



## IDENTIFICACIÓN DE *Escherichia coli* UROPATÓGENA POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA MÚLTIPLE Y SEROTIPIFICACIÓN.

Arenas-Hernández Margarita María de la Paz<sup>1</sup>; Navarro-Ocaña Armando<sup>2</sup>; Martínez Alvarado Jaqueline<sup>3</sup>; Martínez-Laguna Ygnacio<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, ICUAP-BUAP. [maguie10@gmail.com](mailto:maguie10@gmail.com), [ignacio.martinez@correo.buap.mx](mailto:ignacio.martinez@correo.buap.mx)

<sup>2</sup>Facultad de Medicina, UNAM; México, D.F. [arnava@servidor.unam.mx](mailto:arnava@servidor.unam.mx)

<sup>3</sup>Facultad de Cs Qs, BUAP. Puebla, Pue, México. [diablita\\_negra\\_13@hotmail.com](mailto:diablita_negra_13@hotmail.com)

### RESUMEN

*E. coli* uropatógena o UPEC es la causa principal de infecciones del tracto urinario (ITU) y responsable en un 50% de las infecciones urinarias nosocomiales, representando elevados gastos médicos y alta morbilidad en el mundo. Dependiendo del nivel de infección la ITU se puede clasificar en cistitis o pielonefritis, en casos graves se complica a septicemia o con alta frecuencia se vuelve crónica. El presente trabajo tuvo como objetivo identificar cepas de UPEC provenientes de pacientes con infecciones del tracto urinario de la ciudad de Puebla a través de la serotipificación y la detección de genes de virulencia por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple, como los asociados a producción de sideróforos (*iucD*) y los que codifican para las toxinas *Sat* y *Vat*. Además se relacionaron los datos obtenidos con el perfil antimicrobiano. De un total de 125 cepas de *E. coli*, aisladas de orina de pacientes con síntomas de ITU, el 64% provinieron de mujeres adultas. Las cepas de *E. coli* presentaron 78% de multiresistencia, el mayor porcentaje de resistencia fue a antibióticos de primera elección para tratamiento de ITU, ampicilina (74%), trimetropim-sulfametoxazol (66%), levofloxacina (49%) y cefalotina (58%). Se encontraron serotipos relacionados con cepas de UPEC tales como O25:H4, O17:H18, O6:H1. Los genes de virulencia que se amplificaron por PCR múltiple con mayor frecuencia fueron los que codifican para las proteínas autotransportadoras *vat*, *sat* respecto del gen *iucD*. En pacientes con ITU, el diagnóstico y tratamiento oportunos tienen como objetivo erradicar la infección, prevenir daño renal y resolver los síntomas agudos y establecer medidas preventivas para prevenir la diseminación de cepas de UPEC específicas en comunidades abiertas y cerradas; el tratamiento antimicrobiano debe iniciarse después de contar con los resultados del urocultivo para evitar la co-selección de factores de virulencia que pueden complicar el cuadro clínico.

### 1. INTRODUCCIÓN

La infección del tracto urinario (UTI) es una de las enfermedades infecciosas que afecta a hombres y mujeres de diferentes grupos de edad. En México se reportó que desde el año 2003 y hasta el 2008 las UTIs ocuparon el tercer lugar dentro de las 20 principales causas de morbilidad, observándose que las UTIs tuvieron una prevalencia más alta en los grupos de edad de los 25-44 años y en los adultos mayores de 65 años se registró la mayor incidencia. El principal agente etiológico de las UTIs es *Escherichia coli* uropatógena (UPEC), la cual se asocia con el 80 % de las UTIs registradas. UPEC presenta diversos factores de virulencia entre los que se incluyen factores de adherencia (fimbrias P, de tipo 1, S, M FIC y Dr), alfa-hemolisina (Hly), lipopolisacárido (LPS), aerobactinas, proteasas autotrasportadoras (*Sat*) y Factor Necrosante Citotóxico 1 (CNF-1) y mayor producción de antígeno capsular (antígeno K). UPEC pertenece a un sorprendente grupo heterogéneo de patógenos. Seis grupos O causan el 75% de las UTI (Welch *et al.*, 2002; Kaper *et al.*, 2004; Bower *et al.*, 2005; Brzuszkiewicz *et al.*, 2006; Lloyd *et al.*, 2007).



