

AVANCES EN LA CARACTERIZACION MOLECULAR DE CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI* CAUSANTES DE PIELONEFRITIS AGUDAS

Antón AI, Martínez-Murcia AJ, Rodríguez-Varela F*, Dalet F **

* División de Microbiología, Universidad Miguel Hernández de Alicante (España)

**Departamento de Microbiología, Fundación Puigvert de Barcelona (España)

RESUMEN

A un total de 103 cepas de *E. coli* aisladas de enfermos con Pielonefritis aguda (59 cepas de Pielonefritis no complicadas (PNAnoC) y 44 de Pielonefritis complicadas (PNAC)) y 72 cepas de la colección ECOR se les ha determinado el tipo de secuencia V6 (posiciones 1000-1040) del gen 16S-rRNA, la posesión del gen *pap* y la secuencia espacio intergénico 16S-23S-rRNA mediante amplificación por PCR usando 7 cebadores específicos, digestión con endonucleasas, electroforesis y análisis de los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP). Con niveles de similitud del 70% se han formado 4 grupos denominados **a-1**, **a-2**, **b-1** y **b-2**. El subgrupo **a-2** se ha correlacionado con el B-2 de MLEE considerado de máxima virulencia.

Las cepas aisladas de PNAnoC mostraron una asociación causal significativa ($p < 0,01$) con el subgrupo molecular **a-2** (74 %), secuencia V6-1(91,2%) y presencia del gen *pap*, (85,3%). Por contra, en las cepas aisladas de PNAC no se observó relación de causalidad ($p = n.s.$) entre los grupos moleculares, la secuencia V6-I y la presencia del gen *pap*.

La agrupación de las cepas de PNAC según el diagnóstico de la patología de base (no obstructiva: 13 casos, obstructiva: 20 casos y reflujo vesico-renal: 11 casos) demostró que para los casos no obstructivos se conservaba una estructura molecular estrechamente relacionada a los casos de PNAnoC, mientras que para el resto la pertenencia al grupo **a**b**** y tipo de secuencia era aleatorio con una presencia del gen *pap* muy baja (12,9%). La incidencia de polirresistencia a los antibióticos en el grupo **a** fue bastante menor que en el grupo **b** (5,6% versus 25% respectivamente). En el grupo **b** la frecuencia del gen *pap* en cepas polirresistentes disminuyó más de 4 veces respecto a las cepas sensibles o con monorresistencia de su propio grupo o más de 6 veces respecto a las del grupo **a**.

Se concluye que las cepas de PNAnoC poseen una elevada virulencia y homogeneidad y están altamente protegidas de recombinaciones o reordenaciones con patrón molecular de: subgrupo **a-2** + presencia gen *pap* + secuencia V6-I + multisensibilidad a los antibióticos. Las cepas de PNAC (excepto los casos no obstructivos) tienen gran variabilidad intercistronica (grupo **a**b****, tipo de secuencia V6), poseen una baja virulencia y son más polirresistentes a los antibióticos.

PALABRAS CLAVE

Diversidad génica *E. coli* - Espaciador intergénico 16S-23S - Pielonefritis aguda no complicada - Pielonefritis complicada - Gen *pap* - Susceptibilidad antibiótica

SUMMARY

To a total of 103 *E. coli* strains isolated from patients with acute Pyelonephritis (59 from Uncomplicated Pyelonephritis (UAP) and 44 from Complicated Pyelonephritis (CAP)) and 72 *E. coli* strains from ECOR collection, the V6 region of 16S-rRNA gene (positions 1000 to 1040), *pap* gene presence and the intergenic spacer region 16S-23S rRNA were sequenced after PCR-amplification (using 7 specific primers), endonuclease digestion, electrophoresis and restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis. At similarity levels of 70%, a total of 4 groups (**a-1**, **a-2**, **b-1** y **b-2**) were discerned. Subgroup **a-2** is strongly related with B-2 MLEE group, which is considered as of the greatest virulence.

Strains from UAP showed causality relationship ($p < 0,01$) with subgroup **a-2**, V6-I sequence and presence of *pap* gen. On the other hand, strains from CAP showed an aleatory causality (p : ns). When the CAP strains were distributed according to underlying pathology (non-obstructive: 13 cases, obstructive: 20 cases and vesico-renal reflux: 11 cases), non-obstructive cases showed the same molecular properties than UAP cases, so long as for the rest the **ab** group belonging and sequence type were aleatory with the lowest rate of *pap* gen presence.

The incidence of poliresistance to antibiotics in **a** group was significantly lower than in **b** group. Frequency of gen *pap* in group **b** poliresistant strains diminished more than 4 times with respect of sensitive/monoresistant strains and more than 6 times with respect of **a** group strains.

We concluded that UAPN strains have a high virulence and homogeneity and are highly protected from recombinations with the following molecular pattern: **a-2** subgroup + presence of *pap* gene + V6-I sequence + antibiotic multisensitivity. On the contrary, CAPN strains (except non-obstructive cases) have a variable genic structure (**a** / **b** group, V6 sequence), show a low rate of virulence factors, and, are more resistant to antibiotics.

