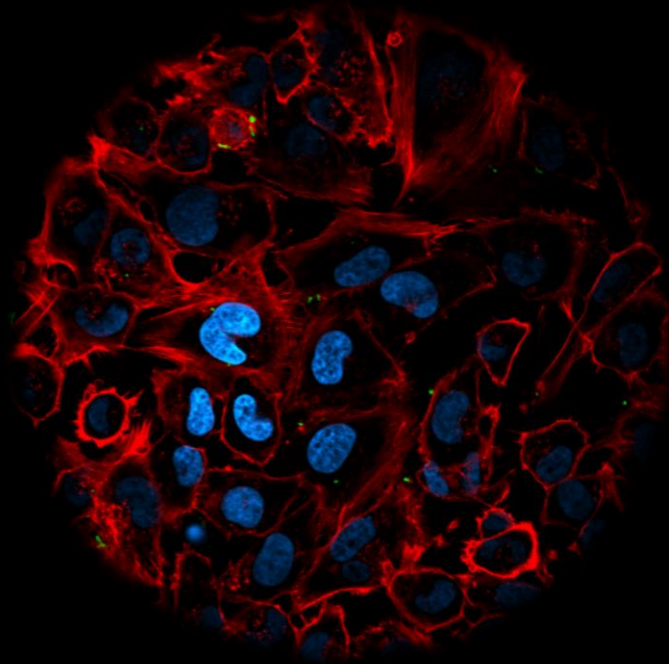


Evaluación de la capacidad de *Escherichia coli* uropatogénica de aislamientos clínicos de formar biofilms y comunidades bacterianas intracelulares y la efectividad de diferentes antibióticos.



Lic. María José González

Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas

2018

Evaluación de la capacidad de *Escherichia coli*
uropatogénica de aislamientos clínicos de formar
biofilms y comunidades bacterianas intracelulares y
la efectividad de diferentes antibióticos.

Lic. María José González

Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas

2018

Orientadora PhD. Paola Scavone

Departamento de Microbiología

IIBCE

“Hay en el mundo un lenguaje que todos comprenden: es el lenguaje del entusiasmo, de las cosas hechas con amor y con voluntad, en busca de aquello que se desea o en lo que se cree.”

Paulo Coelho

Agradecimientos

A Paola, gracias infinitas por aceptar el desafío de ser mi tutora, por enseñarme a hacerme mejor profesional y sobre todo a ser mejor persona. Por inspirarme todos los días a trabajar con pasión y compromiso y no tener miedo a soñar. Gracias por ser parte de mi vida!

A Luciana, por aceptar ser mi cotutora, pero de corazón. Por enseñarme lo importante que es hacer lo que nos apasiona con amor y alegría. De ser resiliente y buscar superarse para ser mejor cada día.

A mis compañeras de todos los días: Vicky, Ana y Dani, por todo lo aprendido y lo compartido. Por aguantarme la cabeza y muchas veces hasta ser la voz de mí conciencia. Por los mates y las conversaciones profundas.

Al west coast y al UTIL, por ser donde me sentí como en casa, por los abrazos, las risas y las anécdotas vividas.

A mis compañeros del laboratorio, porque cada uno apporto su grano de arena durante el desarrollo de esta tesis, desde palabras de aliento hasta tomarse el tiempo para ayudarme.

A los biocosas, por acompañarme en el camino de la ciencia y de la vida. Todo es mejor porque ustedes forman parte.

A los amigos que están siempre y me inspiran a ser mejor cada día: Juanma, Mari, Caro, Regi, Jachu, Nico, Rochi y Vale.

A mi familia, por enseñarme que todo lo que uno quiere lograr, con trabajo, esfuerzo y mucho amor se puede conseguir. Los amo!

GRACIAS!

Dedico este trabajo a los que me acompañan desde arriba, entre ellos a mi tía Alba y al Neo.

Tabla de contenido

Resumen	6
1. Introducción	7
1.1 Infecciones del tracto urinario	7
1.2 <i>Escherichia coli</i> uropatogénica	8
1.3 Factores de virulencia	9
1.3.1 factores de adherencia y colonización	10
1.3.2 factores secretados por UPEC y componentes de la superficie bacteriana	12
1.3.3 factores que permiten la captación de hierro	13
1.3.4 factores vinculados con la evasión del sistema inmune	14
1.4 Formación de biofilms	14
1.4.1 (i) Adhesión reversible a la superficie de las bacterias planctónicas	15
1.4.2 (ii) Adhesión irreversible a la superficie	16
1.4.3 (iii) Formación de la matriz extracelular y de las microcolonias	16
1.4.4 (iv) Maduración	16
1.4.5 (v) Dispersión	17
1.5 Formación de comunidades bacterianas intracelulares	17
1.6 Antibióticos empleados para el tratamiento de ITU	19
2. Objetivos	23
3. Materiales y métodos	24
3.1 Cepas bacterianas	24
3.2 Líneas celulares y condiciones de cultivo	25
3.3 Capacidad de formar biofilm de la colección de cepas de UPEC de origen clínico	25
3.4 Evaluación de la expresión de FimH y fimbria P	26
3.5 Efecto de los antibióticos sobre las bacterias formando biofilms	27

3.6 Análisis comparativo de la expresión del gen de resistencia a betalactámicos en bacterias planctónicas y biofilms	27
3.7 Elección de cepas para ensayos de invasión y formación de CBI en cultivo celular	29
3.8 Formación de comunidades bacterianas intracelulares en modelos <i>in vitro</i>	30
3.8.1 Preparación de cultivos celulares	30
3.8.2 Preparación de la suspensión bacteriana	30
3.8.3 Ensayo de invasión en células T24	30
3.9 Ensayo de confirmación de CBI mediante microscopía laser confocal (MLC)	31
3.10 Adquisición de imágenes	32
3.11 Análisis de imágenes	32
3.12 Efecto de los antibióticos sobre las bacterias formando CBI	33
3.13 Evaluación de la citotoxicidad causada por los antibióticos sobre las células T24	33
4. Resultados	34
4.1 Determinación de la capacidad de formar biofilms sobre una superficie abiótica y su relación con la formación de CBI/BIA, factores de virulencia y grupos filogenéticos	34
4.2 Efecto de diferentes antimicrobianos sobre los biofilms <i>in vitro</i>	36
4.3 Expresión de genes de resistencia en UPEC productora de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en el biofilm	44
4.4 Formación de comunidades bacterianas intracelulares en modelos <i>in vitro</i>	45
4.5 Citotoxicidad de las células eucariotas	47
4.6 Confirmación de la presencia de CBI mediante MLC	48
4.7 Efecto de antibióticos sobre la formación de CBI	52
4.8 Citotoxicidad de antibióticos sobre el cultivo celular	55
5. Discusión	56
6. Referencias bibliográficas	67
7. Anexo	75

Resumen

Las infecciones del tracto urinario (ITU) son una de las infecciones más comunes en humanos a nivel mundial. El principal agente etiológico de estas infecciones, tanto en mujeres como en niños es *Escherichia coli* uropatogénica (UPEC). UPEC presenta diversos factores de virulencia y mecanismos que le permiten la adhesión, invasión y colonización del tracto urinario. Entre estos mecanismos, se ha observado que UPEC es capaz de ingresar a las células uroepiteliales de la vejiga y formar una comunidad bacteriana intracelular (CBI) o en algunos casos bacterias intracelulares aisladas (BIA). Algunos autores han descrito a las CBI como formaciones bacterianas similares a los biofilms. El presente trabajo tiene como objetivo general evaluar la capacidad de distintas cepas de UPEC, pertenecientes a una colección de aislamientos clínicos, de formar CBI/BIA y biofilms en un modelo *in vitro*, así como evaluar el efecto de diferentes antimicrobianos sobre los mismos.

Ciento dieciséis aislamientos de UPEC provenientes de niños con ITU que previamente fueron evaluados en cuanto a la presencia o ausencia de CBI/BIA en células descamadas de orina y la presencia de genes de virulencia, fueron analizados según su capacidad de formar biofilm *in vitro* y de infectar y formar CBI en células de cultivo T24. Diferentes antibióticos de uso clínico fueron evaluados sobre los biofilms y CBIs. En este trabajo no se encontró una relación entre la capacidad de formar biofilms y la presencia de CBI en orina, encontrándose que el 41,4% de los aislamientos eran capaces de formar biofilm y 36,3% presentaban CBI o BIA en células descamadas de orina. La formación de biofilm se asoció de manera significativa con la presencia de los genes *papA*, *papEF* y *papGII*, que codifican para el pili P. De las 116 cepas de UPEC, 23 fueron evaluadas en su capacidad de invasión, encontrándose que todas son capaces de invadir células uroepiteliales *in vitro*. La ausencia del gen *kpsMT K1* y la capacidad de formar biofilm se asociaron significativamente con un porcentaje más alto de invasión. Respecto a los antibióticos, se encontró que de los analizados en este trabajo, la ampicilina fue el único que no fue capaz de disminuir el biofilm *in vitro* y que la azitromicina, ciprofloxacina y ceftriaxona fueron capaces de disminuir el porcentaje de invasión en células T24.

Como conclusión, el estudio de estos mecanismos y el efecto de los antimicrobianos sobre el biofilm y las CBI permitirán mejorar el tratamiento empleado en ITU recurrentes, así como buscar otras opciones terapéuticas.

1. Introducción

1.1 Infecciones del tracto urinario

Dentro de las infecciones más comunes que afectan al ser humano se encuentran las infecciones del tracto urinario (ITU), las cuales se definen como la presencia, crecimiento y multiplicación de microorganismos en el tracto urinario, causando inflamación con la aparición de síntomas y signos (Nicolle, 2002). Se estima que alrededor de 150 millones de personas por año sufren esta patología (González et al., 1999; Stamm et al., 2001). Las ITU pueden clasificarse según el sitio de infección: alta si la infección afecta los riñones, o baja si afecta solamente la vejiga. Se les denomina pielonefritis y cistitis respectivamente. A su vez, pueden clasificarse en complicadas y no complicadas. Las no complicadas suelen afectar a individuos sanos y que no poseen ninguna anomalía en el tracto urinario. Las ITU que se clasifican como complicadas se definen como ITUs asociadas a factores relacionados a anomalías funcionales y anatómicas en el tracto urinario o un sistema inmune deficiente (Rueda, 2002). Dentro de estos factores se encuentran la obstrucción urinaria, la inmunodepresión, falla renal, trasplante, embarazo y la presencia de dispositivos externos como la cateterización, entre otros (Hooton, 2012; Tice, 1999; Rueda, 2002).

La incidencia de las ITU es elevada en todo el mundo. Se estima que el 40% de las mujeres y el 12% de los hombres experimentarán al menos un episodio de ITU en su vida. A su vez un cuarto de las mujeres con esta afección tendrán recurrencia dentro de los próximos 6 a 12 meses. En niños la recurrencia es del 20-40% en los 12 meses siguientes al primer episodio (O´Hanley, 1996). En Uruguay los datos epidemiológicos de ITU son escasos. En el año 2007 el número total de ingresos al Hospital Pediátrico Centro Hospitalario Pereira Rossell (HP-CHPR) por ITU fueron de 294 y en el 2008 de 210, constituyendo el 2% de todos los ingresos, siendo la mayoría niños menores de 2 años (El CHPR en cifras. 2007-2008. Datos aportados por el Laboratorio de Bacteriología del HP-CHPR).

La mayoría de los patógenos responsables de las ITU son bacilos entéricos Gram negativos, siendo *Escherichia coli* uropatógena (UPEC) el principal agente etiológico en los casos de ITU no complicada (75%), seguido de forma variable por microorganismos como *Proteus* spp y *Klebsiella pneumoniae*,

entre otros (Caggiani et al., 2002; Alonso et al., 2001; Robino et al., 2014a). En los pacientes con ITU complicadas, *E. coli* sigue siendo el agente predominante (figura 1) pero disminuye su frecuencia relativa, aumentando el número de casos por otros microorganismos como *Klebsiella pneumoniae* y *Enterococcus* spp (Flores-Mireles et al., 2015). *E. coli* es el patógeno predominante en todos los rangos etarios (Alonso et al., 2001).

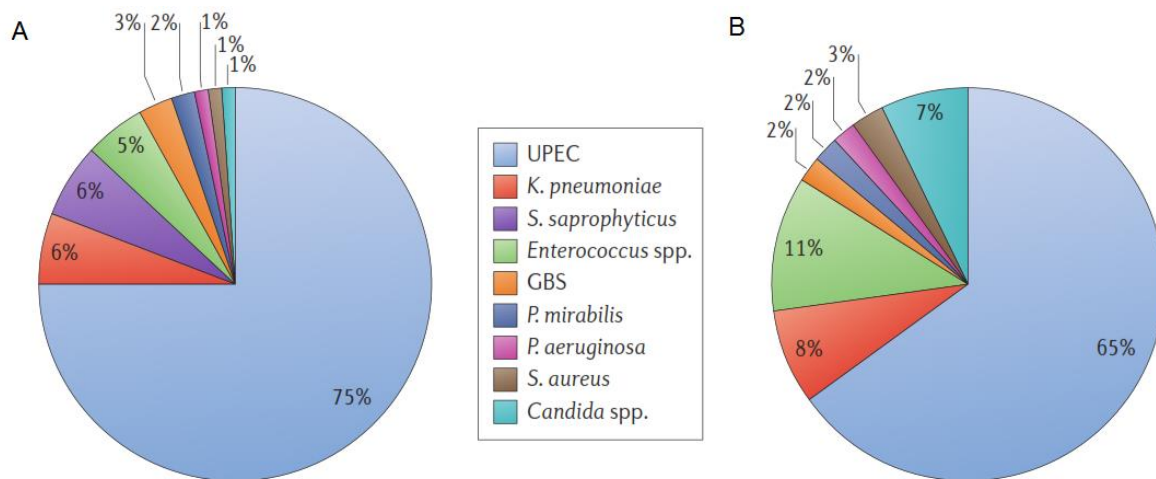


Figura 1. Epidemiología de las infecciones del tracto urinario. Principales agentes etiológicos causantes de ITU para (A) no complicadas y (B) ITU complicadas. Tomado de Flores-Mireles et al., 2015

1.2 *Escherichia coli* uropatogénica

E. coli es un bacilo Gram negativo, que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. Está presente tanto en la microbiota intestinal de los seres humanos y animales como en el ambiente, presentando una gran variabilidad genética y fenotípica. Esta gran variabilidad le permite tener la capacidad de colonizar variados ambientes pero también de adquirir factores de virulencia que le permiten desarrollar diversas infecciones. Según los factores de virulencia que posea, se clasifican en 3 grupos principales: *E. coli* comensal, *E. coli* patógeno intestinal y *E. coli* patógeno extraintestinal, ExPEC (Kaper et al., 2004; Russo et al., 2000). Las ExPEC son capaces de colonizar el tubo gastrointestinal pero también de diseminarse y colonizar otros sitios en el hospedero causando infecciones extraintestinales. Dentro de este grupo se encuentran las *E. coli* uropatogénicas (UPEC) que son capaces de generar ITU. Si bien las UPEC comparten un gran número de factores de virulencia que le permiten generar una ITU, no se

ha definido un único perfil de virulencia (Russo et al., 2002; Brzuszkiewicz et al., 2006). Para definir a un aislamiento de *E. coli* como UPEC, Jhonson et al. proponen la presencia de 2 o más de los siguientes genes de virulencia: *papA*, *papC* (que codifican para pili tipo P), *sfa/focDE* (codifican para las fimbrias S y Dra), *afa/draBC* (adhesinas afimbriales), *iutA* (sideróforo aerobactina), y *kpsMTII* (cápsula de tipo II) (Jhonson et al., 2003).

1.3 Factores de virulencia

Los factores de virulencia se pueden clasificar en los siguientes grupos (Barber et al., 2016):

Los que están asociados a la adhesión y colonización del tracto urinario.

Los que producen daño en el hospedero: factores secretados por UPEC y componentes de la superficie bacteriana.

Los que permiten la captación de hierro.

Los que están relacionados con la evasión de la respuesta inmune.

En la siguiente figura se esquematizan los diferentes factores de virulencia asociados a UPEC:

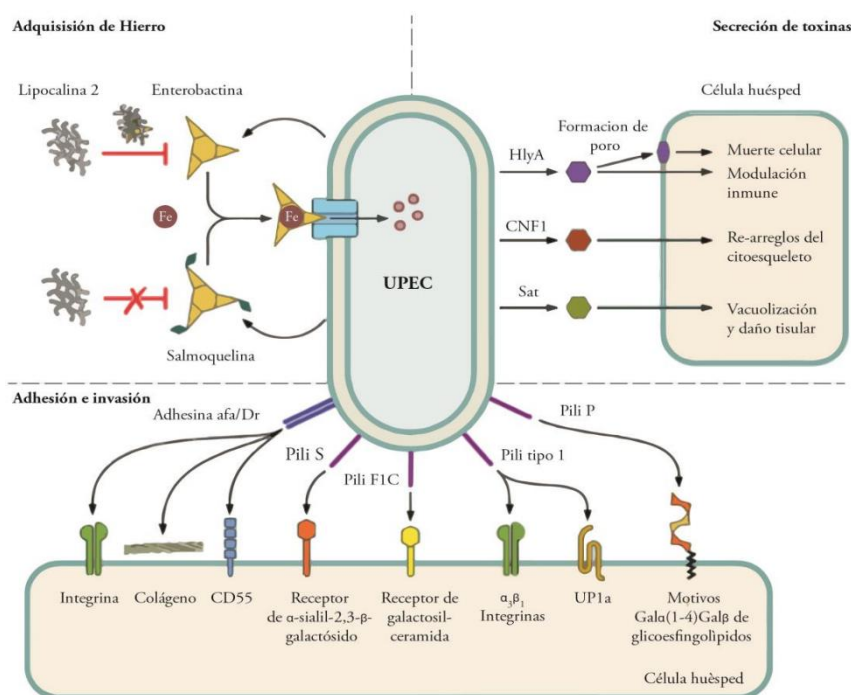


Figura 2. Factores de virulencia de UPEC y su interacción con el hospedero. Principales factores de virulencia relacionados a la adquisición de hierro, secreción de toxinas y adhesión e invasión. Tomado de Barber et al., 2016.

1.3.1 factores de adherencia y colonización.

La adherencia es el factor clave en el proceso de una ITU. Dependiendo del éxito de esta etapa, y de las interacciones que se realicen entre UPEC y el hospedero, el patógeno será exitoso en la colonización o será eliminado. En el caso de UPEC, diversos tipos de adhesinas reconocen receptores en el epitelio de la vejiga, que a su vez también median la colonización. Existen dos tipos de adhesinas, las proteínas monoméricas que se encuentran en la superficie de la bacteria (adhesinas afimbriales) y las que forman parte de un complejo proteico asociado a fimbrias (Chahales et al., 2015).

Existen diversas formas de clasificar los distintos tipos de fimbrias. Una de ellas se basa en la capacidad de las fimbrias de aglutinar eritrocitos en presencia o ausencia de manósidos (manosa resistente o manosa sensible) (Duguid et al., 1979; Old, 1972). Otra forma de clasificar es de acuerdo a la maquinaria de síntesis. Según esta clasificación existen al menos 5 tipos de fimbrias (también denominados pilis): fimbrias de la familia de las chaperonas (CUP), adhesinas curli, fimbrias tipo IV y fimbrias asociadas a los sistemas de secreción III y IV (Waksman et al., 2009).

Los CUP son organelos de adhesión presentes en la superficie de muchas bacterias Gram negativas. Esta vía de las chaperonas es un sistema de secreción bacteriano altamente conservado que media el ensamblado de las fimbrias en la superficie bacteriana mediante un sistema de translocación de proteínas (Kline et al., 2010; Wurpel et al., 2013). Además de facilitar la interacción con el hospedero, los CUP son capaces de promover interacciones bacterianas favoreciendo la formación de biofilms (Vallet et al., 2001). Se han descrito en el genoma de UPEC 38 operones que codifican para CUP, pudiendo una misma cepa codificar hasta 12 fimbrias tipo CUP diferentes (Wurpel et al., 2013). Cada tipo de fimbria presenta en su extremo distal un tipo de adhesina distinto que reconoce receptores específicos. Esto le da la capacidad de asociarse a un tipo de célula o de epitelio, como puede ser la vejiga o el epitelio renal (Wright et al., 2006). Dentro de las fimbrias más estudiadas se encuentran las fimbrias tipo 1 y las fimbrias P.

Las fimbrias de tipo 1 se clasifican como manosa sensibles. Son complejos proteicos tubulares de 0,2 a 2 μm de largo. Se componen de una proteína estructural mayor (FimA) y en su extremo distal se encuentran varias proteínas menores de adhesión donde se encuentra la adhesina FimH (figura 3). FimH media la unión a las uroplaquinas, integrinas (alfa 3 y beta 1) y al receptor TLR4 ("Toll-like

receptor 4” que forma parte de la inmunidad innata), los cuales se encuentran presentes en todas las células uroteliales (Hahn et al., 2002; Zhou et al., 2001; Eto et al., 2007; Mossman et al., 2008). FimH además de mediar la adhesión de UPEC al urotelio, estaría implicado en la internalización de las células del epitelio de la vejiga. Esta internalización ocurre mediante endocitosis, la cual es iniciada por la activación de una cascada de señales que activa las Rho GTPasas, lo que produce un reordenamiento de los filamentos de actina en la célula epitelial y permite la entrada de la bacteria (Hultgren et al., 1985; Mulvey et al., 1998; Martínez et al., 2002). Éstos pilis participan también en la formación de biofilms (Barber et al., 2016). Diversos estudios genómicos realizados en distintas cepas de UPEC indican que son genéticamente muy diversos y que la gran mayoría de estas cepas expresan fimbrias tipo 1, desencadenando la misma respuesta en el hospedero (Brzuszkiewicz et al., 2006; Lloys et al., 2009; Norinder et al., 2012).

Las fimbrias P, codificadas por los genes pap (“pyelonephritis-associated pili”), están presentes ampliamente en las cepas de UPEC que causan pielonefritis. Son codificadas a nivel cromosómico por un cluster de 11 genes pap localizados en islas de patogenicidad (Lane et al; 2007). Se clasifican como manosa resistentes y se adhieren a los residuos Gal(α 1–4)Gal β presentes en la membrana de los eritrocitos humanos del grupo sanguíneo P y en las células uroepiteliales (Lane et al., 2007). Estructuralmente están compuestos por 1000 copias de la proteína mayor, PapA, que forman una estructura rígida la cual se conecta con una punta flexible constituida por pocas copias de la proteína PapE y PapF, y la adhesina PapG en el extremo distal (figura 3). Entre las tres variantes estructurales de papG que existen, papGII se asocia con bacteremia y pielonefritis en humanos mientras que papGIII se asocia con cistitis en humanos e infecciones urinarias en perros y gatos (Johnson et al., 1998; Tseng et al., 2001; Johnson et al., 2000). Al unirse la fimbria P a su receptor, la ceramida es removida, actuando como antagonista de los receptores TLR4. Esto lleva a la producción de citoquinas proinflamatorias y quemoquinas (interleuquina-6 y CXCL8) y al reclutamiento de neutrófilos. A pesar de que estos mecanismos son favorables en la detención de la infección en las primeras etapas, luego es capaz de producir daño tisular y complicaciones renales, contribuyendo con la patología de la infección (Fischer et al., 2007; Bergsten et al., 2005).

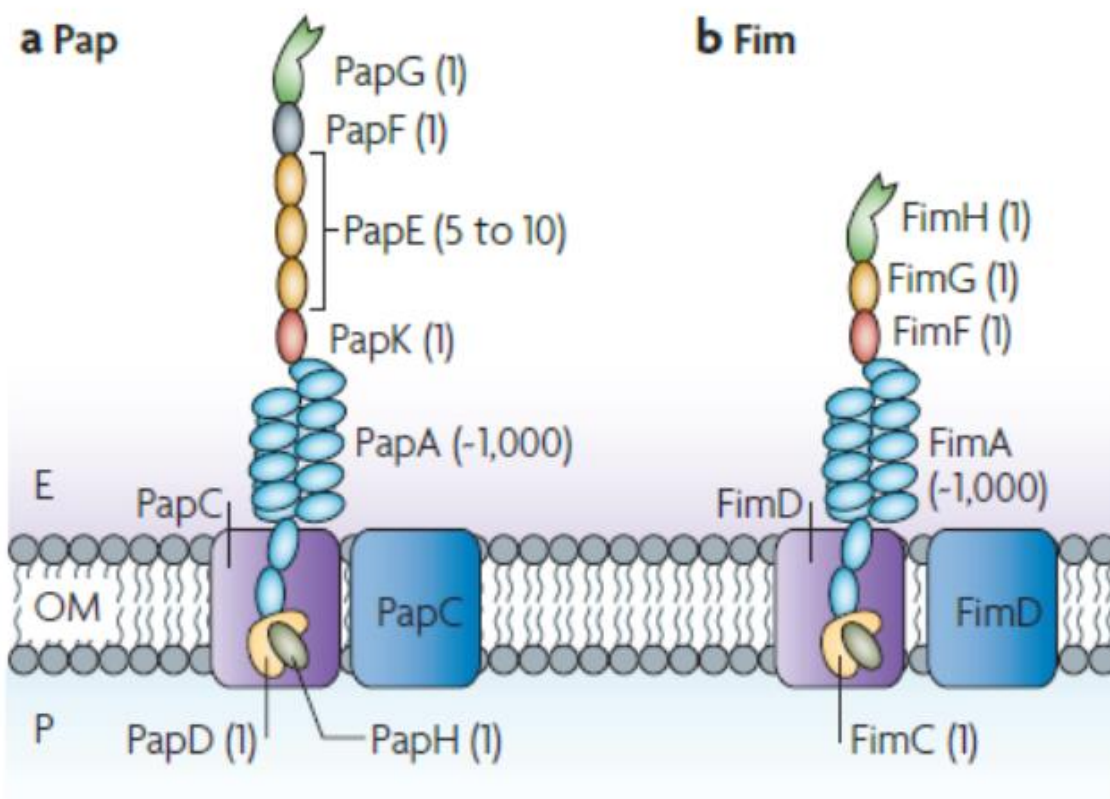


Figura 3. Esquema de los pilos P (a) y tipo 1 (b) representados por los sistemas Pap y Fim, respectivamente. Los números indican el número de copias de cada subunidad del pili. PapD y FimC: chaperona unida a la última subunidad que será incorporada al pili. E: espacio periplásmico, P: periplasma. Tomado de Waksman et al., 2009

Existen otras fimbrias menos estudiadas pero que también cumplen una función importante en la patología de la ITU. Dentro de estas se encuentran la fimbria S/F1C, que media la adherencia bacteriana al urotelio y a los glicolípidos de las células endoteliales (Hanisch et al., 1993; Malagolini et al., 2000); la fimbria curli que promueve la adherencia a las células epiteliales (Kai-Larsen et al., 2010); las fimbrias Dr que poseen un rol fundamental en la unión a las células renales; y las proteínas afimbriales AFA, asociadas a favorecer las ITU recurrente y/o crónicas (Nowicki et al., 2001; Le Bouguenec, 2005).

