribonucleósidos trifosfato (dNTPs).

Etapas de la PCR

La PCR está diseñada según el principio natural de replicación del ADN comprendido en tres pasos designados como un ciclo, que se repite un número específico de veces. Un ciclo de PCR consiste en los siguientes pasos *(Véase Figura 8)*:

1) Desnaturalización.- Es la primera fase y consiste en separar la doble hebra de ADN y convertirla en una hebra sencilla. Típicamente se usa una temperatura de 95-97˚C, por 15 a 60 segundos. El tiempo depende del tamaño del genoma.

2) Alineación.- En este siguiente paso Los cebadores o "primers" previamente diseñados, reaccionan con la hebra sencilla de ADN y se pegan en lugares específicos

por complementariedad de bases. Para esto, se baja la temperatura entre 35 y 60˚C por 30 segundos.

3) Extensión.- la fase de elongación o extensión, la enzima polimerasa incorpora nucleótidos complementarios a partir del extremo 3’ libre de la región en que han hibridado los cebadores. La temperatura a la que se lleva a cabo esta fase depende de la enzima polimerasa empleada; si se utiliza Taq polimerasa la temperatura de elongación suele ser de 72ºC, que es la que coincide con la máxima actividad de la polimerasa para evitar alineamientos inespecíficos de los iniciadores. Al final de esta etapa los primers no se deshibridan.

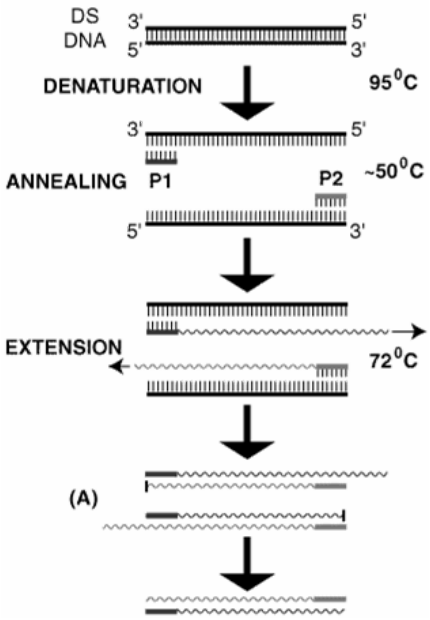


Fig 8: Ilustración que resume las tres etapas de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa. De arriba hacia abajo: denaturación, alineamiento y extensión.

Este proceso tiene lugar en un termociclador, un instrumento que automáticamente controla y alterna las temperaturas durante períodos programados de tiempo para el número apropiado de ciclos de PCR (generalmente entre 30 y 40 ciclos).

Al final del primer ciclo, ambas hebras de una molécula bicatenaria de ADN a las que se les hayan apareado los iniciadores han sido copiadas para generar dos nuevas cadenas

bicatenarias. Cuando se repite por segunda ocasión el ciclo de tres pasos, las dos moléculas del primer ciclo se copian para producir ahora cuatro moléculas. En teoría, 20 ciclos producirán aproximadamente un millón de copias de la molécula molde de ADN, pero en la práctica, el proceso no es tan eficiente. El número de ciclos que se utiliza adquiere gran relevancia a la hora de optimizar una PCR. Este número depende de la cantidad de ADN que existe en la muestra una vez que el resto de factores han sido optimizados (Rodríguez Sánchez Iram Pablo, 2004).

En el presente estudio se utilizó esta técnica para la detección de los siguientes genes *fimH, hlyA* y *usp.* Es decir que se realizaron PCRs individuales para estos genes tomando en cuenta las publicaciones de estudios realizados con anterioridad sobre este tema (Ribeiro Tiba Monique, 2008).

3.7.7.2 Multiplex PCR

Este método permite la amplificación simultánea y en un único tubo diferentes secuencias diana (fragmentos de ADN), permitiendo la detección e identificación de distintos genes de interés al mismo tiempo. En esta PCR hay presentes múltiples pares de primers (hasta 8) lo que da una serie de productos, los mismos pueden verse como múltiples bandas en un gel de agarosa. Ayuda a detectar la presencia de genes de relevancia clínica, como los que codifican resistencia a antibióticos o los que confieren mayor virulencia a los organismos que los portan (Méndez-Álvarez Sebastián, 2004).

En esta investigación utilizamos la Multiplex PCR para amplificar los siguientes genes: *pap GI, pap GII* y *pap GIII.* Se los agrupó de acuerdo a su temperatura de alineamiento y tamaño del amplicón (Rijavec Matija, 2008) (Ribeiro Tiba Monique, 2008).

3.7.7.3 Condiciones para la PCR

Las amplificaciones fueron realizadas por la técnica de PCR para los genes convencional *fimh, hlyA* y *usp* y con una variante de ésta que es la Multiplex PCR para los genes *pap GI, pap GII* y *pap GIII* (Méndez Álvarez & Pérez Roth, 2004). El volumen final de la mezcla de PCR

fue de 25 ul, dicha mezcla para el ensayo de individual de genes por PCR convencional contuvo 21.5 ul de SuperMix Invitrogen [45 ul, Taq pol, dNTPs, Buffer, $MgCl_2$], 0.5 ul de cada primer forward y reverse, 1ul del control positivo o negativo y 1.5 del templado de ADN. Para la Multiplex PCR la mezcla contuvo 19.5 ul de SuperMix Invitrogen [45 ul, Taq pol, dNTPs, Buffer, $MgCl_2$], 0.5 ul de cada primer forward y reverse, 1ul del control positivo o negativo y 1.5 del templado de ADN (Ribeiro Tiba Monique, 2008).

3.7.8 CONFIRMACIÓN DE LA EXTRACCIÓN DEL ADN BACTERIANO.

En la Figura 9 se observa el gel representativo de la confirmación de la extracción del ADN bacteriano, por medio de la identificación del gen 16s ARN que es un componente de la subunidad 30s de los ribosomas en todas las células procariotas y se caracteriza por ser altamente conservado en estas células. El gen 16s de ARN ribosomal contiene regiones que proveen secuencias específicas muy útiles para la identificación de bacterias. Se trata de una molécula muy antigua, presente en todas las bacterias actuales y constituye, por tanto, una diana universal para su identificación. (Rodicio María del Rosario, 2004). El revelado del gel de agarosa al 1,6% p/v evidenció la presencia de bandas confirmándose así la presencia de ADN total extraído *(Véase Figura 9).*

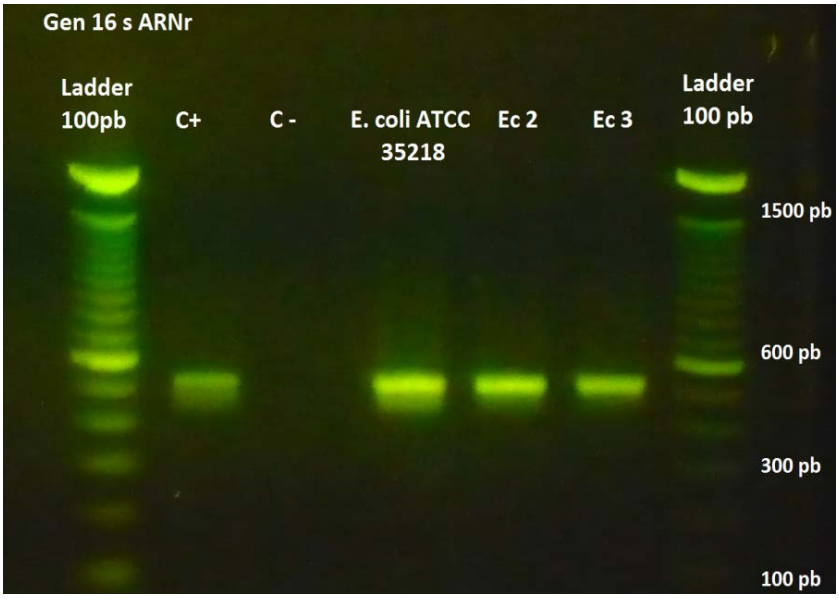


Fig 9: Fotografía de la amplificación del gen 16s ARN ribosomal, en un gel de 1,6% de agarosa Invitrogen coloreado con 5ul de SYBER Safe Invitrogen. El orden de los componentes y las muestras se los puede observar de izquierda a derecha: Ladder invitrogen de 100 pb, C+ (*Streptoccocus pneumoniae* utilizado en el laboratorio siempre como el control positivo), C- agua destilada grado molecular, E. coli ATCC 35218, Ec2 y Ec3 (cepas del proyecto tomadas al azar), y ladder invitrogen de 100 pb. El gen 16s ARNr de 500 pb se amplificó en las muestras C+, *E. coli* ATCC 35218, Ec2 y Ec3.

3.7.9 DETECCIÓN MOLECULAR DE LOS GENES DE VIRULENCIA.

La amplificación de los genes de virulencia se llevó a cabo en dos termocicladores TECHNE TC-312^{MR} y TECHNE Flexigene^{MR}.

Los primers elegidos para ésta investigación están descritos en la *Tabla Nº 6* y son: *pap GI, pap GII, pap GIII PG, fimH, hlyA* y *usp* con sus pesos moleculares de 692 bp, 562 bp, 421 bp, 508 bp, 1177 bp y 1000 bp respectivamente (Farshad S., 2009), (Féria Constança, 2001), (Ribeiro Tiba Monique, 2008).

Tabla Nº 6

Primers de los Factores de Virulencia

Gen de Virulencia	Secuencia 5’ - 3’	Peso Molecular
pap G Clase I	5’ 1:CAA CCT GCT CTC AAT CTT TAC TG 3’ 3’ 2:CAT GGC TGG TTG TTC CTA AAC AT 5’	692 pb
pap G Clase II	5’ 1:GGA ATG TGG TGA TTA CTC AAA GG 3’ 3’ 2:TCC AGA GAC TGT TCA AGA AGG AC 5’	562 pb
pap G Clase III	5’ PG1:CAT GGC TGG TTG TTC CTA AAC AT 3’ 3’ PG2:TCC AGA GAC TGT GCA GAA GGA C 5’	421 pb
fim H	5’ A: TGC AGA ACG GAT AAG CCG TGG 3’ 3’ B GCA GTC ACC TGC CCT CCG GTA 5’	508 pb
hly A	5’ 1: AAC AAG GAT AAG CAC TGT TCT GGC T 3’ 3’ 2: ACC ATA TAA GCG GTC ATT CCC GTC A 5’	1.177 pb
usp	5’ 1: AAC AAG GAT AAG CAC TGT TCT GGC T 3’ 3’ 2: ACC ATA TAA GCG GTC ATT CCC GTC A 5’	1000 pb

Programa para la amplificación de los genes de virulencia.

El programa utilizado para la amplificación de los genes *pap GI, pap GII, pap GIII PG* mediante Multiplex PCR se lo describe de la siguiente manera:

Consistió en 30 ciclos de 94°C por minuto, la temperatura de desnaturalización inicial fue de 94°C por 3 minutos, la temperatura de annealing promedio es de 62°C por un minuto y la extensión final de 72°C por 7 minutos. Todo este procedimiento se realizó en dos termocicladores TECHNE^{MR} y TECHNE Flexigene^{MR}. La duración aproximada del proceso fue de 2 horas.

El programa de amplificación de los genes *fimH, hlyA* y *usp* mediante una PCR por cada gen fue el siguiente*:*

Consistió en 30 ciclos de 94°C por minuto, la temperatura de desnaturalización inicial fue de 94°C por 3 minutos, la temperatura de annealing promedio es de 67°C por 1 minuto y la extensión final de 72°C por 7 minutos. Todo este procedimiento se realizó en dos termocicladores TECHNE^{MR} y TECHNE Flexigene^{MR}. La duración aproximada del proceso fue de 2 horas.

3.7.10 ELECTROFORESIS

La electroforesis en gel es una técnica muy utilizada para separar moléculas o fragmentos de moléculas de ácidos nucleicos. Los materiales más comunes para separar moléculas de ácidos nucleicos son polímeros como la poliacrilamida o la agarosa. Estos geles se colocan en la cubeta de electroforesis, sumergidos en un tampón de pH alrededor de 8. De esta forma, las moléculas de ADN o ARN sometidas a electroforesis se desplazarán al polo positivo ya que a pH superiores a 5 poseen carga negativa. Los geles se comportan como un tamiz molecular y permiten separar moléculas cargadas en función de su tamaño y forma. Así, moléculas de ADN de diferente tamaño, van a emigrar de forma distinta en un gel de electroforesis. La distancia recorrida por cada fragmento de ADN va a ser inversamente proporcional al logaritmo de su peso molecular. Es importante la utilización de marcadores de tamaño conocido porque nos permitirán calcular los pesos moleculares de las muestras de ADN problema. En el caso de los geles de agarosa, se le añade bromuro de etidio u otra tinción menos tóxica, estas son sustancias que se intercalan entre las bases del ADN y es fluorescente cuando se ilumina con luz ultravioleta. Tras la electroforesis, se visualiza el gel con una lámpara de luz UV, y se verán las bandas correspondientes a las muestras de ADN aplicado y los marcadores de peso molecular **(Padilla Peña Carmen Alicia, 2008)**.

