SIBIUP
Biblioteca Int. Simón Bolívar
00301943

UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA

"ESTANDARIZACIÓN DE LAS PRUEBAS DE ELISA Y WESTERN BLOT PARA LA DETECCIÓN DE IGA ESPECÍFICA CONTRA E. *COLI* EN ORINA"

Presentado por:

SHARON IBETH CASTILLO BOSQUEZ

Director:

DR. MANUEL MARÍA ADAMES

Trabajo de graduación para optar

por el Título de Maestría en Ciencias Biomédicas

con Énfasis en Inmunología

PANAMÁ, REPÚBLICA DE PANAMÁ

2016

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a mis familiares y amigos, que me han acompañado y apoyado durante su elaboración. En especial a mi hijo Alen, mi mayor bendición.

Licda. Sharon Ibeth Castillo Bósquez

AGRADECIMIENTO

En primer lugar, a Dios Todopoderoso, quien ha sido mi guía, mi aliento y mi fortaleza para culminar esta investigación.

Al Dr. Manuel María Adames (Director de tesis), a la profesora Griselda Arteaga, a la profesora Dalys Mójica, y demás profesores y colaboradores de los departamentos de Inmunología y Microbiología de la Universidad Nacional de Panamá por su colaboración en la elaboración de este trabajo, al brindarme su asesoría y otras facilidades de equipo, material e instalaciones dentro de la Facultad de Medicina.

A mis colegas del Complejo Hospitalario Metropolitano Dr. Arnulfo Arias Madrid que cooperaron con la recolección de las muestras y datos.

A todos mis amigos y colegas que me brindaron su colaboración en la realización de este trabajo, mi profundo agradecimiento.

Licda. Sharon Ibeth Castillo Bósquez

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA II

AGRADECIMIENTO III

ÍNDICE GENERAL IV

ÍNDICE DE CUADROS IX

INDICE DE FIGURAS XII

ÍNDICE DE GRÁFICAS XIII

INDICE DE FOTOGRAFIAS XIV

LISTADO DE ABREVIATURAS XVII

RESUMEN 1

SUMMARY 2

CAPITULO I.

INTRODUCCION 3

1. Planteamiento del problema, antecedentes, importancia 4

2. Objetivos 6

2.1. Objetivo general 6

2.2. Objetivos específicos 6

CAPITULO II.

MARCO TEÓRICO 7

1. INFECCIÓN URINARIA 8

1.1. Etiopatogenia 12

1.1.1. Escherichia coli 15

1.1.1.1. Estructura Antigénica 18

1.1.1.2. Factores de virulencia 19

1.1.2. Factores Del Huésped 26

1.1.3. La interacción entre la resistencia del huésped y la virulencia bacteriana 28

1.2. Epidemiología 31

1.3. Diagnóstico 34

2. VACUNAS ORALES 40

2.1. OM-89 en el Tratamiento de la ITU Recurrente 45

2.2. Características Generales de OM-89 46

2.3. Mecanismos de acción 49

2.4. Experiencias Clínicas 51

2.4.1. Experiencia clínica en pacientes adultos 51

2.4.2. Experiencia clínica en niños 54

2.4.3. Experiencia clínica y calidad de vida 55

2.5. Perfil de seguridad de OM-89 58

3. ENSAYOS INMUNOENZIMÁTICOS Y WESTERN BLOT 59

3.1. Ensayo Inmunoenzimático (ELISA) 59

3.1.1. Tipos de ELISA 62

3.2. Western Blot 66

3.2.1. Pasos Generales del Western Blot: 68

3.2.1.1. Preparación de la muestra.....68

3.2.1.2. Electroforesis en Acrilamida.....68

3.2.1.3. Transferencia a una Membrana.....69

3.2.1.4. Hibridación del Anticuerpo.....71

3.2.1.5. Detección.....72

CAPITULO III.

METODOLOGÍA.....76

1. REACTIVOS, EQUIPOS Y MATERIALES.....77

1.1. Reactivos, equipos y materiales utilizados en la elaboración de ELISA casero para detectar IgA en orina específica contra E. coli 78

1.2. Reactivos, equipos y materiales utilizados en la técnica de Western Blot para detección de IgA específica contra E. coli en Orina.....80

1.2.1. Electroforesis de *E. coli* 80

1.2.2. Inmunotransferencia e inmunodetección de IgA específica contra E. coli en Orina.....82

2. METODOLOGIA.....86

2.1. Elaboración de ELISA para detectar IgA específica contra E. *coli* en muestras de orina.....86

2.1.1. Preparación de microplatos de ELISA recubiertos con antígenos de E. *coli,* procedentes de la pastilla OM-89.....86

2.1.2. Ensayo de ELISA.....88

2.2. Western Blot para detección de IgA específica contra *E. coli* en Orina 89

2.2.1. Electroforesis de *E. coli* 89

2.2.2. Inmunoeletrotransferencia 93

2.2.3. Inmunodetección de Proteínas en Papel de Nitrocelulosa 95

CAPITULO IV.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN **98**

1. RESULTADOS **99**

1.1. Población y controles 99

1.2. Prueba de ELISA para detectar IgA en orina específica contra E. *coli* 103

1.3. Electroforesis y Western Blot para la inmunodetección de IgA específica contra E. *coli* en orina 112

2. DISCUSION **132**

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES **140**

1. CONCLUSIONES **141**

2. RECOMENDACIONES **143**

CAPITULO VI.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS **144**

CAPITULO VII

ANEXOS **153**

CAPITULO VIII

GLOSARIO **179**

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. DIFERENTES TIPOS DE INFECCIONES EN VÍAS URINARIAS..... 10

Cuadro 2. FACTORES DE VIRULENCIA DE LAS CEPAS DE *E. COLI* INVOLUCRADAS EN INFECCIONES URINARIAS... 25

Cuadro 3. FACTORES PREDISPONENTES DEL HUÉSPED 27

Cuadro 4. MÉTODOS DE RECOGIDA DE LA ORINA. VENTAJAS, INCONVENIENTES E INDICACIONES 37

Cuadro 5. POSOLOGÍA RECOMENDADA DE ANTIMICROBIANOS PARA INFECCIÓN DE VÍAS URINARIAS NO COMPLICADAS 39

Cuadro 6. VENTAJAS E INCONVENIENTES DE LOS MÉTODOS DE DETECCIÓN 74

Cuadro 7. CARACTERÍSTICAS DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES Y POLICLONALES 75

Cuadro 8. DATOS DE LAS MUESTRAS 100

Cuadro 9. DATOS DE LOS CONTROLES NEGATIVOS..... 101

Cuadro 10. DATOS Y RESULTADOS DE CONTROLES POSITIVOS..... 101

Cuadro 11. RESULTADOS DE LOS CONTROLES NEGATIVOS..... 104

Cuadro 12. DATOS Y RESULTADOS DE LOS CONTROLES NEGATIVOS..... 105

Cuadro 13. DATOS Y RESULTADOS DE LAS MUESTRAS NEGATIVAS..... 108

Cuadro 14. DATOS Y RESULTADOS DE LAS MUESTRAS POSITIVAS NO CONFIRMADAS..... 109

Cuadro 15. DATOS Y RESULTADOS DE LAS MUESTRAS POSITIVAS CONFIRMADAS..... 110

Cuadro 16. RESULTADOS DE LA ELECTROFORESIS DEL MARCADOR DE PESO MOLECULAR 17-0446-01 (GE HEALTHCARE)..... 117

Cuadro 17. RESULTADOS DE LA ELECTROFORESIS DE LA MUESTRA DE E. *COLI* NO REDUCIDA..... 119

Cuadro 18. RESULTADOS DE LA ELECTROFORESIS DE LA MUESTRA DE E. *COLI* REDUCIDA..... 120

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

Fotografía 1. Muestras de orinas de pacientes del Complejo Hospitalario Metropolitano Dr. Arnulfo Arias Madrid. 166

Fotografía 2. Muestras de Orina del C.H.M.A.A.M.para almacenar. 167

Fotografía 3. Lavador Stat Fax- 2600. 168

Fotografía 4. Bloqueo de los platos. 169

Fotografía 5. Cultivos de Escherichia *coli* con 24 horas de incubación a 37° C. 170

Fotografía 6. Preparación de la muestra de E. coli para realizar la electroforesis A.....171

Fotografía 7. Preparación de la muestra de E. coli para realizar la electroforesis B.....172

Fotografía 8. Preparación de la muestra de *E. coli* para realizar la electroforesis C.....173

Fotografía 9. Kit para la preparación del Gel SDS sigma-aldrich 08091. 174

Fotografía 10. Armado del molde para los geles verticales de electroforesis 175

Fotografía 11. Equipo de electroforesis en cámara vertical 176

Fotografía 12. Reactivo Sustrato-Cromógeno para la inmunodetección de proteínas en papel de nitrocelulosa.....177

Fotografía 13. Lavado de las tiras de Western Blot en agua destilada. 178

Fotografía 14. Prueba de Elisa para detectar IgA en orina específica contra *E. coli*.....102

Fotografía 15. Corrida electroforetica de las cepas de E. *coli* no reducidas.....114

Fotografía 16. Corrida electroforetica de las cepas de E. *coli* reducida con 2-mercaptonetanol. 115

Fotografía 17. Corrida electroforetica del Marcador de Peso Molecular 17-0446-01 (GE Healthcare) 116

Fotografía 18. Membranas de nitrocelulosa luego de la inmunoelectrotransferencia, teñidos con Rojo Ponceau. 122

Fotografía 19. Geles escaneados y teñidos con Azul de Metileno luego de la inmunoelectrotrasferencia de proteínas. 123

Fotografía 20. Resultados de la Inmunodetección de IgA específica contra E. coli por Western Blot. 127

LISTADO DE ABREVIATURAS

Ac:	Anticuerpo
Ag:	Antígeno
ADN:	Ácido Desoxirribonucleico
AP:	Fosfatasa Alcalina
BA:	Bacteriuria Asintomática
BSA:	Albúmina de Suero Bovino
CCD:	Dispositivo de Carga Acoplada en inglés "*charge-coupled device*"
CN:	Control Negativo
CP:	Control Positivo
DAS:	Double Antibody Sandwich
ECAD:	*E. coli* Adherencia Difusa
ECEI:	*E. coli* Enteroinvasiva
ECEP:	*E. coli* Enteropatogénica
ECET:	*E. coli* Enterotoxigénica
EGO:	Examen General De Orina
ELISA:	Ensayo Inmunoabsorbente Ligado A Enzimas
Fe:	Hierro
GTP:	Guanosín Trifosfato
H:	Antígenos Flagelares

HADAS:	Heterologous Antiglobulin Double Antibody Sandwich
HRP:	Peroxidasa De Rábano Picante
IBC:	Comunidades Bacterianas Intracelulares
IgA:	Inmumoglobulina A
IgG:	Inmunoglobulina G
IgM:	Inmunoglobulina M
IL:	Interleucina
ITU:	Infecciones Del Tracto Urinario
IU:	Infección Urinaria
IVU:	Infección De Vías Urinarias
K:	Antígenos Capsulares
LPS:	Lipopolisacárido
LT:	Enterotóxina Termolábil
MN:	Muestra Negativo
MP:	Muestra Positiva No Confirmada
MPC:	Muestra Positiva Confirmada
MR:	Manosa Resistentes
MS:	Manosa Sensible
NCTC:	Colección Nacional de Tipos de Cultivos
O:	Antígeno Somático
P:	Fimbria (Pielonefritis)
PAGE:	Electroforesis En Gel De Poliacrilamida

PAI:	Islas De Patogenicidad
PAMP:	Patógenos Asociados A Patrones Moleculares
PapG:	Proteína Glicoesfingolípido α-D-Galactopiranosil- (1-4)-β-D-Galactopiranosido
PMN:	Polimorfonucleares
PNA:	Pielonefritis Aguda
PVDF:	Fluoruro De Polivinilideno
RIA:	Radioinmunoanálisis
SARS:	Síndrome Respiratorio Agudo Y Grave
SAT:	Toxina Autotransportadoras Secretadas
SDS:	Detergente Dodecilsulfato Sódico
SSN:	Solución Salina Normal
ST:	Enterotoxina Termoestable
TH:	Proteína de Tamm-Horsfall
TIR:	dominio "Toll Interleukin Related"
TLR:	Receptores Toll-like
TNF:	Factor De Necrosis Tumoral
Tris:	Tri (Hidroximetil) Aminometano
UPEC:	*E. coli* Uropatogénico
VIH:	Virus de Inmunodeficiencia Humana
VTEC:	*E. coli* Enterohemorrágica o Verotoxigénica

RESUMEN

El presente estudio tuvo el objetivo de estandarizar cualitativamente una prueba de ELISA y de Western Blot para detectar IgA específica contra E. *coli* en orina. En la estandarización de la prueba de ELISA los micropocillos fueron recubiertos con una solución de OM-89 de 4 ug/ml. La dilución adecuada del conjugado fue de 1:50,000; la muestra de orina fue utilizada sin diluir; y los tiempos de incubación de la muestra y del conjugado correspondieron a 2 horas y una hora respectivamente. Se seleccionaron 32 controles negativos, con urocultivos negativos y una visible negatividad en pruebas de ELISA para detectar IgA específica contra E. *coli* en orina en análisis previos. Se obtuvo un punto de corte de 0.779. De 109 muestras de orina analizadas por ELISA, 27 fueron positivas, de las cuales 17 tenían urocultivos positivos por E. *coli*; nueve tenían urocultivos negativos, y una tenía urocultivo positivo por Klebsiella *pneumoniae*. De las muestras positivas por ELISA, 15 fueron analizadas por Western Blot. Resultaron todas positivas, obteniéndose reacción contra proteínas de pesos moleculares aproximados de 21kDa a 152kDa. Las más inmunogénicas fueron de aproximadamente 152kDa y de 49kDa. En la literatura se reportaron dos proteínas correspondientes, la ARN polimerasa subunidad beta dirigida por ADN (RpoB) de 151kDa y la Biotin Carboxilasa (accC) de 49kDa. Se concluye que estas pruebas permiten valorar cualitativamente la presencia de IgA específica contra E. *coli* en orina. Tienen una valiosa aplicación clínica e investigativa para evaluar el efecto del uso de medicamentos e inmunoestimuladores utilizados para tratar infecciones de las vías urinarias, en estudios de seguimiento y/o comparativos.

SUMMARY

This study had the aim to standardize a qualitative ELISA and Western Blot to detect specific IgA against E. *coli* in urine. In the standardization of the ELISA, the microwells were coated with a solution of OM-89 4 ug / ml. The appropriate dilution of the conjugate was 1: 50,000; the urine sample was used undiluted; and incubation times of the sample and the conjugate corresponded to 2 hours and one hour respectively. 32 negative controls with negative urine cultures and visible negativity in ELISA tests to detect specific IgA against E. *coli* in urine in previous analyzes were selected. A cutoff of 0.779 was obtained. 109 urine samples were analyzed by ELISA, 27 were positive, of which 17 had positive urine cultures for E. *coli*; nine had negative urine cultures, and one had positive urine culture by Klebsiella *pneumoniae*. Of the positive samples by ELISA, 15 were analyzed by Western blotting. They were all positive, yielding reaction against proteins of approximate molecular weights 21 kDa to 152kDa. The most immunogenic were approximately 49kDa and 152kDa. In the literature two corresponding proteins, RNA polymerase beta subunit DNA directed (rpoB) of 151kDa and Biotin carboxylase (ACCC) of 49kDa were reported. In conclusion, these tests are suitable for qualitatively assess the presence of specific IgA against E. *coli* in urine. They have a valuable clinical and research application to assess the effect of drug use and immunostimulatory used to treat infections of the urinary tract, especially in follow-up and / or comparative studies.

CAPITULO I.

INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

1. Planteamiento del problema, antecedentes, importancia

La infección urinaria es uno de los motivos de consulta ambulatoria más frecuente y repetida de la práctica pediátrica. La importancia de la infección del tracto urinario (ITU) es el desarrollo de cuadros infecciosos, morbilidad aguda y problemas a largo plazo (hipertensión arterial o insuficiencia renal crónica con o sin daño renal). En los niños pequeños estas infecciones son de gran preocupación para los padres y un desafío para el médico cuyo enfoque no solo deberá limitarse a brindar tratamiento oportuno sino a determinar los factores predisponentes que permitan tomar medidas preventivas para evitar futuros episodios (Gómez, 2003). De allí la necesidad de prevenir la recurrencia de episodios de IVU, los cuales alcanzan una tasa de recurrencia en el primer año de la infección original estimada en 40 % para niñas y de 30 % para niños, lo cual a su vez conlleva al uso repetido de antibióticos, provocando el aumento de la resistencia bacteriana (Pennesi et al 2008).

A partir de la década de 1980 se realizaron ensayos clínicos que mostraron que las recurrencias de ITUs son reducidas a la mitad con OM-89 / placebo al final del período de estudio de 6 meses (después de 3 meses de tratamiento - 3 meses sin tratamiento). OM-89, acorta a la mitad la duración total de las ITUs agudas, reduce

los síntomas de ITU y la incidencia de bacteriuria y piuria, y reduce la necesidad de drogas anti-infecciosas (Czerwionka, 1996; Lettgen, 1996; Kun Suk, 2010).

En Alemania en la década de 1990, se realizó un estudio comparativo, doble ciego, que se considera como la base del concepto de inmunoestimulación. Se estudiaron dos grupos con ITU, la mitad de los cuales conformó un grupo control; la otra mitad recibió una cápsula de OM-89 al día durante tres meses. Estos últimos habían presentado por lo menos dos recurrencias de infecciones urinarias en los seis últimos meses y presentaban una ITU aguda en el momento de iniciar el tratamiento, durante el estudio. Luego de tres meses de seguimiento la recurrencia fue dos veces menor en el grupo tratado con OM-89, en comparación con el grupo control, durante los seis meses que duró el estudio (Wolfgang, 2006).

En la actualidad, en Panamá carecemos de pruebas que nos permitan monitorear la eficacia de tales tratamientos, y/o de hacer estudios comparativos entre diversos grupos. La estandarización de una prueba de ELISA para detectar la IgA específica contra E. *coli* en orina permitiría realizar este tipo de estudios. Teniendo a la vez, no solo aplicación investigativa, sino también clínica. No menos importante, es la elaboración de una prueba de Western Blot con la misma finalidad; la cual simultáneamente haría posible la comparación y confirmación de los casos positivos en la prueba de ELISA. Este ensayo de Western Blot permitiría determinar los pesos aproximados de las proteínas más inmunogénicas presentes en las orinas positivas.

La estandarización de forma no industrial de ambas pruebas puede sentar las bases de la elaboración a nivel comercial de estos ensayos y/u otros similares.

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

Estandarizar las pruebas de ELISA y Western Blot para la detección de IgA específica contra E. *coli* en orina.

2.2. Objetivos específicos

a) Definir la concentración óptima de antígenos de *E. coli* requerida para que se dé la unión de la Inmunoglobulina A secretora en muestras de orina de pacientes con infección por *E. coli,* que permita elaborar la técnica de ELISA correspondiente.

b) Precisar la concentración óptima de conjugados de IG anti-IgA que permita la detección de Inmunoglobulina A secretora en muestras de orina de pacientes con infección por *E. coli* que permita realizar la técnica de ELISA.

c) Elaborar una prueba de Western blot, para confirmar la detección de anticuerpos IgA específicos contra E. *coli* en orina de pacientes con infección urinaria.

CAPITULO II.

MARCO TEORICO

La invasión microbiana del aparato urinario, que supera los mecanismos de defensa del huésped, provoca alteraciones morfológicas y/o funcionales y una respuesta inmunológica no siempre detectable (Leroy & Tattevin, 2012).

Las infecciones del tracto urinario (ITU/IVU) son observables con gran frecuencia en pacientes adultos en Atención Primaria, representando el 10% de aquellos que acuden por procesos infecciosos. Esto sin añadir los pacientes autotratados y no reportados a nivel del sector salud. Podemos con esto hacernos una idea del problema que representa esta patología (numéricamente hablando) y el gran consumo de antibióticos que conlleva. Sin embargo, la mayoría de las ITU ocurre en mujeres (consideradas ITU no complicadas), que no presentan enfermedades de base y no muestran anomalías funcionales o estructurales del tracto urinario (Pigrau et al., 2013).

Las Infecciones urinarias son frecuentes durante los períodos de gestación, calculándose que de un 20% a 40% de las mujeres que presentan bacteriuria asintomática, previo al embarazo, terminan desarrollando pielonefritis durante el su gestación (Grabe et al., 2012).

En pacientes pediátricos se observa con frecuencia la presencia de IVU, la cual ocupa en ellos el tercer lugar dentro de las infecciones más comunes, después de las afecciones respiratorias superiores y las infecciones gastrointestinales. En esta población existen controversias tanto en el diagnóstico como en el tratamiento, pero al igual que en el adulto su mayor frecuencia es observada en el género femenino. Aproximadamente un 3% de las niñas y un 1% de los niños habrán tenido una IVU para cuando cumplan once años de edad. En niños pequeños con fiebre alta y ningún otro síntoma existe 1/20

probabilidades de tener una IVU. Y por características anatómicas y de aseo, los niños no circuncidados sufren más de este tipo de infecciones que los circuncidados (American Academy of Pediatrics, 2010).

Cuadro 1. DIFERENTES TIPOS DE INFECCIONES EN VÍAS URINARIAS

Diferentes tipos de infecciones en vías urinarias

Bacteriuria asintomática	En población normal, se define por la presencia de >100,000 unidades formadoras de colonias de un mismo microorganismo por mililitro (10^5 UFC/mL) de orina y en ausencia de síntomas En embarazadas o en niños, se define por la presencia de >100,000 UFC/mL de la misma especie en dos cultivos subsecuentes en ausencia de síntomas
Infección de vías urinarias no complicada	Los síntomas característicos del cuadro son disuria, ardor con la micción, polaquiuria/aumento en la frecuencia de la micción, tenesmo vesical y, ocasionalmente, urgencia, dolor suprapúbico, nicturia y hematuria. Dichos síntomas corresponden habitualmente a infecciones de tracto urinario bajo Se presenta en pacientes que tienen un tracto urinario normal (anatómica y fisiológicamente), que no presentan datos de afección sistémica (fiebre, toxicidad, vómito persistente, deshidratación) y no tienen antecedentes de enfermedades renales o comorbilidades (diabetes, inmunocomprometidos). Es decir, no existen condiciones que predispongan a la IVU ni a la falla de su tratamiento
Infección de vías urinarias complicada	Implica la infección recurrente o el involucramiento de la vía urinaria alta con fiebre, náusea, vómito, dolor lumbar y ataque al estado general También incluye todos los casos en que se presentan personas con alteraciones anatómicas
Pielonefritis aguda	Es una infección del parénquima renal, secundaria a una IVU baja. El paciente presenta ataque al estado general, polaquiuria, disuria, hematuria, dolor en región lumbar y en flanco, fiebre >39 °C y que dura más de 48 horas y signo de Giordano positivo
Reinfección	Dos cuadros de IVU ocasionados por diferentes microorganismos en un lapso menor de 6 meses
Infección recurrente	Más de 3 cuadros de IVU en un lapso de 12 meses o 2 episodios en menos de 6 meses
Persistencia bacteriana	Es la evidencia microbiológica de crecimiento bacteriano a pesar de un tratamiento apropiado

Fuente: (Calderón et al., 2013)

La ocurrencia de IVU aumenta en la adolescencia con el inicio de las relaciones sexuales y la presencia de bacteriuria en la edad preescolar y escolar origina un mayor riesgo de presentar una IVU en la edad adulta (Rondón et al.,2007).

Siendo que el 1.6% de los varones y el 7.8% de las mujeres han tenido al menos una Infección de Vías Urinarias se debe hacer énfasis en su frecuencia, la cual puede indicar posibles anormalidades anatómicas o funcionales subyacentes y principalmente en que sí compromete el riñón puede ocasionar daño irreversible (Rodríguez, 2014).

La mayoría de los patógenos urinarios forman parte de la flora normal intestinal. Poseen factores de virulencia que le permiten colonizar el prepucio en el hombre y el periné en la mujer para luego ascender a la vejiga y al riñón. Es por esto que las enterobacterias son las principales causas de IVU, destacándose la *Escherichia coli*, siendo causante del 70 a 90% de todas las IVU y de más del 90% de las IVU de infección primaria adquiridas. Esta bacteria también presenta mayor prevalencia en pacientes con alteraciones estructurales renales, aunque también son frecuentes la *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Pseudomonas spp.* y *Enterobacter spp.* En mujeres adolescentes se encuentran en un 15% de las pacientes los *Saprophyticus*, a *Staphylococcus coagulasa-negativo* (Colombiana de Salud S.A., 2014).

Otros gérmenes de menor frecuencia son: *Salmonella*, *Shigella* y *Campylobacter*. *Haemophilus influenzae tipo b*, anaerobios, *Lactobacillus spp.*, *Corynebacterium spp.*, aunque ciertamente su presencia debe evaluarse cuidadosamente para descartar la posibilidad de contaminación (Colombiana de Salud S.A., 2014).

1.1. Etiopatogenia

En teoría se describen tres vías de penetración de los gérmenes: vía linfática, hematógena y ascendente, aunque la linfática posee pocas evidencias, pero ha sido demostrada en especies animales (Rondón et al., 2007). El arribo de microorganismos al aparato urinario suele ser por vía ascendente, generalmente por parte de flora intestinal que colonizan la uretra o la zona del periné, exceptuando el periodo neonatal o circunstancias concretas en las que puede desarrollarse por vía hematógena (González & Rodríguez, 2014).

El nivel de infección: uretra, vejiga, o riñones, depende de factores como el tamaño del inóculo, la resistencia del huésped y la virulencia de la cepa infectante. La virulencia proporciona una medida cuantitativa de la patogenicidad o de la probabilidad de desarrollar enfermedad (Rondón et al., 2007).

La patogenia de la ITU tienes gran complejidad y se debe a múltiples factores (bacterianos, inmunitarios, anatomicos, urodinamicos, genéticos, etc.) que pueden influir en la ubicación, desarrollo y pronostico de la misma. El vaciamiento vesical constante y completo constituye el principal mecanismo de defensa frente a la ITU. En la actualidad se acepta la existencia de una predisposición individual y genética a padecer una ITU, debido a polimorfismos que determinan mayor susceptibilidad para presentar ITU recurrente y daño renal progresivo como consecuencia del proceso inflamatorio local. La ITU se manifestará de forma más o

atróficos vaginales, desaparición de la colonización por lactobacilos, se da un aumento en el pH vaginal y por ende colonización por bacterias uropatógenas. Algunos padecimientos, estilos y condiciones de vida y la medicación regular en los ancianos pueden inducir la retención de la micción y por consiguiente a la bacteriuria. Por tal forma, los cistoceles en las mujeres, enfermedades neurológicas (accidentes cerebro vasculares), impactación fecal, y el uso de medicamentos anticolinérgicas, inducen a la infección urinaria. Para el género masculino, la hiperplasia prostática benigna puede desencadenar la retención urinaria, así como un deficiente aseo perianal también es un factor de riesgo para la bacteriuria del adulto mayor en su longevidad (Rondón et al., 2007).

Para la mujer en general se ha observado que la colonización de la región periuretral y de la entrada al conducto vaginal por *Enterobacteriaceae* es primordial en la patogenia de la ITU, por lo cual se ha establecido que previamente a los episodios de bacteriuria, la región periuretral es colonizada por el mismo germen responsable de la bacteriuria. Se destaca la colonización frecuente de la uretra, la región periuretral y el vestíbulo vaginal de las pacientes con ITU recurrentes por bacterias coliformes. Sugiriéndose que existen mecanismos locales de defensa periuretrales y vaginales defectuosos en algunas pacientes con ITU recurrentes, por lo cual la colonización por coliformes es frecuente. Aunque también se ha señalado que las mujeres sin problemas estructurales o neurológicos en cuanto a la micción tienen el mismo riesgo de padecer una ITU. Componentes anatómicos en la mujer como la extensión de la uretra, la cercanía de ésta con el ano, el trauma uretral durante el coito (así como el uso de preservativos) o a través de la manipulación de

sondas vesical u otras exploraciones, así como el estreñimiento severo, son factores que favorecen y facilitan la aparición de ITU. También el diafragma con jalea anticonceptiva en las mujeres como la colocación de preservativos en el hombre pueden predisponer a las ITU, perjudicando mayormente el espermicida que el diafragma, debido a que el espermicida permite la colonización de la vagina por patógenos urinarios, favoreciendo la adherencia de la E. coli a las células epiteliales vaginales (Rondón et al., 2007).

1.1.1. Escherichia coli

La bacteria *Escherichia coli* es la enterobacteria más importante que se encuentra comúnmente en el intestino de organismos de sangre caliente y la más descrita como causa de patología en los seres humanos. Se trata de un microorganismo móvil, catalasa positiva, oxidasa negativa, reduce el nitrato a nitrito, normalmente fermenta la lactosa, produce indol a partir del triptófano siendo negativa la reacción de Voges-Proskauer, ureasa y fenilalanina desaminasa (Molina & Eslava, 2015). Su cubierta celular al ser gram-negativas, está constituida por:

- Membrana citoplasmática externa, formada por una capa de fosfolípidos con proteínas intercaladas
- Sobre ésta se sitúa una capa fina de peptidoglicano y entre ambas se encuentra el espacio o gel periplásmico, también llamado por algunos autores periplasma.
- Por encima se sitúa la membrana externa constituida por una bicapa de fosfolípidos intercalada con distintos componentes como el lipopolisacárido (LPS), lipoproteínas y porinas.

• Además en el caso específico de las enterobacterias, aparecen componentes como flagelos, fimbrias o pili y las adhesinas no fimbrias (Hernández, 2010).

Existen varios tipos de *E. coli* como parte de la flora normal del intestino humano las cuales tienen muchas funciones beneficiosas, tales como la producción de vitamina K2. También evitan que las bacterias dañinas, conocidas como bacterias patógenas, se establezcan en el intestino. Las Cepas son clasificadas de la siguiente forma:

❖ ***E. coli* enterohemorrágica o verotoxigénica (VTEC) (*O157H:7*)**

Producen perotoxinas que actúan en el colon. Produce primero colitis hemorrágica, luego síndrome urémico hemolítico (más afección del riñón, posible entrada en coma y muerte), y por último púrpura trombocitopénica trombótica (más afección del sistema nervioso central) (Iowa State University, 2009).

❖ ***E. coli* enteropatogénica (ECEP)**

Carece de fimbrias y no produce las toxinas ST y LT, pero producen la proteína intimina, una adhesina para adherirse a las células intestinales Este virotipo posee una serie de factores de virulencia que son similares a los que se encuentran en *Shigella*, como la toxina Shiga. La adherencia a la mucosa intestinal causa una reordenación de la actina en la célula hospedante, que induce una deformación significativa. (La patogénesis de su infección puede ser observada en la Figura 1) (Molina & Eslava, 2015).

❖ ***E. coli* uropatogénico (UPEC)**

Causan el 90% de las infecciones urinarias (cistitis y pielonefritis). La adhesina asociada a ésta causa de infección urinaria es la fimbria P (pielonefritis). Cepas de UPEC demuestran una mayor capacidad de adherencia a células del epitelio vaginal y urinario, resistencia al poder bactericida del suero, producción de hemolisina, y mayor producción de antígeno capsular -antígeno K- (Ver Figura 2). Pertenecen además a un limitado número de serogrupos (O1, O2, O4, O6, O7, O8, O9, O11, O18, O22, O25, O62 Y O75). La adherencia es importante no solo en la infectividad, sino que ciertas cepas exhiben una mayor capacidad de producir IU altas. La adhesión está mediada por ligandos específicos que se unen a receptores del huésped. Esos ligandos son pequeñas proteínas localizadas en los pili (Torres & Mattera, 2008).

❖ ***E. coli* enterotoxigénica (ECET)**

Se parece mucho a *Vibrio cholerae*, se adhiere a la mucosa del intestino delgado, no la invade y elabora toxinas que producen diarrea. No hay cambios histológicos en las células de la mucosa y muy poca inflamación. Emplea varias toxinas incluyendo la enterotoxina ST y la LT (la patogénesis de su infección puede ser observada en la Figura 3) (Molina & Eslava, 2015).

❖ ***E. coli* enteroinvasiva (ECEI)**

Es inmóvil, no fermenta la lactosa. Invade el Epitelio Intestinal causando diarrea sanguinolenta Libera el calcio en grandes cantidades impidiendo la solidificación

ósea, produciendo artritis y en algunos casos arterioesclerosis. Es una de las *E. coli* que causa más daño debido a la invasión que produce en el epitelio intestinal (Molina & Eslava, 2015).

❖ ***E. coli* Adherencia difusa (ECAD)**

Se adhiere a la totalidad de la superficie de las células epiteliales y habitualmente causa enfermedad en niños inmunológicamente no desarrollados o malnutridos (Riveros et al., 2011).

1.1.1.1. Estructura Antigénica

La estructura antigénica está formada por tres clases de antígenos:

• Antígenos somáticos o antígenos O son cadenas de polisacárido procedente del LPS capsular que están presentes en todas las bacterias gramnegativas; es el que le confiere especificidad serológica (Hernández, 2010).

• Antígenos flagelares o antígenos H son proteínas que se localizan en los flagelos (Hernández, 2010).

• Capsulares o antígenos K presentes en cepas con cápsula, constituyen una barrera defensiva disminuyendo la capacidad de los anticuerpos para unirse a la bacteria, son un factor de virulencia fundamental porque impide la fagocitosis (Hernández, 2010).

1.1.1.2. Factores de virulencia

Son todas las estructuras o productos bacterianos que intervienen en el proceso infeccioso. Las enterobacterias poseen una serie de factores de virulencia implicados en la producción de los diferentes síndromes clínicos, por una parte poseen fimbrias y adhesinas imprescindibles para adherirse a las mucosas, siendo este el primer paso para la colonización bacteriana, por otra parte producen toxinas como la endotoxina o lipopolisacárido de la pared y otras: hemolisina, citotoxinas y por ultimo poseen plásmidos que son unidades de ADN extracromosómicos, intracitoplasmáticos, con capacidad de autorreplicación y que juegan un papel fundamental en la codificación de información para su acción patógena así como para la resistencia a los antibióticos (Hernández, 2010).

