

BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



**Facultad De Ciencias Químicas
Área de Análisis Clínicos**

**Tesis Profesional
Para Obtener el Título de Químico Farmacobiólogo.**

**Importancia del hallazgo de biofilm en sedimento urinario
originado por bacterias uropatógenas causantes de
infecciones de tracto urinario.**

**Que Presenta
pQ.F.B. Badillo Larios Nallely Sarai**

**Director de tesis
MC. José Ángel Francisco Flores Hernández**

Puebla, Pue.

Agosto 2015

INDICE

MARCOTEÓRICO.....	1
TRACTO URINARIO.....	1
INFECCIONES DE TRACTO URINARIO.....	2
Clasificación de las ITUs.....	4
NUEVOS MECANISMOS DE RELACIÓN ENTRE LOS UROPATÓGENOS Y EN UROEPITELIO.....	5
Comunidades intracelulares bacterianas (IBC o Citólisis bacteriana).....	5
BIOFILM BACTERIANO.....	7
Regulación del proceso de formación del biofilm.....	12
Importancia clínica del biofilm.....	13
Métodos de diagnóstico de ITUs.....	14
Examen general de orina (EGO).....	15
Urocultivo.....	16
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	20
Pregunta central.....	20
JUSTIFICACIÓN.....	21
OBJETIVOS.....	22
Objetivo General.....	22
Objetivos particulares.....	22
HIPÓTESIS.....	23
DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN.....	24
Definición del universo de trabajo.....	24

Tamaño de la muestra.....	24
Tipo de muestreo.....	25
Criterios de selección.....	24
Criterios de inclusión.....	24
Criterios de exclusión.....	25
Definición del grupo control.....	25
Variables y definición de variables.....	25
Manejo estadístico de los datos y pruebas estadísticas.....	25
DIAGRAMA DE TRABAJO.....	26
METODOLOGÍA.....	27
Métodos y sus fundamentos.....	27
Examen general de orina.....	27
Urocultivo.....	28
Técnica de identificación del género y especie.....	29
IDENTIFICACIÓN DE BIOFILM.....	29
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
Grafica 1: Distribución de selección de muestras y género poblacional estudio.....	31
Panel 1. Muestras con agregados bacterianos candidatos a biofilm y muestras marcadas por medio de la técnica de FilmTracer™ SYPRO® Ruby stain.....	33
Grafica 2. Positividad de bacteriuria con biofilm vs género poblacional.....	34

Grafica 3. Positividad de bacteriuria control vs bacteriuria biofilm de acuerdo a edad y género poblacional.....	36
Tabla 5. Análisis físico-químico de grupo bacteriuria control vs. biofilm.....	38
Grafico 6 y 7. Análisis sedimento urinario de grupo de bacteriuria vs grupo biofilm.....	39
Grafico 8. Semicuantificación de biofilm y bacteriuria plantónica en ITUs puras y mixtas.....	41
Grafico 9. Frecuencia de microorganismos aislados en los grupo control y grupo biofilm.....	43
CONCLUSIONES.....	46
BIBLIOGRAFIA.....	47

MARCO TEÓRICO

Tracto urinario

El tracto urinario está formado por los órganos que elaboran y eliminan la orina del cuerpo, la formación y eliminación de la orina son funciones vitales y constituyen uno de los mecanismos más importantes de la homeostasia.^{1,2}

El tracto urinario inicia con los riñones, que se ubican detrás del peritoneo parietal, situados a cada lado de la columna, están formados por los cálices, la pelvis renal, la vejiga y el uréter. Los cálices renales son tubos membranosos fijos por su extremo externo alrededor de la base de cada una de las papilas o cálices menores. La pelvis renal, es una cavidad que ocupa la parte posterior del pedículo renal y se continúa con el uréter; el cual es un conducto que desciende desde los riñones, por la parte posterior de la cavidad abdominal hasta penetrar en la vejiga a través del meato uretral en el ángulo externo del triángulo vesical, carece de esfínter y el único mecanismo valvular está dado por su entrada oblicua a la vejiga y la pared vesical que impiden el flujo retrogrado durante la contracción vesical.^{1,2}

La vejiga es un receptáculo situado detrás de la sínfisis púbica, delante del recto, encima del suelo de la pelvis y de la próstata; constituido de músculo membranoso tapizado de epitelio y rodeada de tejido celular laxo, destinado a recoger la orina y a conservarla hasta su evacuación; en la base el triángulo vesical, presenta tres orificios; dos en ángulos posteriores corresponden a los uréteres y en el ángulo anteriorinferior el que comunica con la uretra.^{1,2}

Finalmente la uretra es un conducto que comunica el piso de la vejiga con el exterior por el cual sale la orina, presenta un revestimiento interno de mucosa. En la mujer está situada por detrás de la sínfisis púbica, por delante de la vagina y es de corta longitud. En cambio en el hombre atraviesa inmediatamente debajo de la vejiga, por el centro de la próstata, después entre dos láminas de tejido fibroso blando que unen los huesos del pubis, y después cursa por el pene, por tres porciones: la prostática, la membranosa y la cavernosa. El orificio que comunica la uretra con el exterior se llama meato urinario.^{1,2}

Infecciones de tracto urinario

Las infecciones del tracto urinario (ITUs) son padecimientos ocasionado por la colonización, invasión y multiplicación de microorganismos patógenos en el tracto urinario con o sin sintomatología clínica.³ Por definición las ITUs se consideran como tal desde el momento en que las bacterias se presentan y multiplican en las vías urinarias más allá de la uretra anterior y es aquí donde comúnmente comienza la sintomatología clásica de la patología, además el diagnóstico debe considerar la respuesta del hospedero, es decir, la descamación epitelial y respuesta inmunológica. El origen bacteriano de la ITU es el más frecuente (80%-90%); en este caso, la definición exacta exige no solo la presencia de bacterias en las vías urinarias, sino también su cuantificación. La migración de bacterias hasta la vejiga es favorecida por factores mecánicos y químicos.⁴ Las ITUs representan una de las patologías más frecuentes en la población, predominando en el sexo femenino y afectan a cualquier edad, desde recién nacidos hasta ancianos³, de elevada morbilidad, en muchos casos recurrente o pueden ocasionar complicaciones graves como sepsis o secuelas importantes.⁴

Las ITUs son comunes entre mujeres sanas aun cuando el tracto urinario es normal, anatómica y fisiológicamente. Se sabe que hasta el 40% de las mujeres desarrollarán UTI por lo menos una vez durante su vida y un número significativo de estas mujeres tienen ITUs recurrentes. Los hombres también padecen ITUs, aunque la incidencia es mucho más baja (3 veces menos frecuente). La mayoría de estos episodios son parecidos a cistitis, pero algunos de ellos pueden llegar a complicarse en pielonefritis aguda. La frecuencia de cistitis aguda en la población de Europa es de 0.5-0.7 episodios por persona al año, representando una fuente de morbilidad y alto costo en estas poblaciones.³ En Estados Unidos en el año 2011 se calcula que las ITUs representan más de 7 millones de consultas por año, a un costo de más de \$1 mil millones de dólares.³

Las ITUs constituyen un problema importante de salud pública, de hecho son una de las infecciones bacterianas más frecuentes; siendo *Escherichia coli* el patógeno causante en más del 80% de todos los casos de infecciones urinarias vistos en

pacientes ambulatorios.³ Algunos de los factores predisponentes en ITUs complicadas son defectos anatómicos, reflujo retro-vesicular, obstrucciones, cirugías, padecimientos metabólicos como la diabetes e inmunosupresión generalizada especialmente en pacientes con trasplantes.^{4, 5}

Hay dos rutas importantes para que una bacteria pueda invadir y colonizar el tracto urinario, una es la ascendente (la vía más común) y la otra es la vía hematógena; aunque existe evidencia acerca de que la vía linfática y la comunicación entero-vesical pueden ser otra vía de infección. La vía ascendente se da cuando la flora normal del intestino, se asientan en tracto urinario y desplaza la flora normal; finalmente bacterias como *Escherichia coli* particularmente la cepa conocida como uropatogena (UPEC) es causante de ITUs agudas y recurrentes, la uretra es la puerta de entrada para que estos patógenos asciendan a vejiga, una vez dentro depende de género y especie del microorganismo, el tamaño del inóculo y la adecuación de la respuesta del sistema inmunológico del hospedero. Una vez que la bacteria ha ascendido a vejiga, las bacterias pueden multiplicarse y subir hacia los uréteres, particularmente si el reflujo vesicouretral está presente.⁶

Las ITUs son ocasionadas por gran variedad de bacterias, sin embargo actualmente las formas de invasión y/o asociación bacteriana son determinantes para la progresión de la infección, en la tabla se aprecian las especies más comunes.⁷

Tabla 1. Frecuencia de bacterias causantes de ITUs

Patogenicidad en el tracto urinario	Frecuencia (por ciento de los aislamientos)			
	Común >10%	Bastante común 1-10%	Poco común 0.1-1%	Raro <0.1%
Patógenos primarios	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>		<i>Escherichia coli</i> dependiente de CO ₂ <i>Leptospira</i> sp <i>Mycobacteria</i> sp, <i>Corynebacterium urealyticum</i> , <i>Haemophilus</i> spp. <i>Pneumococcus</i>
Patógenos secundarios		<i>Enterobacter</i> sp. <i>Enterococcus</i> sp, <i>Klebsiella</i> spp. <i>Proteus mirabilis</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Citrobacter</i> sp. <i>Moraxella morgani</i> , <i>Proteus vulgaris</i> <i>Serratia</i> sp <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Acinetobacter</i> sp <i>Pseudomonas</i> spp. <i>Stenotrophomonas</i>	
Usualmente parte de flora uretral o genital		<i>Streptococcus</i> α-hemolíticos Lactobacilos	<i>Bifidobacterium</i> sp	

(7 Fuente: *European Urinalysis Guidelines*)

Los mecanismos de patogenicidad son muchos, como: los flagelos y la motilidad (los cuales están involucrados en el primer contacto de la bacteria y la superficie celular), las fimbrias entre ellas la *curli*, proteínas autotransportadoras (logran salir de citoplasma y ayudan a la movilización de nutrientes y desechos), pilis de conjugación (permiten el traspaso de información genética, como la resistencia a antibióticos) y producción de exopolisacáridos.⁸

Para el particular caso de los mecanismos de virulencia de *E. coli* (UPEC) que favorecen las ITUs recurrentes están:

- La adhesión bacteriana: permiten la adsorción a superficies epiteliales dificultando su eliminación.
- La formación de biofilms bacterianos: capacidad para organizarse y agregarse en una comunidad.
- La resistencia antimicrobiana: conduce a dificultar la erradicación con tratamientos tradicionales
- Presencia de antígenos superficiales (O, H, K): confieren resistencia a la fagocitosis, al poder bactericida del suero.⁹

Clasificación de las ITUs

De manera tradicional las ITUs son clasificadas basadas en síntomas, datos de laboratorio y hallazgos microbiológicos. De manera práctica se pueden clasificar en no complicadas, complicadas y sepsis.⁴

Hoy se considera que las ITUs son una suma de parámetros que determinan la clasificación y la valoración de la severidad. La primera corresponde a la presentación clínica, esta puede ser: Uretritis, cistitis, pielonefritis, urosepsis y órganos genitales masculinos; el parámetro que se suma a continuación es el grado de severidad, esta incluye cistitis baja, pielonefritis moderada, pielonefritis establecida severa, urosepsis con respuesta sistemática, urosepsis con disfunción del órgano y urosepsis con falla del órgano; a estos se agregan los factores de

riesgo, y finalmente se identifican los patógenos involucrados esto incluye especie y grado de susceptibilidad.⁴

Otras formas de ITUs complicadas son las asociadas a catéteres en la cual la formación de biofilm debe ser considerada, en tal caso la terapia antimicrobiana solo es efectiva en etapas tempranas.⁵ Otro caso específico de ITUs complicadas se encuentra en pacientes con lesión de la médula espinal. En estos casos se sospecha de retención de orina, y es necesaria una evaluación completa del estado urodinámico para valorar la función vesical. La prioridad es garantizar el drenaje adecuado de la vejiga para proteger el tracto urinario. En general se acepta que la bacteriuria asintomática en pacientes con lesión de la médula espinal no debe ser tratada, incluso en los casos de la cateterización intermitente. Para los episodios sintomáticos de infección en los pacientes con lesión de la médula espinal, sólo unos pocos estudios han investigado el agente antimicrobiano más adecuado y la duración de la terapia.¹⁰

Nuevos mecanismos de relación entre los uropatógenos y en uroepitelio.

Hoy en día hay una gran lista de los mecanismos de virulencia desarrollados por distintos uropatógenos. Uno representado por los uropatógenos que han desarrollado una cascada patogénica intracelular que culmina en la formación de comunidades bacterianas intracelulares (IBC por sus siglas en inglés) en el uroepitelio.¹¹ Otro mecanismo sobresaliente es que formación de comunidades tipo biofilm sobre superficies bióticas y abióticas tales como catéteres.

