

ARTÍCULO DE REVISIÓN

Infecciones del tracto urinario, inmunidad y vacunación

Víctor Manuel Luna-Pineda^{1,2*}, Sara Ochoa¹, Ariadnna Cruz-Córdova¹, Vicenta Cázares-Domínguez¹, Fernanda Vélez-González¹, Rigoberto Hernández-Castro³ y Juan Xicotencatl-Cortes^{1*}

¹Laboratorio de Investigación en Bacteriología Intestinal, Hospital Infantil de México Federico Gómez; ²Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México; ³Departamento de Ecología de Agentes Patógenos, Hospital General Dr. Manuel Gea González. Ciudad de México, México

Resumen

Las infecciones del tracto urinario (ITU) se consideran como una de las principales causas de morbilidad en el mundo, y *Escherichia coli* uropatogénica (UPEC, por sus siglas en inglés) es el agente causal asociado a estas infecciones. La alta morbilidad generada por las ITU y la limitación de tratamientos debido al aumento de la resistencia bacteriana a los diversos antibióticos inducen la búsqueda de nuevas alternativas contra estas infecciones. El conocimiento que se ha generado acerca de la respuesta inmunitaria en el tracto urinario (TU) es importante para el desarrollo de estrategias efectivas en la prevención, el tratamiento y el control de las ITU. Los avances en las herramientas de biología molecular y bioinformática han permitido generar proteínas de fusión consideradas como biomoléculas potenciales para el desarrollo de una vacuna viable contra las ITU. Las adhesinas fimbriales (FimH, CsgA y PapG) de UPEC son factores de virulencia que contribuyen a la adherencia, la invasión y la formación de comunidades bacterianas intracelulares. Pocos estudios *in vivo* e *in vitro* han mostrado que las proteínas de fusión promueven una respuesta inmunitaria eficiente y de protección contra las ITU causadas por UPEC. Adicionalmente, la vía de inmunización intranasal con moléculas inmunogénicas ha generado una respuesta en la mucosa del TU en comparación contra otras vías de inmunización. El objetivo de esta revisión fue proponer un diseño de vacuna contra las ITU causadas por UPEC, describiendo el panorama general de la infección, el mecanismo de patogenicidad de la bacteria y la respuesta inmunitaria del huésped.

Palabras clave: *Escherichia coli* uropatogénica. Adhesina fimbrial. Proteínas de fusión. Infecciones del tracto urinario. Interleucina.

Urinary tract infections, immunity, and vaccination

Abstract

Urinary tract infections (UTI) are considered one of the main causes of morbidity worldwide, and uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) is the etiological agent associated with these infections. The high morbidity produced by the UTI and the limitation of antibiotic treatments promotes the search for new alternatives against these infections. The knowledge that has been generated regarding the immune response in the urinary tract is important for the development of effective strategies in the

Correspondencia:

*Víctor Manuel Luna-Pineda

E-mail: luna.pineda@hotmail.com

*Juan Xicotencatl-Cortes

E-mail: juanxico@yahoo.com

1665-1146/© 2018. Hospital Infantil de México Federico Gómez, impreso por Permanyer México SA de CV, todos los derechos reservados.

Fecha de recepción: 25-07-2017

Fecha de aceptación: 30-11-2017

DOI: 10.24875/BMHIM.M18000011

Disponible en internet: 13-04-2018

Bol Med Hosp Infant Mex. 2018;75:67-78

www.bmhim.com

UTI prevention, treatment, and control. Molecular biology and bioinformatic tools have allowed the construction of fusion proteins as biomolecules for the development of a viable vaccine against UTI. The fimbrial adhesins (FimH, CsgA, and PapG) of UPEC are virulence factors that contribute to the adhesion, invasion, and formation of intracellular bacterial communities. The generation of recombinant proteins from fimbrial adhesins as a single molecule is obtained by fusion technology. A few in vivo and in vitro studies have shown that fusion proteins provide an efficient immune response and protection against UTI produced by UPEC. Intranasal immunization of immunogenic molecules has generated a response in the urinary tract mucosa compared with other routes of immunization. The objective of this review was to propose a vaccine designed against UTI caused by UPEC, describing the general scenario of the infection, the mechanism of pathogenicity of bacteria, and the immune response of the host.

Key words: *Uropathogenic Escherichia coli. Fimbrial adhesion. Fusion proteins. Urinary tract infections. Interleukin.*

Infecciones del tracto urinario

Las infecciones del tracto urinario (ITU) son causadas principalmente por patógenos de origen intestinal que contaminan la uretra y ascienden hasta la vejiga. Adicionalmente, algunos factores propios de la bacteria o del hospedero favorecen la colonización del riñón, donde el uropatógeno asciende a través de los uréteres¹. Las ITU pueden ser adquiridas en la comunidad y en los hospitales, y están asociadas con elevadas tasas de morbilidad en todo el mundo². Estas ITU son clasificadas de acuerdo con el sitio de infección: orina (bacteriuria asintomática), vejiga (cistitis), riñón (pielonefritis) y sangre (bacteriemia)³. Las ITU también son caracterizadas con signos y síntomas generales tales como hematuria, piuria, disuria, frecuencia urinaria, urgencia, fiebre, además de dolor en la espalda baja y suprapúbico⁴.

En México, las ITU son un problema de salud pública por su alta morbilidad. Cada año se registran aproximadamente cuatro millones de casos⁵. Las poblaciones con alto riesgo de contraer ITU son los recién nacidos, las niñas en edad preescolar, las mujeres con actividad sexual y ambos sexos en la edad avanzada^{1,2}. Las ITU en la edad reproductiva representan la segunda causa de morbilidad en las mujeres, y en el embarazo son la causa más frecuente de complicaciones perinatales⁶. En el año 2016 se reportaron 3,149,091 de casos de ITU en mujeres, de los cuales 1,392,235 fueron en mujeres entre 20 y 44 años de edad⁶. En el sexo masculino, las ITU fueron la tercera causa de morbilidad, con 957,875 casos por año. La distribución está asociada con la edad; sin embargo, esta infección disminuye en los adultos mayores de 44 años⁶. Las ITU en la pubertad (15 a 19 años) representan la tercera causa de morbilidad, con 297,831 casos; en la edad pediátrica (< 15 años) causan 360,220 casos⁶. La prevalencia de las ITU en menores de un año es de 20,300 casos por año; adicionalmente, la frecuencia de

estas infecciones es del 0.4-1.0% en las niñas, del 0.1% en los niños circuncidados y del 0.7% en los niños no circuncidados^{6,7}.

Escherichia coli uropatogénica (UPEC, por sus siglas en inglés) es el agente causal en más del 80% de las ITU; sin embargo, las infecciones por catéter en los hospitales se han asociado también con otros géneros, como *Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus* y *Enterococcus*. La secuenciación completa de los genomas de las cepas clínicas de UPEC —F11, IAI39, UMN026, UTI89, 536, CFT073, ABU 83972 y VR50— ha mostrado que la adquisición de factores de virulencia ocurre en islas de patogenicidad, plásmidos y fagos a través de la transferencia horizontal de genes⁸. Estos factores de virulencia están localizados en la superficie bacteriana. Algunos de ellos, que la bacteria utiliza para colonizar el tracto urinario (TU) y para generar patología clínica, son exportados para anclarse en la membrana externa (Fig. 1)^{9,10}. El mecanismo de patogenicidad de UPEC inicia con la adherencia a través de la participación de adhesinas fimbriales (FimH, PapG, SfaS, FocH, CsgA y DrA) localizadas en la parte distal de diferentes fimbrias (tipo 1, P, S, F1C, curli y Dr, respectivamente)^{11,12}. La interacción de las adhesinas con los receptores (proteínas α-D-manosiladas, glicoesfingolípidos, ácido neuramínico, factor que acelera el decaimiento [Daf, por sus siglas en inglés] y proteínas de la matriz extracelular), localizados en las células del TU, activa diferentes vías de señalización (apoptosis) y contribuye a la colonización de las células del TU^{13,14}. La expresión de la α-hemolisina (HlyA, por sus siglas en inglés), la toxina autotransportadora secretada (Sat, por sus siglas en inglés) y el factor necrotizante citotóxico (CNF-1, por sus siglas en inglés) contribuye al aumento de la capacidad citotóxica en el TU¹⁰. La presencia de sistemas de captación de hierro (yersiniabactina y aerobactina) es necesaria para la persistencia y la colonización de UPEC en una zona anatómica con un bajo aporte de hierro⁹. La adherencia de UPEC a las células del TU es