La filogenia y la virulencia de un microorganismo condicionan en gran medida su potencial para establecer una infección. No todas las cepas de *E. coli* poseen la misma capacidad para infectar el aparato urinario. En *E. coli* se ha identificado 4 grupos filogenéticos a los que se denominan A, B1, B2 y D. Las cepas comensales derivan en su mayoría de los grupos A y B1, y poseen muy pocos factores de virulencia. Estas cepas constituyen el núcleo de la flora fecal, están adaptadas a una pacífica convivencia en el huésped, no producen enfermedad intestinal y sólo causan infección extraintestinal cuando existen factores favorecedores. Las cepas *E. coli* uropatógenas, derivan principalmente del grupo B2 y en menor medida del D, y albergan genes que codifican factores extraintestinales de virulencia. Las infecciones que producen pueden afectar a

casi todos los órganos y localizaciones anatómicas, excepto el tracto intestinal. Las *E. coli* del grupo B2 producen el 69% de las cistitis, el 67% de las pielonefritis y el 72% de las sepsis urinarias (Pigrau et al., 2013). Los genes que codifican los factores de virulencia se encuentran en el cromosoma bacteriano agrupados en fragmentos de ADN muy particulares denominados "islas de patogenicidad" o PAI. Se trata de piezas genéticas con estructura en forma de mosaico, lo que sugiere que han sido generadas en un proceso secuencial, que con el tiempo experimentan mutaciones que homogenizan su código genético con el general de la bacteria, pierden fragmentos no favorables y se confunden con el genoma propio de la bacteria, en un proceso denominado de maduración genética. El mecanismo de movilidad de las PAI es poco conocido, se postula que se comportan como transposones conjugativos, lo que permite, en condiciones de presión selectiva, la difusión a otras bacterias de los genes de virulencia que contienen. En *E. coli* se han descrito 9 PAI, cada una codificando distintos factores, aunque algunos pueden coincidir en más de una PAI. Una misma cepa de *E. coli* puede albergar diversas PAI (Pigrau et al., 2013).

Tales Factores de Virulencia se detallan a continuación (ver Cuadro 2):

a. Fimbrias: Estructuras complejas que median la adherencia a receptores epiteliales del hospedador.

-Fimbrias tipo 1: Fimbrias MS o manosa sensible, porque la adherencia se inhibe por manosa. Su receptor son las proteínas manosiladas de las

células epiteliales y de los PMN. Facilita la adherencia a una glicoproteína (uroplakina) de células de vejiga (que no está en riñón) y a otras moléculas del hospedador que contienen manósidos. Se une a la proteína de Tamm-Horsfall (proteína altamente glicosilada) y a IgA. La proteína TH y la IgA secretora son mecanismos de defensa por inhibición de la adherencia a células epiteliales. Su expresión está sujeta a variación de fase. Promotor en posición "on", activa genes que expresan proteínas de la fimbria, y son reconocidos por Acs. En "off", escapan al al mecanismo de defensa del hospedador. La fimbria tipo 1 es fundamental en la patogenia de la infección, ya que en el modelo animal facilita la colonización, induce la respuesta defensiva del huésped, y promueve la formación de IBCs y la invasión de las células del huésped (ver Figura 5) (Pigrau et al., 2013).

-Fimbrias P: También llamadas fimbrias MR o manosa resistentes, porque la adherencia no se inhibe por manosa. Su receptor lo constituyen los glucoesfingolípidos que forman parte del antígeno del grupo sanguíneo P del glóbulo rojo y de las células uroepiteliales (presentes en la vejiga, los uréteres y especialmente en los túbulos renales), por lo que se ve facilitada la ascensión a pelvis renal (Pigrau et al., 2013).

Facilita la adherencia a células de riñón, y las infecciones ascendentes y la bacteriemia. 90% de pacientes con pielonefritis tienen cepas que expresan fimbrias P. Las fimbrias P se asocian a pielonefritis aguda. Presentan tres variantes moleculares (I, II y III) que son codificadas por los correspondientes alelos (papG alelo I, papG alelo II, papG alelo III) y se unen a receptores distintos. Probablemente las tres variantes ejercen misiones patogénicas distintas, siendo la variante II de especial importancia en la producción de pielonefritis. Ello se debe a que su receptor constituido por

c. **Flagelo**; Estructura compleja que otorga movilidad. Relacionado con el ascenso de la bacteria de vejiga a riñón (modelo animal). Participaría en las infecciones de TU altas (Naves, 2010).

d. **Sideróforos:** Proteínas especializadas en adquisición de metales.

- Enterobactina

Implicada en la adquisición de Fe. Implicada en invasión, estimula la producción de citoquinas y la respuesta inflamatoria (Aguado et al., 2012).

e. **Comunidades bacterianas intracelulares (IBC-"intracellular bacterial community", biopelículas o pods)**

Estos IBC consisten en bacterias agregadas bañadas en una matriz rica en polisacáridos y rodeadas por una envoltura de uroplactina. La señal para la internalización de los *E. coli* y la posterior formación de IBC sería la adhesión de las fimbrias tipo 1. Estos IBC pueden constituir un reservorio para los *E. coli* productores de las IU recurrentes, ya que su etapa final se caracteriza por las bacterias fluyendo al exterior de las células vesicales en forma de largos filamentos. Existe evidencia de la formación de IBC en IU humanas y se han observado IBC y bacterias filamentosas en la orina de mujeres aquejadas de cistitis (Naves, 2010).

f. Evasión del sistema inmune

Evasión del mecanismo de defensa mediado por la proteína lipocalina. La lipocalina, liberada por neutrófilos, se une a enterobactina, inhabilitándola para su acción. Acción de evasión: glicosilación de la lipocalina, transformándola en salmoquelina (Drago, 2009; Pigrau et al., 2013).

Variación de fase de la fimbria tipo 1. Cuando el promotor del operón fimbrial está en la orientación correcta ("on") hay expresión de fimbria. Está regulado por factores ambientales (pH, osmolaridad, temperatura, niveles de O2). Si está en "off" evade el sistema inmune, y no hay reconocimiento por los Acs (Pigrau et al., 2013).

Evasión de la acción de citoquinas y de especies reactivas del O2: síntesis de factores que inhiben citoquinas y aumentan la tolerancia a especies reactivas (Pigrau et al., 2013).

Cuadro 2. FACTORES DE VIRULENCIA DE LAS CEPAS DE *E. COLI* INVOLUCRADAS EN INFECCIONES URINARIAS

Factor de virulencia	Función
Superficie	
Fimbria tipo 1	Adhesión al epitelio de la mucosa y a la matriz tisular, invasión, formación de biopelícula
Fimbria P	Adhesión al epitelio de la mucosa y a la matriz tisular, inducción de citocinas
Fimbria S	Adhesión a las células de la mucosa, células endoteliales y a la matriz tisular
Fimbria F1C	Adhesión a las células de la mucosa y endoteliales
Curli	Adhesión a las células de la mucosa y a la matriz tisular, formación de biopelícula
Flagelo	Movilidad
Cápsula	Efectos antifagocitario y anticomplemento, resistencia sérica, evasión del reconocimiento inmune
Lipopolisacárido	Efectos endotóxicos, antígeno O, inducción de citocinas, resistencia sérica, inmunoadyuvante
Proteínas de membrana externa	Receptor y transporte
Exportado	
α-hemolisina	Citotoxicidad, hemólisis
Factor citotóxico necrotizante 1	Interferencia en la fagocitosis y apoptosis
Toxina secretada autotransportadora	Citotoxicidad
Toxina dilatadora citoletal	Citotoxicidad
Citolisina A	Citotoxicidad
Enterobactina	Captación de hierro
Aerobactina	Captación de hierro
Yersiniabactina	Captación de hierro

Adaptado de Emödy et al., 2003.

1.1.2. Factores Del Huésped

Existen varios factores que predisponen a la presentación de la IVU:

- Edad: niños menores de 1 año y niñas menores de 4 años. Mayor riesgo alteración anatómica si se diagnostica en menores de 2 años. Mujeres y adultos mayores son más propensos (Centro Nacional de Excelencia Tecnológica en Salud, 2008; Ugalde et al., 2012).

-Raza: niños caucásicos tienen 2 a 4 veces más riesgo de IVU o Predisposición familiar: familiares de primer grado tienen más riesgo de IVU. Se ha observado que mujeres con IVU recurrentes tienen mayor densidad de receptores para *E. coli* en el uroepitelio. También se ha encontrado que la expresión de antígenos sanguíneos en el uroepitelio facilita la adherencia bacteriana (Rondón et al., 2007).

-Género femenino: Se ha observado que mujeres con IVU recurrentes tienen mayor densidad de receptores para *E. coli* en el uroepitelio. También se ha encontrado que la expresión de antígenos sanguíneos en el uroepitelio facilita la adherencia bacteriana las mujeres tienen de 2 a 4 veces más riesgo de IVU, lo cual se asocia a la presencia de uretra femenina más corta (Rondón et al., 2007).

-Circuncisión: hombres circuncidados tienen 4 veces menos riesgo de IVU que los no circuncidados (Rondón et al., 2007).

También otros factores juegan un papel importante en el huésped ante la posibilidad de padecer ITU (Cuadro 3).

Cuadro 3. FACTORES PREDISPONENTES DEL HUÉSPED

FACTORES PREDISPONENTES DEL HUÉSPED	
Anatómicos	a.- Malformaciones del tracto urinario
	Reflujo vésico-ureteral
	Estenosis urétero-piélica y urétero-vesical
	Valvas de uretra posterior
	Hipospadia
	Divertículos vesicales o ureterales
	Megauréter
	Riñón en esponja (Enfermedad de Cacci Ricci)
	b.- Características propias de la uretra femenina
	c.- Adherencias de labios menores y fimosis
Funcionales	a.- Vejiga neurogénica y Disfunción Vesical
	b.- Retención urinaria
	c.- Inmadurez vesical
Condiciones que generan nefro-urolitiasis	a - Hipercalciuria
	b - Hiperuricosuria
	c - Acidosis Tubular Renal
	d - Hipomagnesuria
	e - Hiperfosfaturia
Inmunosupresión	a - Diabetes Mellitus
	b - Enfermedad renal crónica
	c - Neoplasias
	d - Malnutrición
	e - Trasplante
	f - VIH/SIDA
Instrumentación Urológica	Diverso
Otros	a.- Estreñimiento crónico
	b.- Malos hábitos miccionales e higiénicos
	c.- Actividad sexual en la adolescencia
	d.- Embarazo
	e - Obesidad

Fuente: Adaptado de: Garin et al, 2007 (2); García y González, 2007 (3); López , 2003 (4).

Fuente: Vizcaíno et al, 2011

1.1.3. La interacción entre la resistencia del huésped y la virulencia bacteriana

Se ha demostrado que la disminución de la resistencia reduce los requisitos de virulencia para la bacteria, en tanto que, en un huésped resistente, para que ocurra la infección es necesario que las bacterias tengan características de virulencia que permitan colonizar el tracto urinario y producir reacción tisular. En 1981, se introdujo el término uropatógeno para designar a los organismos que están biológicamente equipados para colonizar el tracto urinario e inducir enfermedad a pesar de los mecanismos de resistencia del huésped.

Debido a que el principal germen causante de ITU es la *Escherichia coli*, las investigaciones sobre virulencia se han orientado en torno a ella; existiendo solo un pequeño número de serotipos capaces de producir ITU, es decir, que depende de su estructura clonal o lo que es igual, de la existencia de cepas derivadas de un mismo ancestro con los mismos factores de virulencia. Por lo tanto, ciertas cepas de *E. coli* son seleccionadas a partir de la flora intestinal por la presencia de factores de virulencia que refuerzan la colonización e invasión del aparato urinario y la capacidad de producir ITU. Se ha demostrado que ciertos serogrupos OKH se asocian con urovirulencia y presencia y expresión de numerosos factores cromosómicos determinantes de virulencia.

Las propiedades adherentes de los gérmenes están involucradas en la selección de bacterias capaces de colonizar el colon, así como en la llegada y

colonización del aparato urinario normal e influyen en el nivel anatómico de la ITU. De manera que se seleccionan las bacterias con mayor capacidad de adherencia a las células vaginales y periuretrales para colonizar las regiones anatómicas cercanas al orificio uretral. La capacidad adhesiva del uropatógeno para originar una ITU alta o baja es muy importante y así por ejemplo las *E. coli* aisladas de pielonefritis, se adhieren mejor que las *E. coli* provenientes de cistitis o una *E. coli* fecal aislada al azar. La adherencia de las bacterias a las células epiteliales es un pre-requisito para la colonización y su persistencia, en un sistema de flujo urinario continuo constituye el principal mecanismo de virulencia del germen, ya que, sin éste, las bacterias uropatógenas que son electronegativas al igual que el uroepitelio, no podrían adherirse. Existe una clara relación entre la capacidad de adherencia in vitro y la severidad de la infección in vivo (Rondón et al., 2007).

La respuesta del huésped a la IU incluye una primera línea defensiva parcialmente mencionada previamente, que implica producción de citoquinas y de péptidos antimicrobianos denominados defensinas, como la alpha y betadefensinas y la catelicidina, además de la afluencia de polimorfonucleares, apoptosis y exfoliación de las células del huésped. El uroepitelio contribuye a la esterilidad del tracto urinario excretando proteínas como la Tamm-Horsfall, que bloquea la adhesión bacteriana, y la lipocalina y la lactoferrina, que limitan la presencia de hierro libre en el tracto urinario (Pigrau et al., 2013).

A pesar de todo ello, algunos uropatógenos son capaces de evadir esta primera línea defensiva y colonizar el uroepitelio. Esta colonización se produce mediante la adhesión de las distintas fimbrias que posee el uropatógeno infectante a sus receptores

específicos localizados en la membrana de las células del epitelio urinario. Simultáneamente, el uropatógeno es reconocido por los receptores Toll-like (TLR). Los TLR son proteínas situadas en la membrana de las células eucariotas del huésped, que actúan como receptores reconocedores de patógenos asociados a patrones moleculares (PAMP). Este reconocimiento desencadena la cascada de respuesta inmunitaria innata. La fijación de las PAMP en los TLR implica la activación de factores de transcripción (NF-kappa B, AP-1, IRF3 y IRF7, entre otros) los cuales regulan múltiples genes, entre ellos algunos que codifican importantes citoquinas proinflamatorias, por lo que se activa la producción de factor de necrosis tumoral (TNF), IL- 1 beta, IL-6, IL-8, IL-12 y interferón tipo 1 (alfa y beta) (Pigrau et al., 2013).

Cada tejido corporal puede expresar uno o más TLR, siendo el TLR4 el más importante en las células epiteliales del tracto urinario. El lipopolisacárido (LPS) contenido en la membrana externa de la pared de los bacilos Gram negativo uropatógenos se fija al TLR4, lo que desencadena la respuesta inmunológica. En el desencadenamiento de esta respuesta, el LPS actuaría en conjunción con las fimbrias tipo 1 y las fimbrias P después de adherirse a sus receptores del uroepitelio. Otros TLR, como el TLR5 que reconoce a la flagelina y el TLR11, están también involucrados en la defensa del huésped contra los uropatógenos.

Se ha demostrado que los ratones con una mutación en el dominio TIR del TLR4 se defienden peor de la IU experimental, y que los ratones tlr4 tienen en su vejiga una carga bacteriana significativamente más alta que los ratones salvajes. Ciertos polimorfismos de los TLR pueden modificar la susceptibilidad a la IU. Por

esto se han asociado ciertos polimorfismos de los TLR4 y TLR2 con un aumento de susceptibilidad a las IU en niños, a los polimorfismos TLR1-G180ST y TLR4-A896G con protección frente a la pielonefritis y a las IU recurrentes en adultos respectivamente y al polimorfismo TLR5-C1174T con susceptibilidad aumentada a las IU recurrentes en adultos (Pigrau et al., 2013).

1.2. Epidemiología

La infección del tracto urinario (ITU) es una de las infecciones bacterianas más frecuentes en Pediatría, ya que el 8-10% de las niñas y el 2-3% de los niños tendrán una ITU sintomática antes de los siete años de edad, siendo más frecuente en varones en los primeros tres meses de vida y produciéndose un incremento progresivo con predominio de niñas a partir del año de vida, con alta probabilidad de recurrencia (>30%) por reinfecciones con gérmenes distintos al de la primera manifestación, especialmente durante el primer año tras el episodio inicial. En cuanto a la prevalencia de ITU de acuerdo a la raza, diversos estudios muestran una mayor prevalencia en asiáticos, seguida de niños y niñas de raza blanca e hispanos, y por último en afroamericanos (González & Rodríguez, 2014).

Las infecciones del tracto urinario (ITU) son un problema frecuente en adultos en. Un tercio de las visitas a las consultas de Atención Primaria lo son por procesos infecciosos. De estos, un 10% son ITU. Si añadimos las que se auto medican y las que acuden a las urgencias hospitalarias o ambulatorias, nos hacemos una idea del importante problema de esta patología, en cuanto a número que no gravedad, lo que conlleva un gran

consumo de antibióticos. La mayoría de las ITU ocurre en mujeres sin enfermedades de base y sin anomalías funcionales o estructurales del tracto urinario, por lo que se consideran ITU no complicadas (Pigrau et al., 2013).

En el año 2007, en Estados Unidos, hubo 8,6 millones de consultas médicas por ITU, el 84% de mujeres. Las mujeres jóvenes que mantienen relaciones sexuales tienen aproximadamente 0,7 episodios de cistitis por persona-año, y según un estudio poblacional, las mujeres postmenopáusicas, 0,07 episodios por persona-año. En otro trabajo, cerca del 10% de mujeres postmenopáusicas contactadas por teléfono afirmaron haber tenido un episodio de ITU en el año previo. Se calcula que el 50-60% de las mujeres adultas tendrá al menos un episodio de ITU. Aunque de poca gravedad en comparación con otras infecciones, su impacto es considerable. Cada episodio en una universitaria supone una media de 6 días de síntomas y 2,4 días de actividad restringida (Agirrezabala et al., 2011; Pigrau et al., 2013).

El pico de incidencia de ITU no complicada en mujeres se da en las edades de máxima actividad sexual, de los 18 a los 39 años. El factor de riesgo más importante es el haber tenido relaciones sexuales recientes. Otros factores de riesgo son el uso de espermicidas o de diafragma, así como factores genéticos (Pigrau et al., 2013).

Las ITU recurrentes no complicadas son comunes en mujeres jóvenes sanas. En un estudio en universitarias con su primer episodio de ITU, el 27% tuvo al menos una recurrencia confirmada por cultivo en los seis meses siguientes, y el 2,7% una segunda recurrencia en el mismo periodo. Cuando *Escherichia coli* es el agente causal del primer episodio es más probable que tengan una recurrencia en

los seis meses siguientes que si se trata de un microorganismo distinto. En otro estudio en mujeres de edades entre 17 y 82 años con cistitis por *E. coli*, el 44% tuvieron al menos una recurrencia en el siguiente año (Pigrau et al., 2013).

La pielonefritis aguda no complicada es mucho menos común que la cistitis (relación 1/28), con un pico anual de incidencia de 25 casos por 10.000 mujeres de 15 a 35 años de edad. En un estudio poblacional se calculó que cada año hay unos 250.000 casos de pielonefritis en Estados Unidos, sobre todo en mujeres de 18 a 49 años de edad, con una incidencia de 28 casos por 10.000, de los que el 7% se hospitalizan. Los factores de riesgo más importantes, (relaciones sexuales, historia personal y familiar de ITU, diabetes e incontinencia) son similares a los de cistitis (Pigrau et al., 2013).

En pacientes de edad avanzada la incidencia de ITU sintomática es menos conocida. En un estudio, la incidencia de ITU sintomática fue de 0,17/1.000 días en varones no institucionalizados, de 0,9/1.000 días en mujeres que residían en pisos tutelados geriátricos y del 0,1-2,4 por 1.000 días de estancia en ancianos ingresados en residencias geriátricas. Los factores de riesgo de ITU sintomática en el anciano son la edad, el sexo, la capacidad para realizar las actividades de la vida diaria, las enfermedades de base, la instrumentación urinaria, los problemas de vaciado, es decir, cualquier obstrucción anatómica o funcional (vejiga neurógena), y la diabetes (Pigrau et al., 2013).

Un alto porcentaje de desaparición y aparición espontánea de ésta en ambos sexos. En esas edades la bacteriuria asintomática es mucho más frecuente que la ITU sintomática. ITU complicada se refiere a la infección en un tracto urinario con anomalías funcionales y/o estructurales. En varones, casi todas las ITU se consideran complicadas.

La prevalencia de bacteriuria en varones es baja, y aumenta con los años como consecuencia de patologías de la próstata e instrumentación del tracto urinario. La incidencia de ITU sintomática en varones adultos es mucho menor que en mujeres, cada año se dan 5-8 episodios por 10.000 varones menores de 65 años (Pigrau et al., 2013).

1.3. Diagnóstico

El diagnóstico de ITU debe plantearse frente a una historia y examen físico sugerente, asociado a un examen de orina compatible. Se confirma con un urocultivo positivo. El recuento de colonias significativo dependerá del método por el cual haya sido tomada la muestra (Salas et al., 2012).

En la infancia, a diferencia de lo que ocurre en otros grupos de edad, se considera necesario obtener una muestra de orina para confirmar o descartar una sospecha de ITU, especialmente cuando se trata de un cuadro febril. En recién nacidos y lactantes es recomendable tomar la muestra de orina a través de un catéter uretral. En niños con control de esfínteres, se debe tomar la muestra de cualquier periodo después de tres meses posteriores al evento infeccioso agudo, para evidenciar la extensión de diagnóstico válido de infección urinaria permite el tratamiento y seguimiento correctos de los niños con riesgo de daño renal y evita tratamientos y seguimientos innecesarios en el resto de los niños. Por el contrario, cuando existe un foco infeccioso alternativo claro, no debe obtenerse una muestra

de orina, especialmente utilizando un método de recogida con riesgo alto de contaminación (Salas et al., 2012).

En Adultos el diagnóstico de las IVU no complicadas se realiza con base en el cuadro clínico. En los casos en que los síntomas son leves o incipientes se recomienda realizar "a la cabecera del paciente", de ser posible durante la consulta, un examen de orina con tira reactiva para detectar nitritos y esterasa leucocitaria.

El EGO ampliado, con el análisis microscópico del sedimento, no aporta mayor evidencia para el diagnóstico de IVU. No se justifica realizar urocultivo ni estudios de imagen30 en caso de la IVU aislada no complicada. Estos deben realizarse solamente en pacientes con fiebre que persiste, aun 72 horas después de haber iniciado el tratamiento. El urocultivo se recomienda en casos de sospecha de pielonefritis, síntomas persistentes o que recurren dentro de las primeras 2 a 4 semanas de haber concluido el tratamiento y en caso de síntomas atípicos. El diagnóstico diferencial más importante se realiza con las infecciones vulvovaginales, donde es común que la paciente confunda la disuria con el ardor vulvar terminal, que produce irritación por la orina en la vulva inflamada. La vejiga hiperactiva es otro de los diagnósticos diferenciales. Es una enfermedad generalmente idiopática, cuyos síntomas cardinales son urgencia, frecuencia e incontinencia urinaria (Calderón et al., 2013).

a. Análisis de la orina

Los resultados de algunas determinaciones realizadas de forma rápida en la orina de los pacientes aumentan o disminuyen la probabilidad de diagnosticar una ITU

SISTEMA DE BIBLIOTECAS DE LA
UNIVERSIDAD DE PANAMA

Cuadro 4. MÉTODOS DE RECOGIDA DE LA ORINA. VENTAJAS, INCONVENIENTES E INDICACIONES.

	Urocultivo positivo	Ventajas	Inconvenientes
Chorro miccional limpio	≥100 000 UFC/ml de un germen	• Aceptables indicadores de validez diagnóstica • No invasivo • Sencillo	• Riesgo de contaminación dependiente de higiene y medidas de limpieza
Bolsa adhesiva	≥100 000 UFC/ml de un germen	• No invasivo • Sencillo	• Tasa de falsos positivos muy elevada (>50%) Necesita muestra de confirmación si el resultado es positivo
Cateterismo vesical	De 10 000 a 50 000 UFC/ml de un germen	• Sensibilidad: 95% • Especificidad: 99%	• Invasivo • Riesgo de trauma uretral • Cierto riesgo de contaminación
Punción suprapúbica	Cualquier crecimiento de gérmenes Gram (-) y crecimiento de algunos cientos de colonias de cocos Gram (+)	Técnica de referencia	• Invasivo • Éxito variable (30-70%) • Idealmente precisa control ecográfico

Fuente : Modificado de González & Rodríguez, 2014

establecida mediante la sospecha clínica y ayudan a decidir si es necesario iniciar precozmente el tratamiento antibiótico, aunque es posible que en ocasiones se inicie tratamiento de forma innecesaria en pacientes con leucocituria febril, causa frecuente de falso diagnóstico de ITU, y/o en portadores de BA que presenten nitritos positivos y un proceso intercurrente febril de otra naturaleza (González & Rodríguez, 2014; Pigrau et al., 2013).

b. Urocultivo

Es la prueba definitiva para el diagnóstico de ITU, orientando el tratamiento definitivo según el antibiograma, por lo que se recomienda su realización siempre que sea posible. Es especialmente necesario en los siguientes pacientes y situaciones:

- Pacientes que todavía no han alcanzado el control de la micción.
- Pacientes con riesgo de enfermedad grave.
- Sospecha clínica de PNA.
- Discordancia entre la clínica y los hallazgos del análisis de la orina (González & Rodríguez, 2014)

1.4. Tratamiento

Las metas del tratamiento de una ITU son eliminar la infección aguda y sus síntomas, prevenir sus complicaciones y reducir la probabilidad de un daño renal a futuro. Para ello, es de suma importancia conocer cuatro factores que influyen en la elección del antimicrobiano y la duración del tratamiento: el tipo de bacteria y su susceptibilidad in vitro, la ubicación de la ITU (alta o baja), el contexto clínico (tolerancia, gravedad, etc.) y la edad del paciente. Normalmente, el inicio de la antibioterapia ocurre previo a conocerse el resultado del urocultivo, por lo que la elección del fármaco suele tener una base empírica y basada en la epidemiología local. Parece claro que, dado que sobre 90% de los agentes uropatógenos son bacterias entéricas gramnegativas, el tratamiento inicial debe incorporar, al menos, un antimicrobiano activo sobre estas bacterias (usualmente una cefalosporina o un aminoglucósido), adicionando ampicilina en casos de niños bajo 2 meses de edad, en que la incidencia de Enterococcus sp es mayor que en otras edades (Cavagnaro, 2012).

Cuadro 5. POSOLOGÍA RECOMENDADA DE ANTIMICROBIANOS PARA INFECCIÓN DE VÍAS URINARIAS NO COMPLICADAS

Antibiótico*	Niños	Adultos		Nivel de Evidencia**
		Hombres y mujeres	Embarazadas	
TMP-SMX	10 mg/kg/día en 2 dosis	160/800 mg cada 12 horas	Contraindicada	IA
Nitrofurantoína	7 mg/kg/día en 3 o 4 dosis	100 mg cada 6-8 horas	100 mg cada 6-8 horas	IIA
Fosfomicina trometamol	2 g VO dosis única	3 g VO dosis única	3 g VO dosis única	IA
Quinolonas				
Ácido nalidixico	No aplica	1 g VO cada 6 horas	Bajo estricta supervisión médica	IA
Ciprofloxacina	No aplica	500 mg cada 12 horas		
c 1 g cada 24 horas	Contraindicada			IA
Norfloxacina	No aplica	400 mg cada 12 horas	Contraindicada	IA
Ofloxacina	No aplica	400 mg cada 24 horas		
c 200 mg cada 12 horas	Contraindicada			IA
Rufloxacina	No aplica	200 mg cada 12 horas	Contraindicada	IB
Cefalosporinas				
Cefuroxima	10 mg/kg/día en 2 o 3 dosis	No aplica	500 mg cada 12 horas	IA
Cefixima	9 mg/kg/día en una dosis	400 mg cada 24 horas	400 mg cada 24 horas	IA
Cefixime	8 mg/kg/día en una dosis	400 mg cada 24 horas	400 mg cada 24 horas	IA

*El tratamiento se puede prolongar de 3 a 5 días. TMP, trimetoprima; SMX, sulfametoxazol; VO, vía oral. Adaptado de[44,45] **Calidad de la evidencia. I. Evidencia proveniente de >1 ensayo aleatorizado y controlado. II. Evidencia proveniente de >1 ensayo clínico bien diseñado pero sin aleatorización; de estudios analíticos de cohorte o casos-control (de preferencia, que incluyan a más de un centro); de múltiples series de casos o de resultados significativos provenientes de experimentos no controlados. III. Evidencia proveniente de opiniones de autoridades respetadas, basadas en la experiencia clínica, estudios descriptivos o comunicaciones de comités de expertos. Fuerza de la recomendación: A. Buena evidencia para recomendar su uso. B. Moderada evidencia para recomendar su uso. C. Pobre evidencia para recomendar su uso. D. Moderada evidencia para no recomendar su uso. E. Buena evidencia para no recomendar su uso.

Fuente:(Calderón et al., 2013)

2. VACUNAS ORALES

El uso de probióticos constituidos por cepas de *E. coli* se inició en la década de 1920, para el tratamiento de enfermedades intestinales infecciosas e inflamatorias crónicas. El concepto de la utilización de sustratos bacterianos con el fin de estimular el sistema inmunológico y reducir la IU recurrente surgió hace 40 años, cuando el conocimiento sobre los mecanismos inmunes potenciales involucrados no era bien comprendido. En la década de 1980 hubo una disminución en la incidencia de infección urinaria en los adultos, niños y mujeres embarazadas tratadas con extracto de *E. coli* (Meredith, M. & Chiavaroli, C., 2010; Pigrau et al., 2013).

En 1986 observaron una reducción significativa del uso de antibióticos en mujeres con cistitis recurrente tratados con extracto bacteriano (Carraro & Ambrosio, 2012). Los extractos compuestos por bacterias en su forma integral o fragmentos de ellas promovieron la protección en algunos individuos. Las Fimbrias y otras moléculas expresadas en la superficie bacteriana se convirtieron en un objeto de estudio con potencial para el desarrollo de vacunas (Pigrau et al., 2013).

En los últimos años, una mayor comprensión de los mecanismos involucrados en la respuesta inmune tiene un uso consolidado de estas sustancias como inmunoestimulantes (Carraro & Ambrosio, 2012).

Las vacunas son preparados biológicos utilizados para establecer o mejorar la inmunidad humoral contra una enfermedad específica. La respuesta inmune adaptativa comienza cuando el patógeno invasor es capaz de evadir los mecanismos de defensa que participan en la respuesta inmune innata. Su eficacia está relacionada con la interacción de tres tipos de células: las células presentadoras de antígeno, los linfocitos T derivados del timo y los linfocitos B de la médula ósea. Los primeros son capaces de captar, procesar y presentar el antígeno a las células T para el reconocimiento por el receptor de la superficie celular. Los receptores de la superficie de las células B, es decir, las inmunoglobulinas pueden reconocer directamente el antígeno, procedimiento que conduce a la producción de células plasmáticas capaces de secretar subclases de anticuerpos (IgA, IgE, IgG e IgM). Estos anticuerpos actúan en la prevención o la contención de la infección temprana y están involucrados en la destrucción de células infectadas a través de la citotoxicidad dependiente de anticuerpos o lisis mediada por complemento. La memoria inmunológica permite el rápido aumento en la respuesta después de la reexposición al antígeno. Este efecto juega un papel importante en la función del sistema inmune, y es un principio de la vacunación (Carraro & Ambrosio, 2012).

Una estrategia que nos parece más atractiva por su simplicidad es la administración de vacunas por vía oral o intranasal. Estas vacunas están realizadas a partir de extractos bacterianos de varias cepas de bacterias uropátogenas, obtenidos por lísis alcalina, la cual destruye las moléculas de LPS, pero mantiene su potencial antigénico tras su administración por vía mucosa, estimulando la inmunidad innata a través del Toll-like receptor 4 (TLR4), activando la actividad fagocítica del macrófago y la producción de

citoquinas. Estudios experimentales han demostrado que la administración por vía oral de los extractos bacterianos estimularía la producción de interleucinas 6 y 12, de interferón gamma y de anticuerpos específicos a nivel sérico. Además, se ha observado que se incrementan los niveles de Il-6 e interferón gamma a nivel de la vejiga urinaria que incrementarían la respuesta inflamatoria (Pigrau et al., 2013).

La inmunoestimulación con extractos bacterianos ha demostrado ser eficiente y segura desde hace varias décadas. Un ejemplo es el OM-89, el cual es un producto inmunoactivo fabricado con 18 cepas seleccionadas y estandarizadas de Escherichia *coli*, y es el único inmunoterapéutico oral en el mercado para tratar las ITU con estudios clínicos de Fase II y III. Las cepas se cultivan por separado en fermentadores industriales, se las destruye y fracciona. Luego se purifica y liofiliza el extracto para finalmente comercializarlo como Uro-Vaxom® (OM PHARMA, Meyrin/Ginebra, Suiza). El producto final está compuesto principalmente de proteínas ácidas, péptidos y aminoácidos. La electroforesis en gel muestra un espectro continuo de proteínas que varían de unos cientos a cientos de miles de Daltons, y otros componentes en cantidades menores, como moléculas de lipopolisacáridos, moléculas lipídicas A, azúcares y ácidos grasos hidrolizados y luego detoxificados que podrían también ser responsables de su actividad. El producto mejora la respuesta inmunitaria con la administración oral. Cada cápsula contiene 6 mg de extracto liofilizado de cepas de Escherichia *coli*. Su actividad no se limita a las cepas utilizadas para su fabricación pues también previene la infección con otros gérmenes patógenos, como Proteus *mirabilis* y Klebsiella

pneumoniae, y por ende proporciona un amplio espectro de protección (Meredith, M. & Chiavaroli, C., 2010).

Los informes de un ensayo aleatorio multicéntrico ciego de OM-89 entre 453 mujeres con infección urinaria aguda, encontraron una reducción significativa en las infecciones urinarias recurrentes en el grupo tratado durante un periodo de 12 meses (40% versus 55%). Sin embargo, el 20% de aquellos en el grupo activo, y el 16% en el grupo placebo discontinuaron la terapia temprana; el régimen de una dosis diaria durante 3 meses, seguido de tratamiento durante los primeros 10 días del mes 7-9, fue largo y potencialmente complicado. Lo ideal sería que una vacuna fuera dada sólo un par de veces y que sea de larga duración. Esto puede ser un reto debido a que las *E. coli* uropatógenas son bastante diversas y utilizan una variedad de mecanismos para causar la enfermedad. Diversas vacunas han sido probadas o están en fase de desarrollo, sobre la base de los polisacáridos de superficie, factores de adherencia, toxinas, adquisición de hierro, subunidad multiepítope, proteínas hipotéticas, ingeniería genética, o como OM-89 multicepa de células enteras. La mayoría han sido probadas sólo en modelos de ratones o ratas o primates. La vacuna ideal IU parece distar mucho en el futuro (Foxman & Buxton, 2013).

A nivel mundial la profilaxis continua con antibióticos es el tratamiento inicial recomendado para ITU. El sulfametoxazol / trimetoprim (SMX / TMP) por un período de 6 meses, es la opción más recomendable. Sin embargo, el uso continuo de antibióticos no está libre de riesgo. La multirresistencia de las bacterias a los antibióticos es cada vez mayor, lo que crea la situación dramática que más del 40% de las cepas bacterianas sean resistentes a los antibióticos disponibles en algunas regiones del mundo. Un problema

añadido es la alta incidencia de reacciones adversas asociadas con el uso de antibióticos y otros agentes quimioterapéuticos. Por lo tanto, es razonable considerar otras estrategias preventivas como las que refuerzan los mecanismos naturales de defensa de patógenos (Lorenzo et al., 2013).