INTRODUCCIÓN

Todos los estudios epidemiológicos indican que *E. coli* es el agente etiológico causal más frecuente de infecciones urinarias (IU) en humanos (1). Esto parece deberse a la capacidad de expresión de varios factores de virulencia que se han asociado con la habilidad de desencadenar IU incluso en la población previamente sana, especialmente las pielonefritis no complicadas. Entre los factores estudiados se incluyen la producción de fimbrias, α -hemolisinas, sideróforos (aerobactina) y factor citotóxico.

Las fimbrias son unos apéndices filiformes, rígidos, de naturaleza proteica que emergen de la superficie de la bacteria en gran número (superior a 200) y que son capaces de reconocer ciertos receptores de las células epiteliales a las cuales se adhieren, constituyendo el primer paso para una posterior invasión. La expresión de fimbrias manosa-resistentes del tipo P esta codificada por el gen *pap* y su habilidad para adherirse a células del epitelio cúbico renal califica a este factor de virulencia como indispensable en el desarrollo de una pielonefritis en un sujeto sano (2)(3)(4). Su mecanismo de acción consiste en el reconocimiento exclusivo de un di-galactósido contenido en un glicolípido que se encuentra en la superficie de las células cúbicas renales. Otras bacterias (*P. mirabilis*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., etc.) también son capaces de expresar fimbrias manosa-resistentes que conservan un cierto parecido al tipo P de *E. coli*, pero son mucho menos selectivas. Esta característica explicaría la distinta capacidad de invasión de estas especies y en consecuencia su drástica menor frecuencia de aislamiento como agentes etiológicos. Por esta razón, *E. coli* es, en este sentido, la especie más estudiada por los investigadores, en su afán de conocer cada vez mejor la patogénia y mejorar el tratamiento.

Estudios de tipado de *E. coli* por MLEE (Multi-Locus Enzyme Electrophoresis) han puesto de manifiesto que las proporciones de distintos tipos electroforéticos obtenidos en cepas intestinales, son marcadamente diferentes de aquellas cepas productoras de cistitis o pielonefritis, indicando que no todas las cepas de origen intestinal poseen la misma capacidad de producir patologías urinarias. Las cepas aisladas de bacteriuria asintomática no diferían significativamente de las cepas del reservorio fecal. En cambio, las cepas de bacteriuria sintomática presentaban una distribución de patrones electroforéticos marcadamente diferente. Estos datos parecen indicar que las cepas productoras de infecciones sintomáticas corresponden a subpoblaciones menos diversas (5).

Una de las herramientas más útiles para estudiar las relaciones filogénicas bacterianas es la comparación de secuencias homólogas codificadas del RNA ribosomal (rRNA). La familia multigénica rRNA de *E. coli* comprende siete operones *rrn* de similar, pero no idéntica, secuencia. Entre los genes rRNA hay espaciadores conteniendo uno o más tipos de genes tRNA, secuencias diana para RNasa (requeridos para el proceso de transcripción) y DNA no codificante de función desconocida. La secuenciación de los espaciadores se ha considerado como un rápido y buen reloj molecular para medir los linajes intra-especies y observar el grado de polimorfismo o diversidad que ostentan. En un trabajo previo, la secuencia de la región espaciadora intergénica 16S-23S rRNA de una colección de cepas de *E. coli* uropatógenas y procedentes de la colección ECOR fueron amplificadas por PCR y sujetas a digestión con endonucleasa. El análisis de los patrones de restricción reveló dos grupos marcadamente distintos que fueron denominados **a** y **b**. Además, un bucle localizado en la región V6 del gen 16S-rRNA (posiciones 1.000 a 1.040) mostró tres estructuras primarias diferentes (V6-I, V6-II, V6-

III) basadas en 12 sitios polimórficos, siendo los operones más frecuentes el V6-I aislados o el conjunto V6-I + V6-II (6)(7)(8)(9).

El propósito de este trabajo ha sido estudiar la diversidad génica de 103 cepas de *E. coli* agentes causales de pielonefritis agudas frente a 72 cepas de la colección ECOR de referencia, la correlación con la presencia o ausencia de patología urológica de base, la correlación con la presencia del gen *pap* y la sensibilidad a los antibióticos.

MATERIAL Y METODOS

Selección de pacientes

El diagnóstico de pielonefritis se adjudicó a todos aquellos enfermos con orinas piúricas (>10 leucocitos por campo de 400 aumentos o >45 leucocitos/ μ l) y bacteriúricas (>10E4 UFC/ml) que presentaran además al menos tres de los siguientes signos/síntomas: Fiebre elevada (>38°C) (91 %), Dolor lumbar (97 %), Puñopercusión lumbar positiva (97 %) y Síndrome miccional (69,5 %). Los pacientes sin antecedentes urológicos previos y ecografía renal normal fueron calificados presuntivamente como Pielonefritis agudas No Complicadas (PNAnoC). Una excelente respuesta al tratamiento antibiótico como única terapia y la ausencia de recidivas o recaídas en los controles clínico-bacteriológicos a los 6 meses y 1 año, confirmaron definitivamente el diagnóstico previo de PNAnoC. Cualquier otro caso se adjudicó como Pielonefritis Complicada (PNAC).

Selección de cepas

Se emplearon para el estudio un total de 175 cepas de *E. coli* (72 cepas procedentes de la colección ECOR y 103 aisladas de orinas de otros tantos pacientes con pielonefritis aguda).