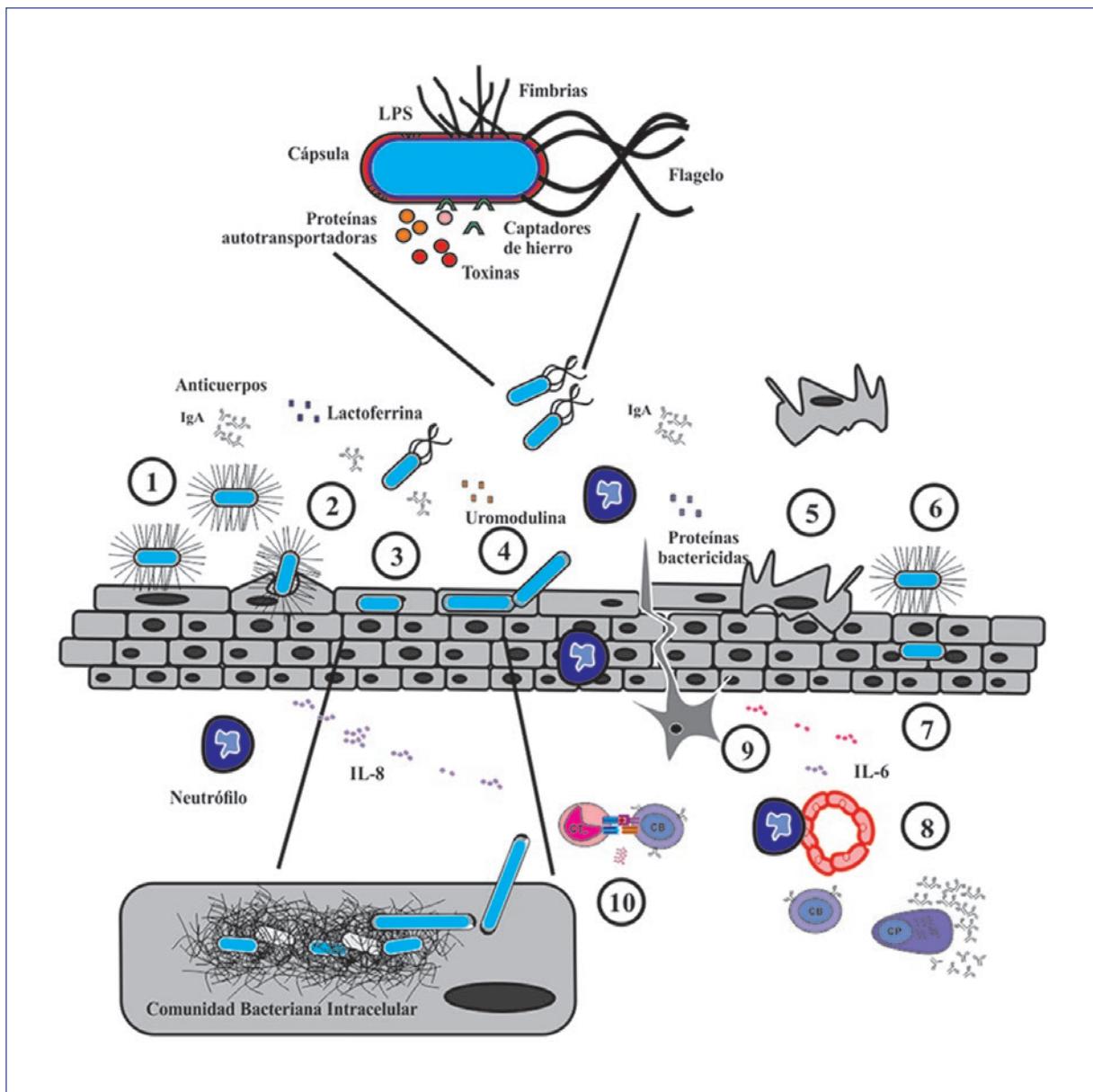


Figura 1. Mecanismo de patogenicidad de *Escherichia coli* uropatogénica (UPEC) en el tracto urinario (TU). La principal *E. coli* extraintestinal es UPEC, la cual puede colonizar el TU usando factores de virulencia (fimbrias, flagelo, cápsula, lipopolisacárido [LPS], proteínas autotransportadoras, toxinas y sideróforos). El mecanismo de patogenicidad se inicia por la adherencia íntima a las células superficiales del TU (1) activando un proceso de invasión (2), el cual permite a la bacteria permanecer intracelularmente para formar comunidades bacterianas intracelulares (3). La interacción de UPEC con la célula promueve un estado de oxidación intracelular, promoviendo la filamentación de la bacteria y su posterior eflujo por la lisis de la célula (4). La interacción célula-bacteria estimula un proceso de apoptosis y el desprendimiento de las células protectoras del TU, como un mecanismo de defensa en el TU (5). El epitelio intermedio del TU permanece expuesto y UPEC coloniza nuevamente para un nuevo ciclo de infección (6). Después de la reinfección, UPEC puede permanecer intracelularmente en estado quiescente hasta por varios meses (7). El eflujo de UPEC es estimulado por la misma bacteria o a través de la célula del huésped, saliendo y colonizando el TU. Por otro lado, la lactoferrina, la uromodulina, los anticuerpos IgA, la catelicidina y las defensinas son secretados por diversos tipos celulares del huésped para inhibir la unión de UPEC al TU. El uroepitelio produce IL-6 e IL-8, estimulando la migración de células de la respuesta inmunitaria, principalmente de neutrófilos (8). La activación de las células presentadoras del antígeno (APC, por sus siglas en inglés) por la captación de antígenos asociados a UPEC (9) permite la presentación de péptidos a las células T y la diferenciación de células B a células plasmáticas (CP) que producen inmunoglobulinas (10).

un proceso inicial que promueve la invasión para evitar el flujo de la orina, la actividad de anticuerpos y de proteínas con propiedades bactericidas, además de la acción de los antibióticos¹⁵. La invasión por UPEC ocurre a través de un mecanismo tipo zipper, un proceso que involucra la membrana celular del hospedero para envolver a la bacteria mediante la activación de varias proteínas (tirosina cinasa, fosfoinositol-3 [PI-3] cinasa y la proteína de control de división celular [Cdc, por sus siglas en inglés]) que promueven complejos entre componentes del citoesqueleto (como la actina, los microtúbulos y la vinculina)¹⁶. Interesantemente, UPEC es capaz de sobrevivir dentro de los macrófagos, un evento que contribuye a su diseminación en el TU¹⁷. En el citoplasma, UPEC inicia la formación de estructuras tipo biopelículas, denominadas comunidades bacterianas intracelulares (CBI), que se encuentran encapsuladas en vesículas fusiformes RAB27b⁺ (por las siglas en inglés de proteína relacionada con Ras) y están asociadas con filamentos intermedios de las células del TU¹⁸. La formación de CBI ocurre en tres etapas: estado temprano (formación), estado intermedio (maduración) y estado tardío (eflujo y liberación por las células del TU)¹⁹. La interacción del lipopolisacárido (LPS) con el receptor tipo Toll 4 (TLR-4, por sus siglas en inglés) favorece el aumento de monofosfato cíclico de adenosina (cAMP, por sus siglas en inglés) y la expulsión de UPEC envueltas en vesículas RAB27b^{+18,20,21}. La activación de TLR-4 por UPEC (LPS, FimH y PapG) genera un estado oxidativo intracelular, el cual promueve la filamentación por la inhibición de la división bacteriana²². El crecimiento de los filamentos de UPEC promueve la lisis celular del huésped, el eflujo de la bacteria y el inicio de un nuevo ciclo de infección^{23,24}. UPEC puede entrar en un estado quiescente por períodos prolongados en los exosomas, un mecanismo que favorece a la bacteria para pasar desapercibida por el sistema inmunitario²⁵. El canal 3 tipo mucolínico TRP (TRPML3, por sus siglas en inglés) se expresa en la superficie del exosoma y puede ser activado por UPEC, promoviendo la neutralización y la exocitosis de los exosomas con bacterias en estado quiescente²⁶. La salida de UPEC envuelta en vesículas fusiformes es probablemente promovida por la fusión con la membrana celular del uroepitelio utilizando vías alternas, las cuales tienen como finalidad el aumento de la superficie celular y la distención de la vejiga²⁷. La salida del estado quiescente de la bacteria favorece el proceso de reinfección del TU por la misma bacteria, lo que se define como ITU recurrente. Esta recurrencia favorece la presencia de pielonefritis y urosepsis²⁸. La patogenicidad de UPEC

por diferentes mecanismos promueve la colonización, la persistencia y la recurrencia de la infección, aunque el huésped también establece una respuesta inmunitaria contra las ITU (Fig. 1).