Existe una estrategia potencial para prevenir la IU mediante la instalación intravesical de *E. coli* avirulentos manipulados genéticamente. Podría ser útil en pacientes con infecciones complicadas recurrentes y factores de riesgo, en los que falla la profilaxis convencional. En un estudio utilizando esta cepa en pacientes con lesión medular, se obtuvo una reducción de IU sintomáticas del 50%, aunque este beneficio no se ha demostrado en otro tipo de pacientes (Pigrau et al., 2013).

Basándose en la hipótesis de que las vacunas anti-IU incrementarían el nivel de anticuerpos en las superficies mucosas del tracto genitourinario, lo que prevendría la adherencia de las bacterias al mismo, se han desarrollado vacunas de células enteras que contienen combinaciones de uropatógenos muertos por calor. Se suelen presentar en forma de supositorios vaginales que contienen $2x10^9$ células/supositorio. Estas vacunas, que se podrían clasificar como convencionales, han mostrado mínimos efectos adversos, pero no acaban de funcionar, probablemente debido a la gran variabilidad antigénica de los UPEC y a la gran diversidad de sus mecanismos de virulencia (Pigrau et al., 2013).

Actualmente y con el fin de obviar los problemas de las vacunas convencionales, se tiende a las vacunas que se podrían denominar funcionales, basadas en la idea de que los anticuerpos dirigidos contra factores de virulencia de los uropatógenos, pueden inhibir su actividad biológica y consecuentemente

disminuir su infectividad y/o persistencia. Una de las vacunas desarrolladas es contra la proteína FimH de las fimbrias tipo 1 *de E. coli*. En experimentos in vitro el suero de los animales vacunados con ella inhibe la adhesión de las *E. coli* uropatógenas a las células epiteliales vesicales. En un modelo murino de experimentación animal, la inmunización con FimH reduce la colonización de la mucosa vesical en más del 99%. También se están desarrollando vacunas antihemolisina, antifimbrias P, antirreceptores de hierro, etc., aunque la baja solubilidad de los antígenos y la gran diversidad de factores de virulencia que actúan conjunta y simultáneamente, son los obstáculos más importantes para que estas vacunas ejerzan una acción protectora contra la mayoría de los agentes causantes de infecciones urinarias. La alternativa más prometedora parece ser una vacuna basada en una combinación de varias proteínas que codifican todos o la gran mayoría de UPEC, y que serían identificadas mediante estudios genómicos (Pigrau et al., 2013).

2.1. OM-89 en el Tratamiento de la ITU Recurrente

El fármaco OM-89 se compone de extractos bacterianos producidos mediante la biotecnología, siendo causal de diversos estudios, que totalizan alrededor de 2000 pacientes, en los últimos quince años. Se presenta en una cápsula que contiene 6 mg liofilizados del extracto de 18 cepas de Escherichia *Coli*, correspondientes a las principales cepas causantes de las infecciones urinarias. La mitad de estas cepas provienen de la "Colección Nacional de Tipos de Cultivos (NCTC)" de Londres y la otra mitad, de la "Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos" del *Instituto Pasteur* de París. La preparación se realiza mediante un proceso de biotecnología muy avanzado y

los cultivos tardan alrededor de un mes para obtener las 18 cepas de bacilos *coli*. El proceso tiene varias etapas: purificación, filtración, liofilización y adición de excipientes para la absorción gástrica (Schulman, 2007).

2.2. Características Generales de OM-89

a. Fórmula Cualicuantitativa:

Cada cápsula contiene:

Lisados bacterianos liofilizados de

Escherichia coli (como liofilizado estandarizado)...6,00 mg

Almidón de maíz pregelatinizado.....77,00 mg

Galato de propilo anhidro.....0,084 mg

Estearato de magnesio.....3,00 mg

Glutamato sódico anhidro.....3,03 mg

Manitol c.s.p.....200 mg

b. Acción Terapéutica

Agente inmunoestimulante urológico

(Código ATC: G04BX)

c. Indicaciones

Inmunoterapia. Prevención de infecciones recurrentes de las vías urinarias inferiores. Adyuvante en el tratamiento de las infecciones agudas de las vías urinarias (Laboratorios Eurolab, 2011).

d. Datos de inocuidad preclínica:

Los estudios extensivos de toxicidad no han demostrado un efecto tóxico (Laboratorios Eurolab, 2011).

e. Farmacocinética:

No se dispone de modelo experimental a la fecha (Laboratorios Eurolab, 2011).

f. Dosis y vía de administración

Tratamiento preventivo y/o terapia de consolidación: 1 cápsula diaria en ayunas durante 3 meses consecutivos. Tratamiento de episodios agudos: 1 cápsula diaria en ayunas como adyuvante a las terapias antiinfecciosas de los síntomas (pero al menos durante 10 días consecutivos) (Laboratorios Eurolab, 2011).

g. Contraindicaciones

Hipersensibilidad conocida frente a los constituyentes de Uro-Vaxom® (Laboratorios Eurolab, 2011).

h. Precauciones

La eficacia y la inocuidad de OM-89 no han sido establecidas en niños menores de 4 años (Laboratorios Eurolab, 2011).

• Interacciones: Hasta la fecha no se conoce ninguna interacción con otros medicamentos (Laboratorios Eurolab, 2011).

• Embarazo/Lactancia: Los estudios de reproducción animales no han demostrado riesgo alguno para el feto, pero no se dispone de un estudio controlado en la mujer embarazada. Con respecto a la lactancia, no hay ningún estudio específico ni dato compilado hasta el presente (Laboratorios Eurolab, 2011).

• Efectos sobre la capacidad de conducir y manejar máquinas: Se admite que OM-89 es seguro y no provoca efecto sedativo (Laboratorios Eurolab, 2011).

i. Reacciones Adversas

La incidencia general de efectos secundarios en los ensayos clínicos se encuentra en alrededor del 4%. Los efectos indeseables más frecuentemente reportados son: problemas gastrointestinales (diarrea, náuseas, dolor abdominal), reacciones dermatológicas (prurito, exantema), así como problemas generales (fiebre ligera). En los casos de reacciones cutáneas o de fiebre, el tratamiento debería interrumpirse, ya que puede tratarse de reacciones alérgicas (Laboratorios Eurolab, 2011).

j. Sobredosificación

Hasta la fecha no se conoce ningún caso de sobredosificación. Vista la naturaleza de OM-89 y los resultados de las pruebas de toxicidad en animales, parece imposible llegar a una sobredosis (Laboratorios Eurolab, 2011).

2.3. Mecanismos de acción

El OM-89 es un fármaco inmunoestimulante específico e inespecífico, que produce:

a. Activación de la inmunidad innata, principalmente vía TLR 4 (*Toll-like receptor 4*), receptores de membrana (CPAs), uniéndose a la molécula extraña que se considera como "señal de peligro". A nivel de las placas de Peyer, que es un grupo de folículos linfoides que se ubican en la lámina propia del intestino, esta activación se traduce en: estimulación de la actividad fagocítica de macrófagos y neutrófilos; incremento de la maduracón de células dendríticas; incremento de moléculas de adhesión sobre la superficie del neutrófilo; inducción de la producción de interferón alfa e interleucina 12 por los macrófagos e incremento de la producción de interferón gamma por las células T (Pigrau et al.,2013).

b. Activación de la inmunidad adaptativa, mediante estimulación de la proliferación y actividad de las células T y B e incremento de IgA e IgG específicas para *Escherichia*

coli, tanto en el suero como en la mucosa.

En suma, el fármaco produce una activación inmunitaria a nivel de las placas de Peyer y luego, una migración de los linfocitos T y B activados a todos los tejidos linfoides asociados con mucosa, en particular con la mucosa urinaria, aspecto de gran interés para el tratamiento de las infecciones urinarias (Schulman, 2007).

La inmunoestimulación se puede realizar de dos formas según el nivel en que se estimulan las inmuglobulinas: puede ser a nivel del tejido linfático, mediante una inmunización general por vía parenteral, por medio de una vacuna clásica o a nivel del tejido mucoso por vía oral, mediante comprimidos que se absorben en el intestino e inducen una reacción en las placas de Peyer. Se aumenta el número de linfocitos y de células natural killer y se estimula la secreción de inmunoglobulinas específicas contra Escherichia *coli* e inespecíficas contra otras bacterias, las que van a actuar en distintos niveles del tejido mucoso. En un experimento efectuado en dos grupos de ratas, uno que recibió OM-89 y otro control, se demostró un aumento significativo de la IgA específica contra las 18 cepas más frecuentes de bacilos *coli* (Schulman, 2007).

Lo anterior demuestra que una de las propiedades de este producto es actuar como estimulante del sistema inmune del huésped, facilitando que el organismo reaccione con prontitud contra bacilos *coli* y otras bacterias como *Klebsiella*, al desencadenar una repuesta inmune específica e inespecífica (Ver Figura 6). Además, tendría propiedades antiinflamatorias. Todo esto lleva a plantear que este fármaco podría mejorar la sintomatología urinaria o reducir la

severidad de los síntomas y sería útil en la prevención de infecciones urinarias recurrentes (Schulman, 2007).

2.4. Experiencias Clínicas

2.4.1. Experiencia clínica en pacientes adultos

Diversas investigaciones y estudios abiertos y aleatorios, doble ciego, controlados con placebo han salido a la luz; demostrando reducción de las recurrencias y sintomatología, y uso de antibióticos, durante el desarrollo investigativo y en los 3 meses posteriores a la culminación del tratamiento. Son casi nulas las reacciones adversas, mayormente fueron leves, según los reportes. El tratamiento se basaba en la toma de una cápsula de OM-89 por día durante 90 días continuos. Reportándose finalmente efectos preventivos de OM-89 que se prolongan 3 a 6 meses culminado el tratamiento (Meredith & Chiavaroli, 2010).

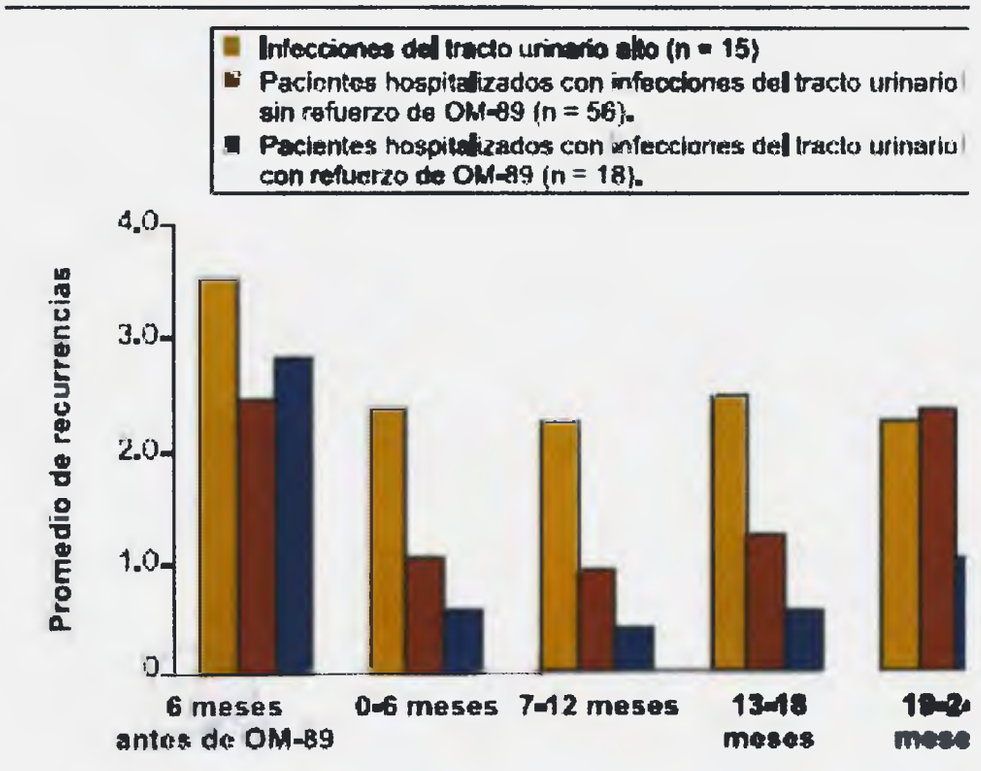
Existen otros estudios cuya premisa fue evaluar el efecto del refuerzo de OM-89. En uno de ellos (de tipo abierto con 116 pacientes mujeres), conjuntamente con el programa estándar (3 meses de tratamiento con 1 cápsula de OM-89 al día y 3 meses de seguimiento) se les suministraba un refuerzo con 1 cápsula diaria de OM-89 durante 10 días cada mes durante 6 meses. Disminuyendo la media de ITU de 3.4 antes del estudio a

1.2 durante el estudio. Sufriendo algunos pacientes de eventos adversos gastrointestinales leves solamente (Meredith & Chiavaroli, 2010).

Posteriormente en otro estudio 89 mujeres recibieron OM-89 durante 3 meses y fueron observadas durante los siguientes 6 meses. Este período de observación se extendió por 6 ó 18 meses adicionales en 77 y 14 pacientes, respectivamente. Dieciocho de 89 pacientes recibieron dosis de refuerzo de OM-89, comenzando 3 meses después del cese del curso inicial del tratamiento de 3 meses, 1 cápsula/día por 10 días al mes durante 3 meses consecutivos. El número de infecciones del tracto urinario alto disminuyó con respecto al valor basal y permaneció estable hasta el final del estudio. En los pacientes con infecciones del tracto urinario bajo, sin tratamiento de refuerzo, el número de recurrencias fue menor durante los meses 0-12 en comparación con el valor basal y luego gradualmente aumentó desde el mes 13 al 24, pero permaneció menor que antes del tratamiento. En las pacientes con infecciones del tracto urinario bajo que recibieron tratamiento con refuerzo, el número de recurrencias, el recuento bacteriano y la duración del tratamiento antibiótico fue menor durante todo el estudio. Solo 2% de los pacientes experimentó eventos adversos gastrointestinales leves (Meredith & Chiavaroli, 2010).

De forma reciente en un estudio doble ciego controlado en el cual se suministró placebo de 12 meses, se examinó el efecto preventivo de OM-89 en 453 mujeres tratadas con 1 cápsula diaria durante 3 meses y luego con un refuerzo durante 10 días en los meses 7, 8 y 9. La media de ITU luego de la determinación de los valores basales durante los 12 meses del estudio fue significativamente

menor en 34 % en el grupo activo que en el grupo placebo (0.84 versus 1.28, $p < 0.003$). La duración total de las recurrencias fue menor en 49% en el grupo OM-89 con respecto al placebo (1.95 versus 3.82 días). La prescripción de antibióticos y la frecuencia de síntomas fue significativamente menor en el grupo activo que en el grupo placebo y con buen perfil de seguridad (Meredith & Chiavaroli, 2010).



Gráfica 1. Número de recurrencias de infecciones del tracto urinario alto y bajo durante 6 meses antes de tratamiento con OM-89 y durante 24 meses de seguimiento. Fuente: Meredith & Chiavaroli, 2010.

2.4.2. Experiencia clínica en niños

En un estudio abierto, al azar, prospectivo, controlado con placebo, de 18 meses, 40 niñas (edad promedio 6.5 años, rango 2-10 años) con ITU recurrente fueron divididas en 2 subgrupos y tratadas de la siguiente manera durante 3 fases consecutivas de 6 meses: Durante la primera fase, todas las pacientes recibieron el antibacteriano nitrofurantoína (1 mg/kg/día), mientras que en la fase, 22 pacientes cambiaron a 1 cápsula de OM-89 al día y 18 permanecieron con nitrofurantoína; la última fase sirvió como período de observación adicional sin tratamiento. Durante los 6 meses antes del estudio, la media de recurrencias fue 2 (en los dos subgrupos). Durante la primera fase (nitrofurantoína), esta cifra disminuyó a 0.05 en los dos subgrupos, mientras que en la segunda fase (OM-89 o nitrofurantoína), se elevó a aproximadamente 0.2 en los dos subgrupos, y en la tercera fase (sin tratamiento), la media permaneció significativamente menor ($p < 0.0003$) en comparación con los 6 meses antes del estudio, alcanzando 0.14 en el subgrupo OM-89 y 0.24 en el subgrupo nitrofurantoína. No se informaron eventos adversos relacionados con el medicamento (Meredith & Chiavaroli, 2010).

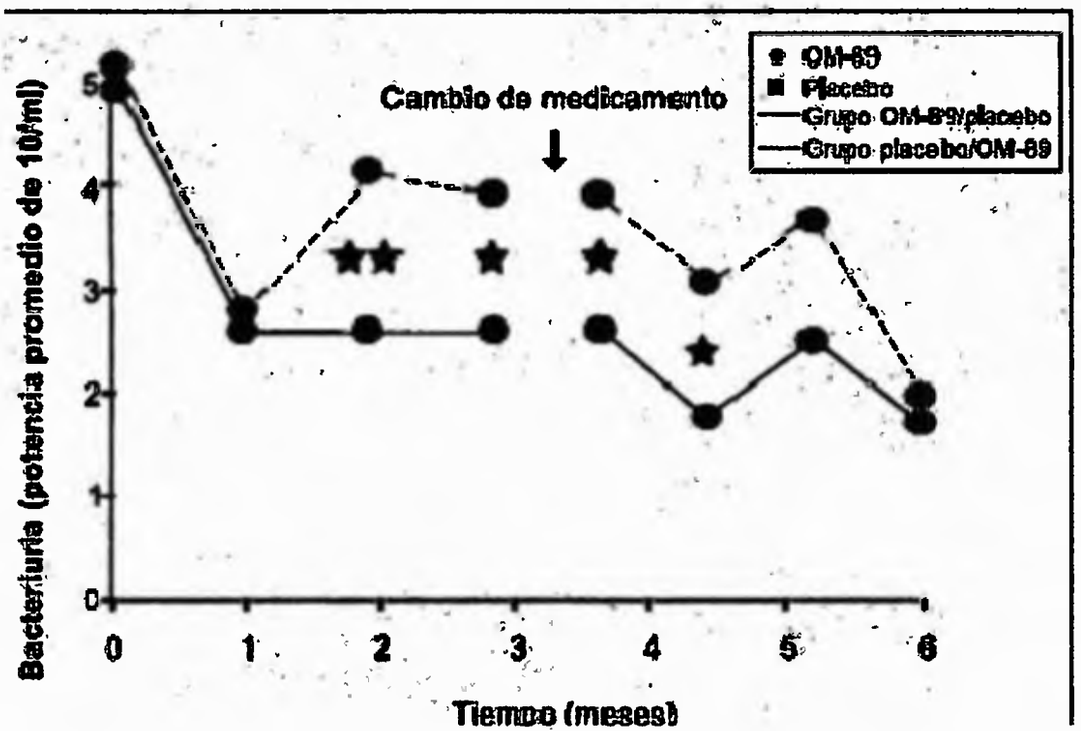
En un estudio abierto, al azar, controlado con placebo, realizado en 38 niños, con edades de 3-12 años e ITU recurrente, 25 recibieron OM-89 más un antibiótico y 13 solo un antibiótico durante 3 meses [26]. La tasa de pacientes con ITU fue similar en los 2 grupos durante el período de tratamiento (aproximadamente 33%), pero en los siguientes 3 meses sin tratamiento, solo 16%

del grupo OM-89 tuvo ITU en comparación con 54% del grupo de control con antibiótico, diferencia que se correlaciona con los niveles de IgA secretora (IgAs) durante el estudio. Antes del tratamiento, los niveles medios de IgAs urinaria fueron menores de lo normal (0.5 mg/L) con 0.20 mg/L en el grupo OM-89 y 0.26 mg/L en el grupo control. Tres meses después del cese de la terapia, los niveles IgAs no habían cambiado en el grupo control (0.27 mg/L), aunque en el grupo OM-89, los niveles IgAs aumentaron significativamente con respecto al valor basal hasta 0.33 mg/L ($p = 0.02$), lo cual demuestra que OM-89 en combinación con un antibiótico es más eficaz que solo la terapia antibiótica (Meredith & Chiavaroli, 2010).

2.4.3. Experiencia clínica y calidad de vida

Se realizó un estudio epidemiológico prospectivo internacional de 6 meses a fin de medir la incidencia de signos psicoafectivos emocionales (ansiedad y/o depresión) y el grado en el que causaron un impedimento social y/o funcional en pacientes con infecciones urinarias recurrentes, y también a fin de evaluar la evolución de estos parámetros de calidad de vida con el tratamiento preventivo de recurrencias de la ITU. Un total de 656 pacientes fueron incorporados (88% mujeres, edad promedio 46.3 años) con promedio de 2.7 ITU durante los 6 meses previos. Aproximadamente dos tercios de los pacientes tuvo ansiedad y/o trastornos de depresión (escala HAD) así como impedimento social y/o funcional (escala de Leicester) en la inclusión. Se respetó plenamente la libertad del médico para recetar tratamientos preventivos y terapéuticos. Durante la encuesta, se recetó a 94.6% de los pacientes un tratamiento preventivo por su

ITU recurrente, y un 94.4% recibió OM-89. La reducción sumamente significativa de 60% ($p < 0.0001$) en las ITU con respecto al valor basal durante el estudio resultó en mejoras sumamente significativas en la ansiedad (en 36%), depresión (en 25%) y escalas HAD globales (en 32%), así como en el bienestar (en 55%), actividad (en 33%) y la escala global de Leicester (en 44%). El análisis estadístico mostró que al final de la encuesta, la mejora en los puntajes de depresión, ansiedad, HAD global y bienestar fue significativamente alta ($p < 0.0001$) y ello se correlacionó con la reducción sumamente significativa en el número de ITU, a la vez que la escala global de Leicester mostró una correlación significativa ($p < 0.02$). Este estudio confirmó que las ITUs recurrentes tienen un impacto negativo en el ánimo y actividades sociales con signos ansio-depresivos e impedimentos socio-funcionales presentes en aproximadamente 66% de los pacientes. Se puede concluir que con la administración de un tratamiento preventivo, como OM-89, los pacientes se beneficiaron de una reducción significativa en la incidencia de ITU recurrente y con mejoría del estado psicoafectivo, socio-funcional y de su calidad de vida (Meredith & Chiavaroli, 2010).



Gráfica 2. Evolución de la bacteriuria en 2 grupos de pacientes. Durante 6 meses de estudios que recibieron OM-89 o placebo durante 3 meses, luego sin período de reposo farmacológico, el tratamiento alternativo durante 3° meses (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). Fuente: Meredith & Chiavaroli, 2010)

2.5. Perfil de seguridad de OM-89

Fue registrado en Suiza en 1988, siendo el primer mercado en donde fue introducido. Posteriormente ha sido comercializado en 37 países más en todo el mundo, y se estima que más de 150,000 pacientes toman OM-89 en todo el mundo cada año, siendo bien tolerado por adultos y niños. La incidencia general de eventos adversos en los estudios clínicos es aproximadamente 4%. Mayormente son de importancia menor, y los más frecuentes son cefalea, náuseas, malestar gástrico y dispepsia. La vigilancia post-comercialización desde 1990 (informes espontáneos, de Autoridades de Salud, casos reportados en la literatura médica publicados en revistas o congresos médicos, informes de estudios clínicos) ha recolectado 237 casos, incluyendo 126 informes no confirmados médicamente. La mayoría se clasificaron como trastornos gastrointestinales, reacciones en la piel y trastornos generales. Solo 3 casos que se consideraron relacionados con la medicación fueron clasificados como serios: tromboflebitis, edema bucal, exposición al medicamento durante el embarazo, aunque sin resultado negativo (Meredith & Chiavaroli, 2010).

Los estudios extensos de toxicidad realizados en animales no han demostrado efecto tóxico de OM-89 y también indicaron que la sobredosis accidental probablemente no causaría consecuencias perjudiciales (Meredith & Chiavaroli, 2010).

En base a los datos de seguridad clínica y toxicológica, OM-89 se puede considerar seguro con una relación riesgo/beneficio favorable que permanece invariable desde su primera introducción al mercado en 1988 (Meredith & Chiavaroli, 2010).

3. ENSAYOS INMUNOENZIMÁTICOS Y WESTERN BLOT

Los ensayos inmunológicos, de forma general, son técnicas de estudio que utilizan anticuerpos como elementos acoplantes "específicos". Son de aplicación universal y permiten la determinación o cuantificación de fármacos terapéuticos y no terapéuticos así como de diversas sustancias biológicas, infecciosas o anticuerpos de respuesta del huésped en el suero, en la orina y demás líquidos o secreciones biológicas donde se encuentre la sustancia requerida para su estudio (Guzmán-Vázquez, 2004).

3.1. Ensayo Inmunoenzimático (ELISA)

El ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas "ELISA" (Enzyme-linked immunosorbent assay, por sus siglas en inglés), también conocido como "Enzimoinmunoanálisis" o "Enzimoinmunoensayo" de carácter heterogéneo, es un método muy conocido por los laboratorios clínicos, así como por los fabricantes de productos de diagnóstico in vitro, organismos reguladores, organizaciones de evaluación externa de la calidad, entre otros. Los sistemas ELISA se basan en la utilización de

enzimas en lugar de isótopos radiactivos, que era la técnica más desarrollada entonces por medio del RIA. Remitiéndonos históricamente, la utilización de marcadores enzimáticos en inmunoensayo es una metodología cuyos estudios datan desde la década 1960, contemplando su desarrollo y uso temprano durante los años 1970 y 1980. (Lequin, 2005). Ya propiamente dos equipos de investigaciones independientes y de forma simultánea desarrollaron el concepto ELISA y llevaron a cabo los experimentos necesarios para demostrar su viabilidad. Peter Perlmann fue el investigador principal y paralelamente Eva Engvall, describió oficialmente la técnica en 1971. (Guzmán, 2004; Lequin, 2005)

El método ELISA es una herramienta fundamental en la inmunología clínica, utilizado para la detección del VIH, SARS, etc. y la identificación de agentes patógenos. Es un método poderoso para la valoración de cantidades de nanogramos a picogramos de Ag o Ac en una solución como suero, orina, entre otros (G-Biosciences, 2012).

Dependiendo de lo que se desea estudiar, se desarrollan variaciones al método de ELISA para detectar y cuantificar ligando de peso molecular elevado. Un marcador se conjuga con un ligando (ya sea antígeno, un anticuerpo específico para el antígeno en estudio o un anticuerpo para el anticuerpo primario). La mayoría de los ELISA son desarrollados en fase sólida, se adsorbe un antígeno o un anticuerpo sobre un soporte sólido. La técnica se puede basar en reacciones de enlace competitivo y otras de enlace no competitivo, pero siempre será imprescindible en el ELISA un paso de separación para descartar el conjugado enzimático libre antes de determinar la cantidad de conjugado enzimático enlazado.

Esto se logra añadiendo sustrato enzimático y midiendo la reacción catalítica entre la enzima y el sustrato (Guzmán, 2004).

Las enzimas utilizadas como marcadores median la formación de complejos antígeno-anticuerpo; poseen características catalíticas, lo cual las torna como marcadores muy sensibles y versátiles. Estos marcadores catalizan un sustrato para producir ya sea la luz que se detecta con la película de radiografía, o el color que se visualiza en las membranas. Suele preferirse la peroxidasa de rábano picante (HRP) y la fosfatasa alcalina (AP) (G-Biosciences, 2012).

El método ELISA basa su funcionalidad en lo siguiente:

a. Ag (antígeno) y Ac (Anticuerpo) logran enlazarse a una superficie portadora insoluble y conservar su reactividad inmunológica.

b. Los marcadores tienen alta especificidad y convierten una gran porción de sustrato en producto detectable, esto logra revelar concentraciones muy bajas del ligando.

c. Durante el análisis y el almacenamiento se preserva y permanece estable la actividad enzimática de los conjugados.

d. Los marcadores enzimáticos no forman parte del componente biológico que se estudia (Guzmán-vázquez, 2004).

La prueba ELISA es muy sensible, ya que sólo requiere una pequeña cantidad de epítopos de anticuerpos humanos consolidados para enlazar muchos anticuerpos secundarios genéricos conjugados. La pericia técnica en el laboratorio debe ser meticulosa para evitar la contaminación cruzada que podría generar falsos resultados. Usualmente en la práctica clínica, el ELISA puede realizarse por triplicado. Si los resultados son positivos, se realiza una prueba más sensible para verificar los resultados porque los falsos positivos ocurren con mucha frecuencia. Tras la obtención de resultados positivos después de un ELISA, se prosigue con una prueba de confirmación, como el inmunoblot o Western blot (Lyons, 2010).

3.1.1. Tipos de ELISA

Elegir entre uno u otro tipo de ELISA depende principalmente de los propósitos del estudio, la disponibilidad y calidad de los reactivos, su utilización en la práctica y la necesidad o no de su ajuste a un formato de estuche de reactivos (Ochoa, 2012).

a. **ELISA Directo:** Ocurre el "tapizado", es decir la fijación al soporte insoluble de antígenos específicos. Se procede a un lavado para eliminar los antígenos deficientemente fijados o los que no lograron fijarse. Luego se adicionan los anticuerpos marcados o "conjugados" con una enzima; si los Ac reaccionan con los Ag, el complejo es solubilizado. Se prosigue a otro lavado para así eliminar los anticuerpos marcados que no presentaron reacción. Se añade un sustrato sobre el

que pueda actuar la enzima marcada (Ver Figura 7). Se puede detener la reacción si se desea. Por último, se procede a la lectura visual o colorimétrica del producto final coloreado (Cultek, 2006).

b. **ELISA Indirecto:** Se inicia con la fijación al soporte insoluble de Ag específicos para Ac en estudio. Se procede a un lavado para eliminar los antígenos deficientemente fijados o los que no lograron fijarse. Se adiciona el suero problema, de modo que sus anticuerpos reaccionen con gran especificidad con los antígenos fijados al soporte. Se prosigue a otro lavado para así eliminar los anticuerpos marcados que no presentaron reacción. Ocurre la adición de anti-anticuerpos conjugados con una enzima, que reaccionan con los anticuerpos específicos añadidos en el paso previo y que se encuentran fijados a los antígenos. Se procede a un lavado para descartar los anti-anticuerpos marcados que no hayan desarrollado reacción. Se añade un sustrato sobre el que pueda actuar la enzima marcada. Si se desea se puede detener la reacción. Por último ocurre la lectura visual o colorimétrica del producto final coloreado (Cultek, 2006).

c. **ELISA Sándwich "DAS" (Double Antibody Sandwich):** Se inicia con la fijación al soporte insoluble de anticuerpos específicos del agente patógeno que se investiga. Se procede a un lavado para eliminar los anticuerpos deficientemente fijados o los que no lograron fijarse. Se añade la muestra problema (puede ser un extracto vegetal, sangre, suero, plasma, etc.), ya que si está presente el agente patógeno a diagnosticar (antígeno), reaccionará de forma específica con los anticuerpos fijados al soporte. Se procede a un lavado para eliminar los antígenos que no hayan desarrollado reacción y los

restos de la muestra no fijados. Se adicionan los anticuerpos específicos del antígeno a detectar (deben tener un epítopo diferente de los anticuerpos con los que se ha tapizado el soporte) conjugados con una enzima, los cuales reaccionan con los antígenos agregados con la muestra problema y que se encuentran adheridos a los anticuerpos. Luego se procede a un lavado para eliminar los anticuerpos marcados que no hayan reaccionado. Se añade un sustrato sobre el que pueda actuar la enzima marcada. Se puede detener la reacción si se desea. Por último ocurre la lectura visual o colorimétrica del producto final coloreado (Cultek, 2006).

d. ELISA Sándwich "HADAS" (*Heterologous Antiglobulin Double Antibody Sandwich)*: Primero ocurre la fijación al soporte insoluble de anticuerpos específicos del agente patógeno en estudio a detectar. Se procede a un lavado para eliminar los anticuerpos deficientemente fijados o los que no lograron fijarse. Se añade la muestra problema (puede ser un extracto vegetal, sangre, suero, plasma, etc.), ya que si está presente el agente patógeno a diagnosticar (antígeno), reaccionará de forma específica con los anticuerpos fijados al soporte. Se procede a un lavado para eliminar los antígenos que no hayan desarrollado reacción y los restos de la muestra no fijados. Se adicionan los anticuerpos específicos del antígeno a detectar (deben tener un epítopo diferente de los anticuerpos con los que se han tapizado el soporte), los cuales reaccionan con los antígenos añadidos con la muestra problema y que se encuentran fijados a los anticuerpos. Se da un lavado para eliminar los anticuerpos que no hayan reaccionado. Se añaden los anticuerpos conjugados con una enzima anti-anticuerpos empleados en el paso previo. Se lava

para eliminar los anti-anticuerpos marcados que no hayan presentaron reacción. Se adiciona un substrato sobre el que sea capaz de actuar la enzima marcadora. Se puede parar la reacción si se desea. Finalmente ocurre la lectura visual o colorimétrica del producto final coloreado (Cultek, 2006).

e. **ELISA Competitivo:** Se fija al soporte insoluble de anticuerpos específicos del agente patógeno a estudiar. Se lava para eliminar los anticuerpos fijados deficientemente o que no lograsen fijarse.

Se añade una concentración conocida de una mezcla de antígenos del anticuerpo utilizado en el paso previo, marcados con una enzima y antígenos desconocidos objeto de estudio. Al mismo tiempo, añadir únicamente antígenos del anticuerpo usado en el paso anterior, marcados con una enzima. Se lava para eliminar los antígenos que no hayan reaccionado. Luego se adiciona un substrato sobre el que sea capaz de actuar la enzima marcadora. Se puede parar la reacción si se desea. Por último, se lleva a cabo la lectura visual o colorimétrica del producto final coloreado de ambas pruebas y se comparan los resultados. Si los resultados de las lecturas de ambas pruebas son semejantes, el antígeno a estudio no estará relacionado con los anticuerpos empleados para tapizar el soporte. Si hay desigualdad en las lecturas de ambos pocillos, en este caso el antígeno objeto de estudio estará relacionado en el aspecto serológico con el anticuerpo utilizado para tapizar el soporte y la diferencia de densidad óptica será proporcional a la concentración del antígeno en estudio (Cultek, 2006).

3.2. Western Blot

Diversas técnicas se han desarrollarlo para evaluar los distintos aspectos inmunológicos que se desarrollan durante el curso de las enfermedades, ya sean de tipo parasitarias, bacterianas, virales, entre otras. Las técnicas empleadas se basan en la detección de antígenos o en la detección de anticuerpos específicos en diversos líquidos y/o secreciones biológicas, así como en tejidos. Hoy en día, una de las técnicas de mayor relevancia para llevar a cabo este tipo de análisis y caracterización de fracciones antigénicas es la Electroinmunotransferancia, mejor conocida como "Western Blot", que resulta ser un proceso cualitativo que mezcla la selectividad de la electroforesis en gel de poliacrilamida, permitiendo fragmentar al antígeno, gracias a la sensibilidad de la prueba inmunoenzimática, logrando evidenciarse la formación de los complejos antígeno-anticuerpo (Chávez-salas, Vásquez, & Escalante, 2007). El nombre de Western Blot es un juego de palabras derivado de los términos " Southern Blot", una técnica para la detección de ADN y la detección de ARN que se denomina "Northern Blot" (Yang & Ma, 2009).

