



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

“DISTRIBUCIÓN DE LOS INTEGRONES
CLASE I Y CLASE II EN CEPAS VAGINALES
DE *Escherichia coli*”

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LIC. EN BIOLOGÍA

PRESENTA :

ROMERO MUÑOZ ALEJANDRO

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. GLORIA LUZ PANIAGUA CONTRERAS

PROYECTO FINANCIADO POR LA DGAPA

UNAM, PAPIIT IN218614



2018

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**“Nunca consideres el estudio como una obligación,
sino como una oportunidad para penetrar en el bello
y maravilloso mundo del saber.”**

Albert Einstein (1879-1955)

Dedicatoria

- ❖ *Dedico este trabajo de investigación a mis padres José Francisco y Esperanza, les estaré siempre muy agradecido por darme siempre la libertad de elegir qué carrera profesional estudiar y en el camino apoyarme para que este objetivo se concretara. Quizás mis decisiones no siempre fueron las que esperaron y llegue a cometer muchos errores, pero gracias a eso he crecido como persona y he aprendido de los errores que he cometido. Sé que fue un camino largo y muy duro, pero les aseguro que todo el esfuerzo que han dedicado para que pueda cumplir mis sueños significa mucho para mí, es algo que valoro infinitamente y que jamás dejare de agradecerles, todos mis logros son de ustedes.*
- ❖ *Agradezco a mi madre, Esperanza Muñoz, por ser un gran ejemplo para mí, me enseñaste a ser una persona honesta, humilde y trabajadora, siempre fuiste una gran motivación para mí, jamás dejaste de apoyarme, nunca me dejaste solo, fuiste mi mejor amiga y mi consejera en los momentos difíciles. Se perfectamente que sacrificaste muchas cosas por mi hermano y por mí y que siempre nos diste lo mejor de ti en todo momento, eres una madre ejemplar, he sido muy afortunado por ser tu hijo y te prometo que seguiré esforzándome para ser un hombre de bien y tener éxito en mi vida personal y laboral.*
- ❖ *Agradezco a mi padre José Francisco, por cuidar de mí en la salud y en la enfermedad, y por su apoyo que me brindo en el ámbito laboral, desde pequeño siempre me ayudaste en la escuela, poniéndome operaciones matemáticas y ayudándome en las lecturas, siempre me dejaste tomar mis propias decisiones y me apoyaste en cada una de ellas, estoy muy orgulloso de tenerte como padre y te agradezco porque tu jamás dudaste de mí, siempre nos consentiste mucho a mi hermano y a mí, fuiste mi compañero en la vida, contigo pase muchas aventuras, risas y momentos felices que jamás olvidare.*
- ❖ *Hermano, tu inteligencia y dedicación es un orgullo y un constante incentivo para seguir adelante. Eres una gran persona y te doy las gracias por tu apoyo, siempre has estado conmigo en las buenas y en las malas y me has ayudado y aconsejado cuando he tenido algún problema, contigo he pasado los momentos más felices de toda mi vida, espero algún día llegar a ser un hombre tan inteligente, amable y talentoso como tú lo eres, eres mi orgullo y mi mayor motivación.*
- ❖ *Agradezco a mi tía Adriana por ser una segunda madre para mí, por cuidarme desde que nací y orientarme en mi vida personal y profesional, por consentirme, darme mucho cariño, amor y muchas atenciones. Gracias por todo. Te quiero.*
- ❖ *En memoria de mi abuelita Teresa Iniestra, quien en todo momento me enseñó a ser una persona honrada y de buen corazón, me siento muy afortunado por haber convivido a su lado muchos años, fue un gran ejemplo para mí, jamás olvidare esos momentos tan increíbles que pase a su lado. La quiero y La extraño.*

Agradecimientos

- *A la Dra. Gloria Luz Paniagua Contreras: Quien me dio cobijo en el laboratorio de Análisis clínicos y me permitió la realización del presente proyecto de investigación, además de sus buenos consejos y darme las motivaciones necesarias para la realización de la tesis.*
- *Al Dr. Eric Monroy Pérez: Quien fue mi apoyo en la realización de las técnicas de biología molecular y me brindó consejos que fueron fundamentales para la realización del trabajo.*
- *Al comité revisor del proyecto:*

Dr. Sergio Vaca Pacheco

M. en C Alina Uribe García

Biol. Susana Gonzáles Almazán

Quienes con su ayuda, comentarios, consejos y asesoramiento fueron de gran importancia para la realización del presente trabajo.

- *Al Dr. Daniel Jesús Muñoz Iniestra: Quien fue un modelo de inspiración y motivación para estudiar la carrera de biología en la UNAM y quien me apoyó y aconsejó durante mi estancia en la universidad.*
- *Un especial agradecimiento a la UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO y a la Facultad De Estudios Superiores Iztacala por haber sido mi segundo hogar, haberme dado la oportunidad de estudiar en sus instalaciones y darme las herramientas necesarias para ser un biólogo competente.*

INDICE

Contenido	Página
1. Abreviaturas.....	7
2.- Resumen.....	8
3.- Introducción.....	9-18
3.1 Características de <i>Escherichia coli</i>	9-10
3.2 Infecciones causadas por <i>Escherichia coli</i>	10-13
3.3 Factores de virulencia.....	13-15
3.4 Resistencia a los antibióticos.....	16-17
3.5 Importancia de los desinfectantes.....	17-18
4.- Antecedentes.....	19-20
5.- Justificación.....	21
6.- Objetivos.....	21
6.1 Objetivo General.....	21
6.2 Objetivos particulares.....	21
7. Material y métodos.....	22-28
7.1 Origen de las cepas.....	22
7.2 Identificación de <i>E. coli</i> por pruebas bioquímicas	22
7.3 Extracción del ADN	22
7.4 Identificación de <i>E. coli</i> por PCR.....	23
7.5 Detección del gen <i>qac</i>	23
7.6 Detección del gen <i>marR</i>	24
7.7 Detección de los genes <i>sul2</i> y <i>sul3</i>	24
7.8 Detección de los genes <i>int1</i> y <i>int2</i>	24
7.9 Detección del gen <i>kpsMTK1</i>	25
7.10 Electroforesis en geles de agarosa.....	26
7.11 Infección de la línea celular A431 con las cepas vaginales de <i>E. coli</i>	28
7.12 Cosecha de <i>E. coli</i> de la superficie del cultivo de la línea celular A431.....	28
7.13 Extracción del RNA de las cepas vaginales de <i>E. coli</i>	28
7.14 Reversotranscripción.....	28-29

7.15 Expresión de <i>kpsMT K1</i> en las cepas vaginales de <i>E. coli</i> PCR en Tiempo Real.....	29
7.16 Análisis estadístico.....	30
8. RESULTADOS.....	30-36
8.1 Mujeres estudiadas.....	30
8.2 Edad de los pacientes analizados.....	30
8.3 Identificación de <i>Escherichia coli</i> cérvico-vaginal.....	31
8.4 Identificación de los factores de virulencia en cepas de <i>Escherichia coli</i> por PCR.....	32-36
8.5 Patrones de asociación de los genes de resistencia en las cepas de <i>E. coli</i>	36-37
8.6 Expresión del gen capsular <i>kpsMT1</i> en las cepas de <i>Escherichia coli</i>	38-39
8.7 Análisis estadístico.....	40
9. Discusión.....	40-45
9.1 Pacientes estudiadas.....	40-41
9.2 Gen <i>qacEΔ1</i> (compuesto de amonio cuaternario)	41
9.3 Gen <i>sul2</i> . (Sulfonamide resistance).....	41-42
9.4 Gen <i>marR</i> (multiple resistance antibiotic).....	42
9.5 Gen <i>intl1</i> (Cassete 1 de integrones).....	42-43
9.6 Gen <i>intl2</i> (Cassete 2 de integrones).....	43
9.7 Gen <i>kpsMT K1</i> (K-antigen).....	43-44
9.8 Gen <i>sul3</i> (Sulfonamide resistance).....	44
9.9 Patrones de asociación de los genes en las cepas CVPEC.....	44
9.10 Expresión del antígeno capsular <i>kpsMT K1</i> durante la infección <i>in vitro</i> de la línea celular A431.....	45
10. Conclusiones.....	46
11. Literatura Citada.....	47-54
12. Recomendaciones.....	55

1. Abreviaturas

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
EMB	Eosina Azul de Metileno
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica
VTEC	<i>Escherichia coli</i> verotoxigénica
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatógena
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
DAEC	<i>Escherichia coli</i> de adherencia difusa
VT	Verotoxina
ExPEC	<i>Escherichia coli</i> extraintestinal
CVPEC	<i>Escherichia coli</i> patógena cérvico-vaginal
CNF1	Factor citotóxico necrotizante tipo 1
Pc	Secuencia promotora
QAC	Compuesto de Amonio Cuaternario

2. Resumen

En los últimos años el tratamiento de las infecciones cérvico-vaginales ocasionadas por cepas patógenas de *E. coli* se ha complicado debido a la selección de cepas multirresistentes a los antibióticos y a los desinfectantes. Es frecuente que los genes de resistencia a los antibióticos se encuentren en elementos genéticos móviles como plásmidos, transposones e integrones. Otro mecanismo que contribuye a la multirresistencia a los antibióticos es el locus de regulación *mar*. La producción de la cápsula por el gen *kpsMT K1* protege a *E. coli* contra la respuesta inmune del hospedero y contra la acción de los antibióticos.

El propósito de este estudio fue determinar la frecuencia de los integrones clase I y clase II, los genes de resistencia a sulfametoxazol y desinfectantes, el locus de regulación *mar* y el antígeno capsular *KpsMT K1* en cepas de *Escherichia coli* cérvico-vaginales.

Se analizaron 200 cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con infecciones cérvico-vaginales atendidas en dos clínicas del IMSS del Estado de México. Las cepas de *E. coli* fueron identificadas por pruebas bioquímicas y por PCR mediante la amplificación del gen 16s rRNA. La identificación de los genes de resistencia a antibióticos, desinfectantes, integrones clase I y II y el antígeno capsular *kpsMT1* se realizó por PCR de punto final. La expresión de *kpsMT K1* se determinó por PCR en Tiempo Real después de la infección de la línea celular vaginal A431.

El integrón clase I (*intl1*) fue identificado en el 83% (n=166), clase II (*intl2*) en 31% (n=62), *sul2* en 78% (n=156), *qacEΔ1* en 78.5% (157) y el locus *marR-marO* en 93% (n=183). El gen *kpsMT K1* fue identificado en el 33.5% (n=67) de las cepas y el antígeno capsular se expresó en 7.46% (n=5) de las cepas que resultaron positivas para ese gen.

Los resultados en este estudio demostraron que las cepas de *E. coli* presentaron una elevada distribución de los integrones clase I y II, del locus *mar*, del gen de resistencia a sulfametoxazol, del gen para resistencia a desinfectantes, y del antígeno capsular, lo que sugiere la capacidad de las cepas para provocar infecciones crónicas o recurrentes.

3. Introducción

3.1 Características de *Escherichia coli*

Las bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* se encuentran distribuidas en la naturaleza y en la microbiota intestinal de los seres humanos y de varias especies de animales. (Lavagnoli, 2017). Dentro de esta familia se encuentran varios géneros de importancia médica como *Klebsiella*, *Proteus*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Enterobacter* y *Escherichia*. Este último género es el de mayor importancia clínica, principalmente la especie *Escherichia coli*, que es la principal bacteria causante de diarreas y enfermedades extraintestinales.

Escherichia coli es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, móvil de 1-3 μm de largo por 1-1.5 μm de ancho (Figura 1). Fermenta la glucosa con producción de ácido y gas, es positivo para indol y rojo de metilo y en el agar EMB (Eosina Azul de Metileno) las colonias son de color verde metálico. *E. coli* tiene la capacidad de colonizar y persistir en numerosos nichos tanto en el ambiente como en el tracto gastrointestinal de animales y humanos, manteniendo una relación simbiótica con el hospedero, al proveer de nutrientes, señales clave para la regulación y protección contra patógenos extraños, sin embargo, existen algunas cepas de *E. coli* que pueden divergir de su estado comensal y adquirir una naturaleza patógena, y causar diferentes cuadros clínicos, entre ellos diarrea, infecciones urogenitales, e infecciones vaginales. (Yan & polk, 2004)

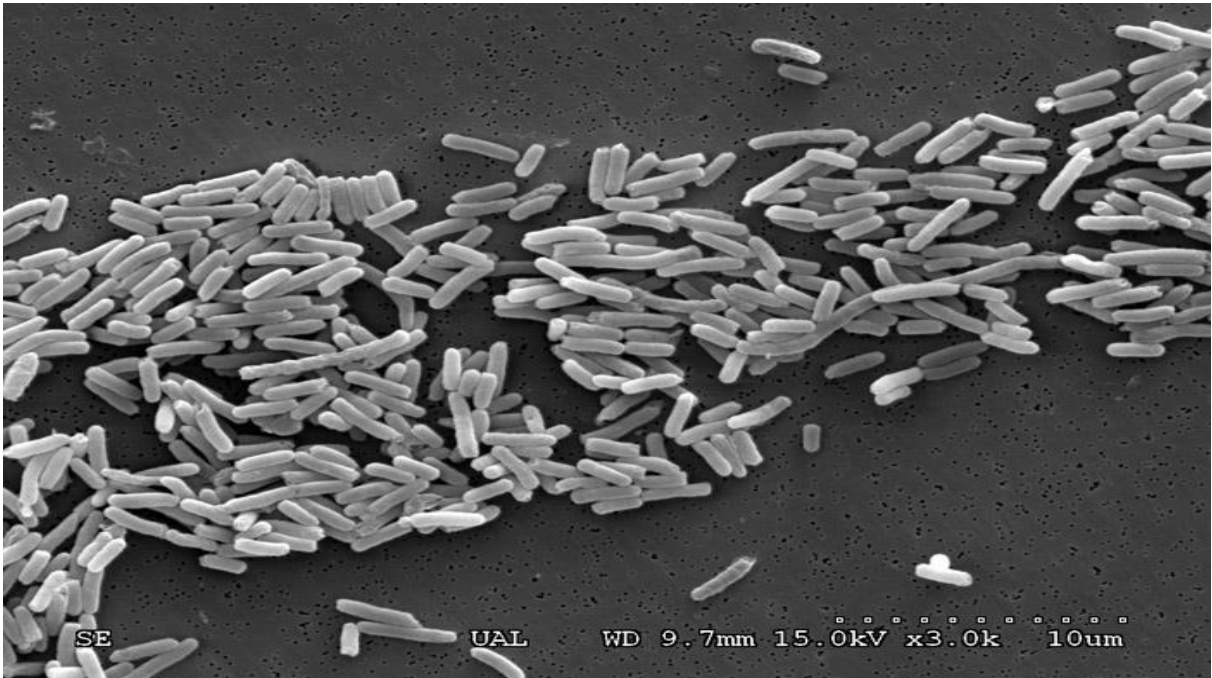


Figura 1. Micrografía electrónica de barrido de *Escherichia coli* a 3000 aumentos. Foto: Servicios Centrales de Investigación. Universidad de Almería, España.

3.2 Infecciones causadas por *Escherichia coli*

Con base en su mecanismo de patogenicidad y cuadro clínico, las cepas de *E. coli* causantes de diarrea se clasifican en seis patotipos: enterotoxigénica (ETEC), enterohemorrágica también conocidas como productoras de toxina Vero o toxina semejante a Shiga (EHEC o VTEC o STEC), enteroinvasiva (EIEC), enteropatógena (EPEC), enteroagregativa (EAEC) y adherencia difusa (DAEC). (Rodríguez, 2002).