Comunidades intracelulares bacterianas (IBC o Citólisis bacteriana)

En las ITUs existen paradigmas con respecto a la patogénesis que han cambiado dramáticamente como resultado de las recientes revelaciones científicas. Más allá de la colonización de la superficie luminal de la vejiga (pensamiento clínico tradicional), las bacterias uropatógenas dirigen una compleja cascada de eventos que inicia con la adherencia e internalización en el uroepitelio y continúa con la multiplicación y evasión de los mecanismos de respuesta del huésped. Después de la invasión epitelial, muchos organismos son rápidamente expulsados por las

células epiteliales de vejiga; una minoría llega a establecer un nicho en el citoplasma que resulta en el desarrollo de comunidades bacterianas intracelulares (IBC) y sirve como el lugar principal de la expansión bacteriana. La exfoliación de la capa epitelial superficial actúa para reducir la carga bacteriana, pero facilita residencia crónica de pequeños nichos de bacterias que posteriormente pueden reaparecer y causar algunos episodios de cistitis recurrente, un escenario familiar clínico en mujeres sanas.¹²

En el establecimiento de la IBC hay distintas etapas, la primera de ellas es la adhesión y la invasión epitelial, la expresión de factores de virulencia bacteriana juega un rol muy importante en la agresión al uroepitelio e incluyen: adhesinas, toxinas, lipopolisacáridos y cápsula, activando receptores celulares Toll-Like (TLR's) los cuales expresan como resultado de señales proinflamatorias intracelulares (NF-κB, citocinas, quimiocinas, interleucinas). En la etapa de adhesión la proteína Fim H es esencial, una vez adherida la bacteria puede internalizarse en la célula, en este punto uno de los mecanismos de defensa del huésped es la descamación, que si bien puede eliminar algunas de las bacterias, también da oportunidad a que estas se internalicen en capas más profundas, una vez establecida la bacteria procede a la formación de nichos celulares (IBC), se ha descubierto que en esta fase las bacterias realizan dos ciclos, cuando las bacterias ya tienen un nicho bien establecido y proliferan dentro de la célula; estas terminan por lisis a la célula; esto con el propósito de infectar a células vecinas, en este punto el mecanismo de evasión que se ha detectado en distintas especies es el de la filamentación, con lo cual evitan ser fagocitadas por los leucocitos gracias a su gran tamaño; hasta este punto se considera como la fase aguda del proceso.¹³

Una vez que este proceso está bien establecido, encontramos la fase estacionaria en la cual encontramos células uroteliales, producto de la exfoliación y regeneración del área, que presentan vesículas que contienen a los uropatógenos, estas estructuras se conocen como: reservorios quiescentes intracelulares (QIRs). Esto coloca a la infección en un estado latente. En ensayos realizados en ratones se ha detectado que el QIR permanecía por meses y es resistente a la antibioticoterapia,

esto es un indicio del porqué las ITUs son recurrentes, ya que el sistema inmune del hospedero parece no reconocer o erradicar las QIR.¹²

El establecimiento de las IBC y QIR, así como la multiplicación de las mismas en el uroepitelio, es el fenómeno reconocido como citólisis bacteriana (CB).¹³

Se ha descrito que al considerar la CB y modificando la técnica de urocultivo se mejora en una 65.9% el recuento real de UFC/mL, por otro lado se ha evidenciado que la CB es un mecanismo de evasión inmunológico, ya que el 85.4% de los pacientes reportaron resultados dentro de los límites biológicos de referencia en el recuento leucocitario por campo en el examen general de orina (EGO), además se sugiere que el despistaje semicuantitativo de bacterias en el EGO sin considerar CB, reduce en un 77.8% el diagnóstico de ITUs.¹³

BIOFILM BACTERIANO

El biofilm es definido como comunidades de microorganismos irreversiblemente adheridas a una superficie que producen sustancia polimérica extracelular (SPE) y que exhiben un estado metabólico alterado comparado al crecimiento planctónico correspondiente, especialmente con respecto a la transcripción y las interacciones entre las células.¹⁴

Estudios recientes han sugerido que la organización espaciotemporal del biofilm y la formación de distintas subpoblaciones bacterianas son importantes para el proceso de desarrollo y características fenotípicas de un biofilm maduro. La arquitectura final del biofilm ha sido presentada por diversas especies bacterianas y cepas, sin embargo esta varía ampliamente, lo que sugiere que el desarrollo del biofilm es un proceso específico en gran medida resultado de tensión y del medio ambiente.¹⁵

Estudios llevados a cabo mediante la aplicación de técnicas microscópicas permitieron determinar que la mayoría de los biofilms exhiben arquitecturas complejas y muy heterogéneas. Dependiendo especialmente de la bacteria y de las condiciones de crecimiento, ha sido factible detectar mediante microscopía de

escaneo láser confocal la formación de estructuras tridimensionales constituidas por distintos arreglos celulares en permanente interacción con las sustancias poliméricas extracelulares que los mismos microorganismos sintetizan y liberan. Por lo general, estas estructuras tipo hongo, observadas en biofilms formados por *P. aeruginosa*, se intercalan con zonas abiertas en las cuales se forman canales de flujo que permiten la incorporación de nutrientes a las células, asimismo permiten la liberación de productos metabólicos y desechos. Tanto los nutrientes como los compuestos producidos por las células difunden dentro y fuera de las microcolonias a través de distintas capas o estratos que las componen.¹⁶

El desarrollo de un biofilm microbiano tiene lugar mediante una serie de etapas perfectamente reguladas. Mientras que el mecanismo molecular involucrado en este proceso de desarrollo puede diferir de un organismo a otro, las etapas de construcción de un biofilm estarían conservadas en un amplio rango de microorganismos. Dichas etapas son:¹⁵

- 1) Adhesión de células a una superficie biótica o abiótica
- 2) Crecimiento y agregación de células formando microcolonias
- 3) Maduración del biofilm
- 4) Mantenimiento de la estructura del biofilm
- 5) Desprendimiento de células de la estructura para colonizar otros ambientes

Figura 1: La maduración del biofilm es un proceso complejo que involucra cinco etapas

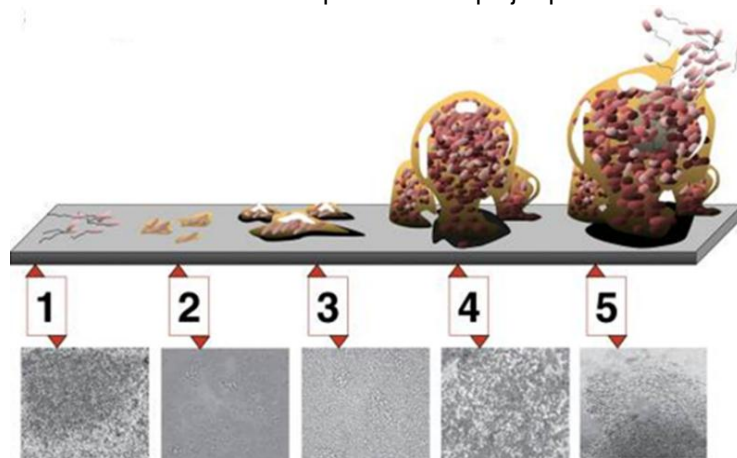


Imagen de: Monroe D. Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms. PLoS Biol. 2007 Nov;5(11):e307.

Cada una de las etapas del establecimiento del biofilm está compuesta por diversos mecanismos descritos a continuación.

a) Adhesión de células a una superficie biótica o abiótica

Los biofilms bacterianos comienzan a formarse cuando células individuales se adhieren a una superficie. La capacidad de las bacterias para ejecutar esta etapa depende de la presencia de ciertos factores de adherencia cuya expresión depende de factores ambientales como son la temperatura, el pH, la fuerza iónica y las condiciones nutricionales, como así también de las propiedades del sustrato. Se ha demostrado que las características fisicoquímicas del ambiente y del sustrato son importantes en la adsorción reversible de la bacteria, mientras que los factores de adhesión propios de las bacterias son generalmente necesarios para conseguir la adherencia irreversible al soporte.¹⁶⁻¹⁸

En bacterias Gram negativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*) se ha visto que los flagelos, las fimbrias de tipo I, IV y los curli son importantes para la etapa de adherencia primaria⁶. La motilidad parece ayudar a la bacteria a alcanzar la superficie y contrarrestar las repulsiones hidrofóbicas. Sin embargo, aunque la motilidad ayuda al proceso no parece ser un requisito esencial, pues muchas bacterias Gram positivas inmóviles como estafilococos, estreptococos y micobacterias son capaces de formar biofilm. En el caso de las bacterias Gram positivas se ha descrito la participación de proteínas de superficie (AtIE, Bap, Esp) en esta etapa de adherencia primaria.¹⁶⁻¹⁸

Rebecca Munk demostró en el 2009 que el fenotipo mostrado en los biofilm de *E.coli* de la cepa K-12 está mediado por la proteína Ag43, la cual es parte de un grupo de proteínas autotransportadoras, denominadas SAAT, las cuales son mediadoras de la autoagregación, floculación y formación del biofilm.¹⁶ Otro factor indispensable es la fimbria F9 la cual se ha determinado que confiere la habilidad de mediar en los uropatógenos un crecimiento denso y uniforme que llega a cubrir de manera uniforme hasta 20µm en una superficie celular. Con respecto a esa fimbria, se ha determinado que los genes que la codifican tienen gran similitud con los que

codifican para la fimbria tipo 1 y la fimbria F1C; además que la secuencia genómica de las Fimbria F9 ha sido detectada intacta en distintas cepas de *E.coli*.¹⁸

b) Crecimiento y agregación de células formando microcolonias

Una vez que la bacteria se ha adherido a la superficie, comienza a dividirse y las células hijas se extienden alrededor del sitio de unión, formando una microcolonia similar a lo que ocurre durante el proceso de formación de colonias en placas de agar. En el caso de *P. aeruginosa* se ha descrito que la adhesión inicial provoca cambios importantes en la expresión de factores vinculados con la conformación de microcolonias las que gracias a un fenómeno de coalescencia forman el biofilm. Por ejemplo, se determinó que luego de la adhesión, la expresión de flagelos disminuye, mientras que la expresión de fimbrias tipo IV se incrementa, con lo cual las bacterias se desplazarían sobre el soporte, favoreciéndose de este modo el reclutamiento e interacción entre ellas. Estos sucesos serían esenciales para el desarrollo de microcolonias. En otros casos la formación de microcolonias ocurre por medio de eventos de división bacteriana donde las células hijas se extienden cerca del sitio de adhesión inicial.¹⁶

c) Maduración y mantenimiento de la estructura del biofilm.

En una etapa posterior la bacteria comienza a secretar exopolisacaridos que constituyen la matriz del biofilm y forman estructuras similares a setas (mushrooms) entre las cuales se observa la presencia de canales.¹⁸ La composición del exopolisacárido es diferente en cada bacteria y varía desde alginato en *P. aeruginosa*, celulosa en *S. typhimurium*, un exopolisacárido rico en glucosa y galactosa en *V. cholerae*, poly-N-acetilglucosamina en *S. aureus*, etc. Además, estudios recientes han puesto de manifiesto que incluso una misma bacteria, dependiendo de las condiciones ambientales en las que se encuentre, puede producir distintos exopolisacáridos como componentes de la matriz del biofilm. Así, algunas cepas de *P. aeruginosa* son capaces de producir además de alginato un polisacárido rico en glucosa que forma una película en la interfase medio-aire al que se ha denominado "Pellican".¹⁹ Sin embargo de los diferentes exopolisacáridos que

han sido descritos, la celulosa y el poli-1,6- β -N-acetilglucosamina son los componentes más comunes del biofilm en las distintas especies bacteriana.¹⁵

En esta etapa la producción y secreción de exopolisacáridos es esencial para la construcción y el mantenimiento de las estructuras tridimensionales tipo hongo que caracterizan a ciertos tipos de biofilms bacterianos. Estas estructuras delimitan, en los biofilms maduros la formación de canales a través de los cuales circulan nutrientes como así también desechos generados a partir del metabolismo de la comunidad microbiana.²⁰

d) Desprendimiento de células de la estructura para colonizar otros ambientes

Finalmente, algunas bacterias de la matriz del biofilm se liberan del mismo para poder colonizar nuevas superficies cerrando el proceso de desarrollo de formación del biofilm. La liberación de las bacterias desde el biofilm es el proceso que menos se conoce. En el caso de *Staphylococcus aureus* se ha descrito un proceso de variación de fase producido por la inserción reversible de un elemento de inserción (IS256) en el interior del operón icaADBC responsable de la síntesis del exopolisacárido del biofilm. El proceso de inserción del elemento parece ocurrir aleatoriamente en la población con una frecuencia de 10^{-6} y produce bacterias deficientes en la síntesis del exopolisacárido y por tanto deficientes en la formación del biofilm. Esto permite a la bacteria mantener un pequeño porcentaje de la población incapaz de sintetizar el exopolisacárido y que puede escapar del biofilm. Como la inserción es un proceso reversible, el salto del IS desde el operón ica provocará una nueva variación de fase.¹⁴ Otra alternativa descrita en *S. aureus* consiste en la obtención de variantes deficientes en la formación del biofilm debido a la eliminación de una isla de patogenicidad que contiene elementos esenciales para el proceso de formación del biofilm.²¹ Ciertos estudios indican que en *P. aeruginosa* la disponibilidad de nutrientes cumpliría un rol substancial en la liberación de bacterias de la matriz y por ende en la dispersión del biofilm, a través de la regulación de la expresión del flagelo y fimbria tipo IV. Justamente, cambios nutricionales provocarían un aumento de la síntesis de flagelos y una disminución de la expresión de fimbria tipo IV, contrariamente a lo que sucede durante la

formación de microcolonias, causando una disminución de la adherencia de las células entre sí y con la superficie como así también un aumento de su movilidad, lo que favorecería en consecuencia el desprendimiento de bacterias de la estructura del biofilm.¹⁵

Regulación del proceso de formación del biofilm

Numerosas evidencias experimentales sugieren que el proceso de formación del biofilm está complejamente regulado. Posiblemente, el mecanismo más ampliamente conocido vinculado a la construcción y maduración de biofilms es el sistema de *Quorum Sensing*.¹⁵ Este es un mecanismo de comunicación celular dependiente de la densidad poblacional a través del cual las bacterias regulan la expresión de una gran variedad de genes relacionados con el control de diferentes procesos celulares. Este es un mecanismo de regulación dependiente de la acumulación en el medio ambiente de una molécula señal, o un autoinductor, que permite a la bacteria sentir la densidad de población existente. En bacterias Gram negativas el principal autoinductor es acilhomoserin lactona, mientras que en bacterias Gram positivas el autoinductor suele ser uno o varios péptidos. Cuando en el medio extracelular se acumula una suficiente cantidad del autoinductor, éste activa un receptor específico que altera la expresión de genes afectando a distintos fenotipos.¹⁴

Además del *quorum sensing*, otros reguladores globales como CsrA en *E. coli*, CytR de *Vibrio cholerae*, se ha demostrado que son determinantes importantes para el desarrollo de biofilm de estas bacterias. En *S. aureus*, se ha demostrado que un regulador global de virulencia denominado SarA es esencial para el desarrollo del biofilm de esta bacteria. Como demostró Plinio Lázaro en el 2010 resulta que un regulador de virulencia es a su vez un regulador de la formación del biofilm, sirviendo de conexión entre ambos procesos²².

