



**BUAP**

---

---

Benemérita Universidad Autónoma de Puebla  
Facultad de Ciencias Químicas  
Departamento de Análisis Clínicos  
Laboratorio de Investigaciones Nefrourológicas

Tesis para obtener el grado de Licenciado  
Químico Farmacobiólogo

Bacterias uropatógenas que expresan el  
morfofotipo filamentososo en orinas de  
pacientes ambulatorios

Presenta:

pQFB. Héctor Hugo Pérez Ramírez

Director de tesis:

MC. José Ángel Francisco Flores Hernández

Enero 2017



# **Contenido**

<b>ANTECEDENTES</b>	2
<b>DEFINICIÓN DEL PROBLEMA</b>	15
<b>HIPÓTESIS</b>	15
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	16
<b>OBJETIVO GENERAL</b>	17
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	17
<b>MATERIAL Y MÉTODOS.</b>	18
<b>Universo de trabajo</b>	18
<b>Grupo de trabajo</b>	18
<b>Manejo estadístico de los datos</b>	20
<b>Grupo control</b>	20
<b>Diagrama de trabajo</b>	21
<b>METODOLOGÍA</b>	22
<b>Técnica de aislamiento bacteriano</b>	23
<b>Técnica de fijación</b>	24
<b>Tinción de Gram</b>	24
<b>Tinción Naranja de acridina – fluoresceína de sodio</b>	24
<b>Técnica para cultivo</b>	25
<b>Técnica de microscopía de barrido electrónico.</b>	26
<b>RESULTADOS</b>	28
<b>DISCUSION DE RESULTADOS</b>	40
<b>CONCLUSIONES</b>	50
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	51
<b>ANEXOS</b>	60

## ANTECEDENTES

El hombre desde su aparición en el mundo se ha visto aquejado por múltiples padecimientos. Las enfermedades que se presentaban en los primeros Homo sapiens debieron ser las que aquejaban a sus antecesores; infecciones fácilmente transmisibles y con un periodo de latencia prolongado como son los Herpes virus, varicela-zoster, treponematosis y el virus de la hepatitis B son los principales candidatos<sup>1</sup>. Además otros microorganismos se han adaptado de igual manera para afectarlo. Por ejemplo: la búsqueda de parásitos intestinales en momias prehistóricas en Europa ha revelado la presencia de *Ascaris lumbricoides* siempre asociado con *Trichuris trichura*, mientras que en América precolombina se han identificado *Enterobius vermicularis*, *Trichuris trichura* y *Ancylostoma spp*, pero nunca *A. lumbricoides*, se postula que este parásito se adaptó al hombre después de los periodos glaciales durante los cuales se colonizó América a través del estrecho de Bering<sup>1</sup>.

De igual manera las actividades humanas han sido determinantes importantes en muchas enfermedades infecciosas. La agricultura, el almacenamiento de granos y cereales además de la domesticación de animales trajo consigo las zoonosis por roedores y animales domésticos; al implementar el sistema de división del trabajo aparecieron grupos vulnerables para ciertos padecimientos por ejemplo los mineros para la tuberculosis (vía silicosis), las prostitutas y los soldados para las enfermedades de transmisión sexual, los carniceros para la brucelosis, entre otros<sup>2</sup>.

Todo esto apunta a que las enfermedades que nos aquejan están fundamentalmente ligadas a nuestro modus vivendi y aunque hemos desarrollado un considerable repertorio químico para combatir a los microorganismos y se han erradicado algunas enfermedades, la prolongación de la esperanza de vida, la aparición de las inmunodeficiencias adquiridas y no adquiridas; sumado a estados de menor resistencia secundarios a procesos de cirugía mayor, procesos cancerosos post-radio/quimioterapia o sobrevivientes de politraumatismos anteriormente considerados mortales, se torna cada vez más evidente e importante la participación

de la biota “oportunistas” que en otros tiempos y en individuos no debilitados, no pasarían de ser simples comensales o saprofitos<sup>2</sup>.

Hasta finales del siglo XXI era usualmente asumido que las bacterias y en general los microorganismos patógenos que causan las enfermedades infecciosas se mantenían vidas unicelulares relativamente independientes, sin comportamientos cooperativos como los tienen los mamíferos, aves e insectos. No obstante nuevas investigaciones han demostrado que mucho de lo que hacen estos patógenos lo hacen en grupos<sup>3</sup>.

La enfermedad sucede cuando la interacción con el agente microbiano resulta en un proceso patológico para el huésped detonado por factores de virulencia o por la respuesta inmune sin regulación por parte del hospedero<sup>2</sup>.

Esta enfermedad se organiza de acuerdo al sitio anatómico, es decir se clasifican conforme al órgano o sistema que está comprometido; en medicina se describen por lo general los siguientes tipos:

- Infecciones de aparato respiratorio
- Infecciones de aparato digestivo
- Infecciones de sistema nervioso
- Infecciones de aparato genitourinario
- Infecciones de sistema cardiovascular
- Infecciones de la piel y tejidos blandos
- Infecciones oculares
- Infecciones osteoarticulares

Dentro de ellas una de las más frecuentes son las infecciones del aparato genitourinario, que a su vez se subclasifican en infecciones de tracto urinario (ITU's) e infecciones venéreas<sup>2</sup>.

Las ITU's son una de las primeras causas por la que los pacientes requieren atención médica primaria, encontrándose como la segunda causa de prescripción de antibióticos<sup>4</sup>. Las infecciones de vías urinarias ocurren en todos los grupos etarios; los picos de mayor incidencia se observan en preescolares, mujeres embarazadas y ancianos<sup>4</sup>. Clínicamente las ITU's son consideradas autolimitadas, de carácter agudo a pesar de la prevalencia de los síntomas después de meses de la infección primaria<sup>7</sup>.

Por motivos prácticos es razonable clasificarlas basados en las zonas anatómicas del tracto urinario, la sintomatología y características del paciente, por lo que se describen 5 tipos<sup>4</sup>:

ITU no complicada

- o Uretritis
- o Cistitis
- o Pielonefritis

ITU complicada

- o ITU febril
- o Pielonefritis complicada
- ITU crónica o recurrente
- Sepsis

Tanto cistouretritis como pielonefritis, afectan a una gran parte de la población en el mundo, repercutiendo de igual manera en la morbilidad y generando elevados costos médicos. Por ejemplo, en Estados Unidos se gastan cerca de dos billones de dólares por año en su atención, se estima que por lo menos un tercio de la población femenina tendrá una ITU antes de los 65 años y que muchas experimentaran más de una infección por año<sup>5</sup>.

El boletín Epidemiológico de la Secretaría de Salud en México reportó en el 2014 un total de 1 997 992 casos de ITU y en el 2015 2 007 471 casos; de los cuales 1 545

117 fueron mujeres (76.96%) y 462 300 (23.04%) hombres, y hasta la semana 20 del 2016 se reportaron 358 913 casos en hombres y 1 176 557 en mujeres<sup>6</sup>. Las ITU's se mantienen como las primeras causas de morbilidad a través de los años y es muy probable que existan muchos más casos de los reportados, lo que representa un importante problema de salud pública nacional y mundial<sup>5</sup>. Se ha descrito que con excepción de la porción más inferior de la uretra, el tracto urinario es estéril gracias a una serie de mecanismos de defensa inespecíficos; entre éstos cabe mencionar el flujo unidireccional sin obstáculos para la salida de la orina y el vaciamiento completo de la vejiga; las características propias de la orina como los cambios extremos en la osmolaridad, concentraciones elevadas de urea y el pH bajo inhiben el crecimiento de algunas bacterias; además existen mecanismos de antiadherencia bacteriana, la motilidad de las vías urinarias y la competencia de la unión ureterovesical, en estas condiciones las vías urinarias se mantienen libres de infección<sup>4</sup>. Sin embargo, cuando el inoculo bacteriano supera los mecanismos antes mencionados o cuando existen alteraciones anatómicas y/o funcionales de las vías urinarias, como son el reflujo vesicoureteral y los cuerpos extraños (cálculos y sondas, tumores) se crean las condiciones para la consecuente bacteriuria<sup>4</sup>.

El término bacteriuria se refiere a la presencia de bacterias en la orina; sin embargo, la bacteriuria significativa es aquella en la que el número de bacterias encontradas supera la cuenta esperada debida su contaminación por el paso uretral. Debe tomarse en cuenta también la bacteriuria asintomática, que implica la existencia de bacteriuria significativa pero el paciente se encuentra sin síntomas<sup>8</sup>.

Es por ello que se hipotetiza que los patógenos deben desarrollar estrategias para ser capaces de colonizar y deben vencer las defensas innatas que normalmente tenemos, no obstante existen situaciones o factores propios del hospedero que pueden contribuir en el desarrollo de ITU's y podemos englobarlos en cuatro categorías<sup>4</sup>:

1. Anormalidades estructurales y funcionales: disrupción del flujo normal de la orina producen estasis urinaria. Bajo esas condiciones las bacterias pueden crecer y dividirse más fácilmente conllevando una carga bacteriana mayor y

promoviendo la adhesión bacteriana. Estas anomalías incluyen a las congénitas, quistes y divertículos, además de defectos neurológicos que provocan retención urinaria.

2. Cuerpos extraños: cálculos y catéteres urinarios no solo causan turbulencia urinaria también actúan como soporte de organismos que pueden formar agregados y biopelículas. Cuando las bacterias como *Pseudomonas aeruginosa* se adhieren a superficies modifican su metabolismo y se organizan para formar biopelículas que las protegen de la respuesta inmune y los antibióticos. *Proteus spp.*, pueden producir ureasas que provocan en aumento del pH urinario y predisponen a la formación de cálculos.
3. Anormalidades metabólicas: la glucosuria en diabetes mellitus y en el embarazo induce el desarrollo de bacterias en la orina, cambios en el epitelio urinario que también ocurren durante el embarazo pueden predisponer a infecciones.
4. Inmunidad comprometida: los pacientes bajo tratamiento con medicamentos inmunosupresores y los pacientes que reciben un trasplante de órganos o de médula ósea tienen un mayor riesgo de sufrir ITU y urosepsis. Los pacientes con VIH (virus de inmunodeficiencia humana) con y sin tratamiento también corren un alto riesgo de padecer ITU's.

Las vías por las cuales las bacterias pueden invadir el tracto urinario son: ascendente, hematológica y linfática<sup>4,10</sup>.

La vía ascendente: En diversas situaciones estas bacterias pueden ascender hacia la vejiga a través de la uretra, como en el caso de cateterizaciones y actividad sexual. Una vez que las bacterias alcanzan la vejiga, se multiplican y pueden pasar a los uréteres, especialmente cuando existe reflujo vesicoureteral. Las mujeres tienen mayor predisposición, ya que la uretra es corta y se encuentra en proximidad con un área vulvar húmeda y el área perirectal, lo cual propicia colonización de vías urinarias<sup>11,12</sup>.

La vía hematógica: ocurre cuando hay infección del parénquima renal con microorganismos presentes en la sangre. El riñón puede ser un sitio de abscesos en casos de estafilococcemias o endocarditis. Las bacteremias por gramnegativos difícilmente dan lugar a pielonefritis, excepto bajo ciertas circunstancias especiales, como obstrucción del flujo de orina o en pacientes inmunocomprometidos. Esta es una de las vías que con mayor frecuencia da origen a infección urinaria en recién nacidos<sup>4,10</sup>.

La vía linfática: esta ruta es poco frecuente. Se ha demostrado en experimentos con animales que existe comunicación linfática entre los uréteres y los riñones, y que una presión incrementada en la vejiga ocasiona flujo linfático al riñón. Comparando las tres vías, la vía ascendente se reconoce como la más frecuente<sup>4,10</sup>.

De las infecciones urinarias, únicamente las que se localizan a nivel renal son consideradas como causa de complicaciones a largo plazo, tales como hipertensión, proteinuria, toxemia e insuficiencia renal. El diagnóstico oportuno y tratamiento adecuado son indispensables para evitar el acenso y diseminación del patógeno y prevenir estas complicaciones<sup>2</sup>.

Tradicionalmente se describe que para establecer un diagnóstico de ITU se deben tomar en cuenta signos y síntomas como es el dolor lumbar, ardor al orinar, orina con olor fuerte, disuria y tenesmo vesical. En los estudios de laboratorio como auxiliar de diagnóstico se emplea el examen general de orina donde se utilizan como indicadores de ITU la esterasa leucocitaria y nitritos positivos en el análisis fisicoquímico, además de la observación microscópica con objetivo seco fuerte (40X) de bacterias abundantes, más de 15 leucocitos por campo, también la presencia de 5 o más eritrocitos por campo; otorgando una probabilidad de infección cercana al 86%<sup>2</sup>.

No obstante la presencia de bacterias en orina *per se* no es un indicativo de ITU, ya que las variables implicadas en la fase preanalítica hacen imposible asegurar que las bacterias identificadas en la muestra provienen del tracto urinario y dificultan la

interpretación. Por lo que las reglas de diagnóstico dependen de la pureza del cultivo (es decir si son aisladas dos o más especies), y de los microorganismos involucrados basados en criterios de uropatogenicidad<sup>9</sup>.

Diferentes tipos de microorganismos han sido agrupados basados en cuatro grados de patogenicidad y la frecuencia clínica. Por lo que se distinguen cuatro categorías:

- a) Patógenos primarios. Especies que tienen la capacidad de producir ITU en individuos sin anomalías de tracto urinario, entre las especies involucradas tenemos a *Escherichia coli* uropatogénica (UPEC por sus siglas en inglés) y *Staphylococcus saprophyticus*<sup>9</sup>.
- b) Patógenos secundarios. Especies que rara vez causan infección en individuos sin anomalías de tracto urinario, pero a menudo aparecen en ITU intrahospitalarias; especies de *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter spp.*, *Proteus spp.*, *Morganella morganii*, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis* son algunos ejemplos<sup>9</sup>.
- c) Patógenos dudosos. Son normalmente flora de la piel y especies que algunas veces se aíslan de cultivos de pacientes hospitalizados. El significado clínico solo es relevante si se aíslan de muestras obtenidas por punción suprapúbica, incluso aunque se trate de especies de estafilococos coagulasa negativa<sup>9</sup>.
- d) Flora uretra-genital. Son especies catalogadas como flora normal residente de la piel y cercanías de la uretra. Aparecen en muestras que no fueron colectadas adecuadamente. La susceptibilidad antimicrobiana solo se realiza en estas especies en casos muy especiales. Este grupo existe para detallar la interpretación clínica y para minimizar falsos positivos<sup>9</sup>.

El principal agente etiológico de ITU's es UPEC, provoca entre 60 - 90 % de ITU's adquiridas y aproximadamente 50% de las nosocomiales<sup>5</sup>. UPEC pertenece a uno de los patotipos de las llamadas *Escherichia coli* extraintestinales patogénicas (ExPEC, por sus siglas en inglés), que producen bacteremia, septicemia, meningitis

e ITU, estas cepas se caracterizan por producir infecciones cuando se encuentran fuera del intestino<sup>13</sup>.

La pérdida o ganancia de elementos genéticos móviles son los responsables de la habilidad de *E. coli* para producir una amplia gama de enfermedades. El núcleo del genoma de *E. coli* que comparten todas las cepas representa aproximadamente 2000 genes, mientras que el pangenoma supera los 10 000. Cada cepa de *E. coli* contiene en promedio 4 800 genes; es la composición específica de los genes adquiridos horizontalmente lo que establece su habilidad para causar una determinada enfermedad y ser definida así como un patotipo determinado<sup>13</sup>.

Los patotipos de *E. coli* residen en el intestino humano inofensivamente sin embargo, cuando acceden a otros sitios anatómicos se convierten en una causa importante de morbilidad y mortalidad como consecuencia de una ITU agresiva ascendente; estas cepas poseen la habilidad poco común de modificar su comportamiento desde un comensal inofensivo en un medio proliero a un patógeno virulento en un medio nutricionalmente limitado<sup>14</sup>.

Estos patotipos requieren de factores de virulencia que le permitan evadir los mecanismos de urodinamia y defensa innata del tracto urinario para poder persistir en él. Estos factores de virulencia los podemos agrupar en las siguientes categorías<sup>4</sup>:

1. Adhesinas: moléculas especiales para la adherencia a superficies bióticas o abióticas, entre las principales se encuentran fimH, papG y dr.
2. Toxinas: tienen funciones diversas, entre las principales es hlyA, sat, cdt y CNF-1.
3. Evasores de la respuesta inmune: la capsula que producen algunas cepas de *E. coli* y la producción de biopelículas son excelentes ejemplos.
4. Proteínas recapturadoras del hierro: *fyuA*, *ireA*, *ironN* y *chuA* son proteínas altamente especializadas en la captura del hierro en el ambiente urinario ya que es un recurso escaso en él.
5. Otros: estos factores involucran el *quorum sensing*, los flagelos, y otros que contribuyen activamente en la colonización del tracto urinario.

Los mecanismos por los que suceden las infecciones son muy complejos, ya que debido a la respuesta inmune del hospedero y a la virulencia de la cepa involucrada inducen cambios en el morfotipo (formas bacilares, filamentosas o cocoides)<sup>7, 9</sup>.

