**Identificación de genes de virulencia en cepas clínicas de *Escherichia coli* uropatógena (UPEC) en la Ciudad de México**

**Ernesto Alexis Enríquez Olivas, estudiante de la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, email:** **al139353@alumnos.uacj.mx**

**Dr. Carlos Alberto Eslava Campos**

**Universidad Nacional Autónoma de México**

**eslava@unam.mx**

**Resumen**

*Escherichia coli* es una bacteria que habita comúnmente el intestino del ser humano. Principalmente es comensal, sin embargo, existen casos donde es causa de enfermedades como diarrea, infecciones de tracto urinario (ITUs) y meningitis. Su habilidad para ocupar un sinfín de nichos se debe a la plasticidad de su genoma. En México los estudios sobre incidencia de ITUs son muy escasos. En este trabajo, se procesaron 33 muestras provenientes de mujeres con ITUs recurrentes en la Ciudad de México. Mediante técnicas de aislamiento, identificación y análisis filogenético se confirmó a *E. coli* como la causa, además de su pertenencia a diferentes filogrupos. Se determinó la presencia de diferentes marcadores mediante PCR para genes de factores de virulencia en estas cepas y se analizaron las frecuencias. A partir de estos resultados, se puede generar conocimiento respecto a la epidemiologia de estas infecciones, lo que contribuiría en buscar mejores tratamientos.

**Palabras clave:** *Escherichia coli*, infecciones de tracto urinario, *E. coli* uropatógena, PCR, incidencia.

**INTRODUCCIÓN**

*Escherichia coli* coloniza el intestino humano unas horas después del nacimiento y es considerada parte normal de la microbiota, sin embargo, puede causar una serie de enfermedades como diarrea, infecciones de tracto urinario (ITUs) y meningitis (Kaper *et al*., 2004). A partir de esto, se le puede clasificar dentro de tres grupos: (i) comensal, (ii) patógeno intestinal y (iii) patógeno extraintestinal (Croxall *et al*., 2011). En estas ultimas, se encuentra la *E. coli* uropatogénica (UPEC), la cual es el agente etiológico asociado en un 80% con este tipo de infecciones (). Además de esta clasificación, las cepas de *E. coli* pueden agruparse filogenéticamente. Los filogrupos A, B1, B2 y D son los mas reconocidos en investigaciones en epidemiologia humana y se basa en la amplificación por medio de Reacción en cadena de la polimerasa triple (PCR multiplex) de los genes *chuA*, *yjaA* y *TSPE4.C2*. Este método funciona como una clave dicotómica que comienza con la presencia o ausencia de un amplicón para el gen *chuA* (que se observa en una electroforesis posterior a la amplificación por PCR). A partir de este, se determina si la cepa pertenece al grupo de las *E. coli* comensales (A y B1) o al grupo de las *E. coli* extraintestinales (B2 y D) (Clermont *et al*., 2000).

La habilidad que presenta *E. coli* para ocupar diferentes nichos es debido en gran parte a la plasticidad de su genoma. Se han descrito diversos genes relacionados a su capacidad virulenta. Entre los factores de virulencia asociados a UPEC están las adhesinas (fimbrias P, de tipo 1, S, M, FIC y DR), toxinas como la alfa-hemolisina (*Hly*), sistemas captadores de hierro, proteasas autotransportadoras (*Sat*) así como la síntesis de lipopolisacárido y cápsula, componentes que le ayudan a evadir el sistema inmunitario del hospedero (Welch *et al*., 2002; Kaper *et al*., 2004; Bower *et al*., 2005; Brzuszkiewicz *et al*., 2006, Lloyd *et al*., 2007). También se han descrito los mecanismos a través de los cuales UPEC puede colonizar diferentes órganos causando uretritis, cistitis y pielonefritis, y en casos mas extremos septicemia e incluso la muerte (Foxman, 2003). A pesar de que el hospedero cuenta con una respuesta inmune frente a la infección, la eliminación del patógeno se complica debido a las adaptaciones de la bacteria lo que conlleva a una recurrencia y cronicidad del padecimiento. Además, se ha descrito que UPEC posee el potencial de convertirse en un patógeno epidemiológicamente importante por la aparición de cepas multi-resistentes a antimicrobianos (Arenas-Hernández *et al*., 2012). Estos factores en conjunto son alarmantes en términos de salud pública, por lo que el desarrollo de nuevas alternativas para combatir las ITUs es de suma importancia.