Los factores de virulencia de UPEC se encuentran codificados principalmente en islas de patogenicidad (PAI) de diferente longitud que contienen bloques de genes que no se encuentran en el genoma de cepas de *E. coli* de origen gastrointestinal.

Las infecciones del tracto urinario asociadas con UPEC son uretritis, cistitis y pielonefritis. Además de las propiedades antimicrobianas que presenta el tracto urinario de manera normal, ante la infección por UPEC, el hospedero presenta una respuesta del sistema inmune innato y del sistema inmune adaptativo. Una de estas respuestas es la de tipo inflamatoria que tiene como propósito la eliminación del patógeno. Aunque el tracto urinario humano presenta varios mecanismos antimicrobianos, UPEC presenta diversos mecanismos que le permiten persistir en el sistema urinario del hospedero, fenómeno que está relacionado con la recurrencia y cronicidad del padecimiento. Actualmente se tiene gran avance en el conocimiento de la genética, factores de virulencia y la patofisiología de la enfermedad que produce este importante patógeno. Sin embargo, aún falta mucho para entender la relación de UPEC con el hospedero humano. Finalmente UPEC posee el potencial de convertirse en un patógeno epidemiológicamente importante por el incremento en el aislamiento de cepas multiresistentes a los antimicrobianos (Arenas-Hernández *et al.*, 2012).

## 2. TEORÍA

Las cepas de UPEC pertenecen a un limitado número de serogrupos (O1, O2, O4, O6, O7, O8, O16, O18, O25, O62 Y O75) y las cepas de *E. coli* que producen UTI se relacionan principalmente con los serotipos: O1:H4, O1:H6, O1:H7, O1:H-, O2:H1, O2:H4, O4:H5, O6:H1, O7:H4, O7:H6, O7:H-, O8, O16, O18ac:H7, O18ac:H-, O22:H1, O25:H1, O75:H5 y O75:H7 (Wiles *et al.*, 2008; Sainz *et al.*, 2008).

Aerobactina (iucD). En UPEC el sideróforo tipo hidroxamato llamado aerobactina es sintetizado por el gen *iucD* (Marrs *et al.*, 2005), se encuentra localizado en el cromosoma de la cepa de *E. coli* CFT073, su tamaño es de 1,338 pb y se encuentra localizado entre los nucleótidos 3463394-3464731, número de acceso AE014075. En el hospedero mamífero, las concentraciones de hierro libre son muy bajas, aproximadamente  $10^{-25}$  M en la sangre y a menudo más bajas en otros sitios. Para el crecimiento, las bacterias requieren una concentración de hierro citoplasmática de  $\sim 10^{-6}$  M (Wiles *et al.*, 2008). La bacteria recupera el hierro ligado a través de los receptores celulares de aerobactina que facilitan el transporte de hierro a través de la membrana bacteriana hacia el citosol donde es liberado. En UPEC, aerobactina está relacionada con la progresión de bacteremia en modelo de ratón, es sintetizada principalmente por cepas que producen pielonefritis y es el sistema más eficaz de captación de hierro (Montgomerie *et al.*, 1984; Ruiz *et al.*, 2002; Vila *et al.*, 2002; Wiles *et al.*, 2008; Vagralli, 2009).

Toxina autotransportadora secretada (Sat). Proteína de 107 KDa, es codificada en el cromosoma CFT073 por el gen *sat* (*secreted auto transporters*), su tamaño es de 3,900 pb y se encuentra ubicada entre los nucleótidos 3456362-34600261, número de acceso AE014075. El gene *sat* está localizado en la isla de patogenicidad PAI II de *E. coli* CFT073.

Es una serin proteasa, altamente inmunogenia en ratones infectados con la cepa CFT073, y también exhibe actividad citopática sobre células HEp-2, Vero y HK-2 de vejiga. En una infección experimental de UPEC en modelo murino se demostró que Sat provoca vacuolización y daño glomerular (Guyer *et al.*, 2002; Sainz *et al.*, 2008). La actividad de serin proteasa de Sat es requerida para inducir alteraciones morfológicas en el citoesqueleto de actina en células de vejiga, reflejada por el redondeamiento y plegamiento de la membrana de las células y riñón, sobre las cuales provoca elongación. Se propone que Sat desempeña un papel importante en la virulencia de UPEC durante una UTI, en la ruptura de la barrera protectora de las células epiteliales provocando que las bacterias invadan el torrente sanguíneo, causando bacteriemia en los individuos afectados (Maroncle *et al.*, 2006).