1.3.2 factores secretados por UPEC y componentes de la superficie bacteriana.

Dentro de la patología de las ITU, los factores que la bacteria secreta tienen un papel importante. Estos son la alfa hemolisina A (HlyA), el factor citotóxico necrotizante (CNF1) y el lipopolisacárido (LPS) que si bien no es secretado, se encuentra en la pared de las bacterias.

La alfa hemolisina A (HlyA) es una toxina, que forma poros en la membrana de las células eucariotas, presente en el 50% de las cepas de *E. coli* causantes de pielonefritis aguda. Está asociada al daño en el epitelio, principalmente en el renal, produciendo daño endotelial y la vasoconstricción renal. HlyA induce la muerte de la célula endotelial mediante la activación de proteasas proinflamatorias denominadas caspasas (Caspasa-1/Caspasa-4) lo que lleva a la exfoliación de la célula urotelial. Si bien este proceso favorece la remoción de las bacterias adheridas a su superficie y de las que se encuentran a nivel intracelular, también sería un paso importante para la invasión de UPEC a capas más profundas del urotelio con el desarrollo de reservorios quiescentes de bacterias intracelulares (QIRs) (Bien et al., 2012; Laestadius 2002).

La toxina CNF1 es producida por algunas cepas de UPEC, principalmente las que producen pielonefritis. Actúa sobre las GTPasas de la familia Rho y estimula la reorganización de las fibras de actina favoreciendo la entrada de *E. coli* a la célula. Estudios *in vitro* también han demostrado que CNF1 interfiere en la fagocitosis mediada por polimorfonucleares y estimula la apoptosis de las células uroteliales (Mills et al., 2000; Miraglia et al., 2007).

El LPS es una molécula anfipática anclada a la pared bacteriana de las bacterias Gram-negativas a través del lípido A. Es ampliamente conocido el rol del LPS en modelos de sepsis estimulando la respuesta inmune en el hospedero. El LPS actúa como un patrón molecular asociado a patógenos (PAMP) activando la proteína de membrana TLR 4 siendo el clásico antagonista del mismo. A través de este receptor, el LPS activa de forma inmediata la liberación de TNF y IL-1 (Backhed et al., 2001).

1.3.3 factores que permiten la captación de hierro.

Los factores de adquisición de hierro son fundamentales para la supervivencia y colonización del tracto urinario tanto para las cepas de *E. coli* patógenas como no patógenas. El ambiente en la vejiga es limitado en la cantidad de hierro por lo que para sobrevivir y multiplicarse en la orina, los uropatógenos emplean sistemas de sideróforos para recolectar hierro del ambiente. Los sideróforos son sistemas compuestos por la maquinaria de montaje, un sideróforo que se une al hierro y un receptor de

membrana que internaliza el hierro unido al sideróforo (Caza et al., 2013). *E. coli* puede producir hasta 4 tipos de sideróforos: aerobactina, yersiniobactina, enterobactina y salmochelina, siendo los 2 primeros los más importantes para la colonización del tracto urinario. La aerobactina es de alta expresión, estable a pH bajos y es más eficiente al unirse al hierro, captando más que la enterobactina. La yersiniobactina es un factor importante en la formación de biofilms en orina y posee la capacidad de proteger contra la muerte intracelular por estrés. Se ha descrito que la aerobactina y la yersiniobactina jugarían un rol importante en la invasión de UPEC a la célula epitelial (García et al., 2011).

1.3.4 factores vinculados con la evasión del sistema inmune.

UPEC presenta varios factores que actúan evadiendo o atacando al sistema inmune. Además de las toxinas mencionadas anteriormente, algunas UPEC extraintestinales presentan también una cápsula compuesta por polisacáridos similares a los que se encuentran en la célula del hospedero, denominados antígenos capsulares K. De esta forma es capaz de evadir la respuesta inmune. Existen 4 grupos de cápsulas, las cuales a su vez se clasifican en varios subtipos. Las cápsulas más frecuentes son las del grupo II, dentro de este la cápsula K2, que permite resistir a la muerte mediada por el sistema del complemento y la K5, que protege a la bacteria de la unión a los neutrófilos inhibiendo la fagocitosis. (Buckles et al., 2009; Subashchandrabose et al., 2015). Existe un subtipo de cápsula que estaría implicado en la formación de comunidades bacterianas intracelulares (CBI) que es la K1, siendo responsable de la morfología de la CBI. (Anderson et al., 2010).

Dentro de los mecanismos empleados por la bacteria para evadir el sistema inmune y resistir a los diferentes antimicrobianos se encuentran la capacidad de formar biofilms y de invadir las células epiteliales para formar CBI.

1.4 Formación de biofilms.

Los biofilms se definen como el agregado de una o más especies microbianas, que se encuentran adheridas a una superficie biótica o abiótica pero también entre ellas. Estas comunidades microbianas

están incluidas en una sustancia orgánica denominada matriz extracelular polimérica (EPS, “extracellular polymeric substances”), compuesta por agua, polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y otros biopolímeros. A través de las interacciones intercelulares, tanto químicas como físicas, junto con las propiedades de la matriz extracelular hacen que el estilo de vida de los biofilms sea claramente distinto al de las células bacterianas de vida libre o planctónicas (Costerton et al., 1999; Rabin et al., 2015).

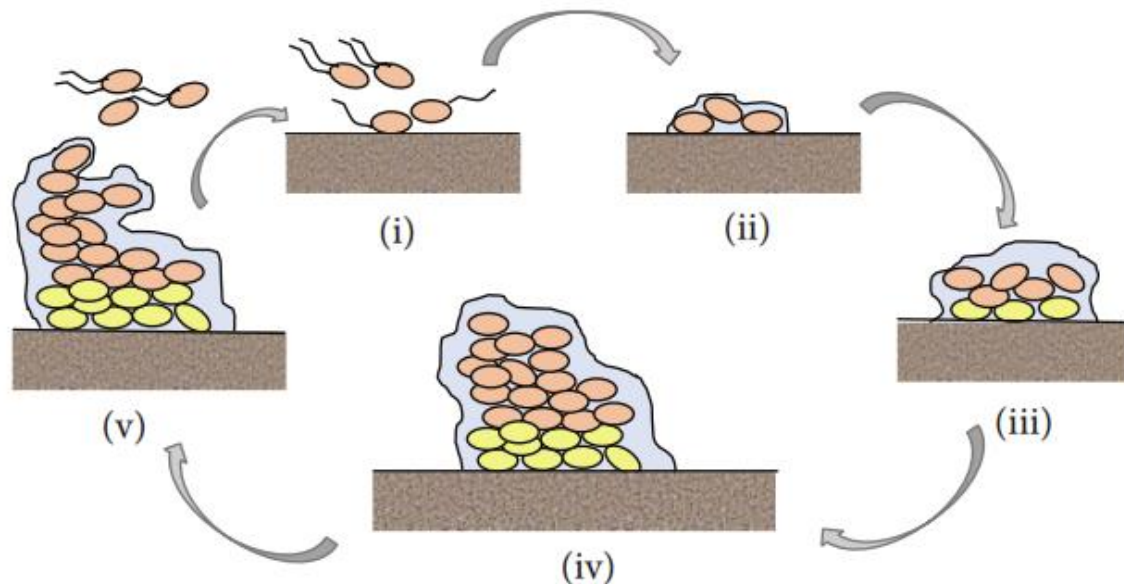


Figura 4. Etapas de la formación del biofilm. (i) Adhesión reversible a la superficie de las bacterias planctónicas. (ii) Adhesión irreversible a la superficie. (iii) Formación de la matriz extracelular (EPS) y de las microcolonias. (iv) Maduración. (v) Dispersión del biofilm. Tomado de Soto, 2014.

Los biofilms presentan cinco etapas en la formación (figura 4):

1.4.1 (i) Adhesión reversible a la superficie de las bacterias planctónicas.

La adhesión de las bacterias a la superficie está mediada por factores no específicos como tensión superficial, hidrofobicidad y fuerzas electrostáticas y factores específicos que incluyen varias estructuras de la superficie celular bacteriana como fimbrias, flagelos, proteínas de membrana externa, lipopolisacáridos y EPS (Donlan et al., 2002). El proceso de adhesión inicial suele ser reversible, permitiendo de esta forma que las células puedan desprenderse de la superficie en caso de que cambien las condiciones (Nadell et al., 2008).

1.4.2 (ii) Adhesión irreversible a la superficie.

Luego del primer contacto de las células a la superficie, algunas de ellas comienzan a adherirse de forma irreversible a la superficie. En el caso de *E. coli*, la adhesión irreversible es mediada por las fimbrias tipo 1, fimbrias curli y el antígeno 43, una proteína de membrana que favorece las interacciones interbacterianas dentro del biofilm (Danese et al., 2000; Beloin et al., 2008).

1.4.3 (iii) Formación de la matriz extracelular y de las microcolonias.

Una de las características distintivas de los biofilms, es la producción de una matriz extracelular, la cual comienza a producirse a mayor escala en la etapa anterior y en esta le permite al biofilm adquirir mayor volumen y colonizar la superficie. La principal función de la matriz es proporcionar adhesión entre células bacterianas, permitiendo así la formación de un biofilm de varias capas. También tiene un rol protector, de comunicación, mantiene la hidratación del biofilm y por lo tanto permite la entrada y salida de nutrientes y desechos. La matriz producida por *E. coli* se compone de celulosa, poliglucosamina y ácido colónico (Agladze et al., 2005; Serra et al., 2013). En esta etapa ocurre una mayor multiplicación celular formando microcolonias.

1.4.4 (iv) Maduración

La maduración ocurre una vez que el biofilm adquiere un mayor volumen, llegando a presentar una estructura tridimensional, presentando diferentes arquitecturas. La producción de EPS conlleva a que los biofilms maduros no se presenten como monocapas homogéneas de células microbianas sobre una superficie (Donlan et al., 2002), sino que por el contrario, son capaces de desarrollar una arquitectura compleja, que comúnmente incluye microcolonias en forma de "hongo", rodeadas de matriz extracelular y separadas entre sí por canales que permiten la circulación de fluidos (O'Toole et al., 2000). Al formarse estas estructuras, se genera un gradiente diferencial de nutrientes, pH, agua y temperatura dentro del biofilm, por lo que las células adquieren un fenotipo distinto a su contraparte planctónica.

1.4.5 (v) Dispersión.

La dispersión celular se da en la última etapa del desarrollo del biofilm, permitiendo a la bacteria diseminarse y colonizar otra superficie. La dispersión es una etapa importante para una gran variedad de especies ya que favorece la transmisión del medio ambiente al hospedero, entre hospederos e incluso dentro del mismo (Kaplan et al., 2010). Varios estudios determinaron que la molécula mensajera di-GMP cíclico cumple un papel importante en la dispersión del biofilm. En *E. coli* esta molécula afecta la producción de EPS, la formación de biofilm, el fenotipo de las bacterias y la movilidad tipo swimming (Mendez-Ortiz et al., 2006).

En la bibliografía se ha descrito que las bacterias dentro de los biofilm presentan protección frente a la respuesta inmune del hospedero, siendo resistente a la fagocitosis y teniendo mayor resistencia a los antibióticos que las bacterias planctónicas. La resistencia a antibióticos en los biofilms ha sido ampliamente estudiada en los últimos años, donde se sugiere que es adaptativa y reversible ya que la bacteria recupera la susceptibilidad cuando retorna al estado planctónico (Keren et al. 2004). La resistencia puede ocurrir por diversos mecanismos como la difusión diferencial del antibiótico a través de la matriz, la inactivación del antibiótico por cambios en el pH y en la concentración de iones y por la inactivación metabólica en las bacterias del biofilm, viéndose favorecida la transmisión horizontal de genes. El nivel de resistencia depende de la etapa de formación del biofilm siendo las bacterias más susceptibles en la etapa inicial (Soto, 2014).

1.5 Formación de comunidades bacterianas intracelulares.

En los últimos años, el estudio de la patogenia de UPEC llevó al descubrimiento de la capacidad de invadir las células uroepiteliales. Una vez que UPEC invade la célula epitelial, es capaz de formar estructuras similares a los biofilms, denominadas comunidades bacterianas intracelulares (CBI) o puede persistir en el interior celular como reservorio bacteriano quiescente intracelular (QIRs) (Anderson et al., 2003; Mulvey et al., 2001).

La principal vía de internalización de UPEC involucra un proceso dependiente de actina y microtúbulos mediado por el pili tipo 1, donde la adhesina FimH se une a la uroplaquina e integrinas que se encuentran en la superficie de las células sombrilla del urotelio (Wright et al., 2007). A su vez FimH induce rearrreglos en los filamentos de actina mediante la activación de la familia de las GTPasas RHO (como las de la familia Rac) que induce la endocitosis de la bacteria (Eto et al., 2007). Una vez internalizadas, las bacterias pueden ser expulsadas de las células mediante exocitosis. Uno de los principales mecanismos de defensa de las células uroepiteliales depende de los receptores TLR-4. El LPS de las bacterias activa estos receptores, que estimulan la producción de AMP cíclico, lo que induce la exocitosis de UPEC dentro de vesículas (Song et al., 2009). Con el fin de ser evitar ser expulsada de la célula, UPEC es capaz de ingresar al citoplasma y multiplicarse formando CBI.

Mulvey et al. y Schwartz et al. han descrito la dinámica de la formación de CBI en un modelo murino, donde primero se forma la CBI temprana a las 6 hrs luego de la infección, constituida por una agrupación de bacterias cocoides. En las siguientes 6 hrs la CBI se expande agrupándose de forma más compacta (CBI intermedio). A las 16 hrs las bacterias se desprenden de la CBI tardía y adoptan una morfología filamentosa, pudiendo emerger de la célula hospedero (Mulvey et al., 2001, Schwartz 2011). La bacteria en la luz vesical puede invadir nuevas células de la superficie del epitelio e iniciar un nuevo ciclo de formación de CBI. El proceso inflamatorio, incluyendo el reclutamiento de polimorfonucleares, estimulan la apoptosis y la exfoliación de las capas más superficiales del urotelio, dejando al descubierto las capas más profundas. Esto permitiría el acceso de UPEC a los tejidos y su persistencia (Schwartz et al., 2011). En la figura 5 se esquematiza el proceso de invasión y formación de CBI en el epitelio de la vejiga.

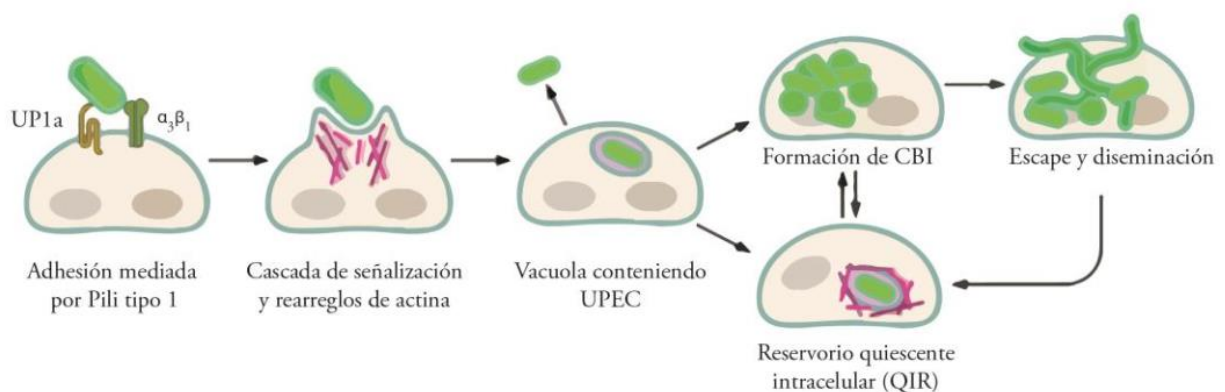


Figura 5. Invasión y formación de comunidades bacterianas intracelulares en la célula urotelial. La unión de la adhesina FimH en el extremo distal de los pilis tipo 1 con las cadenas polisacáridicas de los receptores de uroplaquina 1 (UP1a) o integrinas $\alpha3/\beta1$ estimulan re arreglos en el citoesqueleto de actina de la célula vesical y la internalización de UPEC. Las bacterias pueden ser expulsadas fuera de la célula hospedero o quedar dentro de endosomas o lisosomas tempranos. Dentro de la célula urotelial UPEC puede permanecer como reservorio quiescente intracelular (QIR), protegidos de las defensas del hospedero y de los antibióticos. La replicación bacteriana está limitada por una densa red de filamentos de actina a nivel de las células inmaduras. En las células maduras en sombrillas, la red de filamentos de actina está localizada en la membrana baso lateral, por lo que UPEC puede escapar al citosol y replicarse formando comunidades bacterianas intracelulares (CBI). Una vez en el citosol, puede emerger al exterior celular, adoptando incluso una morfología filamentosa y reiniciar un nuevo ciclo de invasión. Las bacterias también pueden ser eliminadas por exfoliación celular o una vez fuera de la célula mediante la micción. Tomado de Barber et al., 2016.

La formación de CBI es un mecanismo común en los aislamientos clínicos de UPEC y ha sido observado en varios ensayos con ratones. En humanos, Rosen et al. y Robino et al. describieron la presencia de CBI en células epiteliales descamadas en orina proveniente de pacientes con ITU aguda (mujeres y niños respectivamente) (Rosen et al., 2007; Robino et al., 2014).

De manera alternativa, UPEC es capaz de establecer un QIR en las células uroepiteliales transicionales subyacentes. Los QIR consisten en 4 a 10 bacterias en estado no replicativo rodeadas de membrana y de F-actina, pudiendo mantenerse viable por meses (Flores-Mireles et al, 2015).

La capacidad de *E. coli* de invadir las células uroteliales podría ser responsable de la aparición de recurrencias entre otras cosas por resistencia a la respuesta inmune del hospedero y la escasa penetración de los antibióticos al espacio intracelular. Las Infecciones del tracto urinario recurrentes (ITU-R) pueden ocurrir por el mismo microorganismo o por cepas diferentes. En los casos de reinfección por el mismo microorganismo éste puede provenir de la microbiota intestinal o recientemente se propone podría provenir de reservorios vesicales CBI/ QIRs (Mysorekar et al., 2006; Hooton, 2012).

1.6 Antibióticos empleados para el tratamiento de ITU.

Uno de los principales desafíos en el tratamiento de las ITU, es el alto porcentaje de resistencia que presenta UPEC a los antibióticos más comúnmente usados para el tratamiento de las mismas. Se entiende por resistencia antimicrobiana la capacidad de un microorganismo de multiplicarse en presencia de determinado antibiótico. Existen diferentes mecanismos de resistencia utilizados por las

bacterias: destrucción o inactivación enzimática, cambios de la permeabilidad en la membrana y alteraciones en el sitio blanco (Gomez et al., 2008). Los mecanismos como la capacidad de formar biofilm y comunidades bacterianas intracelulares también le confieren a UPEC la capacidad de sobrevivir a los diferentes tratamientos con diferentes antimicrobianos. En los últimos años se ha reportado un aumento de diferentes mecanismos de resistencia en bacterias uropatógenas circulando en la comunidad (Cullen et al., 2013; Velez et al., 2014).

Los principales grupos de antibióticos empleados para el tratamiento empírico de las ITU por bacterias Gram negativas son los betalactámicos, quinolonas y aminoglucósidos.

Las quinolonas actúan inhibiendo enzimas (topoisomerasas) que participan en la síntesis de ADN. Poseen actividad bactericida dependiente de la concentración. Su uso abarca una amplia variedad de infecciones, como tratamiento de elección o alternativo, tanto a nivel hospitalario como extrahospitalario. Se clasifican en primera, segunda, tercera y cuarta generación (Leyva et al., 2008; Oliphant et al., 2002). El principal mecanismo de resistencia cromosómico a las quinolonas se debe a la acumulación de mutaciones en los genes que codifican para la enzima girasa y topoisomerasa IV. También son de origen cromosómico la sobreexpresión de bombas de eflujo y el aumento de la impermeabilidad bacteriana, que también le brindan a la bacteria la capacidad de ser resistente. En los últimos años se han descrito mecanismos de resistencia transferibles asociados principalmente a plásmidos. El primero descrito fue la resistencia por enmascaramiento del sitio blanco que corresponde a una proteína codificada por el gen *qnr*. Está codificado en un plásmido transferible, dentro de un integrón de clase 1 (Tran et al., 2002; Tran et al., 2005). Otro de los mecanismos de resistencia es el mediado por la inactivación enzimática. El gen responsable del mismo es el *aac(6')-Ib-cr* que es una mutación del gen *aac(6')-Ib* que confiere resistencia a aminoglucósidos. Por este motivo, la presencia de este gen le confiere a la bacteria la capacidad de resistencia a dos grupos de antibióticos distintos (Robicsek et al., 2006). Por último, las bombas de eflujo transferibles también brindan altos niveles de resistencia, siendo codificadas por los genes *oqxAB* y *qepA* (Yamane et al., 2007). Dentro de los antibióticos empleados para ITU, las quinolonas, como la ciprofloxacina, han sido ampliamente usadas en casos de patógenos intracelulares, por su capacidad de ingresar a las células del hospedero (Easmon et al., 1986; Schentag, 1989).

Los aminoglucósidos actúan sobre la subunidad 30S del ribosoma bacteriano e inhiben la síntesis proteica. En la actualidad, aunque pueden usarse solos en las infecciones urinarias, se utilizan fundamentalmente en combinación con betalactámicos en infecciones graves por bacilos Gram negativos. Solo pueden usarse por vía parenteral ya que son nefrotóxicos y ototóxicos (producen la elevación de la urea y la creatinina, y alteración de neuronas sensitivas, respectivamente). Entre los mecanismos de resistencia adquirida se encuentran la modificación enzimática de la molécula, siendo este el más común de todos. Luego la disminución de la concentración del aminoglucósido mediante bombas de eflujo, mutación de la subunidad ribosomal 30S y metilación del sitio de unión (Molina et al., 2009; Palomino et al., 2002).

Los betalactámicos, que actúan inhibiendo la última etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana, constituyen la familia más numerosa de antimicrobianos y la más utilizada en la práctica clínica. Son compuestos de acción bactericida lenta, que presentan escasa toxicidad y poseen un amplio margen terapéutico. Estos antibióticos pueden ser utilizados en combinación con inhibidores de betalactamasas, el principal mecanismo de resistencia en enterobacterias (Suárez et al., 2009).

La resistencia a este grupo de antibióticos puede ocurrir por varios mecanismos: la presencia de enzimas modificadoras (betalactamasas), la disminución de la permeabilidad y la presencia de bombas de eflujo y la alteración del sitio blanco de acción (principalmente en bacterias Gram positivas). La producción de betalactamasas es el más importante y frecuente en la familia Enterobacteriaceae y consiste en la hidrólisis del anillo beta-lactámico. Esto implica que, dependiendo del perfil de la enzima involucrada, puede ocurrir hidrólisis enzimática de penicilinas, cefalosporinas y carbapenemes (Paterson et al., 2005). Las betalactamasas se clasifican en tres grupos de enzimas: cefalosporinasas, serin-betalactamasas y metalo-betalactamasas (Bush et al., 2010). Las cefalosporinasas son enzimas que actúan principalmente sobre las cefalosporinas, pudiendo ser tanto cromosómicas como plasmídicas (Bush et al., 2010). En el grupo de las serin-betalactamasas se incluyen las penicilinasas, que poseen un espectro reducido, betalactamasas de espectro ampliado (BLEA) como TEM-1, TEM-2 y SHV-1 y las betalactamasas de espectro extendido (BLEE). Existen muchas familias en este último grupo de enzimas, dentro de las cuales se encuentran CTX-M, OXA, variantes de TEM-1 y TEM-2,

entre otras (Bradford, 2001). Por último, las metalo-betalactamasas generalmente son producidas con otras betalactamasas. Hidrolizan carbapenems y si bien no son inhibidas por el ácido clavulánico o tazobactam, son inhibidas por quelantes de iones (Bush et al., 2010).

En Uruguay los primeros reportes de BLEE son de los años 90. Se documentó la presencia de las enzimas PER-2 y TEM 116 en cepas de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) (Vignoli et al., 2005). También se identificó la enzima CTX-M-2 en aislamientos de *K. pneumoniae*, encontrándose en un integrón complejo de clase 1 (Vignoli et al., 2006). En el año 2006 se detectaron cepas de *E. coli* portadoras de la betalactamasa de espectro extendido CTX-M15 asociada a la enzima aac(6')Ib-cr que confiere resistencia a aminoglucósidos y a fluoroquinolonas en cepas provenientes de aislamientos fecales de pacientes internados en cuidados intensivos (Cordeiro et al., 2006). En los últimos años las BLEE del grupo CTX-M han sido las detectadas con mayor frecuencia en aislamientos de enterobacterias produciendo infección, seguidas por las derivadas de bla SHV (García-Fulgueiras et al., 2011). En *E. coli*, bla CTX-M-15 asociado a la enzima aac(6')Ib-cr es el mecanismo de resistencia predominante, tanto en niños como en adultos (Bado et al., 2016).

2. Objetivos

El presente trabajo tiene como objetivo general evaluar la capacidad de distintas cepas de UPEC, pertenecientes a una colección de aislamientos clínicos, de formar CBI/BIA y biofilms en un modelo in vitro, así como evaluar el efecto de diferentes antimicrobianos sobre los mismos.

Los objetivos específicos son:

Evaluar la capacidad de distintos aislamientos clínicos de UPEC de formar biofilms sobre una superficie abiótica.

Estudiar el efecto de algunos antibióticos sobre las bacterias formando biofilms.

Analizar la formación de comunidades bacterianas intracelulares en cultivos celulares a partir de una colección de aislamientos clínicos de UPEC.

Estudiar el efecto de antimicrobianos sobre las comunidades bacterianas intracelulares.

3. Materiales y métodos.

3.1 Cepas bacterianas.

Las cepas de *E. coli* empleadas en este trabajo pertenecen a la colección de aislamientos obtenidos de muestras de orina de pacientes pediátricos con ITU del Centro Hospitalario Pereira Rossell obtenidas durante el periodo de junio a noviembre del 2012.