En este estudio se busca describir cepas de UPEC aisladas en la Ciudad de México de mujeres con infecciones del tracto urinario a través de técnicas de aislamiento, identificación de filogrupos y detección de genes de virulencia (*fimH, Sat, sitAD, feoB, irp2, KpsmT, ireA, ompT, fyuA, ibeA, malX-PAI, iroND*. Se presenta un panorama de la incidencia de estos genes de virulencia en la Ciudad de México. De igual manera, se hace una introducción a una alternativa de tratamiento que se encuentra actualmente en desarrollo.

**DESARROLLO**

**JUSTIFICACIÓN**

Las infecciones de tracto urinario (ITUs) son una de las enfermedades mas comunes a nivel mundial. Se estima que alrededor de 150 millones de personas en todo el mundo desarrollaran una ITU cada año, lo cual representa alto costo económico y social (Flores-Mireles *et al*., 2015). Aproximadamente un 40% de las mujeres presentaran por lo menos una ITU durante toda su vida (Micali *et al*., 2014), siendo estas las mas afectadas en comparación con los hombres. En México los estudios sobre incidencia de ITUs son muy escasos y reducidos. Hasta hace unos años, no existía una vigilancia de estas infecciones, por lo que es muy difícil hacer una estimación del problema (Molina *et al*., 2011). En contraste, se reporto a la ITUs como tercer lugar en morbilidad en nuestro país durante los años 2003 a 2008 (López *et al*., 2014).

**METODOLOGÍA**

**Procesamiento de muestras**

Se procesaron 33 asilamientos provenientes de muestras de orina de 7 pacientes con infecciones de tracto urinario de tipo crónico en el Hospital Infantil Federico Gómez en la Ciudad de México, las cuales han recibido tratamiento antimicrobiano para combatir la enfermedad. El periodo de recolección de muestras vario entre cada paciente. De estas muestras se tomaron 100 μL y se cultivó en medio TSI por extensión para determinar si la infección fue positiva a través del conteo de UFC/mL. Se sembró a partir de un pellet (obtenido por centrifugación a 2500 rpm durante 15 min) en agar Sangre y agar MacConkey para la identificación de organismos alfa-hemolíticos y aislamiento. Se incubaron a 37ºC durante 24 h para comprobar que la infección sea positiva.

**Identificación por pruebas bioquímicas**

Los aislamientos se sometieron a identificación bioquímica usando Citrato de Simmons, prueba de Ureasa, Rojo de metilo-Vogues-Proskauer, MIO y TSI. Se incubaron a 37ºC durante 24 h. Los aislamientos que confirmaron ser *E. coli* se resembraron en medio MacConkey. Se realizó la extracción de DNA proveniente de una colonia aislada mediante series de centrifugaciones y hervido, añadiendo también InstaGene matrix para la eliminación de nucleasas que puedan afectar el DNA obtenido.

**Análisis filogenético y detección de genes de virulencia**

Los grupos filogenéticos se determinaron por pruebas de PCR multiplex, usando la combinación de tres marcadores (*chuA*, *yjaA* y *TSPE4.C*). La reacción de PCR consistió en una mezcla de 12.5 uL MasterMix (Thermo ScientificTM), el cual contiene 0.05U/μL *Taq DNA polimerasa*, amortiguador de reacción, 4 mM MgCl2 y 0.4 mM de cada dNTP, 1 μL de cada primer (10 uM), 1.5 μL de agua libre de nucleasas (Thermo ScientificTM) y 5 μL del DNA molde de cada muestra. La PCR se corrió bajo las siguientes condiciones de amplificación: 94ºC por 5 min para la desnaturalización, 30 ciclos de 30 s a 94ºC, 30 s a 55ºC y 30 s a 72ºC. Finalmente, una extensión a 72ºC durante 7 min en un termociclador A37834 (Termociclador Miniamp Plus, Applied Biosystems). Los productos fueron observados en geles de agarosa al 1.5% teñidos en una solución de bromuro de Etidio 0.5 μg/mL. Despues de la electroforesis, el gel fue visualizado bajo luz ultravioleta (UV) con ayuda de un fotodocumentador (CleaverScientific omniDOC). Para los factores de virulencia, se utilizaron los primers vistos en la Tabla 1 con las condiciones de amplificación específicos para cada uno (Tabla 2).