Respuesta inmunitaria en el tracto urinario

La vejiga es una mucosa constituida por tejido estratificado de tres a seis capas uroteliales, clasificadas en basal (5-10 µm de diámetro), intermedia (20 µm de diámetro) y de superficie (25-250 µm de diámetro); además, la submucosa contiene vasos sanguíneos y linfáticos²⁹. Las células presentadoras de antígeno (APC, por sus siglas en inglés), las células que expresan el complejo principal de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés) de clase II positivas a la proteína de diferenciación celular 11c (CD11c⁺, por sus siglas en inglés), las células F480⁺, las células dendríticas (DC, por sus siglas en inglés), los macrófagos y las células T-αβ y -γδ, han sido descritas como células residentes del sistema inmunitario en la mucosa³⁰. Las células del revestimiento del TU son la primera línea de defensa contra los uropatógenos y se caracterizan principalmente por secretar proteínas solubles, como la uromodulina. Esta proteína estimula la liberación de las interleucinas (IL) -1, -6 y -8, siendo las primeras moléculas detectadas en el TU después de la infección, las cuales generan la maduración de DC mieloides y la migración de fagocitos a la vejiga y al riñón^{31,32}. La uromodulina evita la adherencia de UPEC al TU por la inducción de agregados bacteria-uromodulina, facilitando la eliminación de la bacteria por el flujo de orina³³⁻³⁵.

Los TLR-2, TLR-4, TLR-5 y TLR-11 son receptores para el reconocimiento de patrones (PRR, por sus siglas en inglés) que son expresados en las células del TU y son capaces de iniciar una fuerte respuesta inmunitaria proinflamatoria^{30,36}. La activación temprana (2 horas posinfección) de PRR en las células del TU por UPEC favorece la liberación de IL-8, un quimiotractante que genera la migración de neutrófilos a la vejiga para el aclaramiento de la bacteria³². Los macrófagos residentes que no expresan el complejo 6 del antígeno linfocitario (LY6C⁻ locus C1, por sus siglas en inglés) en la submucosa del TU actúan como células vigía de uropatógenos; una vez activados, secretan el ligando 1 de la quimiocina motivo C-X-C (CXCL1, por sus siglas en inglés) y el factor de migración de macrófagos (MIF, por sus siglas en inglés), que reclutan un mayor número de neutrófilos. Mientras, el ligando 2

de la quimiocina motivo C-C (CCL2, por sus siglas en inglés) es secretado por macrófagos LY6C⁻ para su propio reclutamiento³⁷. Por debajo del uroepitelio se localizan células cebadas (mastocitos), que actúan como inmunomoduladoras durante las ITU, induciendo la liberación de citocinas proinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral (TNF, por sus siglas en inglés) y la histamina³⁸. De 6 a 12 horas posinfección, los mastocitos producen IL-10, que suprime la respuesta inmunitaria³⁹. Existen otras células del sistema inmunitario, conocidas como asesinas naturales (NK, por sus siglas en inglés), DC y T- $\gamma\delta$; sin embargo, su función ha sido poco estudiada en el TU. Modelos *in vivo* utilizando ratones deficientes en células NK mostraron que son más susceptibles a la infección por UPEC, probablemente por la liberación deficiente de TNF⁴⁰. De manera similar, ratones deficientes en el receptor de células T- $\gamma\delta$ son más susceptibles a las ITU comparados con ratones silvestres, debido a que estas células son fuente de IL-17⁴¹. Las DC identificadas en el TU han mostrado una amplia actividad durante las ITU, y su contribución en la respuesta inmunitaria aún no se ha definido específicamente⁴². La inmunidad adaptativa en la vejiga es limitada; en el riñón, se ha sugerido que puede generar la producción de anticuerpos específicos contra UPEC⁴³.

Cepas clínicas de UPEC multirresistentes y extremorresistentes

El aumento de cepas de UPEC multirresistentes (MDR, por sus siglas en inglés) y extremorresistentes (XDR, por sus siglas en inglés) ha complicado el tratamiento de las ITU, y ello ha impactado directamente en el costo y en la estancia hospitalaria⁴⁴. Se ha descrito la caracterización (perfil de resistencia, integrones y betalactamasas de espectro extendido [BLEE]) y la tipificación (genes de virulencia y grupos filogenéticos) de cepas clínicas de UPEC MDR y XDR aisladas de niños con ITU complicada. Brevemente, las cepas clínicas de UPEC MDR se agruparon dentro del filogrupo D y se asociaron con la presencia de integrones de clase 1 y 2. Las cepas de UPEC XDR se agruparon principalmente en el grupo de filogenéticos B2 y mostraron un fenotipo de BLEE. La distribución de los genes que codifican las adhesinas fimbriales FimH, CsgA y PapG variante II se identificaron en ambos grupos de cepas clínicas de UPEC⁴⁵. Es importante señalar que una disminución significativa de las ITU requiere la contribución de nuevas vacunas viables que generen

una protección eficiente contra las cepas de UPEC MDR y XDR.

Vacunación

Las vacunas disponibles son dirigidas principalmente a la respuesta inmunitaria sistémica, debido a la dificultad de estimular la inmunidad de la mucosa⁴⁶. Diferentes antígenos de UPEC (antígeno O, FimCH [FimH unida a la chaperona FimC], PapDG [PapG unida a la chaperona PapD], HlyA e IroN) han sido evaluados después de la inmunización parenteral en modelos animales, generando una respuesta específica sistémica y no en la mucosa⁴⁷⁻⁵⁰. La inmunogenicidad en la mucosa es inducida eficazmente por la administración de antígenos por vía intranasal, intravaginal y oral, mientras que con la administración parenteral se obtiene una respuesta no eficiente⁵¹. La vacuna SolcoUrovac® (lisados de uropatógenos), administrada por vía vaginal, reduce significativamente las ITU recurrentes en fase clínica II⁵². Sin embargo, con la administración de la vacuna por vía vaginal se han observado reacciones adversas manifestadas por dolor e irritación del epitelio vaginal⁵³. La administración oral del inmunomodulador UROstim estimula una respuesta celular y humoral, pero sin generar protección contra la infección⁵⁴. La administración diaria de OM-89/Uro-Vaxom® por vía oral logra una reducción de las ITU recurrentes; sin embargo, esta vía de inmunización genera tolerancia inmunitaria y manifestaciones gastrointestinales⁵⁵. La inmunización por vía transuretral con cepas de UPEC atenuadas en ratones no es persistente en el TU y da lugar a una protección inespecífica⁵⁶. La inmunización intranasal con diferentes antígenos de UPEC (ChuA, Hma, Iha, IreA, IroN, IutA y FimH) activa la liberación de altas concentraciones de IgA en la saliva, la vagina y la orina^{57,58}. Recientemente se ha demostrado que los anticuerpos contra las adhesinas fimbriales generan una disminución en la adherencia y la invasión bacteriana, y por lo tanto una protección en las células de vejiga humana contra la colonización por UPEC⁵⁹. La vacunación intranasal con adhesinas fimbriales puede ser la mejor vía para generar una respuesta inmunitaria humoral con anticuerpos IgA en la mucosa del TU para proteger al huésped contra las ITU por UPEC.

Vacunación intranasal

El tejido linfoide asociado a mucosas (MALT, por sus siglas en inglés) incluye NALT (tejido linfoide asociado

a nasofaringe), BALT (tejido linfoide asociado a bronquios), GALT (tejido linfoide asociado a intestino, incluyendo placas de Peyer y folículos linfoides), órganos genitourinarios, además de las glándulas mamaria y salival. Estas mucosas están funcionalmente conectadas como un sistema inmunitario de mucosas común, con un sitio inductor (células T y B inactivas) y un sitio efector (células T y B efectoras)^{60,61}.