En este trabajo se realizaron varias electroforesis para observar los resultados de los productos de amplificación en gel de agarosa Ultra-Pure^{MR}, Invitrogen, al 1,6 % (p/v) en dos cámaras (Gel XL ultra V-2, Labnet Internacional Inc), el voltaje al que se realizó la

electroforesis fue de 55 V; el gel fue coloreado usando 5 ul de SYBER Safe Invitrogen[MR], el buffer que se utilizó fue TAE (Tris- Acetato- EDTA) a una concentración de 1X. Se añadió al producto de la PCR Dye como buffer de carga para dar peso y color a cada muestra *(Véase Figura 10).*

La visualización de los productos de amplificación de las bandas se realizará en un transiluminador de luz azul Invitrogen[MR] *(Véase Figura 11).*

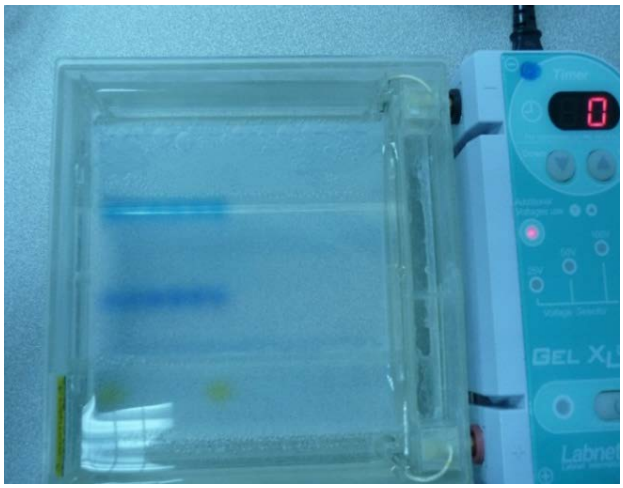


Fig 10: Fotografía del fin del proceso de electroforesis del producto final de la PCR para los genes de virulencia

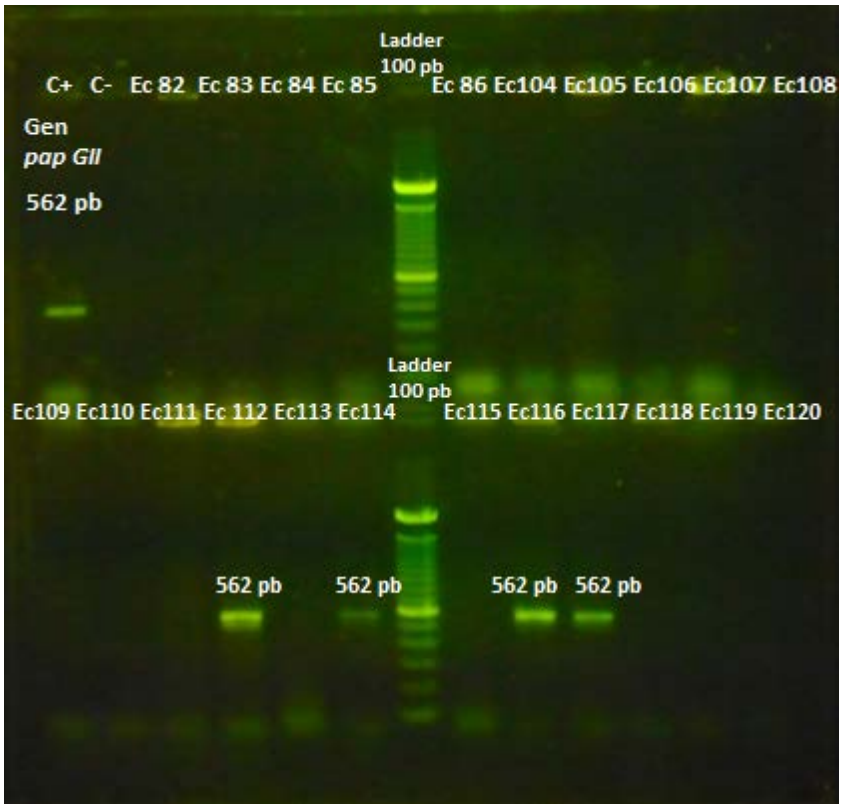


Fig 11: Fotografía del resultados de los productos de amplificación para el gen *pap GII* para las muestras Ec 82-86 y Ec 104-120. Los resultados de la electroforesis se observan en gel de agarosa al 1,6% (p/v) coloreado con 5ul de SYBER Safe Invitrogen.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 ANÁLISIS DE PRESENCIA O AUSENCIA DE GENES DE VIRULENCIA.

El análisis de la presencia de los genes codificadores de los factores de virulencia de *Escherichia coli* Uropatógena, fue evidenciado mediante la amplificación en gel de agarosa obteniéndose las bandas con el peso específico para cada gen estudiado. Así para el gen *fimH* se obtuvieron bandas de 508 pb, para el gen *usp* bandas de 1000 pb, para el gen *pap GI* bandas de 692 pb, para el gen *pap GII* bandas de 562, para el gen *pap GIII* bandas de 421 pb. Para el gen *hlyA* de 1117 pb, no se obtuvo ningún resultado.

Los resultados obtenidos para el total de 142 aislados de *Escherichia coli* analizados se observan en la *Tabla N° 5;* 99 aislados (74,6%) presentaron el gen *fimH,* el gen *usp* presentó 3 aislados (2,1%), 1 aislado (0,7 %) para el gen *pap GI,* 8 aislados (5,6%) para el gen *pap GII,* el gen *pap GIII* presentó 3 aislados positivos (2,1%) y ningún aislados evidenció la presencia del gen *hlyA (Véase Gráfica N°2).*

El registro de todos los datos obtenidos de las pacientes y de los resultados se encuentran recopilados en una base de datos con toda la información que se necesitaba *(Véase Tabla N° 5* en Anexo 4*)*, que incluye Día y Fecha de la recolección de las muestras, numeración del hospital, nombres completos de las pacientes, edad, servicio del que provinieron las muestras, tipo de fermentación de la lactosa, y resultados de presencia o ausencia de amplificación de los genes.

Tabla N° 7

Número total de muestras de *Escherichia coli* Uropatógena que amplificaron para los genes de los factores de Virulencia

Total de muestras analizadas:	142
Total de muestras que amplificaron los genes de virulencia:	121

Tabla N° 8

Distribución en número y porcentaje de los genes de los Factores de Virulencia de *Escherichia coli* Uropatógena en pacientes con Infecciones de vías urinarias.

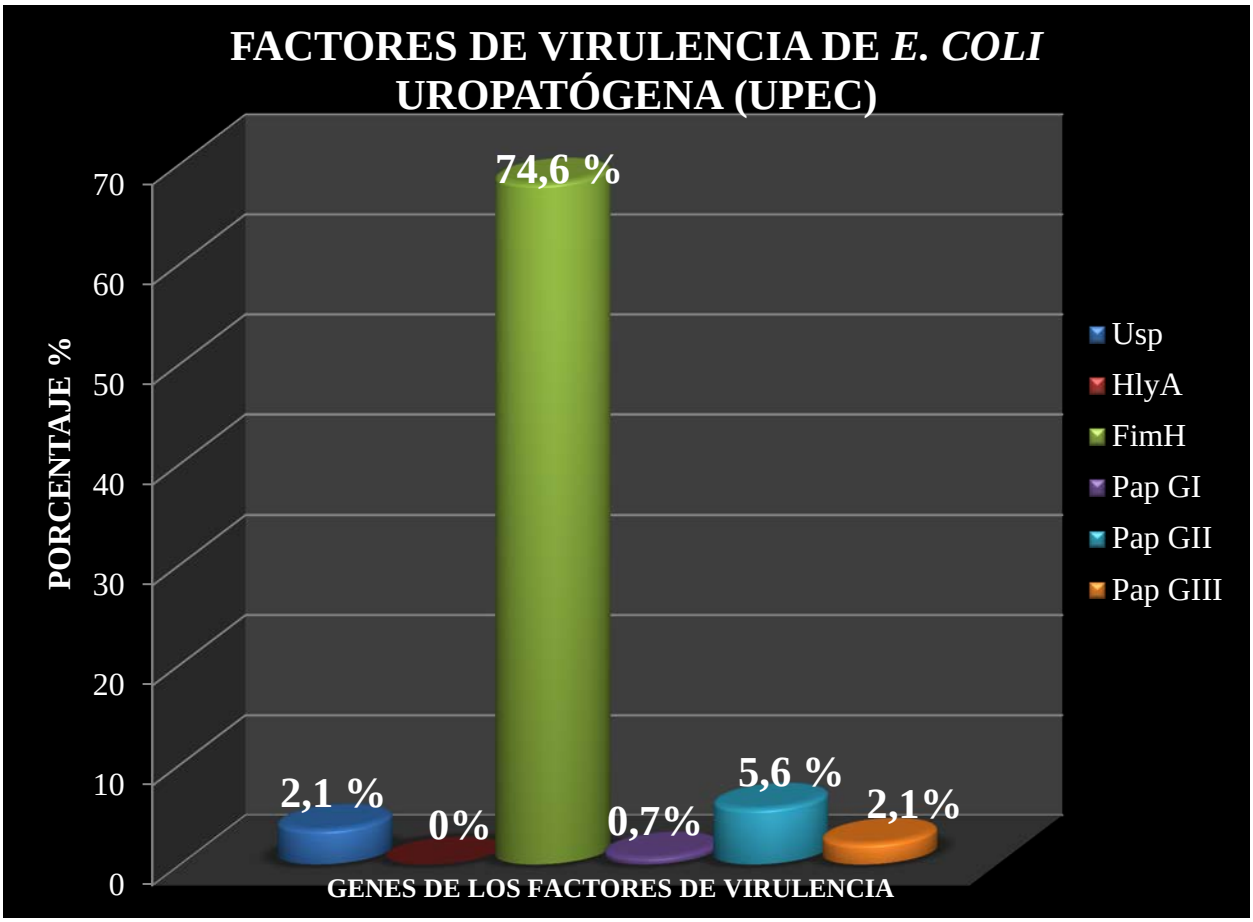
Total Muestras Analizadas = 142			
Genes de Virulencia	**Resultado (+)**	**Genes de Virulencia**	**%**
Usp	3	*Usp*	2,1
HlyA	0	*HlyA*	0
FimH	106	*FimH*	74,6
Pap GI	1	*Pap GI*	0,7
Pap GII	8	*Pap GII*	5,6
Pap GIII	3	*Pap GIII*	2,1

Tabla N° 9

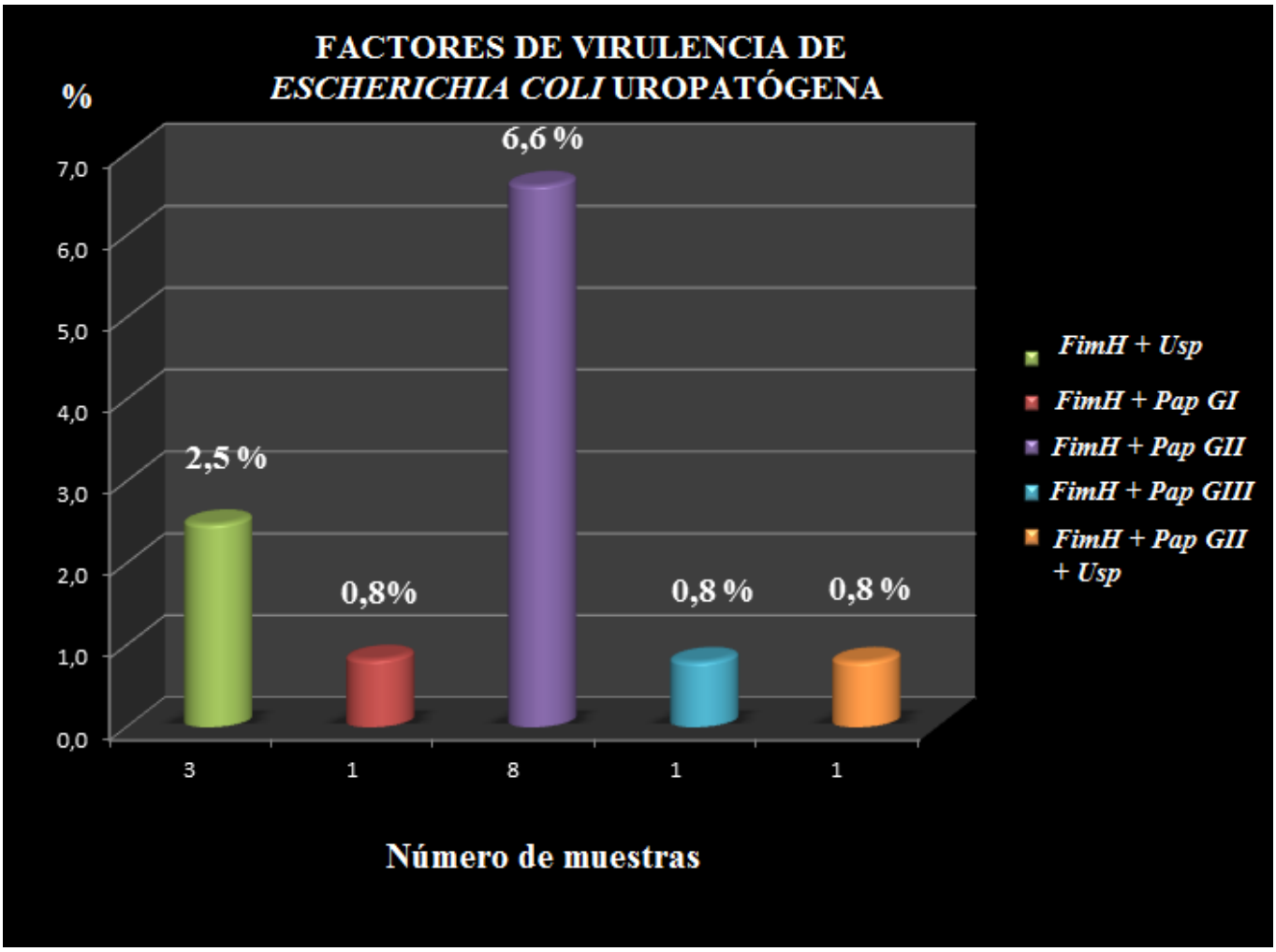
Distribución en número y porcentaje de las muestras que amplificaron para más de un gen de virulencia de *Escherichia coli* Uropatógena en pacientes con Infecciones de vías urinarias.