La especificidad del Western Blot es mayor en sí que el de la electroforesis en gel de poliacrilamida por sí sola, desde el punto de vista inmunoquímico, esto hace evidente el reconocimiento de los antígenos por parte de anticuerpos específicos inducidos, es decir, se observa la identidad. También se puede conocer el peso molecular de las proteínas antigénicas que se estén estudiando utilizando los

patrones adecuados con peso molecular conocido y un equipo analizador de bandas electroforéticas (Diéguez, Muñoz, & Castiñeira, 2009).

Western Blot es una técnica analítica, ampliamente utilizada, para el estudio de proteínas. Este método, permite la detección de una sola proteína dentro de una muestra biológica. La especificidad del Western Blot se logra mediante la utilización de un anticuerpo que reconoce y se une a un epítopo único de la proteína de interés. Con la técnica de Western Blot se puede estimar el tamaño de una proteína, confirmar la presencia de modificaciones post-traduccionales como la fosforilación, y ser utilizado para comparar cuantitativamente los niveles de proteína entre muestras. Los pasos involucrados en la realización de un Western blot, incluyen la preparación de muestras, la separación de proteínas, la transferencia y la detección (Ver Figura 8) (Advansta Corporation, 2011).

Para separar las proteínas por medio de la electroforesis se suele utilizar el gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE). Aquí se logra la separación de las proteínas por tamaño, luego ocurre la transferencia de las proteínas a partir del SDS-gel a una membrana. El fluoruro de polivinilideno (PVDF) y la nitrocelulosa son los dos tipos de membrana más comúnmente utilizados en Western Blot. El PVDF se introdujo en 1985 como un sustrato por Millipore Corporation. Por su parte, la membrana de nitrocelulosa es de alta calidad, ideal para los ensayos de proteínas y ácidos nucleicos (Yang & Ma, 2009).

3.2.1. Pasos Generales del Western Blot:

3.2.1.1. Preparación de la muestra

Es esencial una adecuada preparación de la muestra. Las proteínas se suelen extraer por medio de procesos químicos y/o mecánicos. La elección del método depende del tipo de muestra inicial, de la ubicación subcelular de la proteína y de las condiciones esenciales que requiera el anticuerpo que reconocerá al epítopo proteico. La extracción de las proteínas se logra por medio de la disrupción mecánica o química con el uso de detergentes especiales (Advansta Corporation, 2011).

3.2.1.2. Electroforesis en Acrilamida

Luego de la extracción de proteínas estas son separadas por medio de la electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE). Las proteínas, se revisten con carga negativa, mediante la acción del detergente Dodecilsulfato Sódico (SDS), así las proteínas se pueden separar en el gel según su tamaño, es decir, de forma proporcional a la masa de cada proteína (SDS- PAGE) (Advansta Corporation, 2011).

En caso tal de requerirse condiciones naturales para detectar el epítopo por parte del anticuerpo, no debiese agregarse SDS durante la electroforesis, ni en el gel ni en el tampón. A esa condición se le conoce como PAGE nativo. En este caso las proteínas conservan su estructura tridimensional y su masa regirá la migración en el gel. De todas formas, la mayoría de ensayos Western Blot utilizan geles de poliacrilamida conteniendo SDS (SDS-PAGE) en condiciones desnaturalizantes y de reducción, bajo las cuales las proteínas con carga negativa migran al electrodo positivo tras ser sometidas a un campo eléctrico. En vista de que el SDS equipara de las proteínas, su tasa de migración se ve determinada por su peso molecular, por ende, las moléculas más pequeñas migran con más rapidez que aquellas con mayor peso molecular. El espesor y tamaño del poro del gel estará determinado por el tipo de muestra y el peso molecular de la proteína en estudio (Advansta Corporation, 2011).

3.2.1.3. Transferencia a una Membrana

Cuando culmina la electroforesis, las proteínas son transferidas a una membrana, que viene a ser un soporte sólido que une e inmoviliza las proteínas, lo que permite que la hibridación de un anticuerpo las pueda detectar.

El gel y la membrana se equilibran en una solución tampón pre-enfriada antes de la transferencia. Por lo general este tampón contiene Tris, Glicina, SDS (opcional) y metanos (para membranas de nitrocelulosa) (Advansta Corporation, 2011).

En su mayoría los sistemas de transferencia requieren de la generación de un campo eléctrico que conduzca las proteínas desde el ánodo al cátodo. Los sistemas de

transferencia se desarrollan en formato semiseco o húmedo. El formato semiseco brinda mayor rapidez y a la vez utiliza una cantidad menor en cuanto a volumen de tampón a diferencia del formato húmedo, pero no son adecuados para transferencia de proteínas de un tamaño mayor de 70 kDa y pudiendo provocar, dependiendo del sistema de detección, un aumento en el ruido de fondo. Para la transferencia efectiva de las proteínas se requiere entre el gel y la membrana un contacto estrecho, esto para ambos métodos (Advansta Corporation, 2011).

El PVDF, entre sus más notables características, está el que ofrece mayor resistencia mecánica, así como resistencia la SDS y desarrolla mayor unión que la nitrocelulosa. Por su parte, la nitrocelulosa posee la ventaja de aportar menos ruido de fondo sin requerir pretratamiento con metanol. Para reducir el ruido de fondo en métodos de detección con fluorescencia se han desarrollado membranas PVDF de baja autofluorescencia (Advansta Corporation, 2011).

La membrana se incuba con una solución elaborada para reducir los lugares de unión no específicos al anticuerpo dando paso al bloqueo de la misma. Generalmente se utilizan soluciones a base de proteínas, como la leche descremada en polvo o la BSA (albúmina de suero bovino). La leche descremada en polvo es más rentable que el BSA cuando se inicia un nuevo protocolo, pero la presencia de biotina en las fosfoproteínas, puede no ser la mejor elección cuando utilicen anticuerpos fosfoespecíficos o en métodos donde se determine biotina. Por ello para estas y situaciones similares de preferirá el uso de agentes bloqueantes no proteicos (Advansta Corporation, 2011).

3.2.1.4. Hibridación del Anticuerpo.

Tras el bloqueo, la membrana pasa a ser incubada con el anticuerpo primario. Generalmente los anticuerpos reconocen los epítopos que quedan expuestos al eliminar la estructura tridimensional de la proteína en condiciones desnaturalización y reducción. Cuando los anticuerpos requieren de la proteína plegada para el reconocimiento del antígeno se pueden utilizar los geles nativos (Advansta Corporation, 2011). En Western Blot se pueden utilizar anticuerpos primarios monoclonales como policlonales (Ver Cuadro 7). Ambos con sus ventajas y desventajas, diferenciándose según la forma en la que se sintetizan (Advansta Corporation, 2011).

Debe tratarse la membrana con las proteínas inmovilizadas para así bloquear las regiones con falta de proteínas evitando así la unión no específica de los anticuerpos. Luego de esto se incuba con un anticuerpo primario que irá en contra del epítopo específico de la proteína diana. Luego de varios lavados de la membrana, se agrega un anticuerpo secundario marcado que proporcionará una forma de detección tras unirse de forma específica al anticuerpo primario (Advansta Corporation, 2011).

3.2.1.5. Detección

Existen métodos directos o indirectos para la detección de proteínas cada cual con sus respectivas ventajas e inconvenientes. Aquellos métodos directos hacen uso de un anticuerpo primario conjugado con marcaje detectable, que puede ser: una enzima, biotina o molécula fluorescente. Por su parte, los métodos indirectos ocupan dos anticuerpos; un Ac primario y uno secundario contra el tipo del primer anticuerpo. En tales métodos de detección indirecta quien está conjugado con un marcaje detectable, es el anticuerpo secundario (Advansta Corporation, 2011).

Para la detección de proteínas existen tres métodos usuales: Quimioluminiscencia, Fluorescencia y Colorimetría (Advansta Corporation, 2011).

Los métodos por **Quimioluminiscencia** suelen utilizar anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa (HRP). La luz producida por la reacción entre la enzima y el sustrato es detectada mediante la exposición de la membrana a una película de rayos X o captada digitalmente por medio de una cámara CCD.

La quimioluminiscencia tiene por ventaja el ser muy sensible, la membrana puede reutilizarse tras ser tratada, se logran múltiples exposiciones en películas de rayos X lo que permite que sea fácil de documentar. Por otro lado, resulta inconveniente el hecho de que requiera una habitación de revelado o sistemas de imagen costosos También es desventajoso el hecho de ser semicuantitativa, en vista de que se basa en una reacción enzimática, el revelado tiene un rango dinámico

limitado, además de que la intensidad de la señal puede cambiar debido al tiempo de incubación o el de exposición, tampoco es posible la observación colorida multiplex de más de una proteína, sólo hay un color de reacción (Advansta Corporation, 2011).

Otro de los métodos usuales de detección, la **Fluorescencia**, se basa en la unión a un fluoróforos por parte del anticuerpo secundario, que cuando se estimula emite luz. Esta luz es detectada por medio de un dispositivo que puede medir la fluorescencia o también utilizando una cámara CCD con filtros de longitud de onda adecuados. La imagen es digitalizada para su interpretación (Advansta Corporation, 2011).

Lo ventajoso en el método por Fluorescencia es su sensibilidad, que puede incluso incrementarse mediante el sistema streptavidina/ biotina, ideal para ensayos multiplex (múltiples colorantes), el rango dinámico es amplio, no se necesita un cuarto de revelado, los datos aportados son cuantificables, los resultados son fáciles de documentar además para proteínas abundantes pueden utilizarse Ac primarios marcados y prescindir de pasos. Sin embargo los reactivos y el y equipos necesarios pueden representar costos elevados, es menos sensible que la quimioluminiscencia, por ende puede no ser adecuado para proteínas poco cuantiosas (Advansta Corporation, 2011).

Por último, la **Colorimetría** es un método que utiliza un Ac secundario, conjugado primeramente con una enzima, ya sea peroxidasa o fosfatasa alcalina. La enzima en cuestión transforma en un producto insoluble al colorante, tornándole evidente en la membrana. La concentración de colorante convertido resulta proporcional a la cantidad en la muestra. La intensidad del color puede ser calculada por un densitómetro o por medio de espectrofotometría. Lo bueno de este método es su sencilla elaboración, tampoco requiere de cuartos oscuros o cámaras de revelado y la documentación de las

membranas también resulta una labor fácil por medios fotográficos. Lo inconveniente resulta ser su sensibilidad, que es menor que los métodos previamente mencionados, y con el pasar del tiempo el color puede desvanecerse (Advansta Corporation, 2011).

Cuadro 6. VENTAJAS E INCONVENIENTES DE LOS MÉTODOS DE DETECCIÓN

	Indirecto	Directo
Ventajas	• Amplificación de señal debido a la unión de múltiples Ac secundarios a cada Ac primario. • Versátil - el mismo Ac secundario puede utilizarse para diversos anticuerpos de la misma especie.	• Menos pasos. • Menos posibilidades de unión no específica.
Inconvenientes	• Mayor posibilidad de unión no inespecífica. • Más pasos.	• Puede ser más costoso. • La inmunorreactividad del Anticuerpo puede estar afectada por el marcaje.

Fuente: Advansta Corporation, 2011.

Cuadro 7. CARACTERÍSTICAS DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES Y POLICLONALES

	Anticuerpos Monoclonales	Anticuerpos Policlonales
Reconocimiento epitopo y sensibilidad	• Reconocimiento de un único epitopo • Menos sensibilidad debido a que sólo un anticuerpo se une a cada proteína	• Reconocimiento múltiples epitopos en una proteína • Más sensible debido a los multiples lugares de unión de anticuerpo en cada proteína. • Bueno para proteínas poco abundantes.
Reactividad cruzada potencial	• Reactividad cruzada menos probable. • Potencial para reconocer otras proteínas que contengan el epitopo.	• Reactividad cruzada más probable. • Mayor ruido de fondo potencial debido al reconocimiento de multiples epitopos. • Reactividad cruzada con otras especies más probable.
Tiempo requerido para su producción	Largo	Más corto
Coste de Preparación	Mayor coste - requiere personal capacitado y equipamiento especializado.	Menor coste
Variabilidad	Los lotes de un mismo hibridoma son muy estables.	Propenso a cierta variabilidad entre lotes.
Tolerancia a condiciones variables	Poca tolerancia puede dejar de reconocer al antígeno en condiciones de desnaturalización/reducción de la proteína, o por modificaciones químicas (glicosilación fosforilación) o por diferencias en la secuencia peptídica debido a la presencia de polimorfismos	Más tolerante a condiciones variables.

Fuente: (Advansta Corporation, 2011)

CAPITULO III.

METODOLOGIA

III. METODOLOGÍA

Este es un estudio observacional, descriptivo, de corte transversal; cuyo objetivo era la estandarización cualitativa tanto de un ensayo de ELISA como de Western Blot para la determinación de IgA urinaria específica contra E. *coli*, elaborado con antígenos obtenidos de la pastilla OM-89, que corresponde a un liofilizado bacteriano de E. *coli*.

Para la estandarización del método se utilizaron muestras humanas de orinas recolectadas de pacientes adultos del "Complejo Hospitalario Metropolitano Dr. Arnulfo Arias Madrid" (C.H.Dr.A.A.M.) y una cepa de E. *coli* del "Hospital de Especialidades Pediátricas Omar Torrijos Herrera" (H.E.P.), provenientes de cultivos de orina positivos realizados a pacientes de estas Instituciones. Para realizar ensayos preliminares, se utilizaron cepas de E. *coli* proporcionadas por el "Instituto Oncológico Nacional Dr. Juan Demóstenes Arosemena" (I.O.N.) y por el Departamento de Microbiología de la Universidad de Panamá (Fotografías 1 y 2).

1. REACTIVOS, EQUIPOS Y MATERIALES

A continuación, se detallan los reactivos, equipos y demás materiales utilizados en los diferentes procedimientos, de igual forma la preparación de soluciones de trabajo.

1.1. Reactivos, equipos y materiales utilizados en la elaboración de ELISA casero para detectar IgA en orina específica contra E. coli

a) Cápsula de OM-89 de 6 mg

b) Tampón de Recubrimiento (Tampón de tapizado Carbonato/ Bicarbonato)

Preparación:

0,64 g de Carbonato Sódico (Na2CO3)

3,7 g de Bicarbonato de Sodio (NaHCO3)

1000 ml de agua destilada

pH: 9,6

c) TBS:

Preparación:

6,06 g de Tris base

8,2 g de NaCl

6,0 mL de HCl 6M (Se puede agregar HCl de otra concentración hasta obtener el pH adecuado).

1000 mL de agua destilada

pH: 7,2 - 7,8

*Se puede utilizar TBS, PBS o PBS comercial, y se obtienen buenos resultados.

d) Solución de Bloqueo

Preparación: Diluir leche en polvo al 1% en PBS.

10g de BSA

1L de PBS

e) Solución de lavado (PBS-T)

Preparación: 0.05% de Tween20 en PBS (Agregar 5ml de Tween20 al 10% en 1 Litro de PBS o TBS).

f) Diluente del conjugado: Utilizar solución de bloqueo

g) Conjugado de Anti IgA Humana (Anti-Human IgA, Peroxidase Conjugate, Sigma-Aldrich No. A 0295). Diluir el conjugado 1: 50,000 en diluente del conjugado.

h) Substrato: TMB (Sigma No. T0440)

i) Solución de Parada: H2SO4 2M

j) Platos estériles de 96 pocillos para fijación de antígenos de *E. coli*

k) Muestras de Orina

l) Cristalería, Pipetas y Micropipetas

m) Lavador automático (Stat- Fax 2600)

n) Nevera

o) Lector de placas

1.2. Reactivos, equipos y materiales utilizados en la técnica de Western Blot para detección de IgA específica contra E. coli en Orin

1.2.1. Electroforesis de *E. coli*

a. Cepas de E. coli

b. Tampón de la muestra no reductor

Preparación:

Tris 0,5 M, pH 6,8	10ml
SDS 10%	16ml
Azul de Bromofenol	50mg
Glicerol	12ml

Agua destilada 4ml

c. Kit de preparación del gel SDS Sigma-Aldrich 08091

- 250 ml de solución stock de Acrilamida/Bisacrilamida (PAA)
- 250 ml de Tampón de Separación
- 100 ml de tampón de empaquetamiento (staking)
- 3 botellas de 250ml de tampón de corrida 10x
- 30 ml Solución TEMED
- 30ml de tampón de incubación
- 10 g de Aminopersulfato (APS), envase calibrado de 10 ml para prepararlo

d. Marcadores de peso molecular: * Sigma-Aldrich S8445: Reconstituir con 100µl de agua destilada. Mezclar en Vórtex hasta que el contenido esté completamente disuelto. *17-0446-01 (GE Healthcare): Reconstitutir en 200 µl de tampón de la muestra. Alicuotar y congelar lo que no se utilicé inmediatamente, a -20°C.

e. Solución de Azul de Coomassie R-250

Preparación:

Azul de Comassie R-250	0,25g
Metanol	225 ml
Ácido Acético	46ml
Agua destilada	230ml

Disolver durante 15-30 minutos en agitador magnético. Filtrar y guardar a temperatura ambiente.

f. Centrífuga

g. Plancha de calor

h. Nevera

i. Pipetas y Micropipetas

j. Cámara de electroforesis

k. Tubos de vidrio 8 por 10 cm, tubos de plástico cónicos de 1.5 ml, materiales para armado de la cámara vertical (láminas de vidrio para moldes de gel de electroforesis, goma selladora, espaciadores de 1mm, Horquillas, peines de 1mm) y cristalería.

1.2.2. Inmunotransferencia e inmunodetección de IgA específica contra E. coli en Orina

a. Papel de nitrocelulosa

b. Papel de cromatografía

c. Tijeras

d. Tubos Eppendorf

e. Soporte para tubos Eppendorf

f. Marcadores

g. Esponjas y bandejas plásticas

h. Pipetas y micropipetas

i. Cámara de transferencia

j. Fuente de poder

k. Tampón de trasferencia:

Preparación:

Trisma: 6.0g

Glicina: 29.6g

Metanol: 400 ml

*Ajustar el pH a 8.3 con HCL

*Agregar Agua bidestilada hasta completar 2000 ml

l. Solución de Rojo Ponceau:

Preparación:

Rojo Ponceau 0.5 g

Ácido Acético 15 ml

Agua destilada 485 ml

m. Agua destilada

n. Solución Salina Normal (SSN)

o. Solución de lavado (PBS-T)

Preparación:

0.05% de Tween20 en PBS (Agregar 5ml de Tween20 al 10% en 1 Litro de PBS o TBS).

p. Solución de Bloqueo:

Preparación:

Diluir leche en polvo al 1% en PBS.

10g de BSA

1L de PBS

q. Muestras de Orina

r. Tubos de plástico y bandejas multicanales

s. Conjugado de Anti IgA Humana (Anti-Human IgA, Peroxidase Conjugate, Sigma-Aldrich No. A 0295). Diluir 1:2000 en solución de bloqueo, antes de la incubación.

t. Kit cromógeno AEC Sigma-Aldrich No. AEC101

Preparar antes de la incubación. Agregar en orden: 4ml de agua destilada, 2 gotas de tampón de acetato, 1 gota de cromógeno de AEC, 1 gota de Peróxido de Hidrógeno al 3%.

Kit de tinción cromógeno sigma AEC101

Preparación:

Vial 1: Tampón de Acetato, 2.5 M, pH 5.0

Vial 2: AEC Cromógeno 3-amino-9-etilcarbazol (AEC) en N,N-dimetilformamida

Vial3: H2 O2 en agua destilada.

v. Secador de cabello

w. Escáner

2. METODOLOGIA

Se describen los procedimientos utilizados para la elaboración del ELISA y del Western Blot para la detección cualitativa de IgA urinaria específica contra E. *coli*.

2.1. Elaboración de ELISA para detectar IgA específica contra E. *coli* en muestras de orina

2.1.1. Preparación de microplatos de ELISA recubiertos con antígenos de E. *coli*, procedentes de la pastilla OM-89

a. Preparación del antígeno

Se diluyó el contenido de una cápsula de OM-89 6 mg hasta una concentración de 4.0 µg/ml en solución de Carbonato de Sodio para recubrir los pocillos.

Solución madre de 60µg/ml: Diluir el contenido de una cápsula de Urovaxom (6mg) en 100mL de solución de recubrimiento.

A partir de esta solución madre se prepararon soluciones de 2.0 µg/ml, 3.0 µg/ml, 4.0 µg/ml y 5.0 µg/ml, para ser ensayadas. Utilizando la fórmula: (Volumen

inicial) (Concentración inicial) = (Volumen final) (Concentración final). Sin embargo, para la elaboración final de los platos se seleccionó la concentración de 4.0 µg/ml.

Preparación de solución de 4.0 µg/ml: Tome 13.3 ml de la solución madre y lleve a 200 ml con tampón de recubrimiento (186.7 ml del tampón de recubrimiento).

b. Recubrimiento de los platos y lavado

Se agregaron 300µl del antígeno diluido en tampón de recubrimiento a cada pocillo. Posteriormente, se selló y se incubó el plato con el antígeno a 4°C toda la noche. Después de la incubación, se aspiró la solución del antígeno de cada pozo. Se procedió a lavar cada pocillo con la solución de lavado de la siguiente forma: Se llenó cada pozo con 300µl de la solución de lavado y se retiró por aspiración. Este lavado se realizó tres veces con equipo automatizado, removiendo cualquier remanente de la solución de lavado, mediante la inversión del plato sobre papel toalla limpio (Fotografía 3).

c. Bloqueo del plato

Se añadieron 300µl de la solución de bloqueo a cada pocillo. Posteriormente se incubó a 4°C toda la noche (Fotografía 4). Luego de la incubación, se retiró la solución de bloqueo y se lavó el plato, con solución de lavado, tres veces (como se especificó anteriormente).

2.1.2. Ensayo de ELISA

a. Incubación con el anticuerpo

Se agregaron 100µl de la muestra de orina (sin diluir). Se selló el plato y se incubó por dos horas a temperatura ambiente. Después de la incubación, se retiró la muestra de orina. El plato se lavó con 300µl de la solución de lavado cinco veces. Se removió el remanente de la solución de lavado invirtiendo el plato sobre papel toalla.

b. Incubación con el conjugado

El conjugado fue previamente diluido en solución de bloqueo 1: 50,000. Luego, se agregaron 100µl del conjugado diluido en cada pocillo y se incubó a temperatura ambiente, durante 1 hora. Se procedió a lavar como se especificó en el punto anterior.

c. Reacción con el sustrato: Se agregaron 100µl del sustrato a cada pocillo y se incubó durante 30 minutos, a temperatura ambiente.

e. Interrumpir la reacción: Para detener la reacción se agregaron 50µl de la solución de parada a cada pocillo.

f. Lectura de placas bicromática a 450-620 nm inmediatamente.

2.2. Western Blot para detección de IgA específica contra *E. coli* en Orina

2.2.1. Electroforesis de *E. coli*

a. Preparación del Antígeno

Se sembraron cepas de E. coli en agar MacConkey, y se incubaron por 24 horas a 37 °C (Fotografía 5).

Se prepararon suspensiones de E. coli a 5 unidades de Mcfarland en SSN. Luego, fueron centrifugadas a 2,000rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y el precitado fue resuspendido en 5ml de SSN. Este lavado fue repetido dos veces más. El precipitado resultante fue resuspendido en 5ml de SSN (Fotografía 6). Se añadió Vol/Vol del tampón reductor y de la suspensión de *E. coli* en tubo cónico de plástico, tubos Eppendorf (Fotografía 7). Se abrieron orificios en la tapa del tubo cónico y luego, fue colocado por 5 minutos en agua hirviendo, sobre un soporte, para evitar que el agua entre al tubo (Fotografía 8).

La muestra fue rotulada y guardada a 4 °C hasta el día siguiente que se realizó la electroforesis y/o congelada a -25 °C si el ensayo no iba a ser realizado en menos de 24 horas, para preservar la muestra.

b. Armado del Molde del Gel

b.1. Alrededor de la lámina de vidrio de bordes redondos, se colocó la liga de sellado en el borde inferior (borde redondeado), al borde superior no se le coloca liga.

b.2. Posteriormente, se situó otra lámina de vidrio (de bordes cuadrados) al lado de la lámina de vidrio redondeada, dejando la porción tubular de la goma de sellado entre ambas láminas. Ejerciendo presión para mantenerlas unidas.

b.3. Se colocó una horquilla o prensa en la parte inferior, para mantener la unidad.

b.4. Se ubicaron verticalmente los espaciadores (con respecto al borde inferior redondeado), uno a de cada lado de la unidad, al lado de la goma selladora.

b.5. Se colocó a cada lado una horquilla o prensa, manteniendo los espaciadores y la goma selladora en su lugar.

b.6. Se seleccionó el peine a utilizar y se marcó el vidrio, 1 cm por debajo del borde del peine (Fotografía 10).

c. Preparación de Gel

c.1. La solución de aminopersulfato fue preparada utilizando el envase calibrado, agregando 1g de APS y 10 ml de agua destilada. Se hicieron alícuotas y se guardaron en refrigeración a 4°C por una semana, o congelación a -20°C.La acrilamida es neurotóxica. Por lo cual se utilizaron guantes para realizar todo el procedimiento. Los reactivos utilizados para la elaboración del gel se aprecian en la foto 9.

c.2. El gel inferior o gel de separación es al 12,5 %. Se agregaron las siguientes soluciones en un envase adecuado (matraz de vidrio):

Solución Stock PAA	6,25 ml
Tampón del gel de separación	5,00 ml
Agua destilada	3,50 ml
TEMED	0,25 ml (250µl)

c.3. Se mezcló bien la solución y se agregó 0.1ml (100µl) de la solución de APS al 10%. La solución fue mezclada nuevamente y adicionada inmediatamente a la cámara, hasta la marca colocada anteriormente (marcada a 1cm del borde inferior del peine).

c.4. Fue agregado etanol al 70 % hasta el borde superior y se esperó a que polimerizara el gel inferior.

c.5. En la preparación del gel superior al 3%, fueron agregadas las siguientes soluciones:

Solución Stock PAA	0,50 ml
Tampón del gel superior	1,00 ml
Agua destilada	3,40 ml
TEMED	0,10 ml (100µl)

Luego de agregar el TEMED se mezcló bien la solución.

c.6. Una vez polimerizado el gel inferior, el etanol fue retirado por inversión de la cámara, dejándolo salir por uno de los bordes. Se eliminó el remanente de alcohol de la cámara con papel filtro.

c.7. Se agregaron 0.05 ml (50µl) de APS a la solución del gel inferior, mezclando bien la solución. Inmediatamente, fue adicionado en la cámara sobre el gel inferior (previamente polimerizado) hasta desbordar. Coloque el peine. Según las indicaciones del fabricante se debe dejar reposar un mínimo una hora. Sin embargo, es preferente dejarlo reposar a temperatura ambiente hasta el día siguiente y correr posteriormente la electroforesis. No debe ser dejado más de 24 horas a temperatura ambiente, sin ser utilizado, porque se seca.

d. Dilución del tampón de corrida: se diluyó 1+9 partes en agua destilada antes de su uso.

e. Se retiró la liga selladora del molde del gel y luego fue colocado en la cámara de electroforesis. Sujetando el molde con el gel a la cámara, utilizando horquillas laterales.

f. 10µl de las muestras y 5 µl del marcador fueron agregados a cada pocillo.

g. Se aplicaron 100V a la cámara de electroforesis utilizando la fuente de poder (Fotografía 11).

h. La corrida fue detenida cuando el frente de corrida (Azul de Bromofenol) alcanzó el frente del gel (aproximadamente luego de una hora y media).

i. Un fragmento pequeño del gel fue cortado y teñido con Azul de Coomassie, para confirmar la corrida.

2.2.2. Inmunoeletrotransferencia

a. Se cortó un pedazo de papel de nitrocelulosa del tamaño del gel y dos de papel de cromatografía, luego fueron sumergidos en una bandeja con tampón de transferencia durante 15 minutos. De igual forma, las esponjas de plástico fueron sumergidas en tampón de transferencia.

b. Una vez terminado el procedimiento de electroforesis, se separó el gel y fue sumergido en otra bandeja con tampón de transferencia.

c. Posteriormente, fueron colocadas las esponjas sobre las láminas de plástico y se formó un emparedado, colocando los papeles y el gel en el siguiente orden:

- Papel de cromatografía hacía el polo positivo.
- Nitrocelulosa
- Gel
- Papel de cromatografía hacía el polo negativo

d. Las láminas de plástico se cerraron y fueron sujetadas con ligas de gomas.

e. Este emparedado fue introducido en la cámara de transferencia

f. La transferencia fue hecha a 100mA por 5 horas

g. Al concluir la transferencia el papel de nitrocelulosa fue teñido con Rojo Ponceau, se observaron las bandas y se evaluó la calidad de la trasferencia. Posteriormente, la membrana se lavó y decoloró con PBS-T y agua bidestilada.

h. Para verificar la transferencia, una vez finalizado, también se tiñó el gel con azul de Coomassie y se observó el remanente de las bandas de la corrida electroforética.

2.2.3. Inmunodetección de Proteínas en Papel de Nitrocelulosa

a. Luego de la transferencia, el papel de nitrocelulosa fue bloqueado con leche descremada al 5% en SSN, durante toda la noche a 4 °C.

b. El papel de nitrocelulosa fue cortado en tiras delgadas. Posteriormente, cada tira fue colocada en un tubo que contenía la muestra de orina sin diluir.

c. Fueron incubadas por una hora a temperatura ambiente con agitación constante.

d. Se lavaron tres veces con leche al 5% en SSN.

e. Posteriormente, cada tira fue colocada en un canal de la bandeja multicanal.

f. Se procedió a incubar con el conjugado. Agregando 1 mL del conjugado previamente diluido 1:2000, por 30 minutos a temperatura ambiente. Se procuró que el conjugado tapara la parte superior de cada tira.

g. Luego de esta incubación cada tira fue lavada tres veces con SSN.

h. Tinción Sustrato-Cromógeno:

• El Reactivo Sustrato fue preparado en un tubo antes de la incubación, agregando los reactivos en el siguiente orden especificado en el inserto (Foto 12):

4mL de agua destilada

2 gotas de tampón Acetato (Vial 1)

1 gota de cromógeno AEC (Vial 2)

1 gota de peróxido de hidrógeno al 3% (Vial 3)

Se prepararon aproximadamente 40mL multiplicando cada volumen por 10.

• Cinco gotas del Reactivo Sustrato AEC fueron agregadas a cada tira. Luego, se incubó de 5-10 minutos, observando la reacción, hasta que se observó la aparición de color rojo insoluble en las tiras positivas.

i. Las tiras fueron lavadas tres veces con agua destilada (Fotografía 13).

j. Secar a temperatura ambiente o utilizar secador de pelo.

k. Una vez secas las tiras, se observó la aparición de bandas rojas en el papel de nitrocelulosa. Es normal observar un fondo ligeramente rojo en las tiras.

l. Posteriormente se midieron las distancias de las bandas y se compararon los patrones con las bandas obtenidas en la corrida del marcador de peso molecular. Se calcularon los Rf, al dividir la distancia recorrida por la proteína (distancia desde el punto de aplicación al centro de la banda) entre la distancia recorrida por el frente de corrida. Se construyó una gráfica o curva de calibración colocando el Rf calculado para cada banda del marcador en el eje de las abscisas y el log en base 10 del peso molecular en el eje de las ordenadas. Se calcularon los pesos aproximados de las bandas positivas obtenidas en el western blot, inter y extrapolando en dicho gráfico, y utilizando la ecuación de la recta de dicha gráfica.

m. Los resultados obtenidos fueron analizados y se elaboraron las gráficas y cuadros correspondientes utilizando el programa de Microsoft Excel 2013.

CAPITULO IV.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

1. RESULTADOS

1.1. Población y controles

Las muestras fueron recolectadas de orinas cultivadas en la sección de Microbiología del Complejo Hospitalario Dr. Arnulfo Arias Madrid durante los meses de abril a junio del 2014. Las edades oscilaron entre los 17 y 95 años, con un promedio de 59 años, de los cuales 33 fueron hombres (edad promedio 66 años) y 76 mujeres (edad promedio 56 años), para un total de 109 muestras analizadas mediante ELISA (Cuadro 8).

Los controles negativos (C.N.) igualmente fueron seleccionados de muestras de orinas de pacientes del C.H.Dr.A.A.M., con urocultivos negativos. Las edades estuvieron comprendidas entre los 22 y los 93 años, con una edad promedio de 52 años. De estos 10 fueron hombres y 22 mujeres. En total se corrieron 32 controles negativos, que tenían urocultivos negativos y presentaron visiblemente una clara negatividad en pruebas de ELISA para detectar IgA específica contra *E. coli* en orina (Cuadro 9 y Fotografía 14).

Se corrieron dos controles positivos (C.P.), los mismos correspondían a muestras de orina de pacientes del C.H.Dr.A.A.M. con cultivos positivos por E. *coli* y que presentaron una clara positividad en pruebas de ELISA para detectar IgA específica contra *E. coli* en orina. El control positivo bajo (C.P.1) correspondió a la muestra de una paciente

femenina de 26 años, con urocultivo positivo por *E. coli* y una O. D. de 0.877 en la prueba de ELISA. En tanto que el control positivo alto (C.P.2) correspondió a la muestra de orina de un paciente masculino de 71 años de edad, con urocultivo positivo por E. coli, y una O.D. de 1.783 en la prueba de ELISA. (Cuadro 10 y Fotografía 14).

Cuadro 8. DATOS DE LAS MUESTRAS

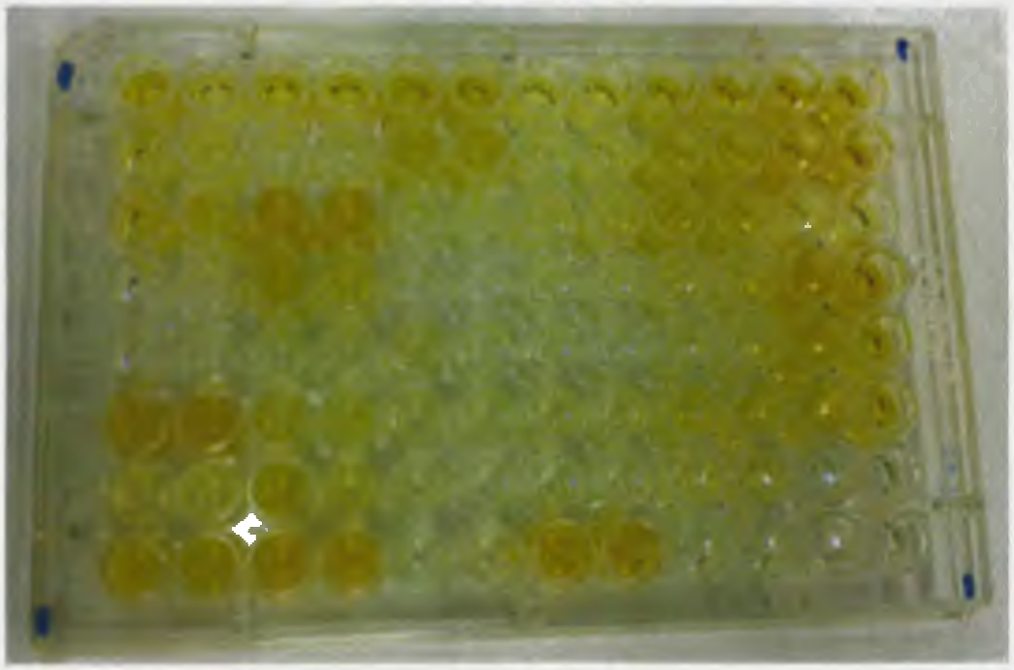
Datos de las muestras			
	Hombres	Mujeres	Total
Cantidad	33	76	109
Edad Promedio por Género	66 años	56 años	
Edad Promedio de la Muestra	59 años		

Cuadro 9. DATOS DE LOS CONTROLES NEGATIVOS

	Datos de los Controles Negativos		Total
	Hombres	Mujeres	
Cantidad	10	22	32
Edad Promedio por Género	64 años	46 años	
Edad Promedio de los Controles Negativos	52 años		

Cuadro 10. DATOS Y RESULTADOS DE CONTROLES POSITIVOS

Controles Positivos (C.P)	Género	Edad	Resultado del Cultivo	O.D.	
C.P.1	F	26	E. coli	0.877	Control Positivo Bajo
C.P.2	M	71	E. coli	1.783	Control Positivo



Fotografía 14. Prueba de ELISA para detectar IgA en orina específica contra *E. coli*. Se aprecia visualmente una clara diferencia entre los resultados positivos (F1 y F2) y los negativos (E1 y E2). Los cuatro últimos pocillos de la esquina inferior derecha (G11, G12, H11, H12) corresponden a blancos.