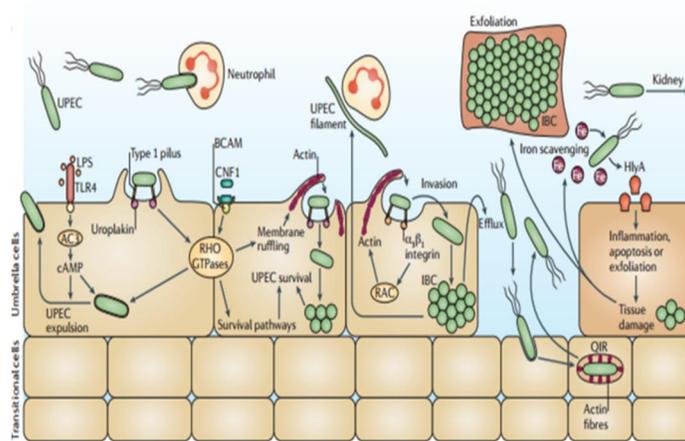
Para explicar los cambios metabólicos que ayudan a la supervivencia bacteriana al cambiar de microambiente Croxen y Finlay en 2010 plantearon que los niveles de algún metabolito intracelular controlan la expresión de genes que codifican enzimas no relacionadas con la obtención de energía, lo que implica que la detección de nutrientes podría ser un indicador para la bacteria de que se encuentra en un medio distinto al intestinal<sup>13</sup>.

Los mecanismos de detección de nutrientes tienen sistemas reguladores de transducción de señales de dos componentes, que contienen un sensor transmembranal tipo cinasa y un factor de transcripción regulador de respuesta afín, de esta manera las bacterias pueden coordinar la expresión genética en respuesta a un estímulo externo específico<sup>13</sup>. En UPEC la disrupción del sistema de dos componentes QseBC disminuye la virulencia dentro del tracto urinario alterando el flujo de fuentes de carbono en las vías centrales, lo que afecta negativamente en la expresión de múltiples adhesinas que están envueltas en la colonización de las células uroteliales<sup>15</sup>. Consistentemente con esto, Alteri y Mobley demostraron que en un medio bajo en carbohidratos pero rico en pequeños péptidos y aminoácidos como es la orina; las cepas con defectos en el transporte de péptidos, gluconeogénesis o ciclo de ácidos tricarbónicos, no colonizan efectivamente el tracto urinario del hospedero<sup>16</sup>.

Durante el proceso patogénico de las ITU's en modelos murinos, se describen cinco pasos para la formación de CBI<sup>19</sup> (Figura 1):

1. Adherencia del uropatógeno de manera específica a un receptor de membrana del uroepitelio.
2. CBI aparecen inicialmente como formas bacilares pobremente organizadas con un tiempo de replicación de aproximadamente 30 minutos.

- Entre las 6 y 8 horas post infección las CBI maduras se encuentran fuertemente empaçadas, altamente organizadas en formas cocoides, con un tiempo de multiplicación superior a los 45 minutos.
- Aproximadamente 16 horas post infección las bacterias en la capa externa de CBI sufren una transición, primero se vuelven móviles y después se convierten en formas bacilares o filamentosas, que se desligan de la comunidad y eventualmente escapan de la célula, entrando al lumen de la vejiga para adherirse a otra célula epitelial o ser evacuada del hospedero durante la micción.
- En el escape de la célula, bacterias filamentosas (mayores a 20 micrómetros de longitud) y bacilares son observadas en la superficie luminal.



**Figura 1.** Adaptado de Hultgren S, Flores A, Walker J, Caparon M. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nat Rev Microbiol.* 2015; 13 (5): 269-284

El primer paso para una exitosa colonización del urotelio consiste en que la bacteria se adhiera al uroepitelio, esto lo hace por medio de adhesinas que tienen como receptor específico las uroplaquinas. Las uroplaquinas (UP) son proteínas que cubren casi toda la superficie de la vejiga, están altamente conservadas entre los mamíferos, difieren básicamente sólo en los azúcares que tienen cuando se manosilan y se conocen cuatro tipos: UPIa, UPIb, UPII y UPIIIa y UPIIIb<sup>5</sup>. El pili tipo

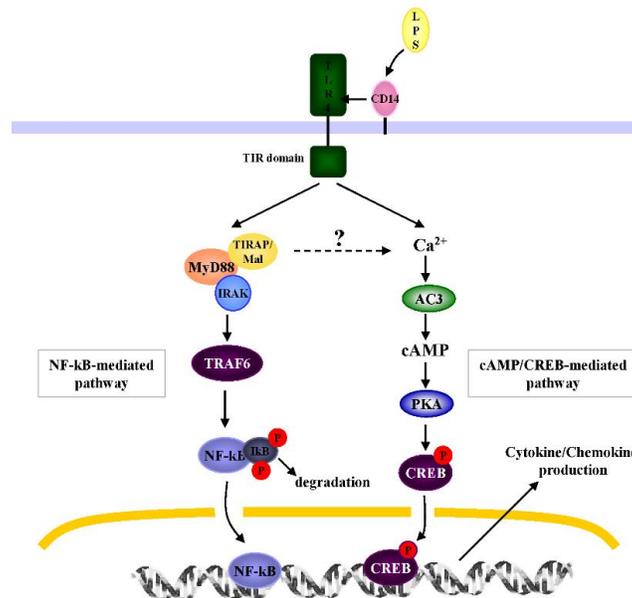
1 de UPEC se une por medio de adhesinas FimH al receptor de UPIa, lo que produce cambios conformacionales en el citoesqueleto, relacionados con rearrreglos de actina y conlleva la internalización de la bacteria<sup>17</sup>. El sistema de dos componentes Cpx regula la biogénesis de las estructuras de la superficie bacteriana y actúa como un sensor de la tensión sobre ella, y ha demostrado ser factor de virulencia importante para UPEC<sup>76</sup>. Las estructuras superficiales tales como las fimbrias son cruciales para la unión de UPEC con el urotelio, así como superficies abióticas, de igual manera los morfotipos filamentosos de UPEC expresan fimbrias tipo 1 en su superficie<sup>77</sup>. En este contexto, es probable que el sistema Cpx se activa por la identificación de una superficie de contacto por la bacteria<sup>76</sup>.

Una vez que la adhesión e internalización han sido exitosas, UPEC escapa del endosoma para evitar la expulsión de la célula e instalándose en el citoplasma donde comienza a multiplicarse rápidamente formando colonias bacterianas intracelulares (CBI), éstas son bacterias con un cambio fenotípico drástico que se organizan en comunidades tipo biopelícula dentro de la célula urotelial con tiempos de replicación entre 30-35 minutos<sup>7,8</sup>.

En las etapas tardías, se generan morfotipos de bacterias bacilares y filamentosas que se deslindan de la CBI, fluyendo de la célula para invadir las células de la periferia e iniciando las subsecuentes CBI<sup>17</sup>.

Cuando el urotelio (epitelio de la vejiga) detecta la presencia de las bacterias principalmente a través de receptores toll-like 4 (TRL4) sensibles al LPS bacteriano, produce citosinas principalmente interleucina 6 (IL-6) e interleucina 8 (IL-8), provocando la exudación de células fagocíticas o neutrófilos polimorfonucleares (PMN). TLR11 también juega un papel esencial en las ITU, se ha descubierto que identifica específicamente a UPEC, aunque todavía se desconoce el ligando<sup>18</sup>. La actividad y respuesta de los sensores inmunológicos es bastante compleja, en el caso de TLR4 la vía clásica es por medio de la activación de NF-κB que culmina con la producción de IL-6 e IL8; en el núcleo NF-κB estimula la transcripción de genes antiapoptóticos y proinflamatorios.

Además de esta existe una alterna vía AMP cíclico y el factor de transcripción CREB (cAMP response element-binding protein), que ejerce el mismo efecto que la vía clásica y conduce a la producción de citosinas solo que de manera más rápida que la primera (Figura 2), además contribuye también en la limitación de la adherencia bacteriana e interviene en la expulsión de endosomas que pueden contener bacterias uropatógenas ya internalizadas<sup>27</sup>. Se ha demostrado que UPEC activamente suprime la producción de citosinas por las células epiteliales de la vejiga<sup>18</sup>



**Figura 2.** Vías de señalización iniciadas por TLR-4 en ITU. Una vez que el LPS es detectado por el receptor TLR4 se inicia la cascada clásica que involucra NF-κB y la vía con segundos mensajeros. Adaptado de Song J, Abraham S. TLR mediated immune responses in the urinary tract. *Curr opin microbiol.* 2008. 11; (1):66-73.

Se ha observado que algunas bacterias bacilares y filamentosas fluyen fuera de la célula para atravesar la superficie luminal siendo variadas las hipótesis acerca del motivo preciso por el cual existe la inhibición de la división celular. Análisis realizados empleando vídeomicroscopía demuestra que durante este tiempo de transición, morfotipos bacilares de UPEC (2-8 micras de longitud) son engullidas fácilmente, mientras que UPEC filamentosa puede resistir la fagocitosis, incluso cuando está en contacto directo con neutrófilos y macrófagos<sup>7</sup>.

No obstante se debe tomar en cuenta que los neutrófilos pueden fagocitar estructuras grandes eficientemente (como hifas fúngicas); la resistencia observada de UPEC filamentosa a la fagocitosis probablemente se basa en atributos más allá del tamaño del organismo<sup>25</sup>. Por lo que se cree que pudieran existir mecanismos de inmunidad que estén relacionados con la activación de TLR4 que no involucren respuesta celular fagocítica, pero que están vinculados con la expresión de morfotipos filamentosos<sup>26</sup>. Enfatizando la importancia patógena de la filamentación, las bacterias como UPEC SulA deficientes forman una primera ronda de invasión sin dificultad, pero fallan para sostener la infección más allá de este punto, ya que no puede filamentar con el fin de sobrevivir a la transición luminal. En ratones deficientes de TLR4, se vuelve a restaurar la capacidad patogénica de estas cepas<sup>26</sup>.

Al emigrar UPEC de la célula hospedera en morfotipo filamentoso obtiene muchas ventajas respecto al morfotipo bacilar:

- a) el aumento de la longitud sin modificar abruptamente la relación superficie/volumen celular confiere a la bacteria una mayor capacidad de captación de nutrientes por tener una mayor superficie de contacto.
- b) la capacidad de adherencia incrementa por el aumento del área superficial total.
- c) la replicación incompleta facilita el mecanismo de reparación de DNA o respuesta SOS, que actúa en respuesta para promover la adaptación y
- d) disminuye la posibilidad de muerte por daño causada por agentes oxidantes<sup>20</sup>.

La teoría más aceptada es la que implica la inhibición de la septación por medio de SulA, una proteína que se encuentra involucrada en la respuesta SOS. La regulación de la respuesta SOS involucra la inhibición de la división celular y se encuentra controlada por dos proteínas: LexA, el represor de los operones SOS inducibles que son las proteínas que potencian la supervivencia bacteriana en medios hostiles; y RecA, una proteasa que es activada por una agresión y que se une específicamente a la proteína LexA catalizando su autoproteólisis<sup>21, 22</sup>.

Este mecanismo incluye por lo menos 43 genes, y sus productos proteicos están involucrados en múltiples procesos de supervivencia<sup>22</sup>. Uno de esos genes SOS es SulA (18 kDa), esta proteína es sintetizada en grandes cantidades durante la respuesta SOS, alcanzando el 0.3% de la síntesis proteica total. SulA es capaz de alterar la división celular, su recambio es rápido (vida media de 1.2 minutos), SulA es degradado por la proteína proveniente del gen *lon*<sup>+</sup>; para bacterias *lon*<sup>-</sup> la vida media de SulA aumenta a 19 minutos<sup>22</sup>.

La inducción de la respuesta SOS provoca la desaparición de los anillos del polímero de FtsZ. SulA se une en proporción 1:1 (el GTP es necesario para la unión *in vitro*) y es un potente inhibidor de la división celular bacteriana<sup>22</sup>. El inhibidor de la división celular en la respuesta SOS, SulA, es esencial para la persistencia de UPEC en las investigaciones de ITU<sup>7</sup>. Experimentos en murinos han demostrado que la filamentación es indispensable para la supervivencia de UPEC en un huésped inmunocompetente y que los receptores TLR4 son cruciales en el mecanismo de respuesta inmune celular del hospedero<sup>19, 23</sup>.

Por otra parte, el estudio de Khandlege y cols., demuestra que en infección tanto *in vitro* como *in vivo*, DamX es determinante en las etapas últimas del ciclo de infección primaria, es decir, cuando se requiera la formación de morfotipos filamentos para el mantenimiento y propagación de la colonización inicial<sup>52</sup>. Mientras que en el espacio extracelular, frente a las amenazas combinadas de la eliminación a través del vaciado de la micción o la fagocitosis por los leucocitos polimorfonucleares reclutados en el lumen vesical; la adopción de una morfología filamentosa puede ser ventajosa tanto en términos de adherencia al tejido y para la evasión inmune<sup>52</sup>. En este estudio, se observó que la cepa UTI89  $\Delta$ damX era incapaz de formar filamentos, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Esta cepa mutante no muestra ninguna reducción en la adhesión celular de la vejiga o la invasión *in vitro*. Además, la tasa de replicación de la cepa UTI89  $\Delta$ damX es comparable a la del tipo salvaje, cuando se cultiva en la orina humana, como cuando residen intracelularmente *in vivo*<sup>52</sup>. La plasticidad morfológica ofrece ventajas selectivas, como evasión de la respuesta inmune del hospedero por UPEC<sup>26</sup> y *Proteus mirabilis*, resistencia a los antibióticos

en *Burkholderia pseudomallei*<sup>74</sup>, y la resistencia al estrés en *Caulobacter crescentus*<sup>75</sup>. Por lo tanto, no se puede excluir la participación del sistema inmune en la inducción de filamentos mediados por DamX.

Finamente en un último esfuerzo por parte de la respuesta innata del hospedero para eliminar a las CBI, activa mediadores citoquímicos para efectuar exfoliación por medio de caspasas 8 y 9.

Después de vencer la exfoliación urotelial de la vejiga, UPEC se establece en las capas basales uroteliales para desarrollar el reservorio quiescente intracelular (RQI).

Este RQI resiste tratamientos con antibióticos orales y es aparentemente indetectable por las células del sistema inmune del hospedero, además puede ser una fuente de infección recurrente. Por si fuera poco, estudios recientes demuestran que UPEC también es capaz de invadir las células basales de urotelio uniéndose a beta integrinas de las células inmaduras uroteliales<sup>29</sup>.

En la última década se ha demostrado que otras bacterias gram negativas son capaces de realizar parcialmente la vía de comunidades bacterianas intracelulares<sup>30</sup>. *Klebsiella pneumoniae*, que causa alrededor del 5% de las ITU no complicadas, es capaz de codificar fimbrias y contiene una adhesina homóloga a la de *E. coli*, sin embargo la virulencia y eficiencia de colonización son muy inferiores comparadas con UPEC<sup>30</sup>. Estas diferencias están relacionadas en parte a la expresión del pili tipo 1, sin embargo son necesarios más estudios para entender el mecanismo en otros uropatógenos.

De igual manera la forma de clasificar y atender las ITU's se ha actualizado: la Asociación Europea de Urología en el 2016 presenta una clasificación modificada, basada en el cuadro clínico, los factores de riesgo asociados y una escala de severidad. Son clasificadas inicialmente por la sintomatología y el sitio anatómico preciso, los factores de riesgo están organizados de acuerdo al sistema ORENUC (por sus siglas en inglés) y son esencialmente introducidos para el tipo y duración del tratamiento. Además menciona que los hallazgos microbiológicos de los cultivos

urinarios y la observación microscópica son determinantes en el diagnóstico, de ser posible mejorar el diagnóstico con técnicas como secuenciación metagenómica pero hace hincapié en el paradigma que implica su interpretación<sup>85</sup>. Específicamente hablando de la interpretación sobre el agente etiológico, menciona que debe tomarse en cuenta la carga bacteriana (conteo de unidades formadoras de colonias), el género y especie involucrado, la susceptibilidad a antibacterianos y la virulencia (Figura 3).