Las cepas de la colección ECOR (*E. coli* Reference Collection) consisten en un conjunto seleccionado entre un total de 2.600 aislados de poblaciones naturales (16 especies de mamíferos) (10), pretendiendo ser representativas de la diversidad genotípica de la especie *E. coli*, tal como lo indican los diferentes grupos subespecíficos distinguidos por MLEE (11)(12). De los 40 aislados de origen humano, 11 proceden de infecciones urinarias y 29 de las heces de individuos sanos.

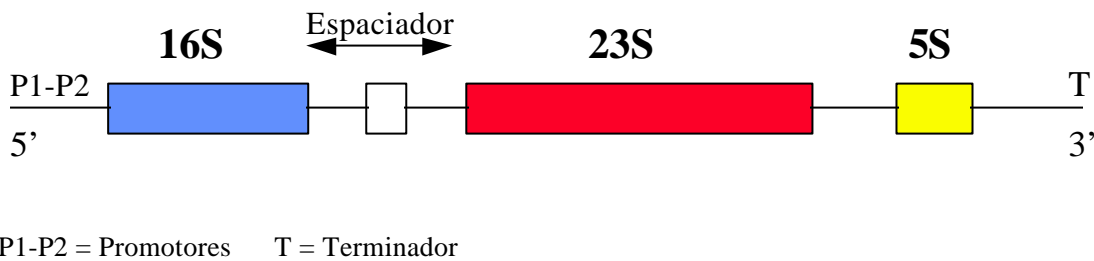
Las cepas procedentes de los pacientes fueron identificadas inicialmente con una prueba de indol y b-glucuronidasa y se les practicó un estudio de susceptibilidad por el método de difusión (tabletas Rosco) a cefalosporinas de 1 y 2 generación (cefalexina, cefonicid), amoxicilina, amoxicilina + ácido clavulánico, cotrimoxazol, fluoquinolonas (ciprofloxacino), aminoglicosidos (gentamicina) y fosfomicina. Todas las cepas se guardaron congeladas a -30 °C hasta el día del ensayo.

Estudio genotípico

A cada cepa se le practicó un estudio genotípico de los genes ribosómicos 16S-23S (Figura 1) cuya metodología ha sido reseñada en un trabajo previo (13). Brevemente, consistió en una extracción del DNA geonómico y plasmídico, amplificación por PCR y secuenciación del gen ribosómico 16S (región variable V6, posiciones 1000 a 1040), de la región espaciadora 16S-23S rRNA y de un fragmento del gen *pap* mediante 7

iniciadores oligonucleótidos diseñados a partir de zonas conservadas de los mismos (16SOF, 16S14F, 23S1R, V6-I, V6-II, AdOF y Ad10R). Los productos de amplificación de los espaciadores 16S-23S se sometieron a digestión enzimática con endonucleasas (*Rsa* I y *Taq* I) y posterior electroforesis en gel agarosa para determinar los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP). Los perfiles de RFLP se analizaron ocularmente y los datos se convirtieron a matrices binarias bidimensionales, siguiendo el criterio de aplicar un valor 1 cuando la banda estaba presente y un valor 0 si estaba ausente. El programa NTSYS-pc (versión 8, Exeter Software) convirtió las matrices bidimensionales en matrices simétricas por comparación de parejas de cepas.

FIGURA 1 : Organización general del operon ribosómico de *E. coli*



Análisis estadístico

Test exacto de Fisher para comparación de proporciones y regresión logística para medir el riesgo de asociación entre Pielonefritis no Complicadas y Pielonefritis Complicadas en las siguientes variables: grupo molecular, presencia operón *pap*, tipo de secuencia V6 y susceptibilidad a los antimicrobianos.

RESULTADOS

Resultados genotípicos globales

Los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) generados con la digestión enzimática de las endonucleasas originaron un total de 15 fragmentos. Con la enzima *Rsa*-I se observaron 9 bandas (tamaño molecular aproximado de 160, 220, 340, 410, 520, 600, 630, 800 y 900 pb) y con la *Taq*-I 6 bandas (tamaño molecular de 340, 400, 570, 630, 650 y 800 pb).

El análisis de los 15 fragmentos de digestión de la región espaciadora 16S-23S calculando el coeficiente de Jaccard para cada pareja de cepas comparada originó un dendrograma de similitud (no se muestra) de las relaciones filogénicas. Con niveles de similaridad del 50%, las cepas se distribuyeron en dos amplios grupos denominados **a** y **b**. Con niveles de similaridad del 70% se forman cuatro grupos por subdivisión de los dos anteriores (**a-1, a-2, b-1, b-2**). Se observó que la pertenencia a los grupos **a** o **b** se hallaba íntimamente asociada a los resultados de los polimorfismos generados por la enzima *Rsa*-I, mientras que los subgrupos debían su aparición a los polimorfismos generados por la enzima *Taq*-I.

El número de secuencias diferentes (12 posiciones nucleotídicas variables) que se encontraron en la hélice V6 del gen 16rRNA fueron tres, denominadas V6-I, V6-II y V6-III. El tipo de secuencia V6 presente se distribuyó en las cepas ECOR según: 33,3% V6-I, 50% V6-I + V6-II, 15,3% V6-II y 1,4% (1 cepa) no contenía la región V6. En las cepas problema la distribución fue la siguiente: 59,2 % el tipo V6-I, el 37,8% el tipo V6-I + V6-II y 3% V6-II. La secuencia V6-III no fue hallada en las cepas uropatógenas, ni en las cepas de la colección ECOR relacionadas con ellas.