1.2. Prueba de ELISA para detectar IgA en orina específica contra E. *coli*

Para la preparación de los platos, los micropocillos fueron incubados con el antígeno de E. *coli* disuelto en una solución alcalina. Este antígeno procedía de las cápsulas de OM-89, correspondiente a 6 mg de lisados bacterianos de E. *coli*.

Durante la estandarización de esta prueba se probaron diferentes concentraciones de este antígeno (2ug/ml, 3ug/ml, 4ug/ml y 5 ug/ml), así como también diferentes diluciones para el conjugado (1: 5,000; 1: 10,000; 1:25,000; 1:50,000) y para la muestra de orina (sin diluir, 1:10, 1:50, 1:100). Los resultandos de esta estandarización fueron: una concentración de antígeno de 4ug/ml, dilución del conjugado de 1: 50,000 y la muestra sin diluir (1:1), con una mejor visualización de las absorbancias (Fotografía 14).

Tanto para las muestras como para los controles, el valor promedio de los blancos correspondientes por corridas fue restado a las absorbancias obtenidas.

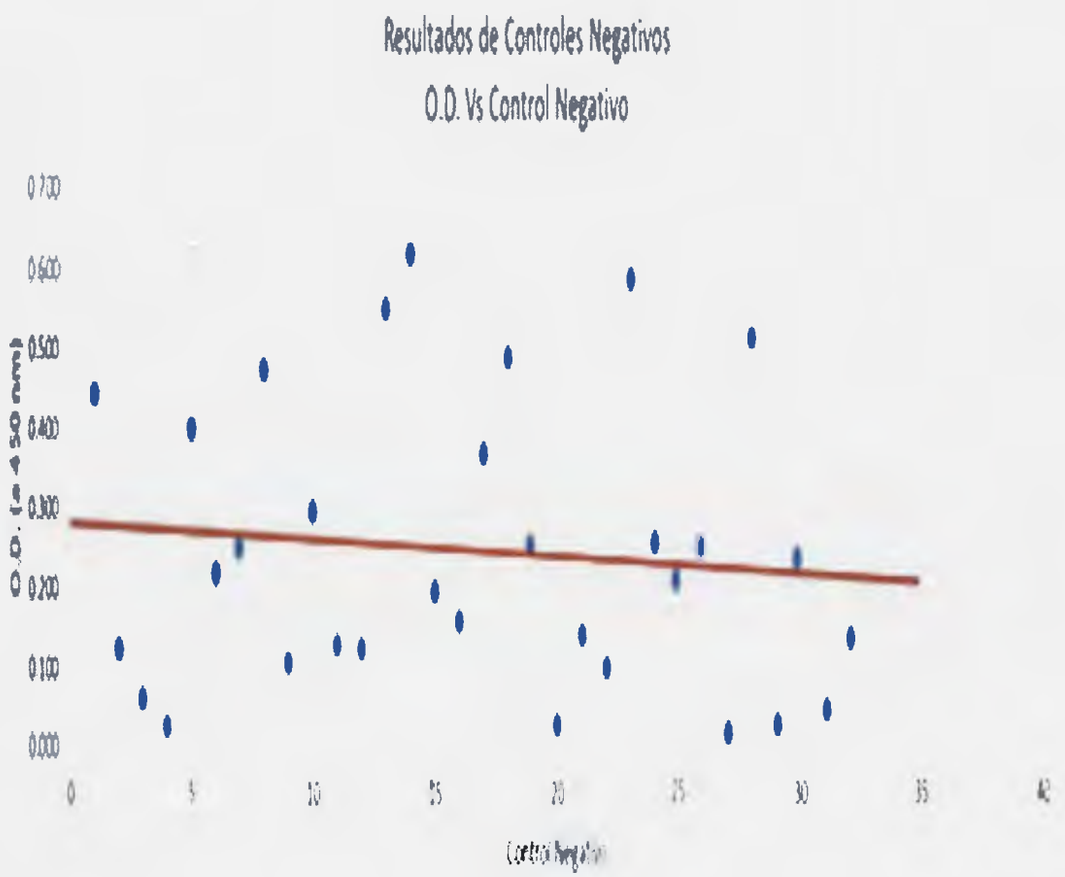
Se seleccionaron 32 controles negativos (C.N.), los cuales presentaban urocultivos negativos por E. *coli* y una visible negatividad en pruebas de ELISA para detectar IgA específica contra E. *coli*, las mismas presentaron absorbancias medias y bajas en dichas pruebas. Estos controles negativos fueron utilizados para obtener el punto de corte, al calcular el promedio de las absorbancias de estos controles negativos y sumándoles tres desviaciones estándar (Promedio de C.N. + 3DS). El promedio de las absorbancias de los C.N. fue de 0.243, la D.S. de 0.1787 y 3D.S. correspondió a 0.536, por lo que el valor de corte establecido fue de 0.779 (Cuadros 11 y 12; Gráfica 3).

Cuadro 11. RESULTADOS DE LOS CONTROLES NEGATIVOS

Promedio	0.243
DS	0.17879233
3 DS	0.536377
Cut off final	0.779

Cuadro 12. DATOS Y RESULTADOS DE LOS CONTROLES NEGATIVOS

Controles Negativos (C.N.)				
Identificación	Género	Edad	Cultivo	O.D.
C.N. 1	F	26	Negativo	0.441
C.N. 2	F	25	Negativo	0.125
C.N. 3	M	52	Negativo	0.062
C.N. 4	M	68	Negativo	0.028
C.N. 5	F	50	Negativo	0.399
C.N. 6	F	38	Negativo	0.217
C.N. 7	F	28	Negativo	0.247
C.N. 8	F	82	Negativo	0.471
C.N. 9	F	34	Negativo	0.104
C.N. 10	F	67	Negativo	0.292
C.N. 11	F	70	Negativo	0.127
C.N. 12	M	53	Negativo	0.122
C.N. 13	F	45	Negativo	0.546
C.N. 14	F	82	Negativo	0.616
C.N. 15	F	37	Negativo	0.193
C.N. 16	F	23	Negativo	0.157
C.N. 17	F	40	Negativo	0.367
C.N. 18	M	76	Negativo	0.486
C.N. 19	F	24	Negativo	0.248
C.N. 20	F	22	Negativo	0.027
C.N. 21	F	69	Negativo	0.139
C.N. 22	F	39	Negativo	0.097
C.N. 23	M	83	Negativo	0.584
C.N. 24	F	50	Negativo	0.255
C.N. 25	M	35	Negativo	0.206
C.N. 26	F	48	Negativo	0.247
C.N. 27	M	36	Negativo	0.016
C.N. 28	M	83	Negativo	0.511
C.N. 29	F	25	Negativo	0.027
C.N. 30	M	86	Negativo	0.233
C.N. 31	M	66	Negativo	0.047
C.N. 32	F	93	Negativo	0.135



Gráfica 3. Gráfica de Dispersión de los Controles Negativos. Se observan las densidades ópticas de los C.N. obtenidos mediante la prueba de ELISA. La línea roja representa la línea de tendencia central (promedio) de las absorbancias.

Se corrieron 109 muestras de orinas que tenían diferentes resultados en los cultivos de orina respectivos. De estas muestras, 82 resultaron negativas por ELISA para detectar IgA específica contra E. coli (M.N.) y 27 tuvieron resultados positivos por ELISA; de estas últimas 12 no fueron analizadas mediante Western blot (Muestras Positivas No Confirmadas: M.P.), ya que teníamos como factor limitante el papel de nitrocelulosa disponible. En tanto que, 15 si fueron confirmadas mediante Western Blot, llamadas Muestras Positivas Confirmadas, M.P.C (Cuadros 13,14 y 15; Gráfica 4).

Cuadro 13. DATOS Y RESULTADOS DE LAS MUESTRAS NEGATIVAS

Resultados de Muestras Negativas (M.N.)				
Identificación	Genero	Edad	Resultado del Cultivo	O.D.
M.N. 1	F	27	Caldo con Kaser	0.194
M.N. 2	F	32	E. coli	0.582
M.N. 3	F	82	E. coli	0.202
M.N. 4	F	56	E. coli	0.562
M.N. 5	M	28	E. coli	0.394
M.N. 6	F	69	E. coli	0.037
M.N. 7	F	50	E. coli	0.043
M.N. 8	F	32	E. coli	0.242
M.N. 9	F	39	E. coli	0.401
M.N. 10	F	53	E. coli	0.038
M.N. 11	F	50	E. coli	0.257
M.N. 12	F	45	E. coli	0.191
M.N. 13	M	68	E. coli	0.204
M.N. 14	F	71	E. coli	0.153
M.N. 15	F	24	E. coli	0.275
M.N. 16	F	63	E. coli	0.488
M.N. 17	F	62	E. coli	0.021
M.N. 18	F	48	E. coli	0.024
M.N. 19	M	93	E. coli	0.308
M.N. 20	F	46	E. coli	0.006
M.N. 21	F	68	E. coli	0.159
M.N. 22	M	71	E. coli	0.462
M.N. 23	F	88	E. coli	0.324
M.N. 24	M	36	E. coli	0.015
M.N. 25	F	42	E. coli	0.292
M.N. 26	F	89	E. coli	0.000
M.N. 27	F	36	E. coli	0.096
M.N. 28	F	23	E. coli	0.120
M.N. 29	F	57	E. coli	0.351
M.N. 30	F	30	E. coli	0.338
M.N. 31	F	28	E. coli	0.147
M.N. 32	M	21	E. coli	0.100
M.N. 33	F	36	E. coli	0.038
M.N. 34	F	82	E. coli	0.675
M.N. 35	F	76	E. coli	0.229
M.N. 36	F	69	E. coli	0.570
M.N. 37	F	57	E. coli	0.202
M.N. 38	F	60	E. coli	0.514
M.N. 39	M	59	E. coli	0.103
M.N. 40	F	46	E. coli	0.073
M.N. 41	F	63	E. coli	0.052
M.N. 42	M	32	E. coli	0.255
M.N. 43	F	78	E. coli	0.350
M.N. 44	F	40	E. coli	0.728
M.N. 45	F	82	E. coli	0.698
M.N. 46	F	48	E. coli	0.731
M.N. 47	F	85	E. coli	0.633
M.N. 48	F	Desconocido	E. coli	0.675
M.N. 49	F	39	E.coli	0.027
M.N. 50	M	52	E.coli	0.016
M.N. 51	F	49	E.coli	0.150
M.N. 52	F	35	E.coli	0.478
M.N. 53	F	87	E.coli	0.187
M.N. 54	M	60	E.coli	0.140
M.N. 55	M	77	Klebsiella Pneumoniae	0.265
M.N. 56	F	31	Klebsiella pneumoniae	0.045
M.N. 57	F	32	Klebsiella pneumoniae	0.045
M.N. 58	M	83	Klebsiella pneumoniae	0.474
M.N. 59	F	68	Klebsiella pneumoniae	0.086
M.N. 60	F	47	Klebsiella pneumoniae	0.139
M.N. 61	F	44	Klebsiella pneumoniae	0.062
M.N. 62	F	76	Klebsiella Pneumoniae	0.636
M.N. 63	M	65	Klebsiella Pneumoniae	0.120
M.N. 64	F	71	Levaduras	0.430
M.N. 65	M	68	Morganella Morganii	0.026
M.N. 66	F	70	Negativo	0.637
M.N. 67	M	74	Negativo	0.636
M.N. 68	F	34	Negativo	0.770
M.N. 69	F	56	Negativo	0.771
M.N. 70	F	78	Negativo	0.647
M.N. 71	F	30	Negativo	0.569
M.N. 72	M	23	Negativo	0.721
M.N. 73	M	66	P. Rettgeri	0.024
M.N. 74	F	87	Policistobiana	0.005
M.N. 75	M	88	Policistobiana	0.113
M.N. 76	F	50	Policistobiana	0.143
M.N. 77	F	69	Policistobiana	0.091
M.N. 78	F	38	Policistobiana	0.134
M.N. 79	M	56	Policistobiana	0.111
M.N. 80	F	88	Proteus mirabilis	0.146
M.N. 81	M	69	Proteus mirabilis	0.146
M.N. 82	M	77	Staphylococcus epidermidis	0.275

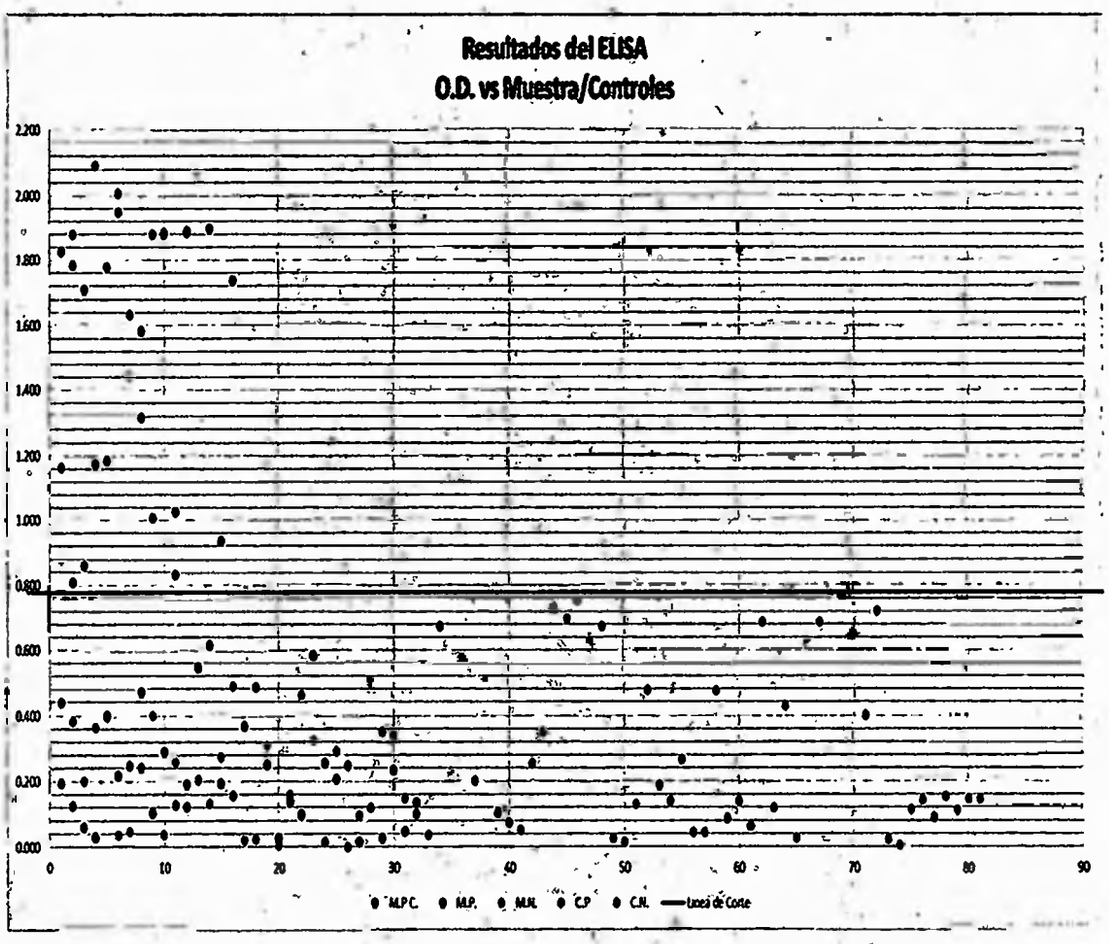
Cuadro 14. DATOS Y RESULTADOS DE LAS MUESTRAS POSITIVAS NO CONFIRMADAS

Muestras Positivas No Confirmadas (M.P)				
Identificación	Género	Edad	Resultado del Cultivo	O.D.
M.P.1	M	79	E. coli	1.826
M.P.2	F	85	E. coli	0.807
M.P.3	F	40	E. coli	0.860
M.P.4	F	71	E. coli	1.175
M.P.5	M	77	E. coli	1.779
M.P.6	M	84	E. coli	1.949
M.P.7	F	34	E. coli	1.440
M.P.8	F	59	E. coli	1.316
M.P.9	F	81	Negativo	1.008
M.P.10	M	43	E. coli	1.885
M.P.11	M	73	E. coli	0.833
M.P.12	F	35	E. coli	1.889

Cuadro 15. DATOS Y RESULTADOS DE LAS MUESTRAS POSITIVAS CONFIRMADAS

Muestras Positivas Confirmadas (M.P.C)

Identificación	Genero	Edad	Resultado del Cultivo	O.D.	Resultado del Western Blot	Tira de WB	Observación
M.P.C.1	F	32	Negativo	1.897	Positivo	1	
M.P.C.2	F	60	Negativo	0.934	Positivo	2	
M.P.C.3	M	61	Negativo	1.739	Positivo	3	
M.N. 72	M	23	Negativo	0.721	Negativo	4	[illegible]
M.P.C.4	M	65	Klebsiella Pneumoniae	1.026	Positivo	5	
M.P.C.5	M	65	E. coli	1.883	Positivo	6	
M.P.C.6	M	66	E. coli	2.073	Positivo	7	
M.N.63	M	65	Klebsiella Pneumoniae	0.120	Negativo	8	[illegible]
M.P.C.7	F	33	Negativo	1.709	Positivo	9	
M.P.C.8	F	86	Negativo	2.090	Positivo	10	
M.P.C.9	F	17	E. coli	1.184	Positivo	11	
M.P.C.10	M	92	Negativo	2.007	Positivo	12	
M.P.C.11	F	32	E. coli	1.633	Positivo	13	
M.P.C.12	F	25	E. coli	1.583	Positivo	14	
M.P.C.13	F	54	E. coli	1.880	Positivo	15	
M.P.C.14	M	Desconocida	Negativo	1.879	Positivo	16	
C.P.2	M	71	E. coli	1.783	Positivo	17	Control Positivo
M.P.C.15	F	71	Negativo	1.164	Positivo	18	
C.N.1	M	30	Negativo	0.062	Negativo	19	[illegible]



Gráfica 4. Gráfica de Dispersión de los Controles y Muestras.

Se observan las densidades ópticas de las Muestras Positivas Confirmadas (M.P.C.), Muestras Negativas (M.N.), Muestras Positivas No Confirmadas (M.P.), Controles Positivos (C.P.) y Controles Negativos (C.N.) obtenidos mediante la prueba de ELISA para detectar IgA específica contra E. *coli*. La línea roja representa la Línea de Corte.

1.3. Electroforesis y Western Blot para la inmunodetección de IgA específica contra E. *coli* en orina

Inicialmente, se buscaba utilizar la solución de OM-89 como fuente de Antígeno para la elaboración de las tiras inmunodetectoras de IgA específica contra E. *coli*; sin embargo, luego de varios ensayos en donde se probaron diferentes concentraciones del gel de separación (de 8% hasta un 20%) no se observó ninguna banda en el gel. Por esta razón se utilizaron suspensiones de E. *coli* a 5 Unidades de Mcfarland, lavadas tres veces y resuspendida en SSN.

Se utilizaron cepas de E. *coli* proporcionadas por el Departamento de Microbiología de la Universidad de Panamá y cepas del H.E.P. obtenidas de cultivos positivos de orina.

Se utilizó un gel de separación al 12,5 %, aplicando 100 V hasta que el frente de corrida hubiera avanzado considerablemente, pero sin salirse de la parte inferior del gel, aproximadamente a la hora y media.

Se utilizó el marcador de peso molecular S8445 (Sigma-Aldrich), el cual, en el gel utilizado, debe constar de 12 bandas correspondientes a 12 proteínas: Miosina (200kDa), β-Galactosidasa (116kDa), Fosforilasa b (97kDa), Albúmina (66kDa), Deshidrogenasa Glutámica (55kDa), Ovoalbúmina (45kDa), Gliceraldheído-3-fosfato Deshidrogenasa (36kDa), Anhidrasa Carbónica (29kDa), Tripsinógeno (24kDa), Inhibidor de Tripsina (20kDa), α-Lactoalbúmina (14,2kDa) y Aprotinina (6,5kDa). Sin embargo, este marcador no presentó el patrón de bandas esperado,

faltando de tres a cuatro bandas por corrida (Fotografías 15 y 16). Por lo que, se utilizaron los resultados del marcador 17-0446-01 (GE Healthcare) para elaborar la curva de calibración y los cálculos correspondientes (Fotografía 17).

Se realizaron corridas electroforéticas con las muestras de E. *coli* en formas no reducidas y reducidas con 2-mercaptoetanol. Se seleccionó la muestra reducida por presentar un mayor número de bandas claramente definidas (16 bandas). Se obtuvo un patrón de bandas similar en todas las cepas. Se escogió una de las cepas proporcionadas por H.E.P. para analizar su patrón de bandas y hacer los cálculos correspondientes a los pesos de las proteínas presentes, así como también para la elaboración de las tiras para la inmunodetección (Fotografías 15 y 16).

Luego de medir la distancia recorrida por cada banda o proteína, se calculó la movilidad relativa (Rf), dividiendo la distancia recorrida por la proteína entre el frente de corrida del indicador (Azul de Bromofenol). En el caso del marcador de peso molecular, el frente de corrida correspondía a 5.3cm; para las corridas de las muestras de E.coli no reducidas y reducidas, correspondió a 3.7cm y 4.2cm respectivamente.

Teniendo en cuenta que el Rf es directamente proporcional al Log en base 10 del Peso Molecular (P.M.), se calcularon los Log 10 de los P.M. de las proteínas (proporcionados en el inserto del reactivo) y se elaboró la curva de calibración "Log 10 (P.M.) vs Rf de la proteína" (Cuadro 16 y Gráfica 5).

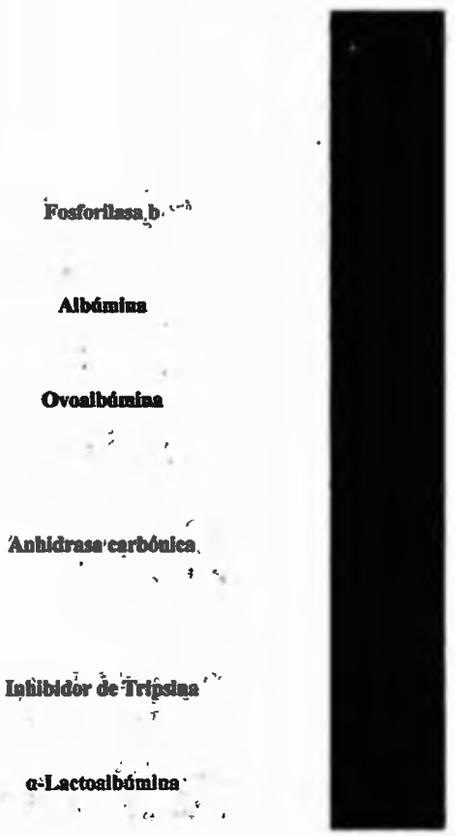
Para el cálculo del log 10 peso molecular de las proteínas de la muestra se utilizó tanto la ecuación de la recta: (-2.5278X)+12.056 (reemplazando el valor "X" por el Rf correspondiente), como intra y extrapolando para confirmar dichos resultados.

Posteriormente se calculo el Peso molecular de cada proteína aplicando el Antilog a cada valor obtenido (Cuadros 17, 18 y 19; Gráfica 6).

Fotografía 15. Corrida electroforetica de las cepas de E. *coli* no reducidas.

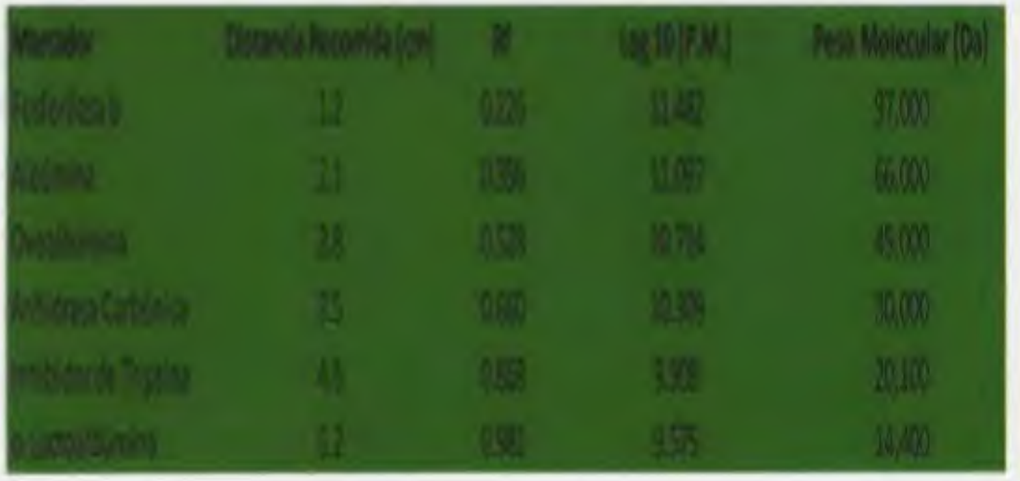
Gel escaneado y teñido con azul de Comassi luego de la electroforesis,. La corrida del borde final derecho corresponde al marcador de peso molecular S8445 (Sigma- Aldrich), se observaron 13 bandas.

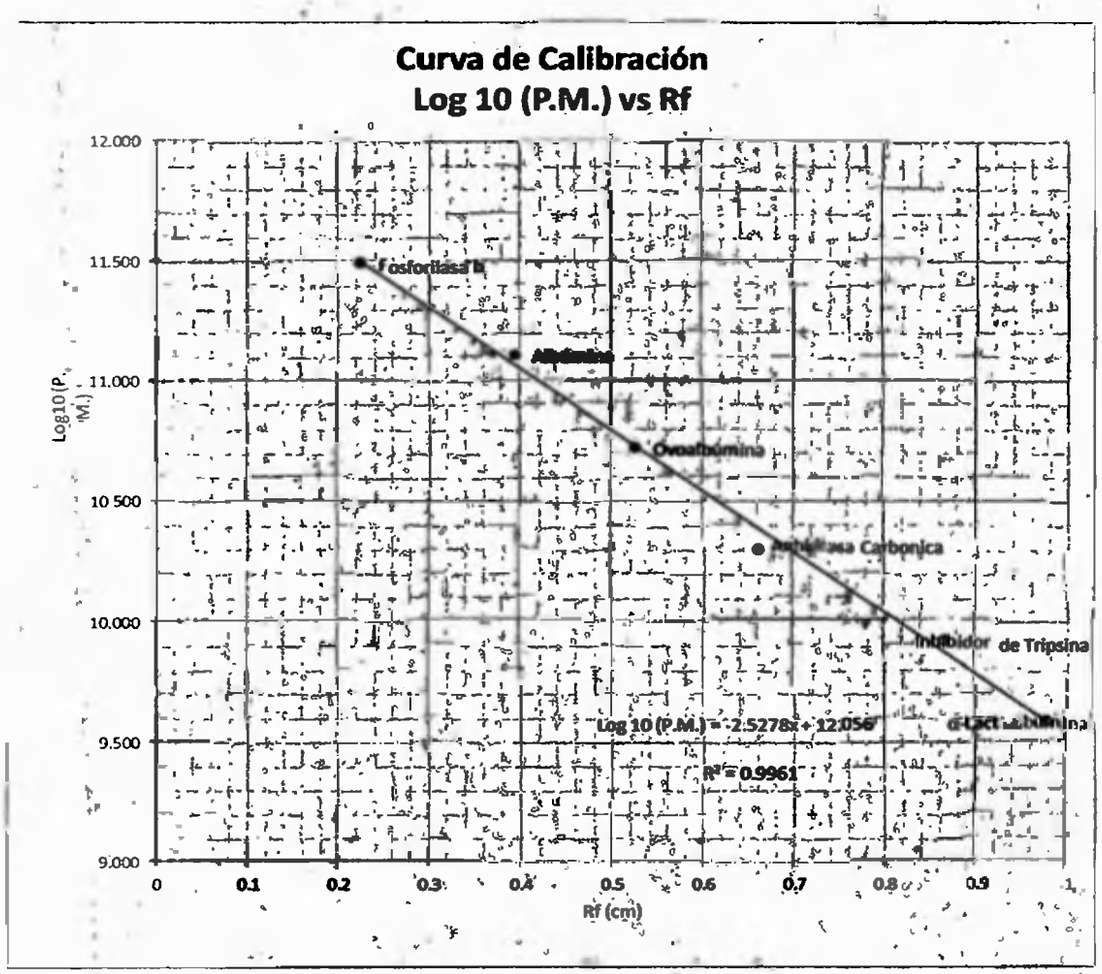
Fotografía 16. Corrida electroforetica de las cepas de E. *coli* reducidas con 2- mercaptonetanol. Gel escaneado y teñido con azul de Comassi luego de la electroforesis. La corrida del borde final derecho corresponde al marcador de peso molecular S8445 (Sigma- Aldrich), se observaron 16 bandas. La cepa seleccionada para la inmunodetección es la correspondiente a la corrida número 5.



Fotografía 17. Corrida electroforetica del Marcador de Peso Molecular 17-0446-01 (GE Healthcare). Gel escaneado y teñido con azul de Comassi luego de la electroforesis. Se observan de arriba hacia abajo las bandas correspondientes a Fosforilasa b (97kDa), Albúmina (66kDa), Ovoalbúmina (45kDa), Anhidrasa Carbónica (30kDa), Inhibidor de Tripsina (20.1kDa) y α-Lactoalbúmina (14.4kDa).

Cuadro 16. RESULTADOS DE LA ELECTROFORESIS DEL MARCADOR DE PESO MOLECULAR 17-0446-01 (GE HEALTHCARE)





Gráfica 5. Curva de Calibración. Log 10 (P.M.) vs Rf. Utilizando el Marcador de Peso Molecular 17-0446-01 (GE Healthcare).

En la corrida de la muestra no reducida de E. coli se obtuvieron 13 bandas con pesos moleculares apróximados de: 160.7kDa, 140.2kDa, 131kDa, 114.2kDa, 106.7kDa, 81.2kDa, 79.8kDa, 66.1kDa, 50.3kDa, 43.9kDa, 38.3kDa, 31.2kDa y 25.4kDa (Cuadro 17). En tanto que en la Muestra reducida se obtuvieron 16 proteínas de pesos moleculares aproximados de: 152.2kDa, 134.5kDa, 118.9kDa, 111.8kDa, 98.8kDa, 87.4kDa, 72.6kDa, 64.2kDa, 60.4kDa, 53.3kDa, 47.1kDa, 41.7kDa, 39.2kDa, 32.6kDa, 27.1kDa y 22.5kDa (Cuadro 18).

Cuadro 17. RESULTADOS DE LA ELECTROFORESIS DE LA MUESTRA DE *E. COLI* NO REDUCIDA

Distancia Recorrida (cm)	Rf	Log 10 (P.M.)	Peso Molecular (Da)
0.1	0.027	11.988	160,762
0.3	0.081	11.851	140,231
0.4	0.108	11.783	130,970
0.6	0.162	11.646	114,243
0.7	0.189	11.578	106,699
1.1	0.297	11.304	81,185
1.3	0.351	11.168	70,817
1.4	0.378	11.100	66,140
1.8	0.486	10.826	50,325
2	0.541	10.690	43,898
2.2	0.595	10.553	38,292
2.5	0.676	10.348	31,195
2.8	0.757	10.143	25,414

Cuadro 18. RESULTADOS DE LA ELECTROFORESIS DE LA MUESTRA DE *E. COLI* REDUCIDA

Distancia Recorrida (cm)	Rf	Log 10 (P.M.)	Peso Molecular (Da)
0.2	0.049	11.933	152,161
0.4	0.098	11.809	134,509
0.6	0.146	11.686	118,905
0.7	0.171	11.624	111,795
0.9	0.220	11.501	98,826
1.1	0.268	11.378	87,361
1.4	0.341	11.193	72,609
1.6	0.390	11.070	64,186
1.7	0.415	11.008	60,348
1.9	0.463	10.885	53,347
2.1	0.512	10.761	47,15
2.3	0.561	10.638	41,
2.4	0.585	10.576	39,19
2.7	0.659	10.391	32,57
3	0.732	10.206	27,076
3.3	0.805	10.021	22,504

Cuadro 19. RESULTADOS DE LA ELECTROFORESIS DEL MARCADOR DE PESO MOLECULAR S8445

Distancia Recorrida (cm)	Rf	Log 10 (P.M.)	Peso Molecular (Da)	Probable Proteína Correspondiente (Da)
0.4	0.098	11.809	134,509	β-Galactosidasa de E. *coli* (116,000)
1	0.244	11.439	92,917	Fosforilasa b de músculo de ratón (97,000)
1.5	0.366	11.131	68,268	Albúmina de suero bovino (66,000)
2	0.488	10.822	50,133	Deshidrogenasa Glutámica (55,000)
2.3	0.561	10.638	41,685	Ovoalbúmina (45,000)
2.6	0.634	10.453	34,648	Gliceraldehído-3-fosfato Deshidrogenasa (36,000)
2.8	0.683	10.330	30,623	Anhidrasa carbónica (29000)
3.2	0.780	10.084	23,964	Tripsinogeno (24,000)
3.4	0.829	9.960	21,172	Tripsina (20,000)

La **electrotransferencia** de las proteínas al papel de nitrocelulosa fue realizada aplicando 100mA durante 5 horas, procurando mantener la temperatura mediante el recambio periódico de la solución de transferencia periódicamente durante el procedimiento. Al finalizar la transferencia, la nitrocelulosa fue teñida con Rojo Ponceau, se observaron las bandas y se evaluó la calidad de la trasferencia. Luego se lavó y decoloró con PBS-T y agua bidestilada (Fotografía 18). Igualmente, para verificar la transferencia, una vez finalizado, también se tiñó el gel con azul de Coomassie y se observó el remanente de las bandas de la corrida electroforética (Fotografía 19).