Total Muestras Analizadas = 142			
Total de muestras que amplificaron para los genes de virulencia = 121			
Genes de Virulencia	**Código de la muestra**	**Resultado (+)**	**%**
Fim H + Usp	Ec 44, Ec 71, Ec 93	3	2,5
Fim H + Pap GI	Ec 57	1	0,8
Fim H + Pap GII	Ec 53, Ec 71, Ec 75, Ec 76, Ec 112, Ec 114, Ec 116, Ec 117	8	6,6
Fim H + Pap GIII	Ec 64	1	0,8
Fim H + Pap GII + Usp	Ec 71	1	0,8
	Total:	14	11,57

4.2 GRÁFICAS DE RESULTADOS



Gráfica N° 2: Porcentaje de presencia de los genes de virulencia *usp, hlyA, fimH, pap GI, pap GII* y *pap GIII* en la población total de muestras analizadas de *Escherichia coli.* N= 142.



Gráfica N° 3: Porcentaje de las muestras que amplificaron para más de un gen de virulencia. Total de muestras amplificadas N= 121. Población total de muestras analizadas de *Escherichia coli.* N= 142.

4.3 FOTOGRAFÍAS DE LAS AMPLIFICACIONES DE LOS GENES CODIFICANTES PARA LOS FACTORES DE VIRULENCIA DE *Escherichia coli* Uropatógena.

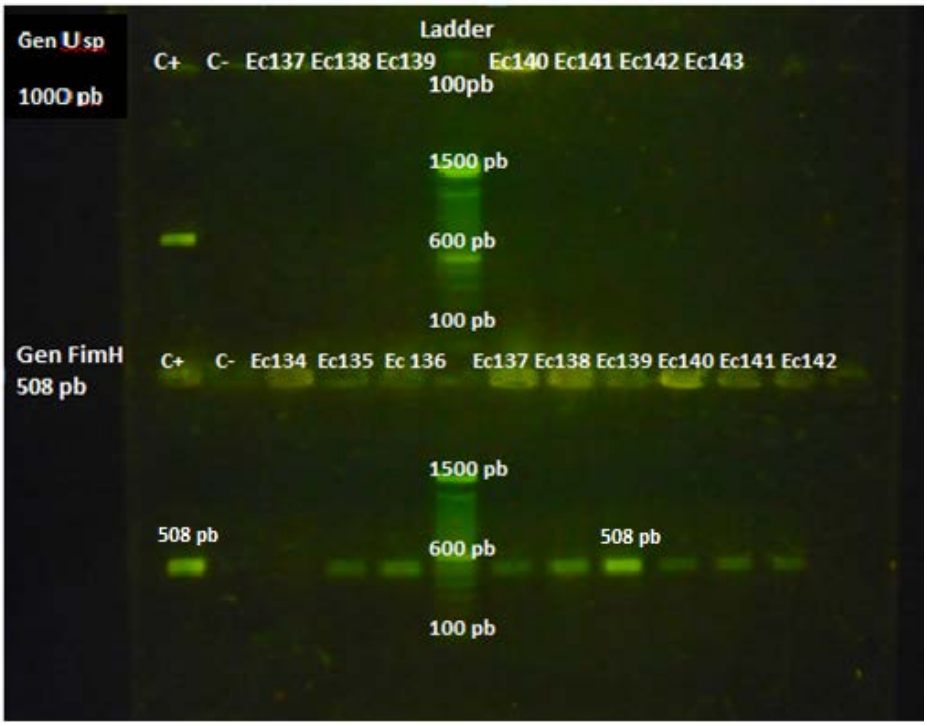


Fig 12: Fotografía de resultados de amplificación del gen *usp* (parte superior) se observan en gel de agarosa al 1,6% (p/v) coloreado con 5ul de SYBER Safe Invitrogen, se observa de izquierda a derecha C+, C-, muestras Ec 137- 142. Muestra 143 (repetición de la 142), no se observó ningún resultado positivo; y del gen *fimH* (parte inferior), se observa de izquierda a derecha C+, C-, muestras Ec 134-142, resultado positivo para muestras de la Ec 135-142

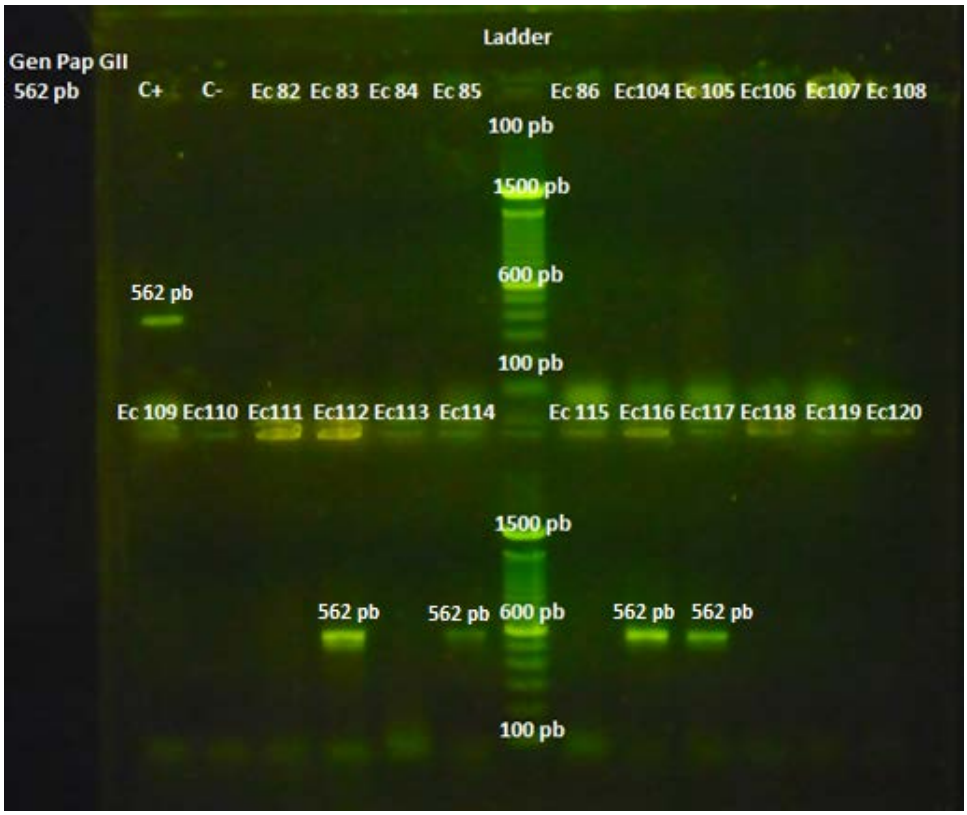


Fig 13: Fotografía de resultados de amplificación para el gen *pap GII* se observan en gel de agarosa al 1,6% (p/v) coloreado con 5ul de SYBER Safe Invitrogen. Se puede visualizar de izquierda a derecha en la parte superior C+, C-, Ec 82-85, ladder de 100 pb, Ec 86 y Ec 104-108; en la parte inferior de izquierda a derecha las muestras Ec 109-114, ladder de 100 pb y Ec 115-120. Los resultados positivos se observan en las muestras Ec 112, Ec 114, Ec 116 y Ec 117.

Fig 14: Fotografía de resultados de amplificación en la parte superior del gel, para el gen *hlyA* de 1.117 pb se observan en gel de agarosa al 1,6% (p/v) coloreado con 5ul de SYBER Safe Invitrogen. Se visualizan de izquierda a derecha el C+, C-, Ec 71-74, ladder de 100 pb, y Ec 75-80. No hay resultados positivos en ninguna muestra. En la parte inferior del gel para el gen *usp* de 1000 pb. Se observa de izquierda a derecha el ladder de 100 pb, C+, C-, Ec 71-78, ladder de 100 pb y Ec 79. Se observa resultados positivos para las muestras Ec 71, Ec 75 y Ec 76.

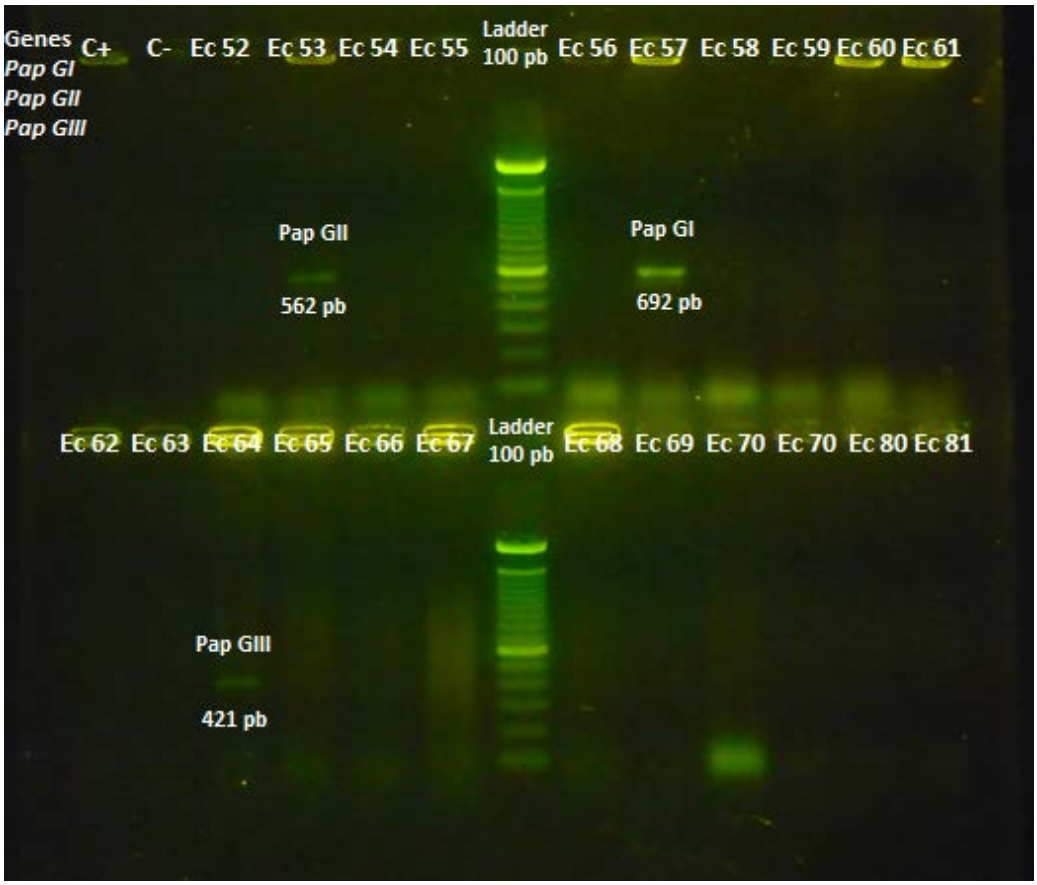


Fig15: Fotografía de resultados de amplificación en la parte superior del gel, para los genes *papGI*, *papGII* y *papGIII* de 692 pb, 562 pb y 421 pb respectivamente. Se observan los productos en gel de agarosa al 1,6% (p/v) coloreado con 5ul de SYBER Safe Invitrogen. Se visualizan de izquierda a derecha el C+, C-, Ec 52-61, ladder de 100 pb, y en la parte inferior Ec 62-70 y Ec 79-81. Los resultados positivos fueron para las muestras Ec 53 gen *pap GIII*, Ec 57 para el gen *pap GI* y Ec 64 para el gen *pap GIII*.