En la amplificación por PCR de un fragmento del gen *pap*, se obtuvieron consistentemente amplicones de 1000 pb en el 62 % de los casos (*pap* +) de la serie de cepas uropatógenas, mientras que en el resto resultaron negativos (*pap* -).

Distribución de resultados por grupos moleculares

Del total de cepas de la colección ECOR estudiadas, solo 20 estaban relacionadas con las cepas pielonefritogénicas.

El subgrupo **a-1** se halla formado por 19 cepas pielonefriticas (CP) y 4 de la colección ECOR (Ecor-35, Ecor-38, Ecor-39 y Ecor-41 pertenecientes al grupo D-1 de MLEE). El tipo de secuencia V6 presente en el gen 16SrRNA fue variable en CP y del tipo V6-II (100%) en ECOR. La presencia del gen *pap* fue elevada (74%) en CP y media en ECOR (50%).

El subgrupo **a-2** consta de 55 CP (39 cepas presentaron idéntico patrón para ambas enzimas) y 6 ECOR (Ecor-52, Ecor-55, Ecor-56, Ecor-59, Ecor-61 y Ecor-62 pertenecientes al grupo B-2 de MLEE). El tipo de secuencia V6 fue muy homogénea en CP y ECOR (tipo V6-I: 93% en CP y 100% en ECOR). La presencia del gen *pap* fue elevada para CP (71%) y media para ECOR (50%).

El subgrupo **b-1** lo forman 13 CP y 6 ECOR (Ecor-1, Ecor-3, Ecor-6, Ecor-7, Ecor-10 y Ecor-21 pertenecientes a grupo A de MLEE). La combinación de estructuras V6-I + V6-II fue elevada y homogénea en ambas series (85% en CP y 83% en ECOR). En cambio, la presencia del gen *pap* fue muy baja (15% en CP y 0% en ECOR).

El subgrupo **b-2** lo forman 16 CP y 4 ECOR (Ecor-42, Ecor-48, Ecor-49 y Ecor-50 pertenecientes al grupo D-2 de MLEE). La estructura V6-I + V6-II predominó en CP (94%), mientras que fue del 50% en ECOR. La presencia del gen *pap* fue similar en ambas series (entre 50-56%) (Tabla I).

TABLA I : DISTRIBUCION DE LAS CEPAS DE E. COLI PROBLEMA Y COLECCION ECOR SEGUN SUS CARACTERISTICAS MOLECULARES

		a-1	a-2	b-1	b-2
CEPAS PROBLEMA PIELONEFRITICAS (103)	TOTAL	19	55	13	16
	pap +	14	39	2	9
	V6-I	7	51	2	1
	V6-II	3	0	0	0
	V6-I + V6-II	9	4	11	15
	<hr/>				
CEPAS ECOR (20)	TOTAL	4	6	6	4
	pap +	2	3	0	2
	V6-I	0	6	1	2
	V6-II	4	0	0	0
	V6-I + V6-II	0	0	5	2
	Grupo MLEE	D-1	B-2	A	D-2

Grupo moleculares según diagnóstico clínico

Cuando las cepas se agruparon de acuerdo a la modalidad clínica de la pielonefritis, los resultados se homogeneizaron aun más claramente (Tabla II). En el grupo de las PNAnoC (59 casos: 3 varones y 56 mujeres) (edad $\pm \delta$ -1: 35 \pm 16 años, rango 17-85), la tasa de cepas pertenecientes al grupo **a** ($p = 0,007$) aumentó hasta el 78% (74% al subgrupo **a-2** y 26% al subgrupo **a-1**). La tasa de frecuencia del gen *pap* fue similar y muy elevada en ambos casos (85,3 y 83,3%, respectivamente). En cambio, la región variable V6-I fue casi exclusiva (91,2%) para el subgrupo **a-2** y variable para el subgrupo **a-1**. La mayoría de las cepas del grupo **b** pertenecieron al subgrupo **b-2** (77%) y la tasa de frecuencia del gen *pap* fue bastante mayor que la global (67-80% versus 25-50%), mientras que la estructura variable V6-I+V6-II fue similar en ambos subgrupos y parecida a la hallada en la global. La presencia del gen *pap* y la posesión de la estructura **V6-I** fue independiente de la edad del paciente (*pap* positivo: 37 \pm 17 años versus *pap* negativo: 36,6 \pm 19 años y **V6-I**: 37,7 \pm 17 años versus **V6-I + V6-II**: 36,8 \pm 18 años).