Toxina autotransportadora vacuolizante (Vat). Proteína de 148 kDa, es codificada por *vat*, tiene alta homología con los genes que codifican para las proteínas miembros de la familia de autotransportadores (Parreira *et al.*, 2003; Parham *et al.*, 2005). En UPEC CFT073, *Vat* fue anotado como ORF (c0393), una proteína Serin Proteases Autotransporter from *Enterobacteriaceae* (SPATE), hemoglobina proteasa (Hbp) y Tsh (Hemaglutinina, de *E. coli* de aves) (Sainz *et al.*, 2008; Parham *et al.*, 2005). El gen *vat* se encuentra en el cromosoma de la cepa CFT073 y su localización es entre los nucleótidos 371877-376007, número de acceso AE014075. *Vat* también es sintetizada por *E. coli* patógena de aves (APEC), causa infecciones gastrointestinales, principalmente las infecciones respiratorias, la pericarditis, y la septicemia de las aves de corral. *Vat* es citopática para fibroblastos de embrión de pollo (CEF) (Kaper *et al.*, 2004; Marrs *et al.*, 2005). *Vat* induce la formación de vacuolas intracelulares resultando en efectos citotóxicos similares a los causados por la toxina VacA de *Helicobacter pylori*. Entre *Vat* y *Sat* solo existe 36% de similitud (Parreira *et al.*, 2003).

La resistencia a diversos antimicrobianos puede considerarse como otro factor de virulencia de estas cepas, entre otros aspectos porque son factor importante en las fallas en el tratamiento. Aunque la UTI no se liga a enfermedades relacionadas a brotes epidémicos, ciertas líneas de UPEC multiresistente a los antibióticos poseen propiedades epidémicas. *E. coli* O15:K52:H1 causó brotes de cistitis adquiridas en la comunidad, pielonefritis y septicemia y fue causa de UTI endémica. Los factores que contribuyen a la resistencia antibiótica son la formación de biopelículas por CBI, la entrada de UPEC intracelular en un estado quiescente y el efecto barrera del uroepitelio (Manges *et al.*, 2001; Blango *et al.*, 2010).

La PCR múltiple proporciona una eficiente herramienta técnica que permite identificar diferentes genes que codifican factores de virulencia en aislamiento bacterianos o directamente de muestras clínicas. Además tiene el potencial de producir ahorros considerables de tiempo y esfuerzo dentro del laboratorio sin comprometer la utilidad de la prueba favoreciendo con ello el diagnóstico y el tratamiento oportuno a la población desprotegida (Elnifro *et al.*, 2000; revisado en Arenas-Hernández *et al.*, 2012).

### 3. PARTE EXPERIMENTAL

- **Material biológico.**

Se procesaron 125 cepas de *Escherichia coli* aisladas de muestras de orina de pacientes con infección de tracto urinario, a las cuales se les realizó perfil de resistencia antibiótica, extracción de DNA, corrimiento electroforético y PCR individual y múltiple para detección de los genes *sat*, *vat* y *iucD*.

- **Métodos.**

Crecimiento en MacConkey y Pruebas bioquímicas. Para identificación de *E. coli*, las cepas se crecieron en este medio selectivo y se sometieron a la identificación bioquímica usando TSI, LIA MIO, urea, Citrato y VP-RM.

Perfil de resistencia antibiótica. Se utilizó agar Mueller–Hinton. Se siembran 4 ó 5 colonias en Caldo Soya Tripticasa, se incubó a 37°C hasta la presencia de turbidez. Se ajustó la turbidez a un equivalente al Estándar de MacFarland 0.5 adicionando caldo estéril o agua destilada. Se inoculan las placas de agar Muller-Hinton con un hisopo, con ayuda de las pinzas estériles se colocaron los multidiscos y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Pasado este tiempo se procedió a medir los halos de inhibición de acuerdo a los criterios de la NCCLS

PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). Los oligonucleótidos se diseñaron a partir de la secuencia genómica de la cepa control CFT073 (NC 004431), utilizando el programa DNASTAR Lasergene ®. Para *sat* y *vat*, se amplificaron dos fragmentos, la región peptidasa, y la región autotransportadora, para asegurarnos de que esté el gen completo, esto es que tenga



la información que codifica para actividad enzimática y su secreción. Las PCRs individuales se llevaron a cabo a volumen final de 25  $\mu$ l, mientras que las PCRs múltiples se realizaron a un volumen final de 12.5  $\mu$ l. Se usaron los oligonucleótidos a una concentración de 10  $\mu$ M y una mezcla de los 4 dNTPs a una concentración de 10mM, Taq polimerasa 5U/ $\mu$ l, MgCl<sub>2</sub> 50 mM. El DNA se ajustó a una concentración final de 0.165  $\mu$ g/ $\mu$ l. El cálculo de la Tm para la alineación de los oligonucleótidos fue en base a las Tm del certificado; de cada par de oligonucleótidos.

Electroforesis en gel de Agarosa. Se realiza la separación de ácidos nucleicos en una matriz de agarosa al 0.7%. Se usó una solución reguladora de pH TAE 0.5X. Para su observación los geles fueron teñidos con Bromuro de Etidio y visualizados con un transiluminador de luz ultravioleta

Serotipificación. De las cepas sembrar de 1 a 10 colonias aisladas en TSA, 24 hrs y 37°C. Resembrar en solución fisiológica y calentar a 100°C, 1hr; agregar formalina y colocar en las placas de 96 pozos se probaron frente a 300 antígenos somáticos aproximadamente, esto con la finalidad de identificar el antígeno somático (O). Para la determinación del antígeno flagelar (H) sembrar por picadura en medio Cray. Se deberá revisar frecuentemente el tubo para ver si el cultivo crece más allá de la picadura (zona de inoculación). Si crece más allá de la zona de inoculación se deberá sembrar en peptona de biotriptasa incubar a 30°C, agregar formalina para ponerlo posteriormente en contacto con los 60 antisueros flagelares. Para las diluciones a los 12 pozos de la fila A se le colocan 100  $\mu$ l de suero problema y los pozos de las filas restantes se les adicionaron 50  $\mu$ l de solución salina. Incubar las placas por 24 horas a 50°C para identificar el grado de microaglutinación; el cual se reporta en un rango de 1+ hasta 4+.

#### 4. CONCLUSIONES

- Los grupos de edad más afectados por las UTI causadas por *E. coli* son la adultez (30%) y la vejez (36%). El problema es más frecuente en el sexo femenino.
- Las cepas de *E. coli* de ITU son multirresistentes en un 78%.
- El mayor porcentaje de resistencia de UPEC a antimicrobianos fue a ampicilina (74%), sulfametoxazol-trimetropim (66%) y cefalotina (58%).
- Los serogrupos más frecuentes fueron O25, O6, O8, O100 y O17, estos dos últimos solo reportados en este estudio.
- Los serotipos más frecuentes fueron O25:H4, O17:H18 nuevos serotipos reportados y O6:H1, reconocido como UPEC.
- Las cepas del serotipo O25:H4 son multirresistentes, 80% AM<sup>r</sup>, 90% LEV<sup>r</sup>, y 80% posee el gen de la toxina Sat
- De ITU, se aislaron serotipos UPEC e importantemente serotipos de DAEC
- Los genes de virulencia *vat* y *sat* se detectaron con mayor frecuencia

#### BIBLIOGRAFÍA

1. Arenas Hernández Margarita María de la Paz, Armando Navarro Ocaña, Tonatiuh Molina Villa, Jaqueline Martínez Alvarado, Fabiola Aroche Camarillo, Ygnacio Martínez Laguna. 2012. *Escherichia coli* UROPATÓGENA. En "Modelos de la Patogénesis de las Enfermedades Infecciosas II". Rocha-Gracia Rosa del Carmen, Lozano-Zarain, Patricia y Martínez-Laguna, Ygnacio. (Eds.). Publicación especial de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Puebla, México. ISBN. 978-607-487-476-1. Pág: 23-44.
2. Blango M. G., and M.A. Mulvey. 2010. Persistence of uropathogenic *Escherichia coli* in the face of multiple antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**: 1855-1863.