Finalmente, parece lógico que la formación de biofilm se produzca en respuesta a las condiciones ambientales y por tanto que existan sistemas de fosfotransferencia de dos-componentes (two-component systems) que transmitan la señal ambiental

al interior de la bacteria para adecuar la expresión de genes a la nueva situación ambiental.

Importancia clínica del biofilm

Los padecimientos en los que está envuelto el biofilm son generalmente crónicos y de difícil tratamiento, debido a que, como ya se mencionó, las bacterias en biofilm son más resistentes que las de vida planctónica.²¹

Una gran cantidad de bacterias pueden vivir en complejos silentes, referidos como biofilm, estas compactas asociaciones microbianas frecuentemente confieren ciertas ventajas a la población microbiana como lo son: resistencia a los antibióticos, evasión de la inmunidad y resistencia en general a la agresión y cambios de su medioambiente.²³

Hoy se sabe que mientras que las infecciones agudas pueden ser eliminadas por antibióticos, las infecciones por biofilms normalmente no consiguen ser completamente eliminadas, persistiendo en el huésped y produciendo episodios recurrentes. Esto ocurre probablemente debido a que las bacterias del biofilm pueden ser hasta 1000 veces más resistentes a los antibióticos que las mismas crecidas en cultivos líquidos.²⁴

A continuación se detallan algunas hipótesis que han sido planteadas para explicar la resistencia bacteriana en biofilms:

- 1) La matriz producida y secretada por las bacterias sésiles actuaría como una barrera de difusión física y química previniendo la penetración de los antibióticos. Asimismo, las matrices que generalmente se encuentran cargadas, funcionarían como resinas de intercambio iónico las cuales serían capaces de unir a las moléculas grandes y con cargas correspondientes a los antibióticos que intentan alcanzar las células contenidas en ellas.
- 2) La presencia de enzimas capaces de degradar antibióticos como las β -lactamasas quedarían inmovilizadas en la matriz del biofilm, de manera tal que

al difundir los antibióticos encontrarían en su camino a las enzimas que los inactivarían con mayor efectividad.

- 3) El crecimiento de las bacterias, dentro de la estructura del biofilm, estaría disminuido debido a la limitación de nutrientes. Como consecuencia, los antibióticos serían menos efectivos ya que su actividad es mayor en células que se dividen rápidamente. En ciertos casos el crecimiento lentificado estaría asociado a la expresión de factores de resistencia.
- 4) Cambios fisiológicos asociados con la transición de las bacterias desde un estilo de vida planctónico a sésil y la aparición de un fenotipo específico de biofilm podrían promover el desarrollo de nuevos mecanismos de resistencia a los antibióticos.
- 5) Dentro de una población bacteriana surgen subpoblaciones con distintos genes que no son operativos mientras no se produzca una eventualidad, la cual es superada gracias a la activación de estos genes. Dichas eventualidades incluyen la aparición de un nuevo producto tóxico o la desaparición de un nutriente habitual.¹⁵

Métodos de diagnóstico de ITUs

Un análisis de orina se debe realizar siempre sobre la base de la necesidad médica, con controles apropiados para diversas poblaciones clínicas y presentaciones; deben ser determinados por el análisis de costo/beneficio. La referencia para los exámenes de orina detallados deben incluir una descripción adecuada del tipo de muestra, y debe informar al laboratorio de la necesidad clínica con el fin de facilitar la selección correcta de los procedimientos de examen y la interpretación de los resultados.⁷

La guía europea de uroanálisis maneja las indicaciones médicas para el análisis de orina, ya que las mediciones en orina pueden ayudar en el diagnóstico de varios parámetros como el endocrino, metabólico y enfermedades hereditarias, el embarazo, drogas de abuso, etc.; la mayoría de los cuales no son tomados en cuenta, ya que los estudios se centran principalmente en enfermedades de los

riñones y tracto urinario, en la siguiente tabla podemos ver bajo qué casos está indicado el análisis de orina.²⁵

Tabla 2.Indicaciones médicas para el uroanálisis

-
- (1) La sospecha o seguimiento de los síntomas o situaciones que sugiere la posibilidad de una infección del tracto urinario
 - (2) La sospecha o seguimiento de las enfermedades no infecciosas renal, ya sea primaria o secundaria a enfermedades sistémicas, como las enfermedades reumáticas, hipertensión, toxemia del embarazo, efectos adversos de los fármacos
 - (3) La sospecha o el seguimiento de la enfermedad no infecciosa post-renal
 - (4) La detección de glucosuria de los grupos de pacientes específicos, por ejemplo, los individuos hospitalizados por diversas emergencias médicas, o de mujeres embarazadas
 - (5) El seguimiento de sólo determinados pacientes con diabetes mellitus, por ejemplo, niños en el hogar, para detectar en la mañana glucosuria y cetonuria, además de los niveles de glucosa en sangre
 - (6) La detección o seguimiento de determinados estados metabólicos, por ejemplo, los vómitos y la diarrea, acidosis / alcalosis, cetosis, o la formación recurrente de cálculos urinarios
-

(7) European Urinalysis Guidelines

Es por esto que la recolección apropiada de orinas frescas deba tener el respaldo de una técnica de laboratorio bien efectuada, para lograr un buen diagnóstico, tratamiento y control del paciente.⁷

Los métodos más usuales para el diagnóstico de procesos infecciosos de tracto urinario son el EGO y el urocultivo.

Examen general de orina (EGO)

El EGO es parte fundamental en el diagnóstico urológico, constituye un examen de fácil ejecución, de bajo costo, por lo que permite diagnosticar situaciones tales como síndrome nefrítico, infección urinaria, insuficiencia renal crónica, etc. Aunque no permite establecer la etiología o patogenia de la enfermedad, da una buena orientación general. Hay que tener en cuenta que puede ser normal en presencia de enfermedad. Las premisas a tomar en cuenta en el examen es:

- Recolección apropiada para cada examen

- Orina fresca
- Sedimento y examen químico completo ²⁵

Para que los datos del EGO sean precisos, es esencial que la orina sea examinada dentro de las dos horas siguientes a su recolección, se pueden usar fijadores o preservativos adecuados, siempre y cuando se entiendan claramente sus efectos sobre la orina y sobre los ensayos en ella realizados.⁷ Este procedimiento se compone de tres partes:

1) Un análisis macroscópico, en el cual la turbidez sería un marcador directo de la cantidad relativa de elementos formes presentes en la muestra, mismos que pudieran indicar la presencia de microorganismos y/o la respuesta inflamatoria o descamativa del huésped, por lo que es un parámetro que indicaría una probable ITU.

2) La evaluación de las características fisicoquímicas, donde la determinación de pH podría orientar hacia ciertas patologías microbianas (pH alcalinos siguieren ITUs urealíticas), así como nitritos y esterasa leucocitaria, podrían indicar la presencia de bacterias y su consecuente respuesta inflamatoria.

3) El examen microscópico del sedimento en campo claro o contraste de fases. Este análisis puede establecer mediante la observación, el tipo y características del uroepitelio, la zona que pudiera estar desarrollándose el proceso de colonización bacteriana. La presencia de bacteriuria tendrá que ser semicuantificada y cobrará importancia el determinar si está presente en forma planctónica o está en desarrollo de vida comunitaria. También es de considerar la presencia de leucocitos y su actividad o capacidad fagocítica (piocitos); la presencia de cristales amónicos (fosfatos y uratos amónicos) puede sugerir infecciones por microorganismos urealíticos; también el incremento de la proteína de Tamm Horsfall y su polimerización, es un marcador de la probable presencia de estímulos inflamatorios producidos en una ITU.²⁶

Urocultivo

El procesamiento del urocultivo exige el conocimiento previo de ciertos datos concernientes a la muestra y al paciente. Es importante enfatizar de donde proviene la muestra, para que el estudio pueda descartar o documentar una bacteriuria significativa, y debería incluir el cultivo cuantitativo de la orina, como así también el análisis del sedimento y eventualmente la realización de tinciones específicas.²⁷

La siembra debe realizarse de orina sin centrifugar con un asa calibrada de 0.001ml lo cual se traduce en que cada colonia está compuesta de 1,000 UFC/mL, lo que permitirá obtener una estimación semicuantitativa del desarrollo microbiano.²⁸

Existen numerosos medios de cultivo para sembrar una muestra de orina. La elección del medio de cultivo debe contemplar el costo-beneficio, de modo de elegir la opción que permita la recuperación de la mayoría de los patógenos con el menor costo posible. Para tal fin, se debe tener en cuenta que el 70-80% de los urocultivos enviados al laboratorio resultan "negativos". El 85-90% de las infecciones urinarias son producidas por enterobacterias, y los Gram positivos que se aíslan con mayor frecuencia son "enterococos" y "estafilococos".²⁹ En la tabla 3 se pueden resumir los objetivos del urocultivo según la Guía Europea del Uroanálisis.

Tabla 3. Los objetivos del cultivo de orina bacteriana

-
- (a) Identificar los agentes etiológicos de la infección del tracto urinario, es decir, los agentes patógenos pertinentes
 - (b) Estimar la concentración de bacterias
 - (c) Ofrecer pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos
 - (d) Para seguir el tratamiento antimicrobiano durante el curso de la infección y/o postratamiento
-

(7) European Urinalysis Guidelines

Finalmente la interpretación del cultivo, resulta útil recordar cuales son las posibilidades de éxito al asumir la presencia de una ITU cuando se relaciona el

recuento de colonias con los síntomas. En 1956 Kass dio a conocer las cifras para la valoración del número de unidades formadoras de colonias (UFC) y su interpretación, los cuales son utilizados para establecer la existencia o no de ITU, en función del número de UFC/ml en el urocultivo realizado a partir de la orina obtenida por micción media directa o bolsa adhesiva, tras la limpieza cuidadosa con agua y jabón de los genitales externos. Estas técnicas de recolección llevan implícita la existencia de una contaminación con flora bacteriana uretral, vulvar o prepucial.³⁰

- En paciente sintomático, un solo cultivo urinario de un agente patógeno habitual en las ITUs, con más de 100.000 UFC/ml indica una probabilidad de infección del 80%. Si dos urocultivos presentan recuentos iguales o superiores a 100.000 UFC/ml del mismo germen, la probabilidad de infección es del 96%. Si son tres los urocultivos con recuentos iguales o mayores a esta cifra, la probabilidad de infección es del 99%.²⁷
- Recuentos inferiores a 10.000 UFC/ml se consideran indicativos de contaminación fisiológica.²⁹
- Los recuentos intermedios, más de 10.000 y menos de 100.000 UFC/ml, se consideran como sospechosos de infección y obligan a la realización de nuevas determinaciones.²⁹
- La ITU es habitualmente monobacteriana, por lo que urocultivos con dos o más gérmenes deben ser considerados como contaminados y no significativos, aunque el recuento sea superior a 100.000 UFC/ml.²⁹

Durante más de cuatro décadas las cifras de los criterios de Kass han constituido el pilar de valoración de todos los analistas, aun a pesar de que en bastantes ocasiones no coincidían con la clínica. Estas discrepancias fueron el motivo principal para que se iniciara un estudio a escala internacional en busca de una mejor correlación. A partir de 1992 y después de 8 años de recogida de datos a cargo de varios grupos internacionales, estas cifras han sido considerablemente modificadas por el Comité de Expertos de la Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas. En infecciones urinarias no complicadas los recuentos han descendido

marcadamente, mientras que se mantienen para las infecciones complicadas, en especial para los pacientes portadores de sondas (tabla 4).²⁹

La principal recomendación para que estas nuevas cifras expresen todo su valor predictivo, tienen que correlacionarse siempre con el número de células inflamatorias presentes en la orina (leucocituria). Además estas nuevas cifras se ajustan mucho más a la realidad clínica, aunque complican bastante la labor al analista. Y más que nunca una recolección adecuada de la muestra y la rapidez en el análisis, adquieren importancia trascendental.³¹

Tabla 4. Nuevo concepto de bacteriuria significativa

Modalidad clínica	UFC/mL
Cistitis simple	> 100
Cistitis hemorrágica	> 100
Cistitis recurrente	> 100
Pielonefritis aguda	> 1000
Prostatitis aguda	Cualquier recuento de Enterobacterias
Bacteriuria asintomática	> 100.000
Infecciones complicadas	> 100.000
Bacteriuria del catéter	> 100.000

(29) Littlewood, J. M., S. I. Jacobs

Las bacterias uropatógenas en las infecciones urinarias no complicadas son muy restringidas y homogéneas, corresponden en su gran mayoría (85-95% de los casos) a cultivos puros (>90%) de bacilos gramnegativos (*E.coli*: 80-90%, *P. mirabilis*: 5-10% y *Klebsiella spp.*: 1-5%) y cocos grampositivos (*S. saprophyticus* 10-15% y *Enterococcus sp* 1-3%). En cambio, los agentes etiológicos de las infecciones urinarias complicadas son más variados e incluyen a bacilos gramnegativos, cocos grampositivos y bacilos grampositivos. Más de 30 especies microbianas se disputan la supremacía o pueden encontrarse en los pacientes con infecciones urinarias complicadas.³²

Planteamiento del problema

En países desarrollados como Estados Unidos se calcula que las infecciones del tracto urinario representan más de 7 millones de consultas por año, a un costo de más de \$1 mil millones de dólares. Hasta el 40% de las mujeres desarrollarán una ITU al menos una vez en su vida y un número significativo de estas tendrán infecciones recurrentes del tracto urinario.⁴

En el caso de nuestro país las infecciones de tracto urinario son un motivo frecuente de consulta médica en el primer nivel de atención. Tanto que hasta el año 2008 las infecciones de tracto urinario ocupaban el tercer lugar de morbilidad dentro de las 20 principales causas siendo reportadas hasta ese año 3,244 994 casos y aumentando a 3, 971 240 para el 2011; y una incidencia que aumentó de 3,041 a de 3,636 por cada 100 000 habitantes del 2008 al 2011 respectivamente. Encontrándose con una frecuencia mayor en mujeres con un 75.6%, comparado con 24.6% en hombres; otros grupos susceptibles son las personas con diabetes, las mujeres embarazadas y los ancianos desarrollan estas infecciones porque situaciones como reflujo urinario problemas de vaciamiento, enfermedades de la vejiga y de próstata, además de presentar la más alta reincidencia.^{33,34}

Actualmente los padecimientos en los que está envuelto el biofilm son generalmente crónicos y de difícil tratamiento, ya que estas asociaciones microbianas tienen ciertas ventajas como son: resistencia a los antibióticos, evasión de la inmunidad y resistencia en general a la agresión y cambios del medio ambiente.²⁴

Pregunta central

¿El hallazgo de agregados bacterianos que sugieren cohesión por una matriz en sedimento urinario es indicativo de la presencia de biofilm bacteriano al interior del tracto urinario?