TABLA II : DISTRIBUCION DE LAS CEPAS DE E. COLI SEGUN SUS CARACTERISTICAS MOLECULARES Y LA MODALIDAD CLINICA DE PIELONEFRITIS

		PIELONEFRITIS AGUDA NO COMPLICADA (N = 59)					PIELONEFRITIS AGUDA COMPLICADA (N = 44)				
		N	pap +	V6-I	V6-II	V6-I + V6-II	N	pap +	V6-I	V6-II	V6-I + V6-II
Grupo a	a-1	12	10	5	1	6	7	4	2	2	3
	a-2	34	29	31	0	3	21	8	20	0	1
Grupo b	b-1	3	2	1	0	2	10	1	1	0	9
	b-2	10	8	0	0	10	6	1	1	0	5

En el grupo de las PNAC (44 casos: 29 litiasis, 11 reflujo vesico-renal y 4 otros) (7 varones y 37 mujeres) (edad $\pm \delta$ -1: 44 \pm 20 años, rango 9-78), la pertenencia a un grupo determinado fue aleatoria (p: ns) y la presencia del gen *pap* descendió netamente (p<0,001), en especial en el grupo **b**. La presencia del gen *pap* y la posesión de la estructura **V6-I** fue independiente de la edad del paciente (*pap* positivo: 46 \pm 17 años versus *pap* negativo: 45 \pm 22 años y **V6-I**: 45 \pm 19 años versus **V6-I + V6-II**: 45 \pm 20 años).

Una aproximación adicional sobre la virulencia de las cepas se obtuvo cuando los casos de PNAC se subdividieron de acuerdo al diagnóstico de la patología de base en: no obstructiva (13 casos), obstructiva (20 casos) y reflujo vesico-renal (11 casos). Se comprobó que para los casos no obstructivos se conservaba una estructura molecular idéntica a la observada en los casos de PNAnoC (grupo **a**: 76,9%, elevada presencia del gen *pap*: 84,6% y secuencia V6-I: 69,2%). En cambio para el resto (patología obstructiva + reflujo vesico-renal) la pertenencia al grupo **a / b** y tipo de secuencia V6 fue aleatorio con una expresión del gen *pap* muy baja (12,9%)(p<0,001)(Tabla III). El tratamiento estadístico de la suma de cepas PNnoC + PNC-no obstructivas aumentó la significación (p<0,001).

TABLA III : TIPOS DE PATOLOGIA SUBYACENTE EN PIELONEFRITIS COMPLICADAS Y CARACTERISTICAS MOLECULARES DE LAS CEPAS

	PATOLOGIA NO OBSTRUCTIVA *	PATOLOGIA OBSTRUCTIVA **	REFLUJO VESICO-RENAL ***
NUMERO	13	20	11
Operon <i>pap</i> +	11	3	1
a-1	2	4	1
a-2	8	6	4
b-1	2	4	3
b-2	1	6	3
V6-I	9	9	5
V6-II	0	2	1
V6-I + V6-II	4	9	5
* Todos corresponden a casos de LITIASIS ** Incluye : 16 LITIASIS, 2 MALFORMACIONES CONGENITAS, 1 TRASPLANTE RENAL y 1 TUMOR VESICAL *** Todos corresponden a MALFORMACIONES CONGENITAS			

Grupos moleculares y resistencias a los antimicrobianos

Globalmente (Tabla IV) se observa que la posesión del gen *pap* es mucho menos frecuente en las cepas polirresistentes que en las cepas sensibles o con monorresistencia (33% versus 73%). Cuando los datos se distribuyen según pertenencia a los grupos moleculares se observa que la incidencia de polirresistencia en el grupo **a** es menor que en el grupo **b** (5,6% versus 25% respectivamente)($p < 0,01$), pero cuando esta se presenta, la posesión del gen *pap* prácticamente no se modifica respecto a las demás cepas dentro de su grupo. Al contrario sucede en el grupo **b** donde la frecuencia del gen *pap* en cepas polirresistentes (12,5%) disminuye más de 4 veces respecto a las cepas sensibles o con monorresistencia (56-67%).

TABLA IV: GRUPOS MOLECULARES, FRECUENCIA DEL OPERÓN *pap* Y RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS

	GRUPO a Nº CEPAS / Nº <i>pap</i> + (%)	GRUPO b Nº CEPAS / Nº <i>pap</i> + (%)
SENSIBLES	24 / 19 (79)	9 / 5 (56)
R = 1 antibiótico (AM / COT)	25 / 19 (76)	6 / 4 (67)
R = 2 antibióticos (AM + COT)	18 / 11 (61)	9 / 2 (22)
R > 3 antibióticos. (AM+COT+FQ+CF / GM) *	4 / 3 (75)	8 / 1 (12,5)
* Amoxicilina + Cotrimoxazol + Fluoquinolonas + Cefalosporinas 1-2 generación y/o Gentamicina		

El análisis de causalidad entre las variables “PNnoC + grupo **a** + presencia gen *pap* + estructura V6-I + multisensibilidad” y “PNC + grupo **b** + ausencia gen *pap* + estructura no-V6-I + multirresistencia” fue altamente significativo ($p < 0,001$) ($\phi = 0,1, 0,04-0,26$).