Los 116 aislamientos fueron estudiados en un trabajo previo (Robino et al., 2014a) donde se realizó la caracterización mediante la búsqueda por PCR multiplex de distintos factores de virulencia característicos de UPEC así como la determinación de grupos filogenéticos. Los factores de virulencia analizados fueron *afa* (adhesina afimbrial Dr), *papA*, *papC*, *papEF*, *papGII* (genes relacionados al pili P), *fimH* (pili tipo 1), *sfa/FocDE* (fimbria), *kpsMIII* (capsula tipo II), *iutA* (sideróforo aerobactin) (Robino et al., 2014a).

Las muestras de orina fueron además analizadas previamente por microscopia láser confocal en busca de la presencia de nichos intracelulares en las células descamadas de la vejiga y clasificadas según la presencia de comunidades bacterianas intracelulares (CBI) o bacterias intracelulares aisladas (BIA) (Robino et al, 2014b). El perfil de resistencia para cada cepa fue determinado empleando el sistema Vitek 2 compact systems (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France). La interpretación de los resultados de la concentración inhibitoria mínima (CIM) se realizó siguiendo las recomendaciones del Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI 2015) (Robino et al, 2014b).

Las cepas fueron conservadas en caldo Luria-Bertani y glicerol (20%) a -80°C y recuperadas en Luria-Bertani agar e incubadas a 37°C. Previo a cada ensayo se realizaron cultivos en medio líquido LB durante 24 o 48 hs dependiendo del ensayo.

3.2 Líneas celulares y condiciones de cultivo.

La línea celular T24, proveniente de carcinoma de epitelio de transición de vejiga humana (ATCC HTB-4), que se empleó para los ensayos, fue mantenida en medio DMEM completo conteniendo 4.5 g/L de glucosa, 110 mg/ml de piruvato de sodio, 4 mM de L-glutamina y suplementado con 10% de suero fetal bovino y antibiótico/antimicótico (Gibco). La línea celular fue cultivada a 37°C, 5% de CO₂. Entre los experimentos, la línea celular fue mantenida a -80°C en medio DMEM suplementado con SFB 20% y DMSO 10%.

3.3 Capacidad de formar biofilm de la colección de cepas de UPEC de origen clínico.

La cuantificación de biomasa del biofilm de cada cepa se realizó por la técnica de cuantificación por cristal violeta en placas de microtitulación de 96 pocillos. Este procedimiento consiste en realizar un cultivo de las cepas en las placas de 96 pocillos con 200 µl de LB a 37°C por 48hs, para permitir la formación del biofilm, que se da en la superficie del pocillo. El inóculo bacteriano empleado fue el mismo para todas las cepas con el fin de poder comparar y clasificar las mismas, que corresponde a 20 µl de cultivo bacteriano de 24 hs a 37°C en 180 µl de LB fresco.

A las 48hs se eliminan las bacterias planctónicas, retirando el medio y lavando tres veces con 200 µl de PBS. Luego se procede a agregar 200 µl de cristal violeta durante 15 minutos y se lava posteriormente con PBS de forma de retirar el exceso del mismo. El cristal violeta que queda retenido en el biofilm y en la matriz extracelular es solubilizado mediante el agregado de 200 µl de etanol 95%. La cuantificación se realiza a través de la medida de la densidad óptica a 590 nm (DO) por espectrofotometría empleando el equipo Varioskan™ Flash Multimode Reader, esto permite obtener una medida semi-cuantitativa de la cantidad de biomasa del biofilm.

Según Villegas (2013) la formación del biofilm se puede clasificar según la DOc que corresponde a la absorbancia en el pocillo control o blanco sin bacterias. La clasificación establece los puntos de corte en $DO \leq DOc$ = no formadora; $DOc < DO \leq (2 \times DOc)$ = débil; $(2 \times DOc) < DO \leq (4 \times DOc)$ = moderada; y $(4 \times DOc) < DO$ = fuerte.

Para *E. coli* la clasificación usada se detalla según se muestra en la tabla 1. Cada ensayo se realizó por triplicado y dos veces de manera independiente.

Tabla 1. Valores de la absorbancia de acuerdo a la clasificación para la formación de biofilm.

Clasificación	DOc=0,21	Valores
No formador	DO≤DOc	≤0,21
Débil formador	DOc<DO≤2xDOc	0,21<x≤0,42
Moderado	(2xDOc)<DO≤(4x DOc)	0,42<x≤0,84
Gran	(4xDOc)<DO	>0,84

3.4 Evaluación de la expresión de FimH y fimbria P.

La expresión de la fimbria tipo 1, FimH, se realizó mediante la técnica de hemaglutinación. Para esto las bacterias se cultivaron en 20ml de caldo LB incubado a 48 hs a 37°C estático. Pasado dicho tiempo se tomaron 1.5 ml del cultivo y se centrifugaron a 10.000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se descartó y se resuspendió el pellet en 0.5 ml de PBS.

Por otro lado, se prepararon glóbulos rojos a partir de sangre de conejo. 3.5 ml de sangre se centrifugaron a 2500 rpm durante 10 minutos a 10°C. El suero sobrenadante fue descartado y se resuspendieron suavemente los glóbulos rojos con igual volumen de PBS. Esto se volvió a centrifugar en las mismas condiciones, y se preparó una suspensión de glóbulos rojos al 3% en PBS. La suspensión fue empleada en el momento.

Al momento de realizar el ensayo, en una placa de hemaglutinación de vidrio de 12 pocillos, se mezclaron 50 µl de glóbulos rojos al 3% y el mismo volumen de suspensión bacteriana y se colocó en agitación leve. Para evaluar la expresión de fimbria P se realizó el mismo procedimiento pero previamente se incubaron las suspensiones bacterianas con d-manosa al 1% en PBS durante 10 min a temperatura ambiente. El resultado obtenido se lee como positivo cuando hay acúmulos de glóbulos rojos y negativo cuando no se observa ningún cambio. Cada ensayo se realizó por duplicado.

3.5 Efecto de los antibióticos sobre las bacterias formando biofilms.

La técnica empleada es la anteriormente descrita en el punto 3.3 con algunas modificaciones. Luego de la formación del biofilm durante 48 hs se adicionan distintas concentraciones de antibiótico dejando un control sin antibiótico en la misma placa. La cuantificación del biofilm bajo el efecto del antibiótico se realizó luego de 24 hs de incubación. Los valores obtenidos con y sin antibiótico se compararon y evaluaron estadísticamente. Los antibióticos evaluados fueron ampicilina, cefalotina, ceftriaxona, ceftazidime, amikacina y ciprofloxacina. Estos representan a los tres grupos de antibióticos más comúnmente usados: betalactámicos, aminoglucósidos y quinolonas (ver tabla 2). Cada ensayo se realizó por triplicado y dos veces de manera independiente. Los resultados se compararon usando el test estadístico de Mann-Whitney y se consideró significativo cuando el valor $p \leq 0,05$.

Tabla 2. Antibióticos, mecanismos de acción y concentraciones empleadas

Antibióticos	Familia	Mecanismo de acción	Concentración en orina ($\mu\text{g/ml}$)	Concentraciones probadas ($\mu\text{g/ml}$)		
				1	2	3
Ampicilina	Beta-lactámicos	Inhibición de la síntesis de la pared celular	>1000	300	500	1000
Cefalotina				1200	1600	2000
Ceftriaxona				500	1000	1500
Ceftazidime				500	1000	1500
Amikacina	Aminoglucósidos	Inhibición de la síntesis de proteínas	170-1720	500	1000	2000
Ciprofloxacina	Quinolonas	Inhibición de la replicación de ADN	2	2	3	5

La concentración del antibiótico en orina corresponde a la encontrada en el paciente luego de recibir una dosis terapéutica via oral del mismo

3.6 Análisis comparativo de la expresión de genes de resistencia a beta-lactámicos en bacterias planctónicas y en biofilms.

PCR en tiempo real fue el método utilizado para comparar la expresión de dos genes de resistencia a beta-lactámicos, blaCTX-M-2 y blaCTX-M-9, en condiciones de biofilm y bacterias planctónicas.

Las dos cepas que presentaban estos genes fueron cultivadas por 48 hs a 37°C en placas de poliestireno de 6 pocillos (Greiner CELLSTAR) en 5 ml de LB. Pasado este tiempo se cambió el medio a LB suplementado con 500 y 1500 $\mu\text{g/ml}$ de ceftriaxona por otras 24 hs, dejando un control sin

antibiótico. Las células planctónicas fueron removidas y se conservaron en 1 ml de RNA later (Ambion). Las células adheridas (biofilm) a la superficie del pocillo fueron lavadas con PBS para eliminar cualquier célula no adherida. Luego se despegó el biofilm de forma mecánica con el uso de un scraper y se agregó 1 ml de RNA later para conservarlo.

A partir de los cultivos descritos anteriormente se procedió a la extracción de ARN total en la condición biofilm y planctónica empleando el kit comercial PureLink RNA mini kit (AMBION), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN total fue tratado con DNAsa I (Invitrogen) con el fin de remover cualquier contaminación con DNA genómico. La cuantificación del ARN fue realizada con el espectrofotómetro NanoDrop (Thermo) y el DNAc fue sintetizado a partir de 8 ng de RNA puro usando random primers y la transcriptasa reversa M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase) de Invitrogen de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. La reacción consistió en incorporar la siguiente mezcla a los tubos tratados con DNAsaI; 1,6 µl de random hexámeros, 1,0 µl de dNTPs (100mM), 4,0 µl de 5X First-Strand Buffer, 2,0 µl de DTT (0,1M), 1,0 µl de RNAsa OUT (Inhibidor de RNasa Recombinante) (400 un/µl) y por último se incorporó 1,0 µl de la enzima M-MLV-RT. El ADNc obtenido se cuantificó mediante el espectrofotómetro Nanodrop, se realizaron diluciones 1:4 y se conservó a -20°C hasta su uso en las reacciones de PCR en tiempo real.

A partir del ADNc se evaluó la expresión de los genes de resistencia mediante PCR Real time. Los cebadores para el PCR real time fueron diseñados para amplificar el gen CTX-M-9 (forward: GCGACAATACCGCCATGAAC; reverse: TAAGCTGACGCAACGTCTGT) y el gen CTX-M-2 (forward: AAAACCGGCAGCGGAGATTA; reverse: CTGCTCCGGTTGGGTAAAGT). Como gen de referencia fue utilizado el gen *rpoA*, que codifica para la proteína ribosomal 50S L29 (Steyert et al. 2012). Las amplificaciones se realizaron en placas de 96 pocillos (Bio-Rad Laboratories™, EU) utilizando el kit comercial SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems™) y los cebadores especificados anteriormente. La mezcla de reacción consistió en 2 µL de ADNc (diluido previamente 1/4), 1,8 µl de cada cebador 10 mM, 4,4 µl de H2O libre de ARNasas y 10 µl del Mix SYBR Green PCR Master.

En cada corrida se incluyeron controles negativos (sin ADN) y un estándar para cada gen a evaluar y el gen de referencia. El estándar se realizó mediante diluciones seriadas 1/4 del ADNc de una muestra escogida al azar. Esta curva permite que el software (Bio-Rad CFX Manager 2.1; Bio-Rad

Laboratories™) pueda calcular el threshold o umbral y la eficiencia de reacción. El programa de ciclado empleado fue el siguiente: un ciclo de 2 min a 50°C, 15 min a 95°C y 40 ciclos de 15 s a 94°C, 30 s a 60°C y 30 s a 72°C. El ciclo umbral (Ct) de cada gen fue normalizado con el Ct del gen *rpoA* amplificado de la muestra correspondiente.

Los datos obtenidos del termociclador fueron analizados empleando el software del equipo (Bio-Rad CFX Manager 2.1; Bio-Rad Laboratories™). Los resultados se expresaron como el aumento relativo de los niveles de ARNm empleando la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak et al., 2001). La media se calculó para tres réplicas independientes, y se compararon mediante el test de Student's t. Cuando el valor $p \leq 0,05$ se consideró significativo.

3.7 Elección de cepas para ensayos de invasión y formación de CBI en cultivo celular.

Las cepas a evaluar fueron elegidas según la clasificación previa de acuerdo a la presencia o ausencia de CBI/BIA en células descamadas de orina (Robino et al, 2014). Además fue tomado en cuenta que las cepas presentaran la mayor variabilidad posible de factores de virulencia y que fueran preferiblemente sensibles a los antibióticos ensayados. Las cepas seleccionadas se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Cepas de UPEC seleccionadas para evaluación de la capacidad de formar CBI in vitro

Cepa	Grupo													Sensibilidad	
	CBI	BIA	filogenetico	afa	sfa/foc	KPSMII	K1	K5	pap A	pap C	iutA	FimH	CNF	ATB	
7	+	-	B2	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	TODO ^s	
145	+	-	A	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	TODO ^s	
98	+	-	D	-	-	-	ND	ND	ND	ND	-	ND	ND	TODO ^s	
121	+	-	D	-	-	-	ND	ND	ND	ND	+	ND	ND	TODO ^s	
155	+	-	B2	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	TODO ^s	
198	+	-	D	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	ND	TODO ^s	
208	+	-	D	-	-	+	ND	ND	-	-	-	ND	ND	TODO ^s	
221	+	-	D	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	TODO ^s	
230	+	-	B1	-	-	-	ND	ND	-	-	-	ND	ND	TODO ^s	
13	-	+	D	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	NAL ^r	
144	-	+	B1	-	-	+	ND	ND	-	-	-	ND	ND	TODO ^s	
173	-	+	A	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	TODO ^s	
182	-	+	D	-	-	+	ND	ND	-	-	-	ND	ND	TODO ^s	
156	-	+	B1	-	-	+	ND	ND	-	-	-	ND	ND	TODO ^s	
30	-	-	D	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	TODO ^s	
95	-	-	B2	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	AK ⁱ	
172	-	-	B2	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	TODO ^s	
174	-	-	B2	+	+	+	ND	ND	-	+	+	ND	ND	TODO ^s	
191	-	-	B2	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	TODO ^s	
194	-	-	B2	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	TODO ^s	
226	-	-	B2	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	TODO ^s	
234	-	-	B2	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	TODO ^s	
237	-	-	A	-	-	-	ND	ND	-	-	-	ND	ND	TODO ^s	

CBI= comunidad bacteriana intracelular; BIA= Bacterias intracelulares aisladas; ND= no determinado; ATB= antibiotico; S= sensible; I= intermedio; R= resistente; NAL= ácido nalidixico; AK= amikacina

3.8 Formación de comunidades bacterianas intracelulares en modelos *in vitro*.

3.8.1 Preparación de cultivos celulares.

La línea celular T24 fue cultivada en botellas de cultivo de 25 cm² con 5 ml con medio DMEM completo hasta tener un ~80% de confluencia. El medio se descartó y previo lavado con PBS Ca/Mg, se levantó la monocapa con 1 ml de tripsina-EDTA 1x (Gibco) incubando por 5 min a 37°C. Luego de desprendidas las células, se agregó DMEM completo para neutralizar la acción de la tripsina. En una placa de microtitulación de 96 pocillos colocamos la dilución de células para tener en cada pocillo 5 x10⁵ células.

3.8.2 Preparación de suspensión bacteriana.

Cada cepa fue cultivada en tubos Falcon con 20 ml de caldo LB a 37°C por 48 hs estático, encontrándose en la fase estacionaria del crecimiento. Para calcular la concentración bacteriana se procedió a medir la densidad óptica al espectrofotómetro. Previamente se determinó que una DO a 600nm de 1.5 corresponde a una concentración bacteriana de 1 x10⁹ UFC/ml y se realizó una dilución 1/10 de la suspensión bacteriana para bajar un orden. La misma fue centrifugada a 10.000 rpm durante 10 min a 4°C y el pellet resuspendido en 1 ml de PBS. Luego de una segunda centrifugación por 10 min a 10.000 rpm el pellet se resuspendió con DMEM. Para los ensayos se colocó una suspensión de bacterias de 7,5 x10⁶ tal para obtener 15 bacterias por célula (MOI=15).

3.8.3 Ensayo de invasión en células T24

Una vez preparada la monocapa de células (3.8.1) y la suspensión bacteriana se procedió a retirar el medio DMEM completo y lavar con PBS Ca/Mg las células, para agregar a las mismas la suspensión de bacterias en DMEM suplementado con 10% de SFB descomplementado. El suero descomplementado evita que el sistema del complemento reconozca a la bacteria y que de esta forma se inhiba la adhesión. El cultivo con las bacterias se incubó por 2 hs a 37°C. Transcurrido dicho tiempo, se retiró el DMEM con bacterias, se realizaron lavados con PBS y se adicionó DMEM con 10% de SFB con 100 ug/ml de gentamicina. Esto elimina todas las bacterias que no hayan entrado a las células.

Luego de incubar 2 hs a 37°C se elimina el medio de cultivo nuevamente y se realizan tres lavados con PBS con Ca/Mg. Posteriormente se agrega medio de cultivo celular con 10 µg/ml de gentamicina y se incuba a 37° por 18 hs. Por último, se retiró el medio y luego de los lavados con PBS se adicionó tritón 0,4% por 30 min, que lisa las células y libera las bacterias intracelulares. De cada pocillo se realizan diluciones 1/10 y se siembran en placa de LA mediante el método de la micro-gota. El método de la micro-gota consistió en sembrar una gota de 10 µl de cada dilución en la placa de agar. Posteriormente se dejó secar, y luego se incuba a 37°C por 24 hs. Cada cepa se ensayó por triplicado.

Para cada ensayo se agregaron pocillos para contar el número de células con cámara de Neubauer luego de la invasión y calcular la mortalidad.

3.9 Ensayo de confirmación de CBI mediante microscopía laser confocal (MLC).

Para confirmar la presencia de CBI en los cultivos celulares se eligieron 4 cepas que previamente fueron clasificadas según la presencia/ausencia de CBI en células descamadas de orina y presentaron un alto porcentaje de invasión. De las cuatro cepas, una presentaba CBI, otra presentaba BIA y dos negativas. El procedimiento realizado es el descrito anteriormente pero en placa de 6 pocillos que contenían un cubreobjetos en cada pocillo. De esta manera al colocar las células, en vez de adherirse al fondo del pocillo, lo hacen al cubreobjetos de vidrio. Al finalizar el ensayo de invasión, luego de las 18 hs de incubación, se retira el medio y se lava con PBS con Ca/Mg. En cada pocillo se agregó PFA al 4% en PBS durante 15 min en frío para fijar las células.

Posteriormente, los cubreobjetos fueron retirados para realizar la tinción por inmunofluorescencia que consistió en una primer incubación con el buffer de no permeabilización NP (BSA 2%, NH₄Cl, 50 mM en PBS Ca/Mg) durante 20 min a TA. Los cubreobjetos se lavaron tres veces con PBS Ca/Mg y las células se permeabilizaron con buffer de permeabilización (Tritón 100X al 0,3% en buffer NP). Luego de tres lavados con PBS, se procedió al marcado con el anticuerpo primario policlonal anti-*E. coli* conjugado con FITC, diluido en buffer NP 1/50. Los cubreobjetos se incubaron a TA durante una hora en oscuridad. Transcurrido dicho tiempo, se lavaron tres veces con PBS y se procedió a incubar los cubreobjetos con los anticuerpos rodamina-faloidina (anti-actina) y Hoeschst 33342 (Invitrogen) durante 30 minutos en oscuridad. Por último, luego de tres lavados con PBS para eliminar cualquier

resto de anticuerpo, se montó en un portaobjetos con 10 μl de solución de montaje (Cityfluor). Los portaobjetos se conservaron en oscuridad a 4°C hasta el momento de su observación al MLC. Cada ensayo se realizó por duplicado.

3.10 Adquisición de imágenes.

La adquisición de imágenes fue realizada en el MLC Olympus BX-61 FV300, empleando el software Olympus Fluoview Versión 4.3 ambos disponibles en el IIBCE. El uso del microscopio láser confocal presenta varias ventajas respecto a los microscopios de fluorescencia; por un lado permite obtener secciones ópticas de la muestra lo cual posibilita la reconstrucción tridimensional del objeto en estudio. Además elimina la fluorescencia que se encuentra fuera de foco obteniendo sólo la información de la región enfocada, denominada "plano focal". La visualización se llevó a cabo con un objetivo de inmersión en aceite 60X, apertura numérica 1.25 y empleando tres láseres (Kr 488 nm, He-Ne 543 nm y Diodo 405 nm). Se seleccionaron entre 3 y 5 campos al azar en cada cubreobjetos y se obtuvieron stacks en el eje z (secciones ópticas) empleando un step size de 0,3 μm entre una imagen y la siguiente. Se utilizó un tamaño de imagen de 1024 x 1024 pixeles y un tamaño de pixel de 0.105 μm .

3.11 Análisis de imágenes.

Inicialmente se procedió a la deconvolución de las imágenes. Este proceso revierte la distorsión óptica producida por el microscopio, principalmente en el eje z, reduciendo el ruido fotónico y las zonas borrosas, fenómeno conocido también como blurring. Se realizó la deconvolución de los stacks de las imágenes usando el software Huygens Professional (Scientific Volume Imaging, Hilversum, Netherlands– www.svi.nl). La reconstrucción de las imágenes 3D y su análisis se realizó con el software Volocity 3-D (Perkin Elmer).

3.12 Efecto de los antibióticos sobre las bacterias formando CBI.

Los ensayos se realizaron como se describió anteriormente, en placas de 96 pocillos. Dos cepas de UPEC susceptibles a los antibióticos evaluados y que forman CBI fueron empleadas para los ensayos. El procedimiento consistió en realizar el ensayo de invasividad clásico pero luego de la incubación con gentamicina y lavado con PBS, las monocapas infectadas se incubaron con diferentes concentraciones de antibióticos durante 10 hs. Como en el ensayo anterior, luego de colocar tritón al 4% en PBS en cada pocillo durante 30 min, se realizaron diluciones y se sembraron en placa de LA. Los antibióticos probados fueron ceftriaxona (500, 1000 y 1500 ug/ml); amikacina (500, 1000 y 2000 ug/ml); ciprofloxacina (2, 3 y 5 ug/ml) y azitromicina (20, 100 y 500 ug/ml). Estos antibióticos fueron probados anteriormente sobre biofilms y se agregó la azitromicina, un antibiótico que es capaz de ingresar a las células pero no se emplea para el tratamiento de ITU. Como control, se empleó la amikacina, que no es capaz de ingresar al interior celular. Cada ensayo se realizó por duplicado y con réplica experimental. Los resultados se compararon usando el test estadístico de Mann-Whitney y se consideró significativo cuando el valor $p \leq 0,05$.

3.13 Evaluación de la citotoxicidad causada por los antibióticos sobre las células T24.

Con el fin de determinar la citotoxicidad de los antibióticos sobre la monocapa de células, se procedió a incubar las células durante 10 hs con cada concentración de antibiótico, en placas de poliestireno de 6 pocillos con un cubreobjetos dentro. Posteriormente, se retiró el medio DMEM con suero fetal bovino 10% y con el antibiótico y luego de tres lavados con PBS se procedió a la tinción de las células con un doble marcado. Este procedimiento se realizó según lo descrito por Kabakov (2011) empleando yoduro de propidio (IP) y Hoescht 33342. Las células que posean el núcleo azul y fragmentado, serán células apoptóticas. Las que posean el núcleo rojo es porque se encuentran en el último estado de necrosis o apoptosis. Luego de las 10 hs de incubación se procedió a colocar la mezcla de fluoróforos (5 ug/ml de IP y 1 ug/ml de Hoescht) preparada en PBS. Las placas se incubaron 15 min y posteriormente se procedió a mirar en el microscopio de epifluorescencia invertido para su observación. Se registraron 20 campos al azar en cada condición. Se calcularon los porcentajes de células muertas respecto al

total de células. Los resultados se compararon usando el test estadístico de Mann-Whitney y se consideró significativo cuando el valor $p \leq 0,05$.

4. Resultados.

4.1 Determinación de la capacidad de formar biofilm sobre una superficie abiótica y su relación con la formación de CBI/BIA, factores de virulencia y grupos filogenéticos.

La cuantificación de la biomasa del biofilm de cada aislamiento de UPEC se realizó por la técnica de cuantificación por cristal violeta. Esto nos permitió obtener para cada cepa una medida de absorbancia (densidad óptica, DO) y clasificarlas en formadoras de biofilm débil, moderadas y fuertes y en no formadoras (ver tabla 1 en anexo). De las 116 cepas de UPEC, 68 resultaron negativas (58,6%) para la formación de biofilm. Las 48 restantes fueron formadoras de biofilm, siendo 19 débiles (16,4%), 21 moderadas (18,2%) y 8 fuertes (6,9%) (figura 6).

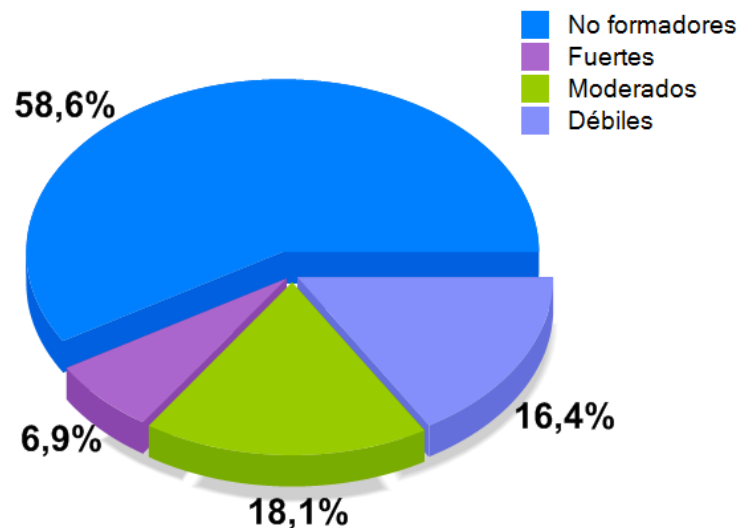


Figura 6. Clasificación de los 116 aislamientos de UPEC según su capacidad de formar biofilms.

Dentro del grupo de cepas formadoras de biofilm, 11 presentaron CBI en células descamadas de orina (22.9%), 6 presentaron BIA (12.5%) y 31 fueron negativas para CBI/BIA (64.6%) (Robino et al, 2014b). En el grupo de las cepas no formadoras de biofilm se observó una distribución similar, donde 14 cepas fueron clasificadas positivas para CBI (20.6%), 11 para BIA (16,2%) y 43 fueron negativas (63.2%). No se encontró una correlación significativa entre la capacidad de producir biofilm y la formación de CBI o BIA ($p > 0.05$, Tabla 4). En el grupo formador de biofilm, 27 cepas pertenecieron al grupo filogenético D, 11 al B2, 6 al grupo A y 4 al B1. No se encontró ninguna asociación significativa entre la formación de biofilm y los grupos filogenéticos.