4.4 TABLAS DE RESULTADOS DE LAS PACIENTES.

Tabla N° 10

PRESENCIA = P

AUSENCIA = A

Resultados Genes de Virulencia *Escherichia coli* Uropatógena (UPEC)												
Día	**Fecha**	**Código**	**# Hospital**	**Edad**	**Servicio**	**Lactosa**	**Fim H**	**Usp**	**HlyA**	**Pap GI**	**Pap GII**	**Pap GIII**
1	12/07/2010	Ec1	531	46-1965	HO Nefrología	(+)	A	A	A	A	A	A
1	12/07/2010	Ec2	522	40-1970	CE Urología	(+)	P	A	A	A	A	A
1	12/07/2010	Ec3	524	67-1943	CE Urología	(-)	P	A	A	A	A	A
1	12/07/2010	Ec4	572	88-1922	HO Infectología	(+)	P	A	A	A	A	A
1	12/07/2010	Ec8	566	21-1989	Urgencias	(+)	A	A	A	A	A	A
2	13/07/2010	Ec5	618	33-1977	Urgencias	(+)	A	A	A	A	A	A
2	13/07/2010	Ec6	606	38-1972	ND	(+)	A	A	A	A	A	A
2	13/07/2010	Ec7	653	55-1955	ND	(+)	A	A	A	A	A	A
3	14/07/2010	Ec9	663	57-1953	ND	(+)	A	A	A	A	A	A
3	14/07/2010	Ec10	668	83-1927	CE Medicina	Lenta	P	A	A	A	A	A

					Interna							
3	14/07/2010	Ec11	674	64-1946	CE Medicina Interna	(+)	A	A	A	A	A	A
3	14/07/2010	Ec12	680	39-1971	CE Medicina Interna	(+)	A	A	A	A	A	A
3	14/07/2010	Ec13	756	50-1960	HO Infectología	(+)	A	A	A	A	A	A
3	14/07/2010	Ec14	758	28-1982	Ginecología	(+)	A	A	A	A	A	A
4	15/07/2010	Ec15	828	65-1945	CE Urología	(-)	P	A	A	A	A	A
5	16/07/2010	Ec16	917	69-1941	CE Medicina Interna	(-)	P	A	A	A	A	A
5	16/07/2010	Ec17	922	68-1942	CE Nefrología	(+)	P	A	A	A	A	A
5	16/07/2010	Ec18	984	59-1951	Obstetricia	(-)	P	A	A	A	A	A
6	19/07/2010	Ec19	1025	45-1965	CE Urología	(+)	A	A	A	A	A	A
6	19/07/2010	Ec20	1031	27-1983	ND	(+)	A	A	A	A	A	A
7	21/07/2010	Ec21	1145	63-1947	Medicina General	(+)	A	A	A	A	A	A
7	21/07/2010	Ec22	1180	64-1946	CE Medicina Interna	(+)	A	A	A	A	A	A
7	21/07/2010	Ec23	1192	66-1944	HO Medicina Interna	(+)	A	A	A	A	A	P

8	22/07/2010	Ec24	1290	57-1953	CE Medicina Interna	(+)	A	A	A	A	A	P
8	22/07/2010	Ec25	1298	79-1931	CE Medicina Interna	(+)	A	A	A	A	A	A
8	22/07/2010	Ec26	1301	26-1984	HO Cirugía Plástica	(+)	A	A	A	A	A	A
8	22/07/2010	Ec27	1289	36-1974	CE Nefrología	(+)	P	A	A	A	A	A
9	23/07/2010	Ec28	1368	65-1945	CE Medicina Interna	(+)	A	A	A	A	A	A
9	23/07/2010	Ec29	1370	86-1924	CE Traumatología Ortopedia	(+)	A	A	A	A	A	A
9	23/07/2010	Ec30	1371	61-1949	CE Medicina Interna	(+)	A	A	A	A	A	A
9	23/07/2010	Ec31	1374	37-1973	CE Urología	(+)	A	A	A	A	A	A
10	26/07/2010	Ec32	1465	65-1945	CE Medicina Interna	(+)	A	A	A	A	A	A
10	26/07/2010	Ec33	1473	26-1984	ND	(+)	A	A	A	A	A	A
10	26/07/2010	Ec34	1547	37-1973	ND	(+)	P	A	A	A	A	A
11	27/07/2010	Ec35	1576	36-1974	CE Medicina	(+)	P	A	A	A	A	A

					Personal							
11	27/07/2010	Ec36	1584	76-1934	CE Medicina Interna	(+)	P	A	A	A	A	A
11	27/07/2010	Ec37	1568	65-1945	CE Medicina Interna	(+)	A	A	A	A	A	A
11	27/07/2010	Ec38	1589	67-1943	CE Urología	(+)	P	A	A	A	A	A
11	27/07/2010	Ec39	1601	85-1925	HO Neumología	(+)	A	A	A	A	A	A
11	27/07/2010	Ec40	1620	90-1920	Urgencias	(+)	P	A	A	A	A	A
11	27/07/2010	Ec41	1640	81-1929	HO Neurocirugía	(+)	A	A	A	A	A	A
12	28/07/2010	Ec42	1689	57-1953	CE Urología	(+)	A	A	A	A	A	A
12	28/07/2010	Ec43	1750	60-1950	HO Neumología	Lenta	P	A	A	A	A	A
13	29/07/2010	Ec44	1816	76-1934	CE Urgencias	Lenta	P	P	A	A	A	A
14	02/08/2010	Ec45	2052	57-1953	Medicina Interna	(+)	P	A	A	A	A	A
14	02/08/2010	Ec46	2100	68-1942	CE Medicina Interna	(+)	P	A	A	A	A	A
15	03/08/2010	Ec47	5	67-1943	CE Urología	(+)	P	A	A	A	A	A
15	03/08/2010	Ec48	44	73-1937	CE Medicina Interna	(+)	P	A	A	A	A	A

15	03/08/2010	Ec49	76	70-1940	HO Cardiología	(+)	P	A	A	A	A	A
15	03/08/2010	Ec50	79	44-1966	HO Gastroenterología	(+)	P	A	A	A	A	A
16	05/08/2010	Ec51	107	81-1929	CE Hematología	(+)	P	A	A	A	A	A
16	05/08/2010	Ec52	126	63-1947	CE Medicina Interna	(+)	P	A	A	A	A	A
16	05/08/2010	Ec53	137	31-1979	CE Nefrología	(+)	P	A	A	A	P	A
16	05/08/2010	Ec54	180	57-1953	HO Observación	(+)	P	A	A	A	A	A
17	06/08/2010	Ec55	221	73-1937	CE Medicina Interna	(+)	P	A	A	A	A	A
18	09/08/2010	Ec56	342	76-1934	CE Urología	(+)	P	A	A	A	A	A
18	09/08/2010	Ec57	367	48-1962	CE Medicina Interna	(+)	P	A	A	P	A	A
18	09/08/2010	Ec58	401	64-1946	Urgencias	(+)	P	A	A	A	A	A
19	11/08/2010	Ec59	430	40-1970	Urología	(+)	P	A	A	A	A	A
19	11/08/2010	Ec60	456	66-1944	CE Medicina Interna	(+)	P	A	A	A	A	A
19	11/08/2010	Ec61	511	65-1945	Urgencias	(+)	P	A	A	A	A	A
20	12/08/2010	Ec62	551	27-1983	ND	(+)	P	A	A	A	A	A

20	12/08/2010	Ec63	553	83-1927	CE Urología	(+)	P	A	A	A	A	A
20	12/08/2010	Ec64	554	60-1950	CE Urología	(+)	P	A	A	A	A	P
20	12/08/2010	Ec65	559	34-1976	ND	(+)	P	A	A	A	A	A
20	12/08/2010	Ec66	560	42-1968	CE Medicina Interna	(+)	P	A	A	A	A	A
20	12/08/2010	Ec67	572	49-1961	Urgencias	(+)	P	A	A	A	A	A
20	12/08/2010	Ec68	628	22-1988	Urgencias	Lenta	P	A	A	A	A	A
21	16/08/2010	Ec69	788	93-1917	Urgencias	(+)	P	A	A	A	A	A
22	18/08/2010	Ec70	815	71-1939	CE Neumología	Lenta	P	A	A	A	A	A
22	18/08/2010	Ec71	840	34-1976	ND	(+)	P	P	A	A	P	A
22	18-ago	Ec72	844	45-1965	CE Medicina Interna	(+)	P	A	A	A	A	A
22	18/08/2010	Ec73	853	74-1936	CE Medicina Interna	(+)	P	A	A	A	A	A
22	18/08/2010	Ec74	857	79-1931	HO Gastroenterología	(+)	P	A	A	A	A	A
22	18/08/2010	Ec75	863	79-1931	HO Traumatología Ortopedia	(+)	P	A	A	A	P	A

22	18/08/2010	Ec76	902	64-1946	HO Infectología	(+)	P	A	A	A	P	A
22	18/08/2010	Ec77	937	-	ND	(+)	P	A	A	A	A	A
23	19/08/2010	Ec78	970	58-1952	ND	(+)	P	A	A	A	A	A
23	19/08/2010	Ec79	972	38-1972	ND	(+)	A	A	A	A	A	A
23	19/08/2010	Ec80	976	43-1967	CE Urología	(+)	P	A	A	A	A	A
23	19/08/2010	Ec81	982	22-1988	CE Medicina Interna	(+)	P	A	A	A	A	A
23	19/08/2010	Ec82	985	25-1985	CE Urología	(+)	P	A	A	A	A	A
23	19/08/2010	Ec83	987	41-1969	CE Hematología	(+)	P	A	A	A	A	A
23	19/08/2010	Ec84	989	86-1924	CE Urología	(+)	P	A	A	A	A	A
24	20/08/2010	Ec85	1066	66-1944	CE Medicina Interna	Lenta	P	A	A	A	A	A
24	20/08/2010	Ec86	1084	48-1962	CE Medicina Interna	Lenta	P	A	A	A	A	A
24	20/08/2010	Ec87	1096	61-1949	HO Infectología	(+)	P	A	A	A	A	A
24	20/08/2010	Ec88	1137	27-1983	Nefrología	(+)	A	A	A	A	A	A
25	23/08/2010	Ec89	1154	63-1947	CE Medicina Interna	Lenta	P	A	A	A	A	A

25	23/08/2010	Ec90	1228	34-1976	CE Nefrología	(+)	P	A	A	A	A	A
25	23/08/2010	Ec91	1232	45-1965	CE Urología	(+)	P	A	A	A	A	A
25	23/08/2010	Ec92	1235	29-1981	ND	(+)	P	A	A	A	A	A
25	23/08/2010	Ec93	1255	68-1942	HO Medicina Interna	(+)	P	P	A	A	A	A
26	26/08/2010	Ec94	1456	64-1946	CE Urología	(+)	P	A	A	A	A	A
26	26/08/2010	Ec95	1461	43-1967	CE Nefrología	(+)	A	A	A	A	A	A
26	26/08/2010	Ec96	1490	38-1972	ND	(+)	P	A	A	A	A	A
27	27/08/2010	Ec97	1520	22-1988	Sala de Partos	(+)	A	A	A	A	A	A
27	27/08/2010	Ec98	1528	69-1941	CE Urología	Lenta	P	A	A	A	A	A
27	27/08/2010	Ec99	1540	22-1988	ND	(+)	P	A	A	A	A	A
27	27/08/2010	Ec100	1548	46-1964	CE Nefrología	(-)	A	A	A	A	A	A
27	27/08/2010	Ec101	1556	58-1952	HO Neurología	(+)	P	A	A	A	A	A
27	27/08/2010	Ec102	1465	84-1926	Cirugía General Sur	(+)	P	A	A	A	A	A
27	27/08/2010	Ec103	1637	70-1942	Urgencias	(+)	A	A	A	A	A	A
28	30/08/2010	Ec104	1620	66-1944	CE Medicina Interna	(+)	P	A	A	A	A	A

29	31/08/2010	Ec105	1746	72-1940	Cirugía General Norte	(+)	P	A	A	A	A	A
29	31/08/2010	Ec106	1706	76-1934	CE Endocrinología	Lenta	P	A	A	A	A	A
29	31/08/2010	Ec107	1715	69-1943	CE Urología	(+)	P	A	A	A	A	A
29	31/08/2010	Ec108	1578	30-1980	HO Neumología	(+)	P	A	A	A	A	A
29	31/08/2010	Ec109	1610	47-1963	HO Observación	(-)	P	A	A	A	A	A
29	31/08/2010	Ec110	1316	77-1933	CE Traumatología Ortopedia	(+)	P	A	A	A	A	A
29	31/08/2010	Ec111	1319	66-1944	CE Medicina Interna	(+)	P	A	A	A	A	A
30	03/09/2010	Ec 112	1779	74-1936	CE Urología	(+)	P	A	A	A	P	A
30	03/09/2010	Ec 113	1790	56-1954	CE Urología	(-)	A	A	A	A	A	A
30	03/09/2010	Ec 114	1794	51-1959	CE Nefrología	(+)	P	A	A	A	P	A
30	03/09/2010	Ec 115	1796	39-1971	CE Urología	(+)	P	A	A	A	A	A
30	03/09/2010	Ec 116	1798	40-1970	CE Urología	(+)	P	A	A	A	P	A
30	03/09/2010	Ec 117	1799	77-1933	CE Urología	(-)	P	A	A	A	P	A
31	06/09/2010	Ec 118	1817	1953	CE Urología	(+)	P	A	A	A	A	A