DISCUSION

El agrupamiento de los aislados de pielonefritis con 20 cepas ECOR de referencia indica una correlación entre los grupos obtenidos mediante RFLP y aquellos derivados de MLEE. La aparición de varios grupos de MLEE señala que las cepas uropatógenas de *E. coli* pueden ser tan diversas como un conjunto cualquiera de representantes de *E. coli* y, así, lo confirma la valoración global de la población de *E. coli* aisladas de pielonefritis que parece más diversa de lo que podría esperarse. Sin embargo, cuando se consideran las cepas procedentes de **pielonefritis no complicadas** (ausencia de patología urológica subyacente) la distribución se hace mucho más homogénea. La pertenencia al subgrupo **a-2** es significativa y se comprueba que se halla estrechamente relacionado con el grupo B-2 de la clasificación obtenida con el método MLEE y designado como de la máxima virulencia. En este sentido, de los cerca de 50.000 serotipos de *E. coli* existentes, solo diez han sido relacionados con pielonefritis y urosepsis. Estas cepas son capaces de expresar varios factores de virulencia y pertenecen al grupo B-2 de MLEE (14)(15)(16)(17)(18) y recientemente se ha identificado (19), dentro o cerca de los genes *tRNA*, un fragmento de DNA que posee las características (genes que codifican la producción de fimbrias P, fimbrias 1, α -hemolisina, aerobactina y factor citotóxico) que definen una isla de patogenicidad asociada (PAIs)(20). La presencia de PAIs faculta a la bacteria para colonizar el epitelio transicional y tubular renal, evitar las defensas del huésped, reproducirse en un medio adverso y provocar la internalización mediante acciones tóxicas sobre la célula epitelial.

La correlación del subgrupo **a-2** con el B-2 de MLEE es tan elevada que, si por PCR se detecta solamente la estructura **V6-I**, la probabilidad de que el aislado pertenezca al grupo B-2 de MLEE es empíricamente superior al 80%. En cambio, la detección de la estructura **V6-II** (generalmente acompañada con **V6-I**) indica una mayor probabilidad

de pertenecer a otro grupo distinto del B-2. Así, el 93,7% del grupo **b-2** mostraron ambas estructuras (**V6-I + V6-II**) y se corresponden con el grupo D-2 de MLEE.

Los resultados apoyan marcadamente los estudios previos que han definido que una bacteria para invadir un árbol urinario previamente sano de un sujeto inmunocompetente y producir infección renal, necesitaba expresar una serie de factores de virulencia que la capacitaran para vencer los mecanismos de defensa del huésped. La experiencia clínica indica que *E. coli* es el microbionte mejor adaptado, porque de lejos es el agente etiológico más común en las PNAnoC. La mayoría de estudios (21)(22)(23)(24) definen que la expresión de fimbrias P (90-100%) es un factor de virulencia imprescindible para la invasión renal. Ensayos con una cepa fecal no adherente de *E. coli* transformada con un plásmido conteniendo el operón P-fímbrico han demostrado la adquisición de facultades ligantes a células tubulares renales tanto de animales como humanas (25). La suma de otros factores eleva potencialmente su capacidad invasora renal (26)(27)(28). Este trabajo demuestra que el operón *pap* se asocia al grupo **a** con elevada frecuencia en especial en los casos de PNAnoC (83-85%), mientras que es poco frecuente en el grupo **b** (10-17%) excepto en las cepas procedentes de PNAnoC (67-80%). Estos datos confirman la importancia invasora del operón P-fímbrico. Queda por explicar cual es el mecanismo patogénico de invasión renal en sujetos sanos del escaso porcentaje de cepas pielonefríticas que no contienen el gen *pap* y pertenecen al grupo **a-2**.

Con el objeto de proporcionar la máxima consistencia a los resultados del trabajo, el diagnóstico clínico-bacteriológico de pielonefritis y los controles de seguimiento de los pacientes se establecieron con un alto grado de exigencia. La antigua denominación de cepas pielonefritogénicas adquiere ahora un sentido molecular, puesto que los resultados de este trabajo indican marcadamente que las cepas de *E. coli* con mayor capacidad invasora (grupo **a-2** que contienen el operón *pap* y la secuencia **V6-I**) se aíslan en las pielonefritis no complicadas y pertenecen a un grupo de elite, de patrón claramente homogéneo filogenicamente. Desde el punto de vista demográfico, la PNAnoC es casi patrimonio del sexo femenino (95%), lo que apoya la idea ya establecida de que la barrera uretral que impide la entrada de microbios es mucho más eficaz en el hombre (1). En cambio, se ha comprobado que carece de fundamento la hipótesis de que en los enfermos más jóvenes al tener supuestamente una mejor funcionalidad de los mecanismos de defensa que los de edad más avanzada, las cepas infectantes deberían ser selectivas para una máxima virulencia con el fin de acceder al riñón. El análisis de la población incluida en el estudio demuestra que la presencia del gen *pap* y de la secuencia **V6-I** de las cepas infectantes es independiente de la edad.