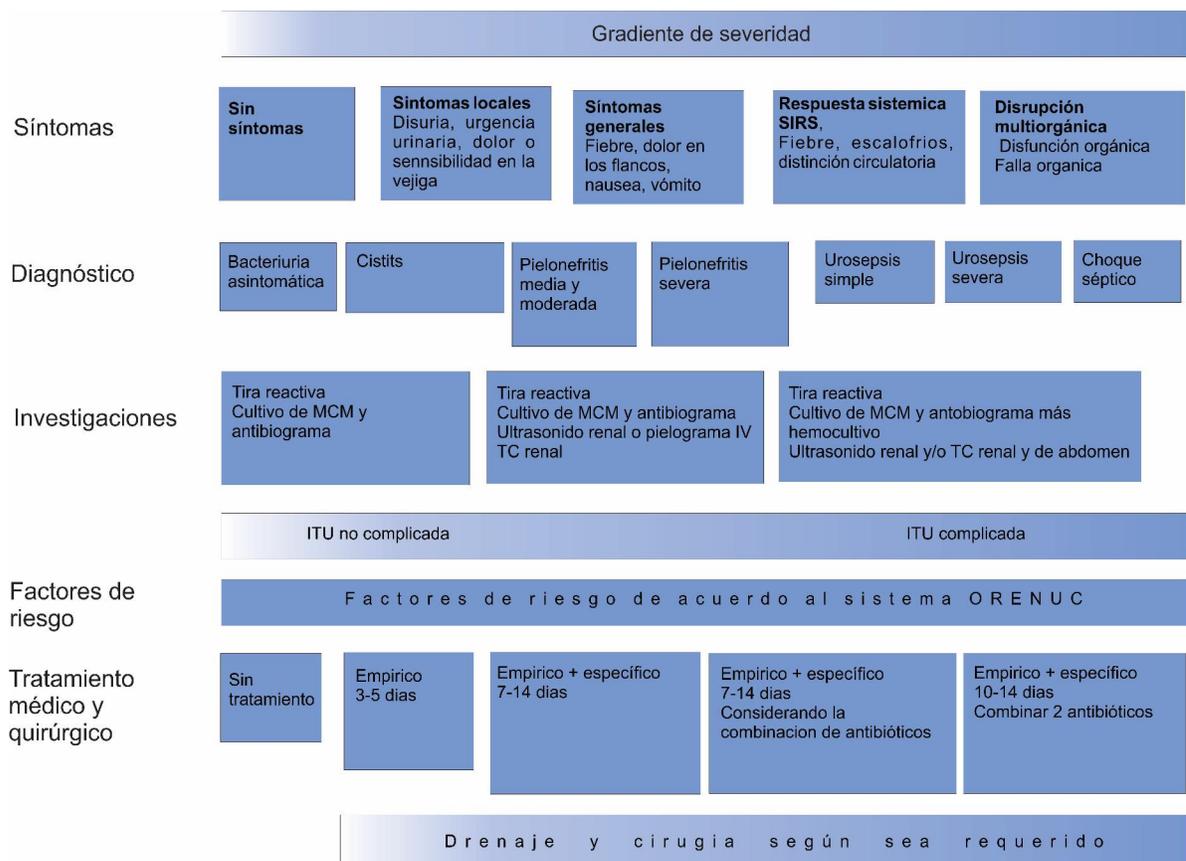


Figura 3. Algoritmo de diagnóstico y tratamiento de ITU's. Adaptado de Guidelines on urological infections, European Association of Urology. 2015

Los métodos de diagnóstico actuales solo pueden detectar estos fenómenos a través del examen general de orina, identificando directamente los morfotipos filamentosos en el análisis microscópico. El análisis de sedimento realizado como lo indica la guía europea de uroanálisis<sup>8</sup>, ya sea utilizando microscopía óptica o de contraste de fases, siendo esta última la mejor técnica para observar las variaciones morfológicas bacterianas en la orina. Sin embargo es indispensable que el personal que realiza la

observación del sedimento urinario esté capacitado debidamente en la identificación de dichas estructuras bacterianas<sup>20</sup>. La forma de reporte de la bacteriuria y de sus diferentes facetas está consolidándose todavía, no obstante la forma propuesta por el Laboratorio de Investigaciones Nefrourológicas es según indica la tabla 1.

**Tabla 1.** Propuesta de reporte de los facetas asociadas a bacteriuria en sedimento urinario.

<b>FASE</b>	<b>REPORTE</b>
<b>Bacteriuria planctónica o total</b>	1 a 4 cruces
<b>Tipo de bacterias</b>	1 a 4 cruces distinguiendo el morfotipo
<b>Comunidades intracelulares bacterianas</b>	0-100% con respecto a sus células pares
<b>Biopelícula</b>	Presente/Ausente
<b>Morfotipo en filamentación</b>	Presente/Ausente

Entonces el diagnóstico de ITU está actualmente basado en el análisis de rutina de un cultivo y aislamiento bacteriano de un uropatógeno dominante. Esta clase de métodos están diseñados para aislar bacterias aerobias fácilmente cultivables, restringiendo de manera muy significativa el hallazgo de bacterias anaerobias y nutricionalmente fastidiosas. Por lo que muchas especies no identificadas podrían estar involucradas directamente con los mecanismos de patogenicidad.

Sin embargo, nuevas técnicas moleculares como secuenciación metagenómica han manifestado la presencia de bacterias en pacientes clínicamente sanos con cultivos de fluidos normalmente estériles como la orina o secreciones prostáticas. Esto pone en evidencia la existencia de otros microorganismos que pueden estar relacionados directamente con las infecciones de tracto urinario, por lo que se requieren más análisis para comprender adecuadamente la relación hospedero-patógeno.

## **DEFINICIÓN DEL PROBLEMA**

Las infecciones de tracto urinario (ITU) son una de las infecciones más frecuentes en la mayoría de los países independientemente del nivel económico. Por lo menos la mitad de la población femenina en el mundo experimentará una ITU a lo largo de su vida. Esto implica una inversión monetaria considerable en tratamientos que no siempre resultan efectivos. En 2015, las ITU se mantuvieron dentro de las primeras causas de morbilidad<sup>6</sup>. El principal agente causal es *Escherichia coli* uropatogénica (UPEC), también se encuentran otras bacterias como *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus saprophyticus*, entre otros de menor incidencia.

El mecanismo infeccioso de UPEC implica modificaciones morfológicas en diferentes estadios de la infección, dentro de los cuales las bacterias filamentosas son altamente encontradas en muestras de orina de modelos animales y también han sido reportadas en algunos pacientes con ITU. Se ha mencionado que la presencia de colonias intracelulares bacterianas y bacterias con morfotipo filamentosas pueden estar ligadas a la recurrencia de la infección desencadenando ITU's crónicas; además de estar mal identificadas, impactando fuertemente en la precisión del diagnóstico y afectando negativamente la calidad de vida de los pacientes.

## **HIPÓTESIS**

Es posible identificar el fenómeno de filamentación de uropatógenos por el hallazgo de bacterias bacilares mayores a 50µm en sedimento urinario de pacientes ambulatorios.

## JUSTIFICACIÓN

La tasa de incidencia para ITU's en nuestro país es elevada, siendo posible que las cifras reportadas disten mucho de las reales, aun así son suficientemente significativas como para considerarse un problema prioritario de salud pública; haciendo necesaria la investigación de los agentes causantes de estas enfermedades y sus mecanismos de infección.

Los modelos murinos en los que se basan la mayor parte de los descubrimientos sobre los mecanismos de patogenicidad involucrados en las ITU's solo funcionan como una guía que nos ayuda a comprenderlos, no obstante es crucial investigar el fenómeno *in vivo*, inicialmente en los especímenes de pacientes con ITU tanto asintomático como sintomático; todo esto para desarrollar nuevas estrategias de diagnóstico confiables ya que es un fenómeno que si bien suele ser descartado, también puede ser confundido, de igual manera con formas fúngicas, lo que lejos de beneficiar al paciente puede ocasionarle incluso complicaciones médicas.

Las investigaciones en modelos animales indican que la filamentación es un paso crucial para la recolonización de las células uroteliales y potencia la supervivencia bacteriana en individuos inmunocompetentes; por lo que esta investigación pretende analizar a las bacterias que expresan el morfotipo filamentoso presentes en sedimento urinario con la intención de determinar a los uropatógenos capaces de producirlo. No obstante ¿es posible aislar uropatógenos en su forma filamentosa para su análisis? ¿Se trata realmente de un único organismo o de células individuales de distinta progenie unidas entre sí?

## **OBJETIVO GENERAL**

Identificar género y especie de los uropatógenos productores del morfotipo filamentoso recuperados orinas de micción espontánea de pacientes ambulatorios.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Demostrar que el morfotipo filamentoso aislado de sedimento urinario es una sola unidad microbiana.
- Determinar el género y especie de los morfotipos filamentosos extraídos del sedimento urinario.
- Evaluar respuesta inmune innata del huésped en el sedimento de donde se recuperen las bacterias con morfotipo filamentoso.

## **MATERIAL Y MÉTODOS.**

### **Universo de trabajo**

Orinas de pacientes que presenten alta turbidez, y bacterias en el análisis de sedimento urinario igual o mayor a 3 cruces proporcionadas por Laboratorios Ruiz de la ciudad de Puebla, Puebla y por el laboratorio clínico Laborat-2 de la ciudad de Nativitas, Tlaxcala; durante el periodo de febrero de 2015 a junio de 2015.

### **Grupo de trabajo**

Orinas analizadas que en el sedimento urinario presenten bacterias con longitudes superiores a las 50  $\mu\text{m}$ .

### **Criterios de inclusión, exclusión y eliminación**

- Criterios de inclusión

Bacterias mayores a los 50 $\mu\text{m}$  de longitud.

No exista contaminación macroscópica (vello púbico, detritos fecales, restos de fibras o papel u otro material ajeno a la orina)

Orinas de pacientes que no estén en medicación por antibióticos o no se les haya administrado antibióticos en las últimas 4 semanas.

Orinas que cumplan con los criterios de contenedor estéril.

- Criterios de exclusión

Bacterias filamentosas provenientes de flora vaginal o fecal (bacilos Doderlein).

Contaminantes microscópicos (espermatozoides en caso de mujeres, ácaros, detritos fecales, algas, u otra estructura ajena a la orina).

El paciente haya referido uso de antibióticos en las últimas 4 semanas.

- Criterios de eliminación

Se eliminaron del estudio las muestras que:

El cultivo presente signos de contaminación con microbiota ambiental

Se aislen más de dos microorganismos del cultivo

- Variables y definición de variables

<b>VARIABLES INDEPENDIENTES</b>	
<b>Variable</b>	<b>Unidad de medición</b>
Edad del paciente	Años
Género del paciente	Masculino/Femenino
Género y especie bacteriana	No aplica
<b>VARIABLES DEPENDIENTES</b>	
<b>Variable</b>	<b>Unidad de medición</b>
Bacteriuria	1 a 4 cruces
Longitud bacteriana	Micrómetros ( $\mu\text{m}$ )
Leucocitos en orina	Células/ $\mu\text{L}$
Glucosa urinaria	mg/dL
Proteínas urinarias	mg/dL
pH urinario	No aplica
Esterasa leucocituria en orina	UI/ $\mu\text{L}$
Mucina	1 a 4 cruces
Eritrocitos en orina	Células/ $\mu\text{L}$

### **Manejo estadístico de los datos**

Los datos cuantitativos y semi-cuantitativos se sometieron un análisis tipo t de student suponiendo varianzas desiguales.

Los datos cualitativos se sometieron a un análisis de tipo chi cuadrada.

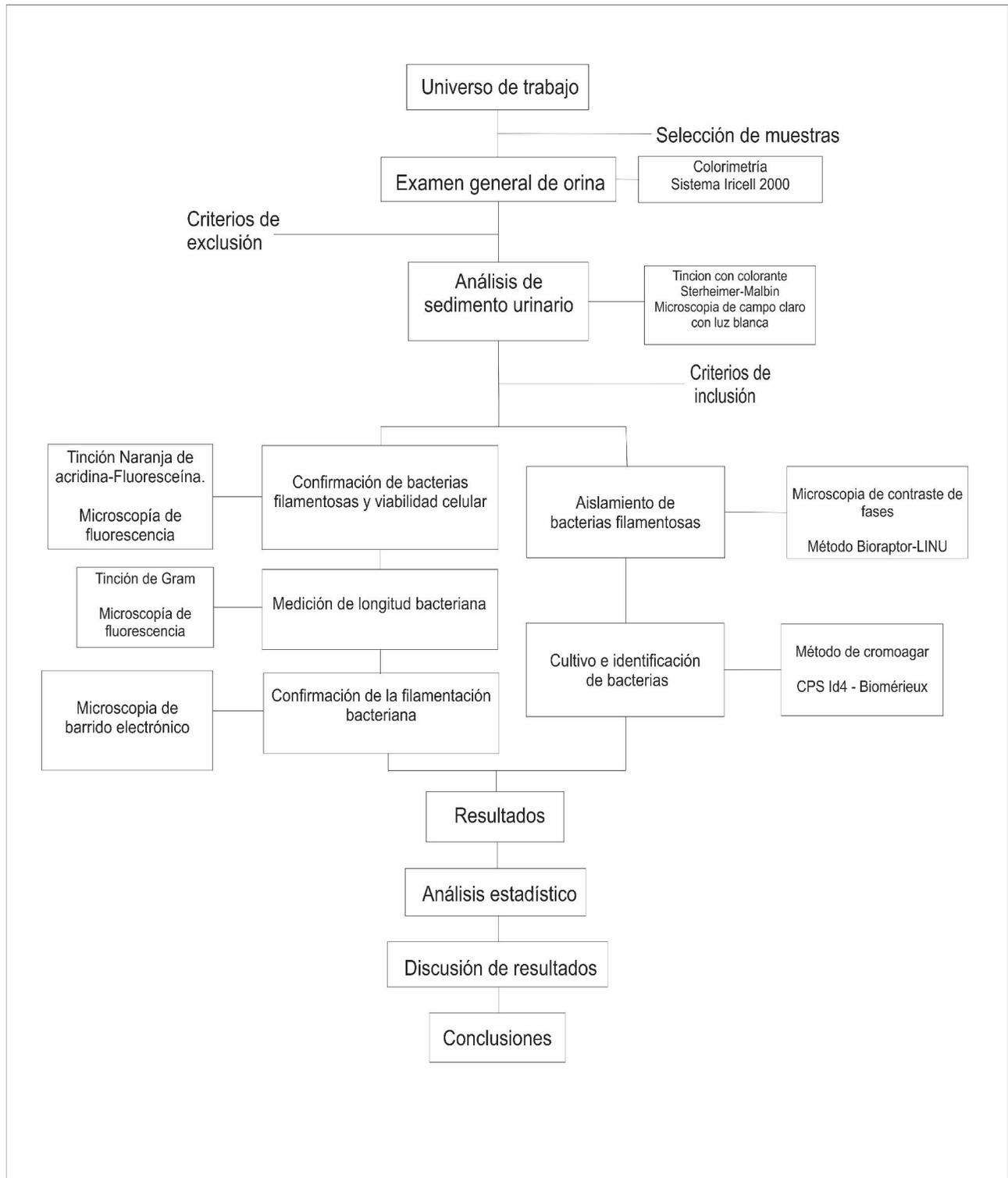
Los análisis de datos fueron realizados con ayuda del software Microsoft Excel 2013

®

### **Grupo control**

Se incluyó en el estudio para el análisis estadístico un grupo control de orinas que cumplieron con los criterios de selección pero que presentaban únicamente el morfotipo bacilar planctónico, con el cual se compararon las características analizadas de la orina.

## Diagrama de trabajo



## **METODOLOGÍA**

### **Examen general de orina (EGO)**

El análisis de orina rutinario, es en un procedimiento que se compone de dos partes: primero un análisis macroscópico, en el cual se determinan las características fisicoquímicas (apariencia, gravedad específica y la medición de los constituyentes químicos por medio de la tira reactiva, como proteínas, glucosa, cetonas, pH), y después un examen microscópico del sedimento por medio de microscopia en campo claro o contraste de fases, para verificar hematuria, piuria, cilindruria, cristaluria, y otros elementos formes.

El cuidado en la recolección de la orina y su entrega rápida en el laboratorio, son cruciales para obtener una información confiable. La orina debe ser colectada en un recipiente limpio, estéril, que tenga un cierre seguro para prevenir posibles derramamientos, evaporación o contaminación. Estos recipientes deben rotularse con el nombre del paciente, fecha y hora de recolección. La primera orina de la mañana es usualmente la mejor para el análisis porque es la orina más concentrada. Las muestras deben estar libres de secreciones vaginales u otra clase de partículas extrañas. La recolección del chorro medio con el lavado previo y usando un envase estéril proporciona una muestra satisfactoria para el examen de rutina. El análisis general de orina para la búsqueda de candidatos para este estudio fue realizado en el equipo automatizado iRICELL®2000 según instrucciones del fabricante (Anexo 1).

El análisis de sedimento para identificar los morfotipos fue realizado de la siguiente manera:

Las muestras fueron homogeneizadas en su contenedor primario. Se tomaron alícuotas aproximadamente al 90% ( $\approx 8.0\text{mL}$  como recomienda la guía europea de uroanálisis<sup>9</sup>) de un tubo de ensayo de 13x100, se centrifugaron a una velocidad de 400G, durante 5 minutos. Se descartó el 90% de orina del sobrenadante restando

aproximadamente 0.5 mL de orina residual. Se resuspendió el precipitado, por agitación suave.

En un portaobjetos limpio, se tomaron 50µl del resuspendido y se adicionaron 5µl del colorante Sternheimer-Malbin. Se mezclaron y cubrieron con un cubreobjetos de 22x22mm evitando la formación de burbujas. Fueron observadas en microscopio óptico de campo claro (American Optical Series 10), a 10x para garantizar la homogeneidad y se interpretó a 40x.

### **Técnica de aislamiento bacteriano**

Con el fin de aumentar la probabilidad de aislar e identificar al uropatógeno que presenta el morfotipo filamentoso se desarrolló una técnica de aislamiento bacteriano que disminuye la cantidad de bacterias planctónicas, esto fue debido a que no existen a la fecha métodos que permitan discriminar únicamente un morfotipo en el sedimento; los cultivos tradicionales no consideran la posibilidad de identificar un morfotipo en específico ya que en el muestreo no se diferencia entre morfotipos bacterianos. La técnica requiere del equipo Bioraptor, (patente en trámite) que consiste en un microposicionador X,Y Z con micropipeta capilar, capaz de aislar elementos formes presentes en la orina, con precisión de 2 – 5 µm y volúmenes de 3 a 10 µL.