JUSTIFICACIÓN

La asociación bacteriana y los factores de virulencia se conjuntan para el desarrollo de comunidades basadas en el biofilm. Estas asociaciones bacterianas son de importancia clínica porque son causantes de la mayoría de los padecimientos recurrentes.²⁴

En la mayoría de los casos reportados de ITUs relacionados con la formación de biofilm está relacionado con alguna forma de cateterismo, encontrándose biofilm bacterianos en el 70% de las muestras (73% organismos Gram negativos, 27% Gram positivos), el urocultivo de las muestra en las que fue detectado, el resultado fue negativo; los biofilm bacterianos pueden existir en el epitelio de la vejiga, sin ser detectado en muestras y sin dar lugar a sistemas.

Siendo el biofilm un mecanismo de resistencia probado en uropatógenos y al estar involucrado en infecciones asintomáticas, recurrentes o crónicas; hace de la investigación de biofilm un factor clave para el diagnóstico y tratamiento de ITUs; es indispensable investigar y establecer métodos de diagnóstico certeros y sobre todo sencillos, que conlleven a reportar el hallazgo en una muestra común, probando la aparición de biofilm en el sedimento.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar si el hallazgo de agregados específicos bacterianos en sedimento urinario, son indicadores del desarrollo de Biofilm por uropatógenos en procesos infecciosos del tracto urinario.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar que los agregados bacterianos observados en sedimento urinario presenten la cohesión de una matriz de exopolisacáridos, establecida como componente de biofilm.
- Identificar género y especie de los uropatógenos bacterianos implicados en la formación del biofilm.
- Encontrar la correlación de la formación de biofilm bacteriano en vías urinarias con los distintos elementos formes encontrados en sedimento urinario.

HIPÓTESIS

La presencia de agregados bacterianos en sedimento urinario unidos por una matriz de exopolisacáridos, es indicativo de Biofilm por uropatógenos proveniente de tracto urinario.

DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

Tipo de estudio

- Analítico
- Transversal

Definición del universo de trabajo

Muestras de orina con características macroscópicas de turbiedad, proporcionadas por el Laboratorio del Hospital ISSSTE de la zona urbana de la ciudad de Puebla, México.

Tamaño de la muestra

Todas las muestras que en el desarrollo de la observación del sedimento urinario presenten estructuras tipo biofilm proporcionadas por el Laboratorio del Hospital ISSSTE de la zona urbana de la ciudad de Puebla durante el periodo de mayo de 2013 a diciembre de 2013.

Tipo de muestreo

Muestreo intencional y discrecional.

- Criterios de selección

Todas las muestras proporcionadas por el Laboratorio del Hospital ISSSTE de la zona urbana de la ciudad de Puebla que cumplan con los criterios de inclusión, exclusión del manual de calidad del laboratorio.

- Criterios de inclusión

Muestras que provengan de la primera micción de la mañana

-Bacteriuria significativa (+++) y estructuras tipo biofilm

-50 ml como volumen mínimo de muestra

-Contenedor estéril

- Criterios de exclusión
 - Muestras que representen una orina distinta a la primera de la mañana
 - Muestras con un volumen menor a 50 ml
 - Si provienen de un contenedor no estéril
 - Muestras de pacientes que estén tomando antibióticos
 - Muestras de orina sin presencia de bacteriuria
- Criterios de eliminación
 - Muestras de orina con contaminación macroscópica y microscópica
- Definición del grupo control

Se tendrán dos controles:

- Negativo: Muestra con presencia de bacteriuria, pero con agregados bacterianos ausentes.
- Doble negativo: Muestras de orina de un paciente sin bacteriuria y sin agregados bacterianos.

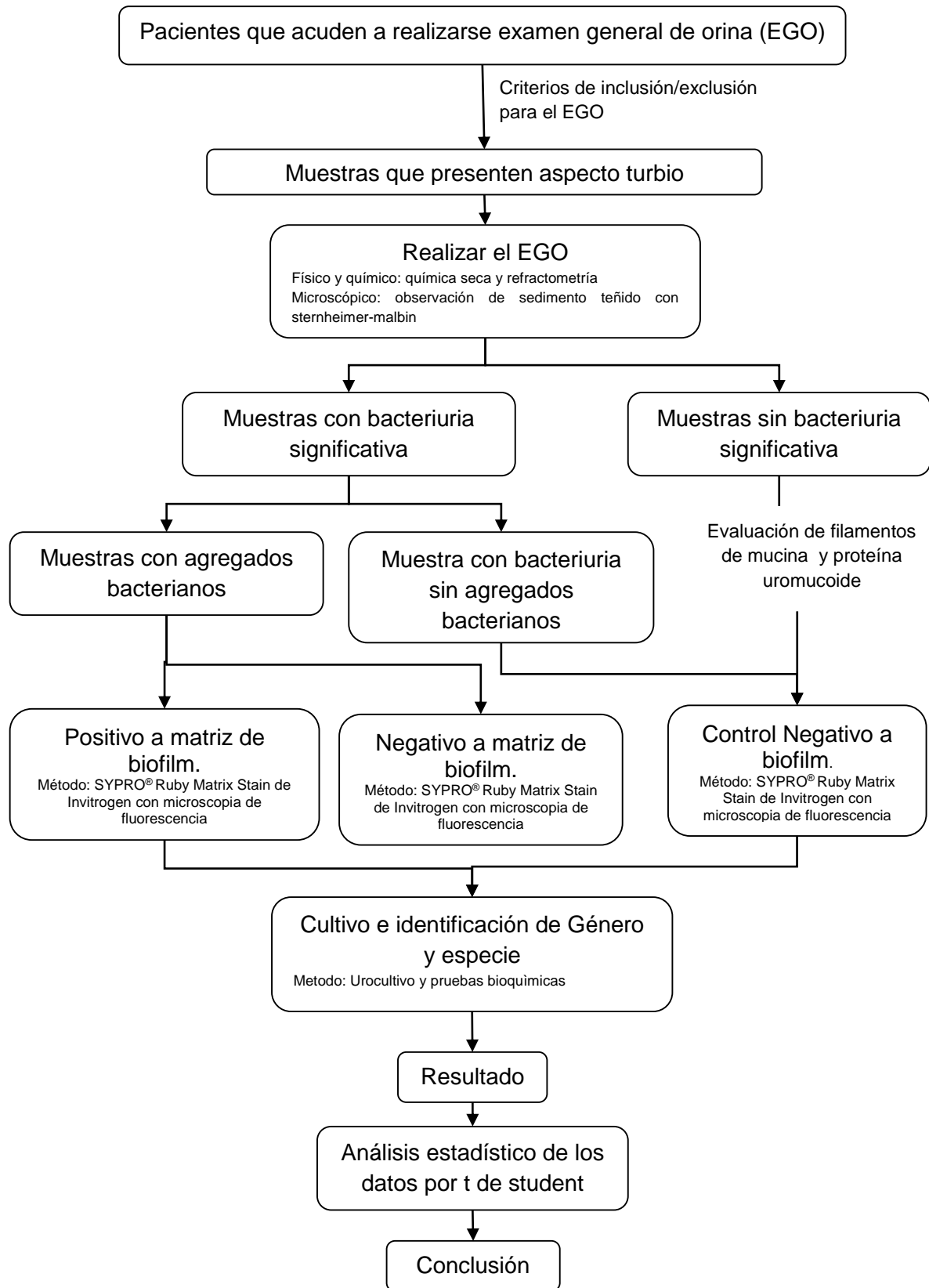
VARIABLES Y DEFINICIÓN DE VARIABLES

VARIABLES INDEPENDIENTES	VARIABLES DEPENDIENTES
Género del paciente Edad del paciente Género y especie bacteriana	Bacteriuria Exopolisacárido Presencia leucocitaria pH urinario Citólisis bacteriana Tipo de uroepitelio Cristaluria

MANEJO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS Y PRUEBAS ESTADÍSTICAS

El manejo de los datos obtenidos se hará por medio de estadística descriptiva y *t* de student de datos pareados

DIAGRAMA DE TRABAJO



METODOLOGÍA

Métodos y sus fundamentos

EXAMEN GENERAL DE ORINA (EGO)

El uroanálisis por definición, se refiere solo al análisis químico de la orina. Además, al análisis per se es definidos como la separación o identificación de los componentes. Por lo tanto el análisis de orina puede adquirir un significado más amplio. En la práctica, el análisis rutinario de orina incluye: (1) análisis macroscópico que incluye la valoración de las características físicas y químicas (2) el análisis microscópico de elementos formes.^{35,36}

Una parte esencial del análisis de orina es la fase pre analítica, una muestra que cumple los estándares de calidad permite asegurar la congruencia del resto del proceso.³⁷

La muestra para el examen general de orina, debe ser preferentemente la primera de la mañana, tomando la parte media y desechando el primer chorro, así como la última parte de la micción, con previo aseo de genitales. El paciente deberá permanecer sin tratamiento antibiótico al menos 48 horas antes.

Para el proceso de la muestra esta deberá ser analizada dentro de las posteriores dos horas a la toma de muestra. Si esto es imposible mantener refrigerada la muestra a 4 °C por no más de 24 horas.³⁸

Técnica de examen general de orina^{38,39}

1. Homogeneizar la muestra primaria en su contenedor original
2. Alícuotar aproximadamente al 90% (≈8.0 ml) de un tubo de ensayo de 13x100
3. Inmediatamente desarrollar el examen macroscópico y fisicoquímico
4. Centrifugar a una velocidad de 1500rpm (400 g), durante 3 minutos
5. Una vez que se ha centrifugado decantar el 90% de orina del sobrenadante (dejar ≈0.5 ml de orina residual)
6. Re suspender el precipitado, por agitación manual

7. Se toman 50µl del re suspendido y se deposita en un portaobjetos
8. Adicionar 5µl del colorante Sterheimer-Malbin
9. Realizado este paso se procede a homogeneizar con el borde de un cubreobjetos
10. Cubrir con un porta objetos de 22x22mm evitando la formación de burbujas
11. Observar a 10x para garantizar el homogeneizado
12. Leer a 40x
13. Buscar la presencia de bacteriuria, biofilm o adherencia bacteriana

UROCULTIVO

La siembra debe realizarse de la orina sin centrifugar con una asa calibrada, lo que permitirá obtener una estimación semicuantitativa del desarrollo cuantitativo.

Existen numerosos medios de cultivo para sembrar una muestra de orina. La elección del medio de cultivo debe contemplar la relación costo-beneficio, de modo de elegir la opción que permita la recuperación de la mayoría de los patógenos con el menor costo. En este caso se eligió la siembra de acuerdo a la observación previa del sedimento.²⁷

Este procedimiento ofrece la ventaja de cultivar el microorganismo en el medio más apropiado, tanto para su desarrollo, como para su caracterización macroscópica, por lo que posibilita orientar con mayor certeza el esquema inicial de identificación. La desventaja inicial de identificación.⁴⁰

Técnica utilizada en urocultivo⁴¹

1. Recolectar la muestra a chorro medio
2. Homogeneizar la muestra
3. Sembrar de forma cuantitativa tomando un asa calibrada d 0.001µl en placas de agar sangre, agar Sal y Manitol y agar Mac Conkey
4. Incubar en estufa bacteriológica 24 horas a 37°C
5. Realizar identificación

Técnica de identificación del género y especie.⁴¹

1. A partir de las colonias aisladas realizar la identificación de género con oxidasa y catalasa
2. Realizar tinción de Gram
3. Inocular las pruebas bioquímicas (TSI, LIA, MIO, Citrato, Urea)
4. Incubar 24 horas a 37°C
5. Leer pruebas bioquímicas
6. Comparar los resultados con las tablas y establecer género y especie

IDENTIFICACIÓN DE BIOFILM

Hay una miríada de condiciones experimentales que favorecen la formación de biofilm. Como consecuencia de la diversidad de técnicas y de microorganismos como objeto de estudio, además de la necesidad de reproducibilidad de los experimentos entre distintos laboratorios.¹³

Para el caso de esta investigación el método elegido la tinción SYPRO® Ruby Matrix Stain de Invitrogen.⁴²

Fijación de la muestra

El primer paso es fijar la muestra, el protocolo diseñado para la fijación fue el siguiente:

1. Del sedimento previamente centrifugado y decantado se toman 50 µl
2. Con suavidad son depositados en un portaobjetos de manera circular, la muestra se deja secar, protegido del aire
3. Se coloca el porta objetos en una estufa microbiológica hasta que la muestra se encuentre totalmente seca
4. Una vez seca, la muestra está lista para su procesamiento

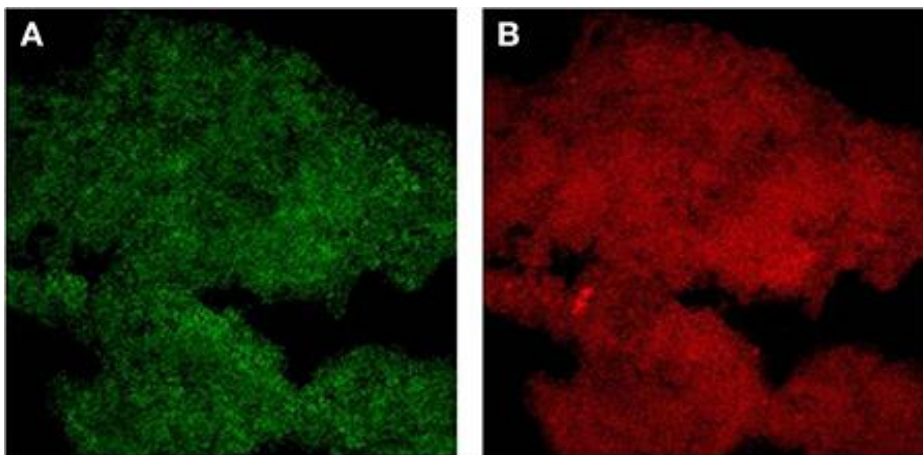
Tinción

Una vez fija la muestra, el protocolo de experimentación es:

1. Adicionar 200 μ L de la solución para tinción en la muestra de biofilm. Adicionar muy suavemente para no alterar el biofilm. Agregue el colorante inmediatamente antes de que el biofilm se seque
2. Incubar la muestra por 30 minutos a temperatura ambiente, protegido de la luz
3. Enjuague la muestra gentilmente con agua destilada, remover todo el exceso de colorante de la base del material de soporte
4. Observar utilizando objetivo de 40X
5. Fluorescencia de excitación/emisión máxima aproximada: 280, 450/610nm

Para este método los criterios de interpretación son los siguientes:

Una muestra negativa, no presenta fluorescencia de ningún tipo, que se observa oscuridad total del campo. Una muestra positiva se observa fluorescencia roja abarcando el área que corresponde a la muestra positiva a la matriz del biofilm.