31	06/09/2010	Ec 119	1891	1977	Ginecología	(+)	P	A	A	A	A	A
31	06/09/2010	Ec 120	1803	1937	Neumología	(-)	P	A	A	A	A	A
31	06/09/2010	Ec 121	1807	1977	HO Transplante	(+)	P	A	A	A	A	A
32	08/09/2010	Ec 122	1910	1938	CE Traumatología Ortopedia	(+)	P	A	A	A	A	A
32	08/09/2010	Ec 123	1917	1914	CE Medicina Interna	(+)	P	A	A	A	A	A
32	08/09/2010	Ec 124	1919	1964	CE Nefrología	(-)	P	A	A	A	A	A
33	09/09/2010	Ec 125	100	1946	ND	(+)	P	A	A	A	A	A
33	09/09/2010	Ec 126	139	1950	ND	(-)	P	A	A	A	A	A
33	09/09/2010	Ec 127	32	1968	ND	(-)	P	A	A	A	A	A
33	09/09/2010	Ec 128	35	1983	Urgencias	(+)	P	A	A	A	A	A
33	09/09/2010	Ec 129	322	1916	CE Medicina Interna	(+)	P	A	A	A	A	A
33	09/09/2010	Ec 130	338	1983	CE Nefrología	(+)	P	A	A	A	A	A
33	09/09/2010	Ec 131	349	1929	CE Nefrología	(+)	P	A	A	A	A	A
33	09/09/2010	Ec 132	352	1950	CE Medicina Interna	(+)	P	A	A	A	A	A

33	09/09/2010	Ec 133	359	1960	ND	(+)	P	A	A	A	A	A
33	09/09/2010	Ec 134	363	1935	CE Medicina Interna	(+)	P	A	A	A	A	A
33	09/09/2010	Ec 135	364	1951	CE Nefrología	(+)	P	A	A	A	A	A
33	09/09/2010	Ec 136	365	1921	HO Traumatología Ortopedia	(+)	P	A	A	A	A	A
33	09/09/2010	Ec 137	368	1928	CE Medicina Interna	(+)	P	A	A	A	A	A
33	09/09/2010	Ec 138	352	1963	CE Gastroenterología	(-)	P	A	A	A	A	A
34	10/09/2010	Ec 139	430	1968	CE Medicina Personal	(-)	P	A	A	A	A	A
34	10/09/2010	Ec 140	438	1973	CE Medicina Interna	(+)	P	A	A	A	A	A
34	10/09/2010	Ec 141	442	1943	CE Urología	(-)	P	A	A	A	A	A
34	10/09/2010	Ec 142	449	1969	CE Medicina Interna	(+)	P	A	A	A	A	A

4.5 DISCUSIÓN

Las infecciones de vías urinarias (IVUs) a nivel mundial son muy comunes y *Escherichia coli* es el agente principal que provoca esta infecciones. Gran parte de las cepas de *E. coli* no son un peligro para el organismo siempre y cuando que vivan en el intestino que es su nicho natural, pero si ingresan en otras partes estériles del cuerpo como el tracto genital o urinario, pueden causar graves problemas desencadenando una infección bacteriana. Y si las infecciones no son tratadas a tiempo, las bacterias ascienden por los uréteres hacia los riñones y provocan una infección secundaria, conocida como pielonefritis aguda, con el riesgo de causar daño renal irreversible conduciendo a la insuficiencia renal y posteriormente a la muerte. Cuando la bacteria coloniza el tracto urinario se la conoce como *Escherichia coli* Uropatógena (UPEC) y es el patógeno al que más se le asocia con las IVUs de todo tipo complicadas, no complicadas y recurrentes. En muchos casos los ensayos y pruebas de laboratorio ya no son muy útiles en la investigación de estos patógenos, por lo que ahora se recurre con más frecuencia a herramientas moleculares que son más confiables en el descubrimiento de genes y determinación de factores de virulencia (FVs) y resistencia bacteriana. Dichas investigaciones cobran mucha importancia ya que se considera que el potencial patógeno de las cepas de *E. coli* está altamente ligado a la presencia de FVs. Dichos factores de virulencia promueven la colonización y persistencia de la bacteria en el uroepitelio provocando así una respuesta inflamatoria común o muchas veces causando lesiones mucho más importantes.

Para la Genotipificación de los genes de virulencia se utilizó el ensayo de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y la Multiplex PCR que es una variante de la PCR convencional pero con el mismo fundamento, estos métodos son altamente específicos y eficaces en la amplificación y detección de genes de virulencia de muchas especies bacterianas. En nuestro estudio se evidenció una elevada prevalencia del gen *fimH* (74,6%) entre la gran mayoría de los aislamientos, lo que confirma su elevada frecuencia en las UPECs, correlacionando con los resultados obtenidos en otras investigaciones sobre las que basamos esta investigación. Comparando con el trabajo realizado en Brasil en el año 2008, el gen *fimH* se amplificó en 158 cepas (97,5%) de un total de 162 muestras analizadas, lo que demuestra que la Fimbria tipo 1 tiene un gran valor como factor de virulencia en la *E.*

coli Uropatógena cumpliendo un papel importante en la inflamación y adherencia al epitelio del tracto urinario. En relación a la adhesinas de la Fimbria P, el alelo *pap GI* sólo se amplificó en una muestra (0,7%) corroborando los resultados obtenidos del trabajo citado anteriormente en los que todas las cepas fueron negativas para este gen. En comparación de los otros genes que se amplificaron en un número un poco mayor. El gen *pap GII* amplificó en 8 cepas (5,6%) y *pap GIII* en 3 cepas (2,1%) es aquí donde hay una diferencia más grande en comparación con la población brasileña. En el caso de la VFs exportados hubo grandes diferencias en los resultados de nuestra población y la de Brasil. Para el gen *usp* la prevalencia fue del 2,1 % con 3 muestras positivas y se manifiesta un gran contraste con la prevalencia del estudio en Brasil de un 22,2% de prevalencia (Ribeiro Tiba Monique, 2008) y del trabajo proveniente de Japón que indicó en 195 aislamientos de cistitis (80%) y 93% en las 76 muestras aisladas con pielonefritis, esto puede deberse a las diferencias entre los individuos que proporcionan las muestras o puede reflejar la variación geográfica de las cepas. El gen *hlyA* que codifica para la toxina α-hemolisina, no hubo ninguna cepa positiva para este gen (0%), lo que indica que no siempre se encuentra en relación con las adhesinas de la fimbria P.

Es interesante ver que en este estudio también hubo cepas que manifestaron combinaciones de factores de virulencia, en este caso la mayor parte fue de las adhesinas, que demuestran estar relacionadas entre sí, en especial los genes que codifican para las fimbrias tipo 1 con los que codifican para las fimbrias P. Aunque también hubo una combinación en una cepa con el gen *usp* de la proteína uropatógena específica, que no se puede dejar de tomar en cuenta por las propiedades recientemente descubiertas de este factor de virulencia.

En este estudió se confirmaron algunos criterios conforme a otras investigaciones realizadas y se proporcionó nueva información epidemiológica molecular de los genes que codifican para los FVs en toda clase de IVU dentro de nuestra población. Se establecieron ensayos con PCR convencional y Multiplex PCR que son técnicas moleculares muy importantes, capaces de genotipificar con mucha sensibilidad a los FVs en las UPECs.

CONCLUSIONES

- La caracterización de la virulencia de *Escherichia coli* Uropatógena demuestra una alta concurrencia de los genes que codifican para las adhesinas, que permiten a la bacteria permanecer en el tracto urinario por más tiempo y eludir a las primeras barreras de protección en especial el vaciamiento vesical. En este caso los análisis demuestran la presencia de los genes *fimH, pap G clase I, II* y *III*, obteniéndose como resultados de prevalencia 74.6%, 0.7%, 5.6% y 2.1% respectivamente.

- Para los genes productores de toxinas en el caso del productor de la α-hemolisina (*hlyA*), no se observó ninguna amplificación y en el análisis no se identificó al mismo dentro de las muestras aisladas, por lo que se concluye que en la población escogida no se ha manifestado la expresión del gen codificante *hlyA* de la α-hemolisina

- Los resultados obtenidos de la presencia de genes de virulencia demuestran que los aislados en general presentan una elevada virulencia con respecto a los factores que permiten la adhesión en las células hospederas. Es decir que los genes *fimH* y *pap G I, II* y *III* están facilitando la permanencia de la bacteria en el huésped, precediendo el desencadenamiento del resto de la cascada molecular que permitiría el avance de la infección dentro de las células hospederas.

- Este estudio demuestra que la mayoría de casos de IVUs pueden llegar a complicarse debido a la acción de las adhesinas y proteína específica uropatógena, codificada por el gen *usp,* que también evidenció amplificación aunque en pequeñas proporciones con una prevalencia del 2.1%.

- Al no obtenerse resultados positivos para el gen *hlyA* podemos concluir que no siempre los diferentes genes de virulencia van a estar en relacionados entre sí, todo varía por la población y eficacia de los mecanismos de transferencia horizontal de genes.

- Con los resultados obtenidos se concluye que los algunos de los factores de virulencia de la UPEC están distribuidos dentro de la población femenina adulta del HCAM y se seguirán dispersando inclusive en otro tipo de poblaciones como la infantil y masculina adulta.

- Al conocer ahora que la UPEC está presente aunque en una pequeña porción dentro de nuestra población, se deben tomar en cuenta nuevos mecanismos de tratamiento para las IVUs considerando también que esta bacteria al ser tan virulenta es potencialmente resistente a antibióticos.

- Se puede reconocer una ventaja en los resultados de esta población al haber expresado la amplificación de menos genes se puede trabajar con más facilidad en la antibiótico terapia en especial con el gen productor de fimbria tipo 1 y su papel de adhesión al epitelio de las mucosas y a la matriz tisular y la formación de biofilms.

- Es importante tomar mucho más en cuenta a las muestras en las que se determinó más de un gen de virulencia, ya que debido a esto serán cepas mucho más virulentas y agresivas, y en las que la antibióticoterapia común podría resultar insignificante. Lo que motiva a realizar estudios posteriores en base a estos antescedentes.

- Al correlacionar nuestros resultados con estudios de otras poblaciones podemos observar que hay similitudes en la amplificación de genes que progresivamente irán aumentado debido a la rapidez con la que las bacterias comparten sus habilidades y características que las hacen un enemigo potencial del ser humano.

- La *Escherichia coli* UPEC es y continuará siendo, el microorganismo más frecuentemente encontrado como factor etiológico en las infecciones no complicadas, complicadas y recurrentes de las vías urinarias.

BIBLIOGRAFÍA

Allan Ronald, M. (2002). The Etiology of Urinary Tract Infection: Traditional and Emerging Pathogens. *Excerpta Medica, Inc.*, 14-19.

Álvarez Barranco, L. C. (2007). Infecciones de vías urinarias en el Hospital Universidad del Norte. *Salud Uninorte*, 9-18.

Andreu-Domingo, A. (2005). Patogenia de las infecciones del tracto urinario. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 15-21.

Bartková G., C. I. (1994). Characterization of Adhesion Associated Surface Properties of Uropathogenic Escherichia coli. *Folia Microbiol.*, 373-377.

Bauer Richard J., Z. L. (2002). Molecular Epidemiology of 3 Putative Virulence Genes for Escherichia coli Urinary Tract Infection- usp, iha and iron E. coli. *Journal of Infectious Diseases* .

Bien Justyna, S. O. (2012). Role of Uropathogenic Escherichia coli Virulence Factors inDevelopment of Urinary Tract Infection and Kidney Damage. *Hindawi Publishing Corporation International Journal of Nephrology*, 1-15.

Borrero R. Jaime, V. A. (2004). *Nefrología.* Corporación para investigaciones biológicas.

Bouckaert Julie, M. J. (2006). The affinity of the FimH fimbrial adhesin is receptor-driven and quasi-independent of Escherichia coli pathotypes. *Molecular Microbiology*, 1556–1568.

Cano Sch Francisco, S. R. (2010). Nefritis Aguda Focal. Caso Clínico. *Revista Chilena de Pediatría*.

Cárdenas Martínez, A. G. (2009). Evaluación Multicéntrica de la actividad antimicrobiana in vitro de tigeciclina en cepas asiladas de muestras clínicas de pacientes del Hospital Carlos Andrade Marín en el año 2009.

Casellas, J. M. (2008). Etiología (etiopatogenia) de las infecciones urinarias. *ANUARIO FUNDACIÓN Dr. J. R. VILLAVICENCIO*.

Cerquetti, M. C. (2012). Bacilos gram-negativos: Enterobacterias y otros géneros: Brucella y Pseudomonas.

Chung Amanda, A. M. (2010). Bacterial cystitis in women. *Australian Family Physician Vol. 39*.

Croxen Matthew A., F. B. (2010). Molecular mechanisms of Escherichia coli pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology* , 26-38.

Di Pierro M, L. R. (2001). Zonula occludens toxin structure-function analysis. Identification of the fragment biologically active on tight junctions and of the zonulin receptor binding domain. *J Biol Chem*.

Díaz, A. E. (2008). De la bacteriuria asintomática a la infección de vías urinarias: ¿tratarla o no hacerlo? 206-220.

Duplessis Christopher, W. T. (2011). Uropathogenic Escherichia coli. *The Female Patient*.

Echevarría-Zarate Juan, S. A.-P. (2006). Infección del tracto urinario y manejo antibiótico. *Acta Med Per*, 26-31.

Evelyn, P. M. (2006). Uretritis. *Revista Paceña de Medicina Familiar*.

Faleiro Naves, P. L. (2009). 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*.

Farinati Alicia E., G. I. (1996). Infecciones Urinarias. *Curso de Microbiología Clínica*.