Escherichia coli enterotoxigénica: Es uno de los agentes más frecuentemente identificados en diarrea aguda. Aproximadamente, cada año se presentan 280 millones de infecciones por ETEC en niños menores de 4 años, de los cuales entre 300,000 a 500,000 mueren y se cree que más de 40 millones son asintomáticos. Se conoce como diarrea del viajero y tiene amplia distribución en países en vías de desarrollo. Sin embargo, es frecuente aislarla de personas asintomáticas. En algunos casos la diarrea por ETEC puede ser leve, sin presencia de moco o sangre;

en otros casos puede ser profusa causando deshidratación grave. Algunos casos presentan cefalea y vómito. (Fárfan, 2016).

Escherichia coli enterohemorrágica: Las cepas comprendidas dentro del patotipo EHEC, así denominadas debido a la capacidad que tienen de producir colitis hemorrágica (CH), se caracterizan por compartir caracteres clínicos, patogénicos y epidemiológicos con la cepa O157 y son un subgrupo de *E. coli* verocitoxigénico (VTEC) o *E. coli* productor de toxina Shiga (STEC). En el hombre, la infección por VTEC puede manifestarse clínicamente como: estado de portador asintomático, diarrea acuosa, colitis hemorrágica, púrpura trombocitopénica trombótica o SUH.

VTEC presenta las siguientes características que determinan su virulencia:

- a) Producción de verotoxinas (VTs): verotoxina 1 (VT1) y verocitotoxina 2 (VT2), así denominadas por su efecto citopatógeno sobre células Vero.
- b) Presencia de grandes plásmidos (megaplásmido o Mp) que se encuentran presentes en casi la totalidad de las cepas productoras de CH y SUH en humanos.
- c) Posee un mecanismo especial de adherencia al enterocito, denominado “Attaching and effacing” o adherencia y borrado que se caracteriza por una íntima adherencia de la bacteria a la célula intestinal. (Rivero,2004).

Escherichia coli enteroinvasiva: Los síntomas característicos en personas infectadas por EIEC son diarrea acuosa, con sangre, moco y dolor abdominal, pero en algunos casos solo se presenta diarrea, lo cual la hace indistinguible de la producida por ETEC y menos grave que la causada por *Shigella*. (Fárfan, 2016).

Escherichia coli enteropatógena: Fue la primera en describirse y es uno de los organismos más estudiados. La infección con EPEC es una de las causas más comunes de diarrea infantil en países de vías de desarrollo, como México. Los síntomas de la enfermedad inducidos por EPEC suelen ser graves, la característica principal de la enfermedad es la diarrea acuosa que puede ocurrir en diversos grados de severidad. Adicional a la diarrea, muy a menudo pueden presentarse vómitos y fiebre en el cuadro clínico. El período de incubación de la infección varía

entre las 3 a 24 horas después que el individuo ingiere un inóculo grande de bacterias (10^9 a 10^{10}). (Vidal, 2007).

Escherichia coli enteroagregativa: Causa diarrea aguda o persistente, tanto en niños como en adultos, en países de vías de desarrollo y se identifica con frecuencia en cuadros diarreicos de personas de países industrializados y en pacientes infectados por VIH. Este patotipo se adhiere a la mucosa intestinal, la coloniza y produce un efecto citotóxico que causa diarrea de tipo acuosa sin fiebre, con secreción de moco. (Mohamed, 2007).

Escherichia coli de adherencia difusa: Las cepas no forman microcolonias cuando se adhieren a células Hep-2. Se sabe poco de su mecanismo de patogenicidad, pero se ha caracterizado una fimbria de superficie, conocida como F1845, involucrada en el fenómeno de adherencia difusa. Los genes que codifican para esta fimbria se pueden encontrar en el cromosoma o en un plásmido. El grupo DAEC se puede aislar tanto de personas sanas como en personas con diarrea, siendo más importantes en niños de 4 a 5 años. Los principales síntomas que se presentan son diarrea acuosa sin sangre y ni leucocitos. (Rodríguez, 2002).

Existe otro grupo de cepas patógenas extraintestinales (ExPEC) de *E. coli* que pueden migrar a otros sitios y causar una variedad de enfermedades en el humano, incluyendo septicemia, neumonía, meningitis, infecciones cérvico-vaginales e infecciones en vías urinarias (Johnson, 1991). *Escherichia coli* patógena extraintestinal (ExPEC) tiene el potencial de invadir muchos tejidos y causar infección en cualquier edad. Aunque las infecciones ExPEC más comunes son infecciones urinarias y vaginales, ExPEC también se ha aislado de personas con infecciones en áreas como el tracto respiratorio, la piel y los tejidos blandos. Junto con *Streptococcus* del grupo B, ExPEC es una causa principal de meningitis neonatal y una causa frecuente de prostatitis, peritonitis y neumonía. (Poolman, 2016).

Dentro del grupo de las extraintestinales se encuentran las cepas patógenas cérvico-vaginales de *E. coli* (CVPEC), las cuales son la causa principal de infecciones del tracto urogenital, afectando a más del 60% de las mujeres durante su vida reproductiva y es uno de los trastornos inflamatorios femeninos que generan frecuentes visitas ginecológicas con profundas implicaciones en el estado de salud y en la vida social. (Rashki, 2014).

3.3 Factores de virulencia en *E. coli*

Las cepas CVPEC son portadoras de un gran número de factores de virulencia que incrementan su patogenicidad. Entre los factores de virulencia más importantes se encuentran; adhesinas (fimbrias P, S y fimbrias F1C,) que están presentes en casi todas las cepas de *E. coli*, toxinas (hemolisinas y el factor necrotizante citotóxico), sideróforos (aerobactina), protectinas (antígenos capsulares *kpsMT* 1, II y III) e invasinas (*IbeA*) (Tabla 1.) (Rashki, 2014). Estos marcadores genéticos facilitan la colonización y la invasión del hospedero, la evasión de la respuesta inmune, lesión a los tejidos y/o activación de la respuesta inflamatoria (James *et al.*, 2000).

Adhesinas: Las adhesinas son por lo general proteínas que tienen afinidad por los azúcares lectinas) (Cárdenas, 2014). La adhesión es el primer paso para el establecimiento de las infecciones causadas por cepas patógenas de *E. coli*. (Riveros, 2011).

En *E. coli* la mayoría de las estructuras de adherencia son fimbrias proteicas que se unen a receptores específicos situados en las membranas de las células epiteliales. Una misma cepa puede contener simultáneamente varias adhesinas. La fimbria tipo 1 es la más universal, pues está presente en casi la totalidad de las cepas de *E. coli* y de otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae*. (Andreu, 2005).

Toxinas: Existen tres tipos de toxinas frecuentemente producidas por *E. coli* patógena Cérvico-vaginal (CVPEC), la alfa hemolisina, el factor citotóxico necrosante tipo 1 (CNF1) y la toxina secretada autotransportadora Sat. La alfa

hemolisina (HlyA), también denominada toxina formadora de poros, se inserta dentro de la membrana celular del hospedero provocando lisis celular, facilitando la liberación de hierro y nutrientes que son esenciales para el crecimiento bacteriano. El CNF1 conduce la activación constitutiva de los miembros de la familia Rho, resultando en el arreglo del citoesqueleto de la célula del hospedero, provocando apoptosis. La toxina Sat es una serina-proteasa, la cual se encuentra predominantemente en cepas de UPEC y CVPEC, por tener efectos citopáticos en el aparato genitourinario. (Miranda, 2015).

Sideróforos: Los sideróforos son ligandos de hierro de baja masa molecular (<100 Da) que se caracterizan por unir hierro con alta afinidad y especificidad. Estas moléculas son producidas por muchas bacterias, entre ellas *Escherichia coli*, algunos hongos y plantas monocotiledóneas en respuesta a la restricción ambiental del hierro. Los sideróforos reconocen específicamente moléculas que contienen Fe^{+2} y secuestran dicho hierro. Las bacterias poseen múltiples receptores de membrana externa y cada uno de ellos provee a la célula de una especificidad para distintos sideróforos. (Garrido, 2005).

Protectinas: Las cápsulas de polisacáridos bacterianas tienen dos funciones clásicas en defensa contra la inmunidad innata del hospedero: inhibición de la fagocitosis por granulocitos / monocitos y resistencia sérica. Estudios más recientes han demostrado que las cápsulas pueden estar implicadas en la adherencia inespecífica y también en la formación de biopelículas en superficies artificiales. (Anderson,2009)

Tabla 1. Factores de virulencia de *E. coli* cérvico vaginal (CVPEC)

Función	Gen	Producto
Sistemas de adquisición de hierro	<i>iroN</i>	Proteína de membrana externa receptora de sideróforo
	<i>irp2</i>	Proteína reprimible por hierro
	<i>iuc</i>	aerobactina
Adhesinas	<i>fim</i>	Fimbria tipo 1
	<i>afal</i>	Adhesina afimbrial I
	<i>sfa</i>	Fimbriae S (S fimbriae)
	<i>iha</i>	Non hemagglutinating adhesin
	<i>tsh</i>	Hemaglutinina temperatura sensible
	<i>papC</i> (alelo 1), <i>papG</i> (alelo2) y <i>papG</i> (alelo 3)	Pili asociado con pielonefritis
Protectinas	<i>kpsMT</i>	Antígeno K
	<i>ompT</i>	Proteína de membrana externa T
	<i>iss</i>	Proteína que incrementa la sobrevivencia en suero
Toxinas	<i>cnf1</i>	Factor citotóxico necrotizante 1
	<i>hlyA</i>	hemolisina
	<i>set</i>	Enterotoxina 1 de <i>Shigella</i>
	<i>astA</i>	Toxina enteroagregativa termo estable
	<i>vat</i>	Toxina autotransportadora vacuolizante

3.4 Resistencia a los antibióticos

El incremento de la multirresistencia a los antibióticos por cepas de *E. coli* es considerado un serio problema de salud que disminuye las alternativas del tratamiento de las infecciones (Sahlberg *et al.*, 2017). El uso indiscriminado de los antimicrobianos, tanto en humanos como en animales, es considerado un factor importante para la selección de cepas resistentes a estos agentes. (Ruiz, *et al.*, 2011). Se han descrito 4 mecanismos de resistencia a antibióticos de las bacterias Gram negativas; **1) Modificación enzimática del antibiótico**, las bacterias expresan enzimas capaces de crear cambios en la estructura del antibiótico haciendo que ésta pierda su funcionalidad; **2) Bombas de eflujo**, operan capturando el antibiótico del espacio periplásmico y expulsándolo al exterior, con lo cual evitan que llegue a su sitio de acción; **3) Cambios en la permeabilidad de la membrana externa**, las bacterias pueden generar cambios de la bicapa lipídica, aunque la permeabilidad de la membrana se vea alterada, principalmente, por cambios en las porinas. **4) Alteraciones del sitio de acción**, las bacterias pueden alterar el sitio donde el antibiótico se une a la bacteria para interrumpir una función vital de esta (Peleg, 2010).

Dentro de los factores más importantes que contribuyen al incremento de la multirresistencia bacteriana se encuentran la transferencia de genes de resistencia a los antimicrobianos por elementos genéticos móviles, incluyendo plásmidos, transposones, genes de cassettes e integrones (Hall,1998). Estos últimos portan genes que codifican para resistencia a diferentes antibióticos. Los integrones están compuestos por tres elementos necesarios para la inserción y expresión de genes exógenos: un fragmento que codifica una integrasa (*intl*), una secuencia *attI* a la que se unen los genes en casetes que codifican diferentes mecanismos de resistencia y dentro del *intl*, y en el extremo 3', una secuencia promotora (Pc) a partir de la cual se transcriben los casetes de resistencia integrados. Por lo que se ha demostrado que el principal rol de los integrones es la diseminación de genes de resistencia a antibióticos en bacterias Gram negativas y son comúnmente asociados a la familia *Enterobacteriaceae* (Hall,1998).

Hasta hace poco la resistencia a múltiples antibióticos en las bacterias se le ha atribuido comúnmente a la adquisición de plásmidos o transposones o mediante la selección clonal de cepas con la multirresistencia. En los últimos años, sin embargo, ha habido un mayor conocimiento de cromosomas y de los sistemas de resistencia a múltiples antibióticos (*mar*) de *E. coli* y *Salmonella*. (Randall, 2002).

El locus de resistencia a múltiples antibióticos (*mar*) es reconocido por su capacidad de modular la bomba de eflujo AcrAB-TolC de algunos antibióticos, desinfectantes y solventes orgánicos y la expresión de porinas a través de dos factores de transcripción codificados, *marC* y *marAB*. La expresión de cada operón está bajo el control de los promotores divergentes: *pmarI* y *pmarII*, que están en una región promotora-operadora situada centralmente. *marC* (221 aminoácidos) codifica una supuesta proteína de membrana interna de función desconocida y *marRAB* codifica el represor de 144 aminoácidos MarR, el activador transcripcional MarA de 127 aminoácidos y la proteína MarB de 72 aminoácidos de función desconocida. (Randall, 2002)

El locus *mar* de *Escherichia coli* está involucrado en la resistencia cruzada a antibióticos como el cloranfenicol, cefalosporinas, ácido nalidíxico, fluoroquinolonas, penicilinas, puromicina, rifampicina y tetraciclina. Además, se ha demostrado que el locus *mar* está involucrado en la resistencia a desinfectantes como el aceite de pino y triclosan, a solventes orgánicos tales como ciclohexano y a agentes de estrés oxidativo. Extendido entre las bacterias entéricas, el sistema confiere resistencia antimicrobiana clínicamente relevante en *E.coli* (Sharma, 2017).

3.5 Importancia de los desinfectantes

Los desinfectantes son agentes químicos que destruyen o inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos en fase vegetativa o no esporulada. Un factor importante es rotar el uso de los desinfectantes, pues el uso continuo de un producto puede dar lugar a la selección de microorganismos resistentes al mismo. Un

desinfectante de alto nivel es un compuesto sintético que, depositado sobre material vivo o inerte, destruye en 10 o 15 minutos todos los gérmenes patógenos tales como bacterias, hongos, y virus excluyendo el virus de la hepatitis B. (Martínez, 2013).

Existe una gran variedad de agentes desinfectantes que son utilizados para destruir a los microorganismos y difieren de gran forma en sus propiedades. La mayoría de las veces los productos comerciales están compuestos de mezclas de agentes desinfectantes, esta técnica es muy utilizada para abarcar un mayor espectro de microorganismos (por ejemplo, Gram+ y Gram-, esporas, mohos y levaduras, virus). Dentro de los desinfectantes más utilizados se encuentran hipocloritos, desinfectantes yodados, tensoactivos anfotéricos, compuestos fenólicos y compuestos de amonio cuaternario. (Herrera, 2016).

Los compuestos de amonio cuaternario (*qac*) son esencialmente sales de amonio con algunos o con todos los átomos del ión (NH_4) sustituidos por grupos alquilo o arilo; el anión es generalmente un cloruro o bromuro. Son solubles en agua y alcohol, actúan en medio ácido, pero principalmente alcalino, tienen propiedades tenso-activas y su actividad se ve disminuida con la presencia de materia orgánica. Presentan una acción desinfectante desde concentraciones de 0,25% o mayores, para uso principalmente en superficies de mobiliario clínico y planta física de centros hospitalarios. Los QACs son bactericidas muy activos frente a las bacterias Gram positivas, siendo menos eficaces para las Gram negativas, mantienen su actividad en un rango de pH de 5-10. (Rojas,2007).

Los QAC son sustancias que lesionan la membrana celular debido a que se unen irreversiblemente a los fosfolípidos y proteínas de la membrana, deteriorando la impermeabilidad. Así mismo, se liberan metabolitos desde la célula, interfiriendo en el metabolismo energético y el transporte activo. Otro mecanismo de acción que se les atribuye es la inactivación de enzimas y la desnaturalización de algunas proteínas esenciales para el desarrollo de los microbios. La acción biocida de las aminas terciarias, que acompañan a los compuestos de amonio cuaternario en los desinfectantes, se debe a su interacción con la membrana plasmática. (Diomedi,2017).