Fotografía 18. Membranas de nitrocelulosa luego de la inmunoelectrotransferencia, teñidos con Rojo Ponceau.

Fotografía 19. Geles escaneados y teñidos con Azul de Metileno luego de la inmunoelectrotrasferencia de proteínas.

Se elaboraron las tiras y se realizó la inmunodetección por Western Blot de IgA específicas contra E. *coli* a 15 de las 27 muestras positivas por ELISA. En donde las muestras reaccionaron a diferentes proteínas. (Fotografía 20; Cuadro 20; Gráfica 6):

M.P.C.1: Con resultado de urocultivo negativo y una O.D. de 1.897 en la prueba de ELISA, reaccionó contra tres proteínas, de aproximadamente 61.8kDa, 48.6kDa y 33.9kDa de peso molecular.

M.P.C.2: Con urocultivo negativo y O.D. de 0.934. Reaccionó contra tres proteínas de peso aproximado: 135.4kDa, 31.9kDa y 23.6kDa.

M.P.C.3: Con urocultivo negativo y O.D. de 1.739. Reaccionó contra dos proteínas de peso aproximado: 135.4kDa y 51.7kDa.

M.N.72: Corresponde a una muestra negativa por cultivo y por ELISA, utilizada como Control Negativo Alto (O.D.: 0.721). No reaccionó con ninguna proteína.

M.P.C.4: Con urocultivo positivo por Klebsiella *pneumoniae* y O.D. de 1.026. Reaccionó contra tres proteínas de peso aproximado: 152.6kDa, 48.6kDa y 31.9kDa.

M.P.C.5: Muestra con urocultivo positivo por E. *coli* y O.D. de 1.883, reaccionó contra una proteína de 51.7kDa.

M.P.C.6: Con urocultivo positivo por E. *coli* y O.D. de 2.073, reaccionó contra dos proteínas de: 94.3kDa y 26.6kDa.

M.N.63: Corresponde a una muestra con urocultivo positivo por Klebsiella pneumoniae y negativa por ELISA (O.D.: 0.120); utilizada para comparar sus resultados con la M.P.C.4, igualmente con urocultivo positivo por K. *pneumoniae*, pero positiva por Elisa. No reaccionó con ninguna proteína.

M.P.C.7: Con urocultivo negativo y O.D. de 1.709. Reaccionó contra dos proteínas de peso aproximado: 152.5kDa y 23.6kDa.

M.P.C.8: Muestra con urocultivo negativo y una O.D. de 2.090. Reaccionó contra cuatro proteínas de peso aproximado: 152.4kDa, 94.3kDa, 74.2kDa y 21.0kDa.

M.P.C.9: Resultado de urocultivo positivo por E. *coli* y ELISA positivo, O.D. de 1.184. Reaccionó contra una proteína: 52.9kDa.

M.P.C.10: Muestra con urocultivo negativo y O.D. de 2.007. Reaccionó contra dos proteínas de peso aproximado: 152.6kDa y 54.9kDa.

M.P.C.11: Con urocultivo positivo por E. *coli* y O.D. de 1.633. Reaccionó contra dos proteínas de: 61.9kD y 31.9kDa.

M.P.C.12: Presentó urocultivo positivo por E. *coli* y O.D. de 1.583. Reaccionó contra dos proteínas de peso aproximado: 152.5kDa, y 51.7kDa.

M.P.C.13: Con urocultivo positivo por E. *coli* y O.D. de 1.880. Reaccionó contra dos proteínas de: 152.5kD y 48.6kDa.

M.P.C.14: Presentó resultado de urocultivo negativo y O.D. de 1.879. Reaccionó contra dos proteínas de: 48.6kD y 40.6kDa.

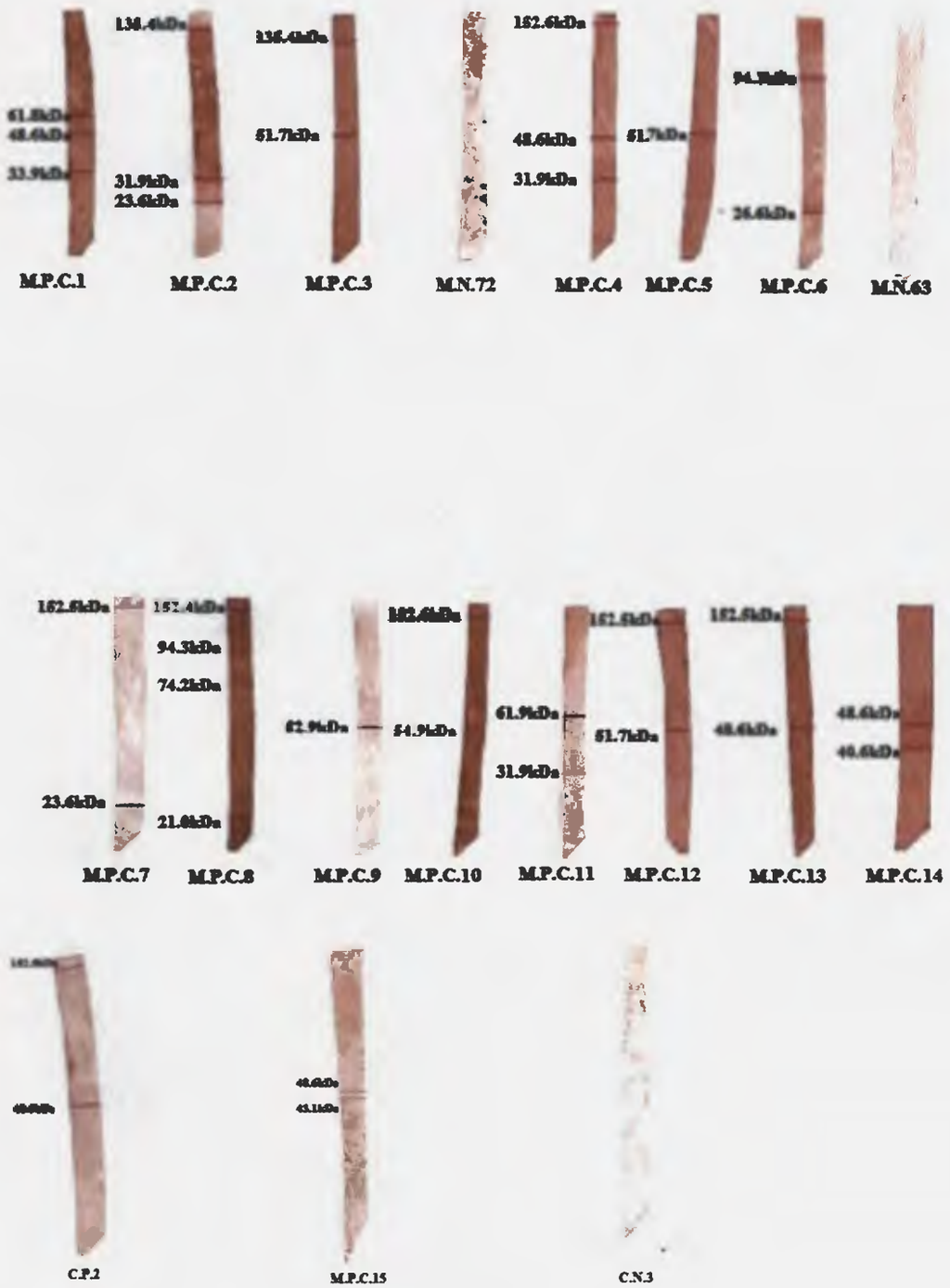
C.P.2: Control Positivo, con urocultivo positivo por E. *coli* y ELISA positivo (O.D. 1.783). Reaccionó contra dos proteínas de pesos moleculares aproximados: 152.5kDa y 48.6kDa.

M.P.C.15: Con urocultivo negativo y O.D. de 1.164. Reaccionó contra dos proteínas de: 48.6kDa y 43.1kDa.

C.N.3: Control Negativo Bajo. Con Urocultivo negativo y ELISA Negativo (O.D. 0.062). No reaccionó con ninguna proteína.

En la Cuadro 14 se presenta un resumen de los resultados de Urocultivo, de ELISA e Inmunodetección por Western Blot de IgA específica contra E. *coli* en orina, observándose que se analizaron un total de 109 muestras. De estas 70 presentaron resultados de urocultivos positivos por E. *coli*, 10 por Klebsiella *pneumoniae*, dos por Proteus *mirabilis*, uno por Citrobacter *koseri*, uno por levadura, uno por Morganella *morganii*, uno por Providencia *retgueri*, uno por Stenotrophomona *maltophilia*; 16 fueron negativos y seis fueron reportados como Cultivo Polimicrobiano.

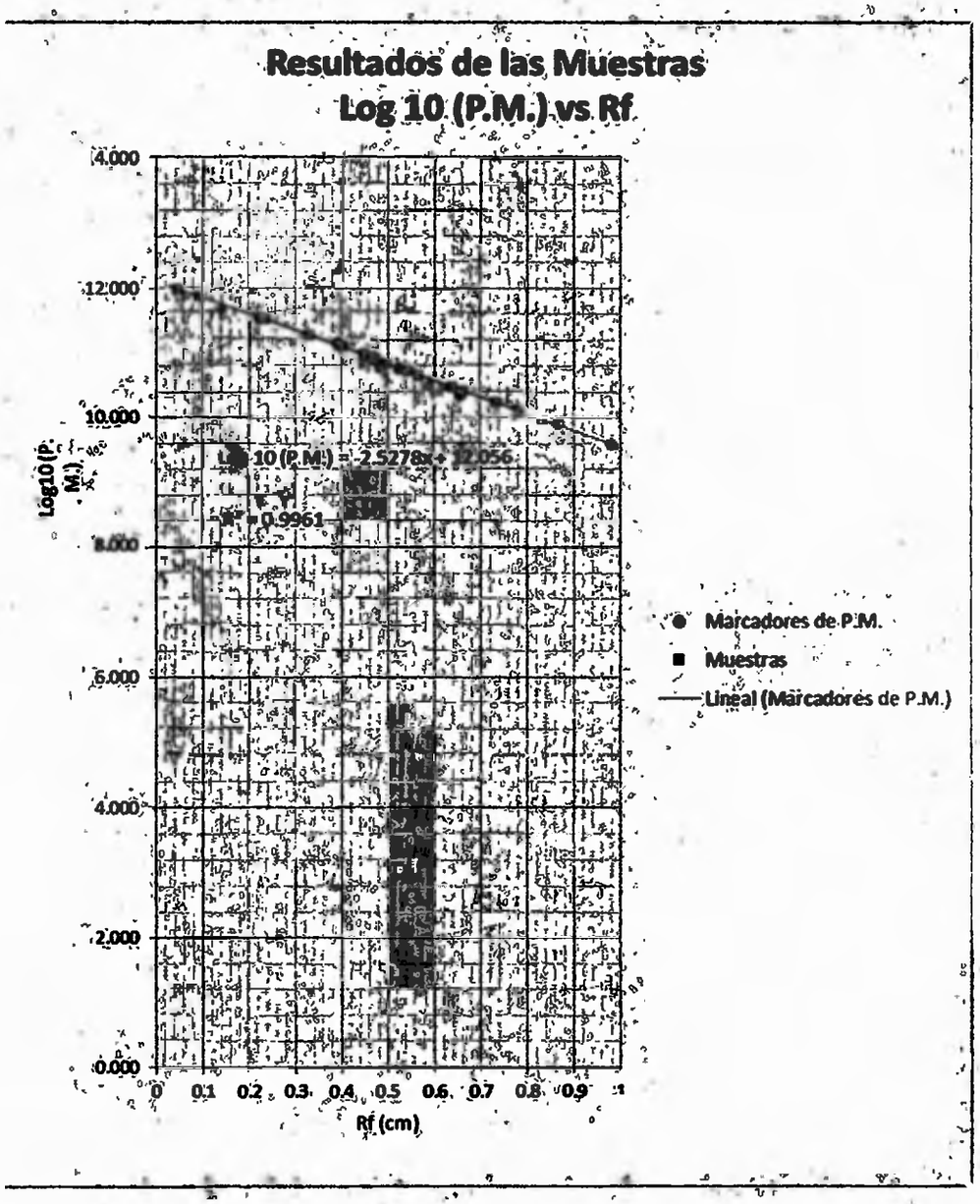
Un total de 27 muestras fueron positivas en la prueba de Elisa, de las cuales 17 eran positivas por E. *coli* en el urocultivo; nueve tenían urocultivos negativos; y una tenía urocultivo positivo por Klebsiella *pneumoniae* (Cuadro 21). De estas 27, 15 fueron analizadas mediante Western blot, resultando todas positivas y obteniéndose reacción contra proteínas de pesos moleculares aproximados a: 152kDa, 135kDa, 94kDa, 74kDa, 61kDa, 54kDa, 52kDa, 49kDa, 43kDa, 41kDa, 34kDa, 32kDa, 27kDa, 24kDa y 21kDa. Estas reacciones corresponden a pesos aproximados de proteínas o bandas observadas en la electroforesis de la muestra de E. *coli* reducida (Cuadro 22).



Fotografía 20. Resultados de la Inmunodetección de IgA específica contra E. coli por Western Blot.

Cuadro 20. RESULTADOS DE LA INMUNODETECCIÓN DE IGA ESPECÍFICA CONTRA E. *COLI* POR WESTERN BLOT

[illegible]	[illegible]	O.D.	Distancia Recorrida (cm)	Rf	[illegible]	Log 10 (P.M.)	Peso Molecular (Da)
M.P.C.1	Negativo	1.897	1.7	0.405		11.032	61,836
			2.1	0.500		10.792	48,635
			2.7	0.643		10.431	33,882
M.P.C.2	Negativo	0.934	0.4	0.095		11.816	135,382
			2.8	0.667		10.370	31,887
			3.3	0.786		10.069	23,603
M.P.C.3	Negativo	1.739	0.4	0.095		11.816	135,382
			2	0.476		10.853	51,677
M.N. 72	Negativo	0.721	Negativo	Negativo	Control Negativo Alto	Neg	Neg
M.P.C.4	Klebsiella Pneumoniae	1.026	0.2	0.048		11.936	152,608
			2.1	0.500		10.792	48,635
			2.8	0.667		10.370	31,887
M.P.C.5	E. coli	1.883	2	0.476		10.853	51,677
M.P.C.6	E. coli	2.073	1	0.238		11.454	94,314
			3.1	0.738		10.190	26,648
M.N.63	Klebsiella Pneumoniae	0.120	Negativo	Negativo	Muestra Klebsiella +, Elisa Neg.	Neg	Neg
M.P.C.7	Negativo	1.709	0.2	0.048		11.935	152,461
			3.3	0.786		10.069	23,603
M.P.C.8	Negativo	2.090	0.2	0.048		11.935	152,461
			1	0.238		11.454	94,314
			1.4	0.333		11.214	74,179
			3.5	0.833		9.950	20,959
M.P.C.9	E. coli	1.184	2	0.467		10.876	52,866
M.P.C.10	Negativo	2.007	0.2	0.048		11.936	152,608
			1.9	0.452		10.913	54,909
M.P.C.11	E. coli	1.633	1.7	0.405		11.033	61,873
			2.8	0.667		10.370	31,887
M.P.C.12	E. coli	1.583	0.2	0.048		11.935	152,461
			2	0.476		10.853	51,677
M.P.C.13	E. coli	1.880	0.2	0.048		11.935	152,461
			2.1	0.500		10.792	48,635
M.P.C.14	Negativo	1.879	2.1	0.500		10.792	48,635
			2.4	0.571		10.613	40,645
C.P.2	E. coli	1.783	0.2	0.048		11.935	152,461
			2.1	0.500		10.792	48,635
M.P.C.15	Negativo	1.164	2.1	0.500	Control Positivo	10.792	48,635
			2.3	0.548		10.672	43,119
C.N.3	Negativo	0.062	Negativo	Negativo	Control Neg. Bajo	Neg	Neg



Gráfica 6. Resultados de las Muestras. Log 10 (P.M.) vs Rf.

Cuadro 21. RESUMEN DE RESULTADOS DE CULTIVO, ELISA E INMUNODETECCIÓN POR WESTERN BLOT DE IGA ESPECÍFICA CONTRA E. *COLI* EN ORINA

Resultados de Cultivos	Cantidad	Positivos por Elisa	Confirmados por Western Blot
Citrobacter koseri	1	0	0
E. coli	70	17	6
Klebsiella pneumoniae	10	1	1
Levadura	1	0	0
Morganella morganii	1	0	0
Negativo	16	9	8
P. retgueri	1	0	0
Polimicrobiana	6	0	0
Proteus mirabilis	2	0	0
Stenotrophomona maltophilia	1	0	0
Total	109	27	15

Cuadro 22. COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS DE LA INMUNODETECCIÓN CON LA ELECTROFORESIS DE LA MUESTRA DE E. *COLI* REDUCIDA.

Inmunodetección (kDa)	Proteína correspondiente (kDa)
152	152
152	
152	
152	
152	
152	
152	
152	
135	135
	119
	111
94	99
94	
	87
74	73
	64
61	60
61	
54	54
52	
52	
52	
52	
49	47
49	
49	
49	
49	
49	
43	42
41	39
34	33
32	
32	
32	
27	27
24	23
24	
21	

El cuadro 22 presenta una comparación de las reacciones observadas en la inmunodetección y sus probables proteínas o bandas correspondientes obtenidas en la Electroforesis de la muestra de E. *coli* Reducida.

2. DISCUSIÓN

El objetivo del presente estudio fue la elaboración y estandarización cualitativa de una prueba de ELISA en orina específica contra E. *coli*, así como también de una prueba de Western blot que permitiera la confirmación y determinación de sus proteínas más inmunogénicas. Estas pueden ser utilizadas como antígenos para pruebas de ELISA y para elaborar tiras de Western blot para la inmunodetección a nivel comercial.

Para los ensayos se utilizaron muestras de cultivos de orina del C.H.Dr.A.A.M. Todas las muestras correspondían a pacientes mayores de 17 años, por lo que estas pruebas han sido estandarizadas con muestras de pacientes adultos; sería recomendable su evaluación en muestras pediátricas, que, por tener niveles inferiores de inmunoglobulinas, pueden no ser detectadas y se requieran modificaciones al procedimiento.

Las muestras no diluidas debieron ser alícuotadas y almacenadas a una temperatura igual o menor de -20° durante un período igual o inferior a tres meses para conservar las IgA presentes. Cuando se iban a utilizar se dejaron descongelar a temperatura ambiente. Debiendo ser centrifugadas a 800 x g por 10 minutos antes

de ser utilizadas, sobre todo si presentan alta turbidez, para evitar interferencias con el ensayo. No se repitieron ciclos de descongelación-congelación ya que podían causar el deterioro de las inmunoglobulinas presentes, produciendo falsos negativos (Assaypro, 2012; Mercodia, 2008).

Para la estandarización del ELISA, se evaluaron diferentes parámetros, entre ellos:

- Concentración del antígeno: obtenido de soluciones de OM-89. Fueron probadas concentraciones de 2ug/ml, 3ug/ml, 4ug/ml y 5 ug/ml.
- Dilución del conjugado: 1:5,000; 1: 10,000; 1: 25,000; 1:50,000.
- Dilución de la muestra de orina: sin diluir, 1:10, 1:50, 1:100.
- Tiempos de incubación de la muestra de orina y del conjugado

La estandarización del ELISA se obtuvo a una concentración de antígeno de 4ug/ml, diluyendo el conjugado a 1: 50,000 y utilizando la muestra de orina sin diluir, con una mejor visualización de las absorbancias. La concentración óptima del conjugado obtenida concordó con la recomendada por el fabricante para pruebas de ELISA. En tanto que, la muestra de orina no debe ser diluida; ya que, luego de resultados poco favorables, se procedió a analizar estas muestras por otra técnica automatizada basada en nefelometría (Equipo Immage Beckman Coulter), obteniéndose resultados bajos o indetectables de IgA total.

En cuanto a los tiempos de incubación, las muestras de orina fueron incubadas por 2 horas, obteniéndose resultados óptimos. Según la literatura este tiempo es adecuado para que las IgA (presentes en las muestras de orina) reaccionen con sus respectivos

antígenos a temperatura ambiente (Assaypro, 2012; abcam, 2010). También se ensayó incubando la muestra toda la noche a 4°C, obteniéndose absorbancias similares en ambas condiciones para todas las muestras analizadas. Sin embargo, se recomienda la primera opción, por ser más rápida y evitar contaminaciones y/u otros inconvenientes. En tanto que el conjugado requirió un tiempo de incubación de 1 hora a temperatura ambiente.

Los platos pueden ser almacenados a 4°C para ser utilizados posteriormente, fueron probados hasta dos semanas luego de ser elaborados. Sin embargo, se obtuvieron resultados óptimos al utilizar los platos inmediatamente luego del bloqueo y de ser lavados. Por lo que, las pruebas de ELISA fueron realizadas de forma continua, luego de retirar y lavar la solución de bloqueo.

Los controles negativos fueron seleccionados en base a dos parámetros:

- Que presentaran urocultivos negativos: Considerando que era posible que de esta forma se disminuyera la probabilidad de que presentaran IgA específica contra E. *coli*.
- Una visible negatividad en pruebas de Elisa para detectar IgA específica contra E. coli en orina en análisis previos.

El valor de corte fue calculado utilizando los resultados de los controles negativos, basado en estudios similares (Espinoza et al, 2003; Ochoa, 2012). Se seleccionaron 32 controles negativos a partir de los cuales se obtuvo un punto de corte de 0.779 D.O., calculando el promedio de las absorbancias de estos controles negativos y sumándoles tres desviaciones estándar.

Según las observaciones hechas en este estudio, es recomendable que los geles utilizados para la electroforesis sean elaborados 24 horas antes, dejándolos polimerizar a temperatura ambiente; de esta forma se obtuvieron resultados óptimos. Sin embargo, no se deben dejar más de 24 horas porque se secan y tampoco almacenar en el refrigerador a 4°C porque se licuan.

Para la elaboración de las tiras para la inmunodetección, se buscó inicialmente que la fuente de antígenos fuera la solución de OM-89, ya que la misma se utilizó para tapizar los micropocillos de los platos y esto permitiría dilucidar cuales antígenos (o proteínas) de este inmunoestimulador son más inmunogénicas, de igual forma establecer cuales antígenos en específico son los que están reaccionando en los pocillos con las IgA correspondientes en las muestras de orina. Se probaron diferentes concentraciones del gel de separación (8%-20%) compactándolo cada vez más, al suponer que la causa era que los antígenos presentes eran de muy bajo peso molecular; sin embargo, no se obtuvieron proteínas retenidas en el gel. Una causa probable es que los antígenos de E. *coli* presentes en el OM-89, al haber sido sometidos al proceso de liofilización y a la adición de excipientes (No se encontraron cuáles son estos aditivos en la literatura disponible) perdieran su solubilidad en SDS. Por lo que se utilizaron suspensiones de cultivos de 24 horas de E. *coli* a 5 Unidades de Mcfarland. Lavadas tres veces y resuspendidas en SSN.

Todas las cepas ensayadas en la electroforesis presentaron un patrón similar de bandas. Se seleccionó una cepa del H.E.P. obtenida de un urocultivo, por tener la certeza de que se trataba de una cepa en circulación. Se seleccionó la muestra reducida por presentar un mayor número de bandas claramente definidas (16 bandas) correspondientes a proteínas de pesos aproximados de: 152.2kDa, 134.5kDa, 118.9kDa, 111.8kDa,

SISTEMA DE BIBLIOTECAS DE LA
UNIVERSIDAD DE PANAMA

98.8kDa, 87.4kDa, 72.6kDa, 64.2kDa, 60.4kDa, 53.3kDa, 47.1kDa, 41.7kDa, 39.2kDa, 32.6kDa, 27.1kDa y 22.5kDa.

Durante la electrotransferencia se realizaron diversos ensayos, algunos con resultados poco favorables al no observase la transferencia de las proteínas, quedando estas retenidas en el gel (evidenciado por la presencia de bandas al teñir el gel remanente con Azul de Comassi), y otros por la desnaturalización de las proteínas (evidenciado por la ausencia de bandas tanto en el gel remanente con Azul de Comassi, como en la nitrocelulosa teñida con rojo Ponceau). Corrigiendo lo primero al aplicar 100mA durante 5 horas, esto es alargando el tiempo de la electrotranferencia aplicando bajo voltaje. Y evitando la desnaturalización de las proteínas por aumento de la temperatura, al recambiar perióricamente la solución de transferencia durante el procedimiento; manteniendo la solución que no se estaba utilizando en refrigeración.

El marcador de peso molecular utilizado en las corridas (S8445) no presentó el patrón de bandas esperado, por lo que no fue usado para trazar la curva de calibración; en su lugar se utilizó el marcador 17-0446-01 (GE Healthcare) corrido en otro ensayo posterior. Esta curva de calibración permitió esclarecer las proteínas del S8445 que no estaban presentes; tratándose de la miosina (200kDa) que por su alto peso molecular pudo quedar retenida en el superior y las dos últimas proteínas: la α-Lactoalbúmina (14.2kDa) y la Aprotinina (6.5kDa). Se contactó a la casa comercial (Sigma- Aldrich), en un principio cuestionaron si se había calentado el marcador 5 minutos en agua hirviendo. No obstante, esto no se hizo ya que el inserto indicaba que no era recomendable hacerlo. Por último explicaron que

algunas proteínas del marcador pueden perder su solubilidad, lo que pudo haber sucedido en este caso. No se descarta la posibilidad de que estas proteínas al perder parte de sus características hayan quedado retenidas en bandas superiores; este podría ser el caso de la primera banda correspondiente a la β-galactosidasa, que peso 134kDa, valor que esta bastante por encima de los 116kDa que debe pesar.

Resumiendo, se analizaron 109 muestras. De las cuales 70 tenían resultados de urocultivos positivos por E. *coli*, 10 por Klebsiella *pneumoniae*, dos por Proteus *mirabilis*, uno por Citrobacter *koseri*, uno por levadura, uno por Morganella *morganii*, uno por Providencia *retgueri*, uno por Stenotrophomona *maltophilia*, 16 fueron negativos y seis fueron reportados como Cultivo Polimicrobiano.

Se detectaron 27 muestras fueron positivas en la prueba de ELISA para detectar IgA en orina específica contra E. *coli*, de las cuales 17 eran positivas por E. *coli* en el urocultivo; nueve tenían urocultivos negativos; y una tenía urocultivo positivo por Klebsiella *pneumoniae*.

La detección de 9 muestras con urocultivos negativos, pruebas de ELISA y Western Blot positivo, indican que el anticuerpo puede estar presente en altas concentraciones aún en ausencia de la infección activa. Estos pacientes pudieron haber tenido la infección en días pasados al urocultivo y haber o no recibido el tratamiento correspondiente.

Se corrió una muestra con urocultivo positivo por Klebsiella *pneumoniae* y ELISA negativo, a modo de control y para comparar con los resultados de la muestra con urocultivo positivo por K. *pneumoniae* y positivo por ELISA, obteniéndose resultado negativo en la muestra control y positivo en la muestra con ELISA positivo, por lo que se

deduce que este paciente sí presentaba IgA en orina específicas contra E. *coli*. Es posible que el paciente haya presentado la infección recientemente o que el crecimiento de la E. *coli* en cultivo quedara enmascarada o inhibida por el crecimiento de la K. *pneumoniae*. Por otro lado, en un estudio realizado por Meredith & Chiavaroli (2010) la administración oral de OM-89 a ratones aumentó los niveles IgA e IgG plásmaticas específicas contra las 18 cepas de OM-89. En este ensayo, las proteínas de los sueros inmunes también tuvieron actividad contra Proteus mirabilis y Klebsiella pneumoniae. En este punto, es válido mencionar que según la literatura se ha observado capacidad inmunogénicas del OM-89 contra infecciones por otros microorganismos; como es el caso de infecciones urinarias por Klebsiella *pneumoniae* (Schulman, 2007). Siendo esta otra posible explicación a la reactividad de esta muestra de orina en la prueba de ELISA.

De las 27 muestras positivas, las 15 que fueron analizadas mediante Western Blot, resultaron todas positivas, obteniéndose reacción contra proteínas de pesos moleculares aproximados a: 152kDa, 135kDa, 94kDa, 74kDa, 61kDa, 54kDa, 52kDa, 49kDa, 43kDa, 41kDa, 34kDa, 32kDa, 27kDa, 24kDa y 21kDa. Estas reacciones corresponden a pesos aproximados de proteínas observadas en la electroforesis de la muestra de E. *coli* reducida. Siendo las más inmunogénicas (aquellas donde más muestras presentaron reacción) la de aproximadamente 152kDa (8 muestras reaccionaron contra esta proteína) y la de 49kDa (6 muestras reaccionaron contra esta proteína).

Según la literatura existen diversas proteínas con pocos kDa de diferencia que se pueden obtener al analizar muestras de *E. coli*; sin embargo, existen dos

proteínas cuyos pesos son aproximados a los obtenidos en las dos proteínas más inmunogénicas obtenidas en este estudio. La ARN polimerasa subunidad beta dirigida por ADN (RpoB) con peso molecular aproximado de 151kDa y la Biotin Carboxilasa (accC) de 49kDa (EcoProDB, 2015; canSAR, 2015).

Diversos estudios muestran el beneficio de la vacuna oral OM-89, sin embargo, la mayor parte de la literatura actual sobre ensayos controlados aleatorizados prospectivos que evalúan este inmunoestimulador en la profilaxis recurrente de ITU es considerada por algunos de baja calidad, ya que muchos de estas investigaciones se limitan a los primeros 6 meses y en su mayoría se basan únicamente en la presencia de bacteriuria y/o de ITU.

Futuros estudios de mayor calidad deber realizar el seguimiento a medio (> 12 meses) y largo plazo (Neto, Nogueira & Reis, 2015; Schulman, 2007). Otros, están basados en la presencia o incremento de la IgA e IgG plásmatica contra *E. coli* (en ratones) luego de la administración de esta vacuna oral (Meredith & Chiavaroli, 2010). De gran importancia son considerados aquellos que junto con la bacteriuria y la recurrencia de ITU, evalúan el incremento de la IgA en orina luego de la administración de este fármaco (Czerwionka-Szaflarska & Pawlowska, 1996).

La estandarización de pruebas de ELISA y de Western Blot específicas para la detección de IgA conta *E. coli* en orina tienen una importante utilidad en la evaluación del efecto del uso de medicamentos e inmunoestimuladores utilizados para tratar infecciones de las vías urinarias recurrentes, sobre todo, en estudios de seguimiento y comparativos.

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

1. CONCLUSIONES

❖ En elaboración de los platos de la prueba de ELISA para la detección de IgA específica contra E. *coli* en orina se pueden utilizar los antígenos procedentes de la solución del liofilizado OM-89 para recubrir los micropocillos, a una concentración de 4 ug/ml.

❖ En la estandarización cualitativa de la prueba de ELISA para la determinación de IgA urinaria específica contra E. *coli* la dilución adecuada del conjugado fue 1:50,000, la muestra de orina debe ser 1:1, el tiempo de incubación de la muestra de orina es de 2 horas y del conjugado, 1 hora.

❖ La prueba de ELISA estandarizada es apta para evaluar cualitativamente la presencia de IgA específica contra E. *coli* en orina.

❖ Tiene una valiosa aplicación clínica e investigativa para evaluar el efecto del uso de medicamentos e inmunoestimulador utilizados para tratar infecciones de las vías urinarias (en estudios de seguimiento y/o comparativos).

❖ Para la elaboración de las tiras para la inmunodetección de IgA específica contra E. *coli* es conveniente utilizar como fuente de proteínas las cepas de E.

coli en forma reducida. Obteniéndose 16 bandas de pesos moleculares aproximados de: 152.2kDa, 134.5kDa, 118.9kDa, 111.8kDa, 98.8kDa, 87.4kDa, 72.6kDa, 64.2kDa, 60.4kDa, 53.3kDa, 47.1kDa, 41.7kDa, 39.2kDa, 32.6kDa, 27.1kDa y 22.5kDa.

- En el procedimiento, es recomendable que los geles para la electroforesis sean elaborados 24 horas antes, a temperatura ambiente. Los mismos, no se deben dejar más de 24 horas porque se secan y tampoco almacenar en el refrigerador a 4°C porque se licuan.

- Las muestras de orina positivas por ELISA reaccionaron contra varias de estas proteínas de pesos moleculares aproximados: 152kDa, 135kDa, 94kDa, 74kDa, 61kDa, 54kDa, 52kDa, 49kDa, 43kDa, 41kDa, 34kDa, 32kDa, 27kDa, 24kDa y 21kDa. Deduciéndose que las muestras más inmunogénicas fueron aquellas donde más muestras presentaron reacción: la de 152kDa (8 muestras reaccionaron contra esta proteína) y la de aproximadamente 49kDa (6 muestras reaccionaron contra esta proteína).

- La Biotin Carboxilasa (accC) de 49kDa y la ARN polimerasa subunidad beta dirigida por ADN (RpoB) de 151kDa, son las proteínas de *E. coli* con pesos moleculares aproximados a las dos proteínas más inmunógenas obtenidas en este estudio.

2. RECOMENDACIONES

- Se sugiere estandarizar el procedimiento en muestras pediátricas.

- Evaluar estas técnicas con muestras de orina positivas para microorganismos distintos de E. *coli* para descartar reacciones cruzadas.

- Implementar ambas técnicas en el campo médico e investigativo para monitoreo y para comparación de grupos en estudio.

CAPITULO VI.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agirrezabala, J., Aizpurua, I., Albizuri, M., & Alfonso, I. (2011). Infección Urinaria en el adulto: Actualización. *Información Farmacoterapéutica de La Comarca*, *19*(9), 2–7.

Aguado, G. a., Moreno, B., Jiménez, B., García, E., & Preciado, R. (2012). Impacto de los sideróforos microbianos y fitosideróforos en la asimilación de hierro por las plantas: Una síntesis. *Revista Fitotecnia Mexicana*, *35*(1), 9–21.

Abcam. Direct ELISA Protocol. (2010).Consultado: 30 de Jul 2014. Disponible en: http://www.abcam.com/ps/pdf/protocols/indirect%20elisa%20protocol.pdf

Advansta Corporation. (2011). *Análisis de Proteínas: Electroforesis, Transferencia e Inmunodetección.* Consultado desde http://www.ecogen.com/upfiles/A56009.pdf

American Academy of Pediatrics. (2010). Infecciones de las vías urinarias en niños pequeños, 2. Consultado desde http://www.aap.org

Assaypro. (2012). Human IgA ELISA Kit. (2012). Consultado: 30 de Jul 2014. Disponible en: http://assaypro.com/pdf/EI7001_1.pdf

Calderón, E., Casanova, G., Galindo, A., Gutiérrez, P., Landa, S., Moreno, S., … Valdez, R. (2013). Diagnóstico y tratamiento de las infecciones en vías urinarias: un enfoque multidisciplinario para casos no complicados. *Boletín Médico Del Hospital Infantil de México*, *70*(1), 3–10.