Farshad S., E. F. (2009). Association of Virulent Genes hly, sfa, cnf-1 and pap with Antibiotic Sensitivity in Escherichia coli Strains Isolated from Children with Community-Acquired UTI. *Iranian Red Crescent Medical Journal*, 33-37.

Féria Constança, M. J. (2001). Distribution of papG alleles among uropathogenic Escherichia coli isolated from di¡erent species. *FEMS Microbiology Letters*, 201-205.

Fronzes Rémi, C. P. (2009). Schematic overview of the major protein secretion systems in Gram-negative bacteria. *Nature Reviews Microbiology* .

Gibreel, T. (2011). Molecular Epidemiology of Uropathogenic Escherichia coli in North West England and characterisation of the ST131 clone in the region.

Gómariz M, V. D. (1998). Infecciones urinarias no complicadas.

González Monte, E. (2011). Infecciones del tracto urinario. *Nefrología al Día*.

González-Pedrajo Bertha, D. G. (2003). Sistemas de secreción de proteínas en las bacterias Gram negativas: Biogénesis flagelar y translocación de factores de virulencia. *Mensaje Bioquímico, Vol. XXVII*.

Guyer M. Debra, K. J.-S. (1998). Genomic Analysis of a Pathogenicity Island in Uropathogenic Escherichia coli CFT073: Distribution of Homologous. *Infection and Inmunity*, 4411–4417.

Hans, O. S. (2002). Infección urinaria en el Embarazo. Tratamientos acortados vs. tratamientos prolongados tradicionales. *Fronteras en Obstetricia y Ginecología*.

James R. Johnson, T. A. (2000). Molecular Epidemiological and Phylogenetic Associations of Two Novel Putative Virulence Genes, iha and iron E. coli, among. Escherichia coli Isolates from patients with urosepsis. *American Society of Microbiology. Infection and Inmunity*.

Johnson, J. R. (1991). Virulence Factors in Escherichia coli Urinary Tract Infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 80-128.

Kaper James B, N. J. (2004). Pathogenic Escherichia coli. *Nature Reviews*.

Koneman Elmer, A. S. (2006). *Diagnóstico Microbiológico.* Madrid-España: Editorial Panamericana.

Koster M, B. W. (2000). Protein secretion mechanisms in Gram-negative bacteria. *Int J Med Microbiol*, 325-331.

L. Emödy, M. K. (2003). Virulence factors of uropathogenic Escherichia coli. . *International Journal of Antimicrobial Agents*, 29-33.

Lloarach, C. (2002). Infección del vías urinarias en adultos.

López Arias , G. (2003). Infecciones de vías urinarias.

López-Cruz Gerardo, R.-G. U.-C. (2010). Proteina de Tamm-Horsfall: Implicaciones clínicas en la Vía Urinaria. *Bol Clin Hosp Infant Edo Son*, 125-128.

M. Grabe, T. B.-J. (2010). Guías Clínicas sobre las Infecciones Urológicas. *Infecciones Urológicas*.

M. Torres, A. M. (2008). Infección urinaria. 189 - 196.

Méndez-Álvarez Sebastián, P.-R. E. (2004). La PCR múltiple en Microbiología Clínica. *Enferm Infec Microbiol Clin*, 183-192.

Monte, E. G. (2011). Infecciones del tracto urinario. *Nefrología al día*.

Nguyen Lily, P. I. (2000). Phylogenetic Analyses of the Constituents of Type III Protein Secretion Systems. *Horizon Scientific Press*.

Oelschlaeger Tobias A., D. U. (2002). Virulence factors of uropathogenes. *Curr Opin Urol.*, 33-38.

Padilla Peña Carmen Alicia, D. D. (2008). Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa. Aislamiento y caracterización electroforética de DNA plasmídico.

Potenziani Bigelli Julio César, C. O. (2010). Mujeres con Infecciones Urinarias Recurrentes: Factores predisponentes en ambos integrantes de la pareja. Nuevo enfoque diagnóstico.

R. A. Welch, V. B.-R. (2002). Extensive mosaic estructure revealed by the complete genome sequence of Uropathogenic Escherichia coli. *PNAS*.

Remaut Han, W. G. (2004). Structural biology of bacterial pathogenesis. *ELSEVIER*, 161-170.

Ribeiro Tiba Monique, T. Y. (2008). Genotypic characterization of virulence factors in Escherichia coli strains from patients with cystitis. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 255-260.

Rijavec Matija, M.-P. M. (2008). Virulence factors and biofilm production among Escherichia coli strains causing bacteraemia of urinary tract origin. *Journal of Medical Microbiology*, 1329-1334.

Rodicio María del Rosario, M. M. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 238-245.

Rodríguez Sánchez Iram Pablo, B. S. (2004). La Reacción en Cadena de la Polimerasa a dos décadas de su invención. *CIENCIA UANL / VOL. VII*.

Rondón Nucete, M., Orence Onett, O., & Rondón Guerra, A. (2007). *Infección del tracto urinario.*

Sánchez, D. (2011). Infección urinaria recurrente.

Sandkvist, M. (2001). Biology of type II secretion. *Molecular Microbiology*, 271-273.

Santana Mera, L. J. (2009). Perfil de resistencia bacteriana de infecciones urinarias en pacientes embarazadas atendidas en el servicio de ginecología y obstetricia del hospital provincial general docente Riobamba.

Thanassi DG, H. S. (2000). Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. *Curr Opin Cell Biol*, 420-430.

Tornieporth Nadia G., J. J. (1995). Differentiation of Pathogenic Escherichia coli Strains in Brazilian Children by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 1371-1374.

Travis J. Wiles, R. R. (2008). Origins and virulence mechanisms of Uropathogenic Escherichia coli. *Experimental and Molecular Pathology. Elsevier Inc*, 11-19.

Tseng Tsai-Tien, T. B. (2009). Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the Gene Ontology. *BMC Microbiology*.

Valdevenito S., J. P. (2008). Infección urinaria recurrente en la mujer. *Infectología al Día*, 268-276.

Vallejos Medic Clotilde, L. V. (2010). Prevalencia de las infecciones de vías urinarias en embarazadas atendidas en el hospital universitario de Puebla. *Enfermedades Infecciosas Microbiología*, 118-122.

Wanderley Dias da Silveira, F. B. (2001). Biological and Genetic characteristics of Uropathogenic Escherichia coli Strains. *Rev. Inst. Trop.*, 303-310.

Yamamoto Shingo, T. A. (1995). Detection of Urovirulence factors in Escherichia coli by Multiplex Polimerase Chain Reaction. *FEMS Inmunology and Medical Microbiology*, 85-90.

Zechner Ellen L., L. S. (2012). Assembly and mechanisms of bacterial type IV secretion machines. *The Royal Society*, 1073-1087.

Zhang Lixin, F. B. (2003). Molecular epidemiology of Eecherichia coli mediated Urinary Tract Infections. *Frontiers in Bioscience*, 235-244.

ANEXOS

ANEXO 1

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Cronograma de actividades 2010-2011														2012	2012
Meses	**Jun**	**Jul**	**Agt**	**Oct**	**Nov**	**Dic**	**Ene**	**Feb**	**Mar**	**Abr**	**May**	**Jun**	**Jul**	**Ago**	**Dic**
Actividades															
Elaboración del Plan de Tesis							x	x	x	x					
Presentación de Plan de Tesis											x				
Aprobación de Plan de Tesis														x	
Revisión Director de Tesis											x	x	x		x
Compra de Reactivos			x												
Compra de Materiales			x												
Toma de muestras	x	x	x												

Realización de pruebas				x	x	x	x	x	x						
Ingreso y Recolección de datos															
Análisis de datos					x					x	x	x	x		
Análisis de estadísticos de datos				x	x	x	x	x	x	x	x				
Informes de progreso de investigación					x										
Informe Final										x					
Redacción de Tesis												x	x	x	
Presentación de Tesis															x

ANEXO 2

FOTOGRAFÍAS ADICIONALES DE LOS MÉTODOS EMPLEADOS EN LA INVESTIGACIÓN.

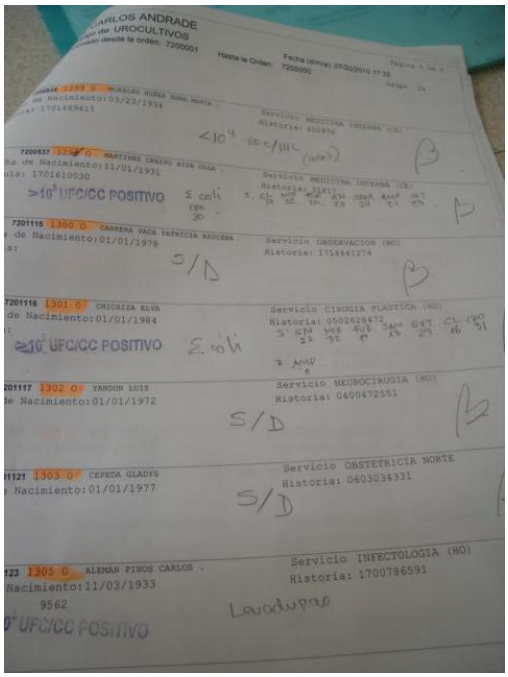


Fig 16: Hojas de trabajo y registros, de la sección de Bacteriología del Laboratorio de Microbiología del HCAM.

Día:			**# Hospital:**
Fecha:			**# HC:**
Fecha de Análisis:			**CI:**
Nº			**Lac:**
Nombre	**Edad**	**Servicio**	**Diagnóstico Presuntivo**
Antibiograma			

Fig 17: Modelo de la ficha de registro de datos del proyecto de cada paciente.

Fig 18: Urocultivos identificados como *E. coli* con su respectivo antibiograma.

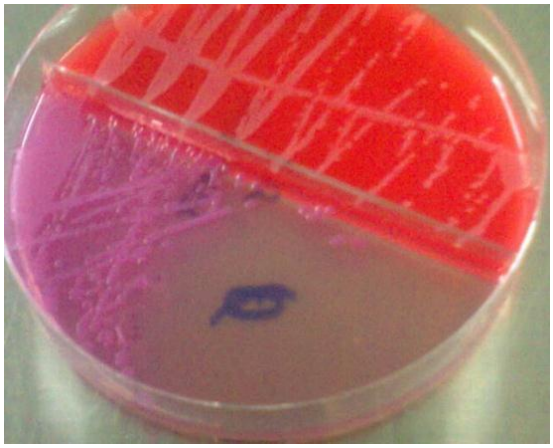


Fig 19: Fotografía de urocultivo identificado como *E. coli.* con $>10^5$ UFC/ml. Se tomaron las colonias rosadas totalmente aisladas.

Fig 20: Fotografía de las cepas almacenadas a -20°C. Numeración en los tubos Eppendorf designada para el proyecto en cada muestra.

Fig 21: Fotografía de las alícuotas que evidencian crecimiento bacteriano en BHI más glicerol (20%) como criopreservante.

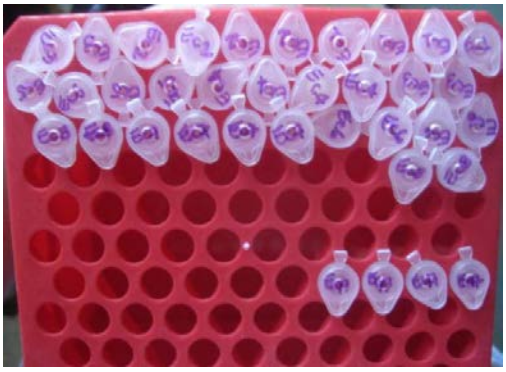


Fig 22: Fotografía de las alícuotas tomadas de cada muestra en caldo BHI con su respectiva numeración.

ANEXO 3

ESTÁNDAR McFARLAND

La escala de McFarland es una escala que representa las concentraciones específicas de UFC/ml. Su finalidad es establecer una relación entre una precipitación química y una suspensión bacteriana.

Con este propósito se recurre al uso del Cloruro de Bario que precipita en presencia del ácido sulfúrico originando una turbidez que puede ser medida en el turbidímetro o en el espectrofotómetro.

La escala McFarland 0.5 es la más utilizada a nivel de los laboratorios de Microbiología. La preparación de las escalas se basa en la siguiente tabla que tiene como base inicial el Estándar McFarland 0.5 (Cárdenas Martínez, 2009)

Escala	**Cl_2Ba (ml) 1%**	**SO_4H_2 (ml) 1%**	**Equivalencia en UFC/ml**
0.5	0.05	9.95	$1,5x10^8$
1	0,1	9,9	$3,0x10^8$
2	0,2	9,8	$6,0x10^8$
3	0,3	9,7	$9,0x10^8$
4	0,4	9,6	$1,2x10^9$
5	0,5	9,5	$1,5x10^9$
6	0,6	9,4	$1,8x10^9$
7	0,7	9,3	$2,1x10^9$
8	0,8	9,2	$2,4x10^9$
9	0,9	9,1	$2,7x10^9$
10	1,0	9,0	$3,0x10^9$

ANEXO 4

PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

1) Agar MacConkey BBL

Fundamento

El agar MacConkey es un medio selectivo y diferencial. Es sólo ligeramente selectiva puesto que la concentración de sales biliares, que inhiben los microorganismos gram positivos, es baja en comparación con otros medios galvánicos entéricos. Violeta de cristal también se incluye en el medio para inhibir el crecimiento de bacterias gram-positivas, especialmente enterococos y estafilococos.