3. Antecedentes

Povilonis y colaboradores (2010). Caracterizaron la presencia y diversidad de los integrones de clase 1 y 2 en cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con infecciones del tracto urinario (ITU) (n=59) y animales de granja sanos y enfermos, incluidas aves de corral. La presencia de integrones, su estructura y la ubicación del genoma se investigaron mediante reacción en cadena de la polimerasa, polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción, secuenciación de ADN, y experimentos de conjugación. Se encontró que el 40% de las cepas de *E. coli* portaban el integron de la clase 1, mientras que los integrones de la clase 2 se encontraban solamente en 23 cassettes de genes diferentes dentro de 15 regiones variables diferentes.

Dessie y colaboradores (2013). Caracterizaron los cassettes de integrones en noventa y nueve cepas de *Escherichia coli* y 33 de *Salmonella* aisladas de aves de corral en Korea. El 54.5% (n=54) de las cepas de *E.coli* fue portadora del integrón de clase 1, 6.1% (n=6) de integrón de clase 2 y 5 (5.1%) de clase 1 y clase 2 de integrones juntos.

Zou y colaboradores (2014). Determinaron la presencia de genes de resistencia a desinfectantes en *Escherichia coli* aisladas de carnes en los Estados Unidos. En el estudio se analizaron 570 cepas de *E. coli* para detectar la presencia de 10 genes de resistencia a desinfectantes; QAC [*qacE*, *qacEΔ1*, *qacF*, *qacG*, *emrE*, *sugE* (c), *sugE* (p), *mdfA* y *ydgE* / *ydgF*]. Los genes *emrE*, *sugE* (c), *mdfA* y *ydgE* / *ydgF* estaban comúnmente presentes (77.2% al 100%) en las cepas de *E. coli*, pero *qacEΔ1* y *sugE* (p) eran menos frecuentes (0.4% al 22.3%). *emrE-mdfA-sugE* (c) - *ydgE* / F fue el perfil de genes de resistencia QAC más común. Se encontró una asociación significativa entre la resistencia a los antimicrobianos y la presencia de *sugE* (p) y *qacEΔ1* (P <0.05).

López y colaboradores (2014). Analizaron un grupo de cepas de *E. coli* aisladas de infecciones del tracto urinario de mujeres mexicanas y encontraron una alta

presencia de genes para la adquisición de hierro y de adhesión asociados a fenotipos de resistencia a los antibióticos.

Rashki y colaboradores (2014). Determinaron la prevalencia de ocho factores de virulencia conocidos y su asociación con serotipos en cepas patógenas de *Escherichia coli* cérvico vaginal. En el estudio encontraron que los genes más frecuentes en las cepas CVPEC fueron: *fimH* (71%), *irp2* (63%), seguido de *ompT* (45%), *iucD* (37%) e *iroN* (31%).

Arabi y colaboradores (2015). Determinaron la presencia de los genes *sul1*, *sul2*, *sul3*, *dfrA1*, *dfrA5*, *int11*, *blaTEM*, *blaSHV* y *CTX-M* mediante amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las frecuencias de *sul1*, *sul2* y *sul3* entre las cepas fueron de 81% (n=116), 67% (n=96) y 2.3% (n=3), respectivamente. Además, el 50.5% (n=72) fue portadora de *sul1* y *sul2*, 2.3% (n=3) de *sul2* y *sul3* y 2.3% (n=3) contenían *sul1*, *sul2* y *sul3*. Treinta y cuatro (78.2%) cepas acarrearon el gen *int11*. Además, *dfrA1* y *dfrA5* estuvieron presentes en tres (3.4%) de las cepas.

Lavigne y colaboradores (2016). Caracterizaron la resistencia a antibióticos y la virulencia de las cepas uropatógenas de *E. coli* (UPEC) aisladas de las infecciones del tracto urinario (ITU) de pacientes hospitalizados. Los genes *papG* alelo II y *papA*, *papC*, *papE*, *kpsMTKII* e *iutA* fueron significativamente más frecuentes entre las cepas ($p < 0.05$).

Hilbert y colaboradores (2008) Caracterizaron los serogrupos O, filogenia y factores de virulencia de cepas cérvico-vaginales y rectales de *Escherichia coli*. Los factores de virulencia más comunes fueron *fimH* (98%), *fyuA* (84%), *kpsMT* (74%), *ompT* (82%), *traT* (74%), *PAI* (64%) y *usp* (72%).

5. Justificación

En los últimos años el tratamiento de las infecciones cérvico-vaginales ocasionadas por *Escherichia coli* se ha complicado debido a la selección de cepas resistentes a los antibióticos, el presente trabajo contribuirá a determinar la frecuencia de genes de resistencia a sulfametoxazol y a desinfectantes, la presencia de los integrones clase I y clase II, de los genes *marR* y *marO*, así como la frecuencia del antígeno capsular *kpsMT K1* en cepas de *Escherichia coli* cérvico-vaginales.

6. Objetivos

6.1 Objetivo general

Caracterización molecular de genes de resistencia a sulfametoxazol y a desinfectantes, la presencia de los integrones clase I y clase II, del locus *marR*, así como la frecuencia del antígeno capsular *kpsMTK1* en cepas de *Escherichia coli* cérvico-vaginales.

6.2 Objetivos particulares

- Identificar por PCR los integrones clase I y clase II en las cepas vaginales de *E. coli*.
- Determinar la frecuencia de los genes de resistencia al sulfametoxazol (*sul2* y *sul3*) en las cepas.
- Establecer la distribución de los genes *marR* y *marO* incluidos en el operón de regulación *mar* en las cepas de *E. coli*.
- Identificar el gen *qacE Δ 1* que codifica para resistencia a los desinfectantes en las cepas.
- Detectar el gen capsular *kpsMT K1* en las cepas.
- Determinar la expresión del gen *kpsMT K1* en las cepas de *E. coli* después de la infección *in vitro* de la línea celular vaginal A431.

7. Materiales y métodos

7.1 Origen de las cepas

Para el desarrollo de este estudio se analizaron 200 cepas de *E coli* previamente aisladas de pacientes con infecciones cérvico-vaginales procedentes de la Clínica de Tequesquihuac (No. 64) y de la Clínica de Cuautitlán Izcalli (No. 62), ambas del IMSS, pertenecientes al municipio de Tlalnepantla, Estado de México. Las cepas de *E coli* se encuentran en el cepario del laboratorio de Análisis Clínicos de la CUSI (Clínica Universitaria de la Salud Integral) en la FES Iztacala.

7.2 Identificación por pruebas bioquímicas

Las cepas fueron crecidas en el medio de cultivo de Eosina Azul de Metileno (EMB), por el método de estría cruzada. A partir de los cultivos puros las cepas fueron identificadas como *E. coli* mediante las pruebas bioquímicas de indol, Kligler, manitol, citrato y urea.

7.3 Extracción de DNA bacteriano

Las cepas de *E. coli* fueron sembradas en el medio de cultivo de Eosina Azul de Metileno (EMB), por el método de estría cruzada; se incubaron a 37°C durante 24 horas. Obtenido el crecimiento bacteriano, se realizó la extracción del ADN por el método de ebullición conforme a lo descrito por Paniagua *et al.*, (2007), para lo cual se tomaron varias colonias con un asa estéril y se depositaron en tubos de rosca de 16 X 50 con 2 ml con agua desionizada estéril. Las muestras se colocaron en un vortex por 20 segundos y al término los tubos se mantuvieron en baño maría durante 20 minutos. Posteriormente, la muestra se colocó en hielo por 10 minutos y se centrifugó a 14,000 rpm por 10 minutos. Se almacenó el sobrenadante con el ADN bacteriano en tubos eppendorf a -20°C, hasta su posterior utilización.

7.4 Identificación de *E. coli* por PCR convencional

Las cepas de *E. coli* se identificaron por PCR convencional mediante la amplificación del gen 16s rRNA (Li et al., 2010). Los cebadores utilizados fueron WI-3110 (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) y WI-3111 (CCGTCAATTCATTGAGTT). Para un volumen final por mezcla de reacción de 25 µl se utilizaron 12µl del equipo comercial Taq DNA polimerase 2x Master Mix Red (Ampliqon), 1µl (10 pmol) de cada oligonucleótido (forward y reverse; tabla 2), 9 µl de agua libre de nucleasas y 2 µl de ADN. La amplificación del ADN se realizó en un termociclador marca BIO-RAD T100® modelo CGI-96. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, 30 ciclos (desnaturalización a 95°C por 30 segundos, alineación a 55°C por 1 minuto y extensión a 72°C por 10 minutos. Finalmente, una extensión final a 72°C por 5 minutos). El tamaño del gen amplificado fue de 919 pb (pares de bases).

7.5 Detección del gen *qacEΔ1* que codifica para resistencia a desinfectantes en cepas de *E. coli*.

La detección del gen de resistencia a desinfectantes *qacEΔ1* en las cepas de *E. coli* se realizó por el método de PCR convencional descrito por Mazel en el 2000. Para un volumen final por mezcla de reacción de 25 µl se utilizaron 12µl del equipo comercial Taq DNA polimerase 2x Master Mix Red (Ampliqon), 1µl (10 pmol) de cada oligonucleótido (forward y reverse; tabla 2), 9 µl de agua estéril libre de nucleasas y 2 µl de ADN. La amplificación del ADN se realizó bajo las siguientes condiciones: Desnaturalización inicial de 94° por 5 minutos, seguido de 30 ciclos (desnaturalización de 94° C por 30 segundos, alineamiento de 60° C por 30 segundos y una extensión de 72° C por 60 segundos y una extensión final de 72°C por 5 minutos.

7.6 Detección de los genes *marR* y *marO* que codifican para resistencia múltiple a los antibióticos.

La detección de los genes *marR* y *marO* se realizó por el método de PCR descrito por Park (1998). Para un volumen final por mezcla de reacción de 25 µl se utilizaron 12 µl del equipo Taq DNA polimerase 2x Master Mix Red (Ampliqon), 1 µl (10 pmol) de cada oligonucleótido (forward y reverse; tabla 2), 9 µl de agua estéril libre de nucleasas y 2 µl de ADN. La amplificación del ADN se realizó bajo las siguientes condiciones: Desnaturalización inicial a 94° C por 1 minuto, seguido de 30 ciclos (desnaturalización a 94°C por 30 segundos, alineamiento de 55° C por 1 minuto y una extensión a 72° C por 2 minutos) y una extensión final de 7 minutos a 72° C.

7.7 Detección de los genes *sul2* y *sul3* que codifican para resistencia a sulfametoxazol en cepas de *E. coli*.

La detección de los genes que codifican para resistencia a sulfametoxazol se realizó por el método de PCR descrito por Maynard (2003). Para lo cual se utilizaron 12 µl del equipo Taq DNA polimerase 2x Master Mix Red (Ampliqon), 1 µl (10 pmol) de cada oligonucleótido (forward y reverse; tabla 2), 9 µl de agua estéril libre de nucleasas y 2 µl de ADN. La amplificación del ADN se realizó bajo las siguientes condiciones: Desnaturalización inicial a 94° C por 5 minutos seguido de 36 ciclos de 15 segundos a 94° C, alineamiento de 67° C por 30 segundos y una extensión de 72° C por 60 segundos. Finalmente, una extensión de 7 minutos a 72° C.

7.8 Detección de los genes *intl1* y *intl2* en las cepas de *E. coli*.

La detección de los genes *intl1* y *intl2* que codifican para los cassettes de integrones de la clase 1 y clase 2, respectivamente, se realizó por el método de PCR descrito por Saenz (2004). Para un volumen final de 25 µl se utilizaron 12 µl del equipo comercial Taq DNA polimerase 2x Master Mix Red (Ampliqon), 1 µl (10 pmol) de cada oligonucleótido (forward y reverse; tabla 2), 9 µl de agua estéril libre de nucleasas y 2 µl de ADN. La amplificación del ADN se realizó bajo las siguientes condiciones: Desnaturalización inicial a 94° C por 5 minutos. Seguido de 30 ciclos

de 94° C por 30 segundos, alineamiento de 62° por 30 segundos, extensión de 72° C por 60 segundos y una extensión final de 10 minutos a 72° C.

7.9 Detección del gen capsular *kpsMT K1* en las cepas de *E. coli*.

La detección del gen capsular *kpsMT k1* en las cepas de *E. coli* se realizó por el método de PCR descrito por James & Steel (2000). Para lo cual se utilizaron 12 µl del equipo Taq DNA polimerase 2x Master Mix Red (Amplicones), 1 µl (10 pmol) de cada oligonucleótido (forward y reverse; tabla 2), 9 µl de agua estéril libre de nucleasas y 2 µl de ADN para completar una reacción con un volumen final de 25µl. La amplificación del ADN se realizó bajo las siguientes condiciones: Desnaturalización inicial a 95° por 12 minutos seguido de 25 ciclos de desnaturalización a 94° C por 30 segundos, alineamiento de 63° C por 30 segundos y extensión de 68° por 3 minutos. Finalmente, una extensión de 72° C por 10 minutos.

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para detectar los genes de resistencia a antibióticos, el gen de resistencia a desinfectantes y el gen capsular en cepas de *E coli* cérvico-vaginal por PCR.

Nombre del gen		secuencia (5' a 3')	Tamaño de amplicón (pb)	Referencia
<i>intl1-F</i>	Integrón clase I	GGGTCAAGGATCTGGATTTTCG	483	Mazel, 2000.
<i>intl1-R</i>		ACATGGGTGTAAATCATCGTC		
<i>intl2-F</i>	Integrón clase II	CACGGATATGCGACAAAAAGGT	788	
<i>intl2-R</i>		GTAGCAAACGAGTGACGAAATG		
<i>qac-F</i>	Desinfectantes	GGCTGGCTTTTTCTTGTTATCG	287	
<i>qac-R</i>		TGAGCCCCATACCTACAAAGC		
<i>marR-F</i>		AGCTAGCCTTGCATCGCA	568	Park, 1998.

maR-R	<i>maR</i> y <i>marO</i>	TACGGCAGGACTTTCTTAAGCA		
sul2-F	Sulfametoxazol	CGGCATCGTCAACATAACC	722	Maynard, 2003.
sul2-R		GTGTGCGGATGAAGTCAG		
sul3-F		CATTCTAGAAAACAGTCGTAGTTCG	990	Perreten, 2003.
sul3-R		CATCTGCAGCTAACCTAGGGCTTTGGA		
kpsMTk1-F	Antígeno capsular k	TAGCAAACGTTCTATTGGTGC	153	Johnson, 2000.
kpsMTk1-R		CAGTATCAGCAATCGTTCTGTA		

7.10 Electroforesis en geles de agarosa

Después de la amplificación de los genes por PCR, 6µl de muestra fue analizada en geles de agarosa al 2%, teñidos con Midori Green (0.7%) (Nipon Genetics, Europe Gmph), bajo las siguientes condiciones: 120 volts, 94 miliamperes por 60 minutos. Los geles fueron fotografiados bajo luz ultravioleta con el digitalizador de imágenes Gel logic 100 KODAK.

7.11 Infección de la línea celular A431 con las cepas vaginales de *E. coli*

Una colonia de cada cepa bacteriana crecida en EMB fue depositada en el medio líquido BHI (infusión-cerebro-corazón, Bioxon) a 37° C por 24 horas. Posteriormente se realizó una dilución 1: 10 para obtener una concentración de 1×10^9 , que correspondió a 0.4 de absorbancia a 600 nm. A partir de esta dilución se tomaron 50 µl del cultivo bacteriano y se depositaron sobre la superficie del cultivo celular de la línea A431 derivada de carcinoma de epidermis vulvar (ATCC® CRL-1555™). Las placas con la línea celular infectada fueron incubadas a 37°C por 48 horas con 5% CO₂ y humedad saturada.