Primero se colocaron 200µL de sedimento resuspendido en un portaobjetos limpio. Después se identificaron las bacterias filamentosas con el microscopio óptico de contraste de fases (American Optical MicroStar) con objetivo seco medio (25x). Se colocó la punta del capilar del Bioraptor en el cuadrante inferior derecho de la platina. La punta del capilar se colocó dentro del sedimento cerca de la estructura deseada. Se extrajo del sedimento por succión con las bombas del aparato dentro del capilar a las bacterias filamentosas. Fueron posteriormente colocadas en 100µL de solución Hartmann estéril (SHE) para realizar un lavado y disminuir los contaminantes. Se transfirieron a otros 200µL de SHE para su posterior cultivo.

## **Técnica de fijación**

La observación de la morfología bacteriana es fundamental para entender la estructura y comportamiento bacteriano, principalmente se deben fijar las muestras para inhibir la autólisis celular, preservar los componentes y la morfología celular<sup>31</sup>.

En la fijación de los morfotipos filamentosos se realizó la técnica descrita por Zhang & Chao modificada. De los 0.5 mL del sedimentos urinario con morfotipos bacterianos filamentosos, se realizaron 3 lavados con 5 ml de PBS y centrifugando a 400 G por 5 minutos y desechando el sobrenadante con pipeta Pasteur, finalmente se agregaron 2 mililitros de mezcla metanol-ácido acético por las paredes del tubo y se homogenizó suavemente, transcurridos 5 minutos se centrifugaron a 200 G por 10 minutos. Se descartó el sobrenadante con pipeta Pasteur dejando aproximadamente 0.5 mL de metanol-ácido acético del paso previo para resuspender el sedimento con agitación suave cuando sea necesario. Los sedimentos fijados fueron almacenados entre a -20°C y -10°C hasta su valoración final mediante otras técnicas de microscopía.

## **Tinción de Gram**

Colocar en un portaobjetos limpio 50µL del sedimento sometido a la técnica de fijación y realizar un extendido tipo frotis, dejar secar al aire. Agregar 500µL de solución cristal violeta y dejar reposar 1 minuto. Se enjuaga con agua destilada y se coloca 500µL de solución lugol durante 1 minuto. Lavar con solución alcohol-cetona aproximadamente 20 segundos. Se enjuaga con agua destilada y adiciona 500µl safranina por 1 minuto. Eliminar con agua destilada y dejar secar al aire.

## **Tinción Naranja de acridina – fluoresceína de sodio**

Las técnicas que involucran fluorocromos son ampliamente usadas y existen de varios tipos donde la fluorescencia puede ser directa o indirecta y usando diferentes tipos de fluorocromos, donde los que se intercalan entre las bases del ADN son los mas empleados<sup>33-36</sup>.

Esta técnica fue utilizada como prueba confirmatoria de la presencia de bacterias filamentosas y apreciar sus características morfológicas. Se realizaron modificaciones a la técnica descrita por fazzi<sup>33</sup>, donde se indica que se debe extender en un portaobjetos las estructuras bacterianas previamente fijadas y dejar secar a la intemperie, después cubrir con la solución de naranja de acridina por dos minutos después lavar con agua destilada, decolorar 10 segundos con alcohol-cetona; posteriormente agregar solución de fluoresceína y reposar por dos minutos después enjuagar con agua destilada y dejar secar a la intemperie para ser analizados en un microscopio de fluorescencia (American Optical Model 410 Flourescent Microscope).

### **Técnica para cultivo**

Las técnicas de cultivo bacteriano en el laboratorio clínico a partir de orina todavía están basadas en medios tradicionales como el agar sangre de carnero al 5%, el agar Mckonkey y el agar sal y manitol. Algunos laboratorios emplean medios especiales para uropatógenos como el agar CLED (por sus siglas en inglés *Cystine-lactose-electrolite deficient*) donde se pueden cultivar los principales uropatógenos; no obstante empleando aun estos medios se debe realizar una identificación bacteriana basada en pruebas bioquímicas que ayuden a identificar el género y especie de los patógenos urinarios<sup>37</sup>.

En los últimos 20 años se han desarrollado innovadores medios de cultivo bacteriano que permiten aislar e identificar los patógenos primarios y algunos secundarios sin la necesidad de medios adicionales, llamados medios cromogénicos que pueden ser utilizados como medio de rutina para urocultivos<sup>37</sup>.

La rápida identificación de los patógenos aislados en medios cromogénicos es debido a colores específicos de acuerdo al género bacteriano. Las cepas de *Escherichia coli* aparecen como colonias de color rosa-borgoña por la producción de beta glucoronidasa ( $\beta$ -GUR). Cepas productoras de  $\beta$ -GLU del grupo KESC (*Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* y *Citrobacter*) presentan colonias turquesa y los cocos gram-positivos como enterococos tienen colonias verdes. De color marrón

claro a la coloración marrón oscuro son colonias indicativas de *Proteus*. *Pseudomonas aeruginosa* presenta con un color gris metálico brillante que se debe principalmente a la producción de piocianina; colonias de color violeta y cocos gram-positivos concuerdan con *Streptococcus agalactiae*<sup>38</sup>. Los patógenos aislados con el medios de cultivo cromogénico fueron confirmados también por métodos convencionales.

Se aislaron las bacterias filamentosas de las muestras viables para el estudio como se menciona anteriormente con la metodología de Bioraptor. Se sembró el aislado depositando los 200µL y extendiéndolo con un asa calibrada de 1µL en una placa de agar cromogénico CPS ID4 chromID de Biomériux® por técnica de estría cruzada. Incubar en estufa por 24 horas a 37°C. Y se realizó la identificación de género y especie de acuerdo a indicaciones del fabricante.

### **Técnica de microscopía de barrido electrónico.**

La microscopía de barrido electrónico (MBE) es una de las técnicas más utilizadas para conocer los detalles de materiales y estructuras, debido a su relativa facilidad de ejecutar e interpretar porque los resultados se muestran como objetos tridimensionales<sup>39</sup>. Para poder visualizar a las bacterias, estas primero necesitan estar fijadas, deshidratadas y secas, ya que no se deben liberar sustancias volátiles en el proceso; además deben ser estructuras de poco tamaño (10 x 10mm y no mayor a 2mm de grosor). Los métodos de fijación serán determinados de acuerdo a la naturaleza de la muestra ya que presentan ventajas y desventajas entre sí, los principales agentes fijadores son formaldehído, glutaraldehído, metanol-etanol y tetraóxido de osmio<sup>39, 40</sup>.

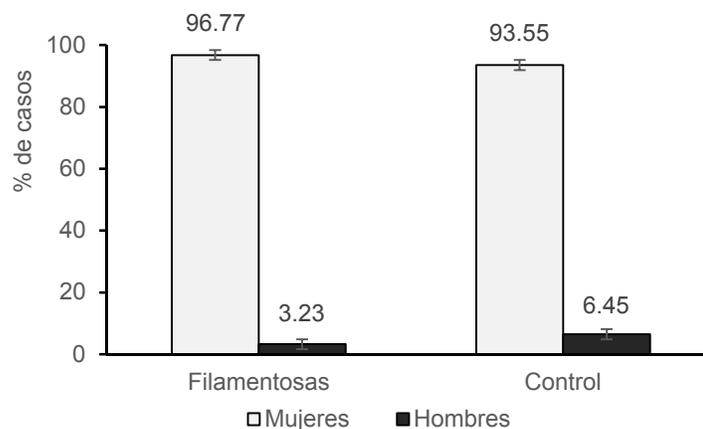
La técnica de fijación ejecutada para el análisis de las bacterias filamentosas para MBE se describe anteriormente, después de colocar 20 microlitros del sedimento resuspendido previamente fijado, en un portaobjetos (preliminarmente tratado para hacerlo libre de contaminantes), extendiéndolo por la superficie formando una capa delgada y dejar secar a la intemperie por 10 minutos.

Colocar las muestras con las bacterias filamentosas ya fijadas en un portaobjetos dentro del revestidor de bombardeo iónico manual (DENTON VACUUM, modelo DESK V) que recubrirá la superficie con una monocapa de oro tendrá un grosor de 6nm o grafito con un grosor de 2nm, después se empleó un microscopio óptico para identificar y marcar las bacterias filamentosas, finalmente se realizó la observación a detalle de las estructuras bacterianas utilizando el microscopio de barrido electrónico (JEOL, JSM—6610LV), donde se obtuvieron imágenes de 700 a 20000 x. Estos procesos fueron realizados con la colaboración del M.C. Eric Reyes Cervantes, investigador del Centro Universitario de Vinculación y Tecnología (CUVyT) de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

## RESULTADOS

Se analizaron 2153 muestras de orina, de las cuales se seleccionaron para el estudio 114 especímenes con bacteriuria de tres cruces. De este grupo se formaron dos subgrupos: el grupo filamentoso (GF) que presenta morfotipo con bacterias con longitud mayor a 50  $\mu\text{m}$  (n=31), y el subgrupo control (GC) con bacteriuria con morfotipo bacilar de tamaño promedio 2 - 3  $\mu\text{m}$  (n=31). La frecuencia del GF con respecto al universo total de trabajo (2153) es de 1.44%. Pero si el espécimen presenta bacteriuria mayor a tres cruces (n=114) la frecuencia del GF se incrementa al 27%.

**Gráfico 1. Frecuencia de observación morfotipo filamentosos vs. Género del paciente.**



El gráfico 1 muestra la frecuencia de casos por género en los grupos, GC (n=31) y GF (n=31). El (\*) indica diferencia significativa del GF vs GC para una  $p < 0.05$ .

En el gráfico 1 se observa que las mujeres se ven afectadas en proporción 30/1 en el GF y 15/1 en el GC con respecto a los varones, no obstante no existen diferencias significativas entre los grupos en el análisis estadístico realizado, sugiriendo que no existe una predilección por un género en especial entre pacientes con bacteriuria plantónica de este estudio.

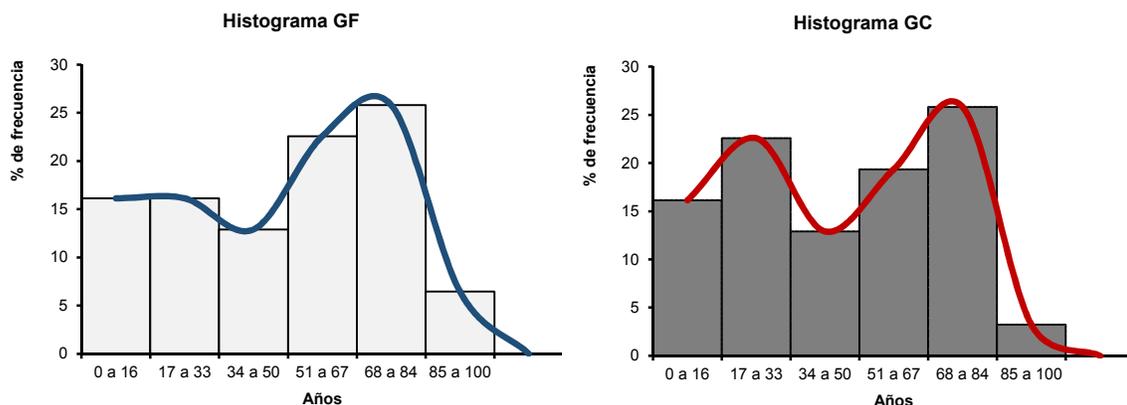
**Tabla 2. Estadística descriptiva para la edad en los grupos en estudio.**

EDAD	GF (n=31)	GC (n=31)
Media	50.2 ± 4.8	45.0 ± 4.6
Moda	68.0	27.0
Desviación estándar	26.5	25.9
Varianza de la muestra	699.7	669.0
Mínimo	5.0	2.0
Máximo	96.0	96.0

Se muestran en esta tabla los datos estadísticos descriptivos para la edad. El (\*) señala diferencia significativa del GF vs GC para una  $p < 0.05$ .

La tabla 2 muestra que las poblaciones tanto el GC como el GF son homogéneas, los valores de máximos y mínimos son muy similares entre los dos grupos y el análisis de comparación de media t de student en cuanto a edad no muestra diferencias significativas (T crítico 1.67, t calculado 0.78  $p > 0.05$ ); no obstante se observa que el valor más frecuente en el GF es 68 años, mientras que en el GC es 27 años.

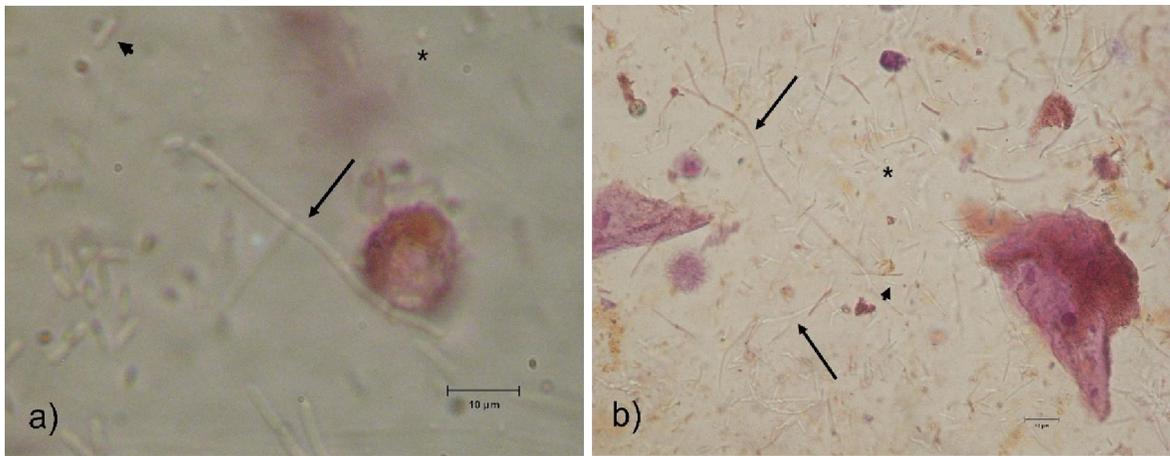
**Gráficos 2.1 y 2.2** Frecuencia de grupos etarios en los grupos analizados.



Los histogramas GF y GC muestran el comportamiento del porcentaje de frecuencia en la que se observan morfotipos filamentosos (GF) y el grupo control (GC) por grupo etario.

Aunque no existe diferencia significativa entre las medias poblacionales, la distribución histográfica de las poblaciones es diferente (gráficos 1.1 y 1.2), en el GC la distribución bimodal y el GF muestra una distribución asimétrica positiva y modas grupales diferentes.

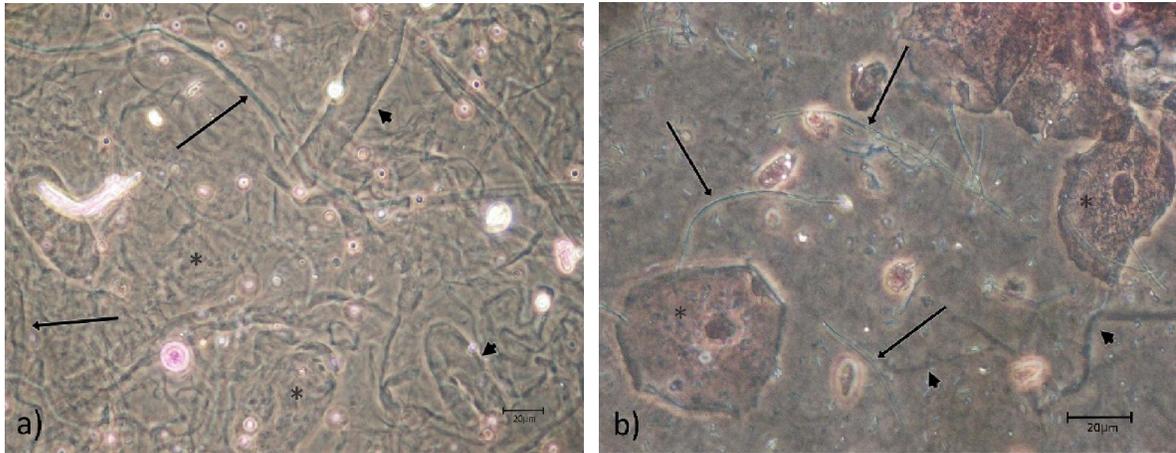
Utilizando microscopía óptica de campo claro y tinción Sternheimer-Malbin se utilizaron sedimentos con bacteriuria significativa y bacterias filamentosas mayores a  $50 \mu\text{m}^{26}$  (imágenes 1a y b), como siguiente paso fue demostrar que las bacterias con esta longitud se tratasen de una unidad microbiana como se describe en el modelo murino y estudios en humanos <sup>5, 26</sup>.