Cansar. (2015). Consultado el 27 de Nov. de 2015. Disponible en: https://cansar.icr.ac.uk/cansar/molecular-targets/P24182/

Carraro, J. C., & Ambrosio, I. (2012). O uso de vacinas na profilaxia das infecções do trato urinário. *J Bras Nefrol*, *34*(2), 178–183.

Centro Nacional de Excelencia Tecnológica en Salud. (2008). Prevención, Diagnóstico y tratamiento de la Infección de Vías Urinarias No Complicadas en Menores de 18 años en el primer y segundo niveles de atención., 34.

Chávez-salas, F., Vásquez, O., & Escalante, H. (2007). Evaluación de la técnica Western blot para la detección de antígenos de Hymelonepis nana. *Rev. Peru. Biol.*, *14*(2), 283–286.

Colombiana de Salud S.A. (2014). Guía de Atención de Vías Urinarias en Pediatría.

Cultek. (2006). *Fundamentos y Tipos de ELISAS.* Consultado desde http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/Soluciones-ELISA-protocolos.pdf

Czerwionka-Szaflarska M &Pawłowska M. 1996. Influence of Uro-Vaxom on sIgA level in urine in children with recurrent urinary tract infections. Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 1996;44(2-3):195-7.

Diéguez, R. R., Muñoz, Y., & Castiñeira, M. (2009). La técnica de Western Blot como criterio de identidad para la vacuna antimeningocócica Men B. *Revista Cubana de Farmacia*, *43*(3), 1–10.

Donnenberg, M. (2010). Infecções causadas por Escherichia coli e outros bacilos entéricos gram-negativos – Michael S Donne. *ACP Medicine*, 1–10.

Drago, M. (2009). Sistemas de adquisición de hierro en Salmonella enterica. *Revista Biomédica*, *20*(1100), 41–54.

EcoProDB. *E. coli* Protein Data Base. (2015). Consultado el 27 Nov 2015. Disponible en: http://eecoli.kaist.ac.kr/view?name=AldH

Espinoza, Y., Huapaya, P., Suárez, R., Chávez, V., Sevilla, C., Dávila, C., Huiza, A., Náquira, C., Alva, P .(2003). Estandarización De La Técnica De Elisa Para El Diangóstico De Toxocariasis Humana. Anales de la Facultad de Medicina. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. ISSN 1025 – 5583. Vol. 64, Nº 1 - 2003

Foxman, B., & Buxton, M. (2013). Alternative Approaches to Conventional Treatment of Acute Uncomplicated Urinary Tract infection in Women. *Curr Infect Dis Rep.*, *15*(2), 124–129. doi:10.1007/s11908-013-0317-5.Alternative

G-Biosciences. (2012). *Immunoquantification Technique (ELISA)*. Consultado el 12 de Jul. del 2015. Disponible en: http://www.gbiosciences.com/PDF/Protocol/504_Immunoquantification_Technique_(ELISA).pdf

Gilbart, J. (2011). Recurrent Uncomplicated Urinary Tract Infections – The Place of Immuno-prophylaxis. *European Urological Review*, *6*(2), 114–119.

González, J. D., & Rodríguez, L. M. (2014). Infección de Vías Urinarias en la Infancia. *AEP Protocolos*, (1), 91–108.

Grabe, M., Bjerklund-Johansen, T., Botto, H., Wullt, B., Çek, M., Naber, K. G., Wagenlehner, F. (2012). *Guidelines on Urological Infections*.

Guzmán-vázquez, E. (2004). Las Pruebas de Elisa. *Gac Méd Méx*, *140*(3), 48–49.

Hernández, E. (2010). *"Escherichia Coli" Productores de BLEE Aislados de Urocultivo: Implicaciones en el Diagnóstcio y Tratamiento de la Infección Urinaria.* Universidad Complutense de Madrid.

Herlax, V. (2006). Interacción Lípido - Proteína: Mecanismo de acción de α - hemolisina de Escherichia coli. *Universidad Nacional De La Plata. Facultad de Ciencias Exactas Departamento de Ciencias Biológicas.*

Iowa State University. (2009). *E . Coli* Enterohemorrágica. *The Center for Food Security & Public Health*, 1–12.

Kun Suk Kim, Ji-Yoon Kim, In Gab Jeong, Jae-Seung Paick, Hwancheol Son, Dae Jung Lim, Hong Bang Shim, Won Hee Park, Hee Chang Jung, Myung-Soo Choo. (2010).A Prospective Multi-center Trial of Escherichia coli Extract for the Prophylactic Treatment of Patients with Chronically Recurrent Cystitis. Korean Med Sci 2010; 25: 435-9.

Laboratorios Eurolab (2011). Uro-Vaxom® (OM Pharma) Infecciones Urinarias Recurrentes.

Lettgen B. (1996) Prevención de las infecciones recurrentes de vías urinarias en niñas. Curr Ther Res 1996;57(6):464

Lequin, R. (2005). Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clinical Chemistry*, *51*(12), 2415–8. doi:10.1373/clinchem.2005.051532

Leroy, H., & Tattevin, P. (2012). Infecciones urinarias. *EMC - Tratado de Medicina*, *16*, 1–7. doi:10.1016/S1636-5410(12)62730-5

Liria, C. R. G. De, Hernández, M. M., & Robles, M. A. (2011). Infección urinaria. *Protocolos de Infectología. Asociación Española de Pediatría. Sociedad Española de Infectología Pediátrica.*, 125–134.

López C, Gómez J. (2003). Tratamiento de la infección Urinaria en Pediatria. Revista de Posgrado de la VIa Cátedra de Medicina - N° 123 – Enero 2003. Pág. 3-13 Disponible en: http://med.unne.edu.ar/revista/revista123/inf_uri_ped.htm

Lorenzo-Gómez, M. F., Padilla-Fernández, B., García-Criado, F. J., Mirón-Canelo, J. a, Gil-Vicente, A., Nieto-Huertos, A., & Silva-Abuin, J. M. (2013). Evaluation of a therapeutic vaccine for the prevention of recurrent urinary tract infections versus prophylactic treatment with antibiotics. *International Urogynecology Journal*, *24*(1), 127–134. doi:10.1007/s00192-012-1853-5

Lyons, E. (2010). *Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Student Guide*. Consultado desde http://www.greenmedinfo.com/sites/default/files/Lab_14_ELISA.pdf

Mandariote, A., Gutiérrez N., Valmaseda T., Sosa R., Ontivero, I., Talaver, A., Álvarez, M., Aranguren, Y., Ochoa, R.F. & García. (2012). Estandarización de ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) para la cuantificación de anticuerpos IgG inducidos por una vacuna de vesículas de membrana externa de los serogrupos A y W135 de Neisseria meningitidis. VacciMonitor 2012; 21(2): 16-23.

Mercodia. 2008. Mercodia Ultrasensitive C-peptide ELIS. Consultado el 1 de diciembre de 2015. Disponible en: https://mercodia.com/assets/upload/files/DfU/US%20C-peptide/ver%209.0/Ultra%20C-peptide%209_0%20ES.pdf

Meredith, M. & Chiavaroli, C. (2010). *Inmunoterapia para las infecciones recurrentes del tracto urinario*.

Mensa, J., Pigrau, C., Horcajada, J., Cartón, J., & Pujol, M. (2000). *Protocolos Clínicos SEIMC. Infección urinaria.* (J. Aguado, B. Almirante, & J. Fortún, Eds.). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC).

Molina, J. & Eslava, C. (2015). *Escherichia Coli* Diarrogénica. Departamento de Salud Pública, Facultad de Medicina, UNAM.

Neto K., L. Nogueira & L. Reis, 2015. Vacuna oral (OM-89) en la profilaxis de infección urinaria recurrente: una revisión sistemática realista con metaanálisis. Consultado el: 30 de Nov. De 2015. Disponible en: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0210480615001679

Naves, P. L. F. (2010). Formación de biopelículas por *Escherichia coli* y su correlación con factores de virulencia : prevención y actividad de antimicrobianos frente a organismos planctónicos y asociados a biopelículas. Universidad Complutense de Madrid.

Ochoa, R. (2012). *Técnicas Inmunoenzimáticas Para Ensayos Clínicos de Vacunas y Estudios Inmunoepidemiológicos.* (Finlay, Ed.) (Primera Ed.). La Habana.

Pemberthy, C., Arango, N., Giraldo, N., Amariles, P., Gutiérrez, J., Monsalve, M., … Amariles, P. (2011). Aspectos clínicos y farmacoterapéuticos de la infección del tracto urinario. Revisión estructurada, (2), 135–151.

Pennesi M, Travan L, Peratoner L, Bordugo A, Cattaneo A, Ronfani L, Minisini S, Ventura A; (2008). Is antibiotic prophylaxis in children with vesicoureteral reflux effective in preventing pyelonephritis and renal scars? A

randomized, controlled trial. North East Italy Prophylaxis in VUR study group; Pediatrics. 2008 Jun; 121(6):e1489-94. Epub 2008 May 19.

Pigrau, C., Alós, J., Cueto, M. de, Domingo, A., Rodríguez, D., Horcajada, J., … Liria, C. de. (2013). *Infección del Tracto Urinario*. (Salvat, Ed.). Madrid, España.

Riveros, M., Durand, D., Mercado, E. H., Contreras, C., Mosquito, S., & Ochoa, T. J. (2011). Patrones de adherencia de cepas de *Escherichia coli* Difusamente adherentes (DAEC) provenientes de niños con y sin diarrea. *Revista Peruana de Medicina Experimental Y Salud Publica*, *28*(1), 21–28.

Rodríguez, J. E. (2014). Diagnóstico y Tratamiento de Infecciones de Vías Utinarias en Niños , basado en técnicas de Inteligencia Artificial., *11*, 41–43.

Rondón, M., Rondón, A., & Orence, O. (2007). *Infección del Tracto Urinario* (Primera Ed.). Mérida, Venezuela: Vicerrectorado Académico.

Salas, P., Barrera, P., González, C., Zambrano, P., Salgado, I., Quiroz, L., … Cavagnaro, F. (2012). Actualización en el diagnóstico y manejo de la Infección Urinaria en pediatría . *Revista Chilena de Pediatría*, *83*(3), 269–278.

Schneider, D., Eder, L., Plän, V., Winkler, T., Bachmeier, M., Hülsmann, R., & Spötz, S. (2013). LUCIO ® -Medical ELISA. *Nal von Minden*. Consultado desde http://www.nal-vonminden.com/fileadmin/files/downloads/nal_von_minden_LUCIO_med_ELISA_Brochure_GB.pdf

Schulman, C. (2007). Nueva Propuesta Para El Manejo De Las Infecciones Urinarias Recurrentes. *Medwave* ; 7(8):e3218 doi: 10.5867/medwave.2007.08.3218

Torres, M., & Mattera, A. (2008). Infección urinaria. Consultado desde http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/infeccionurinaria.pdf

Ugalde, D., Hernández, M. G., Ruiz, M. A., & Villarreal, E. (2012). Infecciones del tracto genital y urinario como factores de riesgo para parto pretérmino en adolescentes. *Revista Chilena de Obstetricia Y Ginecología*, *77*(5), 338–341.

Vizcaino, R., Barreto, Y., Bosque, M., Colina, M., & Vancampenhoud, M. (2011). Manejo Ambulatorio de Infección Urinaria. *Archivos Venezolanos de Puericultura Y Pediatría*, *74*(1), 29–33.

Wolfgang G. Bessler, Ulrich vor dem Esche, Andrea Zgaga-Griesz, Ravshan Ataullakhanov Arzneimittelforschung. (2010) Passive vaccination with a human monoclonal antibody: Generation of antibodies and studies for efficacy in Bacillus anthracis infections. 2010; 60 (6):324-329). Yang, Y., & Ma, H. (2009). Western Blotting and ELISA Techniques. *Researcher*, *1*(2), 67–86.

CAPITULO VII

ANEXOS

VII. ANEXOS

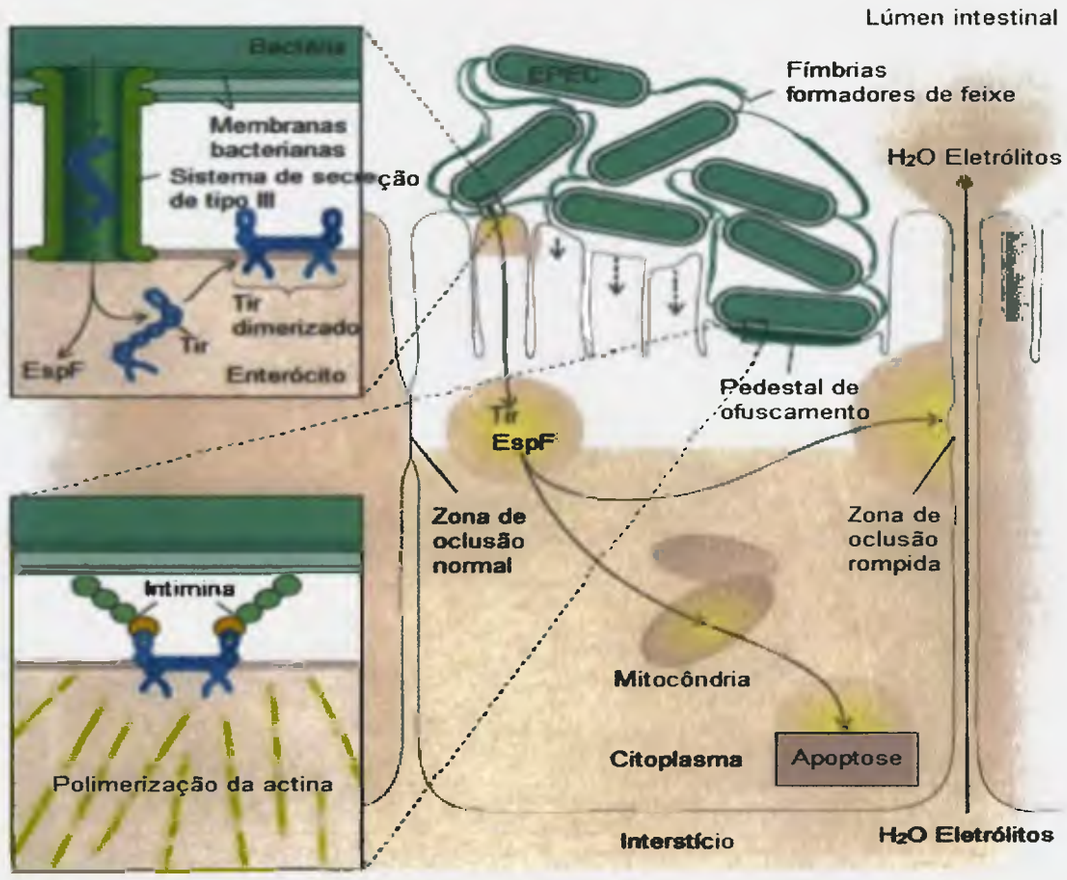


Figura # 1. Patogénesis de las infecciones causadas por *E. Coli* enteropatogénica (ECEP). Las cepas típicas EPEC producen una fimbria formadora de franjas codificada por el plásmido que es necesario para la agregación reversible de las bacterias y para la virulencia total.

Fig. 1: Las bacterias son capaces de inyectar en el interior de las células huésped un número de proteínas, incluyendo Tir y EspF usando un sistema de secreción de tipo III especializado que es codificado por el cromosoma. El Tir forma un dímero en la membrana de la célula huésped, donde actúa como un receptor para una proteína de membrana externa bacteriana - adhesina intimina. La intimina tiene múltiples dominios que también son esenciales para la virulencia. La unión de la intimina causa que Tyr active una maquinaria celular para la polimerización de la actina, lo que lleva a la formación de los característicos pedestales de fijación a la que el organismo se adhiere. La EspF causa pérdida de la función de la barrera intestinal debido a la ruptura de las zonas de oclusión e induce la muerte de la célula huésped a través de la apoptosis. Fuente: (Donnenberg, 2010).

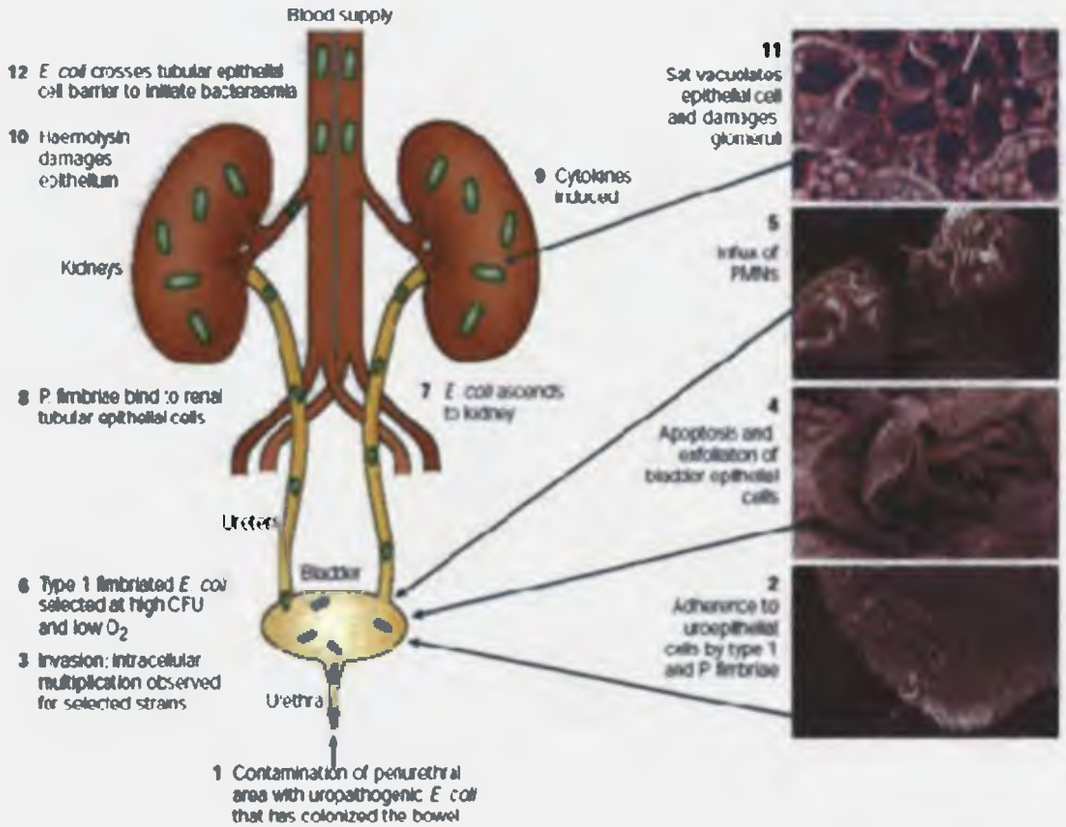


Figura # 2. Representación de la patogénesis de las infecciones del tracto urinario causadas por las cepas de *E. coli* uropatógenas. (1) Contaminación de la región periuretral con cepas UPEC procedentes del intestino grueso; (2) Adherencia a las células uroepiteliales mediada por las fimbrias tipo 1 y P; (3) Invasión y multiplicación intracelular observada para algunas cepas; (4) Apoptosis y exfoliación de las células del epitelio de la vejiga; (5) Atracción de polimorfonucleares; (6) Selección de elevado número bacterias que expresan fimbrias tipo 1 y baja tensión de O2.

Fig. 2: (7) Las cepas de E. coli ascienden hacia los riñones; (8) Las fimbrias tipo 1 se ligan a los receptores de las células epiteliales de los túbulos renales; (9) Inducción de citocinas; (10) Hemolisina daña el epitelio; (11) Vacuolización de las células epiteliales y daño de los glomérulos por la toxina SAT y (12) Cepas de E. coli atraviesan la barrera del epitelio tubular e inician un cuadro de bacteriemia. Fuente: (Kaper et al., 2004).

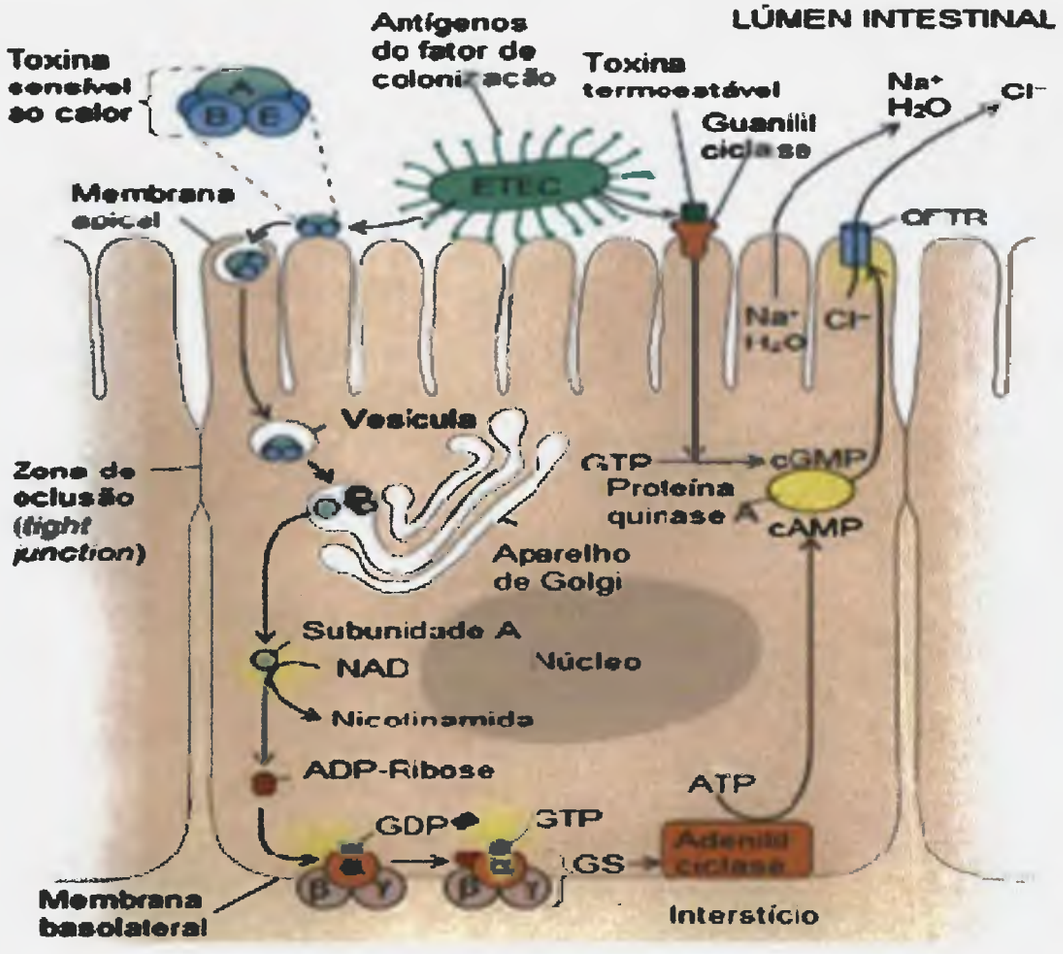


Figura # 3. Patogenia de las infecciones por *Escherichia coli* enterotoxigénica (ECET). Organismos de ETEC se adhieren a las células epiteliales por uno de varias adhesinas conocidas como antígenos de factor de colonización. No se produce daño a las células epiteliales. Las ETEC producen una toxina sensible al calor (LT) o una toxina termoestable (ST).

Fig. 3: También pueden producir ambas toxinas. LT se compone de un pentámero de subunidades B ligadoras de receptor que no están fijados por enlaces covalentes a una sola subunidad A enzimáticamente activa. Después de la unión al receptor de glicolípido y entrar en el enterocito, LT es transportado retrógradamente dentro de vesículas unidas a la membrana del aparato de Golgi. La subunidad A alcanza su objetivo en la membrana celular basolateral, que forma la subunidad alfa del receptor acoplado de la proteína G-heterotrimerica estimulatoria (GA), y cataliza una ribozilación del objetivo adenosina difosfato (ADP). La subunidad alfa modificado se ha quedado atascado en su forma activa unida a la trifosfato de guanosina (GTP), que la obliga a activar constitutivamente la adenil ciclasa. Los niveles elevados de monofosfato de adenosina cíclico (cAMP) resultante conducen a la activación de la proteína quinasa A (PKA), así como a la fosforilación y apertura del regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR, regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística). ST activa una vía distinta, pero convergentes. Al ser un péptido rico en enlaces disulfuro, el ST se parece a la hormona peptídica endógena guanilina. Como su contraparte, ST se une y activa la guanilil ciclasa C unida a la membrana, lo que conduce a la elevación de los niveles de monofosfato de guanosina cíclico (cGMP). Como con LT, esto conduce al flujo de salida de electrolitos y líquidos a través de CFTR.4,33 Cl = cloruro. PIB = difosfato de guanosina. GTP = trifosfato de guanosina. NAD = dinucleótido de nicotinamida-adenina. Fuente: (Donnenberg, 2010).

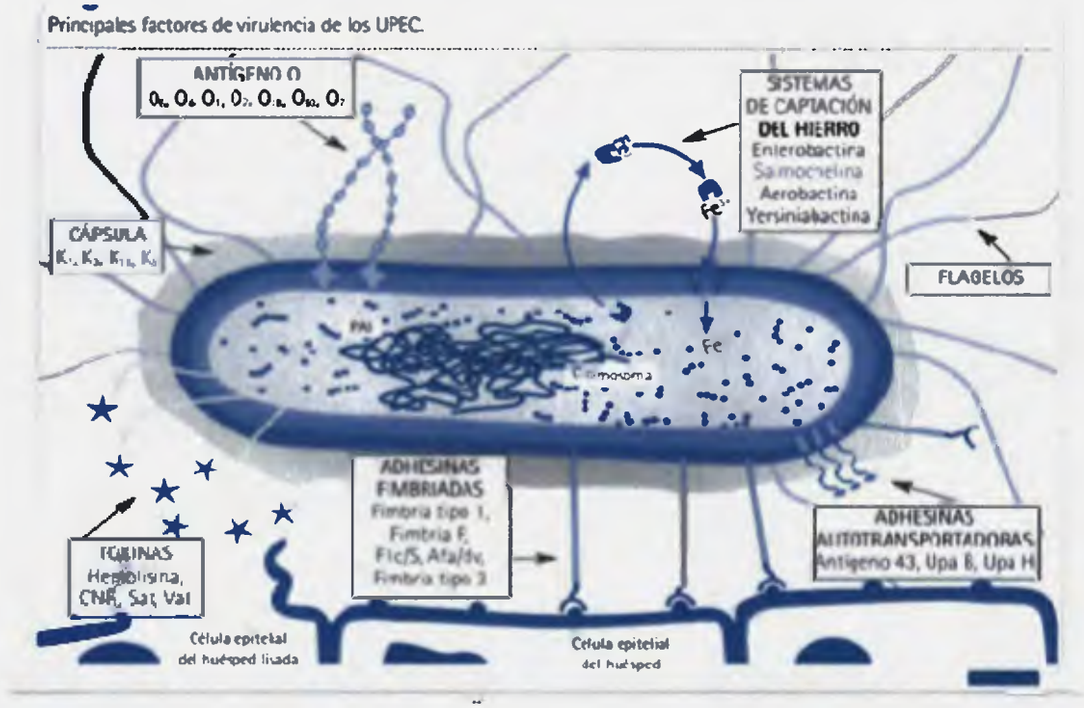


Figura # 4. Principales factores de virulencia de E. coli.

Fuente: (Pigrau et al., 2013)

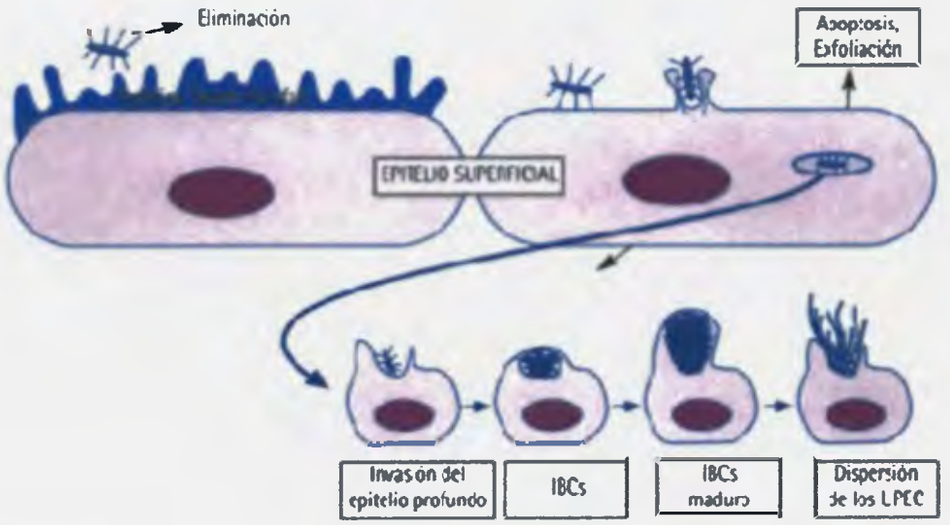


Figura # 5. Efectos Patógenos Desencadenados Por La Fimbria Tipo 1.

En las vías urinarias se une además a la proteína Tamm-Horsfall, unión que actúa como un mecanismo de defensa inespecífico ya que evita la unión de la fimbria tipo 1 y de las restantes fimbrias de *E. coli* al epitelio subyacente. Por ello, esta unión de la fimbria tipo 1 a la proteína Tamm-Horsfall favorece la eliminación del *E. coli*. Estudios experimentales demostraron que cuando la capa formada por la proteína Tamm-Horsfall se daña, quedan adheridos al epitelio gran número de *E. coli*, proceso que podría explicar la evolución a brotes observado en las IU de repetición. La fimbria tipo 1 es fundamental en la patogenia de la infección, ya que en el modelo animal facilita la colonización, induce la respuesta defensiva del huésped, y promueve la formación de IBCs y la invasión de las células del huésped. Fuente: (Pigrau et al., 2013)

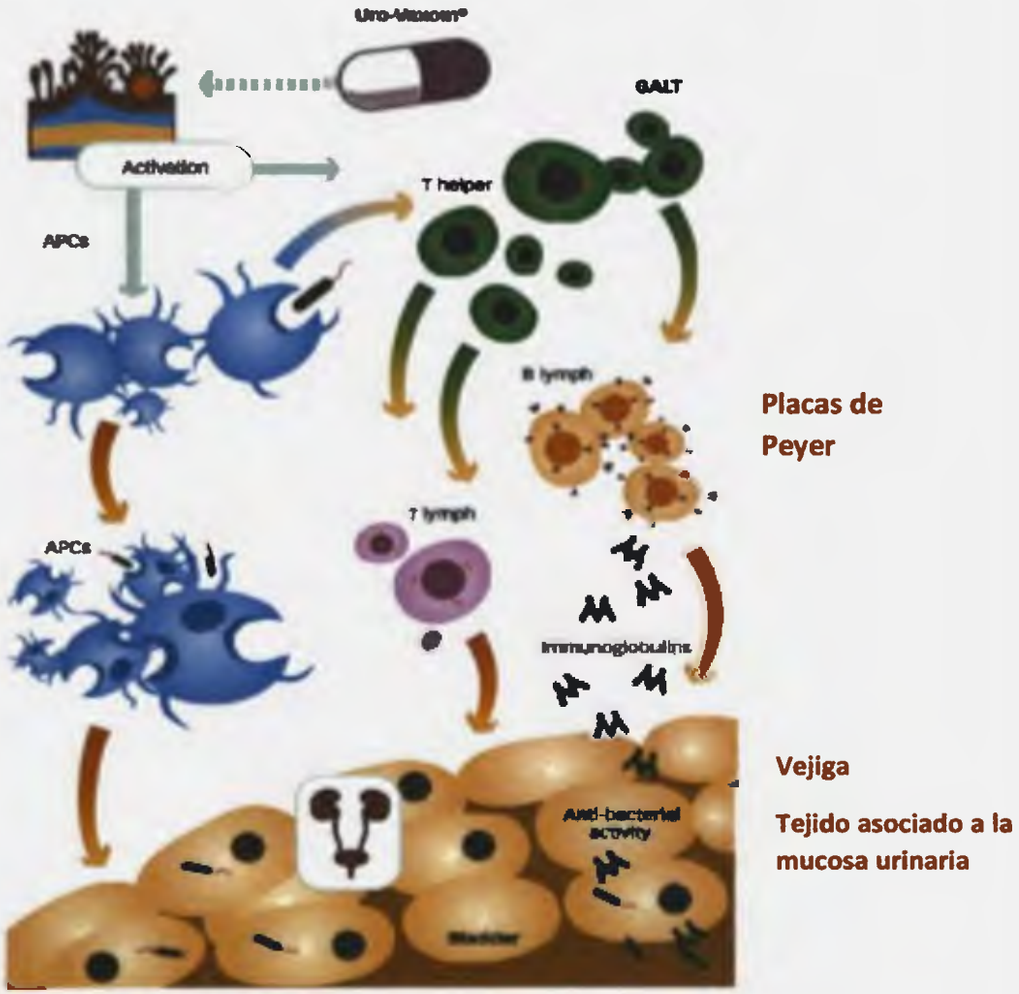


Figura # 6. Modo Putativo de Acción de OM-89 en la Estimulación e Incremento de la Respuesta Inmune a la Infección Bacteriana en Infecciones Recurrentes del Tracto Urinario. APCs = Antígenos presentadores de células; B lymph = Linfocitos B; GALT = Tejido linfoide asociado al intestino; T lymph = Linfocitos T.

Fig. 6: El Uro-Vaxom produce una activación inmunitaria a nivel de las placas de Peyer y luego, una migración de los linfocitos T y B activados a todos los tejidos linfoides asociados con mucosa, en particular con la mucosa urinaria. Fuente: (Gilbart, 2011).