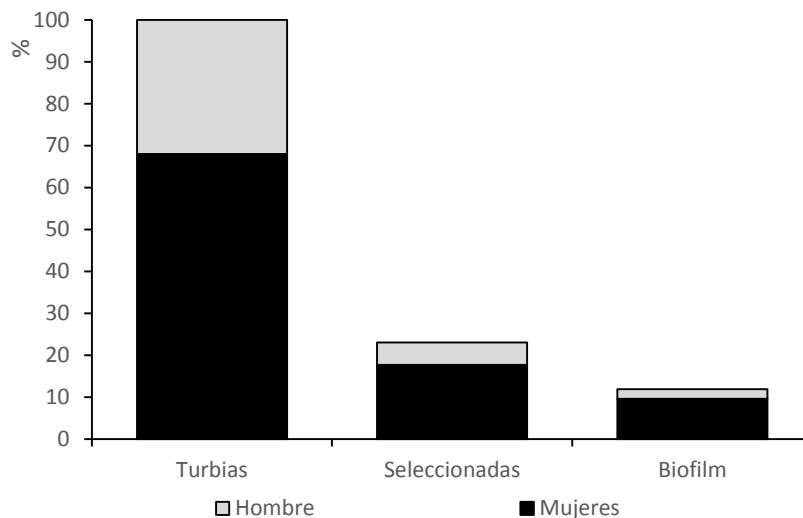


FilmTracer™ SYPRO® Ruby Biofilm Matrix Stain descrita por Ravaioli et al. (2012). A) Canal verde. B) Canal rojo

Resultados y discusión

El presente estudio utilizó 513 especímenes urinarios de pacientes que acudieron al Hospital ISSSTE de la zona urbana de la ciudad de Puebla, México. Dichos especímenes fueron seleccionados por criterios de inclusión y exclusión previamente descritos en el protocolo de investigación. A cada espécimen de orina obtenida de la porción del chorro medio, se le realizó el estudio químico y de elementos formes del sedimento urinario. Del total analizados fueron seleccionados 60 especímenes con presencia de bacteriuria significativa (+ + + o más)³⁰ en el sedimento urinario, de los cuales 31 especímenes presentaban estructuras sugerentes de biofilm (llamado grupo biofilm) y 29 especímenes con bacteriuria sin estructuras sugerentes de biofilm (llamado grupo bacteriuria control). De la realización del protocolo de investigación se extraen los siguientes resultados:

Grafica 1: Distribución de selección de muestras y género poblacional del estudio



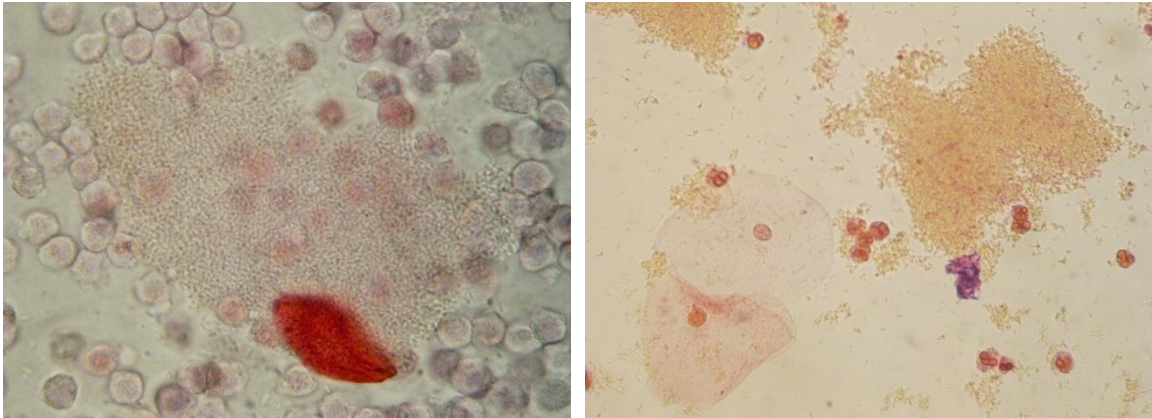
La grafica 1 representa como la población fue seleccionada, donde se partió de 513 muestra a partir de este punto el muestro se hizo intencional seleccionando las muestras turbias que ascendieron a 260 muestras lo que se representa como el 100% con una distribución de 68% (177 especímenes) para el género femenino y 32% (83 especímenes) de casos del género masculino para el estudio fueron

seleccionadas 60 muestras para este estudio, con una distribución por género poblacional que presentó bacteriuria significativa, sugerente de ITU (+++ ó ++++), de 17.7% (46 especímenes) para el género femenino y el género masculino con 14% (14 especímenes) del total de muestras turbias, finalmente se seleccionaron 31 muestras con estructuras sugerentes de biofilm donde el género femenino asciende al 9.6 % (25 especímenes) del total y el género masculino alcanza el 2.3% (6 especímenes).

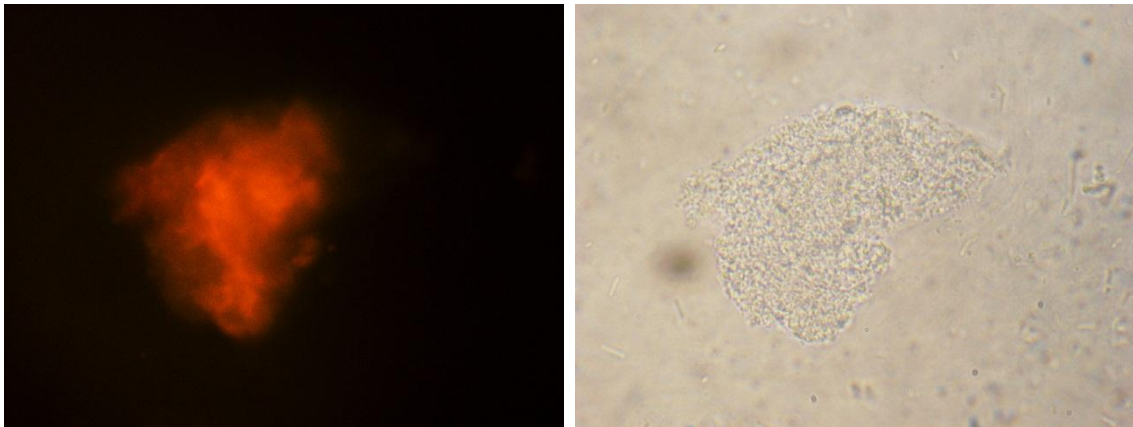
Lo que se encontró es aun cuando el fenómeno pareciera no ser tan común se encuentra con una frecuencia del 11.9% de los casos de muestras turbias. Y cada grupo conserva la tendencia de que el género femenino presenta con mayor frecuencia turbiedad, bacteriuria y biofilm.

El género femenino suele presentar una relación 3:1 con respecto del género masculino de infecciones del tracto urinario (ITUs). Como se señala en el panorama epidemiológico de las infecciones de vías urinarias en México del 2008, el cual señala que la población del género femenino presenta mayor incidencia con una relación de 4:1 con el 75.6% de los casos.^{33,57} Factores como la anatomía femenina que presenta una uretra mucho más corta que la del varón, la cercanía con el introito vaginal y el ano, vida sexual activa, hábitos de higiene, tipo de ropa interior, frecuencia de micción, hábitos de hidratación, índice de masa corporal elevado, son las principales factores para el desarrollo para ITUs.⁴³⁻⁴⁸ Además etapas como el embarazo o postmenopausia; o condiciones fisiológicas como obstrucción del flujo urinario, traumas (cirugías urológicas, traumas abdominales, etc), reflujo vesicoureteral, disfunción vesical neurogénica son condicionantes para ITUs.⁴⁹⁻⁵¹

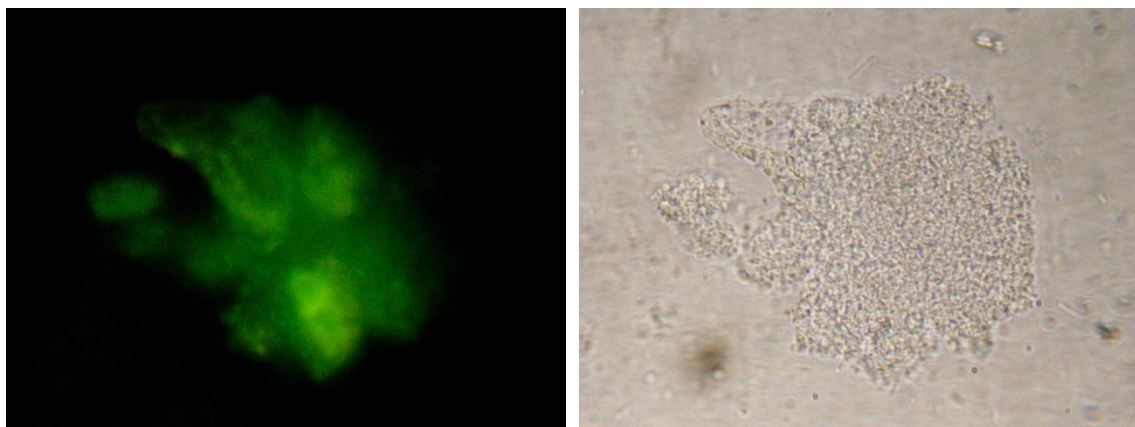
Panel 1. Muestras con agregados bacterianos candidatos a biofilm y muestras marcadas por medio de la técnica de FilmTracer™ SYPRO® Ruby stain



a) Muestras teñidas con Sterheimer-Malbin, microscopia de campo claro. 40x

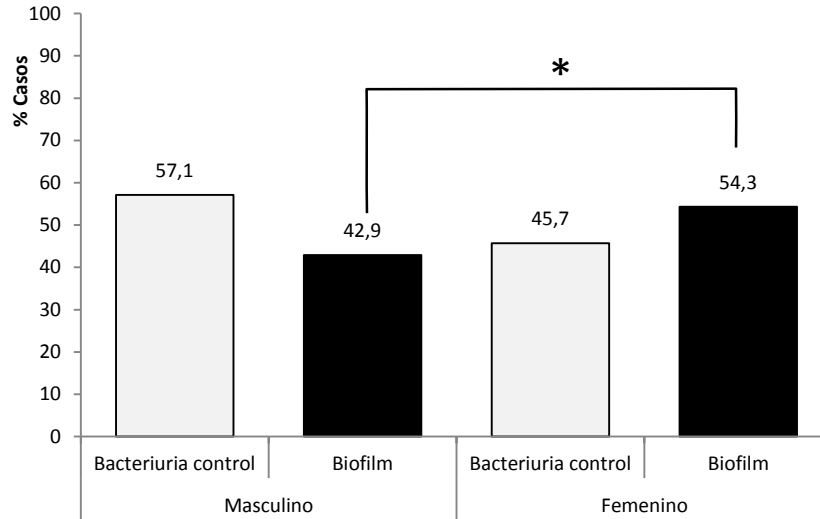


b) Muestra marcada con FilmTracer™ SYPRO® Ruby stain, microscopia de fluorescencia observada en el canal Rojo y campo claro.



c) Muestra marcada con FilmTracer™ SYPRO® Ruby stain, microscopia de fluorescencia observada en el canal verde y campo claro.

Grafica 2. Positividad de bacteriuria con biofilm vs género poblacional.



Los resultados expresan las medias poblacionales, (*) significa que existe diferencia estadísticamente significativa para una $*p \geq 0.05$ con respecto al grupo control. n control=29, n positivo=31

En el grafico 2 representa al 100% de las poblaciones con respecto al género con bacteriuria control y biofilm. El género masculino presentó 57.1% (8 especímenes) para bacteriuria control y 42.9% (6 especímenes) para biofilm. El género femenino desarrollo el 45.7% (21 especímenes) para bacteriuria control y 54.3% (25 especímenes) para biofilm. No se encontró diferencia significativa para bacteriuria control, pero el género femenino presenta diferencia significativa ($p=0.05$) para biofilm; dato indicativo de que las mujeres presentan predisposición a ITUs relacionadas con biofilm.