7.12 Cosecha de *E. coli* de la superficie del cultivo de la línea celular A431.

Las bacterias fueron colectadas de la superficie del cultivo de la línea celular tomando 300 µl de cada pozo y se depositaron en tubos eppendorf de 1.5 ml. Los tubos se centrifugaron a 8000 rpm durante 5 minutos, posteriormente se decantó totalmente el sobrenadante y se agregaron 500 µl de buffer PBS para lavar las células. Los tubos se agitaron en un vortex vigorosamente para resuspender la pastilla y se centrifugó nuevamente a 8000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se decantó conservando solo la pastilla para la extracción de RNA.

7.13 Extracción del RNA de las cepas vaginales de *E. coli*

La extracción total de RNA se realizó con el equipo comercial MiniKit RNeasy (Qiagen, Hilden, Germany) utilizando el equipo robotizado QIAcube (Figura 3). Para lo cual, las pastillas bacterianas obtenidas de la infección celular A431 fueron colocadas en la placa de agitación del equipo. Al mismo tiempo en la posición “A” de la sección correspondiente al buffer de lisis se colocó el buffer TE (solución preparada a pH de 8 con 10 Mm Tris-Cl, 1 Mm de EDTA y 1 mg/ml de lizosima). Después de alimentar el QIAcube con los diferentes reactivos del equipo RNeasy, se llenó el contenedor con puntas de 1 ml y se depositaron tubos de columna y elución en el carrusel (centrifuga) del equipo. Finalmente, el QIAcube se programó para la extracción de RNA con lisis celular siguiendo el protocolo del fabricante (RNeasy Protect Bacteria® Qiagen, Hilden, Germany) y se inició la corrida. El equipo robotizado adicionó 100 µl de buffer TE a cada tubo con la pastilla celular bacteriana cosechadas después de la infección celular A431. Los tubos fueron agitados para lisar las paredes celulares bacterianas. Posteriormente el robot QIAcube adicionó volúmenes de los distintos buffers del equipo comercial RNeasy y realizó repetidos pasos de centrifugación y agitación para los diferentes procedimientos: Adicionó 350 µl de buffer RLT (amortiguador de pH de lisis con tiocianato de guanidina con 100 µl/ml de β-mercaptoetanol) que permitió inactivar las RNAsas y favorecer la unión del RNA a la membrana de sílica de la columna utilizada en el QIAcube.

Al término el equipo adicionó 350 µl de etanol al 95% para homogeneizar el lisado, mezcló suavemente los tubos y transfirió 700 µl de la mezcla a la columna contenida en un tubo de 2 ml, centrifugó los tubos a 10 000 rpm durante 15 segundos y el líquido de flujo fue desechado. Después adicionó 700 µl del buffer de lavado RW1 (tiocianato de guanidina y etanol) a la columna, para la eliminación de biomoléculas no deseadas y centrifugó a 10,000 rpm durante 15 segundos, nuevamente el líquido de flujo fue desechado. Al término el robot adicionó 500 µl de buffer RPE (amortiguador de pH de lavado, con 4 volúmenes de etanol al 96%) a la columna que permite eliminar los rastros de sales, que todavía estaban en la columna debido a los buffers utilizados anteriormente en el protocolo y el equipo centrifugó a 10,000 rpm durante 15 segundos para lavar la membrana, el líquido de flujo fue descartado. Nuevamente adicionó 500 µl de buffer RPE a la columna y centrifugó a 10,000 rpm durante 2 minutos para volver a lavar la membrana y remover restos de sales, descartando nuevamente el líquido de flujo.

Finalmente, el robot movió y depositó la columna en un tubo colector nuevo de 2 ml, centrifugó durante 1 minuto y el equipo adicionó 30 µl de agua libre de RNAsas directamente sobre la membrana de la columna y centrifugó a 10,000 rpm durante 1 minuto para obtener el RNA. La concentración total del RNA se midió utilizando el espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). Debido a la inestabilidad del RNA, se procedió inmediatamente a realizar la reversotranscripción a cDNA.

7.14 Reversotranscripción

Para el proceso de la reversotranscripción de RNA a cDNA se utilizó el equipo comercial QuantiTec Reverse transcription (Qiagen®) siguiendo las instrucciones del fabricante. Primero se realizó la eliminación de DNA genómico. Para un volumen final por mezcla de reacción de 14 µl se agregaron cada uno de los siguientes componentes: Para cada muestra se depositó en un tubo eppendorf 2 µl de gDNA Wipeout buffer7x®, 7 µl de H₂O libre de RNAsas y 5 µl de RNA molde. Posteriormente se incubó a 42°C durante 2 minutos, e inmediatamente se colocó en hielo.

Para la reversotranscripción se preparó la mezcla de reacción en un tubo eppendorf con todos los componentes necesarios para la síntesis de la primera cadena de cDNA: 1 µl de Quantiscript Reverse Transcriptasa®, 4 µl Quantiscript RT buffer 5x®, 1 µl RT Primer mix® y 14 µl de RNA templado (obtenido de la reacción anterior) para un volumen final de reacción de 20 µl. Posteriormente los tubos se incubaron a 42°C por 15 minutos. Para inactivar la transcriptasa reversa el tubo se incubó en un termoblock a 95°C durante 3 minutos. La concentración total del cDNA se midió utilizando un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). Finalmente, el cDNA obtenido se almacenó a -20°C hasta su utilización para PCR en tiempo real.

7.15 Expresión de *kpsMT K1* en las cepas vaginales de *E. coli* PCR en Tiempo Real

Los oligonucleótidos utilizados para la expresión del gen capsular *kpsMT1* fueron los mismos que se utilizaron para la identificación por PCR convencional (Tabla 2). Se utilizó el aparato de PCR en Tiempo Real Corbette® (Rotor Gene). El volumen final por mezcla de reacción fue de 20 µl: 10 µl de RealQ Plus 2x Master Mix® (Ampliqon), 1 µl del oligonucleótido Forward (10 pmol), 1 µl del oligonucleótido Reverse, (10 pmol) 7 µl de agua libre de nucleasas y 1 µl de cDNA templado (500 ng/µl). Las condiciones de amplificación fueron: 95° C por 15 minutos (activación de la enzima TEMase Hot Start), y 40 ciclos de 95°C por 30 segundos (desnaturalización), 60° C por 30 segundos (alineación) y 72°C por 30 segundos (extensión). El control interno para cada ensayo fue el gen 16S rRNA. La melting point se realizó en cada corrida de PCR en Tiempo Real. La cepa de *E coli* ATCC 11775 se utilizó como control positivo en cada ensayo.

7.16 Análisis estadístico

La prueba de X² fue aplicada para identificar la relación entre los genes que codifican para resistencia a antibióticos y desinfectantes entre las cepas de *E coli* portadoras de los integrones clase I y clase II. El nivel de significancia estadística fue $\alpha \leq 0.05$.

8. Resultados

8.1 Mujeres estudiadas

Las cepas fueron aisladas de 210 mujeres con infecciones cérvico-vaginales de la clínica oficial No. 64 del IMSS, Unidad Tequesquihuac y de la clínica oficial No.72 del IMSS, Unidad Tlalnepantla.

8.2 Edad de las pacientes analizadas

La distribución de edad de las pacientes se observa en la figura 2. El rango de edad más abundante fue el de 41 a 60 años con 40.9% (n=86), seguido por los rangos de 18 a 40 años con 40.4% (n=85) y de 61 años a 89 con 14.7% (n=31). En el 3.8% (n=8) de los pacientes analizados no se pudo determinar la edad.

El promedio de edad de las mujeres fue de 44 años (rango: 18 a 89 años).

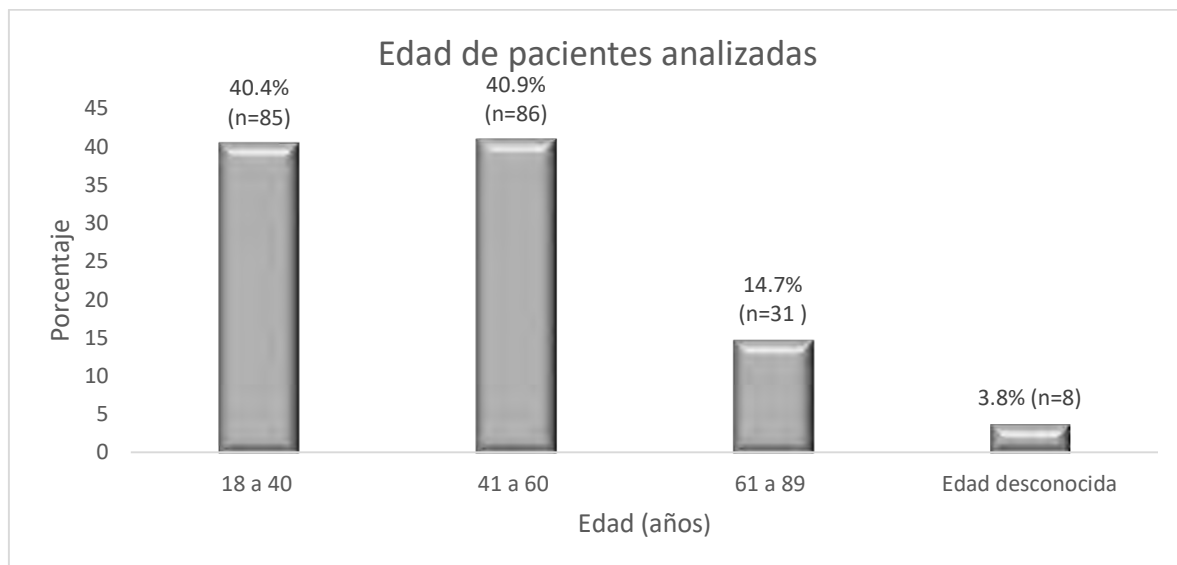


Figura 2. Distribución de pacientes analizadas por rango de edad.

8.3 Identificación de *E coli* cérvico vaginal

E. coli se identificó por pruebas bioquímicas y por PCR convencional mediante amplificación del gen 16S rRNA. (Figura 3.) *E. coli* fue identificada en el 95% (n=200) de las mujeres infectadas (Figura 4)

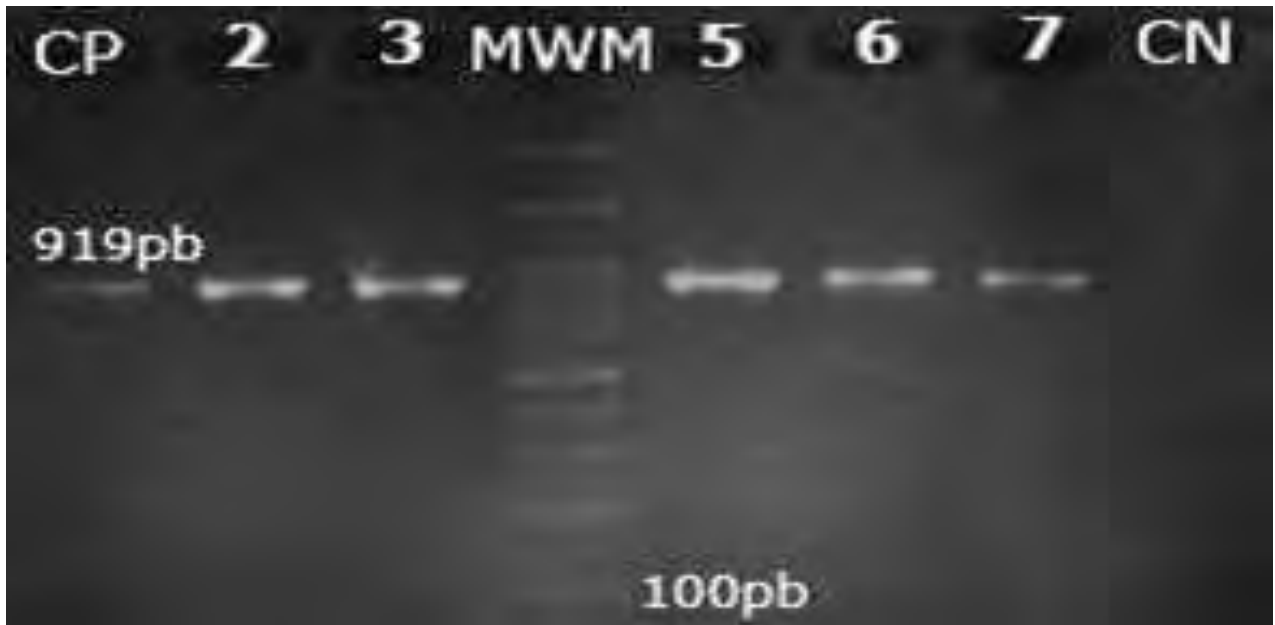


Figura 3. Identificación de *Escherichia coli* mediante la amplificación del gen 16S rRNA Carril 1, control positivo (*E. coli* ATCC11775). Carriles 2-3 y 5- 7, cepas de *E. coli*. Carril 4, MWM (100 pb). Carril 8, control negativo (sin DNA molde).

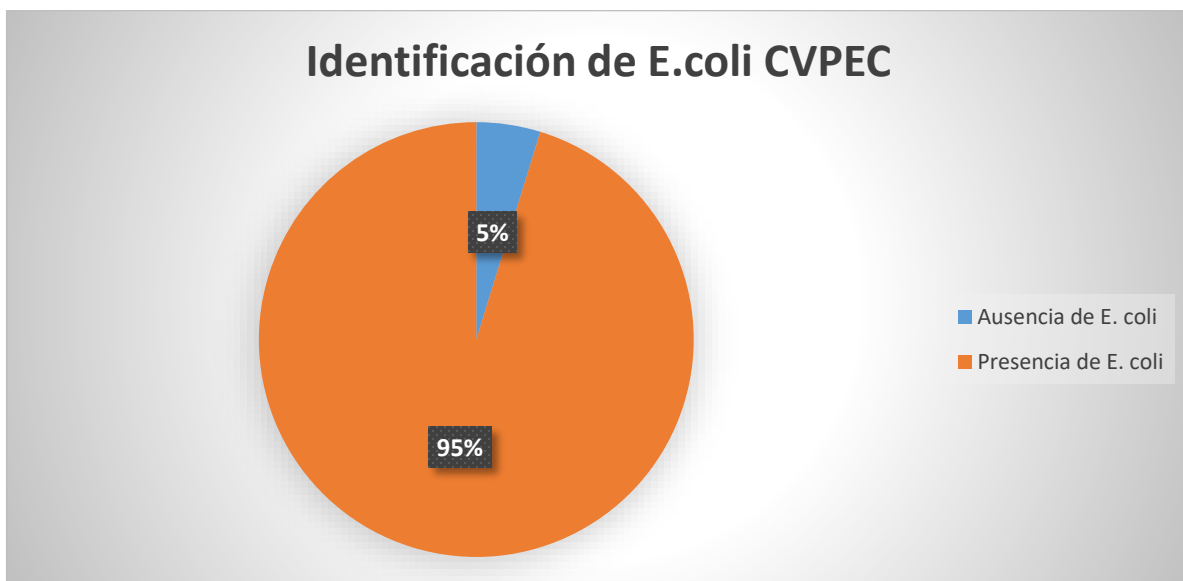


Figura 4. Identificación de *Escherichia coli* proveniente de las pacientes con infecciones vaginales. El 95% de las mujeres resultaron positivas para *E. coli* y el 5% resultaron negativas.