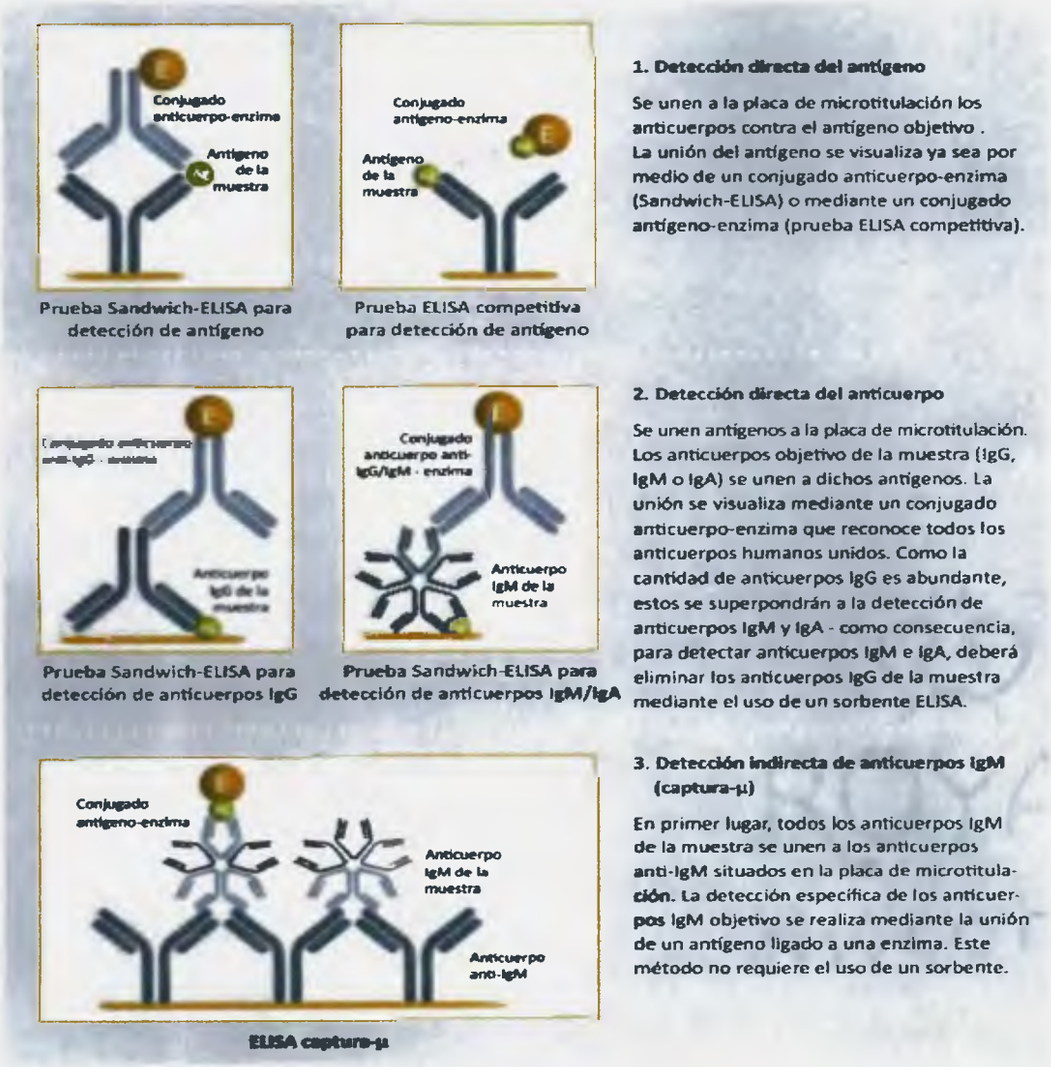


Figura # 7. Detección por medio de Método ELISA.

Fuente: (Schneider et al., 2013).

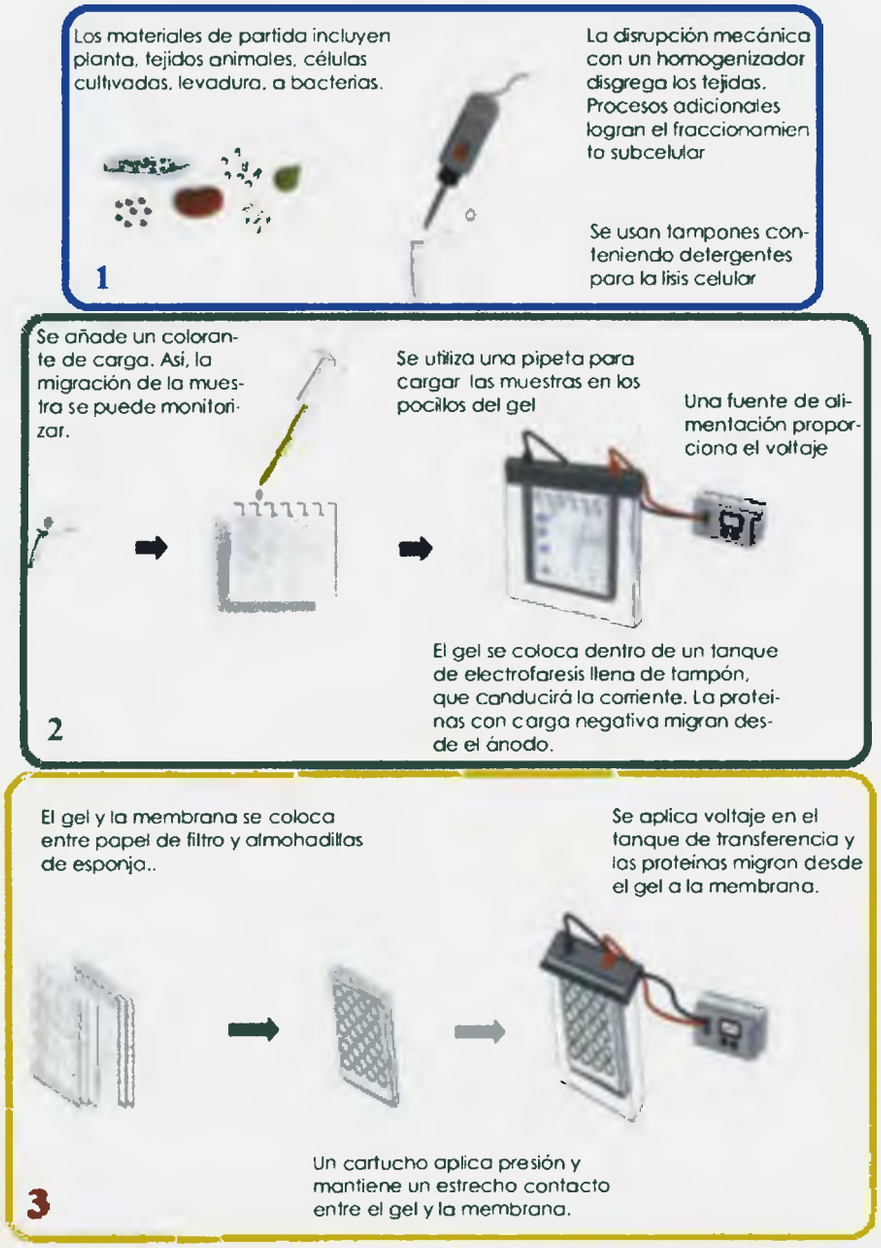


Figura # 8. Visión General (Pasos) del Western Blot A. 1- Preparación de muestras; 2- Electroforesis en Acrilamida; 3- Transferencia de Proteínas a la Membrana (Advansta Corporation, 2011).

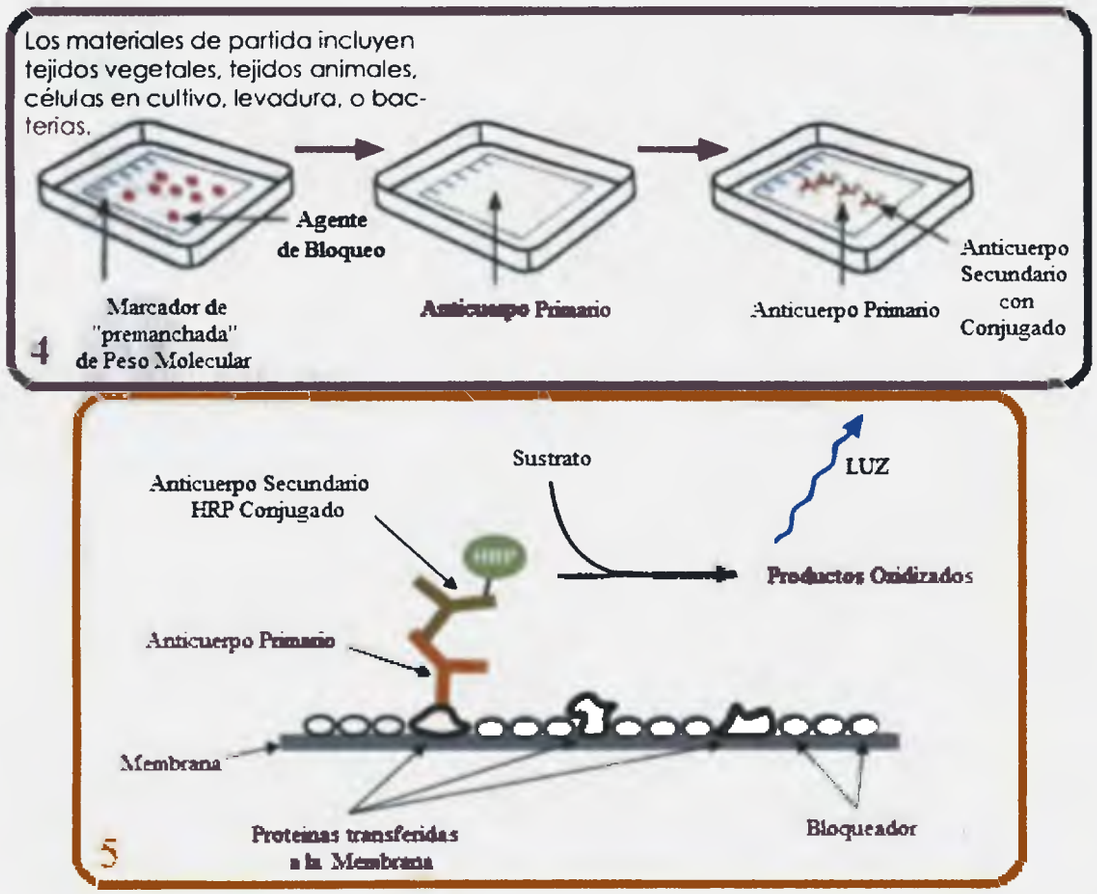
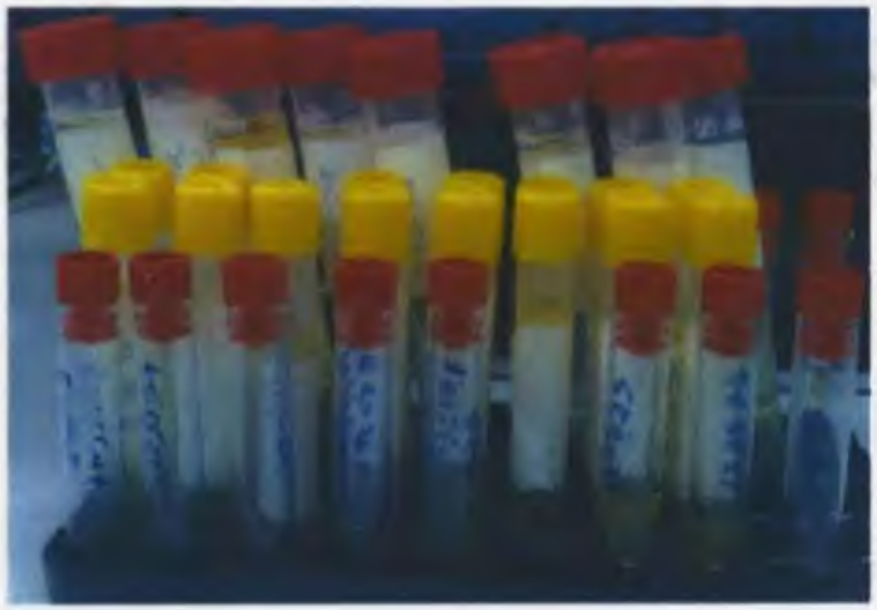


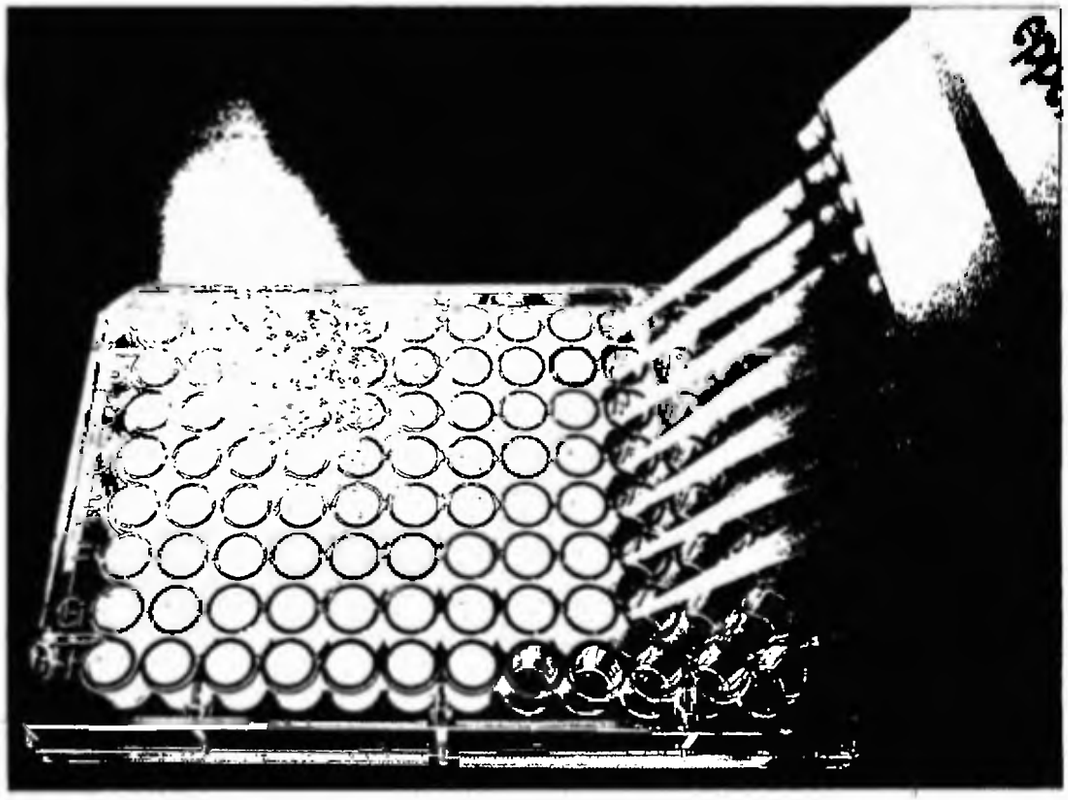
Figura # 9. Visión General (Pasos) del Western Blot B. 4- Hibridación de Anticuerpo; 5- Detección quimioluminiscente de las bandas de proteínas. (Advansta Corporation, 2011).

Fotografía 1. Muestras de orinas de pacientes del C.H. Dr. A A. M.



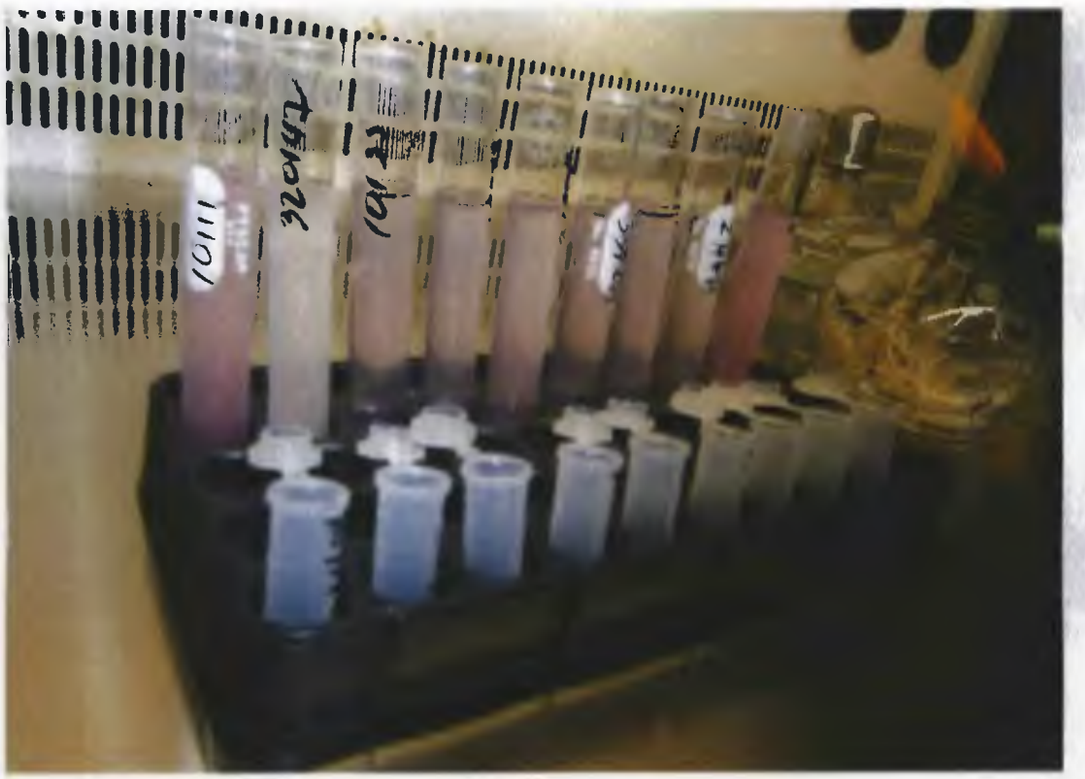
Fotografía 2. Muestras de Orina del C.H. Dr. A.A.M. para almacenar.

Fotografía 3. Lavador Stat Fax- 2600. Tanto en la preparación de los platos, como en las corridas de las pruebas de ELISA se realizaron lavados de forma automatizada. Dispensando en cada pocillo 300µl de la solución de lavado y retirando por aspiración, repitiendo 3 ciclos de lavados. Posteriormente se removió cualquier remanente de la solución de lavado, mediante la inversión del plato sobre papel toalla limpio.



Fotografía 4. Bloqueo de los platos. Se añadió 300µl de la solución de bloqueo a cada pocillo. Posteriormente se incubó a 4°C toda la noche.

Fotografía 5. Cultivos de Escherichia *coli* con 24 horas de incubación a 37° C.



Fotografía 6. Preparación de la muestra de E. coli para realizar la electroforesis A. Fueron preparadas suspensiones de *E. coli* a 5 Mcfarland en solución salina normal (SSN). Fueron centrifugadas a 2,000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. Luego de descartar el sobrenadante, el precitado fue resuspendido en 5ml de SSN. Este lavado fue repetido dos veces más. El precipitado resultante fue resuspendido en 5ml de SSN.

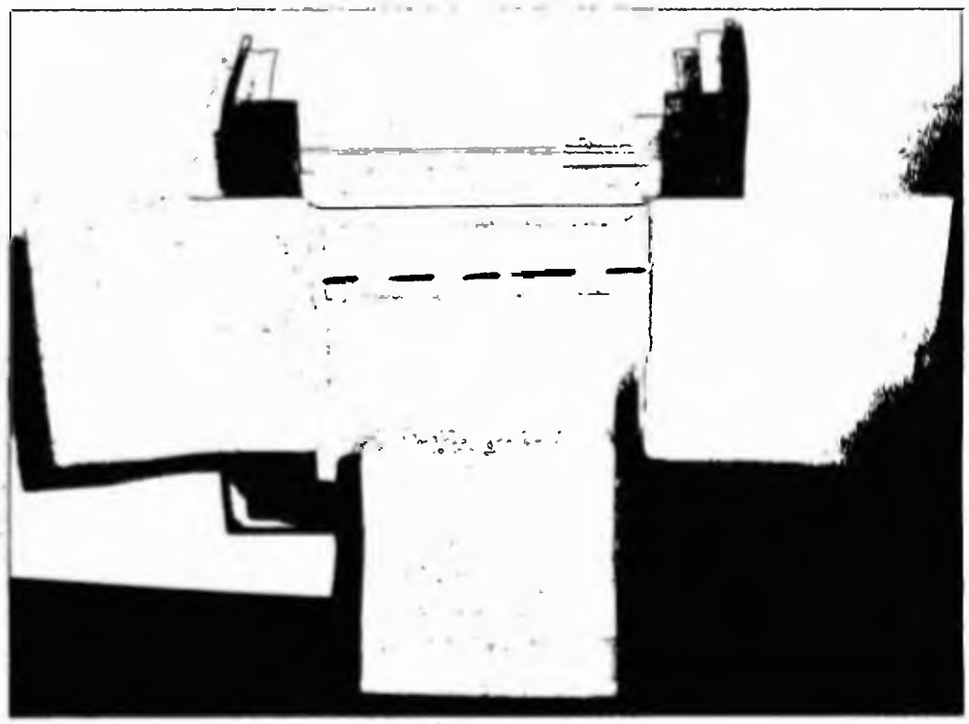
Fotografía 7. Preparación de la muestra de E. coli para realizar la electroforesis B.

Agregar Vol/Vol del tampón reductor y de la suspensión de *E. coli* en tubo cónico de plástico (tubo Eppendorf).

Fotografía 8. Preparación de la muestra de *E. coli* para realizar la electroforesis C.

Abrir orificios en la tapa del tubo cónico y colocarlos por 5 minutos en agua hirviendo, sobre un soporte.

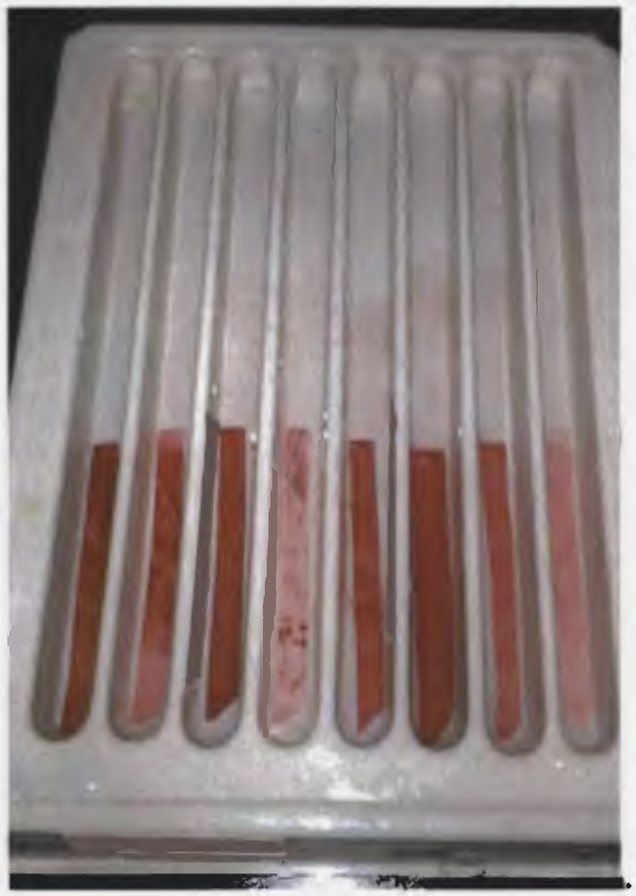
Fotografía 9. Kit para la preparación del Gel SDS sigma-aldrich 08091. Se observa: Solución Stock Acrilamida/ Bisacrilamida; tampón del gel de separación pH 8.8; tampón del gel superior pH 6.8; Tampón de corrida 10x; Aminopersulfato (APS); Tubo calibrador para la preparación del APS; Tetrametiletiléndiamina (TEMED).



Fotografía 10. Armado del molde para los geles verticales de electroforesis.

Fotografía 11. Equipo de electroforesis en cámara vertical. Utilizada en la separación de las proteínas de acuerdo a su peso molecular en geles de poliacrilamida SDS.

Fotografía 12. Reactivo Sustrato-Cromógeno para la inmunodetección de proteínas en papel de nitrocelulosa. Tampón Acetato (Vial 1). Cromógeno AEC (Vial 2). Peróxido de hidrógeno al 3% (Vial 3).



Fotografía 13. Lavado de las tiras de Western Blot en agua destilada. Luego de la tinción las tiras fueron lavadas tres veces en agua destilada.

CAPITULO VIII

GLOSARIO

colonia por mililitro (ufc/ml) aun cuando estudios más recientes proponen recuentos menores, de más de 100 ufc/ml.

Biotina. A veces también llamada vitamina H, vitamina B_7 y vitamina B_8, es una vitamina estable al calor, soluble en agua y alcohol, y susceptible a la oxidación que interviene en el metabolismo de los hidratos de carbono, grasas, aminoácidos y purinas. Una cantidad considerable se sintetiza por bacterias intestinales y se absorbe por vía intestinal. La biotina es importante como un cofactor de enzimas que intervienen en la catálisis de reacciones metabólicas esenciales para sintetizar ácidos grasos, en la gluconeogénesis y en el metabolismo de la leucina.

Cámara CCD. Es un circuito integrado que contiene un número determinado de condensadores enlazados o acoplados. Bajo el control de un circuito interno, cada condensador puede transferir su carga eléctrica a uno o a varios de los condensadores que estén a su lado en el circuito impreso. El término CCD es conocido popularmente como la designación de uno de los elementos principales de las cámaras fotográficas y de video digitales. En éstas, el CCD es el sensor con diminutas células fotoeléctricas que registran la imagen. Desde allí la imagen es procesada por la cámara y registrada en la tarjeta de memoria.

Catelicidina. Las catelicidinas forman una superfamilia de péptidos antimicrobianos que desempeñan un importante rol en la inmunidad innata de los mamíferos. En humanos únicamente se ha identificado una catelicidina: LL-37. Es un

péptido catiónico lineal de hélice alfa de 37 aminoácidos con tres partes diferenciadas: un extremo N-terminal hélice-α, seguido por un extremo C-terminal hélice-α y una cola C-terminal. Ambas hélices están separadas por un giro (motivo hélice-giro-hélice). En la superficie hidrofóbica del péptido se encuentran residuos cargados positivamente que confieren las propiedades fundamentales del mismo. En cuanto a sus funciones, principalmente destaca su papel antimicrobiano. El ataque a las bacterias se basa en la formación de un poro toroidal en la membrana tras la unión de los residuos aminoacídicos hidrofóbicos con carga positiva del péptido, lo cual causa la disrupción de la membrana. Además, se ha observado que LL-37 también tiene actividad antifúngica y antiviral, pues es capaz de romper la membrana de *C. albicans* o unirse a la transcriptasa reversa de HIV-1, bloqueando su acción.

Coliforme. Designa a un grupo de especies bacterianas que tienen ciertas características bioquímicas en común e importancia relevante como indicadores de contaminación del agua y los alimentos. Coliforme significa con forma de coli, refiriéndose a la bacteria principal del grupo, la *E. coli*.

Defensinas. Son péptidos ricos en cisteinas se encuentran en vertebrados e invertebrados y funcionan como antibióticos naturales que se hallan en la superficie de la piel. Son activas contra bacterias, hongos y virus enclaustrados. La mayoría de las defensinas actúan al penetrar la membrana plasmática microbiana por medio de

la atracción eléctrica y, una vez que han penetrado, forman un poro en la membrana que permite la secreción.

Ensayos multiplex. Ensayos que permiten la detección y cuantificación de múltiples analitos (proteínas, péptidos y ácidos nucleicos) en una sola muestra.

Enterobactina. Es un sideróforo de alta afinidad que adquiere el hierro de los sistemas microbianos.

Epítopos. O determinante antigénico es la porción de una macromolécula que es reconocida por el sistema inmunitario, específicamente la secuencia a la que se unen los anticuerpos, que son los receptores de las células B o de las células T en estado soluble. Aunque se piensa que los epítopos provienen de proteínas no propias, las secuencias que se obtienen del huésped que pueden ser reconocidas son también clasificadas como epítopos.

Fagocitosis. Es un tipo de endocitosis por el cual algunas células (fagocitos y protistas) rodean con su membrana citoplasmática partículas sólidas y las introducen al interior celular. Esto se produce gracias a la emisión de pseudópodos alrededor de la partícula o microorganismo hasta englobarla completamente y formar alrededor de él una vesícula, llamada fagosoma, la cual fusionan posteriormente con lisosomas para degradar el antígeno fagocitado.

Filogenia. Es la relación de parentesco entre especies o taxones en general. El primer paso para reconstruir la filogenia de los organismos es determinar cuán parecidos son entre sí en su morfología, anatomía, embriología, moléculas de ADN, etcétera, ya que en última instancia estos parecidos son un indicador de su parecido genético, y por lo tanto de sus relaciones evolutivas.

Fimosis. Ocurre cuando el orificio del prepucio es demasiado estrecho para dejar salir al glande. La fimosis se considera patológica cuando causa problemas, como dificultad para orinar o la realización de las funciones sexuales comunes. Existen numerosas causas para la llamada fimosis patológica.

Flagelina. Es una proteína que tiene la función de ser el principal componente del flagelo de las bacterias y la responsable de la forma de hélice que tiene la estructura del flagelo. Para hacer el filamento del flagelo, las moléculas de flagelina se acomodan entre sí (se polimerizan) formando las paredes de un cilindro hueco de 20 nanómetros de diámetro, que al rotar impulsa el movimiento de la bacteria. La flagelina varía entre las distintas especies de bacterias aunque mantienen un importante porcentaje de homología y su tamaño varía entre los 30.000 y 60.000 Da.

Fluoróforo. O fluorocromo, por analogía con los cromóforos, es un componente de una molécula que hace que ésta sea fluorescente. Es un grupo funcional de la molécula que absorberá energía de una longitud de onda específica

y la volverá a emitir en otra determinada de mayor longitud de onda (es decir, con menor energía). La cantidad de energía emitida y su longitud de onda dependen tanto del propio fluorócromo como de su ambiente químico. Esta tecnología es particularmente importante en el campo de la bioquímica y de los estudios sobre proteínas, por ejemplo en inmunofluorescencia e inmunohistoquímica; o en el análisis de ADN, mediante la técnica de PCR en tiempo real.

Fosforilación. Es la adición de un grupo fosfato, o no fosfato molecular criogenizado inorgánico a cualquier otra molécula. Su papel predominante en la bioquímica lo convierte en un importante objeto de investigación sobre todo en la fosforilación de proteínas y de fructosa. En el metabolismo, la fosforilación es el mecanismo básico de transporte de energía desde los lugares donde se produce hasta los lugares donde se necesita. Asimismo, es uno de los principales mecanismos de regulación de la actividad de proteínas en general y de las enzimas en partícula.

Idiopática. Es un adjetivo usado primariamente en medicina, que significa de irrupción espontánea o de causa desconocida. La combinación de raíces del griego significa "una enfermedad de etiología desconocida".

Índices de Apgar. Es un examen rápido que se realiza al primer y quinto minuto después del nacimiento del bebé. El puntaje en el minuto 1 determina qué tan bien toleró el bebé el proceso de nacimiento, mientras que el puntaje al minuto 5 le indica al médico qué tan bien está evolucionando el bebé por fuera del vientre materno.

Ligando. Es una sustancia (usualmente una molécula pequeña) que forma un complejo con una biomolécula. En un sentido más estricto, es una molécula que envía una señal al unirse al centro activo de una proteína. En enzimas o proteínas no enzimáticas, especialmente de proteínas reguladoras o transportadoras, se denomina ligando a aquella molécula que se une al centro activo de la proteína para que ésta pueda realizar su función (transportar, o inhibir una reacción metabólica). Por ejemplo, el ligando de la hemoglobina es el oxígeno, ya que es la molécula que se une al centro activo de la proteína para que ésta pueda transportarlo. La unión ligando–proteína provoca un cambio conformacional en la proteína, muy importante para determinar la afinidad de una proteína con un sustrato.

Lipocalina. Nombre con el cual se identifican más de 150 proteínas con expresión de preferencia extracelular, con una masa molecular promedio de 18 a 20 kDa y con la propiedad de transportar moléculas lipofílicas como vitaminas, hormonas esteroideas y tiroideas, ácidos grasos y biliares, agentes antigénicos lipófilos y moléculas odorantes. De los 20 miembros de la especie humana, la lipocalina asociada con la gelatinasa de neutrófilos LAGN (también conocida como lipocalina 2 a LCN2) es de las más estudiadas, está unida covalentemente a la colagenasa humana tipo IV a través de un puente intramolecular disulfuro.

Operón. Se define como una unidad genética funcional formada por un grupo o complejo de genes capaces de ejercer una regulación de su propia expresión por

medio de los sustratos con los que interaccionan las proteínas codificadas por sus genes. Este complejo está formado por genes estructurales que codifican para la síntesis de proteínas (generalmente enzimas).

Patogenicidad. Se define como capacidad de los microorganismos para producir enfermedad en huéspedes susceptibles. Asimismo es un atributo del género y especie. Así por ejemplo: el género *Salmonella* es patógeno para los vertebrados pero *Salmonella typhi* es solo patógeno para el hombre. La patogenicidad se expresa clínicamente en proporción variable según los microorganismos y el hospedero, pero la regla es que hay convivencia pacífica.

Pielonefritis. Es una enfermedad de las vías urinarias que ha alcanzado la pelvis renal. Normalmente, los microorganismos ascienden desde la vejiga hasta el parénquima renal.

Pielonefritis aguda. Invasión bacteriana del sistema pielocalicial y del parénquima renal. Ésta forma es una infección del parénquima renal originado secundariamente a una infección de las vías urinarias, pero también la colonización del riñón se da por vía hematógena desde focos infecciosos a distancia. E. *coli* es la bacteria aislada en la mayoría de los casos, pero también se pueden encontrar otros microorganismos involucrados.

Prostatitis. Es una inflamación de la próstata. Comprende un conjunto de síndromes, enfermedades y trastornos funcionales que afectan a la próstata o al área perineal con una sintomatología similar y con una etiología en algunos casos desconocida. Suele aparecer en adultos jóvenes o varones de edad media. Es la infección urinaria más frecuente en el varón entre la segunda y cuarta décadas de la vida.

Recaída. Implica la recurrencia de la infección por el mismo germen, por lo general aparece a las 2 semanas de haber concluido la antibióticoterapia.

Recidiva o Recurrencia Infecciosa: es la aparición de 3 o más ITU en el lapso de un año.

Reinfección. Cuando el patógeno causante de la infección es distinto al que ocasionó la infección previa, después de un intervalo mayor de 6 semanas. El 80 al 90 % de las recidivas son por reinfección y el microorganismo procede del reservorio fecal.

Salmoquelina. Son sideróforos de tipo catecol producidos por enterobacterias, entre las que se destacan las bacterias patógenas extraintestinales de *Escherichia coli*. Son consideradas factores de virulencia extraintestinal, ya que secuestran hierro del medio interno del huésped con alta eficiencia.

Streptavidina. Es una proteína tetramérica que sintetiza la bacteria Streptomyces *avidinii*. Se caracteriza por su elevada afinidad por la biotina, comparable a la de la avidina. La constante de disociación del complejo biotina-estreptavidina la muestra como una de las interacciones no covalentes más fuertes que se conocen. Esta capacidad de unión se mantiene en condiciones extremas de pH, temperatura, disolventes orgánicos, agentes desnaturalizantes, detergentes y peptidasas. Es precisamente esta propiedad la que hace que esta proteína se utilice mucho en biología molecular y biotecnología.

Toxina Shiga. Actúan inhibiendo la síntesis proteica dentro de células blanco. Después de entrar a una célula, la proteína funciona como una N-glicosidasa ciclando varias nucleobases del ARN que comprende el ribosoma, deteniendo de tal modo la síntesis de proteínas.

Transposones Conjugativos. Elementos genéticos móviles que presentan la propiedad de promover su diseminación de una bacteria a otra por conjugación. Son de gran importancia en la diseminación de la resistencia a antibióticos. Contienen genes de resistencia a antibióticos y desempeñan un papel fundamental en la generación de plásmidos R.

Urodinámica. Es el estudio funcional del tracto urinario que permite hacer una evaluación de los síntomas urinarios bajos y obtener información valiosa para la toma de decisiones clínicas.

Virulencia. Designa el carácter patogénico y nocivo de un microorganismo, como una bacteria, hongo, protozoo, microalga o virus, o en otras palabras, la capacidad de un microbio de causar enfermedad.