Actualmente no se ha encontrado evidencia bibliográfica de estudios de biofilm en población ambulatoria no cateterizada, pero se sabe que si una bacteria forma exitosamente biofilm la infección se trasforma en crónica,^{53,80,81} los datos de este estudio puede equipararse epidemiológicamente con las ITUs complicadas cuya fisiopatología incluye anomalías hormonales, estructurales, metabólicas, de inmunocompromiso, patógenos inusuales, entre otros.^{54,55} Por lo que la diferencia significativa del género femenino para desarrollo de biofilm correlaciona entre otros, con lo encontrado en estudios como los de 2007 del Instituto Nacional de Salud de Washington donde se establece a la mujer como el género más común en el que se

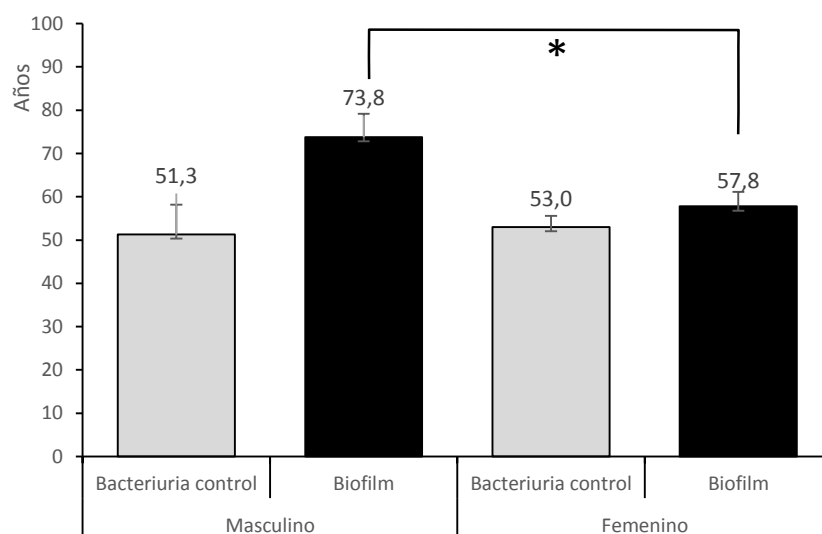
presentan ITUs generalmente por razones anatómicas.⁵⁶ En particular, de acuerdo a la estadística mexicana de prevalencia y factores de riesgo para ITU de 2011 se encontró que el 75% de los casos de ITUs lo presentan las mujeres.⁵⁷

Diferentes situaciones que predisponen al género femenino a desarrollar este tipo de patologías de manera recurrente, entre ellas: las anatomo-fisiológicas, conductuales y además la posibilidad de variabilidad genética como es estatus no secretor de Rh; iniciando por el hecho de que las mujeres con infecciones recurrentes de tracto urinario presentan una mayor adhesión vaginal y periuretral a los uropatógenos. Se ha sugerido la existencia de diferencias en la densidad o expresión de los receptores como el TRL-4, uroplaquinas e integrinas a nivel de la mucosa del tracto urinario lo que podría estar mediado, al menos en parte, genéticamente.^{12,58-60} Afecciones que dificultan el vaciado de la vejiga urinaria, fundamentalmente el cistocele y la incontinencia urinaria, como las alteraciones que con mayor frecuencia se asocian a ITU en las mujeres postmenopáusicas,⁵² en 2009 se describió que los factores conductuales se consideran de especial relevancia en las infecciones recurrentes que se dan en las mujeres premenopáusicas; el incremento del riesgo asociado con la actividad sexual se relaciona por un lado con el efecto mecánico, que parece favorecer la entrada de uropatógenos a la vejiga urinaria, y el método anticonceptivo utilizado. En este sentido, la utilización de espermicidas se ha asociado con un mayor riesgo de infecciones recurrentes, por el efecto deletéreo que ejercen sobre la microflora vaginal favoreciendo la colonización por uropatogenos.⁶¹

Estudios hechos en el Hospital Universitario de Granada en el 2013 describen los cambios fisiológicos en el embarazo que facilitan el desarrollo de infecciones de tracto urinario por mecanismos como ; a) Los factores mecánicos originados por el crecimiento uterino provocan de forma progresiva el desplazamiento lateral del uréter y la compresión de la vejiga, favoreciendo la aparición de residuo posmiccional b) la progesterona disminuye el tono y la contractilidad de las fibras musculares lisas del esfínter ureterovesical y del uréter, favoreciendo el reflujo vesicoureteral, estancamiento de la orina y migración bacteriana ascendente; los

estrógenos pueden inducir una hiperemia en el triángulo favoreciendo la adherencia de los uropatógenos al epitelio.⁶² La glucosuria y aminoaciduria durante el embarazo son factores adicionales para el desarrollo ITU; dada la excreción de glucosa incrementa durante el embarazo hasta 100mg/dL por encima de los valores biológicamente aceptados. Debido a la resorción alterada. Y la excreción fraccional de alanina, glicina, histidina, serina, treonina y se incrementa durante el embarazo. El mecanismo de aminoaciduria selectiva es desconocida, aunque su presencia se ha postulado para afectar a la adherencia de *Escherichia coli* para el urotelio.⁶³

Grafica 3. Positividad de bacteriuria control vs bacteriuria biofilm de acuerdo a edad y género poblacional.



Los resultados expresan las medias poblacionales, el *significa que existe diferencia estadísticamente significativa para una $*p \geq 0.05$ con respecto al grupo control. n control=29, n positivo=31

El gráfico número 3 ilustra el promedio de edad en la que fue localizado el fenómeno de biofilm en los distintos géneros, se observa que para la bacteriuria control no hay diferencia importante en la edad de aparición que esta alrededor de los 50 años. Sin embargo para el desarrollo de biofilm la edad es un factor condicionante para el género femenino, con un promedio de edad de 57 ± 3.3 años, lo cual representa una diferencia estadísticamente significativa con respecto al hombre que resulta ser 16 años mayor, a una edad de 73 ± 5.4 años.

En la progresión de la vida es en mujeres jóvenes y de mediana edad donde se dan los primeros episodios de ITUs esto relacionado a la actividad sexual y hábitos de higiene⁴⁴, acumulando una prevalencia de 30 al 50% para mujeres menores de 50 años. Después de esta edad se ha reportado que la frecuencia aumenta debido a cirugías ginecológicas, menopausia e incontinencia.⁵² Destacando la deficiencia estrogénica, ya que al llegar a la menopausia el pH vaginal aumenta, la flora natural se ve diezmada y esto permite la proliferación de uropatógenos.⁶⁴ Otros factores que afectan a esta edad son el padeciendo de cistocele, el historial de cirugías genitourinarias, el vaciamiento incompleto de la vejiga, la presencia de divertículos en vejiga y el estatus no secretor de factor Rh también son factores predisponentes.^{65,66}

Otro grupo susceptible en esta etapa de la vida son los pacientes diabéticos en los que se ha demostrado que la ITU es el proceso infeccioso más recurrente, donde signos como la glucosuria, el incremento de la adherencia bacteriana al uroepitelio y defectos en la función inmunológica son condiciones para ITUs;⁶⁵ donde las concentraciones altas de glucosa en orina propician un medio de cultivo para los microorganismos patógenos.⁶⁸ Los problemas inmunológicos incluyen una limitada migración inmunológica, la fagocitosis y quimiotaxis de los polimorfonucleares, y se suman las complicaciones como cistitis y pielonefritis, así como un aumento en la severidad de las manifestaciones.⁶⁹ Los factores que incrementan la incidencia son la edad, el control metabólico y las complicaciones a largo plazo, tales como la nefropatía y cistopatía. Las alteraciones del sistema inmune nato también contribuyen.⁷⁰

Para el hombre la aparición de ITUs se recorre a los extremos de la vida. El padecimiento en adultos inicia alrededor de los 50 años igualando su prevalencia con el género femenino.⁷¹ En el 2008 las estadísticas de nuestro país marcan una incidencia que puede ir del 20% hasta más del 50% de los casos.⁵⁷

La mayoría de los hombres con ITU tiene alguna anormalidad funcional o anatómica del tracto genitourinario. La hipertrofia prostática y el cateterismo son los mayores predisponentes de infecciones.⁷² sin embargo la investigación en este género es

escasa, pero se ha dicho que padecimientos predisponentes a una ITU incluyen problemas de espina, de próstata, obstrucción del flujo urinario, caculos, reflujo vesicouretral, diabetes tipo 2, cáncer de vejiga o próstata, los cuales se vuelven frecuentes con la edad y acrecentan el problema.⁷³

Tabla 5. Análisis físico-químico de grupo bacteriuria control vs. biofilm.

Determinación	Control	Biofilm
Gravedad especifica	1.019 ± 0.03	1.017 ± 0.001
pH	5.9 ± 0.1	6.0 ± 0.1
Leucoesterasa (Cel/uL)	54.3 ± 28.6	71.4 ± 23.2
Proteína (mg/dL)	43.8 ± 11.5	55.8 ± 15.2
Sangre (Eri/ul)	23.3 ± 12.5	12.1 ± 7
Glucosa (mg/dL)	20 ± 0	40.96 ± 40.96
Urobilinógeno (mg/dL)	0.2 ± 8.7x10 ⁻¹⁷	0.2 ± 8.7x10 ⁻¹⁷
Cetonas (mg/dL)	0.5 ± 0.37	0.9 ± 0.96
Billirrubinas	0 ± 0	0 ± 0
Nitritos (expresado en porcentaje de frecuencia de aparición)	40%	44.8%

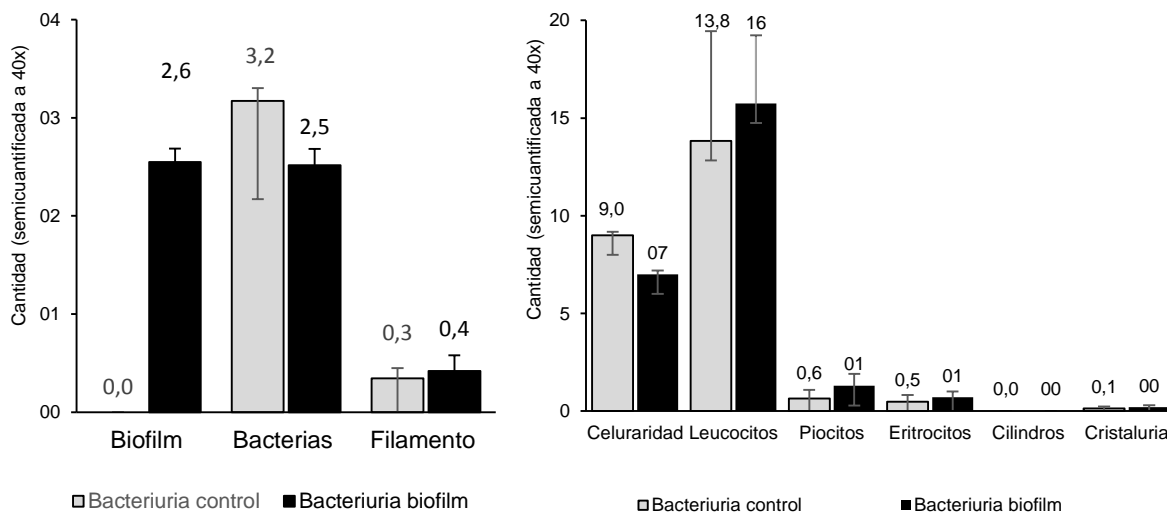
Los resultados expresan las medias poblacionales, ± es el error estándar de la media, el *significa que existe diferencia estadísticamente significativa para una *p ≥ 0.05 con respecto al grupo control. n control=29, n positivo=31.

La tabla muestra el análisis de los resultados obtenidos del examen fisicoquímico de los grupos control y biofilm; donde los parámetros no se presentan diferencias significativas.

De acuerdo con la guía europea de uroanálisis los parámetros obtenidos a través de la tira reactiva que son asociados con las ITUs son la leucoesterasa y los nitritos en las cuales un resultado positivo sumado a la evaluación clínica permite el inicio de un tratamiento empírico, en tanto el cultivo arroja resultados.^{7,74} Sin embargo para leucoesterasa se encontró que el grupo control registro un promedio de 54.3±28.6 (Cel/uL) y el 71.4 ± 23.1 para biofilm sin embargo no existe diferencia

significativa. Caso similar con los nitritos que no presentan una diferencia importante. Aunque sensibilidad de la combinación de ambas pruebas puede variar entre 68 y 88% en los diferentes grupos de pacientes, pero los resultados positivos de la prueba deben ser confirmados mediante el urocultivo.⁷⁵

Grafico 6 y 7. Análisis sedimento urinario de grupo de bacteriuria vs grupo biofilm



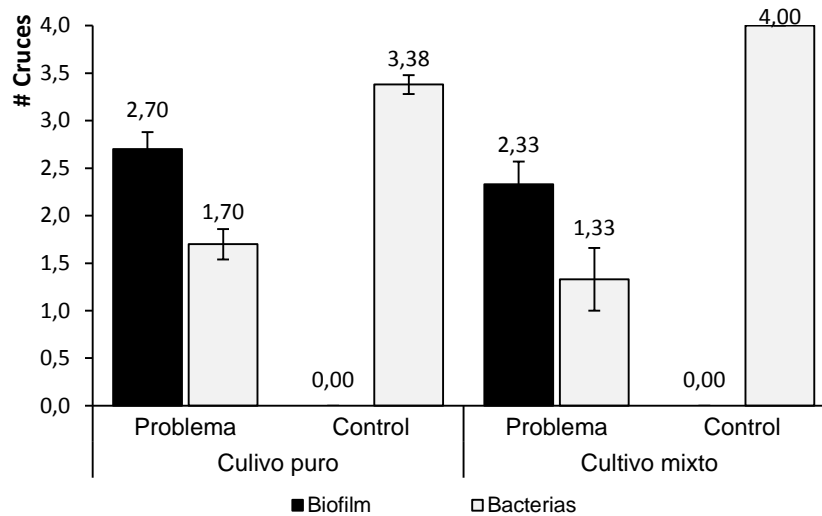
Los resultados expresan las medias poblacionales, el *significa que existe diferencia estadísticamente significativa para una $p \geq 0.05$ con respecto al grupo control. n control=29, n positivo=31.