**Tabla 1.** Descripción de los genes utilizados en caracterización de las cepas clínicas de *E. coli* durante este trabajo de investigación, así como el tamaño del amplicón esperado en cada amplificación.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Marcador | Secuencia 5´-3´ | Secuencia 3´-5´ | Tamaño del amplicón (pb) |
| *chuA* | GACGAACCAACGGTCAGGAT | TGCCGCCAGTACCAAAGACA | 279 |
| *yjaA* | TGAAGTGTCAGGAGACGCTG | ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC | 211 |
| *TspE4C.2* | GAGTAATGTCGGGGCATTCA | CGCGCCAACAAAGTATTACG | 152 |
| *fimH*  | TCGAGAACGGATAAGCCGTGG | GCAGTCACCTGCCCTCCGGTA | 508 |
| *Sat* |  |  | 387 |
| *sitAD* | AGGGGGCACAACTGATTCTCG | TACCGGGCCGTTTTCTGTGC | 608 |
| *feoB* | AATTGGCGTGCATGAAGATAACTG | AGCTGGCGACCTGATAGAACAATG | 470 |
| *Irp2* | AAGGATTCGCTGTTACCGGAC | TCGTCGGGCAGCGTTTCTTCT | 287 |
| *ireA* | AGGCAGGTGTGCGCCGCGTAC | CCAGGACTCACCTCACGAAT | 254 |
| *iroND* | AAGTTAAAGCAGGGGTTGCCCG | GACGCCGACATTAAGACGCAG | 667 |
| *fyuA* | TGATTAACCCCGCGACGGGAA | CGCAGTAGGCACGATGTTGTA | 787 |
| *kpsMT* | TAGCAAACGTTCTATTGGTGC | CATCCAGACGATAAGCATGAGCA | 153 |
| *ompT* | ATCTAGCCGAAGAAGGAGGC | CCCGGGTCATAGTGTTCATC | 559 |
| *ibeA* | AGGCAGGTGTGCGCCGCGTAC | TGGTGCTCCGGCAAACCATGC | 171 |
| *malX-PAI* | GGACATCCTGTTACAGCGCGCA | TCGCCACCAATCACAGCCGAAC | 925 |

**Tabla 2**. Condiciones de amplificación de cada uno de los genes utilizados en caracterización de las cepas clínicas de *E. coli*.

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Marcador | Desnaturalización inicial (ºC/min) | Desnaturalización(ºC/seg) | Alineación(ºC/seg) | Extensión(ºC/min) | Extensión final(ºC/min) | Ciclos |
| *fimH*  | 96/2 | 96/30 | 63/30 | 72/1 | 72/8 | 30 |
| *Sat* | 95/1 | 95/60 | 55/60 | 72/1 | 72/7 | 25 |
| *sitAD* | 94/5 | 94/30 | 59/30 | 72/30seg | 72/5 | 30 |
| *feoB* | 94/5 | 94/30 | 59/30 | 72/30seg | 72/5 | 30 |
| *Irp2* | 96/2 | 96/30 | 57/30 | 72/1 | 72/8 | 30 |
| *ireaA* | 96/2 | 96/30 | 63/30 | 72/1 | 72/8 | 30 |
| *iroND* | 96/2 | 96/30 | 53/30 | 72/1 | 72/8 | 30 |
| *fyuA* | 96/2 | 96/30 | 52/30 | 72/1 | 72/8 | 30 |
| *kpsMT* | 96/2 | 96/30 | 57/30 | 72/1 | 72/8 | 30 |
| *ompT* | 96/2 | 96/30 | 51.6/30 | 72/1 | 72/8 | 30 |
| *ibeA* | 96/2 | 96/30 | 57/30 | 72/1 | 72/8 | 30 |
| *malX-PAI* | 96/2 | 96/30 | 57/30 | 72/1 | 72/8 | 30 |

**RESULTADOS**

En general en los aislamientos se presentó una mayor frecuencia de los genes *iroND* (33; 100%), *feoB* (32; 96.96%) y *fyuA* (30; 90.90%) en relación con los demás genes de virulencia (Figura 1). Estos tres se sabe están relacionados con la codificación de proteínas cuya función es la captación de hierro a través de sistemas conocidos como sideróforos, lo cual se podría esperar ya que el ambiente en el que se encuentra el patógeno dentro de la vejiga del hospedero carece de nutrientes. Por otro lado, se esperaría también que el gen para *fimH* estuviera presente por lo menos en un 90% de los aislamientos, ya que este gen esta implicado en la codificación de adhesinas que le permiten a la bacteria colonizar los diferentes tejidos, sin embargo, solo estuvo presente en un 69.69%.