Cuando los datos obtenidos se distribuyen según la existencia de una patología urológica subyacente, se observa claramente que el patrón molecular cambia y es en este caso de elevada heterogeneidad intercistrica, indicando una ampliación de posibilidades infectantes para otros tipos. Esto está en consonancia con la experiencia clínica acumulada que evidencia una etiología de la pielonefritis no selectiva y aparecen en los estudios realizados otro tipo de cepas de *E. coli* e incluso otros microbios (1). La razón base reside en que toda la patología urológica tiende en mayor o menor grado a minimizar o incluso anular los mecanismos de defensa, por lo que están presentes otros gérmenes con menor capacidad o selectividad a la hora de expresar factores de virulencia (29)(30). La pertenencia de la cepa infectante a un grupo molecular determinado es independiente de la edad, y aunque, la incidencia de PNAC sigue siendo mayoritaria en el sexo femenino (84%), se amplía considerablemente la participación

del sexo masculino, lo que indica que la morbilidad de la patología subyacente tiende en una cierta medida a igualar las oportunidades de los microbiontes. De hecho podría conocerse en que grado afecta la patología de base a los mecanismos de defensa de acuerdo con la etiología de la pielonefritis. Este trabajo muestra como el reflujo vesico-renal y la obstrucción urinaria afectan gravemente a los mecanismos de defensa, ya que las cepas aisladas no son molecularmente selectivas y, de hecho cualquier cepa de *E. coli* esta capacitada para la invasión renal. Contrariamente a lo esperado, también define como un cuerpo extraño (cálculo) no obstructivo, prácticamente no afecta la funcionalidad y eficacia de los mecanismos de defensa, puesto que las cepas de *E. coli* infectantes pertenecen al mismo grupo que los casos previamente sanos. Este dato podría explicar porqué la frecuencia de pielonefritis en la litiasis obstructiva es mucho mayor respecto a la no obstructiva e incita a pensar en la necesidad de redefinir el concepto clínico de pielonefritis complicada.

La polirresistencia esta mayormente asociada a cepas de *E. coli* no portadoras de genes para factores de virulencia, apoyando la hipótesis de que las cepas virulentas no pueden soportar metabólicamente la sobrecarga adicional del DNA plasmídico que codifica la resistencia y en consecuencia son más sensibles a los antimicrobianos (14)(17). Este trabajo se encuentra en consonancia con la idea, pero con algunos importantes matices. Las cepas del grupo molecular **b** cumplen claramente la hipótesis, mientras que no parece suceder lo mismo para el grupo **a**. Así, cuando se ha observado polirresistencia en este ultimo grupo, la tasa de cepas *pap* + es tan alta como la de las cepas sensibles. Es evidente que el número de cepas es bajo y se precisa acumular mayor información, pero el dato sugiere una extremada capacidad de virulencia del grupo molecular **a**, que parece ser capaz de sintetizar factores de virulencia y soportar a la vez la carga adicional plasmídica de poliresistencia.

La técnica de RFLP se ha mostrado como un método eficaz y reproducible del tipado de cepas de *E. coli*. Su correlación con la modalidad clínica de pielonefritis proporciona datos importantes acerca de su patogénia. En definitiva, las cepas de los casos de PNAnoC y aquellas procedentes de casos con patología litiásica no obstructiva son en general multisensibles, poseen con alta frecuencia el operón *pap* y pertenecen a un grupo molecular selectivo, homogéneo y altamente protegido de recombinaciones o reordenaciones, que coincide con el grupo B2 de MLEE portador de PAIs. En cambio, las procedentes de casos con obstrucción de vías o reflujo, muestran una mayor polirresistencia, tienen una acusada heterogeneidad intercistronica debida a sustituciones nucleotídicas, sustituciones en bloque, inserciones y deleciones y una muy baja presencia del operón *pap*.

CONCLUSIONES

- Las cepas de *E. coli* procedentes de PNnoC muestran significativamente las siguientes características: Pertenencia al grupo **a-2** + presencia gen *pap* + secuencia **V6-I** + multisensibilidad antibiótica.
- Las cepas procedentes de PNAC las cepas muestran significativamente las siguientes características: Pertenencia al grupo **a / b** + ausencia del gen "*pap*" + secuencia V6 variable + multirresistencia.

- Las cepas aisladas en sujetos con PNAC SIN OBSTRUCCION DE VIAS muestran el mismo perfil molecular que las cepas PNnoC descritas anteriormente.

- Las cepas aisladas en sujetos con PNAC CON OBSTRUCCION DE VIAS y REFLUJO VESICO-RENAL exhiben la máxima heterogeneidad intercistrica junto con la mínima tasa del gen “*pap*”.

BIBLIOGRAFIA

- 1 – Dalet F, Del Rio G. Infecciones Urinarias. Madrid: Panamericana; 1997
- 2 – Johnson JR. Virulence factors in *E. coli* urinary tract infections. Clin Microbiol Rev 1991; 4:80-128
- 3 - Donnenberg MS, Welch RA. Virulence determinants of uropathogenic *E. coli*. En: Harry L, Mobley T, Warren JW, dir. Urinary Tract Infections: Molecular pathogenesis and Clinical Management. Washington: ASM Press; 1994
- 4 – Salyers A, Whitt DD. Bacterial Pathogenesis. A molecular approach. Washington: American Society for Microbiology; 1994
- 5 - Caugant DA, Levin BR, Lidin-Janson G *et al.* Genetic diversity and relationships among strains of *E. coli* in the intestine and those causing urinary tract infections. Prof Allergy 1983; 33:203-27
- 6 - García-Martínez J, Martínez-Murcia AJ, Rodríguez-Valera F, Zorraquino A. Molecular evidence supporting the existence of two major groups in uropathogenic *E. coli*. FEMS Immunol Med Microbiol 1996; 14:231-44
- 7 - Antón AI, Martínez-Murcia AJ, Rodríguez-Valera F. Sequence diversity in the 16S-23S intergenic spacer region (ISR) of the rRNA operons in representatives of the *E. coli* ECOR collection. J Mol Evol 1998; 47:62-72
- 8 – Güntler V, Stanisich VA. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S spacer region. Microbiol 1996; 142:3-16
- 9 - Jensen MA, Webster JA, Straus N. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. Appl Environ Microbiol 1993; 59:945-52
- 10 - Ochman H, Selander RK. Standard reference strains of *E. coli* from natural populations. J Bacteriol 1984; 157:690-3
- 11 – Pupo GM, Karaolis DKR, Lan R *et al.* Evolutionary relationships among pathogenic and nonpathogenic *E. coli* strains inferred from multilocus enzyme electrophoresis and “*mdh*” sequence studies. Infect Immun 1997; 65:2685-92
- 12 - Bergthorsson U, Ochman H. Heterogeneity of genome sizes among natural isolates of *E. coli*. J Bacteriol 1995; 177:5784-9