Tabla 4. Habilidad de las cepas de *E. coli* de producir CBI o BIA y biofilms.

Presencia o ausencia de CBI/BIA	Total (n)	Fuerte	Moderado	Débil	No formador
CBI	25	1	5	5	14
BIA	17	1	3	2	11
Negativo	74	6	13	12	43
Total biofilms	116	8	21	19	68

CBI= comunidad bacteriana intracelular; BIA= bacteria intracelular aislada

La distribución de los factores de virulencia relacionada a la habilidad de formar biofilms se muestra en la tabla 6. La formación de biofilm se asoció significativamente con la presencia de los genes *papA*, *papEF* y *papGII* ($P = 0.024$, 0.017 y 0.024 respectivamente). Por otro lado, el gen *FimH* se encontró en 84 de las 116 cepas (72.4%), 36 del grupo de cepas formadoras de biofilm y 48 de las no formadoras ($P \geq 0.05$). De las 84 cepas que presentaron el gen de *FimH*, 69 a su vez lo expresaron, como se evidenció en el ensayo de hemaglutinación. De estas 69 cepas, 35 fueron formadoras de biofilm y 34 no, por lo que no se observó una asociación entre la presencia del gen *FimH* y su expresión y la formación de biofilm ($P = 0.21$). Tampoco se encontró una relación entre los otros factores de virulencia estudiados y la capacidad de formar biofilm débil, moderado y fuerte ($P \geq 0.05$) (tabla 5).

Tabla 5. Formación de biofilm y factores de virulencia

Factores de virulencia	Formadores de biofilm (N: 48)	No formadores de biofilm (N:68)	p-valor (IC%95)
<i>afa</i>	18	30	NS
<i>sfa/focDE</i>	9	16	NS
<i>kpsMII</i>	36	51	NS
<i>papA</i>	31	29	0.02 (1.2-5.2)
<i>papC</i>	32	35	NS
<i>papEF</i>	31	27	0.01 (1.3-7.7)
<i>papGII</i>	31	29	0.02 (1.2-5.2)
<i>fimH</i>	36	48	NS
<i>iutA</i>	40	54	NS

El test χ^2 fue aplicado a variables nominales. $P < .05$ fue considerado significativo. Genes de virulencia: *afa*= adhesina afimbrial; *sfa/focDE* = fimbrias S and Dra; *kpsMII*= capsula tipo II; *papA*, *papC*, *papEF* y *papGII*= pili P; *fimH*= pili type 1; *iutA*= sideróforo aerobactin; NS= no significativo.

4.2 Efecto de diferentes antimicrobianos sobre los biofilms *in vitro*.

Diferentes antibióticos fueron evaluados a varias concentraciones para determinar el efecto sobre los biofilms. Un total de 48 cepas fueron evaluadas, las cuales presentaron formación de biofilm a las 48 hs, ya sea débil, moderada o fuerte. Los resultados se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Efecto de las diferentes concentraciones de antibióticos sobre la biomasa del biofilm.

	Concentración (µg/ml)	Media (DO)	P valor
Ampicilina	0	0.752 (± 0.083)	
	300	0.762 (± 0.088)	0.86
	500	0.776 (± 0.093)	0.96
	1000	0.795 (± 0.081)	0.61
Cefalotina	0	0.909 (± 0.112)	
	1200	0.735 (± 0.129)	0.021
	1600	0.682 (± 0.104)	0.048
	2000	0.581 (± 0.085)	0.013
Ceftriaxona	0	0.932 (± 0.124)	
	500	0.139 (± 0.029)	1.7x10 ⁻¹⁰
	1000	0.125 (± 0.031)	1.0x10 ⁻¹⁰
	1500	0.136 (± 0.030)	2.3x10 ⁻¹⁰
Ceftazidime	0	0.942 (± 0.126)	
	500	0.105 (± 0.022)	1.6x10 ⁻¹⁰
	1000	0.073 (± 0.020)	2.7x10 ⁻¹⁰
	1500	0.076 (± 0.021)	2.6x11 ⁻¹¹
Amikacina	0	0.646 (± 0.082)	
	500	0.132 (± 0.047)	2.6x10 ⁻¹⁰
	1000	0.149 (± 0.044)	1.7x10 ⁻⁹
	2000	0.163 (± 0.048)	3.9x10 ⁻⁹
Ciprofloxacina	0	0.866 (± 0.095)	
	2	0.267 (± 0.060)	5.6x10 ⁻⁹
	3	0.350 (± 0.076)	4.7x10 ⁻⁷
	5	0.338 (± 0.083)	1.2x10 ⁻⁷

Las medias para cada grupo de antibiotico fue comparada con la condición sin antibiótico. P-valor ≤ 0,05 fue considerado significativo.

Treinta y ocho cepas de UPEC (79.2%) eran resistentes a ampicilina (todas con CIMs ≥ 32 µg/ml). Para analizar el efecto de este antibiótico sobre el biofilm se ensayaron tres concentraciones diferentes de ampicilina (300, 500 y 1000 µg/ml). No se observó una disminución significativa de la biomasa del biofilm, por lo tanto no se encontró un efecto significativo sobre el biofilm para ninguna de las concentraciones evaluadas (Tabla 6). Incluso, en el caso de las cepas sensibles a ampicilina, tampoco se observó una reducción significativa del biofilm (figura 7). Por otro lado, en el grupo de cepas resistentes se observó un leve incremento en la DO media de los biofilms con las diferentes concentraciones de antibiótico comparado con el control sin el mismo, pero no fueron significativas (tabla 7).

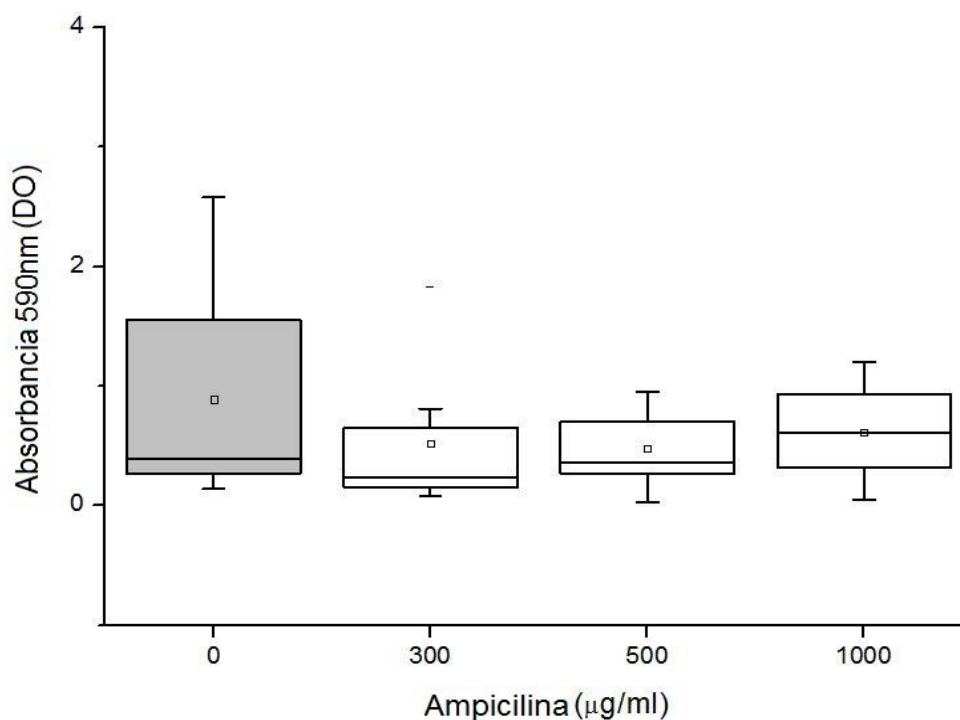


Figura 7. Cuantificación de la biomasa del biofilm de cepas sensibles con diferentes concentraciones de ampicilina. Boxplot comparando el efecto de la ampicilina en las concentraciones 0, 300, 500 y 1000 µg/ml sobre las cepas sensibles.

Tabla 7. Efecto de diferentes concentraciones de ampicilina sobre la biomasa del biofilm en los grupos de aislamientos resistentes y sensibles a esta.

	Concentración (µg/ml)	DO Cepas resistentes	P-valor	DO Cepas sensibles	P-valor
Ampicilina	0	0.716 (± 0.083)		0.887 (± 0.254)	
	300	0.827 (± 0.102)	0.63	0.519 (± 0.165)	0.14
	500	0.853 (± 0.112)	0.62	0.479 (± 0.096)	0.31
	1000	0.842 (± 0.095)	0.44	0.617 (± 0.124)	0.72

Las medias para cada grupo de antibiotico fue comparada con la condición sin antibiótico. P valor ≤ 0,05 fue considerado significativo.

Respecto a la cefalotina, 21 aislamientos (43.8%) eran resistentes a este antibiótico con un rango de CIMs desde 32 a ≥64 µg/ml. Se ensayaron tres concentraciones de cefalotina sobre el biofilm (1200, 1600 and 2000 µg/ml) y las tres produjeron una reducción significativa de la biomasa del biofilm (P ≤ 0.05, Tabla 6). Cuando se analizaron solo los aislamientos resistentes, no se observó ningún efecto

significativo de la cefalotina sobre el biofilm. En cuanto a las cepas sensibles, si se observó una importante reducción del biofilm de forma significativa, para todas las concentraciones de cefalotina, mostrando un comportamiento dosis-dependiente (Tabla 8, figura 8).

Tabla 8. Efecto de diferentes concentraciones de cefalotina sobre la biomasa del biofilm en los grupos de aislamientos resistentes y sensibles a esta.

	Concentración (µg/ml)	DO Cepas resistentes	P-valor	DO Cepas sensibles	P-valor
	0	0.863 (± 0.129)		0.945 (± 0.174)	
Cefalotina	1200	0.857 (± 0.193)	0.45	0.641 (± 0.174)	0.0049
	1600	0.761 (± 0.159)	0.43	0.621 (± 0.139)	0.021
	2000	0.702 (± 0.127)	0.41	0.486 (± 0.114)	0.0023

Las medias para cada grupo de antibiotico fue comparada con la condición sin antibiótico. P valor ≤ 0,05 fue considerado significativo.

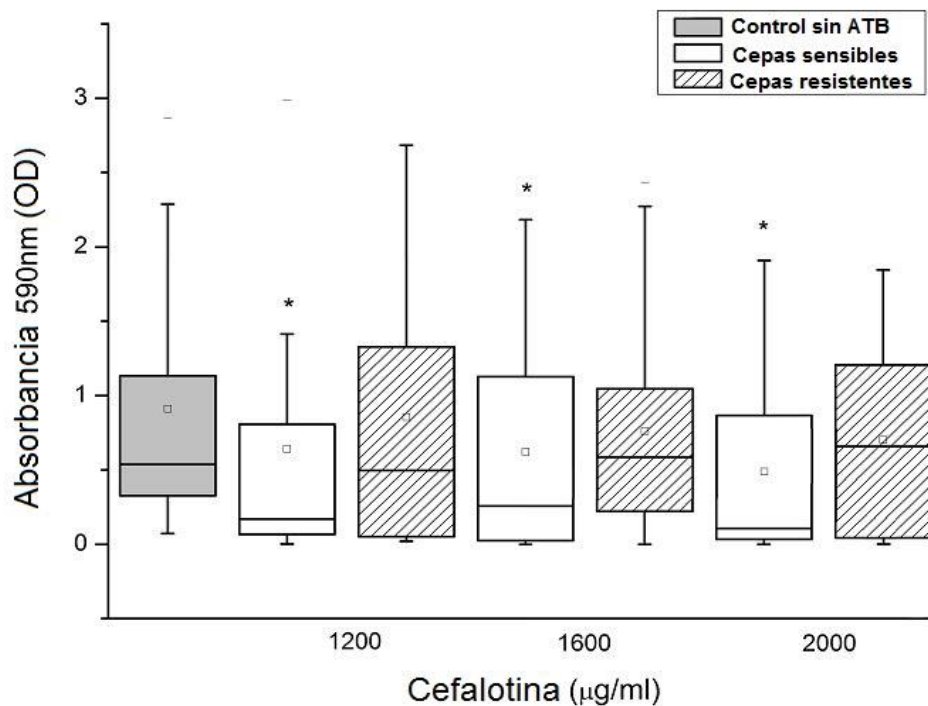


Figura 8. Cuantificación de la biomasa del biofilm con diferentes concentraciones de cefalotina. Boxplot comparando el efecto de la cefalotina en las concentraciones 0, 1200, 1600 y 2000 µg/ml sobre las cepas sensibles y las resistentes. * Disminución significativa de la biomasa del biofilm en relación al grupo sin antibiótico.

Dentro del grupo de las cefalosporinas, se evaluaron los antibióticos ceftriaxona y ceftazidime en las siguientes concentraciones: 500, 1000 and 1500 µg/ml. Los resultados mostraron una gran reducción significativa en la biomasa del biofilm al comparar con los biofilms sin antibióticos (Tabla 10, figuras 5 y 6). Solo dos cepas (4.2%) eran resistentes a ceftriaxona (CIM ≥ 64 µg/ml) y ceftazidime (CIM 16 µg/ml) en el grupo de las cepas evaluadas. Estas cepas portan los genes de resistencia a betalactamasas bla-CTX-M-2 y bla-CTX-M-9 evaluadas por PCR (Robino et al, 2014a). Al cuantificar la biomasa del biofilm en estas dos cepas, se observó una reducción de la misma en todas las concentraciones de ceftazidime, siendo significativamente menor solo a altas concentraciones (1000 and 1500 µg/ml). En cuanto a ceftriaxona, si bien se observó una reducción en el biofilm, esta no fue significativa para dichas cepas resistentes (Tabla 9, figuras 9 y 11).

Tabla 9. Efecto de diferentes concentraciones de ceftriaxona y ceftazidime sobre la biomasa del biofilm en los grupos de aislamientos resistentes y sensibles a los mismos.

	Concentración (µg/ml)	DO Cepas resistentes	P-valor	DO Cepas sensibles	P-valor
Ceftriaxona	0	0.449 (± 0.152)		0.958 (± 0.130)	
	500	0.352 (± 0.341)	0.27	0.127 (± 0.026)	1.2x10 ⁻¹⁰
	1000	0.327 (± 0.059)	0.19	0.114 (± 0.032)	8.2x10 ⁻¹¹
	1500	0.262 (± 0.088)	0.12	0.129 (± 0.031)	2.6x10 ⁻¹⁰
Ceftazidime	0	0.461 (± 0.211)		0.967 (± 0.131)	
	500	0.257 (± 0.165)	0.17	0.096 (± 0.022)	1.6x10 ⁻¹⁰
	1000	0.128 (± 0.012)	0.05	0.07 (± 0.021)	4.5x10 ⁻¹¹
	1500	0.102 (± 0.013)	0.03	0.074 (± 0.023)	5.4x10 ⁻¹¹

Las medias para cada grupo de antibiotico fue comparada con la condición sin antibiótico. P valor ≤ 0,05 fue considerado significativo.

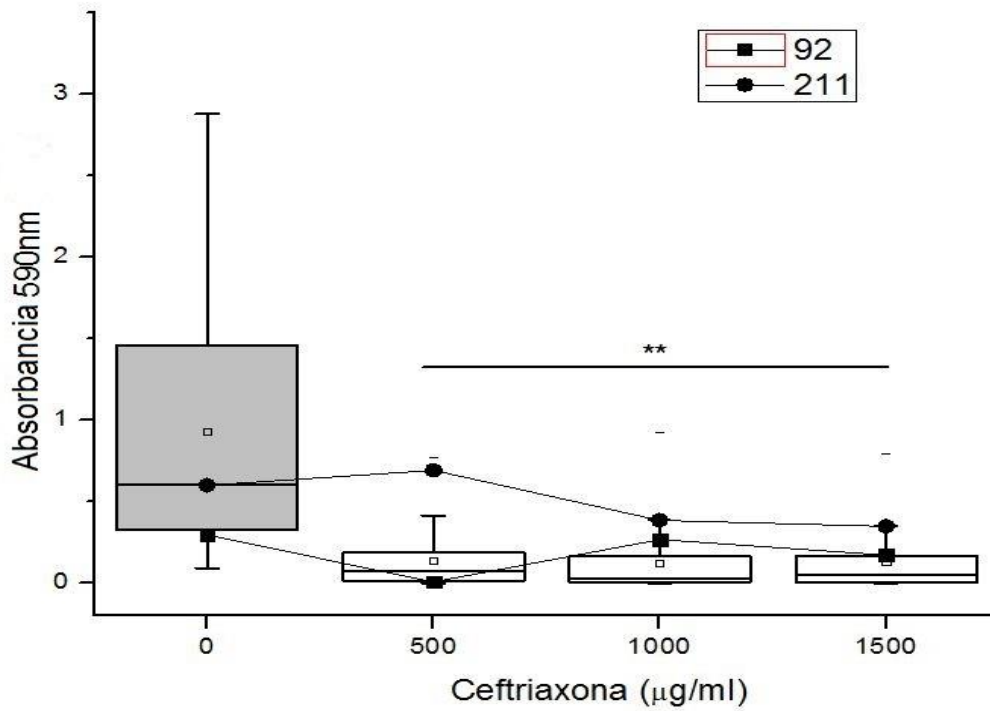


Figura 9. Cuantificación de la biomasa del biofilm con diferentes concentraciones de ceftriaxona. Boxplot comparando el efecto de ceftriaxona en las concentraciones 0, 500, 1000 y 1500 µg/ml sobre todas las cepas y con puntos y líneas las cepas resistentes (92 y 211). **Disminución significativa de la biomasa del biofilm en relación al grupo sin antibiótico.

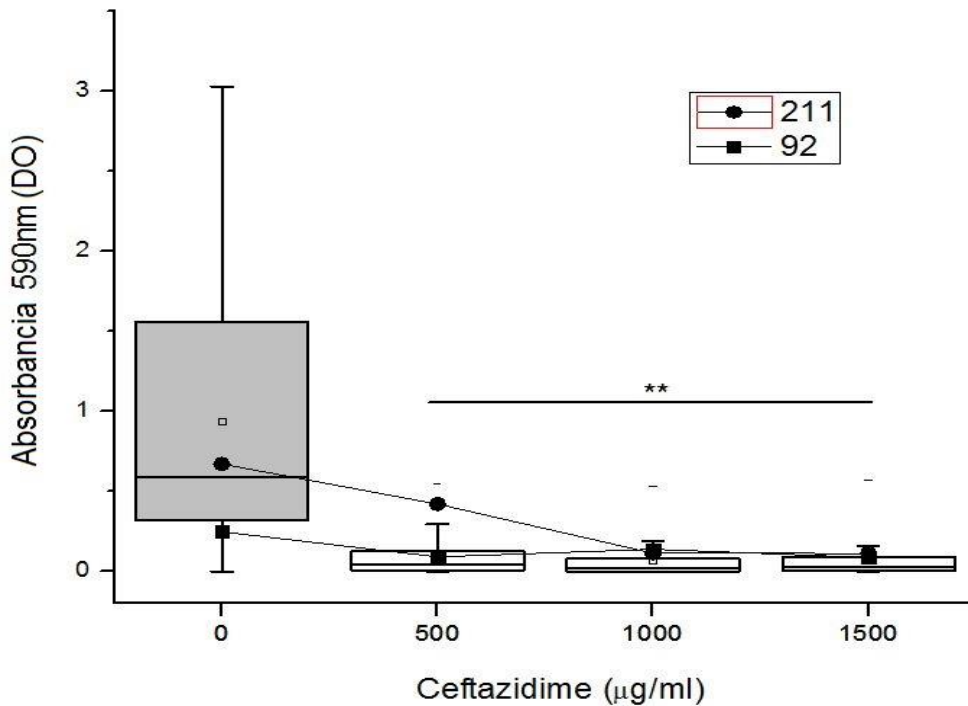


Figura 10. Cuantificación de la biomasa del biofilm con diferentes concentraciones de ceftazidime. Boxplot comparando el efecto de ceftazidime en las concentraciones 0, 500, 1000 y 1500 µg/ml sobre todas las cepas y con puntos y líneas las cepas resistentes (92 y 211). **Disminución significativa de la biomasa del biofilm en relación al grupo sin antibiótico.

La amikacina presentó un efecto de reducción significativo sobre los biofilms para todas las concentraciones probadas: 500, 1000 y 2000 $\mu\text{g/ml}$ (Tabla 10). Los 13 aislamientos (27%) que presentaron resistencia a amikacina, presentaron una importante disminución del biofilm, estadísticamente significativa cuando se comparó con el biofilm sin antibiótico (Tabla 10, figura 11).

Tabla 10. Efecto de diferentes concentraciones de amikacina sobre la biomasa del biofilm en los grupos de aislamientos resistentes y sensibles a esta.

	Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	DO Cepas resistentes	P-valor	DO Cepas sensibles	P-valor
Amikacina	0	0.767 (\pm 0.147)		0.599 (\pm 0.099)	
	500	0.126 (\pm 0.035)	6.0x10-5	0.135 (\pm 0.064)	4.7x10-9
	1000	0.111 (\pm 0.032)	2.3x10-5	0.164 (\pm 0.061)	8.4x10-8
	2000	0.171 (\pm 0.067)	2.3x10-4	0.161 (\pm 0.062)	3.9x10-8

Las medias para cada grupo de antibiotico fue comparada con la condición sin antibiótico. P valor \leq 0,05 fue considerado significativo.

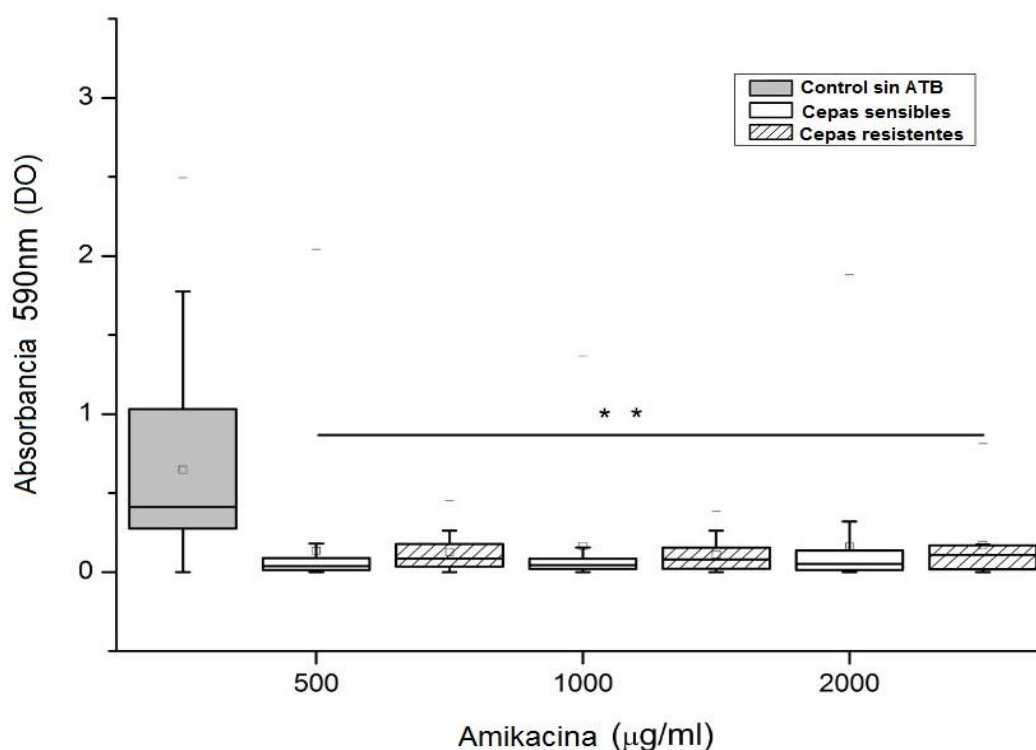


Figura 11. Cuantificación de la biomasa del biofilm con diferentes concentraciones de amikacina. Boxplot comparando el efecto de la amikacina en las concentraciones 0, 500, 1000 y 2000 $\mu\text{g/ml}$ sobre las cepas sensibles y las resistentes. ** Disminución significativa de la biomasa del biofilm en relación al grupo sin antibiótico.

Ciprofloxacina se testó con las siguientes concentraciones: 2, 3 and 5 $\mu\text{g/ml}$. La biomasa del biofilm disminuyó de forma significativa en todas las concentraciones, en relación al biofilm sin antibiótico (P

< 0.05, Tabla 11). Tres aislamientos (6.3%) fueron resistentes a la ciprofloxacina (MICs $\geq 4 \mu\text{g/ml}$). Dos de estos aislamientos mostraron una reducción del biofilm para todas las concentraciones, pero esta reducción no fue significativa comparada con el biofilm sin antibiótico. La biomasa del biofilm para la cepa restante no varió al incubar con y sin ciprofloxacina (figura 12).

Tabla 11. Efecto de diferentes concentraciones de ciprofloxacina sobre la biomasa del biofilm en los grupos de aislamientos resistentes y sensibles a esta.

	Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	DO Cepas resistentes	P-valor	DO Cepas sensibles	P-valor
Ciprofloxacina	0	0.866 (± 0.182)		0.866 (± 0.099)	
	2	0.517 (± 0.269)	0.39	0.266 (± 0.063)	7.4×10^{-9}
	3	0.451 (± 0.295)	0.29	0.358 (± 0.078)	8.3×10^{-7}
	5	0.553 (± 0.303)	0.44	0.345 (± 0.087)	1.9×10^{-7}

Las medias para cada grupo de antibiotico fue comparada con la condición sin antibiótico. P valor $\leq 0,05$ fue considerado significativo.