**Figura 1.** Frecuencia de los genes de virulencia en los 33 aislamientos.

Otros genes de importancia en la virulencia de UPEC son *KpsMT* (que participa en la formación de la cápsula) y *ibeA* (que participa en la formación de biopeliculas) ya que determinan la capacidad de colonización, evasión del sistema inmune del hospedero y la resistencia que pueden presentar para que la infección persista. Sin embargo, en el caso del formador de biopeliculas ese estuvo completamente ausente, mientras que el formador de capsulas solo en un 21.21% de los aislamientos.

**Figura 2.** Frecuencia de los filogrupos en los 33 aislamientos.

El filogrupo que estuvo en mayor proporción presente en los aislamientos corresponde al de las cepas extraintestinales patogénicas B2 (**Figura 2**). Detrás de este se ubica el grupo A, que corresponde a uno de los comensales seguido por el grupo B1. Finalmente, el grupo D estuvo presente en menor proporción.

**Figura 3.** Frecuencia de los genes de virulencia en cada uno de los filogrupos en los 33 aislamientos.

**Tabla 3**. Frecuencia de los filogrupos en las muestras, además se incluye la frecuencia de los genes de virulencia en cada uno de los filogrupos y la función en la que participan.

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  | Adhesinas | Transportador | Sistemas de captación de hierro | Yersiniabactina | Cápsula | Proteasa | Biopelículas | Isla de patogenicidad |
| Filogrupo | **Frecuencia****N = 33** | ***fimH*** | ***SAT*** | ***sitAD*** | ***feoB*** | ***irp2*** | ***ireA*** | ***iroND*** | ***fyuA*** | ***kpsMT*** | ***ompT*** | ***ibeA*** | ***malX-PAI*** |
| A | 1133.33% | 545.45% | 545.45% | 763.63% | 11**100%** | 763.63% | 327.27% | 11**100**% | 1090.9% | 545.45% | 763.63% | 00% | 19.09% |
| B1 | 515.15% | 240% | 00% | 360% | 5**100%** | 00% | 00% | 5**100**% | 480% | 00% | 360% | 00% | 00% |
| B2 | 1442.42% | 14**100%** | 750% | 857.14% | 1392.85% | 1392.85% | 17.14% | 14**100**% | 1392.85% | 17.14% | 857.14% | 00% | 535.71% |
| D | 39.09% | 266.66% | 00% | 3100% | 3**100%** | 00% | 00% | 3**100**% | 3**100**% | 133.33% | 3100% | 00% | 00% |

En la figura 3 se puede fácilmente visualizar la frecuencia de los genes en cada uno de los filogrupos correspondientes a UPEC en estos aislamientos. En la mayoría de los genes de virulencia la mayor proporción corresponde al grupo B2 (patógenas extraintestinales), seguido de las comensales del grupo A. Esto resulta interesante, ya que se esperaría que la proporción de genes relacionados a la virulencia fuera mayor en cepas correspondientes a los grupos extraintestinales y en los grupos comensales, esta fuera mucho menor. Sin embargo, se puede demostrar con estos resultados que las cepas comensales son potencialmente patógenas.

**CONCLUSIONES (DISCUSIÓN Y APORTACIONES)**

Según lo reportado por López-Banda y colaboradores en el 2014, el filogrupo predominante en aislamientos de mujeres con ITUs fue el de las extraintestinales B2 (55.6%). De manera similar este filogrupo se presentó en los aislamientos de esta investigación, que, a pesar de no ser una muestra representativa, el grupo B2 mostro el mismo patrón con los estudios de López-Banda y colaboradores realizados en la Ciudad de México, así como en Estados Unidos y España. Aunque no solo para este grupo. En estos mismos estudios, se encontró que el grupo D estuvo presente en menor proporción en comparación con los otros filogrupos, mientras que detrás del grupo B1, le seguía el grupo A de las comensales. Molina y colaboradores en el 2011 obtuvieron casi los mismos patrones de proporción en estudios realizados en la Ciudad de México, la diferencia es que el filogrupo B1 estuvo presente en menor frecuencia que el filogrupo D.