La administración de vacunas por vía intranasal con dosis bajas de antígeno induce una respuesta inmunitaria en la mucosa nasal, oral y urogenital, en comparación con otras vías de inmunización⁶². La inmunización intranasal en ratones con una proteína de fusión basada en adhesinas de UPEC y de la bacteria *Proteus* ha estimulado la producción de anticuerpos IgG e IgA en muestras de suero, lavado nasal, lavado vaginal y orina⁶³. Por otro lado, seis proteínas relacionadas con la captación de hierro de UPEC administradas a ratones CBA/J por vía intranasal generaron una respuesta sistémica y de mucosa con títulos altos de anticuerpos IgM, IgG y IgA, así como una respuesta celular caracterizada por la inducción de interferón gamma (IFN- γ) y de IL-17⁵⁸. El tipo de adyuvante es importante para obtener una inmunización efectiva; sin embargo, en esta revisión, el enfoque se centra en describir únicamente el compuesto monofosforil lípido A (MPL) derivado del LPS de *Salmonella*⁶⁴. El MPL es un adyuvante efectivo con propiedades inmunoestimuladoras, como el LPS, pero carece de toxicidad⁶⁵. Las vacunas formuladas con las proteínas de superficie del virus de la hepatitis B, toxoide tetánico y antígenos de influenza supplementados con el adyuvante MPL han mostrado altos títulos de anticuerpos IgA en muestras de lavados de la mucosa vaginal⁶⁶. Adicionalmente, se han observado altos títulos de anticuerpos IgG1 e IgG2 en sueros de ratones inmunizados por vía intranasal; los anticuerpos IgA también se han localizado en el sitio efector (lavado traqueal) y en la mucosa distal (lavado vaginal). Las vacunas formuladas con MPL inducen una inmunidad sistémica característica de una respuesta tipo Th1⁶⁶.

Adhesinas fimbriales y respuesta inmunitaria

Diversos estudios han descrito la patogenicidad de la bacteria, la respuesta inmunitaria en el TU y las vacunas evaluadas contra las ITU. Estos datos se han empleado para el desarrollo de estrategias efectivas en la prevención, el tratamiento y el manejo de las ITU causadas por la aparición de cepas de UPEC MDR y

XDR. Las vacunas contra las ITU son generadas a partir de proteínas de UPEC (adhesinas fimbriales, autotransportadores, toxinas, sideróforos, flagelo y proteínas de la membrana externa) localizadas en la superficie de la bacteria, involucradas en el mecanismo de patogenicidad, expresadas durante la infección y consideradas como estimuladoras de la respuesta inmunitaria del hospedero⁶⁷. UPEC produce las adhesinas FimH localizada en la parte distal de la fimbria tipo 1, PapG en la fimbria P, SfaS en la fimbria S, Focl en la fimbria F1C, DraA en la fimbria Dr y CsgA en la fimbria curli. Estas adhesinas fimbriales participan en gran medida en la adherencia y la colonización de las células del TU¹¹. La fimbria tipo 1 está ampliamente distribuida (80-90%) en las cepas de UPEC, y relacionada con procesos de adherencia, invasión y formación de CBI en el TU⁶⁸. El gen csgA, que codifica la proteína CsgA de la fimbria curli, se ha identificado en la mayoría ($\geq 95\%$) de las cepas de UPEC, y se caracteriza por participar en procesos de cistitis y uropatía⁶⁹⁻⁷¹. La fimbria P tiene una distribución del 35-45% en cepas de UPEC y participa en la colonización del riñón mediante la interacción con globoceramidas, que son expresadas en la superficie de las células renales. La diversidad de globoceramidas ha favorecido la aparición de tres variantes alélicas del gen papG: papG_{J96} (variante I), papG_{AD/IA2} (variante II) y prsG_{J96} (variante III)⁷². Es importante mencionar que las adhesinas FimH, CsgA y PapG (variante II) son relevantes en la patogénesis de UPEC, además de tener una amplia distribución en comparación con otras adhesinas fimbriales. Por lo tanto, estas adhesinas pueden ser consideradas biomoléculas viables para la generación de una vacuna eficaz que estimule una respuesta inmunitaria.

Inmunogenicidad de FimH

La adhesina FimH de la fimbria tipo 1 es ampliamente utilizada como vacuna en modelos animales. El suero de ratones C3H/HeJ inmunizados con FimH y la fimbria tipo 1 inhibe la adherencia a células humanas de vejiga⁷³. El dominio de unión a la manosa de FimH, la proteína completa y en asociación con FimC (chaperona) reducen significativamente la adherencia en la vejiga y el riñón de ratones y de monos *cynomolgus*. Estos datos sugieren que los anticuerpos específicos anti-FimH inhiben la colonización de UPEC^{49,74-76}. Las vacunas multivalentes generadas con diversos factores de virulencia de la superficie bacteriana son consideradas biomoléculas funcionales por su capacidad

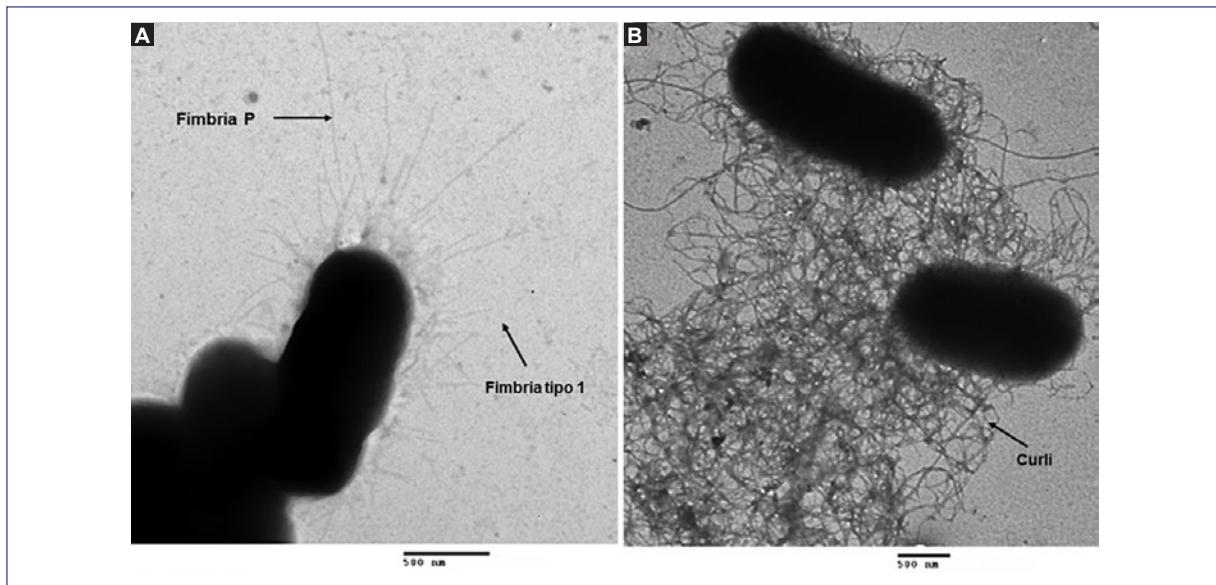


Figura 2. Visualización de las fimbrias en la cepa de UPEC U52 por microscopía electrónica de transmisión. A la izquierda se muestra una micrografía de la cepa UPEC U52 en la que pueden verse fimbrias cortas y largas, que corresponden a las fimbrias tipo 1 y P, respectivamente. Morfológicamente, ambas son rectas y delgadas. A la derecha se muestra otra micrografía en la que se observan fibras finas en forma de rizos flexibles que forman estructuras amiloideas denominadas curli. Las micrografías fueron generadas en la Central de Instrumentación de Microscopía de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, bajo la asesoría del Dr. Edgar Oliver López Villegas. La barra inferior corresponde a una escala de 500 nm.

inmunógena. La proteína recombinante FimH fusionada con FliC induce un aumento de la respuesta inmunitaria celular y humoral contra las ITU en un modelo de ITU en ratón. Además, se han identificado valores altos de inmunoglobulinas (IgG1 e IgG2a) y la liberación de citocinas (IFN- γ e IL-4) por las células T (Th1 y Th2) después de la inmunización subcutánea⁷⁷. La proteína de fusión de FimH (UPEC) y MrpH (*Proteus mirabilis*) induce significativamente la expresión de anticuerpos IgG e IgA en diversas muestras de ratón (suero, orina, lavado nasal y vaginal) después de la inmunización por vía intranasal. La inmunidad celular de tipo Th1 y Th2, generada por las proteínas FimH/MrpH con o sin adyuvante MPL, sugiere que una de estas proteínas funciona como molécula adyuvante⁶³. La proteína FimH interacciona con el TLR-4 a través de un coreceptor α -manosilado que favorece la activación de las células epiteliales CD4 $^+$ mediante la vía Tirap-MyD88 para el reclutamiento de neutrófilos en la mucosa^{78,79}.

Inmunogenicidad de CsgA

La proteína CsgA ha sido considerada como una adhesina involucrada en la adherencia de UPEC a las células de la vejiga⁷¹. Los títulos altos de anticuerpos

anti-CsgA identificados en sueros de pacientes convalecientes de sepsis sugieren que esta proteína es expresada *in vivo*. Sin embargo, la inmunogenicidad de esta proteína en UPEC no ha sido estudiada, aunque la fimbria curli de otras *E. coli* induce significativamente la liberación de citocinas proinflamatorias, como TNF- α , IL-6 e IL-8, en células de macrófagos⁸⁰. La proteína recombinante CsgA de *Salmonella* y la fimbria curli de *E. coli* MC4100 participan en la liberación de IL-8 en células de macrófagos humanos THP-1 por la interacción cooperativa de TLR-1 y TLR-2⁸¹. La proteína CsgA también se ha considerado como un PAMP (siglas en inglés de patrón molecular asociado a patógenos), que genera una respuesta de IL-6 e IL-1 β mediante la vía del inflamósoma (NLRP3)^{82,83}.