8.4 Detección de los genes de resistencia a sulfametoxazol, a desinfectantes, integrones, el locus *mar* y el gen *KpsMT k1* en cepas de *E. coli*

Los genes *qacEΔ1* (desinfectantes; figura 5), *sul2* (sulfametoxazol; figura 6), *marR-marO* (resistencia múltiple a los antibióticos; figura 7), e *IntI1* (integrón clase I; figura 8) se identificaron en la mayoría de las cepas de *E. coli*, mientras que el integrón clase II (*IntI2*; figura 9) y el antígeno capsular *KpsMT K1* (figura 10) se encontraron en una tercera parte de las cepas. El gen *sul3* no se identificó en ninguna de las cepas de *E. coli*. (Tabla 3; Figura 11).

Tabla 3. Porcentaje de genes encontrados en las cepas de *E. coli* cérvico vaginal.

Gen		Número de cepas (n=200)	Porcentaje
<i>qacEΔ1</i>	Desinfectantes	157	78.5
<i>sul2</i>	Sulfametoxazol	156	78
<i>sul3</i>		0	0
<i>maR</i> y <i>marO</i>	Operón <i>mar</i>	186	93
<i>intI1</i>	Integrón de clase I	166	83
<i>intI2</i>	Integrón de clase I	62	31
<i>kpsMTK1</i>	Antígeno capsular K	67	33.5

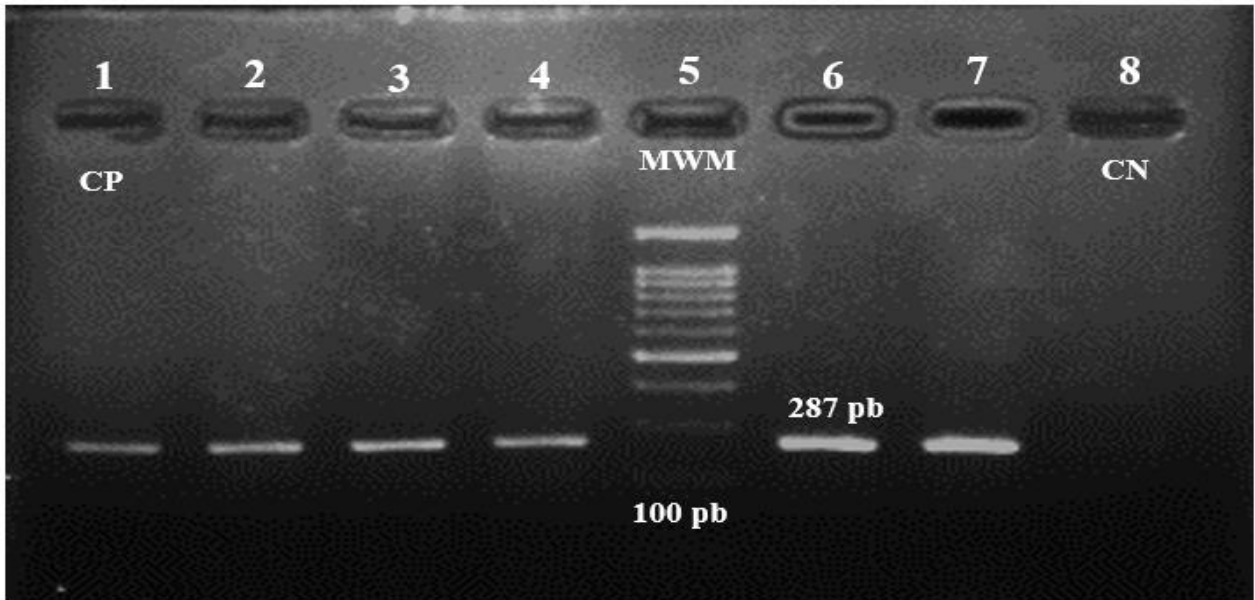


Figura 5. Identificación de *qacED1* en *Escherichia coli* cérvico-vaginal. Carril 1, control positivo (*E. coli* ATCC11775). Carril 1, control positivo (*E. coli* ATCC11775). Carriles 2-4 y 6-7 cepas de *E. coli*. Carril 5 MWM (100 pb). Carril 8 control negativo (sin DNA molde).

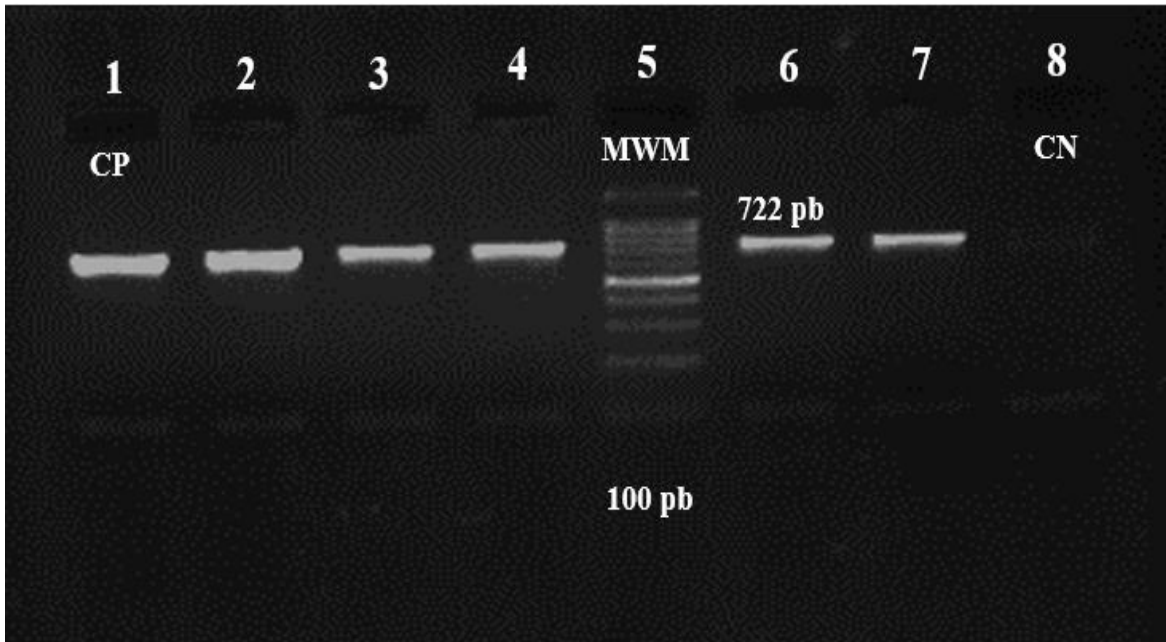


Figura 6. Identificación de *sul2* en *Escherichia coli* cérvico-vaginal. Carril 1, control positivo (*E. coli* ATCC11775). Carriles 2-4 y 6-7 cepas de *E. coli*. Carril 5 MWM (100 pb). Carril 8 control negativo (sin DNA molde).

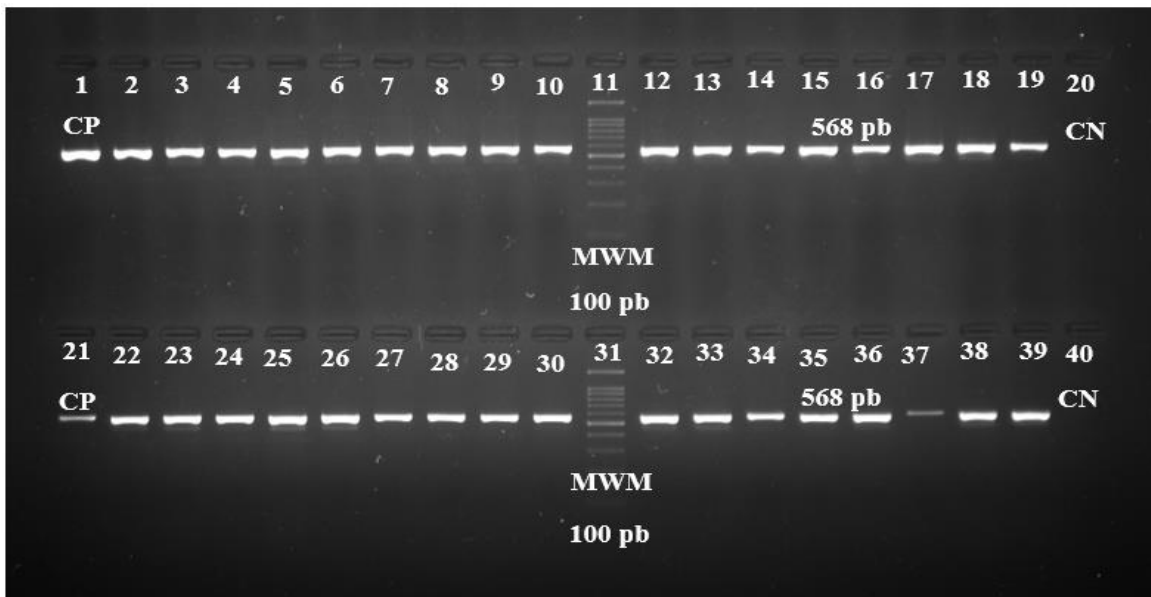


Figura 7. Identificación de *marR-marO* en *Escherichia coli* cérvico-vaginal. Carriles 1 y 21 control positivo (*E. coli* ATCC11775). Carriles 2-10,12-19,22-30,32-39 cepas de *E. coli*. Carriles 11 y 31 MWM (100 pb). Carriles 20 y 40 control negativo (sin DNA molde)

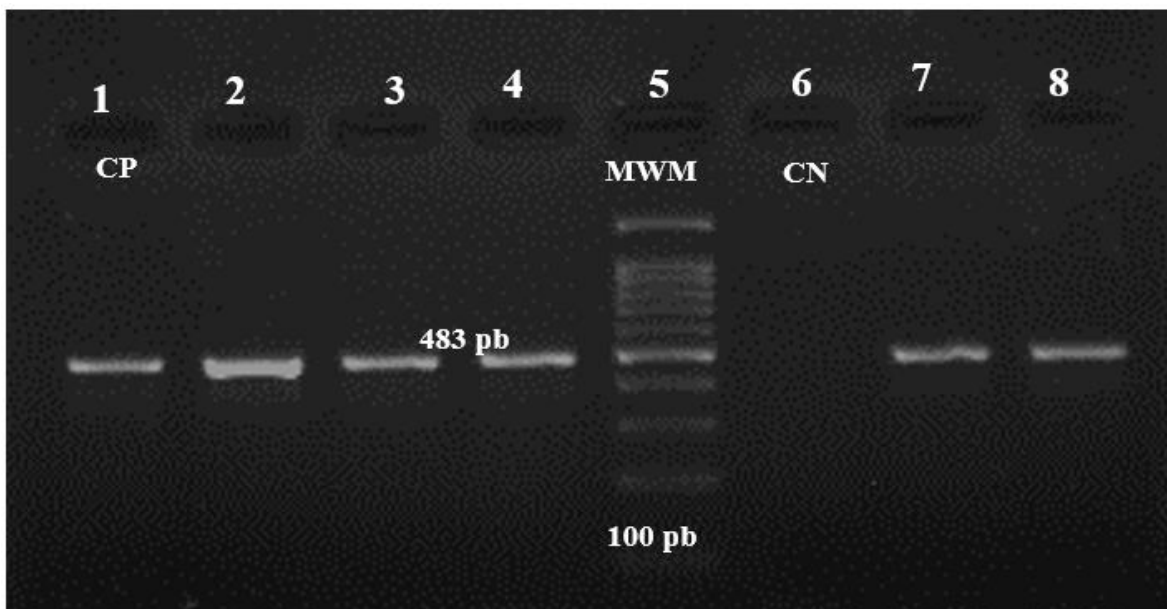


Figura 8. Identificación del gen *int11* en *Escherichia coli* cérvico-vaginal. Carril 1, control positivo (*E. coli* ATCC11775). Carriles 2-4,7 y 8 cepas de *E. coli*. Carril 5 MWM (100 pb). Carril 6 control negativo (sin DNA mole)

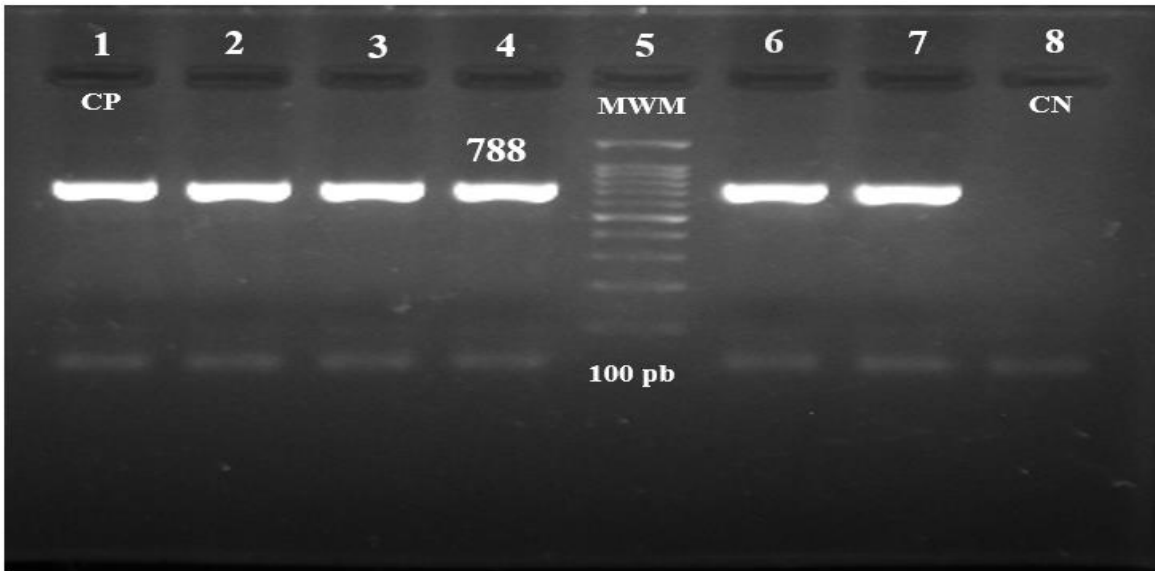


Figura 9. Identificación del gen *intI2* en *Escherichia coli* cérvico- vaginal. Carril 1, control positivo (*E. coli* ATCC11775). Carriles 2-4,6 y 7 cepas de *E. coli*. Carril 5 MWM (100 pb). Carril 8 control negativo (Sin DNA molde).

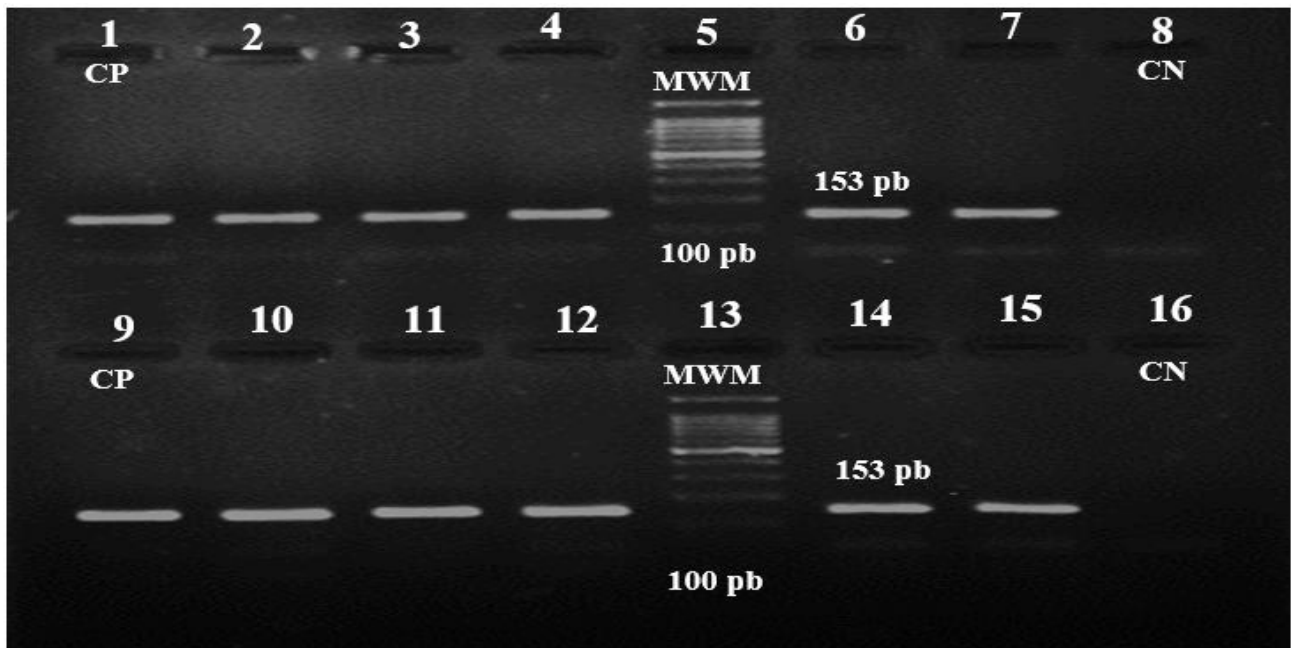


Figura 10. Identificación del gen *KpsMTk1* en *Escherichia coli* cérvico- vaginal Carril 1, control positivo (*E. coli* ATCC11775). Carriles 2-4, 6-7, 9-12, 14 y 15 cepas de *E. coli*. Carriles 5 y 13 MWM (100 pb). Carriles 8 y 16 control negativo (sin DNA molde).