3. Brzuszkiewicz E., H. Bruggemann, H. Liesegang, M. Emmerth, T. Olschlager, G. Nagy, K. Albermann, Ch. Wagner, C. Buchrieser, L. Emody, G. Gottschalk, J. Hacker, and U. Dobrindt. 2006. How to become a uropathogen: Comparative genomic analysis of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains. Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A. **103**:12879-12884
4. Bower J. M., D. S. Eto and M. A. Mulvey. 2005. Covert operations of uropathogenic *Escherichia coli* within the urinary tract. Traffic. **6**:18-31
5. Guyer D. M., S. Radulovic, F-E Jones, and H.L.T. Mobley. 2002. Sat, the Secreted Autotransporter Toxin of Uropathogenic *Escherichia coli*, Is a Vacuolating Cytotoxin for Bladder and Kidney Epithelial Cells. Infect. Immun. **70**:4539-4546.
6. Kaper J.B., J.P.Nataro and H.L.T. Mobley. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. Nature. Vol. 2:123-140
7. Lloyd, A. L.; D. A. Rasko, and H.L.T. Mobley. 2007. Defining genomic islands and uropathogen-specific genes in uropathogenic *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 189:3532–3546.
8. Manges A.R., J. R. Johnson, B. Foxman, T. T. O'Bryan, K. E. Fullerton, and L. W. Riley. 2001. Widespread distribution of urinary tract infections caused by a multidrug-resistant *Escherichia coli* clonal group. N. Engl. J. Med. 345:1007-13.
9. Marrs C. F., L. Zhang, and B. Foxman. 2005. *Escherichia coli* mediated urinary tract infections: Are there distinct uropathogenic *E. coli* (UPEC) pathotypes? FEMS Microbiol. Lett. 252: 183-190.
10. Maroncle N. M., K. E. Sivick, R. Brady, F-E Stokes, and H. L. T. Mobley. 2006. Protease activity, secretion, cell entry, cytotoxicity, and cellular targets of secreted autotransporter toxin of uropathogenic *Escherichia coli*. Infect. Immun. 74: 6124-6134.
11. Montgomerie J. Z., A. Bindereif; J. B. Neilands, G. M. Kalmanson, and L. B. Guze. 1984. Association of hydroxamate siderophore (aerobactin) with *Escherichia coli* isolated from patients with bacteremia. Infect. Immun. 46: 835-838.
12. Parreira V.R. and C.L. Gyles. 2003. A Novel Pathogenicity Island Integrated Adjacent to the *thrW* tRNA Gene of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Encodes a Vacuolating Autotransporter Toxin. Infection and Immunity. Vol. 71(9):5087-5096.
13. Parham N. J., S. J. Pollard, M. Desvaux, A. Scott-Tucker, Ch. Liu, A. Fivian, and I. R. Henderson. 2005. Distribution of the serine protease autotransporters of the *Enterobacteriaceae* among extraintestinal clinical isolates of *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol. 43: 4076-4082.
14. Ruiz J., K. Simon, J. P. Horcajada, M. Velasco, M. Barranco, G. Roig, A. Moreno, J. A. Martínez, T. Jiménez, J. Mensa, and J. Vila. 2002. Differences in virulence factors among clinical isolates of *Escherichia coli* causing cystitis and pyelonephritis in women and prostatitis in men. J. Clin. Microbiol. 40: 4445-4449.
15. Sainz E. T. R, V. Reyes, J. Vicente, R. Serapio, M. P. Zárate, A. Navarro, and C. Eslava. 2008. Resistencia a antimicrobianos de cepas de *E. coli* de diversos serotipos aisladas de pacientes de un hospital psiquiátrico. Rev. Mex. Cs. Farmac. 39: 18-25.
16. Vagrli M. A. 2009. Siderophore production by uropathogenic *Escherichia coli*. Ind. J. Pathol. Microbiol. 52:126-127
17. Welch R. A., V. Burland, G. Plunkett, P. Redford, P. Roesch, D. Rasko, E. L. Buckles, S.-R. Liou, A. Boutin, J. Hackett; D. Stroud, G. F. Mayhew, D. J. Rose, S. Zhou, D. C. Schwartz, N. T. Perna, H. L. T. Mobley, M. S. Donnenberg, and F. R. Blattner. 2002. Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A. 99: 17020-17024.
18. Wiles T. J., R. R. Kulesus, and M. A. Mulvey. 2008. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. NIH Public Access. 85:1-20.