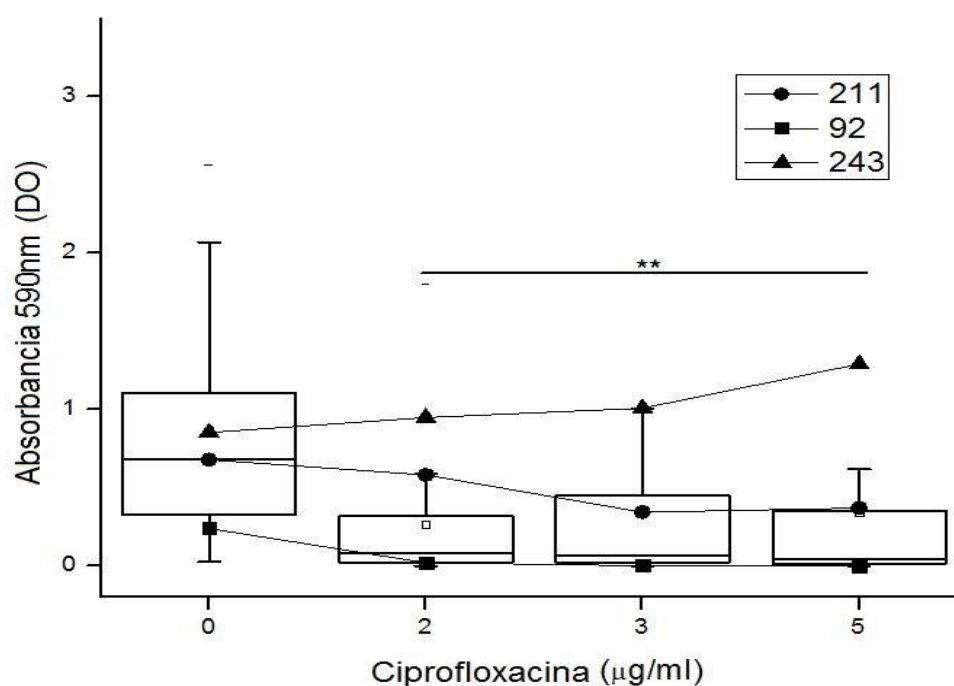


Figura 12. Cuantificación de la biomasa del biofilm con diferentes concentraciones de ciprofloxacina. Boxplot comparando el efecto de ciprofloxacina en las concentraciones 0, 2, 3 y 5 $\mu\text{g/ml}$ sobre todas las cepas y con puntos y líneas las cepas resistentes (92 y 211). **Disminución significativa de la biomasa del biofilm en relación al grupo sin antibiótico.

4.3 Expresión de genes de resistencia en UPEC productora de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en el biofilm.

Con el fin de determinar la expresión de CTX-M-9 y CTX-M-2 en los biofilms de *E. coli* bajo diferentes condiciones, se procedió a realizar RT-PCR real time. La expresión del gen CTX-M se comparó en biofilms y en las bacterias planctónicas, con y sin ceftriaxona. Como se observa en la figura 13, la expresión de CTX-M-9 es mayor en las células planctónicas (5.68 ± 1.18) en comparación con el biofilm (1.15 ± 0.42), biofilm con 500 $\mu\text{g/ml}$ (0.28 ± 0.06) y 1500 $\mu\text{g/ml}$ (0.29 ± 0.16) de ceftriaxona. La expresión de CTX-M-2 mostró una tendencia similar a CTX-M-9 pero estadísticamente no significativa. La expresión de CTX-M-2 fue mayor en las células planctónicas (1.44 ± 0.59) comparado con el biofilm (1.03 ± 0.14), biofilm con 500 $\mu\text{g/ml}$ (1.13 ± 0.26) y 1500 $\mu\text{g/ml}$ (1.14 ± 0.26) de ceftriaxona.

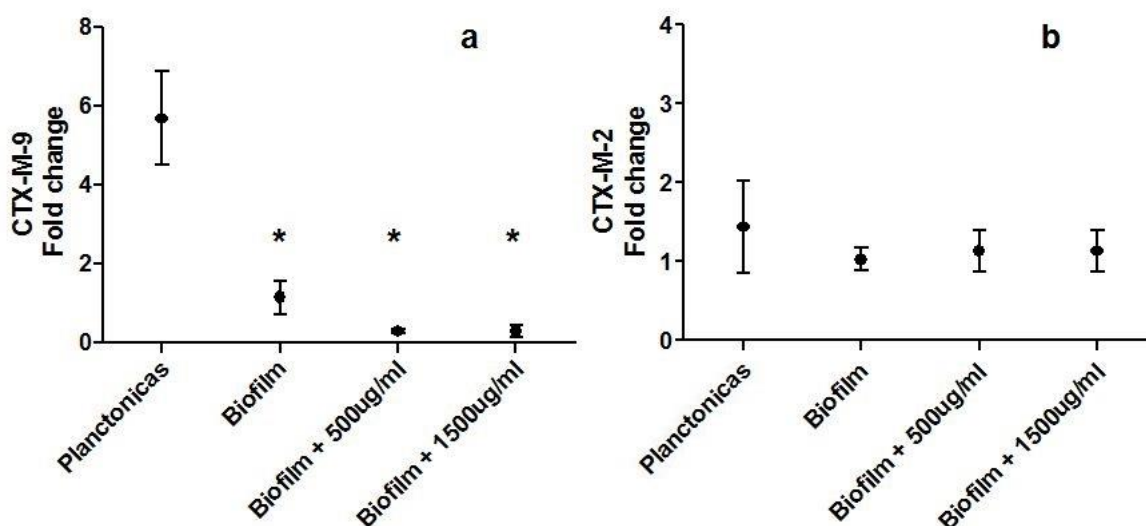


Figura 13. Expresión de genes de resistencia por PCR real time. Expresión de los genes (a) CTX-M-9 y (b) CTX-M-2 mediante RT-PCR real time en bacterias planctónicas, biofilm y biofilm con 500 y 1500 $\mu\text{g/ml}$ de ceftriaxona en las cepas 92 y 211, respectivamente (estas cepas son resistentes a ceftriaxona). Las diferencias en la expresión de genes fueron calculadas usando el método $2^{-\Delta\text{Ct}}$ normalizado con el gen de referencia *rpoART*. Los Box plots muestran el mínimo, máximo y la media de la expresión de genes de tres réplicas independientes. *Diferencias significativa entre la condición planctónica y biofilm ($P < 0.05$ test de student).

4.4 Formación de comunidades bacterianas intracelulares en modelos *in vitro*.

Para analizar la capacidad de invasión de UPEC, se seleccionaron 23 cepas previamente clasificadas según la presencia/ausencia de CBI/BIA en células descamadas de orina de niños con ITU (Robino et al. 2014b). Las 23 cepas elegidas 9 presentaban CBI, 5 BIA y 9 eran negativas para CBI/BIA en células descamadas de orina. Para calcular el porcentaje de invasión *in vitro*, se realizó recuento en placa de las bacterias intracelulares viables y se calculó el porcentaje de invasión en relación al inóculo inicial. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 12. Todas las cepas fueron capaces de infectar las células *in vitro*. Los porcentajes de invasión observados variaron desde 2,6 a 18% en el grupo clasificado como CBI positivo; 1 a 14,2% en el grupo BIA positivo y 0,7 a 12,5% en el grupo negativo.

Tabla 12. Porcentaje de invasión promedio para UPEC en monocapa de células T24

CEPA	CBI/BIA	% invasión
7	CBI	4
145	CBI	1,27
98	CBI	3
121	CBI	6,3
155	CBI	4,96
198	CBI	6,1
208	CBI	2,6
221	CBI	4,1
230	CBI	18
13	BIA	1
144	BIA	14,2
173	BIA	6,6
182	BIA	2,3
156	BIA	2,3
30	NO	0,7
95	NO	1,1
172	NO	12,5
174	NO	8,8
191	NO	5,1
194	NO	6,7
226	NO	6,4
234	NO	1,4
237	NO	5,1

CBI= comunidad bacteriana intracelular; BIA= bacteria intracelular aislada. La clasificación en CBI/BIA o negativas fue realizada en base al análisis previo por MLC de células descamadas de orina.

A su vez, comparando entre los diferentes grupos de clasificación (CBI, BIA y negativas), no se observaron diferencias significativas como se observa en la figura 14.

El porcentaje de invasión presentó diferencias significativas al comparar los aislamientos que presentaron el gen *kpsMT K1* y los que tenían la capacidad de formación de biofilm, en comparación con los aislamientos sin *kpsMT K1* y que no formaban biofilm. En la figura 15 se puede observar la distribución de los porcentajes de invasión para los genes estudiados.

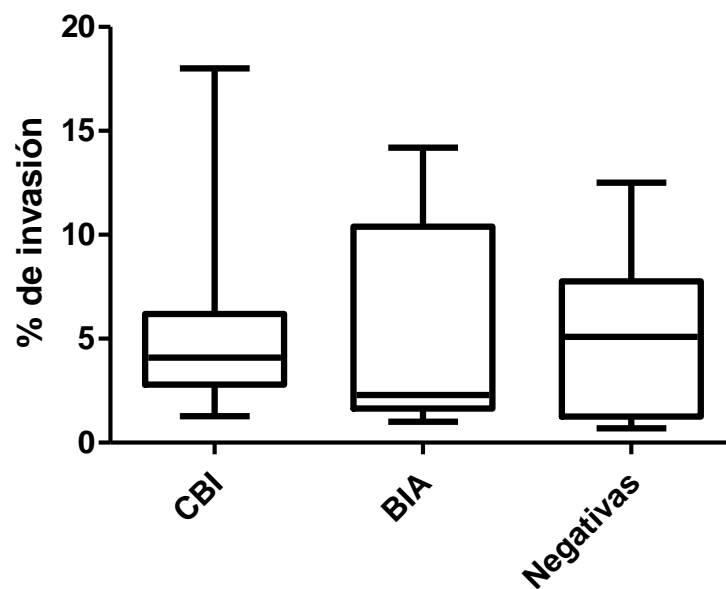


Figura 14. Porcentaje de infección para los grupos previamente clasificados en CBI, BIA o negativas. No existen diferencias significativas entre los tres grupos según el test de Mann-Whitney. Un valor $p \leq 0,05$ presenta diferencias significativas.

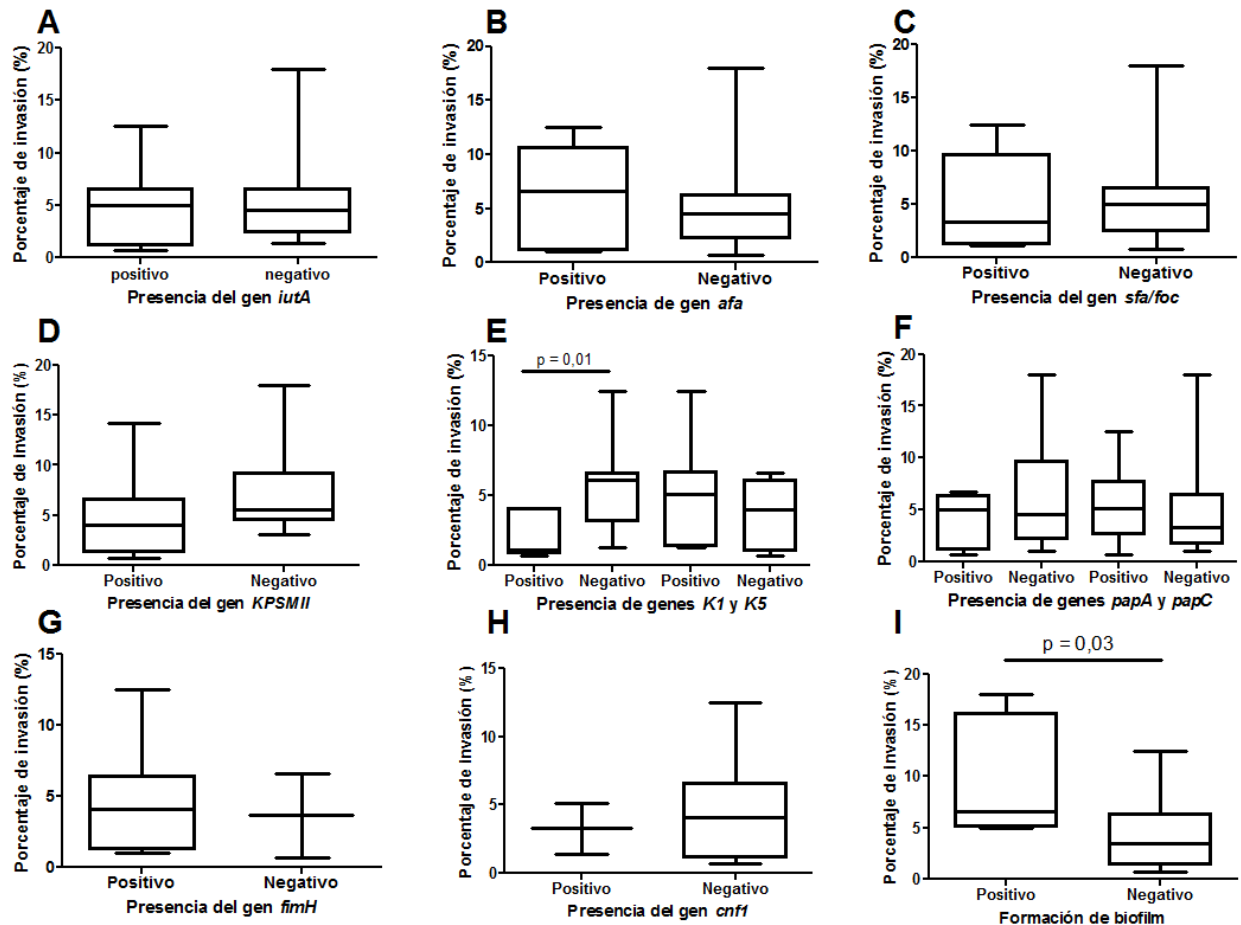


Figura 15. Porcentaje de invasión para los grupos según la ausencia o presencia de diferentes genes analizados y la capacidad de formar biofilm. Los genes estudiados fueron: A) *iutA*, receptor del sideróforo aerobactina; B) *afa*, adhesinas de unión Dr; C) *sfa/foc*, fimbria S y fimbria F1C; D) *KPSMIII*, cápsula del grupo 2; E) *kpsMT K1* y *kpsMT K5*, genes capsulares; F) *papA* y *papC*, fimbria P; G) *fimH*, fimbria de tipo 1; H) *cnf1*, factor citotóxico necrotizante por último I) Formación de biofilm. Solo existen diferencias significativas para el gen *kpsMT K1* y la formación de biofilm, según el test de Mann-Whitney. Un valor $p \leq 0,05$ presenta diferencias significativas.

4.5 Citotoxicidad de las células eucariotas.

Con el fin de evaluar la citotoxicidad producida sobre la monocapa de cada aislamiento de UPEC, se procedió a realizar el recuento celular luego de cada ensayo de invasión. El porcentaje de mortalidad se calculó en relación al control sin infectar.

Las cepas de *E. coli* presentaron una gran variabilidad en cuanto a la citotoxicidad presentando valores desde 0 hasta 90%. Si bien la mayoría de las cepas presentan valores intermedios, tres presentaron una citotoxicidad mayor al 75% y tres no produjeron muerte en el cultivo (figura 16). Las tres cepas (208, 191 y 234) que presentaron una citotoxicidad mayor al 75 % no producen biofilm *in vitro* y dos de ellas presentan el gen *CNF1*, que expresa la toxina CFN 1 que actúa sobre las células uroteliales. Las

cepas que no fueron citotóxicas para las células (7, 156 y 221) tampoco forman biofilm in vitro y ninguna presenta el gen que codifica para la toxina CNF1.

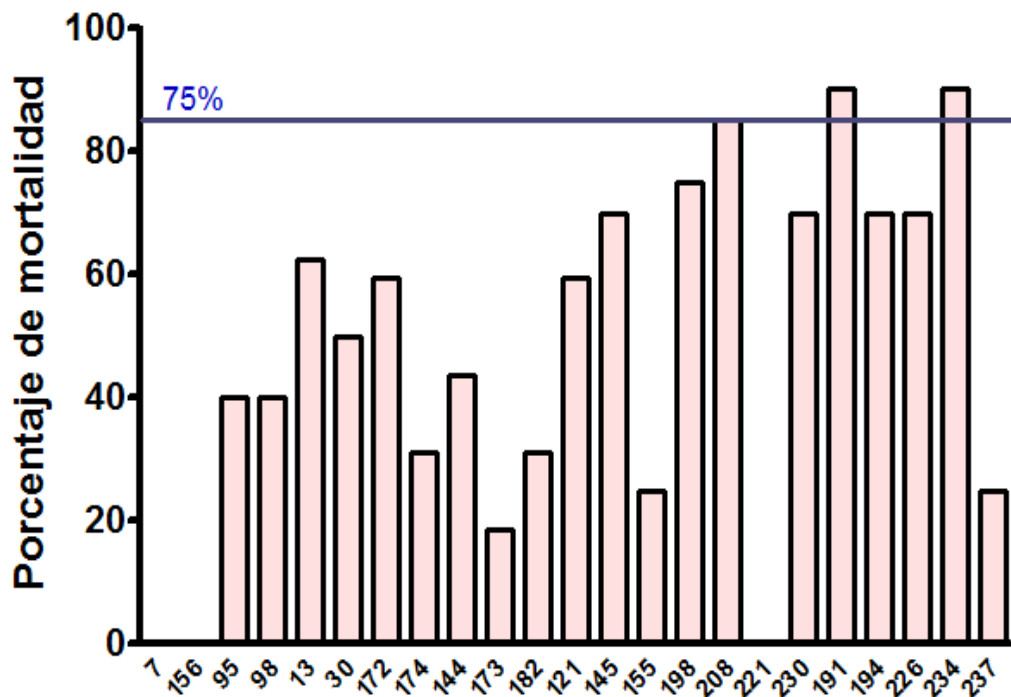


Figura 16. Porcentaje de citotoxicidad sobre la monocapa de células, para cada cepa de UPEC ensayada. La citotoxicidad se calculó como el porcentaje de células muertas, en relación al control.

4.6 Confirmación de la presencia de CBI mediante MLC.

Si bien todas las UPEC evaluadas son capaces de ingresar a las células eucariotas, la confirmación de la formación de CBI se realizó para cuatro cepas mediante MLC. De esta forma se puede confirmar que la bacteria además de ingresar a la célula, es capaz de desarrollar CBI. Se ensayaron cuatro cepas, las cuales dos de ellas fueron negativas para la presencia de CBI en células descamadas de orina.

Luego de la adquisición de imágenes y su posterior análisis, se encontró la formación de CBI para las cuatro cepas analizadas. Las imágenes a continuación son representativas de las CBI encontradas. Las bacterias se observan en verde, los núcleos de las células eucariotas en azul y la actina en rojo, que marca el citoesqueleto de la célula. En la figura 17 se observa una pequeña CBI en la zona perinuclear de la célula. Esta agrupación bacteriana se encuentra rodeada de actina (rojo) por lo que se encuentra dentro de la célula.

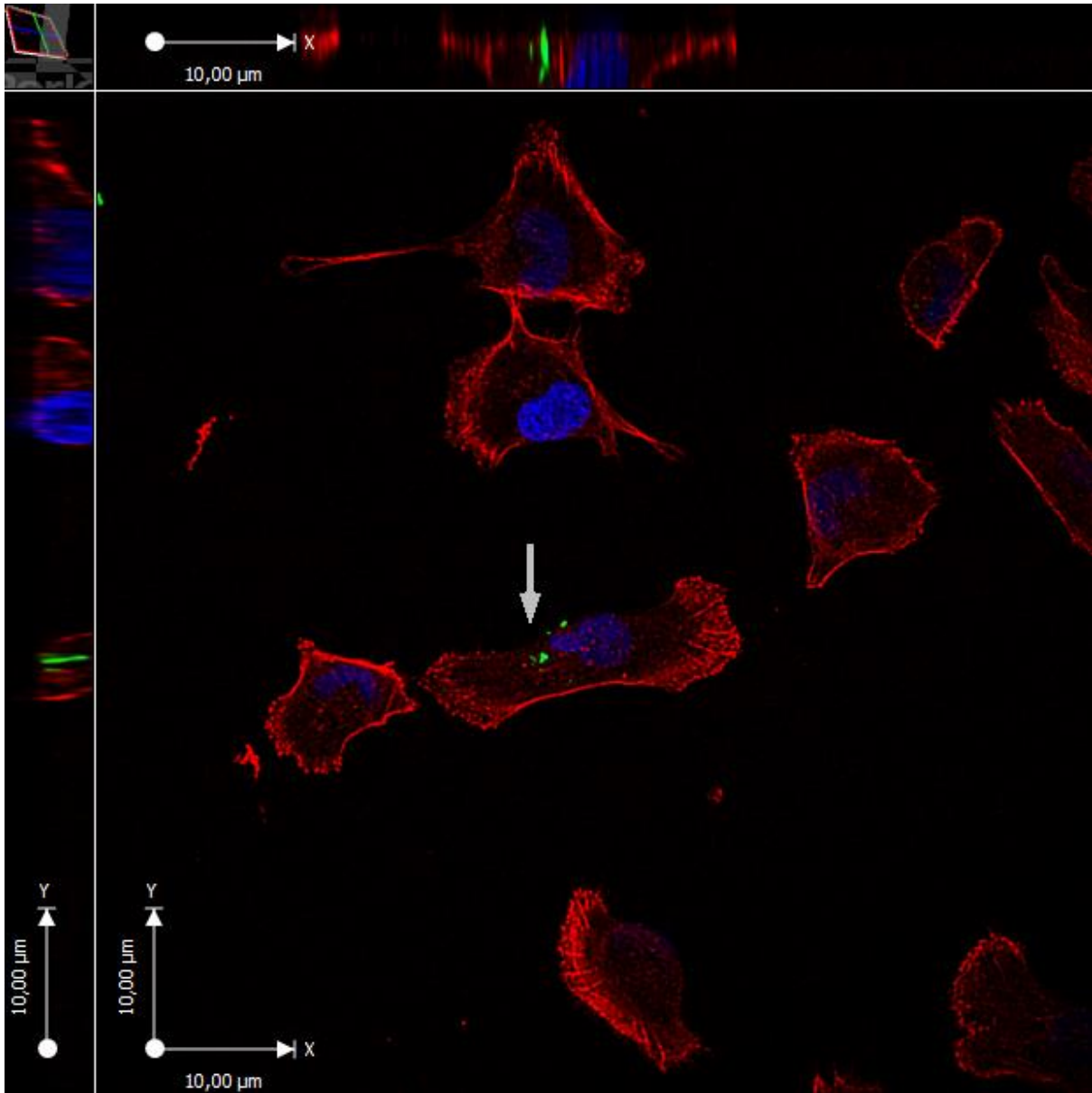


Figura 17. Imágen de CBI in vitro en células T24 infectada con el UPEC 7. Teñido con DAPI para detección de ADN (azul.), anti-actina (rojo), *E. coli* (verde). Las imágenes 3D de los stacks donde confluyen los 3 canales revelan un pequeño grupo de bacterias intracelulares a nivel perinuclear (la flecha lo indica). En el recuadro central se observa el plano xy, en la zona superior el plano zx y a la izquierda el zy.

En la figura 18 se observa una CBI de mayor tamaño, donde se pueden distinguir algunas bacterias (verde). Las bacterias se ubican junto al núcleo, ocupando una gran parte espacio citoplasmático.

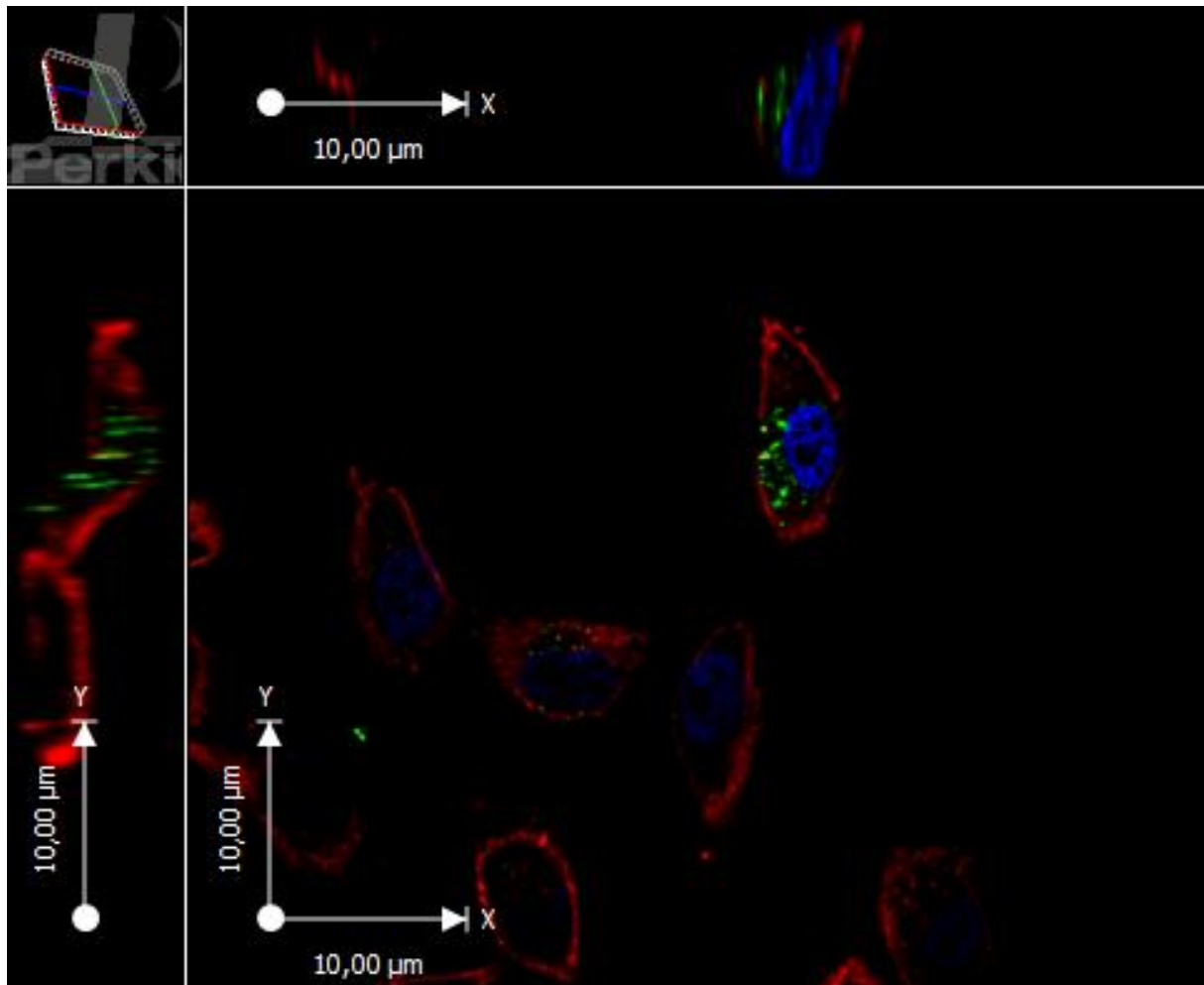


Figura 19. Imágen de CBI in vitro en células T24 infectada con el UPEC 144. Teñido con DAPI para detección de ADN (azul,), anti-actina (rojo), *E. coli* (verde). Las imágenes 3D de los stacks donde confluyen los 3 canales revelan un grupo de bacterias intracelulares (en verde) a nivel perinuclear. En el recuadro central se observa el plano xy, en la zona superior el plano zx y a la izquierda el zy.