Como se había mencionado, *fimH* es uno de los genes que están altamente relacionados con la habilidad de colonizar el epitelio del tracto urinario (Mulvey, 2002). Este, estuvo presente de forma muy evidente en cepas del filogrupo B1 (100%), aunque también estuvo presente en los demás filogrupos. Este resultado, puede estar relacionado con la patogenicidad que presentan estos aislamientos ya que la adherencia es un determinante muy importante para la colonización e infección por la bacteria. Es por esto por lo que esta tan bien conservado en los grupos comensales. En las cepas estudiadas, menos del 50% contienen tienen genes que codifican capsulas y proteína autotransportadora. De igual manera ocurre con el marcador de isla de patogenicidad (*malX-PAI*). A diferencia del gen codificador de proteasa *ompT* que se encuentra en poco más del 50% de las muestras. Finalmente, en el caso de *ibeA* (gen codificante para la formación de biopeliculas) estuvo completamente ausente en todos los filogrupos, sin embargo, se sabe que este gen es poco frecuente en UPEC por lo que el tamaño de muestra de esta investigación podría además justificar su ausencia en los resultados.

Este trabajo confirma que la mayoría de los aislamientos que están asociados con infecciones de tracto urinario pertenecen al filogrupo B2 y en menor proporción al grupo D. Se presentan también los factores de virulencia que están relacionados con la patogénesis de cepas UPEC y su relación con los filogrupos. De acuerdo con lo obtenido, se demuestra que las cepas agrupadas como comensales también tienen la capacidad de actuar como patógenos causantes de ITUs, lo que representa un punto importante en la investigación en salud publica. A partir de estos resultados, se puede inferir que la mayoría de los aislamientos tienen la habilidad de colonizar el tracto urinario, independientemente de su procedencia filogenética, además de que están ampliamente adaptadas para resistir las condiciones de baja disponibilidad de nutrientes a las que están expuestas en ambientes como el de la vejiga.

Se considera pertinente ampliar el numero de muestra para que los resultados sean mas representativos, además de incluir el perfil de sensibilidad a antimicrobianos para hacer énfasis en la necesidad de nuevos tratamientos. A partir de esto, se podría incluir también el trabajo que se esta realizando en el laboratorio de patogenicidad bacteriana referente a las autovacunas, ya que se ha observado que están teniendo resultados positivos en cuanto al control de las infecciones de tracto urinario.

A partir de estos resultados, se puede tener un conocimiento mas amplio respecto a la epidemiologia de este tipo de infecciones, lo que pudiera contribuir en buscar mejores tratamientos, como el de las autovacunas que actualmente esta en desarrollo.

**REFERENCIAS (BIBLIOGRAFÍA)**

Arenas, M., Navarro, A., Molina, T., Martínez, J., Aroche, F., & Martínez, Y. (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, Mexico. ISBN. 978-607-487-476-1.

Foxman, B. (2003). Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. *Disease-a-Month*, *49* (2), 53–70.

Bower, J., Eto, D. & Mulvey, M. (2005). Covert operations of uropathogenic *Escherichia coli* within the urinary tract. *Traffic*, *6*, 18-31

Brzuszkiewicz E., Bruggemann, H., Liesegang, H., Emmerth, M., Olschlager, T., Nagy, G., Albermann, K., Wagner, Ch., Buchrieser, C., Emody, L., Gottschalk, G., Hacker, J. & Dobrindt, U. (2006). How to become a uropathogen: Comparative genomic analysis of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains. Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A. 103:12879-12884

G. Croxall, J. Hale, V. Weston. (2011). Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolates from a regional cohort of elderly patients highlights the prevalence of ST131 strains with increased antimicrobial resistance in both community and hospital care settings,” *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *66* (11), 2501–2508.

J. B. Kaper, J. P. Nataro, and H. L. T. Mobley. (2014). Pathogenic *Escherichia coli*,” *Nature Reviews Microbiology*, *2* (2), 123–140.

Kaper J.B., J.P.Nataro and H.L.T. Mobley. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature. (2)*, 123-140

López, E., Carrillo, M., Orozco, G., Manjarrez, H., Arroyo, S., Moncada, D., Villanueva, S., Xicohtencatl, J. & Hernández, R. (2014). Identification of Virulence Factors Genes in *Escherichia coli* Isolates from Women with Urinary Tract Infection in Mexico Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International. Article ID 959206, 10 pages http://dx.doi.org/10.1155/2014/959206

Molina-López, J., Aparicio-Ozores, G.,Ribas-Aparicio, R., Gavilanes-Parra, S., María E. Chávez-Berrocal2, Rigoberto Hernández-Castro3, H. Ángel Manjarrez-Hernández. 2011 Drug resistance, serotypes, and phylogenetic groups among uropathogenic Escherichia coli including O25-ST131 in Mexico City J Infect Dev Ctries 2011; 5(12):840-849.