Inmunogenicidad de PapG

La adhesina PapG de UPEC ha sido involucrada en procesos de pielonefritis en humanos⁸⁴. La interacción de PapG con un coreceptor del TLR-4 con características de esfingolípido activa la secreción de IL-6 e IL-8^{78,85}. La inmunización intraperitoneal de la fimbria completa y de un complejo proteico de PapDG induce la producción de anticuerpos específicos en sueros de

Tabla 1. Análisis bioinformático de las propiedades fisicoquímicas e inmunológicas de las proteínas fusión

Proteínas de fusión	No. de aminoácidos	Peso molecular	ΔG (kcal/mol)	Epítopos lineales	Epítopos conformacionales	Péptidos MHC de clase II
FC	417	43.09	-11,912.82	18	13	86
CP	450	48.83	-7,040.78	27	12	68
PF	617	66.4	-7,140.54	32	8	147
FCP	751	79.85	-13,866.68	32	17	149
CPF	751	79.85	-13,343.83	33	14	152
PFC	751	79.85	-13,577.65	33	13	159

C: CsgA; F: FimH; ΔG: Energía libre de Gibbs; MHC: Complejo principal de histocompatibilidad; P: PapG.

ratón y mono *cynomolgus*; además, cortes histológicos muestran una protección contra la inflamación del riñón^{47,86}. Sin embargo, se observaron diferencias no significativas entre el número de bacterias recuperadas en orina y el grupo control, probablemente por la expresión de otras fimbrias que contribuyen en la colonización bacteriana⁴⁷.

Proteínas de fusión multiméricas

Las proteínas recombinantes generadas por tecnología de fusión para la incorporación de antígenos de uno o más patógenos han conferido una mayor respuesta inmunitaria y protección en modelo animal contra las ITU^{63,87}. Estos antígenos o biomoléculas son conocidos como quimeras o proteínas de fusión. Recientemente se han demostrado la importancia y la distribución de las fimbrias tipo 1 (FimH), curli (CsgA) y P (PapG) en cepas de UPEC aisladas de pacientes pediátricos⁴⁵. Estas cepas de UPEC MDR y XDR contienen factores de resistencia a diferentes familias de antibióticos, lo cual reduce las opciones de tratamiento⁴⁵.

El presente grupo de investigación ha diseñado, en el Laboratorio de Investigación de Bacteriología Intestinal, una biomolécula funcional para la generación de una vacuna viable que permita disminuir las ITU en México. La biomolécula de fusión ha sido construida a partir de las adhesinas FimH, CsgA y PapG variante II de la fimbria tipo 1, curli y P de UPEC, respectivamente (Fig. 2). Los resultados teóricos de las proteínas de fusión son estables, con un alto número de epítopos lineales, conformacionales y péptidos con afinidad por el MHC de clase II (Tabla 1). Los ensayos de bioactividad de estas proteínas aumentan la liberación de IL-6 e IL-8 en células de vejiga humana HTB-5, con un máximo de 521.24 pg/ml para FCP (FimH-CsgA-PapG)

y 450.4 pg/ml para FC (FimH-CsgA). La antigenicidad de las proteínas de fusión usando suero y orina de pacientes con ITU reconocen altos títulos de IgA, en comparación con las muestras de pacientes con urocultivo negativo (sin presencia de leucocitos ni nitritos en orina y sin síntomas de ITU). Los anticuerpos polyclonales de conejo contra las proteínas de fusión reducen la adherencia de UPEC a las células de vejiga HTB-5, mostrando una inhibición del 73% para la proteína dimérica FC⁵⁹.

Los datos generados por nuestro grupo de trabajo mostraron que el uso de dos o más moléculas involucradas en la patogénesis de UPEC puede considerarse una nueva forma de potenciar la respuesta inmunitaria contra las ITU (Fig. 3 A). Las vacunas multiméricas contra las ITU pueden ser diseñadas a partir de los diversos antígenos que son expresados en las cepas de UPEC. Otros estudios han mostrado que la proteína de fusión con FimH de UPEC y MrpH de *P. mirabilis* (MrpH/FimH) genera una respuesta inmunitaria y una protección contra ambas bacterias. De manera interesante, la inmunización intranasal de ratones BALB/c con la proteína de fusión FimH/MrpH genera una misma actividad inmunógena⁶³. Las proteínas de fusión que incluyen PAMP inducen una respuesta específica, potente y rápida, en ausencia de adyuvante⁸⁸. El reconocimiento específico de PAMP es mediado principalmente por TLR, un PRR que estimula cambios en la presentación del antígeno y la activación celular³⁶. El TLR-4 es activado por la interacción con la proteína FimH mediante un coreceptor α-manosilado que estimula la vía MyD88-NFκB, la cual estimula la liberación de IL-6 e IL-8. El TLR-4 es activado también por la interacción de la adhesina PapG con el coreceptor glicoesfingolípido, la cual promueve la vía Tram/Trif-NFκB, induciendo la liberación de IL-6 e IL-8, además de la migración de neutrófilos al