La diferenciación de microorganismos entéricos se logra mediante la combinación de lactosa y el indicador rojo neutro. Incoloro o de color rosa a colonias de color rojo se producen dependiendo de la capacidad del aislado para fermentar los hidratos de carbono.

Uso

El Agar MacConkey es un medio selectivo y diferencial recomendado para el cultivo y aislamiento de microorganismos Gram negativos a partir de muestras clínicas, de alimentos, agua, productos lácteos y productos farmacéuticos. En este medio se aislan y diferencían bacilos entéricos Gram negativos fermentadores y no fermentadores de la lactosa.

Fórmula

Digerido Pancreático de Gelatina 17.0

Digerido Pancreático de Caseína 1.5

Digerido Péptico de Tejido Animal 1.5

Lactosa 10.0

Rojo Neutro 0.03

Sales Biliares 1.5

Cloruro de Sodio 5.0

Cristal Violeta 0.001

Agar Bacteriológico 13.5

pH 7.1 ± 0.2

Preparación por litro

Suspender 50g del medio en un litro de agua purificada. Calentar con agitación suave hasta su completa disolución y hervir durante un minuto. Esterilizar en autoclave a 121°C (15 libras de presión) durante 15 minutos. Enfriar a una temperatura entre 45-50°C y vaciar en placas de Petri estériles.

2) Infusión Cerebro Corazón (BHI)

Fundamento

El medio de Infusión Cerebro Corazón es una modificación de las formulaciones desarrolladas por Rosenow y Hayden en las que se adicionó infusión de cerebro de ternera y difosfato de sodio.

El medio de Infusión Cerebro Corazón está especificado en varios procedimientos estándares para la industria alimenticia y el análisis de aguas. También es recomendado por la NCCLS para preparar el inóculo para las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana.

En este medio la infusión de carne de corazón y de cerebro de ternera así como la peptona proveen la fuente de carbono, nitrógeno sulfuro y vitaminas. La dextrosa actúa como fuente de energía. El cloruro de sodio mantiene el balance osmótico del medio. El fosfato disódico actúa como buffer.

Uso

El medio de Infusión Cerebro Corazón es utilizado para el cultivo de microorganismos fastidiosos como estreptococos, neumococos y meningococos. Este medio también es conocido como BHI por sus siglas en inglés.

Fórmula

Infusión de Cerebro de Ternera 200.0

Infusión de Corazón de Res 250.0

Peptona de Gelatina 10.0

pH 7.4 ± 0.2

Cloruro de Sodio 5.0

Fosfato Disódico 2.5

Dextrosa 2.0

Preparación por litro

Suspender 37g del medio en un litro de agua purificada. Calentar con agitación suave hasta su completa disolución y hervir durante un minuto. Dispensar en tubos de vidrio, tapar con papel aluminio y esterilizar en autoclave a 121°C (15 libras de presión) durante 15 minutos.

ANEXO 5

RECONSTITUCIÓN Y ALMACENAMIENTO DE PRIMERS

Reconstitución:

1. Para reconstituir los primers someter a centrifugación el tubo que lo contiene por unos segundos con el objeto de precipitar todo el contenido al fondo del tubo.

2. Retirar la tapa con cuidado y añadir el volumen apropiado de TE o Agua grado biología molecular para realizar la reconstitución. El volumen varía en referencia a la concentración que se desea obtener **(Ver cálculo de la concentración).**

3. Dejar en reposo por el lapso de dos minutos para que el óligo se rehidrate, y posteriormente, someta a agitación en el vortex durante 15 segundos.

Almacenamiento:

1. Los oligonucleótidos liofilizados son estables a -20ºC alrededor de un año

.

2. Los oligonucléotidos disueltos en TE son estables alrededor de 6 meses a temperatura de -20ºC o 4ºC.

3. Los oligonucleótidos disueltos en agua son estables a -20ºC al menos por 6 meses en ausencia de nucleasas por lo que se debe asegurar que el agua a utilizarse sea totalmente pura y tenga pH neutro.

NOTA: NO ALMACENAR A 4ºC LOS OLIGONUCLEOTIDOS DISUELTOS EN AGUA.

Solución de Disolución:

Agua para biología molecular o buffer TE.

- Para preparar el buffer se utiliza agua desionizada ya que la acidez que pude contener el agua puede causar hidrólisis de los oligonucleótidos.

- Se recomienda que los óligos sean reconstituidos en concentraciones mayores a 10 uM.

Al momento de adquirir un oligonucleótido, el proveedor o compañía productora facilita la información esencial, como características químicas (Peso molecular (PM), concentración molar, OD, ug, nmoles entre otras), que facilitan el cálculo de las cantidades en masa y volumen que se requiere al momento de usarlos.

En base a estas características, a continuación se presenta diferentes rutas para calcular la concentración y el volumen necesario para reconstituir un oligonucleótido.

Cálculo de la Concentración de Reconstitución

Al momento de adquirir un oligonucleótido, el proveedor o compañía productora facilita la información esencial, como características químicas (Peso molecular (PM), concentración molar, OD, ug, nmoles entre otras), que facilitan el cálculo de las cantidades en masa y volumen que se requiere al momento de usarlos.
En base a estas características, a continuación se presenta diferentes rutas para calcular la concentración y el volumen necesario para reconstituir un oligonucleótido.

EJEMPLOS:

1. **Cálculo de la concentración molar a partir del número de nanomoles.**

Si se conoce que el número de nmoles es 24 y se desea resuspender en 1 ml se deberá realizar lo siguiente:

$$1ml = 0.001L$$

$$24nmoles/0.001L = 24000nmoles/L = 24000nM$$

$$24000\,nmole/L * 1umole/1000nmole = 24\,umole/L = 24uM$$

Explicación: se realiza una conversión de ml a L ya que la molaridad esta expresada en mol/L, al dividir los nmoles sobre los litros se obtiene la concentración molar (nM) entonces para obtener la concentración en uM debemos dividir por el factor de conversión que es 1000, logrando obtener la concentración molar que es 24 uM.

2. **Solución Stock con una concentración a 100 uM.**

Si tenemos 24 nmoles de óligo:

$$24nmole * 1umole/1000nmole = 0.024umole$$

$$0.024umole/100uM = 0.024umole/100umole/L = 0.00024L$$

$$0.00024L * 1000ml/L = 0.24ml = 240ul$$

Explicación: Se debe convertir de nmoles a umoles entonces se divide por la concentración molar a la que se desea llegar (umole/L), los umoles vienen dados en litros por lo que se debe convertir en ml. Para conseguir una concentración molar de 100 uM se deberá resuspender en 0,24 ml.

3. Cálculo desde OD

Si el OD es 0.14 y si el ug/OD reportado 36.6:

$$0.14\,OD/ml * 1000ul/10ul = 14\ OD/mlstock$$

$$14\,OD/ml * 36.6\,ug/OD = 512.4\,ug/ml$$

Explicación: El OD/ml es multiplicado por el factor de dilución para conseguir el stock OD/ml. El OD es convertido a ug/ml multiplicando el OD/ml del stock por el ug/OD. Logrando obtener la concentración en ug/ml; en el ejemplo 512,4 ug/ul.

Si el valor de nmole/OD reportado es 4.9:

$$0.14\,OD/ml * 1000ul/10ul = 14\,OD/mlstock$$

$$14\,OD/ml * 4.9\,nmole/OD = 68.6\,nmole/ml$$

$$68.6\,nmole/ml * 1000ml/1L = 68600\,nmole/L = 68600nM$$

$$68600nM = 68600\,nmoles/L$$

$$68600\,nmoles/L * 1umole/1000nmole = 68.6\,umole/L = 68.6uM$$

Explicación: El OD/ml es multiplicado por el factor de dilución para conseguir el stock OD/ml. El OD/ml es multiplicado por el número de nmoles/OD, los ml son convertidos en L obteniendo la concentración nmolar entonces se divide por el factor de conversión (1000) para obtener la concentración en uM.

4. Cálculo desde el Peso Molecular

Cálculo desde el Peso molecular (PM) si se conoce que el valor del óligo es 7440,9

$$7440.9\,{}^{gr}\!/_{mole} = 7440.9\,{}^{ug}\!/_{umole}$$

$$7440.9\,{}^{ug}\!/_{umole} * 68.6\,{}^{umole}\!/_{L} = 510445.74\,{}^{ug}\!/_{L}$$

$$510445.74\,{}^{ug}\!/_{L} * {}^{1L}\!/_{1000ml} = 510.4\,{}^{ug}\!/_{ml}$$

ANEXO 6

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

1) TAE (Tris-Acetate-EDTA) BUFFER

Componentes:

Tris HCl Stock 0,5M

EDTA Stock 0,5M

Tris HCl 10 [mM]

EDTA 1 [mM]

Vf= 50 ml

0,5 M= 500 [mM]

Tris HCl 500mM

C1 x V1 = C2 x V2

500mM xV1= 10mM x 50 ml

V1= (10 x 50) / 500

V1= 1ml

EDTA 500mM

C1 x V1 = C2 x V2

500mM x V1 = 1mM x 50ml

V1 = (1 x 50) / 500

V1= 0,1 ml (100mM)

Por lo tanto:

(1,1 ml de Tris HCl + EDTA) + (48,9 ml de Agua destilada grado molecular) = 50 ml de TAE buffer

2) TAE (Tris-Acetate-EDTA) BUFFER 50X

Componentes:

Tris	48,4 ml
Ácido Acético	11,42 ml
EDTA	3,72 gr

Vf= 200 ml TAE buffer 50X

Primero añadir el Tris, luego el Ácido Acético, luego agua destilada, EDTA y al final agua destilada

Mezclar en el agitador magnético hasta que se disuelva por completo.

3) TAE (Tris-Acetate-EDTA) BUFFER 1X

C1= 50X

C2= 1X

V1= ?

V2= 1000 ml Agua destilada

C1 x V1 = C2 x V2

50 X V1 = 1 X 1000

V1= 1000 / 50

V1= 20 ml TAE 50X + 980 ml Agua destilada = 1000 ml TAE buffer 1X

ANEXO 7

INSERTO PCR SUPERMIX INVITROGEN[MR]

invitrogen

PCR SuperMix

Cat. No. 10572-014 **Size: 100 reactions**
Cat. No. 10572-063 **Size: 5000 reactions**

Store at -20°C (in a non-frost-free freezer)

Description

PCR SuperMix provides qualified reagents for the amplification of nucleic acid templates by the polymerase chain reaction (PCR). PCR SuperMix contains Mg^{++}, dNTPs, and recombinant *Taq* DNA Polymerase at concentrations sufficient to allow amplification during PCR. PCR SuperMix is supplied at 1.1X concentration to allow approximately 10% of the final reaction volume to be used for the addition of primer and template solutions. Reagents sufficient for 100 and 5000 amplification reactions of 50 µl each are provided.

PCR SuperMix may be stored at either -20°C or 4°C. Storage at 4°C avoids the necessity of thawing the mix before assembling the PCR. No detectable reduction of PCR performance or enzyme activity is observed after storage of PCR SuperMix for 8 months at 4°C. Repeated freeze-thaw cycles do not reduce performance or activity.

Component	100-rxn size	5000-rxn size
PCR SuperMix	4 x 1.125 ml	4 x 56.25 ml

Components

22 mM Tris-HCl (pH 8.4), 55 mM KCl, 1.65 mM MgCl2, 220 µM dGTP, 220 µM dATP, 220 µM dTTP, 220 µM dCTP, 22 U recombinant *Taq* DNA Polymerase/ml, stabilizers.

Guidelines and Recommendations

Since PCR is a powerful technique capable of amplifying trace amounts of DNA, all appropriate precautions should be taken to avoid cross-contamination. Ideally, amplification reactions should be assembled in a DNA-free environment. Use of aerosol-resistant barrier tips is recommended. Take care to avoid contamination of PCR SuperMix with the primers or template DNA used in individual reactions. PCR products should be analyzed in an area separate from the reaction assembly area.

A standard 50-µl reaction uses 45 µl of PCR SuperMix and 5 µl of primer and template solution. We have observed no decrease in product yield if the amount of template and primer solution added is between a fraction of a microliter and 20 µl. Lower yields occur as the Mg^{++} concentration drops to a suboptimal level. If the final Mg^{++} concentration is adjusted to 1.5 mM, the volume of primer and template solution that can be added to 45 µl of PCR SuperMix can exceed 50 µl.

Quality Control

The Certificate of Analysis provides detailed quality control and product qualification information for each product. Certificates of Analysis are available on our website. Go to www.invitrogen.com/support and search for the Certificate of Analysis by product lot number, which is printed on the box.

Protocol

The following protocol is suggested as a starting point and guideline when using PCR SuperMix. We recommend assembling reactions on ice from pre-chilled components. This protocol is for a reaction size of approximately 50 µl. The reaction size may be adjusted as desired.

Note: For multiple reactions with common components, prepare a master mix of the components common to all reactions to reduce pipetting errors.