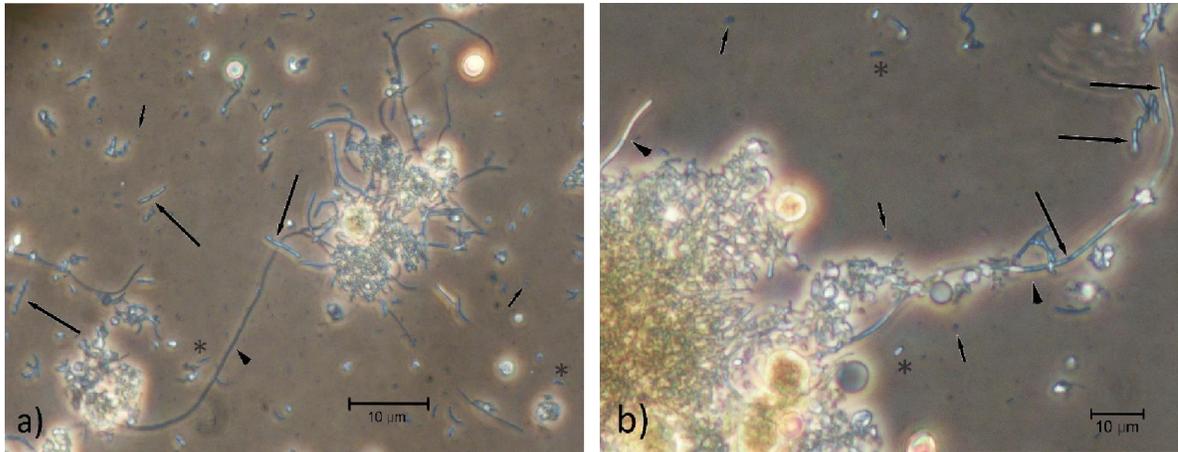
**Imágenes 1 a y b.** Microfotografías de sedimento urinario realizadas en microscopía óptica de campo claro y tinción Sternheimer-Malbin donde se observa el polimorfismo bacteriano, **a)** la flecha larga señala una bacteria con morfotipo en filamentación de  $48 \mu\text{m}$ , la flecha corta señala un morfotipo bacilar de  $5 \mu\text{m}$  y el asterisco un morfotipo cocoide de  $1 \mu\text{m}$  aproximadamente, imagen tomada a  $500\times$  **b)** la flecha larga señala una bacteria con morfotipo en filamentación de  $75 \mu\text{m}$  (parte superior de la imagen) y otra de  $55 \mu\text{m}$  aproximadamente (parte inferior de la imagen), la flecha corta señala un morfotipo bacilar de  $2 \mu\text{m}$  y el asterisco un morfotipo cocoide de  $1.5 \mu\text{m}$  aproximadamente, imagen tomada a  $60\times$ .

La microscopía de contraste de fases que recomienda la guía europea de uroanálisis, también puede ser de utilidad en la identificación del morfotipo

filamentoso. Este tipo de microscopia fue empleado para el aislamiento de las bacterias filamentosas debido a que se puede observarlas sin la necesidad de colorantes que pudieran afectar de alguna manera la viabilidad de la bacteria (imágenes 2 y 3).

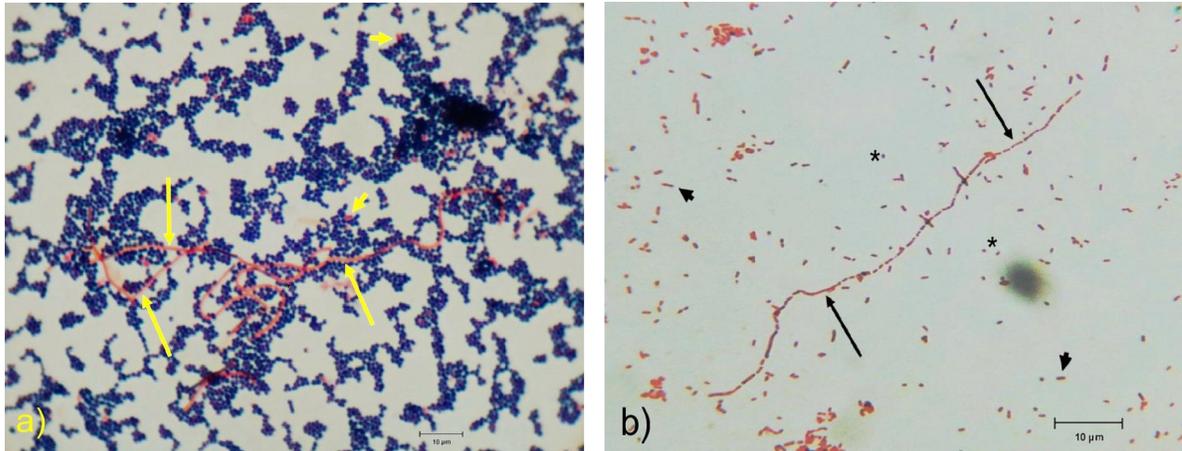


**Imágenes 2a y 2b.** Microfotografías de sedimento urinario por microscopia óptica de contraste de fases y tinción Sternheimer-Malbin. a) Las flechas largas señalan filamentos de mucina y las flechas cortas señalan cilindros hialinos tipo 1, el asterisco señala el estado geloide de la mucina, imagen tomada a 400x. b) las flechas largas señalan bacterias con morfotipo filamentoso de 85  $\mu\text{m}$  en la parte superior y de 62  $\mu\text{m}$  en la zona central y 53  $\mu\text{m}$  en la zona inferior de la imagen, el asterisco señala epitelio uretral y la flecha corta señala filamentos de mucina y el asterisco señala epitelio uretral, imagen tomada a 800x.



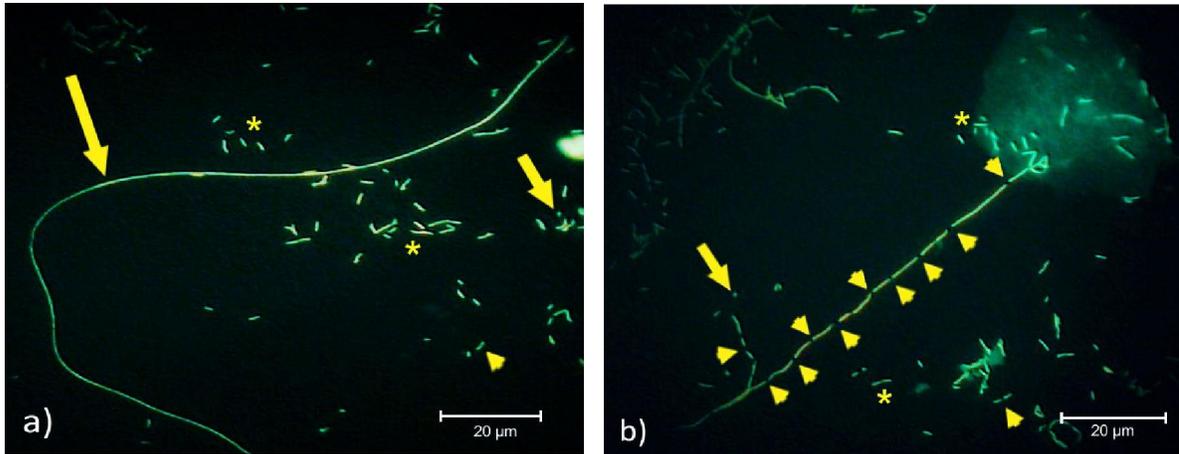
**Imágenes 3a y 3b.** Microfotografía de sedimento urinario por microscopía óptica de contraste de fases y tinción Sternheimer-Malbin. a) Las flechas largas señalan zonas de división celular, las flechas señalan una bacteria filamentosa de 56  $\mu\text{m}$  de longitud, el asterisco señala bacterias con morfotipo bacilar de 2  $\mu\text{m}$  y las flechas cortas señalan morfotipo cocoide de 1 micra aproximadamente, imagen tomada a 400x. b) La cabeza de flecha señala una bacteria filamentosa de 86  $\mu\text{m}$  de longitud aproximadamente, que está en procesos de segmentación (zona central), y un segmento de bacteria filamentosa de 16  $\mu\text{m}$  aproximadamente (parta superior izquierda), las flechas largas señalan las zonas de división bacteriana, el asterisco señala bacterias con morfotipo bacilar de 2  $\mu\text{m}$  y las flechas cortas señalan morfotipo cocoide de 1 micra aproximadamente, imagen tomada a 600x.

En el desarrollo de la cascada uropatogénica se ha descrito la expresión de la plasticidad morfológica que origina morfotipos bacterianos, que logran invadir intracelularmente el uroepitelio, se han descrito morfotipos cocoides, bacilares, filamentosos asociados a comunidades intracelulares bacterianas, todo esto como mecanismo de adaptación y supervivencia de los uropatógenos. El desarrollo de tinción de Gram fue empleada para diferenciar la variedad de morfotipos en cuanto a tamaño, forma, agrupación y características tintoriales de los patógenos más comúnmente aislados tanto Gram negativos y Gram positivos. Además de evidenciar las características de monomicrobiana o polimicrobiana de las ITUs (imágenes 4a y 4b).



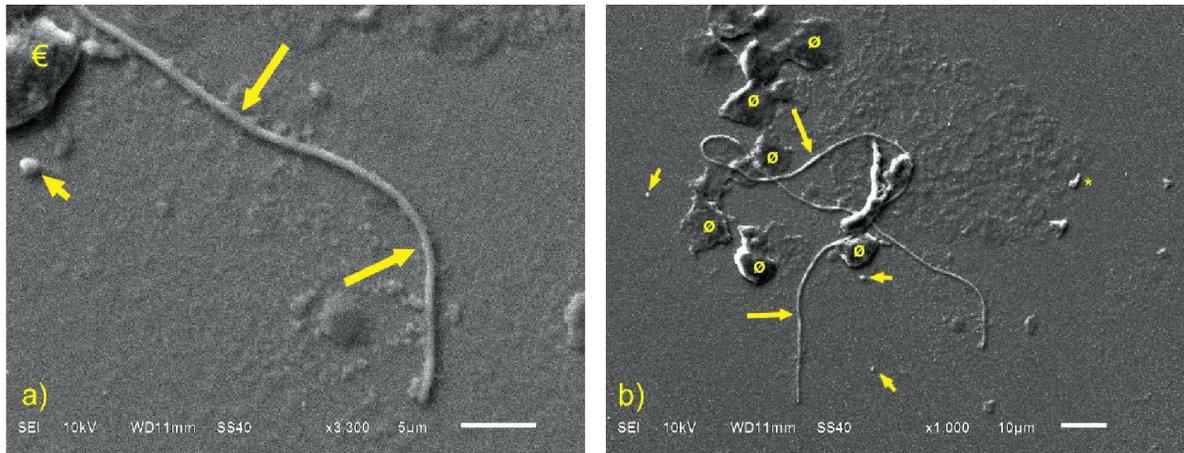
**Imágenes 4a y 4b.** Microfotografías de sedimento urinario realizadas en microscopía óptica de campo claro con tinción de Gram. a) la flecha larga señala el polimorfismo bacteriano Gram negativo con morfotipo filamentosos de 52, 71 y 133  $\mu\text{m}$  de longitud aproximadamente, la flecha corta señala morfotipos bacilares de 1 - 2  $\mu\text{m}$  de longitud, también se observa una gran cantidad de cocos Gram positivos, sugerentes de ITU polimicrobiana, imagen tomada a 400x. b) las flechas largas señalan una bacteria Gram negativa con morfotipo filamentosos de 102  $\mu\text{m}$  de longitud en proceso septación, las flechas cortas señalan bacterias con morfotipo bacilar de 2  $\mu\text{m}$  de longitud y los asteriscos señalan morfotipos coco-bacilares de 1  $\mu\text{m}$  (arriba) y 1.5  $\mu\text{m}$  (centro), imagen tomada a 500x.

La microscopía de fluorescencia con tinción de naranja de acridina - fluoresceína revela las formas filamentosas de manera muy eficiente. Esto es debido a que son fluorocromos similares al bromuro de etidio, 4,6-diamidina-2-fenilindol (DAPI), entre otros se visualiza el material cromosómico bacteriano (ácido desoxirribonucleico y el ácido ribonucleico) usando un microscopio de fluorescencia<sup>33-36</sup>. Fazi y colaboradores en el 2002 desarrollaron un método de coloración de fluorescencia para la diferenciación entre bacterias Gram positivas y Gram negativas, basada en el uso de naranja de acridina y fluoresceína de sodio que origina el sistema rojo/verde<sup>33</sup> (imágenes 5a y 5b).

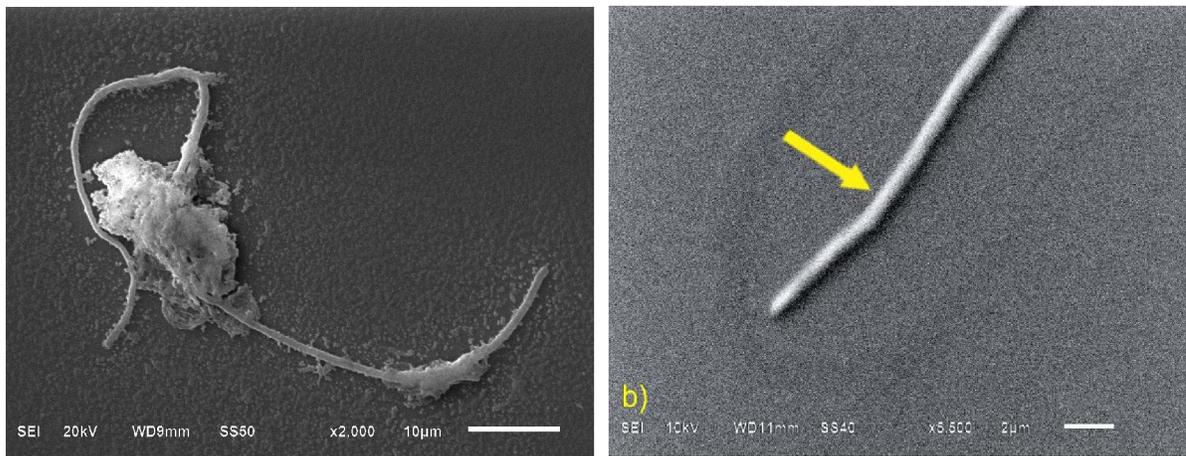


**Imágenes 5a y 5b.** Microfotografías de sedimento urinario realizadas en microscopía de fluorescencia con tinción de naranja de acridina - fluoresceína. a) La flecha larga señala una bacteria con morfotipo filamentosos de 209  $\mu\text{m}$  de longitud aproximadamente, la cabeza de flecha señala zonas de septación bacteriana, el asterisco señala bacterias con morfotipo bacilar de 2  $\mu\text{m}$  de longitud y la flecha corta señala un morfotipo cocoide de 2  $\mu\text{m}$  de longitud, imagen tomada a 800x. b) Se observa una bacteria filamentosos de 74  $\mu\text{m}$  de longitud con múltiples zonas de segmentación (cabezas de flecha), el asterisco señala bacterias con morfotipo bacilar de 2  $\mu\text{m}$  de longitud y la flecha corta señala un morfotipo cocoide de 1  $\mu\text{m}$  de longitud, imagen tomada a 800x.

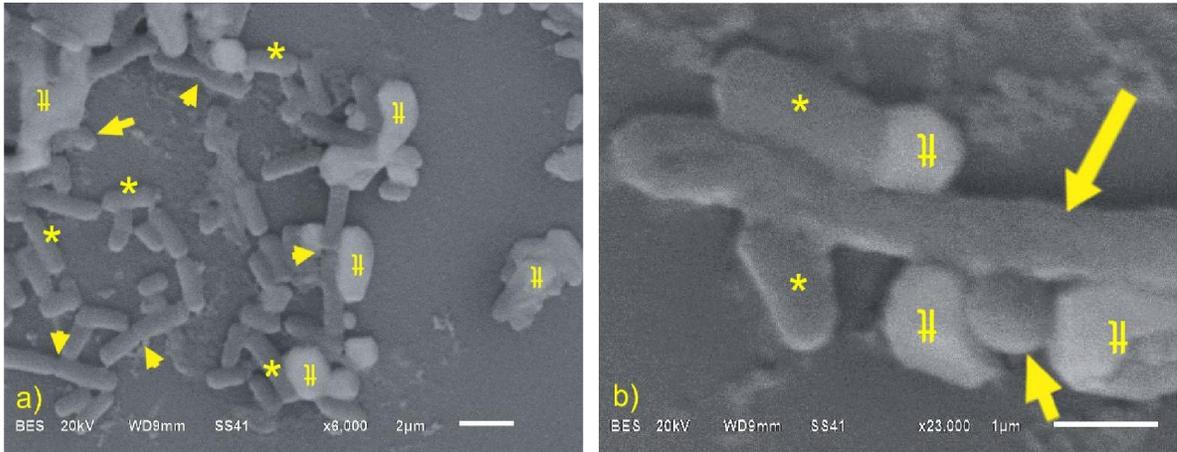
La microscopía de barrido electrónico (MBE) posibilita conocer con mayor detalle la morfología superficial. De la interacción entre los electrones incidentes con los átomos que componen la muestra se generan señales, las cuales pueden ser captadas con detectores específicos para cada una de ellas. Con esta imagen superficial se pueden tener aumentos de la estructura bacteriana de hasta 23,000 aumentos, pudiendo así observar si existen discontinuidades en la membrana indicativas de septos o es una sola estructura bacteriana.



**Imágenes 6a y 6b.** Microfotografías de barrido electrónico de sedimento urinario, a) la flecha larga señala filamentación bacteriana de 68  $\mu\text{m}$  de longitud, la flecha corta señala un morfotipo cocoide de 1.5  $\mu\text{m}$  y el símbolo € señala un fragmento de epitelio uretral, imagen a 3,300x. b) la flecha larga señala filamentación bacteriana de 277  $\mu\text{m}$  de longitud, la flecha corta señala morfotipos cocoides de 1.5  $\mu\text{m}$ , el asterisco morfotipo bacilar de 2.5  $\mu\text{m}$  y el símbolo ø señala leucocitos, imagen a 1000x.