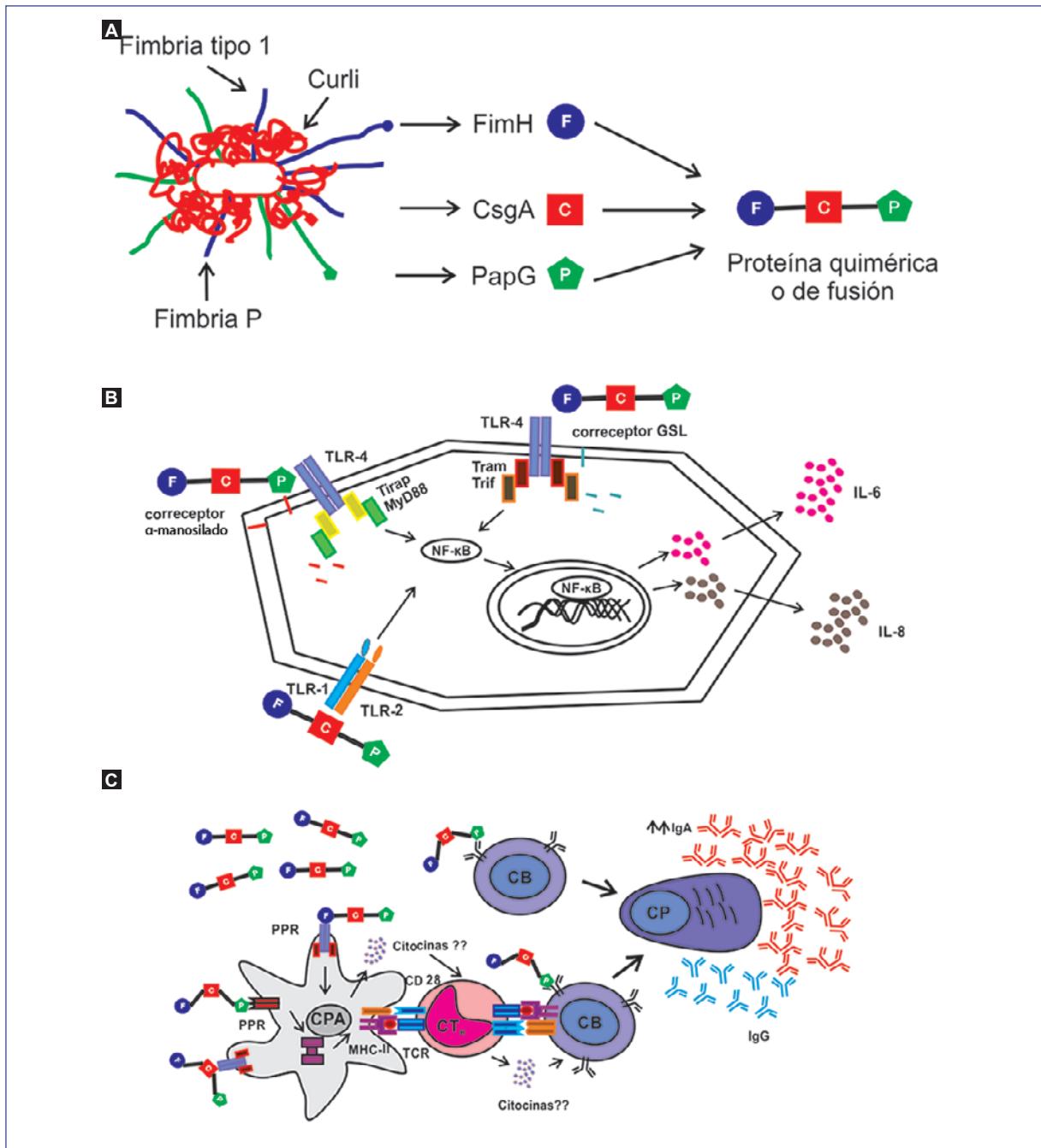


Figura 3. Propuesta de un mecanismo de interacción de las proteínas de fusión con el sistema inmunitario. **A:** Las adhesinas fimbriales FimH, PapG y CsgA unidas con la secuencia repetida EAAAK pueden potenciar la respuesta inmunitaria contra las infecciones del tracto urinario (ITU). **B:** La proteína FimH activa al TLR-4 mediante un correceptor α -manosilado por la vía MyD88-NF κ B, y la adhesina PapG por la interacción con un correceptor glicoesfingolípido que promueve la vía Tram/Trif-NF κ B. Ambas vías de señalización celular promueven la liberación de IL-6 e IL-8, seguido de la migración de neutrófilos al uroepitelio. La adhesina CsgA interacciona con el complejo TLR1/TLR2 generando una mayor estimulación en la liberación de IL-6 e IL-8 mediante la vía MyD88-NF κ B. **C:** La interacción de las adhesinas FimH, CsgA y PapG con PRR puede aumentar la activación rápida y la presentación de epítopos en la APC. Algunas de estas adhesinas pueden funcionar como un adyuvante eficaz y seguro. La célula B puede actuar como APC, presentar los péptidos para la activación de la célula T cooperadora y activarse ella misma. Posteriormente, generarán células plasmáticas que secrete anticuerpos específicos contra los diferentes epítopos de las adhesinas en sueros y orinas de pacientes con ITU.

uroepitelio⁷⁸. Ambas adhesinas generan un aumento en la liberación de citocinas, como ha sido demostrado por este grupo de trabajo⁵⁹. Adicionalmente, la adhesina CsgA, otra proteína con propiedades de adhesión, puede interaccionar con el complejo TLR-1/TLR-2 y generar una mayor estimulación en la liberación de IL-6 e IL-8 mediante la vía MyD88-NFkB (Fig. 3 B)^{81,83}. La interacción de PRR con las proteínas de fusión generadas a partir de diferentes adhesinas (FimH, CsgA y PapG) probablemente puede generar la activación rápida y la presentación de los diferentes antígenos en la APC. En casos específicos, algunos de los PAMP pueden servir como un adyuvante eficaz y seguro. La célula B puede tener la capacidad de actuar como APC y presentar los péptidos para la activación de la célula T cooperadora⁸⁹. Así mismo, puede activarse ella misma para generar una célula plasmática que secreta anticuerpos específicos contra los diferentes epítopos de las adhesinas, de los cuales se ha demostrado su presencia en sueros y orinas de pacientes con ITU (Fig. 3 C)⁵⁹. La finalidad es la generación de anticuerpos de mucosa del isotipo IgA, específicos contra las principales fimbrias y con capacidad para bloquear el paso inicial de la patogenicidad de UPEC en las ITU, como se ha demostrado en los ensayos de inhibición⁵⁹.

Perspectivas

Las ITU por UPEC están asociadas con la expresión de múltiples factores de virulencia ensamblados en la superficie bacteriana. La prevención de la adherencia, como el paso inicial y fundamental en la colonización del TU, puede ser la vía para la prevención de las ITU. La adherencia es mediada por adhesinas fimbriales con capacidad antigénica e inmunogénica. Sin embargo, la variedad y la regulación en la expresión de las fimbrias han limitado la eficiencia en la vacunación con formulaciones simples. El uso de biomoléculas como formulaciones multiméricas es viable por los avances de la bioinformática, la biología molecular y los protocolos de purificación de proteínas. El aumento en el número de epítopos y péptidos durante la sinapsis inmunitaria puede generar anticuerpos con capacidad protectora contra la adherencia de UPEC al TU. La ventaja de emplear componentes multiméricos en la generación de una proteína de fusión es la posibilidad de que una de esas proteínas pueda funcionar como adyuvante alterno y, por lo tanto, evitar el uso de adyuvantes sintéticos en la formulación. La inmunización por vía intranasal ha generado grandes beneficios en la inducción de una respuesta inmunitaria de mucosas distantes a la

mucosa nasal. Bajo este esquema de inmunización, se considera que la administración de una proteína de fusión multimérica puede activar las células del sistema inmunitario en el NALT, migrar a su sitio efectivo en el TU y producir anticuerpos IgA para proteger al hospedero contra la infección por UPEC.

Conclusiones

Los antígenos localizados en la superficie bacteriana, expresados *in vivo* e involucrados en mecanismos de patogenicidad, son viables para la generación de proteínas de fusión multiméricas, las cuales pueden ser utilizadas para el desarrollo de nuevas vacunas contra las ITU. Los nuevos datos generados a partir de las proteínas de fusión sugieren que estas biomoléculas pueden ser consideradas como vacunas funcionales sin el uso de adyuvantes en las formulaciones contra las ITU. La inmunización intranasal de vacunas ha sido la mejor vía de administración por su capacidad de generar una respuesta inmunitaria en la mucosa del TU. Sin embargo, deben realizarse más estudios enfocados en la respuesta inmunitaria celular y humorada en el TU.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Financiamiento

El artículo de revisión fue financiado por CONACyT-Problemas Nacionales (2016) con el número de cuenta 1764 y por Fondos Federales del Hospital Infantil de México Federico Gómez con los siguientes números de registro: HIM/2014/014 SSA.1117, HIM/2016/024 SSA.1239, HIM/2016/027 SSA.1240 y HIM/2017/002 SSA.1298.

Agradecimientos

Agradecemos al Dr. Edgar Oliver López Villegas por el procesamiento y la obtención de las micrografías.

Víctor M. Luna-Pineda es alumno del doctorado en el Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y recibió una beca de CONACyT número 261764.