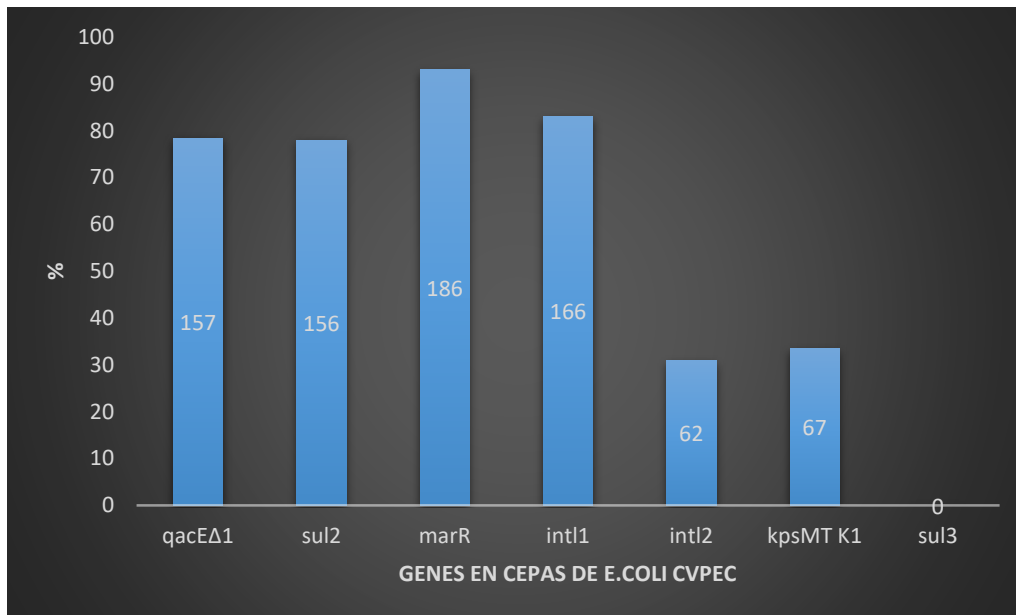


Figura 11. Detección de genes en cepas de *E.coli* cérvico-vaginal.

8.5. Patrones de asociación de los genes de resistencia en cepas de *E. coli*

Se encontraron 33 patrones distintos de asociación de los genes de *E. coli* (Tabla 4), dentro de los cuales el patrón No.1 (*int1-qacEΔ1-marR-marO-sul2*) se detectó en el 24.5% (n=49) de las cepas, el patrón No.2 (*int1-qacEΔ1-marR-marO-kpsMTK1-sul2*) en el 12% (n=23), y el patrón No. 3 (*int1-int2-qacEΔ1-marR-marO-sul2*) en el 8% (n=16). En la mayoría de los patrones se encontraron los integrones clase I o II, el locus *mar*, genes de resistencia a sulfametoxazol y a desinfectantes (Tabla 4).

Tabla 4. Patrones de asociación de los diferentes genes de resistencia a antibióticos, desinfectantes y el antígeno capsular en las cepas clínicas de *E. coli*.

No de patrón	Patrón	Cepas N=200	Porcentaje (%)
1	<i>intl1-qacEΔ1-marR-marO-sul2</i>	49	24.5
2	<i>intl1-qacEΔ1-marR-marO-kpsMTK1-sul2</i>	23	11.5
3	<i>intl1-intl2-qacEΔ1-marR-marO-sul2</i>	16	8
4	<i>qacEΔ1-marR-marO-sul2</i>	13	6.5
5	<i>intl1-intl2-qacEΔ1-marR-marO-kpsMTK1-sul2</i>	12	6
6	<i>intl1-qacEΔ1-marR-marO</i>	10	5
7	<i>Intl1-marR-marO-sul2</i>	8	4
8	<i>intl1-qacEΔ1-sul2</i>	7	3.5
9	<i>qacEΔ1-marR-marO</i>	6	3
10	<i>intl1-intl2-marR-marO-kpsMTK1</i>	6	3
11	<i>intl1-intl2-marR-marO</i>	6	3
12	<i>Intl1-marR-kpsMTK1</i>	5	2.5
13	<i>qacEΔ1-marR-marO-kpsMTK1-sul2</i>	4	2
14	<i>intl1-intl2-marR-marO-sul2</i>	3	1.5
15	<i>intl2-qacEΔ1-marR-marO-kpsMTK1-sul2</i>	3	1.5
16	Cepas bacterianas sin patrón de asociación	3	1.5
17	<i>intl2-qacEΔ1-marR-marO-sul2</i>	2	1
18	<i>intl1-qacEΔ1-kpsMTK1-sul2</i>	2	1
19	<i>intl1-intl2-qacEΔ1-marR-marO</i>	2	1
20	<i>intl1-marR-marO</i>	2	1
21	<i>intl1-intl2-kpsMTK1</i>	2	1
22	<i>intl1-qacEΔ1</i>	2	1
23	<i>intl1-marR-marO-sul2</i>	2	1
24	<i>intl1-qacEΔ1-marR-marO-kpsMTK1</i>	2	1
25	<i>marR-marO-kpsMTK1</i>	1	0.5
26	<i>intl2-qacEΔ1-sul2</i>	1	0.5
27	<i>intl2-qacEΔ1-marR-marO</i>	1	0.5
28	<i>qacEΔ1-marR-marO-kpsMTK1</i>	1	0.5
29	<i>intl1-intl2-marR-marO-kpsMTK1-sul2</i>	1	0.5
30	<i>Intl1-sul2</i>	1	0.5
31	<i>intl1-marR-marO-kpsMTK1-sul2</i>	1	0.5
32	<i>intl1-intl2-qacEΔ1-sul2</i>	1	0.5
33	<i>intl1-intl2</i>	1	0.5
34	<i>intl1-qacEΔ1-marR-marO-sul2-kpsMTK1</i>	1	0.5
Total		200	100

8.6 Expresión del gen capsular *kpsMTk1* en las cepas de *Escherichia coli*

Después de la infección *in vitro* del cultivo celular A431 con las cepas de *E. coli* portadoras del gen *kpsMTk1* (n=67, tabla 3), se encontró que únicamente el 7.4% de las cepas (n=5) expresó el marcador *kpsMTk1* (figuras 12-14).

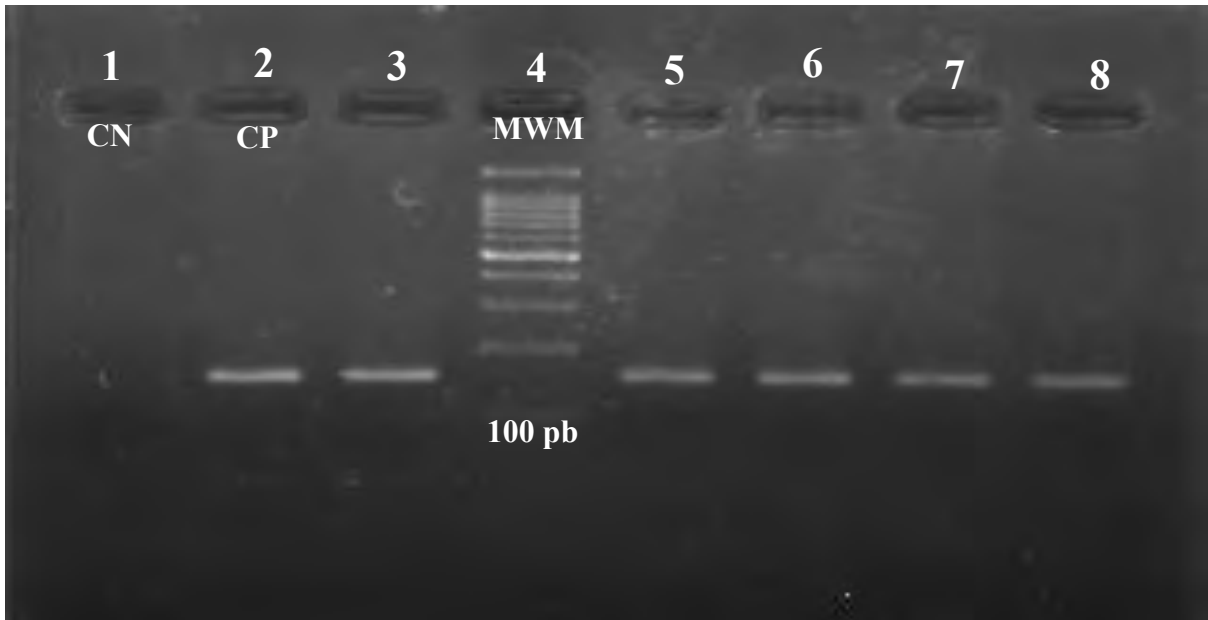


Figura 12. Detección de la expresión del gen *kpsMTk1* en *Escherichia coli* por el método de PCR-RT (transcriptasa reversa). Carril 1, control negativo (sin DNAc). Carril 2 control positivo (*E. coli* ATCC11775). Carriles 3 y 5-8 cepas de *E. coli*. (DNAc) Carril 4, MWM (100 pb).

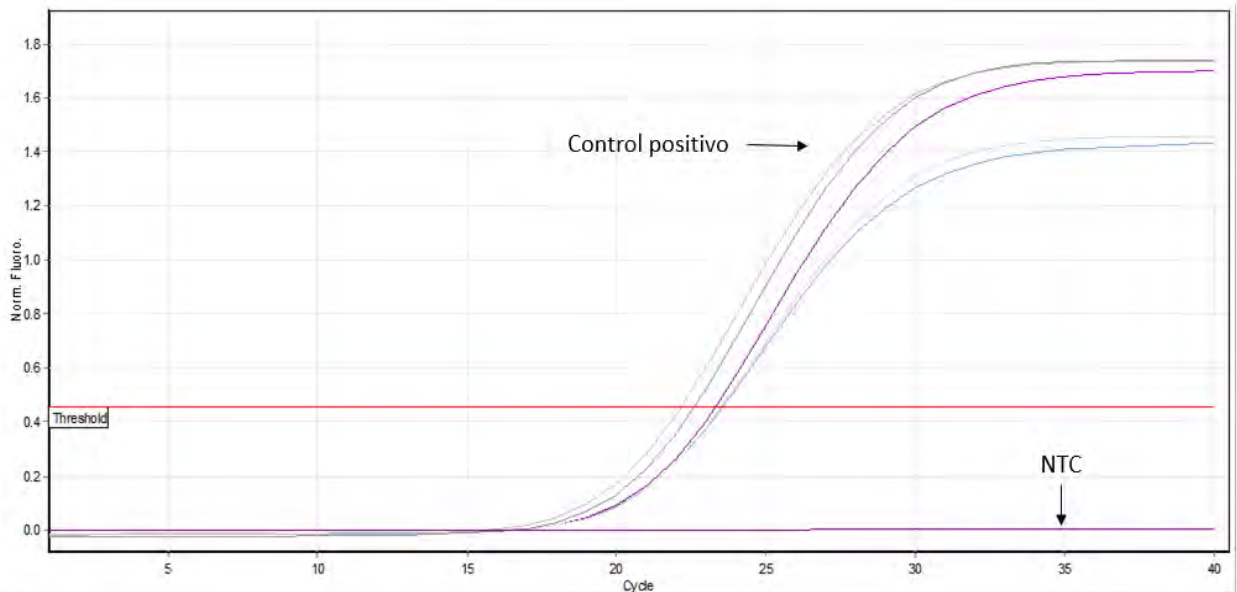


Figura 13. Expresión del gen *kpsMTK1* en cepas de *E. coli* por PCR en Tiempo Real. Control positivo (*E. coli* ATCC11775). NTC (No Control Templado).

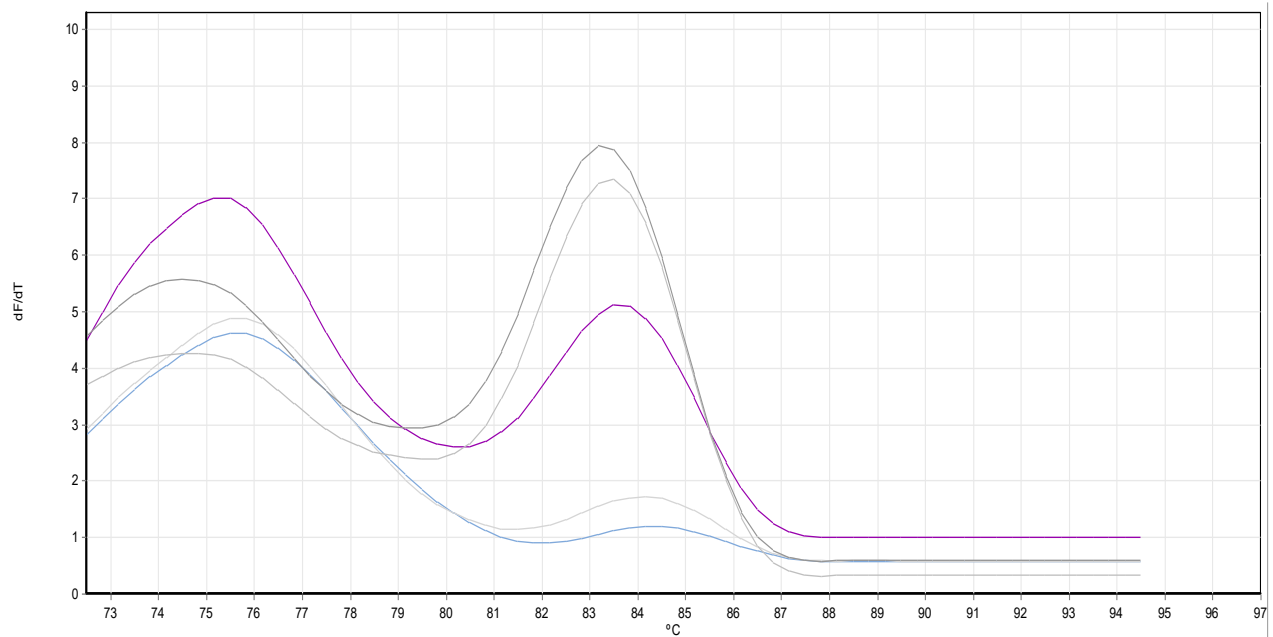


Figura 14. Curva de fusión (Melting point), del gen *kpsMTK1*. Los productos específicos muestran una temperatura de disociación más elevada que los productos inespecíficos.