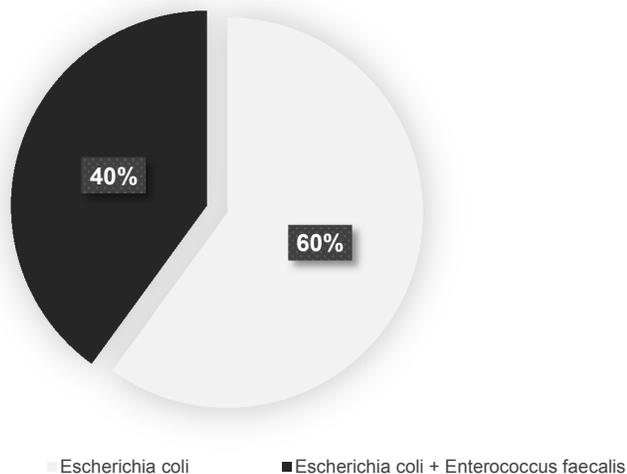


**Imágenes 7a y 7b.** Microfotografías de barrido electrónico de sedimento urinario, a) la flecha larga señala una bacteria filamentosa de 100  $\mu\text{m}$  de longitud, imagen a 2000x. b) la flecha larga señala un fragmento de filamentación bacteriana de 19  $\mu\text{m}$  de longitud, imagen a 5,500x. En ambas microfotografías se observa la continuidad de las estructuras filamentosas bacterianas ante la ausencia de septos.



**Imágenes 8a y 8b.** Microfotografías de barrido electrónico de sedimento urinario, a) la flecha corta señala un morfotipo cocoide de 0.85  $\mu\text{m}$ , el asterisco señala morfotipos bacilares de longitudes variables, la cabeza de flecha señala zonas de formación de septos indicativo de división bacteriana y el símbolo ft señala detritos urinarios (probablemente sales de precipitación), imagen a 6,000x. b) la flecha larga señala un fragmento de morfotipo filamentoso, la flecha corta señala un morfotipo cocoide de 0.75  $\mu\text{m}$ , el asterisco señala morfotipos bacilares de 1.3 a 1.7  $\mu\text{m}$  y el símbolo ft señala detritos urinarios (probablemente sales de precipitación), imagen a 23,000x.

**Gráfico 3.** Agentes etiológicos aislados de bacterias filamentosas en los grupos en estudio.

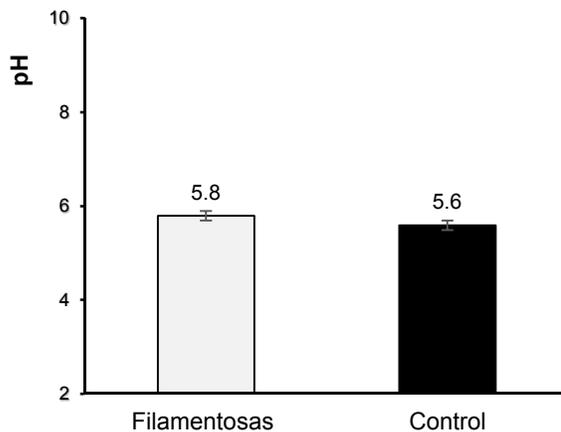


En el gráfico 3 se muestra la distribución porcentual de los agentes etiológicos aislados de los sedimentos donde se observaron los morfotipos filamentosos, siendo el género predominante *Escherichia coli*, no obstante *Enterococcus faecalis* estuvo presente en casi la mitad de los cultivos pero con una menor cantidad de unidades formadoras de colonias que *E. coli*.

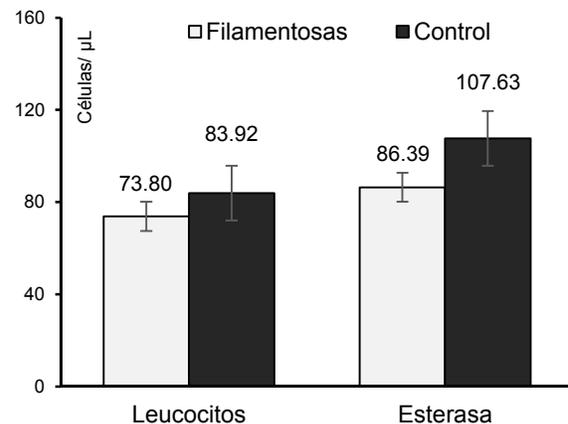
De las bacterias con morfotipo filamentosas aisladas del sedimento urinario el agente etiológico identificado es *Escherichia coli* en el 100% de las muestras; no obstante en el 40% de los casos se obtuvo un cultivo mixto de *E. coli* con *Enterococcus faecalis* (Gráfico 3), a pesar de los aislamientos con Bioraptor la especie predominante por número de colonias fue *E. coli* pero existían escasas colonias de *E. faecalis*.

La respuesta inmune innata en el tracto urinario que podemos medir en el examen general de orina involucra principalmente el pH, la presencia de fagocitos y esterasa leucocitaria, la proteína de Tamms-Horfall, y la presencia de células de distintas partes del tracto urinario. La presencia de nitritos en orina y en ocasiones los hematíes son utilizados como indicadores de infección de tracto urinario que se basan en características del metabolismo bacteriano<sup>4</sup>.

**Gráfico 4.** pH urinario en los grupos analizados.



**Gráfico 5.** Leucocitos y esterasa leucocitaria entre los grupos analizados.



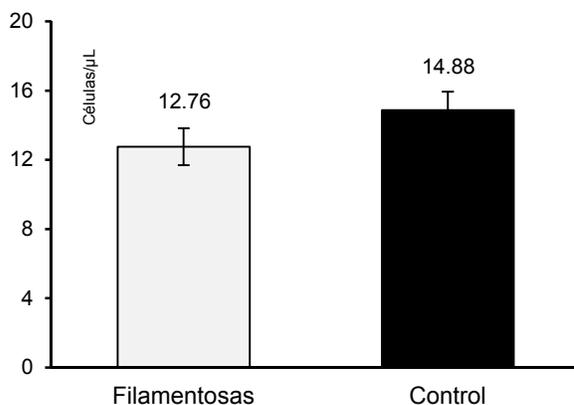
Los gráficos 4 y 5 muestran la comparación de medias para la variable pH, esterasa y leucocitos para los grupos, GC (n=31) y GF (n=31). El (\*) indica diferencia significativa del GF vs. GC para una  $p < 0.05$ .

El estudio se realizó con tira reactiva para medir el pH y la esterasa leucocitaria en el equipo automatizado iRICELL®2000 de Beckman Coulter®, después del análisis estadístico de medias por t de student observamos que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los grupos analizados.

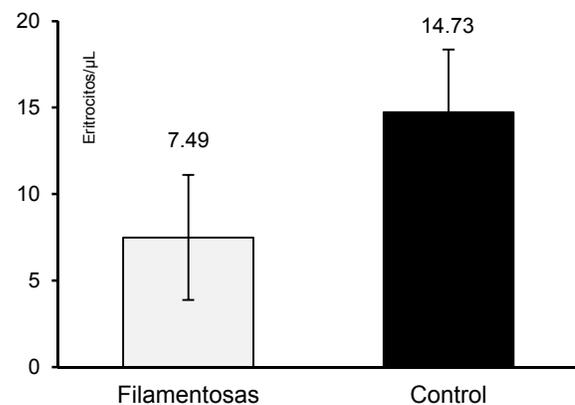
Primero, analizando la variable pH (Estadístico  $t=0.67$ , T crítico= $2.00$ ,  $p > 0.05$ ) (Gráfico 4), observamos que la tendencia entre los grupos es similar con lo que inferimos que el pH no es un inductor de la filamentación y aparentemente no hay relación entre el pH y este fenómeno.

Respecto al análisis de los leucocitos y la esterasa leucocitaria, no se encontró diferencia significativa entre la bacteriuria con células filamentosas y con bacilares planctónicas (Leucocitos: estadístico  $t= 0.04$ , valor t crítico= $1.99$ ,  $p > 0.05$ ) (Esterasa: estadístico  $t=0.071$ , valor t crítico=  $2.01$ ,  $p > 0.05$ ) (ver gráfico 5). En cuanto a las células presentes en los grupos analizados, las medias fueron muy similares, por lo que en el análisis no hubo diferencias estadísticamente significativas (Estadístico  $t= 0.82$ , valor crítico  $t= 2.00$ ,  $p > 0.05$ ) (ver gráfico 6).

**Gráfico 6.** Células uroepiteliales en los grupos analizados.



**Gráfico 7.** Eritrocituria en los grupos en estudio



Los gráficos 5 y 6 muestran la comparación de medias para las variables de células epiteliales y eritrocitos presentes en el sedimento de los grupos, GC (n=31) y GF (n=31). El (\*) indica diferencia significativa del GF vs GC para una  $p < 0.05$ .

## DISCUSION DE RESULTADOS

La comprensión del mecanismo infeccioso de UPEC ha crecido considerablemente desde los primeros informes que detallaban las diferentes etapas en el proceso infeccioso observado en modelos murinos de ITU<sup>7, 19</sup>. UPEC ha sido un modelo bacteriano utilizado para demostrar el complejo mecanismo de infección vesical, que comienza con la adherencia e invasión de las células uroteliales de la vejiga, posteriormente las bacterias se replican intracelularmente para formar comunidades intracelulares densas de bacterias cocoides, clasificados como CBI's<sup>5,7,13,17,41</sup>. El modelo propone que una subpoblación dentro de estas tienen un proceso de maduración para formar filamentos que fluyen fuera de la célula urotelial infectada, y posteriormente a través de la filamentación reversa se producen bacterias bacilares que tienen el potencial para reiniciar un nuevo ciclo de infección<sup>26,28,41</sup>. Cabe mencionar que no existen modelos de cómo sucede el mecanismo de infección en la uretra, siendo la celularidad predominante observada en el sedimento urinario, en este estudio fueron identificados fenómenos similares a los descritos en urotelio como adhesión bacteriana, CBI's y bacterias filamentosas, sugiriendo que el mecanismo en este tejido sucede de manera muy parecida.

Utilizando microscopia de campo claro para el primer reconocimiento (100x), de contraste de fases y fluorescencia para visualizar con detalle la septación bacteriana (1,000x) y la microscopia de barrido electrónico para los ultradetalles (33,000x), se logra observar, aislar y medir bacterias con morfotipo filamentosos mayor a 50  $\mu\text{m}$ .

El hallazgo de bacteriuria significativa en conjunto con cilindros leucocitarios (característicos de pielonefritis), leucocitos activos, (individuales o agrupados) y la positividad a nitritos son usados como marcadores clásicos de ITUs en todas sus formas<sup>42-44</sup>. Recientemente se han descrito diversos morfotipos bacterianos implicados en el desarrollo de la cascada uropatogénica<sup>5,7,8, 24,26</sup>. La guía europea de uroanálisis (6.2.2.1) establece el análisis microscópico de campo claro y tinción supravital (Sternheimer-Malbin) para el reconocimiento inicial de estos marcadores<sup>9</sup>.

La tinción de Sternheimer-Malbin es una herramienta de diagnóstico en el sedimento urinario, tanto para el reconocimiento de la celularidad encontrada<sup>45</sup> como para diversas patologías urinarias<sup>46-48</sup>. Utilizando esta tinción se pudo reconocer en microscopía de campo claro los morfotipos filamentosos (imagen 1b) presentes en la orina de la población estudiada, encontrando morfotipos de hasta 345.7  $\mu\text{m}$  (imagen 1 anexo 2); diferenciar células uroepiteliales (gráfica 6), respuesta leucocitaria (gráfica 5) y hematuria (gráfica 7). Por lo que el uso de esta tinción es muy útil en el diagnóstico inicial de los morfotipos asociados a la cascada uropatogénica, la respuesta inmune y el comportamiento de uroepitelio encontrado en los pacientes con ITU's.

El uso de microscopia de contraste de fases mejora la observación del sedimento urinario<sup>47</sup>. En este trabajo se pudo reconocer el morfotipo filamentosos (figura 2b) presente y diferenciarlo de los filamentos de mucina y cilindros urinarios (figura 2a), fibras o espermias en el sedimento urinario<sup>49-51</sup>. Se reconocieron los morfotipos bacterianos bacilares, cocoides (Imagen 3a) y los morfotipos filamentosos en el proceso de reversibilidad a morfotipo bacilar (imagen 3b); fenómeno que ha sido descrito para UPEC<sup>52, 53</sup>. Con esta microscopia se pudo semicuantificar la leucocituria (gráfico 5) distinguir la ausencia o presencia de bacteriuria significativa, la presencia de uroepitelio (gráfico 6), elementos importantes en el diagnóstico de cistitis<sup>54</sup>. No obstante la microscopia óptica podría ser equiparable si se realiza el análisis de sedimento con colorante Sternheimer-Malbin, por personal capacitado.

La tinción de Gram es una de las técnicas más empleadas mundialmente en la observación microscópica de estructuras bacterianas y desde su introducción ha sido solo ligeramente modificada<sup>55, 56</sup>. Se pudo diferenciar mediante esta técnica de tinción las características de membrana de los uropatógenos aislados, encontrando que de los especímenes con filamentación el 100% de los casos fue Gram negativo (*Escherichia coli*), y que los sedimentos contenían también bacterias Gram positivas en el 40% de los casos (gráfico 2). La filamentación de *Escherichia coli* aislada es una característica de plasticidad morfológica descrita para UPEC como un mecanismo de resistencia a la fagocitosis<sup>7, 25</sup> y como parte importante en el

desarrollo de comunidades intracelulares bacterianas (CIBs)<sup>26, 57</sup>. Se reconocieron y midieron morfotipos filamentosos con promedio de 153  $\mu\text{m}$  (Imagen 4a), dimensiones mayores a las descritas de 50 a 70  $\mu\text{m}$  como parte de la cascada uropatogénica<sup>7, 17</sup>. Y se identificó que el morfotipo cocoide Gram positivo en asociación con *E. Coli* que puede originar procesos infecciosos polimicrobianos que resultó corresponder a *Enterococcus faecalis*<sup>58, 59</sup> (figura 4a). También por esta técnica de tinción se puede observar la variación morfológica de la bacteria aunque con poco detalle, tanto el morfotipo filamentosos (imagen 4a) y posteriormente la filamentación reversa (figura 4b)<sup>5, 7, 9, 19</sup>. Estos datos sugieren que esta plasticidad morfológica es utilizada como estrategia sólo por Gram negativos (*E. coli*) y que los Gram positivos (*E. faecalis*) son participantes importantes en la colonización pero no a través de modificaciones en la expresión de morfotipos<sup>25, 26</sup>.

Mientras que algunas de las ventajas conferidas por la plasticidad morfológica de UPEC ya ha sido reconocida, los mecanismos precisos detrás de estos fenómenos no han sido descubiertos en su totalidad. Se han usado con anterioridad anticuerpos dirigidos al inhibidor Sul A y analizados en microscopio de fluorescencia, evidenciándose el mismo morfotipo filamentosos que el encontrado en este estudio<sup>60</sup>. No obstante se empleó una técnica de fluorescencia para observación de la continuidad bacteriana a través de cromógenos que brillan en presencia de ácidos nucleicos. Según los autores<sup>33</sup>, el decolorante (alcohol-cetona) desestabiliza la membrana externa de las bacterias Gram negativas, removiendo parcialmente el naranja de acridina; de tal forma que al incorporar la fluoresceína, se produce un efecto de coloración diferencial, donde las bacterias Gram positivas se tiñen de verde y las Gram negativas de naranja-rojo. De esta manera se pueden observar las características morfológicas bacterianas ya que resaltan sobre un fondo oscuro y obtener detalles que ayudan a identificar el microorganismo involucrado. En los sedimentos, por medio de esta técnica, pudimos observar con mayor detalle el fenómeno de filamentación reversa, donde bacterias bacilares de diferentes longitudes se desprenden de la filamentosos como se ha descrito en otras publicaciones realizadas en modelos murinos<sup>60, 61</sup>.

La microscopía de barrido electrónico da la mejor resolución de las bacterias filamentosas respecto a otras técnicas de microscopía utilizadas en este análisis<sup>60</sup>. Las bacterias analizadas por microscopía de barrido electrónico (MBE) pueden ser reproducidas como objetos tridimensionales en varios ambientes muy cercanos a su apariencia natural pero deben tenerse consideraciones muy rigurosas en la preparación de los especímenes<sup>39, 40</sup>. Los hallazgos en las muestras analizadas con MBE confirman el polimorfismo bacteriano en el sedimento urinario, se comprobó al observar filamentos continuos mayores a 70 micras de longitud (imagen 5a y 6b), valor que ha sido reportado como referencia para considerar una bacteria con morfotipo filamentosos<sup>26</sup>. De igual manera se observan variaciones en el tamaño de los bacilos observados e incluso formas cocoides, lo que apoya la tesis de que la variación morfológica está relacionada con la supervivencia en el tracto urinario<sup>25</sup>. La transición cíclica entre el morfotipo bacilar a cocoide a filamentosos proporciona un marco de referencia sustentable para explicar la alta tasa de reincidencia en pacientes con ITU.