En la figura 19 se pueden observar tres agrupaciones bacterianas. Dos de ellas (señaladas con flechas grises) parecen CBI pero no se encuentran dentro de una célula. Estas dos agrupaciones se encuentran cercanas a restos de actina, por lo que pueden haber estado dentro de células que necrotizaron. La tercera agrupación bacteriana muestra un grupo de bacterias dentro de la célula eucariota, dispuestas en citoplasma.

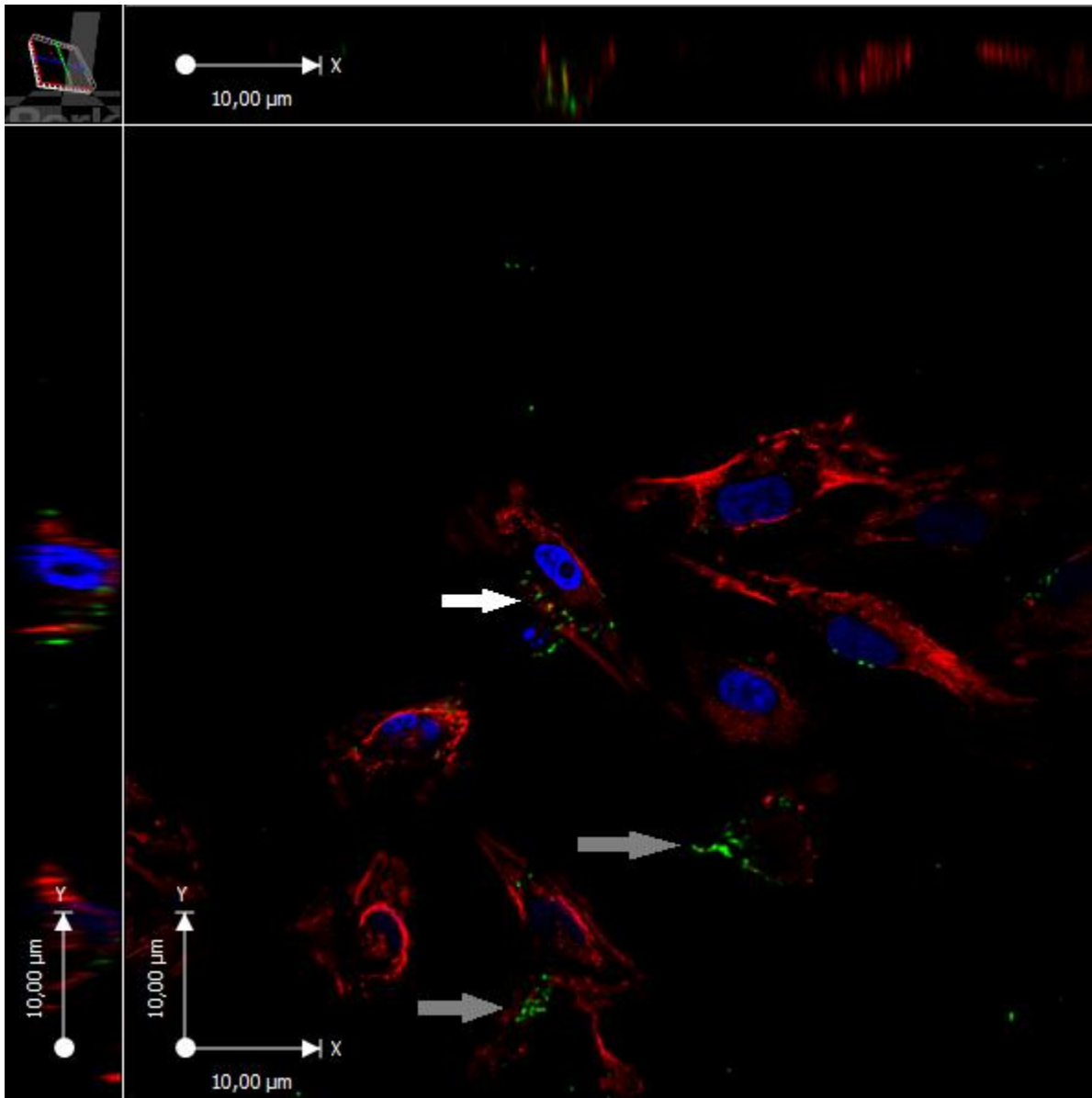


Figura 19. Imágen de CBI in vitro en células T24 infectada con el UPEC 172. Teñido con DAPI para detección de ADN (azul.), anti-actina (rojo), *E. coli* (verde). Las imágenes 3D de los stacks donde confluyen los 3 canales revelan tres grupos de bacterias. En el recuadro central se observa el plano xy, en la zona superior el plano zx y a la izquierda el zy. Las flechas grises indican dos grupos de bacterias que no se encuentran dentro de la célula pero que es probable fueran CBI anteriormente. La flecha blanca indica un grupo de bacterias intracelulares dispuestas en el citoplasma de la célula.

4.7 Efecto de antibióticos sobre la formación de CBI.

Con tal de evaluar el efecto de los antibióticos sobre las bacterias intracelulares se emplearon los siguientes antimicrobianos: ceftriaxona (500, 1000 y 1500 $\mu\text{g/ml}$); amikacina (500, 1000 y 2000 $\mu\text{g/ml}$); ciprofloxacina (2, 3 y 5 $\mu\text{g/ml}$) y azitromicina (20, 100 y 500 $\mu\text{g/ml}$). Las cepas 7 y 144 fueron empleadas para estos ensayos, ambas presentando porcentajes de invasión de 4 y 14,2% respectivamente. En cada ensayo, posterior al tiempo requerido para la formación de CBI, se incubaron los cultivos con la concentración de antibiótico correspondiente durante 10 hs. En la tabla 13 se puede observar los porcentajes de invasión para cada cepa, bajo cada condición.

Tabla 13. Porcentaje de invasión bajo el efecto de diferentes concentraciones de antibiótico para las cepas de UPEC 7 y 144.

	$\mu\text{g/ml}$	7		144	
		Media	Error típico	Media	Error típico
Amikacina	0	3,02	0,54	2,54	0,52
	500	1,75	0,54	2,54	0,23
	1000	2,22	0,41	3,18	1,83
	2000	4,29	1,22	2,54	0,69
Ceftriaxona	0	3,68	1,73	6,84	5,3
	500	1,58	0,59	5,35	5,4
	1000	1,28	0,58	1,39	0,5
	1500	0,28	0,22	0,24	0,2
Ciprofloxacina	0	2,87	0,99	2,24	1,22
	2	0,3	0,2	1,28	0,15
	3	0,68	0,39	0,82	0
	5	0,41	0,25	1,12	0,02
Azitromicina	0	2,33	0,42	1,75	0,7
	20	2,54	0,58	0,64	0
	100	0,79	0,48	0,95	0,32
	500	0,21	0,03	0,06	0

La amikacina, que pertenece al grupo de los aminoglucósidos y no es capaz de ingresar a las células eucariotas, no generó un efecto significativo sobre los porcentajes de invasión a pesar de que ambas eran sensibles, como era esperable. Incluso la cepa 7 presentó un leve aumento en el porcentaje de invasión a concentraciones altas de antibiótico (figura 20).

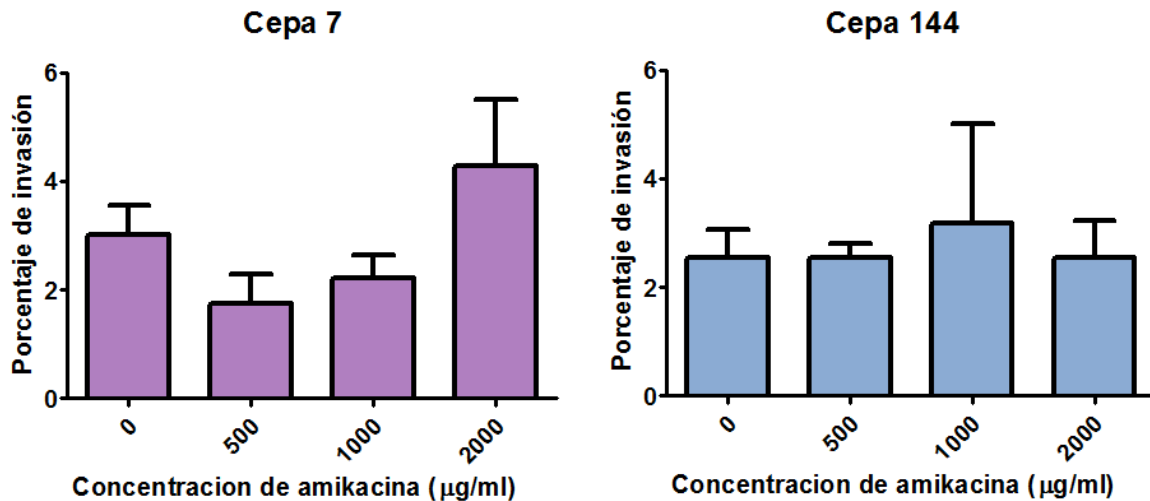


Figura 20. Efecto de diferentes concentraciones de amikacina sobre el porcentaje de invasión de las cepas 7 y 144. No se observaron diferencias significativas.

En cuanto al efecto de ceftriaxona sobre las bacterias intracelulares, a concentraciones altas (1000 y 1500 µg/ml) se observó una disminución significativa del porcentaje de invasión (figura 21).

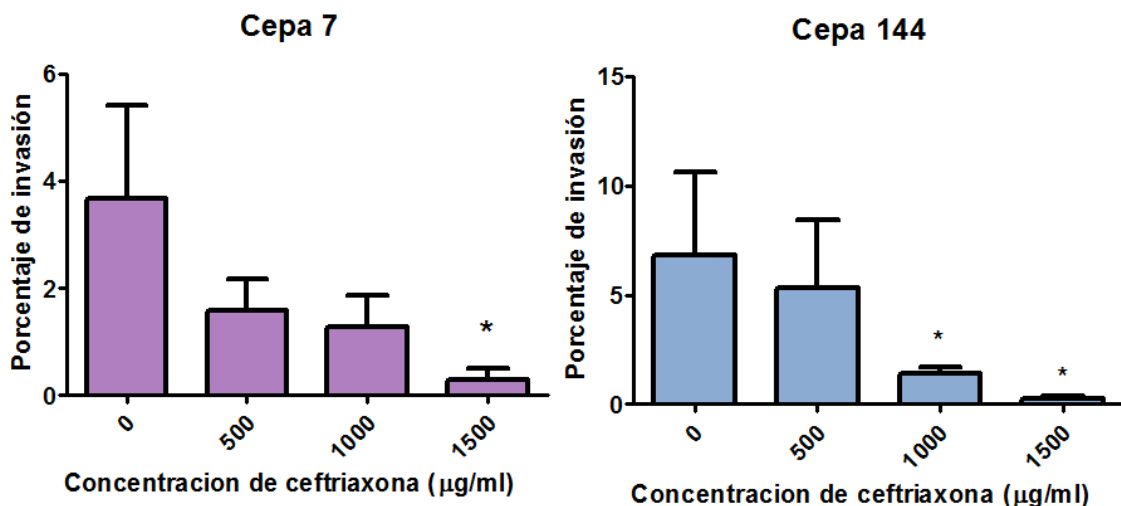


Figura 21. Efecto de diferentes concentraciones de ceftriaxona sobre el porcentaje de invasión de las cepas 7 y 144. *Diferencias significativas respecto al control sin antibiótico (valor $p \leq 0,05$)

La ciprofloxacina es el único antibiótico de los que se emplea de forma habitual en la clínica para el tratamiento de ITU, que es capaz de ingresar a las células eucariotas. Se observó una disminución de las bacterias intracelulares para ambas cepas, en relación a la condición sin antibiótico. Para la cepa 7 esta disminución es significativa, para la cepa 144 si bien se observa esta disminución en todas las concentraciones de antibiótico, solo con 3 µg/ml de ciprofloxacina es significativa (figura 22).

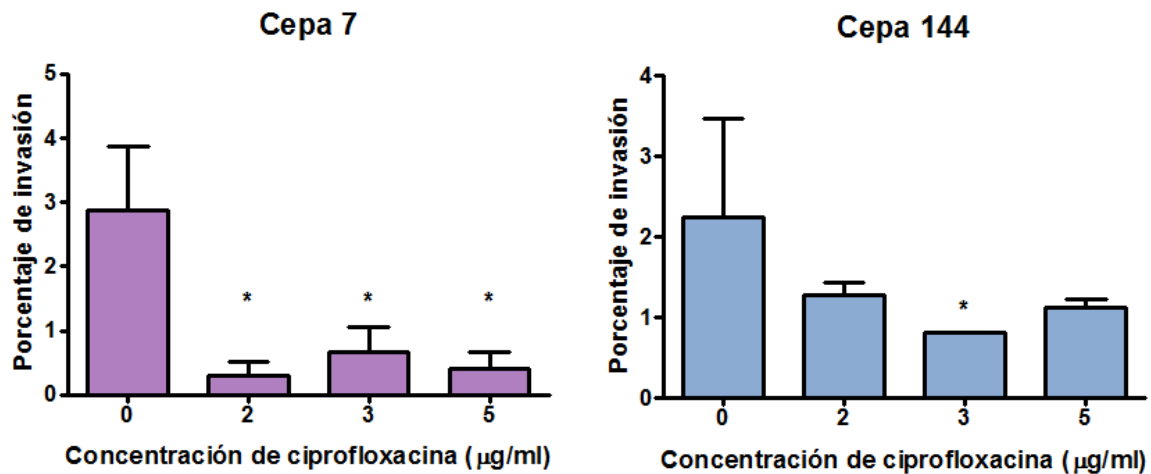


Figura 22. Efecto de diferentes concentraciones de ciprofloxacina sobre el porcentaje de invasión de las cepas 7 y 144. *Diferencias significativas respecto al control sin antibiótico (valor $p \leq 0,05$)

En relación al efecto de la azitromicina para la cepa 7 se observó un efecto de disminución del porcentaje de invasión para las últimas dos concentraciones (100 y 500 µg/ml) de azitromicina, siendo significativamente menor en la concentración más alta. La cepa 144 presentó una disminución de las bacterias intracelulares para todas las concentraciones de antibiótico, en relación al control sin el mismo, siendo significativo la concentración más elevada (figura 23).

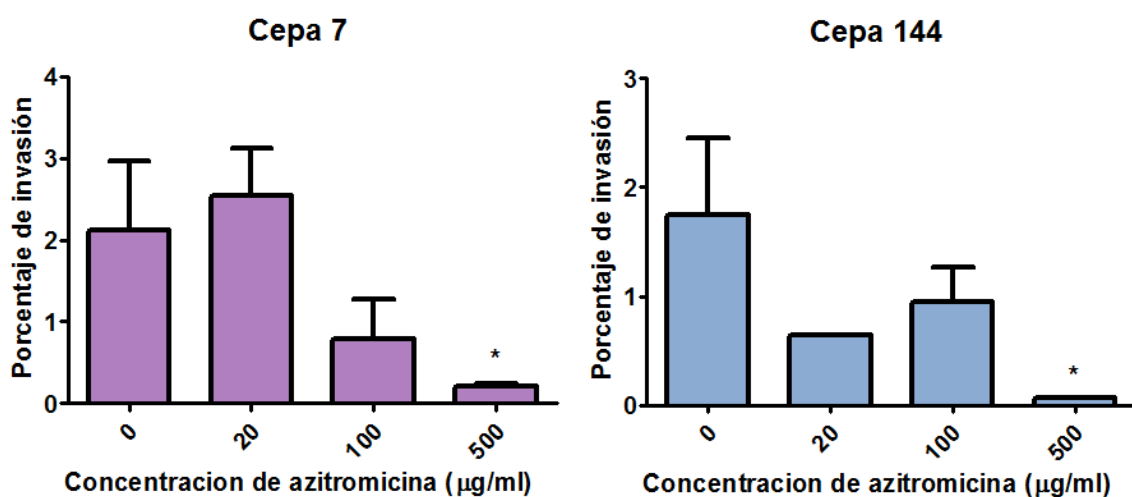


Figura 23. Efecto de diferentes concentraciones de azitromicina sobre el porcentaje de invasión de las cepas 7 y 144. *Diferencias significativas respecto al control sin antibiótico (valor $p \leq 0,05$)

4.8 Citotoxicidad de los antibióticos sobre el cultivo celular.

Con el fin de descartar la posibilidad de que la disminución en el porcentaje de infección se deba a la citotoxicidad del antibiótico sobre la monocapa de células, se realizó un ensayo de citotoxicidad probando directamente el antibiótico durante 10 hs sobre las células. Luego mediante la tinción diferencial de las células (vivas y muertas) y el análisis de imágenes por MLC, se determinó en porcentaje la citotoxicidad en relación al control sin antibiótico. Para todos los antibióticos, se observó que a medida que se aumentó la concentración también aumentó la citotoxicidad, pero ésta nunca superó el 20% (figura 24).

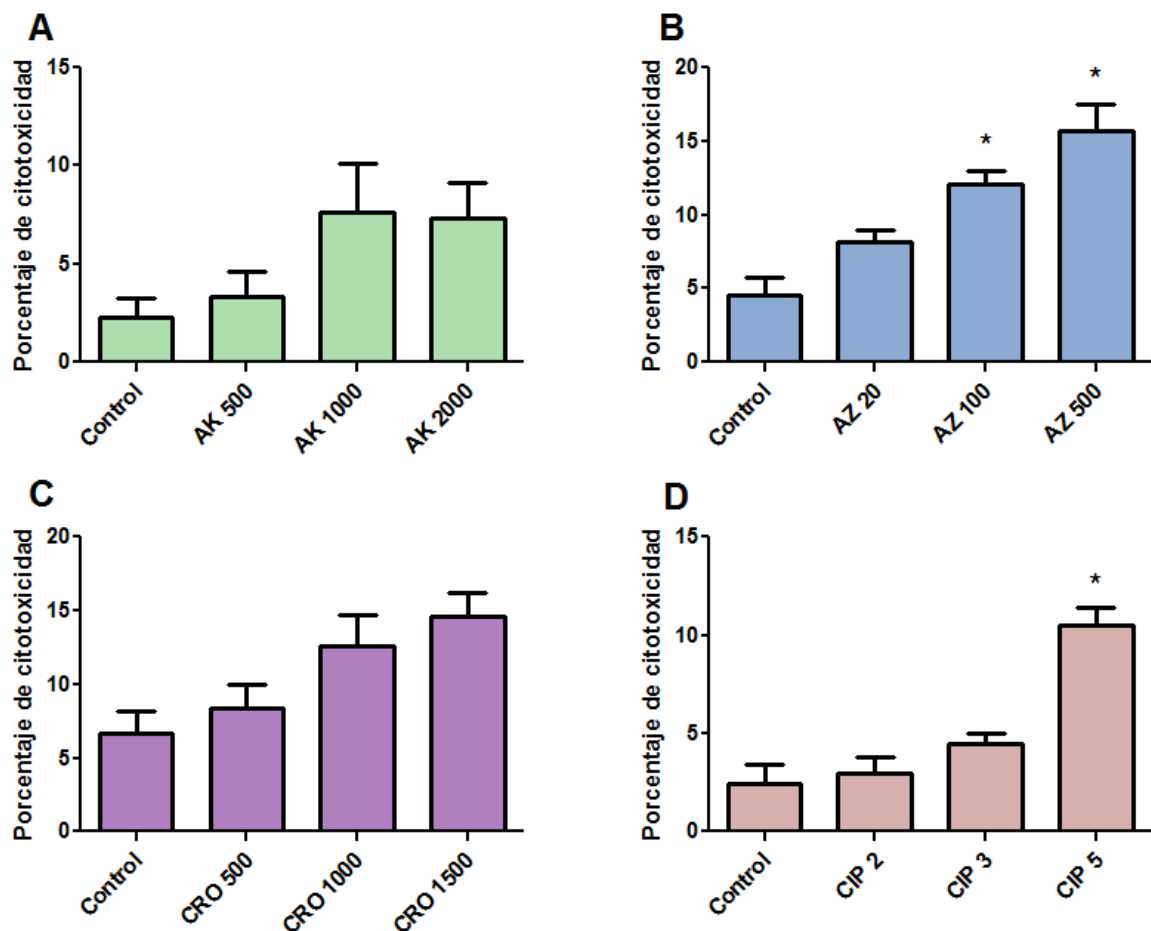


Figura 24. Evaluación de la citotoxicidad de cada concentración de antibióticos sobre el cultivo celular. Cada concentración de antibiótico fue evaluada sobre la monocapa durante 10 hs de incubación. Mediante MLC se observó el número total de células por campo y el número de células muertas, y se calculó el porcentaje. A) Citotoxicidad para las diferentes concentraciones de amikacina (AK), B) azitromicina (AZ), C) ceftriaxona (CRO) y D) ciprofloxacina (CIP). El control es el cultivo sin antibiótico. Los resultados se compararon usando el test estadístico de Mann-Whitney y se consideró significativo cuando el valor $p \leq 0,05$. *Diferencias significativas respecto al control.

5. Discusión

UPEC es el principal agente etiológico asociado a ITU adquirida en la comunidad y por este motivo ha sido ampliamente estudiado (Ronald, 2003). Uno de los mecanismos empleados por UPEC para evadir la respuesta inmune y la acción de los antibióticos, descrito en los últimos años, es la formación de CBI en las células superficiales de la vejiga (Anderson et al., 2003). Estas estructuras han sido reportadas anteriormente en las células descamadas de orina de mujeres con ITU (Garofalo et al., 2007; Rosen et al., 2007), niños (Robino et al. 2013, Robino et al., 2014b) y en modelos de infección en ratón (Anderson et al., 2004). Existe evidencia de que las CBI estarían relacionadas con las ITU recurrentes (Robino et al. 2014b). Una vez que la bacteria invade la célula, existen distintas etapas en el desarrollo de estas comunidades: CBI temprana, intermedia y tardía (Mulvey et al., 2001). La maduración de las CBI ocurre alrededor de las 12 hs luego de la infección. En este momento la bacteria adquiere una morfología diferente (bacilos más cortos) y disminuye la tasa de crecimiento produciendo una comunidad intracelular que parecería estar embebida en una matriz extracelular (Anderson et al., 2003). Esto es muy similar a lo que ocurre en un biofilm, por lo que en la mayoría de los artículos consideran a las CBI como similares a los biofilms. Por este motivo, en este trabajo se evaluó la capacidad de formar biofilms de diferentes aislamientos de UPEC de una colección clínica y su relación con la capacidad de formar CBI. Todas las cepas evaluadas en este trabajo presentaron diferentes habilidades en la formación de biofilm, variando desde fuertes formadoras hasta no formadoras. Además, más del 50% de las cepas fueron no formadoras de biofilm in vitro y no se encontró una correlación entre la capacidad de formar biofilms y la presencia o ausencia de CBI/BIA en orina. Esto pudo deberse en parte a que la clasificación de CBI fue basada en la presencia de las mismas en células descamadas de orina de niños con ITU (Robino et al. 2014b), por lo que no se puede descartar que una cepa clasificada previamente como negativa (sin presencia de CBI/BIA) tenga la capacidad de formar CBI. A su vez, si bien este mecanismo es similar a la formación del biofilm, ocurren procesos diferentes. El proceso de invasión y la salida de las vacuolas al citoplasma son necesarios para la formación de las CBI. Por lo tanto, ambos mecanismos pueden llevar a la falla terapéutica y a la recurrencia de la infección, pero no tienen por qué estar asociados.

La formación de biofilm es un mecanismo importante en la patogénesis de las ITU. No se encontró una asociación significativa entre la formación de biofilm y los grupos filogenéticos. Aun así, la mayoría de las cepas pertenecieron a los grupos filogenéticos D y B2. Esto coincide con lo descrito anteriormente donde las *E. coli* causantes de ITU se asocian en su mayoría al grupo filogenético B2, mientras que las que producen ITU y luego reinfección pertenecen en gran medida al grupo D (Ejrnæs, 2011).

Se ha determinado previamente que la expresión genética de las bacterias formando el biofilm varía en comparación con las planctónicas y varios trabajos previos han demostrado la importancia de este cambio (Revisado en Donlan et al., 2002). La formación de biofilm es un proceso complejo que consta de varias etapas donde diferentes factores están involucrados (Klausen et al., 2003). Una de las etapas más importantes es la adhesión irreversible a la superficie. En esta etapa la síntesis de flagelos está reprimida. En el caso de *Escherichia coli*, tienen un papel fundamental las adhesinas, como las fimbrias tipo 1 y curli, que permiten la adhesión irreversible (Sharma et al., 2016). Sin embargo, Hancock y colaboradores (2010) demostraron que los genes involucrados en la génesis de las fimbrias tipo 1, P y F1c están inhibidos en el biofilm de UPEC CFT073 crecidos en orina humana, lo que indica que estas fimbrias no son relevantes para la formación del biofilm en orina. Greene et al (2015) confirman estos resultados ya que también observaron que la orina humana disminuye la expresión y la función de la fimbria tipo 1 en UPEC. Los resultados obtenidos indican que existe una correlación entre la presencia de los genes *pap* y la capacidad de formar biofilm *in vitro*. Los genes *pap* (pyelonephritis-associated pili) codifican para la fimbria P, que está involucrado principalmente con la patogénesis de pielonefritis, donde se une a receptores con motivo Gal(α 1–4)Gal β en el riñón. Estos resultados coinciden con los encontrados por Naves et al. (2008), donde los genes *papC*, *papG*, *sfa/focDE*, *focG*, *hlyA* y *cnf1* fueron más prevalentes en las cepas fuertes productoras de biofilm. Recientemente se encontró que la adhesina UCA-like (UCL) también participa en la adhesión, estando involucrada en la formación de biofilm y en la unión a las células uroepiteliales (Wurpel et al., 2016).

La fimbria de tipo 1 se considera relevante para el desarrollo de CBI (Wright et al., 2007). En este trabajo, con respecto a la presencia del gen fimbrial *fimH* (fimbria tipo 1), no se observó una correlación con la formación de biofilm *in vitro* en esta colección de cepas. Esto puede deberse a la alta prevalencia de los genes que codifican a la fimbria de tipo 1, donde están presentes en más del 90% de las cepas de UPEC (Robino et al. 2014a). En otros trabajos encuentran los mismos resultados, ya que al buscar

una correlación entre la presencia de *fimH* y la formación de biofilm, encuentran que *fimH* está presente en el 87% de los aislamientos formadores de biofilm y en el 86% en los no formadores (Zamani et al., 2018). Ocurre lo mismo con la expresión de *fimH*, siendo similar en el grupo de cepas formadoras y no formadoras de biofilm. El repertorio de adhesinas, estructuras fimbriales y adhesinas no fimbriales pueden determinar el tropismo del patógeno en el tejido, las interacciones bacterianas, la formación de CBI y biofilms (Chahales et al., 2015).