8.7. Análisis Estadístico

La relación entre los genes que codifican para resistencia a antibióticos y desinfectantes entre las cepas de *E coli* portadoras de los integrones clase I y clase II se analizaron por la prueba de bondad X^2 . De acuerdo con los resultados obtenidos se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los genes de resistencia a antibióticos y desinfectantes en las cepas de *E. coli* portadoras de los integrones clase I y II. El nivel de confianza utilizado fue del 95% con un P value <0.05.

9. Discusión

9.1 Pacientes estudiadas.

Para el desarrollo de este estudio se analizaron 210 muestras de mujeres con síntomas de infecciones cérvico-vaginales que acudieron a la clínica N. 64, Unidad Tequesquihuac y a la clínica No. 62 de Cuautitlán Izcalli, ambas pertenecientes al IMSS, ubicadas en el municipio de Tlalnepantla, Estado de México.

Las infecciones cérvico vaginales son una de las principales causas de consulta en las clínicas de primer nivel de atención médica, principalmente en mujeres en edad reproductiva. La prevalencia de los procesos infecciosos más comunes puede variar dependiendo de la población de estudio, por ejemplo, la candidiasis vaginal varía de un 10 a 25 %, y la vaginosis bacteriana (VB), varía entre 20 y 45 % (Bradshaw, *et al.* 2005). Las infecciones cérvico-vaginales bacterianas se deben principalmente a bacterias Gram negativas como *E. coli*. En este estudio se identificó a *Escherichia coli* en el 95% (n=200; Figura 4) de las mujeres con infecciones cérvico-vaginales (n=210). Este porcentaje es superior al 34.5% (n=132) descrito por Rashki (2014) en un grupo de mujeres con infecciones vaginales (n=382) y al 17% (n=75) de otro grupo de mujeres infectadas(n=440) (Pedraza, *et al.* 2007). El elevado porcentaje de *E. coli* identificado en este estudio en las mujeres infectadas pone de manifiesto que en México ha ocurrido un importante incremento de las infecciones vaginales

por *E. coli*, por lo que es importante establecer programas que ayuden a disminuir y a diseminar las infecciones por esta bacteria.

9.2 Gen *qacEΔ1* que codifica para resistencia a los compuestos cuaternarios de amonio.

El genotipo *qacEΔ1* que codifica para la resistencia a los desinfectantes fue identificado en el 78.5% (n=157; Tabla 3; Fotografía 5; Figura 11) de las cepas vaginales de *E. coli*. Este porcentaje es inferior al 93.7% (n=102) detectado en cepas de *E. coli* de origen clínico (Shafaati, *et al.* 2016) y superior al 22.3% (n = 28), y 9.6% (n=50) detectados en cepas de *E. coli* aisladas de carnes (Hoffmann *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2015), al 40.9% (n=18) identificado en cepas de *E. coli* (n= 44) aisladas de una granja de pollos (Yang *et al.*, 2017). y también al 19.3% (n=17) descrito en cepas de *E. coli* aisladas de pandas gigantes (Guo, *et al.* 2015). La elevada presencia del gen *qacEΔ1* en las cepas estudiadas de *E. coli* demuestra que en nuestro país ha ocurrido un incremento notable de los genes que codifican para desinfectantes, lo cual puede deberse a la transferencia horizontal mediante plásmidos o transposones, por lo que es importante mejorar o cambiar las medidas de desinfección, sobre todo en los hospitales, en donde el riesgo de transmisión bacterianas en los pacientes, sobre todo de inmunodeprimidos, puede ser mayor.

9.3 Gen *sul2*. (resistencia a sulfametoxazol).

El gen *sul2* que codifica para la resistencia al sulfametoxazol fue identificado en el 78% (n=156; Tabla 3; Fotografía 6; Figura 11) de las cepas vaginales de *E. coli*. Este porcentaje coincide con el reportado por Grape *et al.*, (2003), quien encontró el gen *sul2* en el 75% (n=48) de las cepas de *E. coli* de origen humano (n=64), sin embargo, es superior al 67% (n=100) detectado en cepas de *E. coli* uropatógenas (Teichmann *et al.*, 2014), y al de 60.8% (n=150; Yahiaoui, *et al.* 2015). La resistencia al sulfametoxazol codificada por los genes *sul* en cepas de *E. coli* se ha incrementado en varias partes del mundo, alcanzando porcentajes de detección para *sul2* del 96% (n=122) en cepas uropatógenas de *E. coli* (n=127) aisladas de pacientes de un hospital en Lodz (Polonia) (Adamus *et al.*, 2018) y del 77.9% (n=350) en Europa y Canadá. (Blahna, 2006). El incremento notable de la

resistencia al sulfametoxazol debido a la presencia de los genes *sul* puede deberse a que el sulfametoxazol en combinación con el trimetoprim son antibióticos utilizados frecuentemente en México por el sector salud para tratar las infecciones, tanto para Gram positivos como Gramnegativos, en cuyo caso, las cepas se han seleccionado como resistentes, siendo frecuente que los genes que codifican para la resistencia (*sul*) puedan transferirse horizontalmente de una bacteria a otra mediante la conjugación.

9.4 identificación del locus *mar* (resistencia múltiple a los antibióticos).

Los genes *marR* y *marO* presente en el locus *mar* se encontraron en el 93% (n=186; Tabla 3; Fotografía 7; Figura 11) de las cepas de *E. coli*. El método de identificación utilizado para identificar el locus *mar* fue el previamente descrito por Sáenz *et al.* (2004), quienes detectaron el locus *mar* en cepas de *E. coli* de origen humano, animal y alimentario, además analizaron los cambios de aminoácidos en la proteína *marR* y mutaciones en los nucleótidos dentro de la región del operador-promotor *marO*, lo cual posiblemente contribuya al fenotipo de resistencia múltiple a los antibióticos. La elevada presencia del locus *mar* encontrado en las cepas vaginales de *E. coli* demuestra la capacidad de las cepas para ocasionar infecciones crónicas (Linde *et al.*, 2000), debido a que el locus *mar* está asociado a la resistencia de un amplio grupo de antibióticos. como el cloranfenicol, cefalosporinas, ácido nalidíxico, fluoroquinolonas, penicilinas, puromicina, rifampicina y tetraciclina, además de desinfectantes (Sharma, 2017).

9.5 integrón clase I.

El integrón clase I fue identificado por PCR mediante amplificación del gen *int1* en el 83% (n=166; Tabla 3; Fotografía 8; Figura 11) de las cepas vaginales de *E. coli*. En este trabajo el porcentaje del integrón I encontrado en las cepas de *E. coli* es superior al 57% (n=181; Rao, *et al.* 2006) y 47% (n=12; Lavakhamseh *et al.*, 2015) reportado en cepas de *E. coli* aisladas de pacientes hospitalizados, y al 29% de muestras fecales (n=29; Vinué *et al.*, 2008). El integrón I también ha sido detectado en 121 cepas de *E. coli* uropatogena provenientes de pacientes Iranies del Hospital

Shiraz Nemazee (59.5%; Ebrahim, *et al.* 2018), y 72% (n=95; Wei, *et al.* 2013). La elevada frecuencia del integrón clase I en las cepas vaginales de *E. coli* evidencia la capacidad de las cepas para ocasionar infecciones crónicas, debido a que se ha descrito que los integrones de clase 1 están asociados con una variedad de cassettes de genes de resistencia, incluyendo un determinante de resistencia *aadA*, que codifica para resistencia a estreptomicina-espectinomicina, los genes de resistencia al trimetoprim (Fluit & Schmitz 204), y también acarrean cassettes de genes que codifican resistencia a β -lactámicos (Mazel 2006).

9.6 integrón clase II.

El integrón clase II fue identificado en el 31% (n=62) de las cepas vaginales de *E. coli* mediante amplificación del gen *intI2* (Tabla 3; Fotografía 9; Figura 11). Este porcentaje es superior al 3.9% encontrado por Lavakhamseh (2015) en cepas de *E. coli* aisladas de pacientes (n=120), y al encontrado en cepas aisladas de muestras fecales (4%, Vinué *et al.*, 2008; 1%, Odetoyin *et al.*, 2017). El integrón clase II también ha sido identificado en cepas de *E. coli* uropatógena con una frecuencia del 8% (n=18; Poey *et al.*, 2014). La presencia del integrón clase II en las cepas de *E. coli* estudiadas evidencia la complejidad del tratamiento de las infecciones vaginales, debido a que los integrones II acarrean cassette de genes que codifican para resistencia a trimetoprim (*dfrA1*), estreptomicina/espectinomicina (*sat1*) y a amino glucósido (*aadA1*).

9.7 Gen *kpsMT K1* (K-antigen).

El gen capsular (*KpsMT K1*) se identificó en el 33.5% de las cepas vaginales de *E. coli* (n=67; Tabla 3; Fotografía 10; Figura 11). El porcentaje encontrado en este estudio es similar al 39.3% (n=11) identificado en cepas de *Escherichia coli* uropatógenas (Toval *et al.*, 2014) y también al 33.3% (n=12) detectado en cepas UPEC (Goh *et al.*, 2017), sin embargo, es inferior al 72.7% (n=16) descrito en cepas de *E. coli* adherentes-invasivas (n=22; AIEC) aisladas de pacientes pediátricos con enfermedad de Crohn (Pia Conte *et al.*, 2014), y al 86.3% (n=113) reportado en cepas de *E. coli* provenientes de un hospital universitario chino (n = 131; Fujian

Medical University Union Hospital, Fuzhou, China) (Wu, *et al.*, 2017). La expresión de KpsMT K1 de *E. coli* durante los procesos infecciosos le permite a la bacteria la síntesis de la cápsula, para evitar la fagocitosis por macrófagos, la acción de los antibióticos, la evasión el sistema inmune humoral y celular, generando de esta manera las infecciones crónicas y/ o recurrentes.

9.8 Gen *sul3* (resistencia a sulfametoxazol).

El gen *sul3* que codifica para resistencia a sulfametoxazol no se detectó en ninguna de las cepas de *E.coli* cérvico-vaginales (Tabla 3; Figura 11), el cual contrasta con el encontrado por Curiano *et al.*, (2011), quienes detectaron el gen *sul3* en el 6% (n=15) de cepas de *E. coli* (n=249) obtenidas de humanos hospitalizados, ambulatorios y sanos, y también al 2.2% detectado en cepas de *E. coli* (n=144) provenientes de hospitales Iranies (Arabi *et al.*, 2015). La frecuencia de este gen ha sido también detectada en 45 cepas de *E. coli* uropatógena (2.2%; n=1; Shin, *et al.* 2015).

9.9 Patrones de asociación de los genes en las cepas CVPEC.

En este estudio se identificaron 33 patrones de asociación de los diferentes genes en las cepas CVPEC analizadas (Tabla 4). El patrón más prevalente (24.5; n=49) fue el integrado por los genes *intl1-qacEΔ1-marR-marO-sul2*. Estos resultados demuestran que las cepas cérvico-vaginales de *E. coli* estudiadas son portadoras del locus *mar* (resistencia múltiple a los antibióticos), de integrones (I y II), que acarrean numerosos genes de resistencia a los antibióticos (Canal, *et al.* 2016) y de desinfectantes (Karczmarczyk *et al.*, 2011), lo cual representa un serio problema de salud, por lo que es importante establecer esquemas de vigilancia y de monitoreo para mejorar las alternativas de tratamiento de las infecciones, con el propósito de disminuir a mediano plazo, el riesgo de diseminación de cepas multirresistentes a los antimicrobianos.

9.10 Expresión del antígeno capsular *kpsMT K1* de *E. coli* después de la infección *in vitro* de la línea celular vaginal A431.

El gen *kpsMT K1* se expresó en el 7.4% (n=5; Fotografía 12; Figura 13 y 14) de las cepas de *E. coli* portadoras del gen (n=67; Tabla 3). Estos resultados son inferiores a los reportados por Zhao *et al.* (2008), quienes estudiaron la expresión de genes específicos en *Escherichia coli* uropatógena (UPEC) y *E. coli* patógena aviar (APEC) en un modelo murino de infección del tracto urinario y en un modelo de desafío de pollo, en donde *kpsMT K1* se expresó en el 45% (n=91) de las cepas UPEC (n=202) y en el 55% (n=55) de cepas de APEC (n=100). Los resultados demostraron que durante el modelo de infección *in vitro* del cultivo de células epiteliales vaginales (A431) con las cepas CVPEC, las bacterias fueron capaces de expresar el antígeno capsular *kpsMTK1* durante la patogénesis de la infección, evidenciando la capacidad de las cepas para ocasionar infecciones crónicas y/o recurrencia de las infecciones vaginales.

10. Conclusiones

1. El locus de resistencia múltiple a los antibióticos (*mar*), el integrón clase 1, el gen de resistencia al sulfametoxazol (*sul2*) y el gen de desinfectantes (*qacEΔ1*) fueron identificados en la mayoría de las cepas vaginales de *E. coli*, mientras que el integrón clase II fue menos frecuente.
2. En este estudio se demostró que si bien el marcador *kpsMT K1* fue detectado en la tercera parte de las cepas de *E. coli*, después de la infección de la línea celular vaginal A431 la expresión de *kpsMT K1* fue muy baja.
3. Los resultados en este estudio demostraron que las cepas de *E. coli* presentaron diferentes patrones de asociación del locus *mar*, integrones clase I y II, del gen para resistencia al sulfametoxazol, del gen de desinfectantes, y del antígeno capsular, lo que demostraría la capacidad de las cepas para provocar infecciones crónicas o recurrentes.

11. Bibliografía

1. Anderson G, Goller C, Justice S, Hultgren S, Seed P. 2009. Polysaccharide capsule and sialic acid-mediated regulation promote biofilm-like intracellular bacterial communities during cystitis. *Infect Immun.* 78(3): 963-975.
2. Andreu A. 2005. Patogenia de las infecciones del tracto urinario. *Enferm infeccc Microbiol Clin.* 23(4):15-21.
3. Arabi H, Pakzad I, Nasrollahi A, Samadi N. *et al.* 2015. Sulfonamide Resistance Genes (sul) M in Extended Spectrum Beta Lactamase (ESBL) and Non-ESBL Producing *Escherichia coli* isolated From Iranian Hospitals. *Jundishapur J Microbiol.* 8(7):1-6.
4. Blahna M, Zalewski C, Reuer J, Kahlmeter G, Foxman B, Marrs C. 2006. The role of horizontal gene transfer in the spread of trimethoprim-sulfamethoxazole resistance among uropathogenic *Escherichia coli* in Europe and Canadá. *J Antimicrob Chemother.* 57(4):666-672.
5. Bradshaw C, Morton A, Garland S, Morris MB, Moss LM, Fairley CK. 2005. Higher-risk behavioral practices associated with bacterial vaginosis compared with vaginal candidiasis. *Obstet Gynecol.* 106(1):105-114.
6. Canal N, Meneghueti K, Almeida C, Rosa M, Otton L, Corcao G. 2016. Characterization of the variable región in the class 1 integron of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolated from surface wáter. *Braz J Microbiol.* 47(2):337-344
7. Cárdenas M, Cruz O, Gándara J, Pérez M. 2014. Factores de virulencia bacteriana: la “inteligencia” de las bacterias. *Elementos.* 94(1): 35-43.
8. Curiano T, Cantón R, Garcillán P, de la Cruz F, Baquero F, Coque T. 2011. Association of composite IS26-*su*3 Elements with Highly Transmissible Incl1 Plasmids in Extended-Spectrum- B-Lactamase-Producing *Escherichia coli* Clones from Humans. *Antimicrob Agents Chemother.* 55(5):2451-2447.
9. Deng Y, Bao X, Ji L, Chen L, Liu Junyan, Miao Jian, Chen Dinggiang, Bian Huawei, Li Yanmei, Yu G. 2015. Resistance integrons: class 1, 2 and 3 integrons. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 14(45):1-11.