Los resultados del cultivo bacteriano de las orinas con morfotipos filamentosos concuerdan con los encontrados previamente en modelos murinos<sup>7</sup> y en pacientes con ITU<sup>60</sup>. Estos hallazgos son semejantes con los reportados en Estados Unidos por Foxman<sup>12</sup>, Justice y colaboradores<sup>62</sup>, además del grupo de Hultgren<sup>41</sup>, y en México por Salinas y colaboradores, donde *Escherichia coli* es el patógeno más frecuentemente aislado de pacientes con ITUs<sup>31</sup>. Además de *Escherichia coli* se aisló otro patógeno: *Enterococcus faecalis*; que según Horsley y cols., en el 2013 se aísla de casos de ITU no complicadas<sup>59</sup>. Si bien ya está demostrado que *Escherichia coli* es capaz de adherirse a las células uroteliales, invadirlas y escapar expresando el morfotipo filamentosos<sup>5, 7, 19, 60</sup>; *Enterococcus faecalis* no era un patógeno que se espera aislar, ya que no se ha demostrado a la fecha la expresión de variaciones morfológicas filamentosas. No se han reportado artículos que indiquen una asociación tendencial entre estos dos patógenos, sin embargo en 2013 se demuestra *in vitro* la capacidad de *Enterococcus faecalis* para invadir células de carcinoma vesical humano T24 transformadas<sup>59</sup>, además se encontraron la

presencia de *Enterococcus faecalis* dentro de las células uroteliales de pacientes que manifestaban síntomas de ITU<sup>59</sup>. En el modelo murino en el que se estudia a *Enterococcus faecalis* se ha demostrado que puede colonizar el tracto urinario y persistir en los riñones, no obstante también se ha descrito que es rápidamente eliminado del tracto urinario sin aparente inflamación; sugiriendo que no puede adherirse a las células<sup>63</sup>. Con esta evidencia podríamos considerar que las cepas aisladas en este estudio de *Enterococcus faecalis* no son contaminación y su hallazgo es más significativo. Ha sido estimado que el 20% de mujeres que presentan síntomas de ITU tienen cultivos negativos; éstos se consideran así ya sea porque no hubo crecimiento de bacterias, se aislaron más de dos microorganismos que no son considerados patógenos primarios, o el conteo de bacterias aisladas no es igual o mayor a las reglas establecidas<sup>58, 64, 65</sup>. Por lo que en general las infecciones polimicrobianas son subestimadas todavía en los laboratorios de rutina a pesar de la evidencia que señala una compleja interacción entre bacterias y hospederos<sup>58, -62</sup>. Por lo que es necesario considerar analizar el modelo de infección de *Enterococcus faecalis* en tracto urinario para determinar si existe sinergismo con *Escherichia coli* (como ya se ha demostrado con otras especies) o sean estrategias de colonización independientes entre sí<sup>66, 67</sup>.

Aunque no es totalmente claro cuáles son los factores específicos que actúan como inductores de la filamentación de *Escherichia coli* observada durante la ITU; están descritos como inductores de filamentación en otros microorganismos la baja actividad del agua y la interacción con macrófagos<sup>68, 69</sup>. No obstante se ha demostrado por Klein que las altas concentraciones de sales urinarias no provocan la filamentación de UPEC<sup>61</sup>, aún es necesario estudiar otros posibles inductores.

Se ha descrito el pH urinario como protector de la colonización e infección del tracto urogenital por UPEC, mediante la inhibición de crecimiento, induciendo estrés y regulación negativa de proteínas críticas para la adherencia al huésped<sup>4, 70</sup>. En este estudio el análisis estadístico sugiere que el pH no es inductor de la filamentación bacteriana al no encontrar diferencias significativas entre el morfotipo bacilar y el filamentoso. Mientras que investigaciones recientes encontraron que cambios en el

pH son capaces de inducir la respuesta SOS por hidrolisis del represor<sup>71</sup> no obstante son limitadas las publicaciones que analizan el pH como variable en estudios de ITU's y la cascada uropatogénica por UPEC. En 2015 Hultgren y cols., describen que el pH puede ser un inhibidor de la expresión de pili tipo 1, pero reconocen que se necesitan más estudios para determinar cuáles son los mecanismos que inhiben la expresión de adhesinas, que son cruciales para el proceso patogénico<sup>72</sup>.

Los receptores TLR4 activan la secreción de IL-6 e IL-8 en urotelio responsables de la quimioatracción de fagocitos, estos receptores detectan la fracción lipídica del lipopolisacárido (LPS) presente en las bacterias Gram negativas como UPEC, esta molécula es similar entre bacterias con morfotipo filamentoso y bacilar por lo que la quimioatracción es igual en un morfotipo que en otro <sup>27, 73</sup>, siendo esto manifestado en los resultados de este estudio (gráfico 5). Estos hallazgos sugieren que la filamentación bacteriana no está necesariamente asociada a la agresión por polimorfonucleares.

En este estudio se analizaron también la cantidad de células epiteliales en el sedimento, encontrando que es muy similar en ambos grupos, y no se hallaron diferencias significativas entre ellos. Se ha descrito por Wachtler y colaboradores en 2001, que al haber una infección, la severidad de ésta será directamente proporcional a la expresión y señalización de TLR's; es decir la tasa de exfoliación celular en un proceso de invasión bacteriana será correspondiente con la activación de los receptores TLR<sup>73, 78</sup>. El principal receptor en este proceso es TLR4 que es activado por el LPS<sup>73, 78</sup>, por lo no habría motivos para que hubiera una mayor respuesta inmune que induzca exfoliación celular. Hultgren y colaboradores en 2008 describen que distintas cepas pueden tratar de colonizar el tracto urinario en un solo inóculo, no obstante sólo una cepa bacteriana será capaz de superar todos los obstáculos que representa la respuesta inmune y a través de los factores de virulencia que posea conseguirá instalarse en el tracto del hospedero<sup>9</sup>. Justice y col. previamente sugirieron que SulA podría ser el responsable del proceso de filamentación de UPEC en un huésped inmunocompetente, que tenga la capacidad de montar una respuesta inmune que induzca respuesta bacteriana tipo SOS<sup>26</sup>. Esta

evidencia inductora de filamentación mediada por SulA, bajo el ataque de las células inmunes fagocíticas, también ha sido descrita en otros patógenos, como *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*, *Helicobacter pylori*, y *Acinetobacter baumannii*<sup>79-82</sup>. No obstante nuevos modelos experimentales usando cámara de flujo<sup>52, 61</sup>, no observan defectos en la cepa UTI89  $\Delta$ SulA, lo que sugiere que esta proteína no es responsable de la filamentación observada durante la colonización superficial secundaria *in vitro*. Entre las cepas mutantes probadas utilizando video microscopia, la cepa UTI89  $\Delta$ damX era la única que mostraba ausencia de filamentación, así como defectos en la colonización secundaria de las células de urotelio vesical<sup>52</sup>. No obstante no es descartable que el reclutamiento y la interacción con los neutrófilos contribuyan de alguna manera la inducción de la filamentación *in vivo* de UPEC. De manera análoga es necesario que se realicen estudios posteriores dedicados a demostrar las diferencias o similitudes de las moléculas antigénicas de los morfotipos bacilares y filamentosos para esclarecer esta cuestión.

La hematuria es un signo que puede involucrar muchos procesos: glomerulares, renales no glomerulares y urológicos, se puede diferenciar de donde proviene la hematuria según la morfología eritrocitaria en el sedimento, aunque no la hemoglobinuria<sup>58</sup>. Los grupos estudiados mostraron eritrocituria normórfica y en el análisis estadístico no se encontró diferencias significativas para esta variable (gráfico 7). Con esto se puede inferir que las bacterias filamentosas no inducen mayor hematuria en comparación a las bacterias planctónicas. Pero la hemoglobina podría ser una fuente constante de hierro, que es un recurso escaso y muy valioso en los procesos infecciosos, en especial en el tracto urinario los uropatógenos como UPEC tienen numerosos sistemas de recaptura y hemolisinas que la ayudan a obtener este metal<sup>59, 83</sup>, no obstante parece que las bacterias con morfotipo filamentosos capturan este mineral libre del medio urinario antes que provocar hematuria para conseguirlo, aunque se desconoce aún si es porque es más eficiente su captura debido a su mayor superficie o porque no posee los factores de virulencia que le permitan provocar hematuria<sup>83</sup>.

El tamaño y morfología de las bacterias filamentosas tienen alta similitud con las que han sido observadas por Rosen, Justice y Hultgren en muestras de orina con presencia de UPEC en humanos y también en el modelo murino<sup>5, 7, 18, 24, 60</sup>.

Aunque no es de manera definitiva, el hallazgo de bacterias filamentosas de los sedimentos por medio de los diferentes tipos de microscopía que se emplearon, sugieren que los mecanismos de patogénesis en el tracto urinario de pacientes ambulatorios con bacteriuria significativa y los modelos de ITU murinos ocurren de manera muy similar, donde las bacterias que expresan el morfotipo filamentosos son fundamentales para la exitosa colonización.

Todo esto apoya la teoría de que UPEC puede adoptar más de una estrategia para alcanzar una morfología filamentosas, provocada por una respuesta de estrés SOS durante un ataque inmunológico, así como una inducción mediada por DamX en paralelo, provocada por las condiciones de crecimiento fisicoquímicas e hidrodinámicas generales presentes en la vejiga<sup>52, 84</sup>.

A pesar de los esfuerzos de distintas instituciones especializadas en el análisis de la orina y en general de urología; la efectividad de los diagnósticos y tratamientos son muy inespecíficos y sus daños colaterales llegan a superar sus beneficios. La tasa de reincidencia en pacientes que presentan ITU no complicada es considerable siendo reflejo del poco éxito terapéutico.

Las guías actuales como la de la Asociación Europea de Urología consideran determinantes a las características del agente causal, enfatizando en su caracterización y sus patrones de susceptibilidad a antibióticos, mencionando que se debe analizar la virulencia del patógeno, no obstante no ofrece pautas o indicadores que puedan medirse para evaluar dicha virulencia.

Los análisis de identificación de genes que codifican para factores de virulencia son en ocasiones costosos y no necesariamente implica que la posesión de tales genes resulte en su expresión o que las proteínas resultantes tengan una función real dentro del mecanismo de infección.

Esto sumado a la falta de un patrón molecular específico que caracterice a un uropatógeno, inclusive en el caso de UPEC donde no es posible realizar una definición precisa sobre cuál o cuáles son los factores de virulencia de una cepa uropatógena<sup>4</sup>. Algunos estudios señalan la prevalencia de algunos grupos filogenéticos y serotipos más frecuentemente encontrados en los pacientes con ITU, pero no son específicos para cepas de *E. coli* capaces de colonizar tracto urinario.

Una situación similar ocurre con las variaciones morfológicas, que si bien están descritas en cepas capaces de producir ITU en pacientes; siendo el morfotipo filamentoso el más frecuentemente observado, presentándose en un 44% según reporta Rosen en un análisis con pacientes que padecían cistitis aguda no complicada, mientras que en un grupo de mujeres clínicamente sanas no se observaron las bacterias filamentosas.

Los conteos bacterianos en cultivos son decisivos para el diagnóstico de ITU y se pueden ver afectados por las variaciones morfológicas que se describen en el mecanismo de uropatogenicidad de UPEC. La densidad bacteriana en la orina puede no correlacionar con la cantidad de bacterias adheridas al tejido e incluso no observarse bacteriuria mientras que un número significativo de patógenos trata de invadir las células del tejido. Por otra parte las bacterias interiorizadas en vesículas y en células con CBI pueden dar conteos aproximados a las 100 000 UFC/mL, no obstante pueden no ser liberadas o sedimentar dentro de la muestra, impactando directamente en el conteo del urocultivo y provocando falsos negativos. Finalmente las bacterias filamentosas pueden llegar a originar 35 bacterias hijas, pero si son cultivadas puede traducirse únicamente en una UFC impactando de manera similar en el diagnóstico como las CBI

En esta investigación se obtuvieron evidencias relevantes que refuerzan los hallazgos de estas variaciones morfológicas descritas por otros autores, donde ya se ha demostrado que el morfotipo filamentoso está altamente relacionado con una mayor supervivencia bacteriana en el tracto urinario<sup>5, 8, 17, 20, 25, 26, 28, 52</sup>; siendo el posible responsable de infecciones crónicas que producen una considerable disminución en la calidad de vida de los pacientes y generan grandes costos en

atención medica además de fomentar el aumento de la aparición de bacterias resistentes a antimicrobianos<sup>12, 52</sup>.

Por lo que se deben planear soluciones integrales para enfrentar este problema de salud pública, diseñando esquemas idóneos para el correcto análisis de la bacteriuria que contemple incluir técnicas de análisis específicos para observar y distinguir las características morfológicas bacterianas presentes en el sedimento urinario.

Las observaciones de este y los estudios anteriores<sup>26, 52, 60</sup> con metodologías diferentes sugieren que la fase filamentosa de la infección UPEC debe ser transitoria y reversible con el fin de asegurar la progresión de las infecciones urinarias del episodio primario; reflejando la complejidad del mecanismo de infección de UPEC<sup>84</sup>, ya que incluso en una comparación de perfiles de transcripción de UTI89 durante las tres fases de infección, reveló la expresión temporal de varios genes implicados en la división celular, lo que indica un cambio en los niveles de patrones de expresión de genes durante la filamentación en comparación con las CBI's y de planctónicas<sup>52</sup>.

Siendo así, es indispensable confirmar por técnicas más sensibles, que efectivamente las bacterias filamentosas que pueden encontrarse en orinas de pacientes con bacteriuria son una entidad bacteriana, con el fin de estudiar su posible potencial como indicador de ITU por patógenos que realicen mecanismos de infección que impliquen alta virulencia bacteriana. También hace necesarios estudios más específicos que ratifiquen la expresión de factores de virulencia en bacterias con morfotipo filamentoso en sedimento urinario.

Los más de 20 años de investigación del mecanismo de UPEC en los modelos de tracto urinario murino y humano ya existe la suficiente evidencia que respalda que el hallazgo de morfotipos filamentosos en el sedimento urinario pueden emplearse como un coadyuvante en el diagnóstico de infección de tracto urinario.

## CONCLUSIONES

El morfotipo filamentoso observado en sedimento urinario con microscopia de campo claro, contraste de fases, fluorescencia y barrido electrónico tiene mucha similitud con los estudiados en el modelo murino y debe comprobarse por técnicas más específicas que es una única entidad microbiana.

*Escherichia coli* es el principal patógeno asociado al morfotipo filamentoso ya que fue aislado en el 100% de los sedimentos analizados, además es necesario estudiar la participación de *Enterococcus faecalis*.

La frecuencia del morfotipo bacteriano filamentoso en tracto urinario es mayor en mujeres, sin un intervalo de edad determinado y sin factores de riesgo adicionales a los de una bacteriuria de 3 cruces.

No existe diferencia significativa entre esterasa leucocitaria, pH, leucocitos y células epiteliales en sedimento urinario entre pacientes con bacteriuria bacilar y bacteriuria con morfotipos filamentosos.

El morfotipo filamentoso debe ser estudiado como un posible indicador útil en el diagnóstico de infecciones de tracto urinario causadas por *Escherichia coli*.

Es necesario analizar la aplicabilidad de la identificación de morfotipos bacterianos como coadyuvante del diagnóstico de infecciones de tracto urinario.

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Where did our infectious diseases arise? En: "Health and Disease in Tribal Societies". Ciba Foundation Symposium 49. Amsterdam. Elsevier, 1977.
2. Kumate J, Gutierrez G. Muñoz O. Infectología clínica Kumate-Gutierrez. Ed. 17. Mexico. 2008.
3. Leggett HC, Brown SP, Reece SE. 2014 War and peace: social interactions in infections. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 369-81.
4. Rané A, Dasgupta R. Urinary tract infection. 1a Ed. United Kingdom: Springer; 2013.
5. Hultgren S, Martinez J, Mulvey M, Schilling J. Bad bugs and beleaguered bladders: Interplay between uropathogenic *Escherichia coli* and innate host defenses. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97 (16): 8829-8835.
6. Secretaría de Salud. [Base de datos en internet]. México. Sistema único de información. Mayo 2016. [Citado 30 Mayo de 2016]. Disponible en: <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/boletin/2016/BOL-EPID-2016-SE21.pdf>
7. Anderson G, Fletcher D, Footer M, Hultgren S, Hung C, et al. Differentiation and developmental pathways of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 101 (5): 1333-1338.
8. Hannan T, Totsika M, Mansfield K, Moore K, Schembri M, Hultgren S. Host-pathogen checkpoints and population bottlenecks in persistent and intracellular uropathogenic *Escherichia coli* bladder infection. *FEMS Microbiology Reviews.* 2012, 36 (3) 616-648
9. European confederation of laboratory medicine. European urinalysis guidelines. *Scand J clin Lab invest suppl.* 2000; 231. 1-86.
10. Niall F. Davis and Hugh D. Flood. The Pathogenesis of Urinary Tract Infections, Clinical Management of Complicated Urinary Tract Infection, Dr. Ahmad Nikibakhsh Ed. 2, 2011. ISBN: 978-953-307-393-4

11. Hopkins, W.J., Elkahwaji, J., Beierle, L.M., Levenson, G.E., Uehling, D.T.: Vaginal mucosal vaccine for recurrent urinary tract infections in women: results of a phase 2 clinical trial. *J. Urol.*, 2007; (177):1349-53.
12. Foxman B. Epidemiology of urinary tract infections: Incidence, morbidity, and economic costs. *Disease-a-Month*. 2003. 49: 53-70.
13. Croxen M., Finlay B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat rev microbiol*. 2010. 8(1): 26-38.
14. Johnson JR, Russo TA. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: "the other bad *E coli*". *J Lab Clin Med*. 2002; 139(3):155-62.
15. Kostakioti, M., Hadjifrangiskou, M., Pinkner, J. S. and Hultgren, S. J. QseC-mediated dephosphorylation of QseB is required for expression of genes associated with virulence in uropathogenic *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 2009. 73: 1020–1031.
16. Alteri CJ, Mobley HLT. *Escherichia coli* Physiology and Metabolism Dictates Adaptation to Diverse Host Microenvironments. *Current Opinion in Microbiology*. 2012; 15 (1):3-9.
17. Hultgren S, Mulvey M, Schilling J. Establishment of a persistent *Escherichia coli* reservoir during the acute phase of a ladder infection. *Infect Immun*. 2001; 69 (7): 4572 - 4579.
18. Hunstad DA, Justice SS, Hung CS, Lauer SR, Hultgren SJ. Suppression of Bladder Epithelial Cytokine Responses by Uropathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*. 2005;73(7):3999-4006.
19. Hultgren S, Hunstad D, Seed P, Wright K. Development of intracellular bacterial communities of uropathogenic *Escherichia coli* depends on type 1 pili. *Cell Microbiol*. 2007; 9 (9): 2230-2241.
20. Pérez H, Conde R, Flores J. Filamentación de uropatógenos en el sedimento urinario: ¿polimorfismo adaptativo o factor de virulencia? *Noticonaquic. México*. 2014; 22(63): 47-49.