Conflictos de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Foxman B. The epidemiology of urinary tract infection. *Nat Rev Urol*. 2010;7:653-60.
2. Foxman B. Urinary tract infection syndromes: occurrence, recurrence, bacteriology, risk factors, and disease burden. *Infect Dis Clin North Am*. 2014;28:1-13.
3. Foxman B. Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. *Am J Med*. 2002;113:5S-13S.
4. Kumar S, Dave A, Wolf B, Lerma EV. Urinary tract infections. *Dis Mon*. 2015;61:45-59.
5. Secretaría de Salud. Panorama epidemiológico de las infecciones de vías urinarias en México 2003-2008. México, 2015. Disponible en: http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/2015/morbilidad/grupo/veinte_principales_causas_enfermedad_nacional_grupo_edad.pdf
6. Secretaría de Salud. Anuario de morbilidad 1984-2016. México; 2016. Disponible en: http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/html/morbilidad_nacional.html.
7. Schlager TA. Urinary tract infections in infants and children. *Infect Dis Clin North Am*. 2003;17:353-65.
8. Lloyd AL, Rasko DA, Mobley HLT. Defining genomic islands and uropathogen-specific genes in uropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 2007;189:3532-46.
9. Subashchandrabose S, Mobley HLT. Virulence and fitness determinants of uropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr*. 2015;3.
10. Emody L, Kerényi M, Nagy G. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli*. *Int J Antimicrob Agents*. 2003;22:29-33.
11. Antão E-M, Wieler LH, Ewers C. Adhesive threads of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Pathog*. 2009;1:22.
12. Spaulding CN, Hultgren SJ. Adhesive pili in UTI pathogenesis and drug development. *Pathogens*. 2016;5(1).
13. Lüthje P, Brauner A. Virulence factors of uropathogenic *E. coli* and their interaction with the host. *Adv Microb Physiol*. 2014;65:337-72.
14. Thumbikat P, Berry RE, Zhou G, Billips BK, Yaggie RE, Zaichuk T, et al. Bacteria-induced uroplakin signaling mediates bladder response to infection. *PLoS Pathog*. 2009;5:e1000415.
15. Dhakal BK, Kulesus RR, Mulvey MA. Mechanisms and consequences of bladder cell invasion by uropathogenic *Escherichia coli*. *Eur J Clin Invest*. 2008;38:2-11.
16. Dhakal BK, Mulvey MA. Uropathogenic *Escherichia coli* invades host cells via an HDAC6-modulated microtubule-dependent pathway. *J Biol Chem*. 2009;284:446-54.
17. Bokil NJ, Totsika M, Carey AJ, Stacey KJ, Hancock V, Saunders BM, et al. Intramacrophage survival of uropathogenic *Escherichia coli*: differences between diverse clinical isolates and between mouse and human macrophages. *Immunobiology*. 2011;216:1164-71.
18. Bishop BL, Duncan MJ, Song J, Li G, Zaas D, Abraham SN. Cyclic AMP-regulated exocytosis of *Escherichia coli* from infected bladder epithelial cells. *Nat Med*. 2007;13:625-30.
19. Scott VCS, Haake DA, Churchill BM, Justice SS, Kim J-H. Intracellular bacterial communities: a potential etiology for chronic lower urinary tract symptoms. *Urology*. 2015;86:425-31.
20. Song J, Bishop BL, Li G, Grady R, Stapleton A, Abraham SN. TLR4-mediated expulsion of bacteria from infected bladder epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106:14966-71.
21. Song J, Bishop BL, Li G, Duncan MJ, Abraham SN. TLR4-initiated and cAMP-mediated abrogation of bacterial invasion of the bladder. *Cell Host Microbe*. 2007;1:287-98.
22. Justice SS, Lauer SR, Hultgren SJ, Hunstad DA. Maturation of intracellular *Escherichia coli* communities requires SurA. *Infect Immun*. 2006;74:4793-800.
23. Mulvey MA, Schilling JD, Martinez JJ, Hultgren SJ. Bad bugs and beleaguered bladders: interplay between uropathogenic *Escherichia coli* and innate host defenses. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97:8829-35.
24. Klein K, Palarash Y, Kolmos HJ, Möller-Jensen J, Andersen TE. Quantification of filamentation by uropathogenic *Escherichia coli* during experimental bladder cell infection by using semi-automated image analysis. *J Microbiol Methods*. 2015;109:110-6.
25. Leatham-Jensen MP, Mokszycki ME, Rowley DC, Deering R, Camberg JL, Sokurenko EV, et al. Uropathogenic *Escherichia coli* metabolite-dependent quiescence and persistence may explain antibiotic tolerance during urinary tract infection. *mSphere*. 2016;1:e00055-15.
26. Miao Y, Li G, Zhang X, Xu H, Abraham SN. A TRP channel senses lysosome neutralization by pathogens to trigger their expulsion. *Cell*. 2015;161:1306-19.
27. Truschel ST, Wang E, Ruiz WG, Leung S-M, Rojas R, Lavelle J, et al. Stretch-regulated exocytosis/endocytosis in bladder umbrella cells. *Mol Biol Cell*. 2002;13:830-46.
28. Kodner CM, Thomas-Gupton EK. Recurrent urinary tract infections in women: diagnosis and management. *Am Fam Physician*. 2010;82:638-43.
29. Lewis SA. Everything you wanted to know about the bladder epithelium but were afraid to ask. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2000;278:F867-74.
30. Ingorsoll MA, Albert ML. From infection to immunotherapy: host immune responses to bacteria at the bladder mucosa. *Mucosal Immunol*. 2013;6:1041-53.
31. Song J, Duncan MJ, Li G, Chan C, Grady R, Stapleton A, et al. A novel TLR4-mediated signaling pathway leading to IL-6 responses in human bladder epithelial cells. *PLoS Pathog*. 2007;3:e60.
32. Agace WW, Hedges SR, Ceska M, Svanborg C. Interleukin-8 and the neutrophil response to mucosal gram-negative infection. *J Clin Invest*. 1993;92:780-5.
33. Bates JM, Raffi HM, Prasad K, Mascarenhas R, Laszik Z, Maeda N, et al. Tamm-Horsfall protein knockout mice are more prone to urinary tract infection: rapid communication. *Kidney Int*. 2004;65:791-7.
34. Mo L, Zhu X-H, Huang H-Y, Shapiro E, Hasty DL, Wu X-R. Ablation of the Tamm-Horsfall protein gene increases susceptibility of mice to bladder colonization by type 1-fimbriated *Escherichia coli*. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2004;286:F795-802.
35. Säemann MD, Weichhart T, Zeyda M, Staffler G, Schunn M, Stuhlmeier KM, et al. Tamm-Horsfall glycoprotein links innate immune cell activation with adaptive immunity via a Toll-like receptor-4-dependent mechanism. *J Clin Invest*. 2005;115:468-75.
36. Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol*. 2001;2:675-80.
37. Schiow M, Weisheit C, Franken L, Gutweiler S, Dixit A, Meyer-Schweisinger C, et al. Crosstalk between sentinel and helper macrophages permits neutrophil migration into infected uroepithelium. *Cell*. 2014;156:456-68.
38. Shelburne CP, Nakano H, St John AL, Chan C, McLachlan JB, Gunn MD, et al. Mast cells augment adaptive immunity by orchestrating dendritic cell trafficking through infected tissues. *Cell Host Microbe*. 2009;6:331-42.
39. Chan CY, St John AL, Abraham SN. Mast cell interleukin-10 drives localized tolerance in chronic bladder infection. *Immunity*. 2013;38:349-59.
40. Gur C, Copenhagen-Glazer S, Rosenberg S, Yamin R, Enk J, Glasner A, et al. Natural killer cell-mediated host defense against uropathogenic *E. coli* is counteracted by bacterial hemolysinA-dependent killing of NK cells. *Cell Host Microbe*. 2013;14:664-74.
41. Jones-Carson J, Balish E, Uehling DT. Susceptibility of immunodeficient gene-knockout mice to urinary tract infection. *J Urol*. 1999;161:1338-41.
42. Engel D, Dobrindt U, Tittel A, Peters P, Maurer J, Gütgemann I, et al. Tumor necrosis factor alpha- and inducible nitric oxide synthase-producing dendritic cells are rapidly recruited to the bladder in urinary tract infection but are dispensable for bacterial clearance. *Infect Immun*. 2006;74:6100-7.
43. Ratner JJ, Thomas VL, Sanford BA, Forland M. Bacteria-specific antibody in the urine of patients with acute pyelonephritis and cystitis. *J Infect Dis*. 1981;143:404-12.
44. Flores-Mireles AL, Walker JN, Caparon M, Hultgren SJ. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nat Rev Microbiol*. 2015;13:269-84.
45. Ochoa SA, Cruz-Córdova A, Luna-Pineda VM, Reyes-Grajeda JP, Cázares-Domínguez V, Escalona G, et al. Multidrug- and extensively drug-resistant uropathogenic *Escherichia coli* clinical strains: phylogenetic groups widely associated with integrons maintain high genetic diversity. *Front Microbiol*. 2016;7:2042.
46. Lamm ME. Interaction of antigens and antibodies at mucosal surfaces. *Annu Rev Microbiol*. 1997;51:311-40.
47. Roberts JA, Kaack MB, Baskin G, Chapman MR, Hunstad DA, Pinkner JS, et al. Antibody responses and protection from pyelonephritis following vaccination with purified *Escherichia coli* PapDG protein. *J Urol*. 2004;171:1682-5.
48. Russo TA, McFadden CD, Carlino-MacDonald UB, Beanan JM, Olson R, Wilding GE. The siderophore receptor IroN of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* is a potential vaccine candidate. *Infect Immun*. 2003;71:7164-9.
49. Langermann S, Möllby R, Burlein JE, Palaszynski SR, Auguste CG, DeFusco A, et al. Vaccination with FimH adhesin protects cynomolgus monkeys from colonization and infection by uropathogenic *Escherichia coli*. *J Infect Dis*. 2000;181:774-8.