De acuerdo a la guía europea de uroanálisis donde se indica la forma de reportar lo observado en el sedimento la gráfica muestra los resultados obtenidos al observar el sedimento urinario de los grupos control y biofilm; en el grafico 6 se observan los aspectos que se analizan en magnitud de una a cuatro cruces; siendo una cruz escaso, dos moderado, tres abundante y cuatro muy abundante, estos parámetros comprenden bacterias, filamento de mucina y se incluye biofilm que se ha cuantificado en esta escala para equipararlo con la contabilización de bacterias. El grafico 7 incluye los parámetros cuantificables del sedimento urinario: leucocitos, piocitos, eritrocitos, celularidad, cilindros y cristaluria.^{29,76}

Aun cuando no existen diferencias significativas en ningún parámetro, las cuantificaciones de piocitos y leucocitos son resaltables porque se ha demostrado que aun cuando la respuesta inmune es desatada por el biofilm ya que se presenta

la infiltración leucocitaria, especialmente de polimormonucleares (PMN), que a través de estructuras bien conservadas como los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) que las bacterias interactúan con los receptores tipo Toll (o Toll-like receptor TLRs) que permiten el reconocimiento entre el biofilm y los PMN.⁷⁷ El biofilm está protegido de los antibióticos y del sistema inmunológico del cuerpo y se sabe que hay diversos mecanismo detrás de la resistencia al ataque de los leucocitos tales como: la limitada penetración y sus productos en el biofilm así como la supresión de su acción, la respuesta global de los reguladores y el quorum sensing, la disminución de la capacidad fagocitaria de las células del hospedero y los cambios genéticos incrementan la resistencia del biofilm.^{78,79} Esto porque la matriz del biofilm forma una barrera entre los fagocitos y la colonia protegiéndola de las defensas antimicrobianas, en el caso específico de los macrófagos el biofilm puede provocar la muerte o reprogramación a una cepa de actividad antimicrobiana más pobre. Otra relación destacable es que las muestras de biofilm también presentan bacterias de tipo plantónicas y según estudios del 2013 describió que al establecerse una comunidad de biofilm, las células planctónicas crecientes en el tejido de los alrededores están en proceso de pasar a una vida sésil y empezar a producir una matriz de biofilm.⁸⁰

Grafico 8. Semicuantificación de biofilm y bacteriuria plantónica en ITUs puras y mixtas



Los resultados expresan las medias poblacionales, el *significa que existe diferencia estadísticamente significativa para una $*p \geq 0.05$ con respecto al grupo control. n control=29, n positivo=31.

Se muestra la proporción en la que las muestras presentaron una cohesión probada por medio de la técnica de FilmTracer™ SYPRO® Ruby stain; la escala utilizada es de cero a cuatro cruces, y se ha pareado cada valor con la cantidad de bacterias libres en el medio en la misma, además se divide en las muestras que mostraron solo un patógeno (cultivo puro) y aquellas que presentaron cultivos con dos o más especies bacterianas (cultivo mixto).

La presencia de biofilm que se da en 2.7 ± 0.18 de magnitud en ITUs puras junto a 1.7 ± 0.16 de bacteriuria planctónica; y en ITUs mixtas 2.3 ± 0.24 de biofilm con 1.33 ± 0.33 de bacteriuria platónica. Los grupos control presentaron bacteriuria simple de 3.38 ± 0.1 y 4.0 ± 0.0 cruces para los cultivos puros y mixtos respectivamente sin marca de matriz.

De este análisis hay dos puntos sobresalientes; el primero es que se presentaron dos categorías en cuanto a los patógenos involucrados, los que presentaron solo un patógeno lo que presentaron cultivos mixtos, bien sabido que por más de cuatro décadas, que los llamados criterios de Kass fueron utilizados como referencia para el diagnóstico de ITUs donde, para un paciente sintomático un cultivo urinario de un

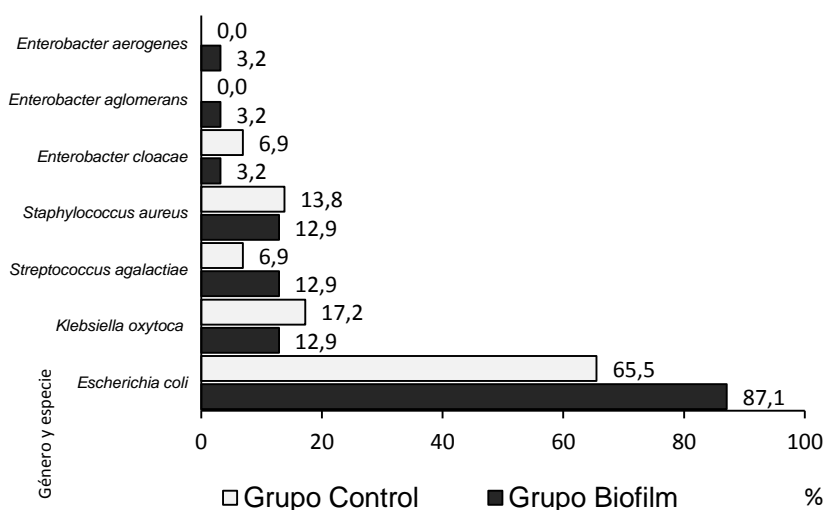
agente patógeno habitual en las ITUs, con más de 100.000UFC/ml indica una probabilidad de infección del 80%. Y que urocultivos con dos o más gérmenes deberían ser considerados como contaminados y no significativos, aunque el recuento sea superior a 100.000 UFC/ml.^{27,29,30}

Sin embargo hoy en día las infecciones polimicrobianas envuelven múltiples organismos que actúan colectivamente para facilitar la progresión de la infección. Y aunque durante años la mayoría de los tratamientos se enfocaron en la especie dominante, otros microorganismos, incluidos los comensales, pueden influir profundamente tanto en la respuesta a los antimicrobianos como en la virulencia. Muy poco es lo que se conoce sobre el mecanismo molecular de las interacciones entre bacterias durante este tipo de infección.⁸² En la investigación del biofilm se ha dividido el fenómeno en: poblaciones microbianas mixtas y en mono poblaciones microbianas ya que la existencia de una no descarta la otra. En el primer caso, los organismos se consideran como una masa homogénea, biomasa, haciendo caso omiso de las propiedades de las especies individuales, siendo la suma la que determina los fenómenos observados. El segundo caso se concentra en las propiedades y procesos de una especie microbiana haciendo caso omiso de la influencia del medio ambiente más amplio como otras especies microbianas, en esta especie, siendo las condiciones del medio y la especie bacteriana las que determinan en tipo de colonia se desarrollara.⁸³

Al final el propósito de las colonias polimicrobianas es formar una comunidad en la que todas las especies se ha beneficiadas, por medio de interacciones microbianas como: la comunicación inter-especie a través de la difusión de señales como el autoinductor-2 (AI-2) que es una molécula señal derivada de ribosa producida y percibida por múltiples bacterias.⁸⁴ Las familia de señales difusibles (DSF) que son un conjunto de moléculas caracterizadas por ser ácidos grasos con una instauración cis en la posición dos.⁸⁵ La retroalimentación de metabolitos, que conjunta la utilización de productos finales de una especie como materia prima de otra y las interacciones antagónicas, de este modo las habilidades metabólicas de las distintas especies del biofilm se complementan unas a otras.⁸⁶ Finalmente las

interacciones dependientes del contacto entre bacterias durante la infección, que particularmente en el caso del biofilm este sinergismo tiene como propósito el aumento de la biomasa y mejorar la tolerancia al antibiótico;⁸⁸ entre los participantes de estas interacciones se encuentran las fimbrias y pilis que tienen participación en la adhesión célula- célula, los flagelos que participan en la adhesión inicial.⁸⁹

Grafico 9. Frecuencia de microorganismos aislados en los grupo control y grupo biofilm.



Los resultados expresan las medias poblacionales, el *significa que existe diferencia estadísticamente significativa para una $*P \geq 0.05$ con respecto al grupo control. n control=29, n positivo=31

Se observan las especies bacterianas encontradas en el estudio, dividido en dos grupos que suman 100% de manera independiente. Para ambos grupos la especie predominante es *Escherichia coli*, con 65.5% y 87.1% para grupo control y biofilm respectivamente, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactie* y *Klebsiella oxytoca* se presentan en un número similar alcanzando una media 12.9% en el grupo biofilm, sin embargo para el grupo control estas especies se observan de manera menos uniforme alcanzado en promedio 13.8% para *Staphylococcus aureus*, 6.9% en el caso *Streptococcus agalactie* y 17.2% de casos con *Klebsiella oxytoca*, se reportan tres especies más, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter agglomerans* y *Enterobacter cloacae*, que para el grupo biofilm alcanzan un 3.2%

formando parte de cultivos mixtos, en cambio en el grupo control Enterobacter cloacae presenta un 6.9% en cultivos puros.

Los patógenos involucrados en ITUs son variados, pero las especies predominantes suelen ser *E. coli* (UPEC), *Staphylococcus saprophyticus*, el grupo B de *Streptococcus*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella sp.*, *Enterobacter sp.*, *Proteus sp.* y cuando hay interacciones interespecie entre estos organismos las consecuencias suelen ser: infecciones persistentes, modulación de la respuesta inmune por parte del no-patógeno y la promoción de la infecciones por el patógeno.⁸²

Esta parte de la discusión se centra en *Escherichia coli*, ya que es la especie presente en la mayoría de los casos como especie planctónica y ha sido señalado como una especie capaz de formar asociaciones comunitarias para su exitosa sobrevivencia, ya sea como un complejo puro o mixto alcanzado de un 70 a un 90% de los casos de ITU,^{15,82} descrito ampliamente por Costerton et al. desde 1995, *E. coli* es una especie predominante entre las anaerobias facultativos ya que fácilmente prospera en ambientes característicos de biofilm polimicrobianos.^{89,90}

El biofilm de *E. coli* es más frecuente gracias a los distintos factores de virulencia, los cuales son: al inicio de la infección flagelos, pilis tipo 1 y curli los que están involucrados en el anclaje y adherencia; el ser una bacteria móvil es una ventaja en las etapas iniciales, pero una desventaja para el mantenimiento del biofilm maduro por lo que la expresión genética flagelar disminuye, además de que posee una amplia variedad de sustancia como el ácido colánico importantísima para la formación de la estructura tridimensional del biofilm, pero de igual forma puede presidir de ella o sustituirla.⁹¹ En adición las cepas formadoras de biofilm muestran un aumento significativo en la producción de hemolisina y fimbria tipo 1.⁸ Finalmente el proceso de dispersión que es esencial para fomentar la migración de la bacteria a los confines del biofilm con el propósito de colonizar nuevos territorios. Aunque este proceso no se ha esclarecido totalmente en ninguna especie se ha sugerido que en *E.coli* es un ciclo regulado, donde la expresión diferencial de los genes de quitinasa promueven el desprendimiento de células del biofilm.⁹²

En la clínica los datos estadísticos señalan que aquella mujer que presenta ITU recurrente se ha demostrado que el 74% de las cepas involucradas son capaces de formar biofilm.⁸ Y en el caso del varón la formación de biofilm puede resultar en el incremento de la habilidad de las cepas de causar prostatitis aguda o prostatitis secretora persistente y aunado ITUs recurrentes, resulta en una prostatitis bacteriana crónica.⁹³ De hecho ha sido reportado que el 63% de las cepas de *E. coli* recolectadas de pacientes con prostatitis son capaces de formar biofilm, con contraste con un 40% de las cepas provenientes de cistitis y pielonefritis.⁹⁴ Esta podría ser la razón de porque la prostatitis es tan difícil de erradicar.

CONCLUSIONES

- El hallar de agregados bacterianos específicos en sedimento urinario teñidos con Sternheimer malbin evaluados por el marcaje de la técnica FilmTracer™ SYPRO® Ruby stain, lo que hizo posible evidenciar y reconocer biofilm.
- *Escherichia coli* es la especie que se presenta con mayor frecuencia en especímenes con biofilm (87.1%) y especímenes que contienen bacteriuria significativa (65.5 %).
- No se encontró diferencia significativa entre los resultados obtenidos en el examen físico químico o los elementos formes hallados en el sedimento urinario de las poblaciones estudiadas y el hallazgo de biofilm, por lo cual no hay correlación alguna entre los mismos.

BIBLIOGRAFIA

1. C.P. Anthony, G.A. Thibodeau; Anatomía y Fisiología; Decima edición; Editorial Interamericana
2. http://www.med.ufro.cl/clases_apuntes/cursos_clinicos/urologia/documentos/apuntes-anatom-urogenital.pdf
3. Steven E Gradwohl, Urinary Tract Infection; Taubman Medical Library; June, 2011
4. J. Echevarría-Zarate, E. Sarmiento, F. Osorio-Plenge; Infección del tracto urinario y manejo antibiótico; Acta medica Peruana; 2006
5. M. Grabe, T.E. Bjerklund-Johansen; Guidelines on Urological Infections; European Association of Urology; marzo 2011
6. <http://www.columbia.edu/itc/hs/medical/pathophys/id/2009/utiNotes.pdf>
7. European Urinalysis Group; European Urinalysis Guidelines; Scand J Clin Lab Invest 2000;
8. Sara M. Soto, Francesc Marco; Biofilm Formation in Uropathogenic Escherichia coli Strains: Relationship with Urovirulence Factors and Antimicrobial Resistance; Clinical Management of Complicated Urinary Tract Infection; ISBN 978-953-307-393-4; September, 2011
9. The role of F9 fimbriae of uropathogenic Escherichia coli in biofilm formation; Microbiology Great Britain; Marzo de 2007; 2321-2331
10. <http://www.riojasalud.es/ficheros/infeccionesurinarias.pdf>
11. Hadji-frangiskou M, Gu AP; Transposon mutagenesis identifies uropathogenic Escherichia coli biofilm factors; Journal of Bacteriology, American society of microbiology; septiembre 2012
12. David A. Hunstad, Sheryl S. Justice; Intracellular Lifestyles and Immune Evasion Strategies of Uropathogenic Escherichia coli; Annu. Rev. Microbiol. 2010. 64:203–21
13. Ángel J. Flores; Citolisis Bacteriana: modificador del número de UFC/mL: NOTICONAQUIC; 2008
14. Nosedá, D. G. (2012). Biofilm como forma de vida de Bordetella pertussis en su hospedador (Doctoral dissertation, Facultad de Ciencias Exactas).
15. Faleiro-Naves, P. L. (2009). Formación de biopelículas por Escherichia coli y su correlación con factores de virulencia: prevención y actividad de antimicrobianos

frente a organismos planctónicos y asociados a biopelículas (Doctoral dissertation, Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Departamento de Microbiología I. Universidad Complutense de Madrid. Madrid).