- 13 - Antón AI, Martínez-Murcia AJ, Rodríguez-Valera F. Sequence microdiversity at the ribosomal RNA operons of *E. coli* pyelonephritogenic strains. *Clin Microbiol Infect* 2001; 7:345-51
- 14 - Johnson JR, Goulet PH, Picard B *et al.* Association of carboxylesterase B electrophoretic pattern with presence and expression of urovirulence factor determinants and antimicrobial resistance among strains of *E. coli* that cause urosepsis. *Infect Immun* 1991; 59:2311-5
- 15 - Picard B, Journet-Mancy C, Picard-Pasquier N *et al.* Genetic structures of the B2 and B1 *E. coli* strains responsible for extra-intestinal infections. *J Gen Bacteriol* 1993; 139:3079-88
- 16 - Blum G, Falbo V, Caprioli A, Hacker J. Gene-clusters encoding the cytotoxic necrotizing factor type 1, Prs-fimbriae and alpha-hemolysin form the pathogenicity island II of the uropathogenic *E. coli* strain J96. *FEMS Microbiol Lett* 1995; 126:189-95
- 17 - Johnson JR, Orskov Y, Orskov F *et al.* O, K and H antigens predict virulence factors, carboxylesterase B pattern, antimicrobial resistance, and host compromise among *E. coli* strains causing urosepsis. *J Infect Dis* 1994; 169:119-26
- 18 - Picard B, García JS, Gouriou S *et al.* The link between phylogeny and virulence in *E. coli* extraintestinal infection. *Infect Immun* 1999; 67:546-53
- 19 - Guyer DM, Kao J-S, Mobley LTM. Genomic analysis of a pathogenicity island in uropathogenic *E. coli* CFT073: Distribution of homologous sequences among isolates from patients with Pyelonephritis, Cystitis, and Catheter-associated Bacteriuria and from Fecal samples. *Infect Immun* 1998; 66:4411-7
- 20 - Lee CA. Pathogenicity islands and the evolution of bacterial pathogens. *Infect Agents Dis* 1996; 5:1-7
- 21- Dalet F, Segovis T, Del Rio G. Frequency and distribution of uropathogenic *E. coli* adhesins: A clinical correlation over 2.000 cases. *Eur Urol* 1991; 19:295-303
- 22 - Vaisanen V, Elo J, Tallgren LG *et al.* Mannose-resistant haemagglutination and P antigen recognition are characteristic of *E. coli* causing primary pyelonephritis. *Lancet* 1981; ii:1366-9
- 23 - Kallenius PV, Schwan WR, Amundsen SK *et al.* In vitro expression and variation of *E. coli* type 1 and P pili in the urine of adults with acute urinary tract infections. *Infect Immun* 1989 ; 57:1656-62
- 24 - Haslam DB, Boren T, Falk P *et al.* The amino-terminal domain of the P-pilus adhesin determines receptor specificity. *Mol Microbiol* 1994; 14:399-409
- 25 - Harjai K, Chhibber S, Bhau LN, Sharma S. Introduction of plasmid carrying an incomplete set of genes for aerobactin production alters virulence of *E. coli* HB101. *Microb Pathog* 1994; 17:261-70

- 26- Puzova H, Siegfried L, Kmetova M *et al.* Fimbriation, surface hydrophobicity and serum resistance in uropathogenic strains of *E. coli*. FEMS Immunol Med Microbiol 1994; 223-9
- 27 - Trifillis AL, Donnenberg MS, Cui X *et al.* Binding to and killing of human renal epithelial cells by hemolytic P-fimbriated *E. coli*. Kidney Int 1994; 46:1083-91
- 28 - Straube E, Schmidt G, Marre R, Hacker J. Adhesion and internalization of *E. coli* strains expressing various pathogenicity determinants. Int J Med Microbiol Virol Parasitol Infect Dis 1993; 278:218-28
- 29 - Sobel JD, Kaye D. Host defense mechanisms in urinary tract infections. En: Schrier RW, Gottschalk CW "Diseases of the Kidney". 4th edition. Boston: Little Brown; 1988
- 30 - Warren JW. Clinical presentations and epidemiology of urinary tract infection. En: L. Harry, T. Mobley y JW Warren, dir. Urinary Tract Infections: Molecular Pathogenesis and Clinical Management. Washington DC: ASM; 1994