Actualmente, los antibióticos más recomendados para el tratamiento de ITU incluyen a cefuroxime, trimetoprim-sulfametoxazol, ciprofloxacina y amoxicilina-clavulánico (Foxman, 2010; Gupta et al., 2011). Sin embargo, el aumento de resistencia a los antibióticos y las elevadas tasas de recurrencia plantean un desafío para el tratamiento de las ITU (Longhi et al., 2012; Dayan et al., 2013). Los antibióticos betalactámicos actúan inhibiendo la síntesis de la pared bacteriana. Dentro de este grupo se encuentran las penicilinas, aminopenicilinas, cefalosporinas y carbapenems. En Uruguay el 58% de los aislamientos de *E. coli* aislada de niños con ITU son resistentes a las aminopenicilinas, presentando un amplio espectro de betalactamasas (como TEM-1 y SHV-1) (Robino et al., 2014a). El 79% de las cepas analizadas en este estudio eran resistentes a ampicilina. No se observó una disminución de la biomasa del biofilm en ninguna de las diferentes concentraciones, incluso en las cepas susceptibles. En el grupo de las cepas sensibles el biofilm actuaría como un mecanismo de resistencia al antibiótico. Esto puede explicarse por la escasa penetración de la ampicilina en el biofilm como fue demostrado por Anderl y colaboradores (2000). Otros factores que podrían explicar el bajo efecto sobre el biofilm de la ampicilina podrían ser los diferentes estados de la bacteria en el biofilm que la vuelve tolerante al antibiótico (Anderl et al. 2003).

Los antibióticos ceftriaxona y ceftazidime son cefalosporinas de tercera generación. Son recomendados generalmente para el tratamiento de ITU tanto en adultos como en niños (Gupta et al. 2011). El principal mecanismo de resistencia que presentan las bacterias Gram negativas es mediante la producción de BLEEs (Paterson et al., 2005). Aproximadamente un 3% de los aislamientos de enterobacterias provenientes de niños con ITU comunitaria es productor de BLEE (Robino et al. 2014b). Las dos cepas resistentes a ceftriaxona y ceftazidime estudiadas en este trabajo presentaban los genes CTX-M-2 y CTX-M-9. Las cefalosporinas mostraron un efecto importante sobre el biofilm,

reduciendo la biomasa del mismo tanto para las cepas sensibles como resistentes a excepción de la ceftriaxona donde se observó una disminución sobre las cepas resistentes pero que no es significativa. Por lo tanto, ceftazidime fue más eficiente disminuyendo la biomasa del biofilm en las cepas resistentes. La reducción del biofilm, incluso en cepas resistentes al antibiótico, podría explicarse por la alta concentración de los antibióticos testados y/o por la ausencia de la expresión de BLEE en el biofilm. Las concentraciones utilizadas en este estudio fueron determinadas por la concentración que los antibióticos alcanzan en la orina con el uso de los mismos. Por lo tanto, las concentraciones están considerablemente por encima de la CIM establecida para determinar a un aislamiento resistente (≥ 4 $\mu\text{g/ml}$ para ceftriaxona y ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$ para ceftazidime según la CLSI 2015) y por encima de la CIM de estas cepas en particular siendo para ceftriaxona la CIM ≥ 64 $\mu\text{g/ml}$ y ceftazidime la CIM 16 $\mu\text{g/ml}$. Puede ocurrir que la alta concentración de antibiótico sature a las betalactamasas, lo que llevaría a que la bacteria se vuelva sensible al antibiótico, y esto permita la reducción del biofilm en las cepas resistentes (Lorian, 2005). La segunda posible explicación es que podría existir una disminución de la expresión de las BLEE durante la formación del biofilm. La mayoría de los estudios publicados encontraron una relación entre la presencia de genes BLEE en *E. coli* y la formación de biofilm, pero solo se basan en la presencia o ausencia de los genes, no en si los genes de BLEE se expresan en el biofilm (Mittal et al., 2015; Neupane et al., 2016). Cuando evaluamos la expresión del gen CTX-M en bacterias planctónicas y en el biofilm, con y sin antibiótico por PCR a tiempo real, se observó que la expresión de CTX-M-2 y CTX-M-9 fue de dos a cuatro veces mayor en las planctónicas que en el biofilm. No se observó diferencia significativa de la expresión de BLEE, con y sin antibiótico. El gen de referencia empleado para normalizar los resultados es el *rpoA*, ampliamente utilizado para comparar expresión de genes en distintas condiciones, entre ellas en condición planctónica y en biofilm (Steyert et al, 2012).

En cuanto a los aminoglucósidos, la amikacina tuvo un efecto anti biofilm tanto en el grupo de cepas sensibles como resistentes. Los aminoglucósidos actúan inhibiendo la síntesis de proteínas al unirse al ribosoma bacteriano, lo que podría causar un efecto inhibitorio en la síntesis del biofilm. Este efecto inhibitorio sobre el biofilm fue demostrado para otros grupos de antibióticos que también actúan sobre el ribosoma inhibiendo la traducción, como el cloranfenicol y la tetraciclina (Liaqat et al., 2009). Estudios del efecto de antibióticos sobre la formación del biofilm en *Klebsiella pneumoniae* reportaron que la

amikacina era capaz de erradicar las biofilms en etapas tempranas de la formación del mismo, pero que se volvía inefectivo a medida que aumentaba la edad del biofilm, por el aumento de producción del exopolisacárido (Singla et al., 2013). En este estudio, el efecto del antibiótico fue evaluado luego de 48 hs de formación del biofilm. Según Schlapp et al. (2011) la fase irreversible del biofilm ocurre entre las 24 y 48 hs en otros uropatógenos, por lo que el biofilm no estaría en la fase más temprana, más bien estaría en una fase madura. A pesar de esto, la amikacina tiene un efecto inhibitorio reduciendo la biomasa del biofilm. También es importante recalcar que el biofilm estuvo bajo el efecto del antibiótico durante 24 hs, es posible que a un menor tiempo el efecto no haya sido inhibitorio. Blango y Mulvey (2010) obtuvieron los mismos resultados al probar la amikacina sobre el biofilm de 48 hs en un aislamiento de UPEC (UTI89).

Las fluoroquinolonas, como ciprofloxacina, inhiben la replicación del ADN y tienen la capacidad de penetrar las membranas de las células del hospedero y acumularse intracelularmente. En este trabajo, la ciprofloxacina fue capaz de reducir el biofilm tanto en las cepas sensibles como en las resistentes. Blango y Mulvey estudiaron el efecto de diferentes antibióticos sobre biofilm in vitro y su eficacia para eliminar las CBI en modelo de ratón. Ellos observaron que la ciprofloxacina y la sparfloxacina tienen un efecto inhibitorio en el biofilm y promueven la disminución de CBI (Blango et al., 2010).

Hasta el momento se desconoce si todas las *E. coli* uropatógenas son capaces de ingresar a la célula urotelial y además desarrollar CBI. En la mayoría de los trabajos previos que buscan aislamientos de *E. coli* capaces de formar CBI, lo hacen en las células epiteliales descamadas de orina o evalúan solamente con pocos aislamientos muy caracterizados, como UTI89, en modelo in vitro y de ratón (Rosen et al., 2007; Anderson et al., 2009; Robino et al 2014b;). Por esto se eligieron 23 cepas que previamente se clasificaron según la presencia/ausencia de CBI/BIA en células descamadas de orina y que presentaron diferentes perfiles de factores de virulencia. En este trabajo se observó que todas las cepas evaluadas fueron capaces de infectar células epiteliales in vitro presentando una gran variabilidad en el porcentaje de invasión. Esto sugiere que la ausencia de CBI en las células uroteliales en la orina puede deberse a otros factores independientes de la bacteria. Estos factores pueden estar relacionados a la toma de muestra de orina, ya que esta puede ocurrir en etapas diferentes del desarrollo de la infección, o el volumen estudiado. Otros factores podrían estar relacionados con el

hospedero, principalmente con la respuesta del sistema inmune (Bien et al., 2012). Estos resultados *in vitro* no necesariamente correlacionan con lo que puede ocurrir durante la infección. A su vez, se puede deducir que hay cepas que tienen mayor capacidad que otras para alcanzar un estado intracelular, ya que la capacidad de invasión fue muy variable.

Garofalo y colaboradores (2006) evaluaron la capacidad de formar CBI de 18 aislamientos provenientes de mujeres con ITU en un modelo murino. Ellos encontraron que la mayoría de las cepas fueron capaces de formar CBI *in vivo* y los que no eran capaces, sí lo hacían al co-infectar con una cepa formadora de CBI. También encontraron una asociación entre la procedencia del aislamiento y la capacidad de formar CBI *in vivo*, donde los aislamientos causantes de ITU aguda eran significativamente menores que los causantes de bacteriuria asintomática, ITU recurrente y pielonefritis. Estos resultados más los encontrados en este trabajo apoyan la hipótesis de que si bien UPEC es capaz de generar infección en un modelo de cultivo celular, existen factores relacionados al hospedero que afectan esta capacidad.

En modelos murinos, inicialmente solo el 0,1% de las bacterias del inóculo inicial que se introduce trans-uretralmente es internalizado. A pesar de esto, a las doce horas de la infección, la mitad de las bacterias son intracelulares y hay entre 3 a 700 CBI formados (Schwartz et al., 2011). Si bien es cierto que podrían entrar varias bacterias a una misma célula, se comprobó que una vez dentro, las bacterias que forman CBI son clones que provienen de una misma bacteria (Méndez et al., 2016).

La adhesina que posee un papel fundamental en la adhesión y el ingreso de las bacterias a las células uroteliales es FimH, que desencadena la internalización mediante la unión a glicoproteínas manosiladas en la superficie de las células sombrilla de la vejiga (Mulvey et al., 2002). Dos de las cepas de UPEC probadas fueron negativas en la búsqueda del gen *fimH*. Sin embargo, estas dos cepas fueron capaces de invadir las células de la línea celular T24 presentando un 0,7 y 6,6% de invasión. Por lo tanto, no se encontró relación entre la presencia del gen *fimH* y el porcentaje de infección, pero esto es debido a que casi todas las cepas probadas poseen este gen. Otras adhesinas podrían estar involucradas en este proceso, ya que cepas sin el gen *fimH* fueron capaces de invadir.

No se encontró una relación entre el porcentaje de invasión y la presencia previa de CBI o BIA en las células descamadas de orina, aunque se observó una menor variabilidad en los porcentajes para el grupo de aislamientos previamente negativos. Al evaluar la relación entre los porcentajes de invasión y la presencia o ausencia de ciertos genes de virulencia se determinó que la ausencia del gen *kpsMT K1* se asocia al aumento del porcentaje de invasión. Esto se traduciría a que la bacteria puede invadir más las células y/o producir más CBI. El polisacárido capsular K1 está asociado frecuentemente con aislamientos de *E. coli* proveniente de pacientes con meningitis neonatal o septicemia. También ha sido asociado a la pielonefritis en niños (Roberts et al., 1986). La etapa de adhesión de la bacteria a las células es una etapa crítica para la internalización de la bacteria, donde la presencia de la cápsula puede interferir con la misma. La cápsula le provee a la bacteria protección contra la fagocitosis por parte de células del sistema inmune y la capacidad de sobrevivir en el torrente sanguíneo pudiendo llegar a otros tejidos y causar meningitis. La cápsula le confiere a la bacteria una mayor probabilidad de causar infecciones invasivas. A su vez, se demostró previamente que *E. coli* K1 es capaz de ingresar a las células endoteliales microvasculares del cerebro humano (Kim et al., 2003). Por lo tanto es probable que los aislamientos que poseen este gen y lo expresan, sean capaces de sobrevivir en la sangre e invadir las células endoteliales cerebrales, pero sean menos eficientes en invadir las células uroteliales. No ocurre lo mismo con la presencia del gen *kpsMT K5* donde no se encontró diferencias en los porcentajes de invasión de los aislamientos con y sin el gen. Sin embargo, Anderson y colaboradores (2009) determinaron que el polisacárido K1 tiene un papel importante en la formación de CBI, más específicamente que es un componente de la matriz las mismas (Anderson et al., 2009). Esto podría indicar que la presencia de este polisacárido dificulta el ingreso a las células, pero una vez dentro facilita la formación de CBI.

Interesantemente, la capacidad de formar biofilm se asoció de manera positiva con porcentajes mayores de invasión. La mayoría de los trabajos describen a las comunidades bacterianas intracelulares como similares a los biofilms, ya que parecen tener algunas características en común, como la producción de una matriz extracelular rica en polisacáridos, y presenta varias etapas de maduración con cambios fenotípicos en las bacterias y una etapa de dispersión (Justice et al., 2004). Muchos de los factores de virulencia que le permiten a UPEC formar biofilms, también participan en la

adherencia e invasión a las células uroteliales, por lo que esto puede favorecer la asociación positiva. Es probable que las cepas formadoras de biofilm tengan un mayor porcentaje de invasión.

Cusumano et al. (2010) encontró que la presencia del plásmido pUTI89 le confiere a UTI89 una mayor capacidad de infectar *in vivo* en un modelo de ITU en ratón, ya que en la cepa UTI89 curada (sin el plásmido) se encontró una disminución en la invasión bacteriana, el recuento y la formación de CBI. El plásmido presentaba genes relacionados al metabolismo del hierro (sideróforos), codificaba para una endotoxina y posibles proteínas con función de transporte de membrana. Esto puede indicar que la presencia de éste plásmido en UPEC, podría favorecer la invasión y la formación de CBI *in vivo*, lo que también podría explicar la diferencia del porcentaje de infección entre los aislamientos. Por lo tanto, si bien en este trabajo no se analizó la presencia de plásmidos, se podría evaluar en un futuro, buscando una asociación entre la presencia de plásmidos y el porcentaje de invasión.

El factor CNF1 (factor citotóxico necrotizante 1) es producido por un tercio de las UPEC causantes de pielonefritis y podría estar asociado a la invasión en el riñón. En ensayos *in vitro*, esta proteína secretada es capaz de estimular la formación de fibras de actina y generar cambios en la membrana que resulta en la entrada de *E. coli* a la célula. También se demostró *in vitro* que CNF1 es capaz de interferir con la fagocitosis por los polimorfonucleares y gatillar la muerte apoptótica de las células epiteliales (Mills et al., 2000). Las dos cepas estudiadas que presentaban el gen *cnf1* presentaron un porcentaje de citotoxicidad sobre las células T24 superior al 75%. Tanto los aislamientos con un mayor porcentaje de citotoxicidad como los que no fueron citotóxicos, portan los genes *fimH* y *KPSMIII* y no poseen los genes *afa* y *iutA* ni son formadoras de biofilm. Con estos resultados se puede sugerir que la proteína CNF1 podría ser uno de los factores que aumenten la citotoxicidad de los aislamientos de UPEC. Este resultado es congruente con lo encontrado en otros trabajos (Fabbri et al, 2010; García et al, 2013).

Con el fin de confirmar que estos aislamientos forman CBI, se eligieron 4 cepas de las cuales dos habían sido clasificadas como negativas en la presencia de CBI/BIA en células descamadas de orina de niños con ITU (Robino et al. 2014b). Las cuatro cepas analizadas presentaron CBI y también BIA. Si bien las bacterias intracelulares aisladas pueden encontrarse en el inicio de la infección, cuando la

bacteria ingresa a la célula, también pueden ser bacterias que se convertirán en QIRs. Al confirmar que las cepas previamente negativas para CBI forman comunidades intracelulares in vitro, podemos confirmar la hipótesis de que existen otros factores que determinan la ausencia de CBI en células descamadas de orina.

El mecanismo de UPEC de formar CBI o de persistir en el epitelio de la vejiga en forma de QIRs, podría explicar la recurrencia de la infección luego del tratamiento antibiótico (Schilling et al., 2002; Justice et al., 2004). La mayoría de los antibióticos empleados para el tratamiento de ITU no son capaces de ingresar a las células, a excepción de las quinolonas, como la ciprofloxacina, lo cual hace muy difícil la eliminación de las CBI (Schentag, 1989). Por este motivo, con el fin de evaluar si este mecanismo actúa como una barrera impidiendo la eliminación de la infección, probamos antibióticos que son eficientes sobre el biofilm de *E. coli* en la concentración que se encuentra en orina. Considerando que la citotoxicidad de los antibióticos sobre las células no sobrepasa el 20% de mortalidad para los cuatro antibióticos, los resultados obtenidos no se deben al efecto del antibiótico sobre las células. La ciprofloxacina si bien es capaz de ingresar a las células, podría no ser activo sobre las CBI. El porcentaje de invasión disminuyó significativamente al emplear este antibiótico, con lo cual podemos concluir que es efectivo para la eliminación de las bacterias intracelulares. Blango et al. (2010) estudió el efecto de diferentes antibióticos sobre el biofilm in vitro y la eficacia para erradicar CBI en un modelo murino. Ellos observaron que la ciprofloxacina y la sparfloxacina tienen un efecto inhibitorio sobre el biofilm. Sin embargo, ninguno de estos antibióticos fue capaz de erradicar las bacterias intracelulares en el tejido de la vejiga de los ratones. La principal diferencia con nuestros resultados es el uso de modelos distintos, por lo que para confirmar lo encontrado en este trabajo es necesario emplear un modelo murino, que permita comparar a su vez con lo encontrado por otros investigadores.

La amikacina fue empleada como control ya que es muy efectiva sobre las cepas formando biofilms pero no es capaz de ingresar a las células eucariotas. Como se esperaba, la amikacina no produjo disminución en el porcentaje de invasión. Esto ocurre porque es un antibiótico que no es capaz de ingresar a las células, por lo que es incapaz de actuar sobre CBIs y BIAs.

Los betalactámicos no son antibióticos utilizados comúnmente para el tratamiento de infecciones causadas por patógenos intracelulares, por lo que su capacidad de concentrarse dentro de la célula del epitelio vesical no está bien establecida. En este trabajo se pudo observar una disminución en el porcentaje de invasión al evaluar diferentes concentraciones de ceftriaxona, siendo significativo solo en las concentraciones más altas.

La azitromicina pertenece a la familia de los macrólidos, es un antibiótico de amplio espectro que actúa inhibiendo la síntesis de proteínas. Otros trabajos han comprobado *in vitro* e *in vivo* que posee actividad anti biofilm, inhibiendo la producción de alginato, uno de los componentes de la matriz (Parnham et al., 2014). La azitromicina posee la capacidad de ingresar a las células y es utilizada comúnmente para el tratamiento de infecciones por *Chlamydia* (patógeno intracelular) (Parnham et al., 2014). En este trabajo se observó que la azitromicina fue efectiva sobre las bacterias intracelulares, de manera significativa a 500 µg/ml. Hay que destacar que no se conoce la concentración que alcanza este antibiótico en orina, por lo cual las concentraciones elegidas pueden no representar lo que ocurre en realidad. Sería importante conocer este dato para poder adecuar la dosis necesaria de este antibiótico, el cual proponemos, podría ser evaluado (en combinación con otro antibiótico con actividad conocida y adecuada sobre bacterias extracelulares) para el tratamiento de las ITU recurrentes donde las CBI podrían estar involucradas.

Para un adecuado tratamiento antibiótico de las ITU, se debe considerar los patrones de sensibilidad del microorganismo aislado y la patogenia de la infección: si es una infección recurrente y si presenta CBI en orina. En caso de ITU recurrente potencialmente asociada a la presencia de biofilm, como en pacientes cateterizados, el uso de cefalosporinas de tercera generación (siendo más eficiente ceftazidime), fluoroquinolonas y aminoglucósidos es recomendado. Estos antibióticos (a excepción de ampicilina) reducen la biomasa del biofilm incluso en el caso de cepas resistentes. Otro aspecto relevante es el empleo de antibióticos eficientes sobre *E. coli* en CBI. La mayoría de los antibióticos no ingresan a la célula, a excepción de las fluoroquinolonas y macrólidos, por lo que hasta el día de hoy está en debate la mejor estrategia terapéutica. Proponemos evaluar la azitromicina como un antibiótico a emplear en este último caso, como complementario a los fármacos de uso habitual.

Este trabajo contribuye con un mayor entendimiento de la resistencia a antibióticos debida a mecanismos como la formación de biofilms y de comunidades bacterianas intracelulares en aislamientos clínicos de UPEC. A su vez, pudimos establecer que todos los aislamientos clínicos de UPEC estudiados fueron capaces, in vitro, de formar CBI, concluyendo que quizá este proceso “in vivo” esté a su vez regulado por factores independientes a la bacteria.

Las perspectivas de este trabajo son las siguientes: i) Evaluar si existe una asociación entre la presencia de elementos genéticos móviles (plásmidos) y la eficiencia de la infección in vitro. ii) Evaluar las cepas en un modelo murino, con el fin de determinar si existen factores del hospedero que afecten la capacidad de estos aislamientos de formar CBI. iii) Evaluar otros antibióticos y posibles compuestos que ayuden a erradicar tanto los biofilms como las CBI.

6. Referencias bibliográficas

- Agladze K, Wang X, Romeo T. Spatial periodicity of *Escherichia coli* K-12 biofilm microstructure initiates during a reversible, polar attachment phase of development and requires the polysaccharide adhesin PGA," *J Bacteriol.* 2005; 187(24): p. 8237–8246.
- Alonso B, Bernada M, Pereda M, Traversa M, Lechini R, Mariño S, et al. Infección urinaria en niños: agentes patógenos y sensibilidad antibiótica. *Arch PediatrUrug.* 2001; 72(4): p. 268-272.
- Anderl JN, Franklin MJ, Stewart PS. Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Ch.* 2000; 44: p. 1818–24.
- Anderl JN, Zahller J, Roe F, et al. Role of nutrient limitation and stationary-phase existence in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Ch.* 2003; 47: p. 1251–6.
- Anderson GG, Palermo JJ, Schilling JD, Roth R, Heuser J, Hultgren SJ. Intracellular bacterial biofilm-like pods in urinary tract infections. *Science.* 2003; 301(5629): p. 105-7.
- Anderson GG, Dodson KW, Hooton TM, et al. Intracellular bacterial communities of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract pathogenesis. *Trends Microbiol.* 2004; 12: p. 424–30.
- Anderson GG, Goller CC, Justice S, Hultgren SJ, Seed PC, et al. Polysaccharide capsule and sialic acid-mediated regulation promote biofilm-like intracellular bacterial communities during cystitis. *Infect Immun.* 2010; 78(3): p. 963-75.
- Backhed F, Söderhäll M, Ekman P, Normark S, Richter-Dahlfors A. Induction of innate immune responses by *Escherichia coli* and purified lipopolysaccharide correlate with organ-and cell-specific expression of Toll-like receptors within the human urinary tract. *Cell Microbiol.* 2001; 3(3): p. 153-8.
- Bado I, Gutiérrez C, García-Fulgueiras V, Cordeiro NF, Araújo L, Seija V, et al. CTX-M-15 in combination with aac(6')-Ib-cr is the most prevalent mechanism of resistance both in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*, including *K. pneumoniae* ST258, in an ICU in Uruguay. *J Glob Antimicrob resistance.* 2016; 6: p. 5-9.
- Barber AE, Norton JP, Wiles TJ, Mulvey MA, et al. Strengths and Limitations of Model Systems for the Study of Urinary Tract Infections and Related Pathologies. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2016; 80(2): p. 351-67.
- Beloin C, Roux A, Ghigo JM. *Escherichia coli* biofilms. In: *Bacterial biofilms.* Ed. Springer Berlin Heidelberg. 2008; 322: p. 249–289.
- Bergsten G, Wullt B, Svanborg C. *Escherichia coli*, fimbriae, bacterial persistence and host response induction in the human urinary tract. *Int J Med Microbiol.* 2005; 295(6-7): p. 487502
- Bien J, Sokolova O, Bozko P. Role of Uropathogenic *Escherichia coli* Virulence Factors in Development of Urinary Tract Infection and Kidney Damage. *Int J Nephrol.* 2012; p. 681473.
- Blango MG, Ott EM, Erman A, et al. Forced resurgence and targeting of intracellular uropathogenic *Escherichia coli* reservoirs. *PLoS One.* 2014; 9: e93327.
- Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev.* 2001; 14(4): p. 933-51
- Brzuszkiewicz E, Brüggemann H, Liesegang H, Emmerth M, Olschläger T, Nagy G, et al. How to become an uropathogen: comparative genomic analysis of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006; 103(34): p. 12879-84.

- Buckles EL, Wang X, Lane MC, Lockett CV, Johnson DE, Rasko DA, et al. Role of the K2 capsule in *Escherichia coli* urinary tract infection and serum resistance. *J Infect Dis*. 2009; 199(11): p. 1689-97.
- Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010; 54(3): p. 969-976.
- Caggiani M, Barreiro A, Schol P. Infección urinaria en niños internados: características clínicas, bacteriológicas e imagenológicas. *Arch Pediatr Urug*. 2002; 73(4): p. 203-21.
- Caza M, Kronstad JW. Shared and distinct mechanisms of iron acquisition by bacterial and fungal pathogens of humans. *Front. Cell. Infect. Microbiol*. 2010 3: p. 80.
- Chahales P, Thanassi DG. Structure, Function, and Assembly of Adhesive Organelles by Uropathogenic Bacteria. *Microbiol Spectr*. 2015; 3(5).
- CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: 25th Informational Supplement*. M100–S25. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2015.
- Cordeiro NF, Robino L, Medina J, Seija V, Bado I, García V, et al. Ciprofloxacin-resistant enterobacteria harboring the aac(6)-Ib-cr variant isolated from feces of inpatients in an intensive care unit in Uruguay. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008; 52(2): p. 806-7.
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999; 284(5418): p. 1318-1322.
- Cullen IM, Manecksha RP, McCullagh E, Ahmad S, O'Kelly F, Flynn R, et al. An 11-year analysis of the prevalent uropathogens and the changing pattern of *Escherichia coli* antibiotic resistance in 38,530 community urinary tract infections, Dublin 1999-2009. *Ir J Med Sci*. 2013; 182(1): p. 81-9.
- Cusumano CK, Hung CS, Chen SL, Hultgren SJ. Virulence plasmid harbored by uropathogenic *Escherichia coli* functions in acute stages of pathogenesis. *Infect Immun*. 2010; 78(4): p. 1457-1467.
- Cusumano CK, Pinkner JS, Han Z, et al. Treatment and prevention of urinary tract infection with orally active FimH inhibitors. *Sci Transl Med*. 2011; 3: p. 109–15.
- Danese PN, Pratt LA, Dove SL, Kolter R. The outer membrane protein, Antigen 43, mediates cell-to-cell interactions within *Escherichia coli* biofilms. *Mol microbiol*. 2000; 37(2), 424-432.
- Dayan N, Dabbah H, Weissman I, Aga I, Even L, Glikman D, et al. Urinary tract infections caused by community-acquired extended-spectrum beta-lactamase-producing and nonproducing bacteria: a comparative study. *J Pediatr*. 2013; 163(5): p. 1417-21.
- Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical microbiology reviews*. 2002; 15(2): p. 167-193.
- Duguid JP, Clegg S, Wilson MI. The fimbrial and non-fimbrial haemagglutinins of *Escherichia coli*. *J Med Microbiol*. 1979; 12(2): p. 213-27.
- Easmon CSF, Crane JP, Blowers A. Effect of ciprofloxacin on intracellular organisms: in-vitro and in-vivo studies. *J Antimicrob Chemother*. 1986; 18(Supplement D): p. 43-48.
- Ejrnaes K. Bacterial characteristics of importance for recurrent urinary tract infections caused by *Escherichia coli*. *Dan Med Bull*. 2011; 58(4): p. B4187.
- Eto DS, Jones TA, Sundsbak JL, Mulvey MA. Integrin-mediated host cell invasion by type 1-piliated uropathogenic *Escherichia coli*. *PLoS Pathog*. 2007. 3(7): p. e100. 76
- Fabbri A, Travaglione S, Fiorentini C. *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor 1 (CNF1): toxin biology, in vivo applications and therapeutic potential. *Toxins*, 2010; 2(2), 283-296.