16. Rebecca Munk, Per Klemm; Cellular chain formation in *Escherichia coli* biofilms; *Microbiology Great Britain*; Febrero de 2009; 1407-1417

17. I. Lasa, J. L. del Pozo, J. R. Penadés, J. Leiva; Biofilms bacterianos e infección; Mayo de 2012

18. Iñigo Lasa; towards the identification of the common features of bacterial biofilm development; *international of microbiology*; 9:21-28; 2006

19. Rahul Mittal, Sudhir Aggarwal; Urinary tract infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*: A minireview; *Journal of Infection and Public Health*; August 2009; 101-111

20. Jeff G Lied; Bacterial Biofilms Resist Key Host Defenses; *Microbe*; 2009; 66-70

21. Glen C. Ulett, Amanda N. Mabbett; The Role of F9 fimbriae of uropathogenic *Escherichia coli* in biofilm formation; *Microbiology Great Britain*; 2007; 2321-2331

22. Plinio Lázaro Faleiro Naves; Formación de biopelículas por "*Escherichia coli*" y su correlación con factores de virulencia: prevención y actividad de antimicrobianos frente a organismos planctónicos y asociados a biopelículas; Madrid, 2010; ISBN: 978-84-692-8575-6

23. Bacterial biofilm formation in the urinary bladder of spinal cord injured patients; Department of Microbiology and Immunology, University of Western Ontario, London, Ontario, Canada; 1992

24. James A. Garnetta, Verónica I. Martínez-Santos; Structural insights into the biogenesis and biofilm formation by the *Escherichia coli* common pilus; *PNAS*; 2012

25. MANUAL DE SEMIOLOGIA UROLOGICA; Dr. Juan A. Hinostroza; Marzo del 2001

26. Dalet, F. (1999). El Sedimento Urinario: ¿Qué hay de nuevo en algo tan viejo?. *Revista Electrónica Diagnóstico In Vitro*, 1.

27. Rosario Alors Correderas ESTUDIO MICROBIOLÓGICO DE LA ORINA: UROCULTIVO; Enero 2009

28. Albers, A. C., and R. D. Fletcher. "Accuracy of calibrated-loop transfer." *Journal of clinical microbiology* 18.1 (1983): 40-42.

29. KasS EH. Bacteriuria and the diagnosis of infections of the urinary tract; with observations on the use of methionine as a urinary antiseptic. *AMA Arch Intern Med.* 1957 Nov;100(5):709-14.
30. Littlewood, J. M., S. I. Jacobs, and C. H. Ramsden. "Comparison between microscopical examination of unstained deposits of urine and quantitative culture." *Archives of disease in childhood* 52.11 (1977): 894-896
31. Karen Ejrnæs; Bacterial Characteristics of Importance for Recurrent Urinary Tract Infections Caused by *Escherichia coli*; *Danish Medical Bulletin*; 2011; B4187
32. M.C. Gancedo García, M.C. Hernández Gancedo; Infección urinaria aguda y recurrente; *Pediatr Integral* 2005;IX(5):317-324.
33. Sistema nacional de vigilancia epidemiológica; Panorama epidemiológico de la infecciones de vías urinarias en México 2003-2008; sistema único de información, secretaria de salud ISSN 1405-2636
34. Sistema nacional de vigilancia epidemiológica; Información epidemiológica de morbilidad; Anuario 2011, versión ejecutiva; secretaria de salud
35. MANUAL DE PRACTICAS, BIOQUIMICA CLINICA; UNAM facultad de química; 2009
36. Abirami, K., & Tiwari, S. C. (2001). Urinalysis in Clinical Practice (Akin to Liquid Kidney Biopsy). *Indian Academy of Clinical Medicine*, 2, 39-50.
37. Control de calidad para el laboratorio clínico, biorad, 2008
38. El laboratorio clínico: preanalítica de las muestras de orina 2007; Dra. Guadalupe Ruiz Martina: especialista en análisis clínicos.
39. Abirami, K., & Tiwari, S. C. (2001). Urinalysis in Clinical Practice (Akin to Liquid Kidney Biopsy). *Indian Academy of Clinical Medicine*, 2, 39-50.
40. Carlos Bantar, Horacio Lopardo; UROCULTIVO: PROCESAMIENTO, CRITERIOS DE INTERPRETACION E INFORME; Laboratorio Britania; 1997
41. Manual de procedimientos bacteriológicos en infecciones intrahospitalarias: Rosa Sacsquispe contrelas, laboratorio e bacteriología especial, centro nacional en salud pública instituto nacional de salud, Peru.
42. <http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/mp10318.pdf>.
43. Echevarría-Zarate, J., Sarmiento Aguilar, E., & Osoreo-Plenge, F. (2006). Infección del tracto urinario y manejo antibiótico. *Acta Medica Peruana*, 23(1), 26-31

44. Kunin CM, White LV, Hua TH. A reassessment of the importance of 'low-count' bacteriuria in young women with acute urinary symptoms. *Ann Intern Med.* 1993;119:454-560.
45. Stamm WE, Counts GW, Running KR, Fihn S, Turck M, Holmes KK. Diagnosis of coliform infection in acutely dysuric women. *N Engl J Med.* 1982;307:463-468.
46. Komaroff AL. Urinalysis and urine culture in women with dysuria. *Ann Intern Med.* 1986;104:212-218.
47. Hooton TM, Scholes D, Stapleton AE, et al. A prospective study of asymptomatic bacteriuria in sexually active young women. *N Engl J Med.* 2000;343(14):1037-1039.
48. Members of the Jury of the Consensus Conference on nosocomial urinary tract infections (NUTI) in adult patients. Consensus conference 2002, short text / Médecine
49. Cavagnaro, S. M. (2005). Infección urinaria en la infancia. *Revista chilena de infectología*, 22(2), 161-168.
50. Hooton, Thomas M. "Uncomplicated urinary tract infection." *New England Journal of Medicine* 366.11 (2012): 1028-1037.
51. Yomayusa, N., & Altahona, H. (2004). Infección de la vía urinaria inferior. *Guías para manejo de urgencias.*
52. Raz R, Gennesin Y, Wasser J, Stoler Z, Rosenfeld S, Rottensterich E. Recurrent urinary tract infection in postmenopausal women. *Clin Infect Dis* 2000; 30: 152-156.
53. Nicolle, L. E. (2001). A practical guide to antimicrobial management of complicated urinary tract infection. *Drugs & aging*, 18(4), 243-254.
54. Wagenlehner FM, Cek M, Naber KG, Kiyota H, Bjerklund-Johansen TE. Epidemiology, treatment and prevention of healthcare-associated urinary tract infections. *World J Urol.* Feb 2012;30(1):59-67.
55. Johansen TE, Botto H, Cek M, et al. Critical review of current definitions of urinary tract infections and proposal of an EAU/ESIU classification system. *Int J Antimicrob Agents.* Dec 2011;38 Suppl:64-70
56. Griebing TL. Urinary tract infection in women. In: Litwin MS, Saigal CS, eds. *Urologic Diseases in America.* Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. Washington, D.C.: GPO; 2007. NIH publication 07–5512:587–619.

57. Estadística 2011 de, prevalencia y factores de riesgo, and infección urinaria según sexo y edad.
58. Schaeffer AJ, Stamey TA. Studies of introital colonization in women with recurrent urinary infections. *J Urol* 1975; 118: 221-224.
59. Brumfitt W, Gargan RA, Hamilton-Miller JM. Periurethral enterobacterial carriage preceding urinary infection. *Lancet* 1987; 1: 824-826.
60. Schaeffer AJ, Jones JM, Dunn JK. Association of in vitro *Escherichia coli* adherence to vaginal and buccal epithelial cells with susceptibility of women with recurrent urinary tract infections. *N Engl J Med* 1981; 304:1062-1066.
61. Smithson Amat, Alejandro. Factores dependientes del microorganismo y del huésped en la patogenia de las infecciones urinarias. Universitat de Barcelona, 2009.
62. Martín, M^a Teresa Maroto. "PATOLOGÍA URINARIA Y EMBARAZO." Servicio de Obstetricia y Ginecología; Hospital Universitario; Virgen de las Nieves; Granada ; 2013
63. Smaill F. Asymptomatic bacteriuria in pregnancy. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* Jun 2007;21(3):439-50.
64. Foxman, Betsy. "Urinary tract infection in postmenopausal women." *Current infectious disease reports* 1.4 (1999): 367-370.
65. Stamm, Walter E., and Raul Raz. "Factors contributing to susceptibility of postmenopausal women to recurrent urinary tract infections." *Clinical infectious diseases* 28.4 (1999): 723-725.
66. Nicolle, Lindsay E. "Urinary tract infection in geriatric and institutionalized patients." *Current opinion in Urology* 12.1 (2002): 51-55
67. Geerlings SE, Brouwer EC, Gaastra W, et al. Effect of glucose and pH on uropathogenic and non-uropathogenic *Escherichia coli* : studies with urine from diabetic and non-diabetic individuals. *J Med Microbiol* 1999;48(6).
68. Geerlings, S. E., Stolk, R. P., Camps, M. J., Netten, P. M., Collet, T. J., & Hoepelman, A. I. (2000). Risk factors for symptomatic urinary tract infection in women with diabetes. *Diabetes Care*, 23(12), 1737-1741.
69. Stapleton, A. (2002). Urinary tract infections in patients with diabetes. *The American journal of medicine*, 113(1), 80-84.
70. Stapleton, A. (2002). Urinary tract infections in patients with diabetes. *The American journal of medicine*, 113(1), 80-84.

71. <http://www.revista-portalesmedicos.com/revista-medica/tratamiento-de-las-infecciones-de-vias-urinarias/>
72. Lipsky, B. A. (1989). Urinary tract infections in men: epidemiology, pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Annals of internal medicine*, 110(2), 138-150.
73. Hummers-Pradier, E., et al. "Urinary tract infection in men." *International journal of clinical pharmacology and therapeutics* 42.7 (2004): 360-366.
74. Demilie, Tazebew, et al. "Diagnostic accuracy of rapid urine dipstick test to predict urinary tract infection among pregnant women in Felege Hiwot Referral Hospital, Bahir Dar, North West Ethiopia." *BMC research notes* 7.1 (2014): 481.
75. Devillé, Walter LJM, et al. "The urine dipstick test useful to rule out infections. A meta-analysis of the accuracy." *BMC urology* 4.1 (2004): 4.
76. Kouri, T., Fogazzi, G., Gant, V., Hallander, H., Hofmann, W., & Guder, W. G. (2000). European urinalysis guidelines. *SCANDINAVIAN JOURNAL OF CLINICAL AND LABORATORY INVESTIGATION SUPPLEMENTUM*.
77. Hänsch, G. M. (2012). Host defence against bacterial biofilms: "Mission impossible"? *ISRN Immunology*, 2012.
78. Pace, John L., Mark E. Rupp, and Roger G. Finch, eds. *Biofilms, infection, and antimicrobial therapy*. CRC Press, 2005.
79. Leid, J. G. (2009). Bacterial biofilms resist key host defenses. *Microbe*, 4(2), 66-70.
80. Valle, Jaione, et al. "Biofilm switch and immune response determinants at early stages of infection." *Trends in microbiology* 21.8 (2013): 364-371.
81. Bjarnsholt, T. (2013). The role of bacterial biofilms in chronic infections. *APMIS*, 121(s136), 1-58.
82. Short, F. L., Murdoch, S. L., & Ryan, R. P. (2014). Polybacterial human disease: the ills of social networking. *Trends in microbiology*, 22(9), 508-516.
83. Siebel, M. A. (1987). *Binary population biofilms* (Doctoral dissertation, Montana State University).
84. Hardie, K. R., & Heurlier, K. (2008). Establishing bacterial communities by 'word of mouth': LuxS and autoinducer 2 in biofilm development. *Nature Reviews Microbiology*, 6(8), 635-643.

85. Ryan, R. P., & Dow, J. M. (2011). Communication with a growing family: diffusible signal factor (DSF) signaling in bacteria. *Trends in microbiology*, 19(3), 145-152.
86. Kaplan, J. B., Izano, E. A., Gopal, P., Karwacki, M. T., Kim, S., Bose, J. L., ... & Horswill, A. R. (2012). Low levels of β -lactam antibiotics induce extracellular DNA release and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *MBio*, 3(4), e00198-12.
87. Lee, K. W. K., Periasamy, S., Mukherjee, M., Xie, C., Kjelleberg, S., & Rice, S. A. (2014). Biofilm development and enhanced stress resistance of a model, mixed-species community biofilm. *The ISME journal*, 8(4), 894-907.
88. Pratt, L. A., & Kolter, R. (1998). Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Molecular microbiology*, 30(2), 285-293.
89. Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R., & Lappin-Scott, H. M. (1995). Microbial biofilms. *Annual Reviews in Microbiology*, 49(1), 711-745.
90. Probert, H. M., & Gibson, G. R. (2002). Bacterial biofilms in the human gastrointestinal tract. *Current issues in intestinal microbiology*, 3(2), 23-27.
91. Jackson, D. W., Suzuki, K., Oakford, L., Simecka, J. W., Hart, M. E., & Romeo, T. (2002). Biofilm formation and dispersal under the influence of the global regulator CsrA of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 184(1), 290-301.
92. Allison, D. G., Evans, D. J., Brown, M. R., & Gilbert, P. (1990). Possible involvement of the division cycle in dispersal of *Escherichia coli* from biofilms. *Journal of bacteriology*, 172(3), 1667-1669.
93. Soto, S. M. (2014). Importance of biofilms in urinary tract infections: new therapeutic approaches. *Advances in Biology*, 2014.
94. Soto, S. M., Smithson, A., Martinez, J. A., Horcajada, J. P., Mensa, J., & Vila, J. (2007). Biofilm formation in uropathogenic *Escherichia coli* strains: relationship with prostatitis, urovirulence factors and antimicrobial resistance. *The Journal of urology*, 177(1), 365-368.