10. Dessie HK, Bae DH, Lee YJ. Characterization of integrons and their cassettes in *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates from poultry in Korea. *Poult Sci.* 92(11): 3036-3043.
11. Diomedi A, Chacón E, Delpiano L, Hervé B, Jemenao I, Medel M. et al. 2017. Antisépticos y desinfectantes: apuntando el uso racional. Recomendaciones del Comité Consultivo de infecciones Asociadas a la Atención de Salud, Sociedad Chilena de Infectología. *Rev Chilena infectol.* 34(2):156-174.
12. Ebrahim S, Nezhad N, Heidari H, Motamedifar A, Motamedifar M. 2018. Detection of Antimicrobial Susceptibility and Integrons Among Extended-spectrum B-lactamase Producing Uropathogenic *Escherichia coli* isolates in Southwestern Iran. *Oman Med J.* 33(3):218-223.
13. Fluit AC, Schmitz FJ. 2004. Resistance integrons and super-integrons. *Clin Microbiol Infect.* 10:272–288.
14. Garrido M. 2006. *Caracterización de los sistemas de captación de hierro y zinc del patógeno animal Pasteurella multocida.* Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona, España.
15. Goh K, Phan M, Forde B, Chong T, Yin W, Chan K, Ulett G, Dulce M, Beatson S, Schembri, M. 2017. Genome-Wide Discovery of Genes Required for Capsule Production by Uropathogenic *Escherichia coli*. *mBio.* 8(5):1-17.
16. Grape M, Sundstrom L, Kronvall G. 2003. Sulphonamide resistance gene sul3 found in *Escherichia coli* isolates from human sources. *J Antimicrob Chemother.* 52(6):1022-1024.
17. Guo L, Long M, Huang Y, Wu G, Deng W, Yang X, Li B, Meng L, Cheng L, Fan H, Zhang H, Zou L. 2015. Antimicrobial and disinfectant resistance of *Escherichia coli* isolated from giant pandas. *J Appl Microbiol.* 119(1): 55-64.
18. Hall RM, Collins CM. 1998. Antibiotic resistance in gram- negative bacteria: The role of gene cassettes and integrons. *Drug Resist Updat* 1(2): 109-119.
19. Herrera J, Romero J, López L. 2016. “Efecto bactericida de desinfectantes sobre cepas de *Escherichia coli* y *Listeria innocua* en superficies de uso en la industria alimentaria” Tesis profesional. Universidad de Chile.

20. Hilbert D, Paulish T, Mordechai E, Adelson M, Trama J. 2008. O serogroups, phylogeny, and virulence factors of cervicovaginal and rectal *Escherichia coli* isolates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 27(12):1265-1268.
21. James JR, Steel AL. 2000. Extended Virulence Genotypes of *Escherichia coli* Strains from Patients with Urosepsis in Relation to phylogeny and Host Compromise. *J Infect Dis.* 181(1):261-272.
22. Johnson JR. 1991. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clin Microbiol Rev.* 4(1):80-128.
23. Karczmarczyk M, Abbott Yvonne, Waish C, Leonard N, Fanning Séamus. 2011. Characterization of Multidrug-Resistant *Escherichia coli* isolates from Animals Presenting at a University Veterinary Hospital. *Appl Environ Microbiol.* 77(20):7104-7112.
24. Lavagnoli L, Basetti B, Lemos T, Kutz M, Cerutti C. 2017. Factores asociados con la contracción de enterobacterias resistentes al carbapenem. *Rev. Latino-Am. Enfermagem.* 25(e2935): 1-7.
25. Lavakhamseh H, Ramazanzadeh R, Mohajeri P, Rasani A, 2015. Multidrug resistant *Escherichia coli* Strains isolated from patients are associated with class 1 and 2 integrons. *Chemotherapy* 61(2):72-76.
26. Lavigne JP, Bruyère F, Bernard L, Combescure C. Resistance and virulence potential of uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from patients hospitalized in urology departments: a French prospective multicentre study. *J Med Microbiol.* 65(6): 530-537.
27. Lena K, Ponzi C, Bastos M, Muner L, Corcao G. Characterization of the variable región in the class 1 integron of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolated from Surface wáter. *Braz J Microbiol.* 47(2):337-344.
28. Li D, Liu B, Chen M, Guo D, Guo X, Liu F, Feng L, Wang L. A multiplex PCR method to detect 14 *Escherichia coli* serogroups associated with urinary tract infections. *J Microbiol Methods.* 82(1):71-77.
29. Linde HJ, Notka F, Metz M, Kochanowski B, Heisig P, Lehn N. 2000. In vivo increased resistance to Ciprofloxacin in *Escherichia coli* associated with

- deletion of the C-terminal part of MarR. *Antimicrobial Agents and Chemother* 44(7):1865–1868.
30. López D, Carillo E, Leyva M, Orozco G, Manjarrez A, Arroyo E, Moncada D, Villanueva S. 2014. Identification of virulence factors genes in *Escherichia coli* isolates from women with urinary tract infection in México. *Biomed Res Int*. 2014(959206): 1-10.
 31. Martínez M, Domínguez J. 2013. Guía de antisépticos y desinfectantes. Hospital Universitario de Ceuta, España. 3-24. Disponible en: http://www.ingesa.msc.es/estadEstudios/documPublica/internet/pdf/Guia_Antisepticos_desinfectantes.pdf
 32. Mazel D. 2006. Integrons: agents of bacterial evolution. *Nat Rev Microbiol*. 4:608–620.
 33. Miranda L, Ruíz M, López J, Parra I, Gonzales E, Castro N. 2015. Relación entre factores de virulencia, resistencia a antibióticos y los grupos filogenéticos de *Escherichia coli* uropatógena en dos localidades de México. *Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica*. 35(7):426-433.
 34. Mohamed J A, Huang D B, Jiang Z D, DuPont H L, Nataro J P, Belkind-Gerson J, et al. 2007. Association of putative enteroaggregative *Escherichia coli* virulence genes and biofilm production in isolates from travelers to developing countries. *J Clin Microbiol*. 45(1): 121-126
 35. Ochoa S, Bouza E, Pérez C, Galiana L. 2005. Etiología de las infecciones del tracto urinario y sensibilidad de los uropatogenos a los antimicrobianos. *Rev Esp Quimioterap*. 45(1): 124-135.
 36. Odetoyin B, Labar A, Lamikanra A, Aboderin A, Okeke Iruka. 2017. Classes 1 and 2 integrons in faecal *Escherichia coli* strains isolated from mother-child pairs in Nigeria. *PLoS One*. 12(8):1-16.
 37. Paniagua Contreras GL, Monroy PE, Vaca PS. 2007. PCR: Manual de identificación de *Escherichia coli* y *Salmonella* spp. en materia fecal. ISBN: 978-970-32-4824-7, 1-76. FES-Iztacala, UNAM.

38. Pedraza A, Ortiz C, Dávila R, Valencia M. 2007. Infecciones cérvicovaginales más frecuentes; prevalencia y factores de riesgo. *Rev cubana Obstet Ginecol.* 33.(2): 1-12.
39. Peleg A, Hooper D. 2010. Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. *N Engl J Med.* 362(19):1804-1813.
40. Perreten V, Boerlin P. 2003. A New Sulfonamide Resistance Gene (*sul3*) in *Escherichia coli* Is Widespread in the Pig Population of Switzerland. *Antimicrob Agents Chemother.* 47(3):1169-1172.
41. Pia Conte M, Longhi C, Marazzato M, Conte A, Aleandri M, Lepanto M, Zagaglia C, Nicoletti M, Aloï M, Totino V. 2014. Adherent-invasiva *Escherichia coli* (AIEC) in pediatric crohn's disease patients: phenotypic and genetic pathogenic features. *BMC Res Notes.* 7 (748):1-12.
42. Poey M, Laviña M. 2014. Integrons in uropathogenic *Escherichia coli* and their relationship with phylogeny and virulence. *Microb Pathog.* 77(1):73-77.
43. Povilonis J, Seputiene V, Ruzauskas M, Virgallis M. 2010. Transferable class 1 and 2 integrons in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* isolates of human and animal origin in Lithuania. *Foodborne Pathdog Dis.* 7(10):1185-1192.
44. Poolman J, Wacker M. 2016. Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*, a Common Human Pathogen: Challenges for Vaccine Development and Pogress in the Field. *J Infect Dis.* 213(1): 6-13.
45. Randall L, Woodward M. 2002. The multiple antibiotic resistance (*mar*) locus and its significance. *Res Vet Sci.* 72(2): 87-93.
46. Rao A, Barlow M, Ann L, Boring J, Tenover F, McGowan J. 2006. Class 1 integrons in Resistant *Escherichia coli* and *klebsiella* spp., US Hospitals. *Emerg Infect Dis.* 12(6):1011-1014.
47. Rashki A. 2014. Cérvico-vaginopathogenic *Escherichia coli* in Iran: Serogroup distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties. *Microb Pathog.* 75(1): 29-34.

48. Rivero M, Padola N, Etcheverria A, Parma, A. 2004. *Escherichia coli* enterohemorrágica y síndrome urémico hemolítico en Argentina. *Med Buenos A.* 64(4):352-356.
49. Riveros M, Barletta F, Cabello M, Durand D, Mercado E, Contreras C. Patrones de adherencia de cepas de *Escherichia coli* difusamente adherente (DAEC) provenientes de niños con y sin diarrea. *Rev Peru Med Exp Salud Pública.* 28(1): 21-28.
50. Rodríguez G. 2002. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud pública Méx.* 44(5):464-475.
51. Rodríguez K, Giddings C, Doetkott C, Jhonson T, Fakhr Mohamed, Nolan Lisa. 2005. Comparision of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis. *Microbiology.* 151(6):2097-2110
52. Rojas C. 2007. Evaluación sobre cuatro desinfectantes sobre *Listeria monocytogenes* aislada de productos cárnicos crudos de una planta de procesados en Bogotá. Tesis de Licenciatura. Pontificia Universidad Javeriana. Bogota.
53. Ruiz J, Mosquito S, Bauer J, Ochoa T. 2011. Molecular mechanisms of antibiotic resistance in *Escherichia coli* associated to diarrhea. *Rev Perú Med Exp Salud Pública.* 28(4):648-656.
54. Sáenz Y, Briñas L, Dominguez E, Ruiz J, Zarazaga M, Vila J, Torres C. 2004. Mechanisms of Resistance in Multiple-Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* Strains of human, Animal, and Food Origins. *Antimicrob Agents Chemother.* 48(10):3996-4001.
55. Sahlberg Bang C, Demirel I, Kruse R, Persson K. Global gene expression profiling and antibiotic susceptibility after repeated exposure to the carbon monoxide-releasing molecule-2 (CORM-2) in multidrug-resistant ESBL-producing uropathogenic *Escherichia coli*. *PLoS One.* 12(6):1-25.
56. Shafaati M, Boroumand M, Nowroozi J, Amiri P, Kazemian H. 2016. Correlation Between *qacE* and *qacEΔ1* efflux Pump Genes, Antibiotic and Disinfectant Resistant Among Clinical isolates of *E. coli*. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov.* 11(2):189-195.

57. Sharma P, Haycocks J, Middlemiss A, Kettles R, Sellars L,. 2017. The múltiple antibiotic resistance operon of enteric bacteria controls DNA reappear and outer membrane integrity. *Nat Commun.* 8(1444):1-12.
58. Shin H, Lim J, Kim S, Kim J, Kwon GC, Koo S. 2015. Characterization of trimethoprim-sulfamethoxazole resistance genes and their relatedness to class 1 integron and insertion sequence common región in gram-negative bacilli. *J Microbiol Biotechnol.* 25(1):137-42).
59. Teichmann A, Souza L, Pereira M, Dagmar J. 2014. Antibiotic resistance and detection of the *sul2* gene in urinary isolates of *Escherichia coli* in patients from Brazil. *J Infect Dev Ctries.* 18(1):39-43.
60. Toval F, Kohler C, Vogel U, Wagenlehner F. 2014. Characterization of *Escherichia coli* Isolates from Hospital Inpatients or Outpatients with Urinary Tract Infection. *J Clin Microbiol.* 52(2):407-418.
61. Vidal J, Canizáles R, Gutierrez J, Navarro F. Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatógena. *Salud Pública Méx.* 49(5):376-386
62. Vinué L, Sáenz Y, Somalo S, Escudero E, Moreno M. 2008. Prevalence and diversity of integrons and associated resistance genes in faecal *Escherichia coli* isolates of healthy humans in Spain. *J Antimicrob Chemother.* 62(5);934-937.
63. Wei Q, Jiang X, Li M, Li G, Hu Q, Lu H, Chen G, Zhou Y, Lu Y. 2013. Diversity of gene cassette promoter variants of class 1 integrons in uropathogenic *Escherichia coli*. *Curr Microbiol.* 65(5):543-549.
64. Wu J, Lan F, Lu Y, He Q, Li B. 2017. Molecular characteristics of ST1193 Clone among Phylogenetic Group B2 Non-ST131 Fluorquinolone-Resistant *Escherichia coli*. *Front Microbiol.* 21(8):1-6.
65. Wu S, Dalsgaard A, Hammerum A, Porsbo L, Jensen L. 2010. Prevalence and characterization of plasmids carrying sulfonamide resistance genes among *Escherichia coli* from pigs, pig carcasses and human. *Acta Vet Scand.* 52(47):1-7.

66. Xu Z, Li L, Shirtliff M, Alam M, Yamasaki S, Shi L. 2009. Occurrence and characteristics of class 1 and 2 integrons in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients in southern China. *J Clin Microbiol.* 47(1):230-234.
67. Yahiaoui M, Robin F, Bakour R, Hamidi M, Bonnet R, Messai Y. 2015. Antibiotic Resistance Virulence and Genetic Background of Community-Acquired Uropathogenic *Escherichia coli* from Algeria. *Microb Drug Resist.* 21(5):516-526.
68. Yan F, Polk B. 2004. Commensal bacteria in the gut: learning who our friends are. *Curr Opin Gastroenterol* 20(6):565–571.
69. Yang S, Guoyan W, Mei L, Wenwen D, Hongning W, Likou Z. Antibiotic and disinfectant resistance of *Escherichia coli* isolated from a chicken farm. *Chinese Journal of Applied Environmental Biology.* 2 (2017): 312-317.
70. Zhang A, He X, Meng Y, Guo L, Long M, Yu Hua, Li B, Fan L, Liu S, Wang H, Zou L. 2015. Antibiotic and Disinfectant Resistance of *Escherichia coli* isolated from Retail Meats in Sichuan, China. *Microb Drug Resist.* 22(1):80-87.
71. Zhao L, Gao S, Huan H, Xu X, Zhu X, Yang W, Gao Q, Liu X. 2009. Comparison of virulence factors and expression of specific genes between uropathogenic *Escherichia coli* and avian pathogenic *E.coli* in a murine urinary tract infection model and chicken challenge model. *Microbiology.* 155 (5):1634-1644.
72. Zou L, Meng J, McDermott PF, Wang F, Yang Q, Cao G, Hoffmann M, Zhao S. 2014. Presence of disinfectant resistance genes in *Escherichia coli* isolated from retail meats in the USA. *J Antimicrob Chemother.* 69(10): 2644-2649.

Recomendaciones

Se recomienda a las personas que tengan el deseo de continuar con esta investigación, trabajar con los diferentes genes que codifican para el antígeno capsular además del estudiado en el presente trabajo. El gen *su13* no se encontró en las cepas CVPEC estudiadas, sin embargo, es recomendable seguir en la búsqueda de este gen, debido a la escasa información y los pocos registros que se tienen. Finalmente se aconseja seguir estudiando los diferentes cassetes de integrones por su gran relevancia en la transferencia de genes de resistencia.