21. Cordell S, Robinson E, Löwe J. Crystal structure of the SOS cell division inhibitor SulA and in complex with FtsZ. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Jun 24;100(13):7889-94.
22. Gayda C, Markovitz A, Schoemaker J. Regulation of cell division in *Escherichia coli*: SOS induction and cellular location of the SulA protein, a key to lon-associated filamentation and death. *J Bacteriol*. 1984; 158 (2):551-61.
23. Horvath D, Justice S, Li B, Romesberg F, Smith P. SOS regulatory elements are essential for UPEC pathogenesis. *Microbes Infect*. 2010; 12 (8-9):662-8
24. Garofalo C, Gordon J, Hooton T, Hultgren S, Martin S, Palermo J, et al. *Escherichia coli* from urine of female patients with urinary tract infections is competent for intracellular bacterial community formation. *Infect Immun*. 2007; 75 (1): 52-60.
25. Horvath, D.J., Jr.; Li, B.; Casper, T.; Partida-Sanchez, S.; Hunstad, D.A.; Hultgren, S.J.; Justice, S.S. Morphological plasticity promotes resistance to phagocyte killing of uropathogenic *Escherichia coli*. *Microbes Infect*. 2011, 13, 426–437
26. Justice, S.S.; Hunstad, D.A.; Seed, P.C.; Hultgren, S.J. Filamentation by *Escherichia coli* subverts innate defenses during urinary tract infection. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 2006, 103, 19884–19889.
27. Song J, Abraham S. TLR mediated immune responses in the urinary tract. *Curr opin microbiol*. 2008. 11; (1):66-73.
28. Olson PD, Hunstad DA. Subversion of Host Innate Immunity by Uropathogenic *Escherichia coli*. Svanborg C, ed. *Pathogens*. 2016; 5(1):2.
29. Blango M, Erman A, Mulvey M, Ott E, Veranic P. Forced resurgence and targeting of intracellular uropathogenic *Escherichia coli* reservoirs. *PLoS Med*. 2014; 9(3): e93327.
30. Rosen, David A.; Pinkner, Jerome S.; Jones, Jennifer M.; Walker, Jennifer N.; Clegg, Steven; and Hultgren, Scott J., "Utilization of an intracellular bacterial community pathway in *Klebsiella pneumoniae* urinary tract infection and the

effects of FimK on type 1 pilus expression." *Infection and Immunity*. 2008; 76: (7). 3337-3345.

31. Alturkistani HA, Tashkandi FM, Mohammedsaleh ZM. Histological Stains: A Literature Review and Case Study. *Global Journal of Health Science*. 2016; 8 (3):72-79.
32. Chao Y, Zhang T. Optimization of fixation methods for observation of bacterial cell morphology and surface ultrastructures by atomic force microscopy. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2011; 92(2):381-392.
33. Fazii P, Ciancaglini E, Sforza R. Differential fluorescent staining method for detection of bacteria in blood cultures, cerebrospinal fluid and other clinical specimens. *Eur J Clin Microb & Inf Dis*. 2002; 21 (5):373-378.
34. Kronvall, G. and E.B. Myhre. 1977. Differential staining of bacteria in clinical specimens using acridine orange buffered at low pH. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica - Section B, Microbiology* 85:249-254.
35. Kong H, Chung D. Comparison of acridine orange and giemsa stains for malaria diagnosis. *Korean J Parasitol*. 1995; 33(4):391-4.
36. Instituto Karolinska (internet). Suecia. 2014. Acridine Orange Staining in Clinical Microbiology a Mini-Review. Citado 10 marzo 2015. Disponible en: [http://ki.se/sites/default/files/goran\\_kronvall\\_ao\\_staining\\_mini-review.pdf](http://ki.se/sites/default/files/goran_kronvall_ao_staining_mini-review.pdf)
37. Aspevall O, Osterman B, Dittmer R, Stén L, Lindbäck E, Forsum U. Performance of Four Chromogenic Urine Culture Media after One or Two Days of Incubation Compared with Reference Media. *Journal of Clinical Microbiology*. 2002; 40 (4):1500-1503.
38. Biomérieux (página de internet). 2015. chromID® CPS® Elite Reading Guide; (citado 10 de marzo de 2016). Disponible en: [http://www.biomerieux-diagnostics.com/sites/clinic/files/9308627-002-gb-a-chromid-cps-elite-reading-guide\\_0.pdf](http://www.biomerieux-diagnostics.com/sites/clinic/files/9308627-002-gb-a-chromid-cps-elite-reading-guide_0.pdf)
39. Golding CG, Lamboo LL, Beniac DR, Booth TF. The scanning electron microscope in microbiology and diagnosis of infectious disease. *Scientific Reports*. 2016; 6: 26516.

40. Talbot MJ, White RG. Methanol fixation of plant tissue for Scanning Electron Microscopy improves preservation of tissue morphology and dimensions. *Plant Methods*. 2013; 9:36.
41. Flores-Mireles AL, Walker JN, Caparon M, Hultgren SJ. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nature reviews Microbiology*. 2015; 13(5):269-284.
42. Bădicuț I, Poiată A, Tuchiluş C, Bădicuț A, Buiuc D. A study for the improvement of the cytological urine examination performances in upper tract infection diagnosis. *Roum Arch Microbiol Immunol*. 2003 Jul-Dec; 62(3-4):191-202.
43. Kayalp D, Dogan K, Ceylan G, Senes M, Yucel D. Can routine automated urinalysis reduce culture requests? *Clin Biochem*. 2013 Sep; 46(13-14):1285-9. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2013.06.015. Epub 2013 Jun 25.
44. Whiting P, Westwood M, Bojke L, Palmer S, Richardson G, Cooper J, Watt I, Glanville J, Sculpher M, Kleijnen J Clinical effectiveness and cost-effectiveness of tests for the diagnosis and investigation of urinary tract infection in children: a systematic review and economic model. *Health Technol Assess*. 2006 Oct;10(36):iii-iv, xi-xiii, 1-154.
45. Gentin G, Larcan A, Guillemin P. Role, importance & value of Sternheimer-Malbin cells in urinary sediment. *J Urol Medecale Chir*. 1958 Jan-Feb; 64(1-2):62-8.
46. Goodgold A.L. Reubi F. Appraisal of the Sternheimer-Malbin Urinary Sediment Stain in the Diagnosis of Pyelonephritis. *Urol Int* 1955;1: 225–242.
47. Fogazzi GB, Ponticelli C, Ritz E. The urinary sediment An integrated view, 2nd ed. Milan: Masson; 1999 and Oxford: Oxford University Press; 2009.
48. Amin, R., Eid, L., Edvardsson, V. O., Fairbanks, L., & Moudgil, A. (2016). An Unusual Cause of Pink Diaper in An Infant. *Pediatric Nephrology (Berlin, Germany)*, 31(4), 575.
49. Rizzoni, F. Braggion, G. Zacchello. Evaluation of glomerular and nonglomerular hematuria by phase-contrast microscopy. *The Journal of Pediatrics*, Volume 103, Issue 3, September 1983.

50. Emmanouil Magiorkinis and Aristidis Diamantis. The fascinating story of urine examination: From uroscopy to the era of microscopy and beyond. *Diagnostic Cytopathology*. Volume 43, Issue 12. December 2015. Pages 1020–1036
51. J. Stewart Cameron. A history of urine microscopy *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. Volume 53, Issue s2, Pages s1453–s1464, ISSN (Online) 1437-4331, ISSN (Print) 1434-6621,
52. Khandige S, Asferg CA, Rasmussen KJ, Larsen MJ, Overgaard M, Andersen TE, Møller-Jensen J. 2016. DamX controls reversible cell morphology switching in uropathogenic *Escherichia coli*. *mBio*7(4):e00642-16.
53. Huang KH, Mychack A, Tchorzewski L, Janakiraman A. Characterization of the FtsZ C-Terminal Variable (CTV) Region in Z-Ring Assembly and Interaction with the Z-Ring Stabilizer Zap D in *E. coli* Cytokinesis. *PLoS One*. Apr 18;11(4):e0153337. 2016.
54. Peter J. Smith, Arthur J. Morris & L. Barth Reller. Predicting urine culture results by dipstick testing and phase contrast microscopy. Page 161-165. 2011
55. The gram stain: the century-old quintessential rapid diagnostic test. *Lab. Med.* 19:288–291.
56. Woods GL, Walker DH. Detection of infection or infectious agents by use of cytologic and histologic stains. *Clinical Microbiology Reviews*. 1996;9(3):382-404.
57. Anderson G.G., Palermo J.J., Schilling J.D., Roth R., Heuser J., Hultgren S.J. Intracellular bacterial biofilm-like pods in urinary tract infections. *Science*. 2003;301:105–107
58. Kimberly A. Kline and Amanda L. Lewis. Gram-Positive Uropathogens, Polymicrobial Urinary Tract Infection, and the Emerging Microbiota of the Urinary Tract *Microbiol Spectr*. 2016 Apr; 4(2): 10.1128/microbiolspec.UTI-0012-2012
59. Horsley H, Malone-Lee J, Holland D, et al. *Enterococcus faecalis* Subverts and Invades the Host Urothelium in Patients with Chronic Urinary Tract Infection. van Schaik W, ed. *PLoS ONE*. 2013;8(12):e83637.
60. Rosen DA, Hooton TM, Stamm WE, Humphrey PA, Hultgren SJ. Detection of Intracellular Bacterial Communities in Human Urinary Tract Infection. Opal SM, ed. *PLoS Medicine*. 2007;4(12):e329.

61. Klein K, Palarasah Y, Kolmos HJ, Møller-Jensen J, Andersen TE. Quantification of filamentation by uropathogenic *Escherichia coli* during experimental bladder cell infection by using semi-automated image analysis. *J Microbiol Methods*. 2015 Feb;109:110-6.
62. Justice SS, Harrison A, Becknell B, Mason KM. Bacterial differentiation, development and disease: mechanisms for survival. *FEMS microbiology letters*. 2014;360(1):1-8.
63. Kau AL, Martin SM, Lyon W, Hayes E, Caparon MG, Hultgren SJ. *Enterococcus faecalis* tropism for the kidneys in the urinary tract of C57BL/6J mice. *Infect Immun*. 2005; 73:2461–2468.
64. Wolfe AJ, Toh E, Shibata N, Rong R, Kenton K, Fitzgerald M, Mueller ER, Schreckenberger P, Dong Q, Nelson DE, Brubaker L. Evidence of uncultivated bacteria in the adult female bladder. *J Clin Microbiol*. 2012; 50:1376–1383.
65. Domann E, Hong G, Imirzalioglu C, Turschner S, Kühle J, Watzel C, Hain T, Hossain H, Chakraborty T. Culture-independent identification of pathogenic bacteria and polymicrobial infections in the genitourinary tract of renal transplant recipients. *J Clin Microbiol*. 2003; 41:5500–5510.
66. Alteri CJ, Himpel SD, Mobley HL. Preferential use of central metabolism in vivo reveals a nutritional basis for polymicrobial infection. *PLoS Pathog*. 2015; 11:e1004601. [PubMed: 25568946]
67. Kline KA, Schwartz DJ, Gilbert NM, Hultgren SJ, Lewis AL. Immune modulation by group B *Streptococcus* influences host susceptibility to urinary tract infection by uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 2012; 80:4186–4194. [PubMed: 22988014]
68. Mattick, K.L., Jorgensen, F., Legan, J.D., Cole, M.B., Porter, J., Lappin-Scott, H.M., Humphrey, T.J., 2000. Survival and filamentation of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis PT4 and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 at low water activity. *Appl. Environ. Microbiol*. 66, 1274–1279.
69. Chauhan, A., Madiraju, M.V., Fol, M., Lofton, H., Maloney, E., Reynolds, R., Rajagopalan, M., 2006. *Mycobacterium tuberculosis* cells growing in

- macrophages are filamentous and deficient in FtsZ rings. *J. Bacteriol.* 188, 1856–1865.
70. *J Physiol Pharmacol.* 2009 Dec;60 Suppl 6:13-8. Lactobacillus by-products inhibit the growth and virulence of uropathogenic *Escherichia coli*. Cadieux PA1, Burton J, Devillard E, Reid G.
71. Erill I1, Campoy S, Barbé J. Aeons of distress: an evolutionary perspective on the bacterial SOS response. *FEMS Microbiol Rev.* 2007 Nov;31(6):637-56.
72. Greene SE, Hibbing ME, Janetka J, Chen SL, Hultgren SJ. Human Urine Decreases Function and Expression of Type 1 Pili in Uropathogenic *Escherichia coli*. *mBio.* 2015; 6 (4):e00820-15.
73. C. Svanborg, B. Frendéus, G. Godaly, L. Hang, M. Hedlund, and C. Wachtler Toll-like Receptor Signaling and Chemokine Receptor Expression Influence the Severity of Urinary Tract. *Infection J Infect Dis.* (2001) 183 (Supplement 1): S61-S65
74. Miller C, Thomsen LE, Gaggero C, Mosseri R, Ingmer H, Cohen SN. 2004. SOS response induction by beta-lactams and bacterial defense against antibiotic lethality. *Science* 305:1629 –1631.
75. Wortinger MA, Quardokus EM, Brun YV. 1998. Morphological adaptation and inhibition of cell division during stationary phase in *Caulobacter crescentus*. *Mol Microbiol* 29:963–973.
76. Otto K, Silhavy TJ. 2002. Surface sensing and adhesion of *Escherichia coli* controlled by the Cpx-signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:2287–2292.
77. Andersen TE, Khandige S, Madelung M, Brewer J, Kolmos HJ, Møller-Jensen J. 2012. *Escherichia coli* uropathogenesis in vitro: invasion, cellular escape, and secondary infection analyzed in a human bladder cell infection model. *Infect Immun* 80:1858 –1867.
78. O'Brien VP, Hannan TJ, Schaeffer AJ, Hultgren SJ. Are you experienced? Understanding bladder innate immunity in the context of recurrent urinary tract infection. *Current opinion in infectious diseases.* 2015;28(1):97-105.

79. Van der Veen S, Abee T. 2010. Dependence of continuous-flow biofilm formation by *Listeria monocytogenes* EGD-e on SOS response factor YneA. *Appl Environ Microbiol* 76:1992–1995.
80. Humphrey S, Macvicar T, Stevenson A, Roberts M, Humphrey TJ, Jepson MA. SulA-induced filamentation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium: effects on SPI-1 expression and epithelial infection. *J Appl Microbiol*. 2011 Jul;111(1):185-96.
81. Chu Y-T, Wang Y-H, Wu J-J, Lei H-Y. Invasion and Multiplication of *Helicobacter pylori* in Gastric Epithelial Cells and Implications for Antibiotic Resistance. *Infection and Immunity*. 2010; 78(10):4157-4165.
82. Choi CH, Lee JS, Lee YC, Park TI, Lee JC. *Acinetobacter baumannii* invades epithelial cells and outer membrane protein A mediates interactions with epithelial cells. *BMC Microbiology*. 2008;8: 216.
83. Subashchandrabose S, Mobley HLT. Virulence and Fitness Determinants of Uropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology spectrum*. 2015;3(4):10.
84. Tenorio E, Saeki T, Fujita K, Kitakawa M, Baba T, Mori H, Isono K. 2003. Systematic characterization of *Escherichia coli* genes/ORFs affecting biofilm formation. *FEMS Microbiol Lett* 225:107–114.
85. Guia de urologia 2016

## **ANEXOS**

Anexo 1. Procedimiento de Examen general de orina en iRICELL®2000.

Anexo 2. Microfotografías bacterias filamentosas.