50. O'Hanley P, Lalonde G, Ji G. Alpha-hemolysin contributes to the pathogenicity of pilated digalactoside-binding *Escherichia coli* in the kidney: efficacy of an alpha-hemolysin vaccine in preventing renal injury in the BALB/c mouse model of pyelonephritis. *Infect Immun.* 1991;59:1153-61.
51. Levine MM. Immunization against bacterial diseases of the intestine. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2000;31:336-55.
52. Kochiashvili D, Khuskivadze A, Kochiashvili G, Koberidze G, Kvakhajelidze V. Role of the bacterial vaccine Solco-Urovac® in treatment and prevention of recurrent urinary tract infections of bacterial origin. *Georgian Med News.* 2014;(231):11-6.
53. Hopkins WJ, Elkhwajji J, Beierle LM, Leverton GE, Uehling DT. Vaginal mucosal vaccine for recurrent urinary tract infections in women: results of a phase 2 clinical trial. *J Urol.* 2007;177:1349-53.
54. Marinova S, Nenkov P, Markova R, Nikolaeva S, Kostadinova R, Mitov I, et al. Cellular and humoral systemic and mucosal immune responses stimulated by an oral polybacterial immunomodulator in patients with chronic urinary tract infections. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2005;18:457-73.
55. Bauer HW, Alloussi S, Egger G, Blümlein H-M, Cozma G, Schulman CC, et al. A long-term, multicenter, double-blind study of an *Escherichia coli* extract (OM-89) in female patients with recurrent urinary tract infections. *Eur Urol.* 2005;47:542-8.
56. Billips BK, Yaggie RE, Cashy JP, Schaeffer AJ, Klumpp DJ. A live-attenuated vaccine for the treatment of urinary tract infection by uropathogenic *Escherichia coli*. *J Infect Dis.* 2009;200:263-72.
57. Mike LA, Smith SN, Sumner CA, Eaton KA, Mobley HLT. Siderophore vaccine conjugates protect against uropathogenic *Escherichia coli* urinary tract infection. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2016;113:13468-73.
58. Alteri CJ, Hagan EC, Sivick KE, Smith SN, Mobley HLT. Mucosal immunization with iron receptor antigens protects against urinary tract infection. *PLoS Pathog.* 2009;5:e1000586.
59. Luna-Pineda VM, Reyes-Grajeda JP, Cruz-Córdova A, Saldaña-Ahuactzi Z, Ochoa SA, Maldonado-Bernal C, et al. Dimeric and trimeric fusion proteins generated with fimbrial adhesins of uropathogenic *Escherichia coli*. *Front Cell Infect Microbiol.* 2016;6:135.
60. McGhee JR, Fujihashi K. Inside the mucosal immune system. *PLoS Biol.* 2012;10:e1001397.
61. Kozlowski PA, Williams SB, Lynch RM, Flanigan TP, Patterson RR, Cu-Uvin S, et al. Differential induction of mucosal and systemic antibody responses in women after nasal, rectal, or vaginal immunization: influence of the menstrual cycle. *J Immunol.* 2002;169:566-74.
62. Brandtzæg P. Mucosal immunity: induction, dissemination, and effector functions. *Scand J Immunol.* 2009;70:505-15.
63. Habibi M, Asadi Karam MR, Shokrgozar MA, Oloomi M, Jafari A, Bouzari S. Intranasal immunization with fusion protein MrpH-FimH and MPL adjuvant confers protection against urinary tract infections caused by uropathogenic *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. *Mol Immunol.* 2015;64:285-94.
64. Baldridge JR, Crane RT. Monophosphoryl lipid A (MPL) formulations for the next generation of vaccines. *Methods.* 1999;19:103-7.
65. Ulrich JT, Myers KR. Monophosphoryl lipid A as an adjuvant. Past experiences and new directions. *Pharm Biotechnol.* 1995;6:495-524.
66. Baldridge JR, Yorgensen Y, Ward JR, Ulrich JT. Monophosphoryl lipid A enhances mucosal and systemic immunity to vaccine antigens following intranasal administration. *Vaccine.* 2000;18:2416-25.
67. Brumbaugh AR, Mobley HLT. Preventing urinary tract infection: progress toward an effective *Escherichia coli* vaccine. *Expert Rev Vaccines.* 2012;11:663-76.
68. Connell I, Agace W, Klemm P, Schembri M, Märild S, Svanborg C. Type 1 fimbrial expression enhances *Escherichia coli* virulence for the urinary tract. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93:9827-32.
69. Norinder BS, Köves B, Yadav M, Brauner A, Svanborg C. Do *Escherichia coli* strains causing acute cystitis have a distinct virulence repertoire? *Microb Pathog.* 2012;52:10-6.
70. Hung C, Marschall J, Burnham C-AD, Byun AS, Henderson JP. The bacterial amyloid curli is associated with urinary source bloodstream infection. *PLoS One.* 2014;9:e86009.
71. Cordeiro MA, Werle CH, Milanez GP, Yano T. Curli fimbria: an *Escherichia coli* adhesin associated with human cystitis. *Braz J Microbiol Publ Braz Soc Microbiol.* 2016;47:414-6.
72. Manning SD, Zhang L, Foxman B, Spindler A, Tallman P, Marrs CF. Prevalence of known P-fimbrial G alleles in *Escherichia coli* and identification of a new adhesin class. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2001;8:637-40.
73. Langermann S, Palaszynski S, Barnhart M, Auguste G, Pinkner JS, Burlein J, et al. Prevention of mucosal *Escherichia coli* infection by FimH-adhesin-based systemic vaccination. *Science.* 1997;276:607-11.
74. Thankavel K, Madison B, Ikeda T, Malaviya R, Shah AH, Arumugam PM, et al. Localization of a domain in the FimH adhesin of *Escherichia coli* type 1 fimbriae capable of receptor recognition and use of a domain-specific antibody to confer protection against experimental urinary tract infection. *J Clin Invest.* 1997;100:1123-36.
75. Langermann S, Ballou WR. Vaccination utilizing the FimCH complex as a strategy to prevent *Escherichia coli* urinary tract infections. *J Infect Dis.* 2001;183: 84-6.
76. Langermann S, Ballou WR. Development of a recombinant FimCH vaccine for urinary tract infections. *Adv Exp Med Biol.* 2003;539:635-48.
77. Asadi Karam MR, Oloomi M, Mahdavi M, Habibi M, Bouzari S. Vaccination with recombinant FimH fused with flagellin enhances cellular and humoral immunity against urinary tract infection in mice. *Vaccine.* 2013;31:1210-6.
78. Fischer H, Yamamoto M, Akira S, Beutler B, Svanborg C. Mechanism of pathogen-specific TLR4 activation in the mucosa: fimbriae, recognition receptors and adaptor protein selection. *Eur J Immunol.* 2006;36: 267-77.
79. Samuelsson P, Hang L, Wullt B, Irlja H, Svanborg C. Toll-like receptor 4 expression and cytokine responses in the human urinary tract mucosa. *Infect Immun.* 2004;72:3179-86.
80. Bian Z, Brauner A, Li Y, Normark S. Expression of and cytokine activation by *Escherichia coli* curli fibers in human sepsis. *J Infect Dis.* 2000;181:602-12.
81. Tükel C, Nishimori JH, Wilson RP, Winter MG, Keestra AM, van Putten JPM, et al. Toll-like receptors 1 and 2 cooperatively mediate immune responses to curli, a common amyloid from enterobacterial biofilms. *Cell Microbiol.* 2010;12:1495-505.
82. Bian Z, Yan ZQ, Hansson GK, Thorén P, Normark S. Activation of inducible nitric oxide synthase/nitric oxide by curli fibers leads to a fall in blood pressure during systemic *Escherichia coli* infection in mice. *J Infect Dis.* 2001;183:612-9.
83. Rapsinski GJ, Wynosky-Dolfi MA, Oppong GO, Tursi SA, Wilson RP, Brodsky IE, et al. Toll-like receptor 2 and NLRP3 cooperate to recognize a functional bacterial amyloid, curli. *Infect Immun.* 2015;83:693-701.
84. Lane MC, Mobley HLT. Role of P-fimbrial-mediated adherence in pyelonephritis and persistence of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) in the mammalian kidney. *Kidney Int.* 2007;72:19-25.
85. Frendéus B, Wachtler C, Hedlund M, Fischer H, Samuelsson P, Svensson M, et al. *Escherichia coli* P fimbriae utilize the Toll-like receptor 4 pathway for cell activation. *Mol Microbiol.* 2001;40:37-51.
86. Pechá B, Low D, O'Hanley P. Gal-Gal pili vaccines prevent pyelonephritis by pilated *Escherichia coli* in a murine model. Single-component Gal-Gal pili vaccines prevent pyelonephritis by homologous and heterologous pilated *E. coli* strains. *J Clin Invest.* 1989;83:2102-8.
87. Habibi M, Asadi Karam MR, Bouzari S. In silico design of fusion protein of FimH from uropathogenic *Escherichia coli* and MrpH from *Proteus mirabilis* against urinary tract infections. *Adv Biomed Res.* 2015;4:217.
88. Huleatt JW, Jacobs AR, Tang J, Desai P, Kopp EB, Huang Y, et al. Vaccination with recombinant fusion proteins incorporating Toll-like receptor ligands induces rapid cellular and humoral immunity. *Vaccine.* 2007;25:763-75.
89. Moser M, Leo O. Key concepts in immunology. *Vaccine.* 2010;28: 2-13.