1. Set up reaction tubes/plates on ice.
2. Add the following components in any order to each reaction vessel.
   - 45-µl PCR SuperMix
   - Primers (200 nM final concentration per primer is recommended)*
   - Template DNA solution*

   *Total volume of primer and template solution can be 0.5-20 µl.
3. Mix contents and cover with mineral or silicone oil, if necessary.
4. Cap reaction vessels and load in thermal cycler at 80°C.
5. Run cycling program.

ANEXO 8

INSERTO SYBER SAFE INVITROGEN

invitrogen

MOLECULAR PROBES®

SYBR® Safe DNA Gel Stain

Table 1 Contents and storage

Material	Amount	Concentration	Storage	Stability
SYBR® Safe in TBE buffer	1 L* or 4 L†	0.5X, 45 mM Tris-borate, 1 mM EDTA, pH ~8.3	• 2–25°C • Protect from light	~6 months, when stored as directed
SYBR® Safe in TAE buffer	1 L* or 4 L†	1X, 40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA, pH ~8.3		
SYBR® Safe in DMSO	400 µL	10,000X		
SYBR® Safe DNA Gel Stain Starter Kit	1 L of SYBR® Safe gel stain, and one SYBR® Safe photographic filter	0.5X TBE		

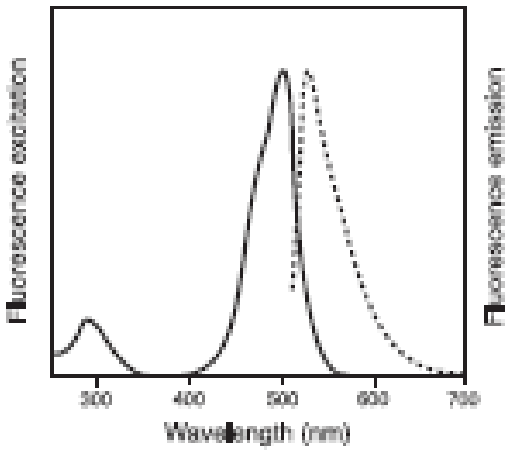
Number of labelings: * Provides sufficient material to stain ~20 minigels. † Provides sufficient material to stain ~80 minigels. 4 L unit size is packaged in a cube-shaped container with a removable spigot for easy dispensing and storage.

Approximate fluorescence excitation and emission maxima: 280, 502/530 nm, bound to DNA

Introduction

SYBR® Safe DNA gel stain has been specifically developed for reduced mutagenicity, making it safer than ethidium bromide for staining DNA in agarose or acrylamide gels. SYBR® Safe stain comes either as a concentrate or as a ready-to-use solution that can be used like an ethidium bromide solution, and the detection sensitivity with SYBR® Safe stain is comparable to that obtained with ethidium bromide. DNA bands stained with SYBR® Safe DNA gel stain can be detected using a standard UV transilluminator, a visible-light transilluminator, or a laser-based scanner. The stain is also suitable for staining RNA in gels. Bound to nucleic acids, SYBR® Safe stain has fluorescence excitation maxima at 280 and 502 nm, and an emission maximum at 530 nm (Figure 1, page 2).

Figure 1 Normalized fluorescence excitation and emission spectra of SYBR® Safe DNA gel stain, determined in the presence of DNA



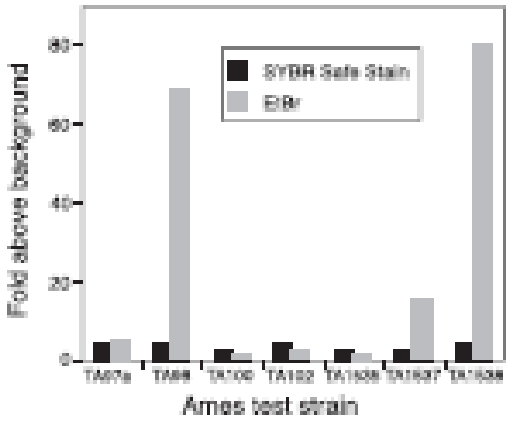
Before Starting

Storage, Handling, and Disposal

You may store the SYBR® Safe DNA gel stain at any temperature between 2 to 25°C. SYBR® Safe in DMSO freezes at low temperatures; therefore, the product must be completely thawed and mixed before using. Repeated freeze-thawing has minimal impact on product performance.

SYBR® Safe DNA gel stain showed no or very low mutagenic activity when tested by an independent, licensed testing laboratory, and this stain is not classified as hazardous waste under U.S. Federal regulations. The safety testing included 3 well-established mammalian cell–based tests (Table 2, page 3), a battery of well-established Ames-test bacterial strains (Figure 2, below), and extensive testing for environmental safety (Tables 3 and 4, page 3). Use care when using this reagent and dispose of the stain in compliance with all pertaining local regulations.

Figure 2 Summary of Ames test results for mutagenicity. Samples were pre-treated with a mammalian S9 fraction and then tested using the indicated Ames test strain. With strains TA97a, TA98, TA100, and TA102, a result of less than two-fold above background suggests that the compound is nonmutagenic; whereas, a result of greater than this value suggests that the compound is mutagenic. With strains TA1535, TA1537, and TA1538, a result of less than three-fold above background suggests that the compound is nonmutagenic; whereas, a result of greater than this value suggests that the compound is mutagenic. All tests were performed by Covance Laboratories, Inc., Vienna, VA, an independent testing laboratory.



Staining Nucleic Acids after Electrophoresis

1.1 Soak the gel in SYBR® Safe stain. If using SYBR® Safe gel stain concentrate, dilute 10,000X in TAE or TBE buffer (as appropriate) prior to use. Place the gel in a plastic container, such as a pipet-tip box lid or a household food-storage container. Do not use a glass container, as the dye in the staining solution may adsorb to the walls of the container, resulting in poor gel staining. Add sufficient SYBR® Safe DNA gel stain to cover the gel. A 50 mL volume is sufficient for staining most standard minigels. To stain larger gels, increase the volume of staining solution in proportion to the increased gel volume, and ensure that the gel is fully immersed during staining.

1.2 Incubate for 30 minutes. Protect the gel and staining solution from light by covering it with aluminum foil or by placing it in the dark. Continuously agitate the gel on an orbital shaker at 50 rpm. No destaining is required.

Precasting SYBR® Safe Stain in Agarose Gels

2.1 Prepare the agarose gel directly in SYBR® Safe DNA gel stain. SYBR® Safe stain is provided in buffer; simply substitute SYBR® Safe stain for the buffer when preparing the molten agarose. If using the 10,000X SYBR® Safe stain concentrate, dilute the concentrated stain 1:10,000 in agarose gel buffer (e.g., 1X TBE or 1X TAE) and add the buffer plus stain mixture to the powdered agarose. For example if you run TBE gels and require 30 mL of molten agarose for your tray, add 3 µL of 10,000X SYBR® Safe stain concentrate to 30 mL of 1X TBE, mix well, and add to the powdered agarose.

Note: The agarose/SYBR® Safe stain mixture may be heated in the microwave. As with precasting gels with ethidium bromide, the mobility of nucleic acid fragments in the gel may be somewhat slower when run in these gels compared to their mobility in the gel without stain.

2.2 Run the gel. Use a running buffer appropriate to the SYBR® Safe gel stain formulation. No post-staining or destaining is needed.

Viewing and Photographing the Gel

Stained gels can be viewed using a standard 300 nm transilluminator, a 254 nm epi- or transilluminator, or a blue-light transilluminator such as the Safe Imager™ 2.0 Blue-Light transilluminator from Molecular Probes (Cat. no. G6600). DNA stained with SYBR® Safe stain can also be visualized and analyzed using imaging systems equipped with an excitation source in the UV range or between 470–530 nm. Refer to Table 5 on page 5 to determine the optimal filter sets to use, or contact the instrument manufacturer for advice.

Note: If bands from the SYBR® Safe stained gel are to be excised and used in a ligation reaction, we recommend that the gel is illuminated using blue-light source (i.e., Safe Imager™ 2.0 Blue-Light transilluminator) and not a UV light source. In some instances, UV light sources in combination with SYBR® Safe stain can lead to reduced cloning efficiencies.

Stained gels can be photographed using Polaroid® 667 black-and-white print film and SYBR® Safe photographic filter (Cat. no. S37100). Molecular Probes' SYPRO® photographic filter (Cat. no. S6656) or a Kodak® Wratten #9 filter also work well. Using this film and one of these filters, SYBR® Safe DNA gel stain provides the same detection sensitivity as ethidium bromide and an appropriate filter. A standard ethidium bromide photographic filter should not be used with SYBR® Safe DNA gel stain. Gels stained with SYBR® Safe stain can also be imaged using a CCD camera or a laser-based scanner.

ANEXO 9

TRACKIT 100 pb DNA LADDER INVITROGEN

Invitrogen
life technologies

TrackIt™ 100 bp DNA Ladder

Cat. No. 10488-058 Size: 100 applications

Conc. 0.1 µg/µl Store at room temperature

Introduction

The TrackIt™ 100 bp DNA Ladder is suitable for sizing double-stranded DNA fragments from 100-1500 bp. The ladder is prepared from a plasmid containing repeats of a 100 bp DNA fragment.

The TrackIt™ 100 bp DNA Ladder is formulated with unique tracking dyes, Xylene Cyanol FF (XCFF) and tartrazine, that allow you to visually track DNA migration during electrophoresis and also indicate when maximum resolution is achieved. The tracking dyes do not obscure the visualization of DNA bands in the ladder as the dyes run outside the limits of most DNA bands in the ladder.

The important features of the ladder are listed below:

- Consists of 15 fragments in 100 bp increments ranging in size from 100-1500 bp and an additional band at 2072 bp
- 600 bp reference band is ~2-fold brighter than other bands for easy determination of band size
- Formulated with unique tracking dyes, XCFF and tartrazine
- Designed for use with E-Gel® agarose gels and TBE/TAE agarose gels
- Supplied in a ready-to-load format
- Visualized with ethidium bromide or SYBR® Green staining

Specifications

Storage Buffer:	10 mM Tris-HCl, pH 7.5; 10 mM EDTA, pH 8.0; 0.06% XCFF; 0.6% tartrazine; 5% glycerol
Storage:	Store at room temperature
Stability:	6 months at room temperature

Part No. 10488058.pps Rev. Date: 12 Nov 2003

This product is distributed for laboratory research only. CAUTION: Not for diagnostic use. The safety and efficacy of this product in diagnostic or other clinical uses has not been established.

For technical questions about this product, call the Invitrogen Tech-Line℠ U.S.A. 800 955 6288

Directions

The TrackIt™ 100 bp DNA Ladder is supplied in a ready-to-load format. **There is no need to heat the ladder prior to loading.**

Note: The TrackIt™ 100 bp DNA Ladder is not recommended for use with polyacrylamide gels and is not designed for quantitation.

1. Vortex the ladder gently to ensure the solution is homogenous.
2. Load the ladder using the loading volumes listed below to obtain the best results.

   TAE or TBE agarose gel (1% to 2%)

   Load 5 µl TrackIt™ 100 bp DNA Ladder per 5 mm lane width on a TAE or TBE agarose gel.

   1.2% E-Gel® agarose gel

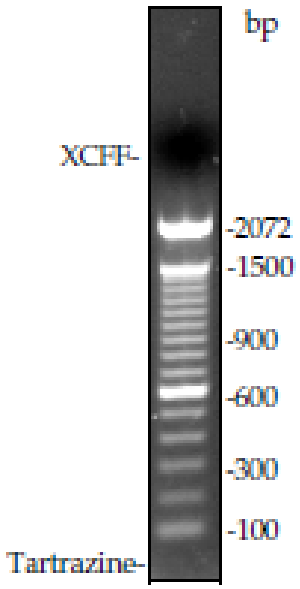
   Mix 2 µl TrackIt™ 100 bp DNA Ladder with 18 µl deionized water and load 20 µl of the diluted ladder in the well of a single-comb E-Gel®. Loading undiluted TrackIt™ DNA Ladder on an E-Gel® will result in loss of resolution.

3. Load your DNA samples.
   We recommend using the TrackIt™ Cyan/Yellow Loading Buffer to prepare your DNA samples. The TrackIt™ Loading Buffers contain the same two tracking dyes as the TrackIt™ DNA Ladders that allow you to visually track DNA migration during electrophoresis without obscuring any DNA bands. **Note:** If you are using TrackIt™ Cyan/Yellow Loading Buffer to prepare samples for E-Gel® agarose gels, dilute this buffer 60-fold (refer to the manual supplied with the loading buffer).
4. After electrophoresis, stain the DNA ladder with ethidium bromide or SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain. **Note:** There is no need to stain E-Gel® agarose gels as the gels contain ethidium bromide.
5. Visualize DNA bands of the ladder on a UV transilluminator. An example of the ladder analyzed on an E-Gel® is shown on the next page.

Example

The TrackIt™ 100 bp DNA Ladder (2 µl) was mixed with 18 µl deionized water and 20 µl of the diluted ladder was analyzed on a 1.2% E-Gel® agarose gel. The gel was visualized and imaged on a UV transilluminator equipped with a camera. The migration of tracking dyes is indicated in the figure below.

Note: For more details on the migration of XCFF and tartrazine in different percentage agarose gels, contact Technical Service.



Product Qualification

Agarose gel analysis must show that bands between 100-1500 bp are distinguishable after ethidium bromide staining. The 600 bp band must be more intense than any other ladder bands except the 2072 bp band.