Fischer H, Ellström P, Ekström K, Gustafsson L, Gustafsson M, Svanborg C. Ceramide as a TLR4 agonist; a putative signalling intermediate between sphingolipid receptors for 77 microbial ligands and TLR4. *Cell Microbiol.* 2007; 9(5): p. 1239-51.

Flores-Mireles AL, Walker JL, Caparon M, Hultgren SJ. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nat Rev Microbiol.* 2015; 13(5): p. 269-84.
Foxman B. The epidemiology of urinary tract infection. *Nature Rev. Urol.* 2010; 7: p. 653–660.

Garcia EC, Brumbaugh AR, Mobley HL. Redundancy and specificity of *Escherichia coli* iron acquisition systems during urinary tract infection. *Infect Immun.* 2011; 79(3): p. 1225-35.

Garcia-Fulgueiras V, Bado I, Mota MI, Robino L, Cordeiro NF, Varela A, et al. Extended-spectrum β -lactamases and plasmid-mediated quinolone resistance in enterobacterial clinical isolates in the paediatric hospital of Uruguay. *J Antimicrob Chemother.* 2011; 66(8): p. 1725-9.

Garcia TA, Ventura CL, Smith MA, Merrell DS, O'Brien AD. Cytotoxic necrotizing factor 1 and hemolysin from uropathogenic *Escherichia coli* elicit different host responses in the murine bladder. *Infection and immunity*, 2013; 81(1), 99-109.

Garofalo CK, Hooton TM, Martin SM, et al. *Escherichia coli* from urine of female patients with urinary tract infections is competent for intracellular bacterial community formation. *Infect Immun.* 2007; 75: p. 52–60.

Gómez J, García E, Ruiz J. Significación clínica de las resistencias bacterianas: una perspectiva histórica (1982-2007). *Rev Esp Quimioter.* 2008; 21(2): p. 115-122.

González CM, Schaeffer A J. Treatment of urinary tract infection: what's old, what's new and what works. *World J Urol.* 1999; 17(6): p. 372-82.

Greene SE, Hibbing ME, Janetka J, Chen SL, Hultgren SJ. Human urine decreases function and expression of type 1 pili in uropathogenic *Escherichia coli*. *MBio.* 2015; 6(4): e00820-15.

Gupta K, Hooton TM, Naber KG, et al. International clinical practice guidelines for the treatment of acute uncomplicated cystitis and pyelonephritis in women: a 2010 update by the infectious diseases society of America and the European Society for Microbiology and infectious diseases. *Clin Infect Dis.* 2011; 52: p. 103–20.

Hahn E, Wild P, Hermanns U, Sebbel P, Glockshuber R, Häner M, Taschner N, et al. Exploring the 3D molecular architecture of *Escherichia coli* type 1 pili. *J Mol Biol*, 2002. 323(5): p. 845-57.

Hanisch FG, Hacker J, Schroten H. Specificity of S fimbriae on recombinant *Escherichia coli*: preferential binding to gangliosides expressing NeuGc alpha (2-3)Gal and NeuAc alpha (28) NeuAc. *Infect Immun.* 1993; 61(5): p. 2108-15.

Hancock V, Vejborg RM, Klemm P. Functional genomics of probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 and 83972, and UPEC strain CFT073: comparison of transcriptomes, growth and biofilm formation. *Mol Genetic Genomic.* 2010; 284: p. 437–54.

Hooton TM. Uncomplicated urinary tract infection. *New Engl. J. Med.* 2012; 366: p. 1028–1037.

Hultgren SJ, Porter TN, Schaeffer AJ, Duncan JL. Role of type 1 pili and effects of phase variation on lower urinary tract infections produced by *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 1985; 50(2): p. 370-7.

Johnson JR, Brown JJ, Maslow JN. Clonal distribution of the three alleles of the Gal(alpha1-4)Gal-specific adhesin gene *papG* among *Escherichia coli* strains from patients with bacteremia. *J Infect Dis.* 1998; 177(3): p. 651-61.

Johnson JR, O'Bryan T, Low D, Ling G, Delavari P, Fasching C, et al. Evidence of commonality between canine and human extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains that express *papG* allele III. *Infect Immun.* 2000; 68(6): p. 3327-36.

- Johnson JR, Kuskowski MA, Owens K, Gajewski A, Winokur PL, et al. Phylogenetic origin and virulence genotype in relation to resistance to fluoroquinolones and/or extended-spectrum cephalosporins and cephamycins among *Escherichia coli* isolates from animals and humans. *J Infect Dis*. 2003; 188(5): p. 759-68.
- Kabakov AE, Kudryavtsev VA, Gabai VL. Determination of cell survival or death. *Molecular Chaperones: Methods and Protocols*. 2011: p. 231-244.
- Kai-Larsen Y, Lüthje P, Chromek M, Peters V, Wang X, Holm A, et al. Uropathogenic *Escherichia coli* modulates immune responses and its curli fimbriae interact with the antimicrobial peptide LL-37. *PLoS Pathog*. 2010; 6(7): p. e1001010.
- Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*. 2004; 2(2): p. 123-40.
- Kaplan JB. Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *J Dent Research*. 2010; 89(3): p. 205–218.
- Keren I, Shah D, Spoering A, et al. Specialized persister cells and the mechanism of multidrug tolerance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 2004; 186: p. 8172–80.
- Kim KJ, Elliott SJ, Di Cello F, Stins MF, Kim KS. The K1 capsule modulates trafficking of *E. coli*-containing vacuoles and enhances intracellular bacterial survival in human brain microvascular endothelial cells. *Cell microbiol*. 2003; 5(4): p. 245-252.
- Klausen M, Heydorn A, Ragas P, et al. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Mol Microbiol*. 2003; 48: p. 1511–24.
- Kline KA, Dodson KW, Caparon MG, Hultgren SJ. A tale of two pili: assembly and function of pili in bacteria. *Trends Microbiol*. 2010; 18, p. 224–232.
- Laestadius A, Richter-Dahlfors A, Aperia A, Dual effects of *Escherichia coli* alpha hemolysin on rat renal proximal tubule cells. *Kidney Int*. 2002; 62(6): p. 2035-42.
- Lane MC, Mobley HL. Role of P-fimbrial-mediated adherence in pyelonephritis and persistence of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) in the mammalian kidney. *Kidney Int*. 2007; 72(1): p. 19-25.
- Le Bouguenec C. Adhesins and invasins of pathogenic *Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol*. 2005; 295(6-7): p. 471-8.
- Leyva S, Leyva E. Fluoroquinolonas. Mecanismos de acción y resistencia, estructura, síntesis y reacciones fisicoquímicas importantes para propiedades medicinales. *Soc Quím Méx*. 2008; 2(1): p. 1-13
- Liaqat I, Sumbal F, Sabri AN. Tetracycline and chloramphenicol efficiency against selected biofilm forming bacteria. *Curr Microbiol*. 2009; 59: p. 212–20.
- Litvak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ΔΔCT method. *Methods*. 2001; 25: p. 402–8
- Lloyd AL, Smith SN, Eaton KA, Mobley HL. Uropathogenic *Escherichia coli* Suppresses the host inflammatory response via pathogenicity island genes *sisA* and *sisB*. *Infect Immun*. 2009; 77(12): p. 5322-33.
- Longhi C, Conte MP, Marazzato M, Lebba V, Totino V, Santangelo F, et al. Plasmid-mediated fluoroquinolone resistance determinants in *Escherichia coli* from community uncomplicated urinary tract infection in an area of high prevalence of quinolone resistance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012; 31(8): p. 1917-21.

Lorian V. *Antibiotic in Laboratory Medicine*. Philadelphia, PA. 5th edn. Lippincott Williams & Wilkins, 2005.

Malagolini N, Cavallone D, Wu XR, Serafini-Cessi F. Terminal glycosylation of bovine uroplakin III, one of the major integral-membrane glycoproteins of mammalian bladder. *Biochim Biophys Acta*. 2000; 1475(3): p. 231-7.

Martinez JJ, Hultgren SJ. Requirement of Rho-family GTPases in the invasion of Type 1 piliated uropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol*. 2002; 4(1): p. 19-28.

Méndez-Ortiz MM, Hyodo M, Hayakawa Y, Membrillo-Hernández J. Genome-wide transcriptional profile of *Escherichia coli* in response to high levels of the second messenger 3', 5'-cyclic diguanylic acid. *J Biol Chem*. 2006; 281(12): p. 8090-8099.

Méndez G, Beren K, Bragagnolo G, O'Callaghan D, Lavigne JP, Keriél A. A high-throughput assay for the measurement of uropathogenic *Escherichia coli* attachment to urinary bladder cells. *Int j experim pathol*. 2016; 97(2): p. 194-201.

Mills M, Meysick K, O'Brien AD. Cytotoxic necrotizing factor type 1 of uropathogenic *Escherichia coli* kills cultured human uroepithelial 5637 cells by an apoptotic mechanism. *Infect Immun*. 2000; 68(10): p. 5869-80.

Miraglia AG, Travaglione S, Meschini S, Falzano L, Matarrese P, Quaranta MG, Viora M, Fiorentini C, Fabbri A. Cytotoxic necrotizing factor 1 prevents apoptosis via the Akt/I κ B kinase pathway: role of nuclear factor- κ B and Bcl-2. *Mol. Biol. Cell*. 2007; 18: p. 2735–2744.

Mittal S, Sharma M, Chaudhary U. Biofilm and multidrug resistance in uropathogenic *Escherichia coli*. *Pathog glob health*. 2015; 109(1): p. 26-29.

Molina J, Cordero E, Palomino J, Pachón J. Aminoglucósidos y polimixinas. *Enferm infec microbiol clin*. 2009; 27(3): p. 178-188

Mossman KL, Mian MF, Lauzon NM, Gyles CL, Lichty B, Mackenzie R, et al. Cutting edge: FimH adhesin of type 1 fimbriae is a novel TLR4 ligand. *J Immunol*. 2008; 181(10): p. 6702-6.

Mulvey MA, Lopez-Boado YS, Wilson CL, Roth R, Parks WC, Heuser J, et al. Induction and evasion of host defenses by type 1-piliated uropathogenic *Escherichia coli*. *Science*. 1998; 282(5393): p. 1494-7.

Mulvey MA, Schilling JD, Hultgren SJ. Establishment of a persistent *Escherichia coli* reservoir during the acute phase of a bladder infection. *Infect Immun*. 2001; 69(7): p. 4572-9.

Mulvey MA. Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*. *Cellular microbiology*. 2002; 4(5): p. 257-271.

Mysorekar IU, Hultgren SJ. Mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli* persistence and eradication from the urinary tract. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006; 103(38): p. 14170-5.

Nadell CD, Xavier JB, Foster KR. The sociobiology of biofilms. *FEMS microbiology Reviews*. 2008; 33(1): p. 206-224.

Naves P, del Prado G, Huelves L, et al. Measurement of biofilm formation by clinical isolates of *Escherichia coli* is method dependent. *J Appl Microbiol*. 2008; 105: p. 585–90.

Neupane S, Pant ND, Khatiwada S, et al. Correlation between biofilm formation and resistance toward different commonly used antibiotics along with extended spectrum beta lactamase production in uropathogenic *Escherichia coli* isolated from the patients suspected of urinary tract infections visiting Shree Birendra Hospital, Chhauni, Kathmandu, Nepal. *Antimicrob Resist In*. 2015; 5: p. 5.

Nicolle L. Resistant Pathogens in Urinary Tract Infections. *J. Am. Geriatr. Soc*. 2002; 50: p. 230-235.

- Norinder BS, Köves B, Yadav M, Brauner A, Svanborg C. Do *Escherichia coli* strains causing acute cystitis have a distinct virulence repertoire? *Microb Pathog.* 2012; 52(1): p. 10-6.
- Nowicki B, Selvarangan R, Nowicki S. Family of *Escherichia coli* Dr adhesins: decay-accelerating factor receptor recognition and invasiveness. *J Infect Dis.* 2001; 183 Suppl 1: p. S247.
- O'Hanley P. Prospects for urinary tract infection vaccines. In: Mobley HLT, Warren JW, (eds.) Urinary tract infections: molecular pathogenesis and clinical management. ASM Press 1996: p. 405–425.
- O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Ann Rev Microbiol.* 2000; 54(1): p. 49-79.
- Old DC. Inhibition of the interaction between fimbrial haemagglutinins and erythrocytes by Dmannose and other carbohydrates. *J Gen Microbiol.* 1972; 71(1): p. 149-57.
- Olipphant CM, Green GM. Quinolones: a comprehensive review. *Am fam phy.* 2002; 65(3): p. 455-464.
- Parnham MJ, Haber VE, Giamarellou-Bourboulis EJ, Perletti G, Verleden GM, Vos R. (2014). Azithromycin: mechanisms of action and their relevance for clinical applications. *Pharmacol therap.* 2014; 143(2): p. 225-245.
- Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev.* 2005; 18(4): p. 657-86.
- Pualomino J, Pachón J. Aminoglucósidos. *Enferm infecc microbiol clin.* 2003; 21(2): p. 105-115.
- Rabin N, Zheng Y, Opoku-Temeng C, Du Y, Bonsu E, Sintim HO. Biofilm formation mechanisms and targets for developing Antibiofilm agents. *Future.* 2015; 7(4): p. 493-512.
- Roberts I, Mountford R, High N, Bitter-Suermann D, Jann K, Timmis K, Boulnois G. Molecular cloning and analysis of genes for production of K5, K7, K12, and K92 capsular polysaccharides in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1986; 168: p. 1228–1233.
- Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby GA, Macielag M, Abbanat D, Park CH, et al. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat Med.* 2006; 12(1): p. 83-8.
- Robino L, Scavone P, Araujo L, et al. Detection of intracellular bacterial communities in a child with *Escherichia coli* recurrent urinary tract infections. *Pathog Dis.* 2013; 68: p. 78–81.
- Robino L, Garcia-Fulgueiras V, Araujo L, et al. Urinary tract infection in Uruguayan children: Aetiology, antimicrobial resistance and uropathogenic *Escherichia coli* virulotyping. *J Glob Antimicrob Re.* 2014a; 2: p. 293–98.
- Robino L, Scavone P, Araujo L, et al. Intracellular bacteria in the pathogenesis of *Escherichia coli* urinary tract infection in children. *Clin Infect Dis.* 2014b; 59:158–64.
- Ronald A. The etiology of urinary tract infection: traditional and emerging pathogens. *Dis Mon.* 2003; 49: p. 71–82.
- Rosen DA, Hooton TM, Stamm WE, Humphrey PA, Hultgren SJ, et al. Detection of intracellular bacterial communities in human urinary tract infection. *PLoS Med.* 2007; 4(12): p. e329.
- Russo TA, Johnson JR. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *J Infect Dis.* 2000; 181(5): p. 1753-4.
- Rueda E, Murcia I. Trastornos de las vías urinarias. En: Quevedo F. El pediatra eficiente. 6ta Ed. Bogotá: Panamericana, 2002.

- Schentag JJ. Clinical significance of antibiotic tissue penetration. *Clinical Pharmacokinetics*. 1989; 16(1): p. 25-31.
- Schilling JD, Lorenz RG, Hultgren SJ. 2002. Effect of trimethoprim- sulfamethoxazole on recurrent bacteriuria and bacterial persistence in mice infected with uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 2002; 70: p. 7042–7049.
- Schlapp G, Scavone P, Zunino P, et al. Development of 3D architecture of uropathogenic *Proteus mirabilis* batch culture biofilms-A quantitative confocal microscopy approach. *J Microbiol Methods*. 2011; 87: p. 234–40.
- Schwartz DJ, Chen S, Hultgren SC, Seed P. Population dynamics and niche distribution of uropathogenic *Escherichia coli* during acute and chronic urinary tract infection. *Infect Immun*. 2011; 79(10): p. 4250-9.
- Sharma VK, Kudva IT, Bearson BL, et al. Contributions of EspA filaments and curli fimbriae in cellular adherence and biofilm formation of entero-hemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *PLoS One*. 2016; 11: e0149745.
- Sivick KE, Mobley HL. Waging war against uropathogenic *Escherichia coli*: winning back the urinary tract. *Infect Immun*. 2010; 78: p. 568–85.
- Song J, Bishop BL, Li G, Grady R, Stapleton A, Abraham SN. TLR4-mediated expulsion of bacteria from infected bladder epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci*. 2009; 106(35): p. 14966-14971.
- Soto SM. Importance of biofilms in urinary tract infections: new therapeutic approaches. *Adv Biol*. 2014; 2014: p. 543974.
- Suárez C, Gudiol F. Antibióticos betalactámicos. *Enferm infecc microbiol clín*. 2009; 27(2): p. 116-129.
- Subashchandrabose S, Mobley HL. Virulence and Fitness Determinants of Uropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr*. 2015; 3(4).
- Stamm WE, Norrby SR. Urinary tract infections: disease panorama and challenges. *J. Infect. Dis*. 2001; 183(1): p. 1–4.
- Steyert SR, Sahl JW, Fraser CM, et al. Comparative genomics and stx phage characterization of LEE-negative Shiga toxin producing *Escherichia coli*. *Front Cell Infect Microbiol*. 2012; 2: p. 133.
- Tice AD. Short-course therapy of acute cystitis: a brief review of therapeutic strategies. *J. Antimicrob. Chemother*. 1999; 43: p. 85-93.
- Tran JH, Jacoby GA. Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99(8): p. 5638-42
- Tran JH, Jacoby GA, Hooper DC. Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance Protein Qnr with *Escherichia coli* DNA gyrase. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49(1): p. 118-25.
- Tseng CC, Huang JJ, Ko WC, Yan JJ, Wu JJ, et al. Decreased predominance of *papG* class II allele in *Escherichia coli* strains isolated from adults with acute pyelonephritis and urinary tract abnormalities. *J Urol*. 2001; 166(5): p. 1643-6.
- Vallet I, Olson JW, Lory S, Lazdunski A, Filloux A. The chaperone/usher pathways of *Pseudomonas aeruginosa*: identification of fimbrial gene clusters (*cup*) and their involvement in biofilm formation. *Proc Natl Acad. Sci. USA*. 2001; 98, 6911–6916.
- Velez Echeverri C, Serna-Higueta LM, Serrano AK, Ochoa-García C, Bedoya AM, et al. Resistance profile for pathogens causing urinary tract infection in a pediatric population, and antibiotic treatment response at a university hospital, 2010-2011. *Colomb Med*. 2014; 45(1): p. 39-44.

Vignoli R, Varela G, Mota MI, Cordeiro NF, Power P, Ingold E, et al. Enteropathogenic *Escherichia coli* strains carrying genes encoding the PER-2 and TEM-116 extended-spectrum beta-lactamases isolated from children with diarrhea in Uruguay. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(6): p. 2940-3.

Vignoli R, Cordeiro N, Seija V, Schelotto F, Radice M, Ayala J, et al. Genetic environment of CTX-M-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolates from hospitalized patients in Uruguay. *Rev Argent Microbiol.* 2006; 38(2): p. 84-8.

Villegas NA, Baronetti J, Albesa I, et al. Relevance of biofilms in the pathogenesis of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* infection. *Scientific World J.* 2013; 607258.

Waksman G, Hultgren SJ. Structural biology of the chaperone-usher pathway of pilus biogenesis. *Nat Rev Microbiol.* 2009; 7(11): p. 765-74.

Wright KJ, Hultgren SJ. Sticky fibers and uropathogenesis: bacterial adhesins in the urinary tract. *Future Microbiol.* 2006; 1, p. 75–87.

Wright KJ, Seed PC, Hultgren SJ. (2007). Development of intracellular bacterial communities of uropathogenic *Escherichia coli* depends on type 1 pili. *Cell microbiol.* 2007; 9(9): p. 2230-2241.

Wurpel DJ, Beatson SA, Totsika M, Petty NK, Schembri MA. Chaperone-usher fimbriae of *Escherichia coli*. *PLoS One.* 2013; 8(1): p. e52835.

Wurpel DJ, Totsika M, Allsopp LP, et al. Comparative proteomics of uropathogenic *Escherichia coli* during growth in human urine identify UCA-like (UCL) fimbriae as an adherence factor involved in biofilm formation and binding to uroepithelial cells. *J Proteomics.* 2016; 131: p. 177–89.

Yamane K, Wachino J, Suzuki S, Kimura K, Shibata N, Kato H, et al. New Plasmid-Mediated Fluoroquinolone Efflux Pump, QepA, Found in an *Escherichia coli* Clinical Isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; 51(9): p. 3354-3360.

Zamani H, Salehzadeh A. Biofilm formation in uropathogenic *Escherichia coli*: association with adhesion factor genes. *Turk J Med Sci.* 2018; 48: p. 1-6

Zhou G, Mo WJ, Sebbel P, Min G, Neubert TA, Glockshuber R, et al. Uroplakin1a is the urothelial receptor for uropathogenic *Escherichia coli*: evidence from in vitro FimH binding. *J Cell Sci.* 2001. 114 (22): p. 4095-103.

7. Anexo

Tabla 1. Resultados de la medida de absorbancia (DO) para cada aislamiento de *E. coli*

Cepa	DO ± DE	Cepa	DO ± DE	Cepa	DO ± DE	Cepa	DO ± DE
3	0,090 ± 0,025	114	0,037 ± 0,009	162	0,084 ± 0,060	207	0,067 ± 0,070
7	0,078 ± 0,146	117	0,064 ± 0,054	164	0,506 ± 0,256	211	0,264 ± 0,105
13	0,134 ± 0,109	118	0,236 ± 0,022	165	0,152 ± 0,032	213	0,019 ± 0,017
28	0,112 ± 0,127	120	0,003 ± 0,075	167	0,130 ± 0,041	214	0,069 ± 0,008
30	0,100 ± 0,040	121	0,103 ± 0,236	168	2,014 ± 0,350	216	0,283 ± 0,055
34	0,073 ± 0,001	127	0,745 ± 0,196	169	0,050 ± 0,026	217	0,042 ± 0,080
38	0,017 ± 0,016	128	0,227 ± 0,079	170	0,143 ± 0,039	218	0,740 ± 0,115
47	0,097 ± 0,347	129	0,657 ± 0,004	171	0,107 ± 0,064	219	1,842 ± 0,624
48	0,076 ± 0,063	130	1,962 ± 0,506	172	0,148 ± 0,026	220	1,030 ± 0,112
55	0,222 ± 0,058	132	0,451 ± 0,196	173	0,496 ± 0,083	221	0,050 ± 0,135
56	0,059 ± 0,011	133	0,050 ± 0,148	174	0,008 ± 0,214	222	0,100 ± 0,063
74	0,029 ± 0,112	135	0,128 ± 0,078	176	0,643 ± 0,232	226	0,038 ± 0,017
75	0,219 ± 0,034	136	0,611 ± 0,241	177	0,076 ± 0,101	227	0,000 ± 0,001
76	0,508 ± 0,283	138	0,109 ± 0,000	178	0,089 ± 0,056	228	0,336 ± 0,124
92	0,603 ± 0,148	140	0,177 ± 0,169	179	0,000 ± 0,080	230	0,802 ± 0,220
94	0,467 ± 0,046	141	0,003 ± 0,080	180	0,019 ± 0,065	231	0,432 ± 0,324
95	0,239 ± 0,047	142	0,178 ± 0,125	182	0,000 ± 0,018	233	0,379 ± 0,220
97	0,965 ± 0,257	143	0,060 ± 0,054	183	0,278 ± 0,276	234	0,101 ± 0,052
98	0,006 ± 0,132	144	1,367 ± 0,018	186	0,040 ± 0,192	235	0,382 ± 0,094
99	0,104 ± 0,006	145	0,070 ± 0,044	188	0,115 ± 0,042	236	0,156 ± 0,129
101	0,036 ± 0,227	147	0,202 ± 0,169	189	0,000 ± 0,031	237	0,591 ± 0,135
102	0,199 ± 0,291	148	0,062 ± 0,027	190	0,075 ± 0,040	239	0,682 ± 0,063
103	0,010 ± 0,052	151	0,267 ± 0,038	191	0,000 ± 0,030	240	0,213 ± 0,017
104	0,076 ± 0,149	152	0,289 ± 0,169	194	0,021 ± 0,229	241	0,678 ± 0,129
105	0,716 ± 0,077	155	0,606 ± 0,121	196	0,278 ± 0,120	243	0,593 ± 0,135
106	3,166 ± 0,587	156	0,079 ± 0,080	197	0,090 ± 0,064	245	0,105 ± 0,087
107	0,388 ± 0,133	157	0,102 ± 0,053	200	0,271 ± 0,046		
108	0,346 ± 0,545	158	0,006 ± 0,035	203	0,233 ± 0,186		
111	1,023 ± 0,030	159	0,000 ± 0,021	204	0,054 ± 0,010		
112	0,619 ± 0,797	161	0,078 ± 0,024	205	0,719 ± 0,461		

DO= densidad óptica; DE= desvío estandar