



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**ASOCIACIÓN DEL ANTÍGENO CAPSULAR *kpsMTIII*
CON EL GENOTIPO DE RESISTENCIA A
ANTIBIÓTICOS EN CEPAS DE *Escherichia coli* DE
ORIGEN VAGINAL.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LIC. EN BIOLOGÍA

PRESENTA:

ACEVEDO VEGA WENDY ERIKA

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Gloria Luz Paniagua Contreras



PROYECTO FINANCIADO POR LA UNAM-DGAPA-
PAPIIT IN216517

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, 2018.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

“He aquí, yo estoy contigo, y te guardaré por donde quiera que fueres, y volveré a traerte a esta tierra; porque no te dejaré hasta que haya hecho lo que te he dicho.”

Génesis 28:15

Dedicatoria

A MI DIOS,

Por haber estado conmigo desde que estaba en el vientre de mi madre, hasta el día de hoy. Te agradezco infinitamente por no dejarme ir, por atraerme con lazos de amor. Como dice Jeremías: "me sedujiste, más fuerte fuiste que yo, y me venciste".

A ti, porque proveíste todos los recursos como un día tú hablaste para poder yo prepararme académicamente. Tu palabra fue cumplida. Te estoy infinitamente agradecida. Este logro no es por mí, porque yo sola no lo habría logrado. Este logro es por ti y para ti.

Te entrego esta corona a tus pies.

A MIS PADRES,

Por su infinito amor para conmigo, por su paciencia y comprensión. Por ser un ejemplo para mi vida y para la vida de mis hermanos. Porque creyeron en mí. Por su gran esfuerzo para que no me faltara nada. Ustedes son el vehículo que Dios usa para bendecir mi vida. Los amo y admiro mucho.

A MIS HERMANOS JONATHAN Y SARA,

Por apoyarme y creer en mí. Por aguantar mi mal genio cuando las cosas no salían del todo bien. Por su paciencia. Esto es para ustedes, para que vean que las cosas si se proponen, se logran alcanzar. Espero ser un buen ejemplo para ustedes. Y que logren alcanzar cosas aún mayores de las que yo pude alcanzar. Los amo.

Agradecimientos

- A DIOS, por su amor inagotable, sobrenatural y sin condición para mi vida.
- A la Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM, por abrirme sus puertas y darme la oportunidad de pertenecer a esta máxima casa de estudios, por capacitarme dentro de sus aulas a través de sus mejores maestros.
- A la Dra. Gloria Luz Paniagua Contreras por darme la confianza y haberme abierto las puertas para estar en su equipo de trabajo. Por su dirección, crítica y motivación para poder realizar este proyecto.
- Al Dr. Eric Monroy Pérez por su tiempo invertido al enseñarme el uso de cada uno de los equipos del laboratorio y en la revisión de cada detalle de este escrito, así mismo por su crítica y consejos para realizar un buen trabajo de tesis.
- A cada uno de los asesores de revisión de este trabajo:

Dr. Sergio Vaca Pacheco.

M. C. Alina Uribe García.

Biól. Susana Esther González Almazán.

Por sus aportaciones que hicieron enriquecer este trabajo.

- A las Biólogas Susana y Patricia por ayudarme a resolver dudas sobre el uso del equipo del laboratorio.
- A la financiación de este proyecto por la UNAM-DGAPA-PAPIIT IN216517.

ÍNDICE

1. RESUMEN	7
2. INTRODUCCIÓN	8
2.1 Características de <i>Escherichia coli</i>	8
2.2 Factores de virulencia de <i>E. coli</i>	9
2.3 Patología de <i>E. coli</i>	11
2.4 Infecciones del tracto cérvico-vaginal.....	12
2.5 Mecanismos de resistencia a los antibióticos.....	13
3. ANTECEDENTES	14
4. JUSTIFICACIÓN	15
5. OBJETIVOS	15
5.1 Objetivo general.....	15
5.2 Objetivos particulares.....	15
6. MATERIALES Y MÉTODOS	16
6.1 Origen de las cepas de <i>E. coli</i>	16
6.2 Identificación de <i>E. coli</i> por pruebas bioquímicas.....	16
6.3 Extracción de DNA bacteriano.....	16
6.4 Identificación de <i>E. coli</i> por PCR convencional.....	17
6.5 Detección de los genes de resistencia a tetraciclinas, fluoroquinolonas y trimetoprim en las cepas de <i>E. coli</i> por PCR convencional.....	17
6.6 Detección del gen capsular <i>kpsMTIII</i> por PCR convencional.....	19
6.7 Análisis de los productos de PCR convencional.....	20
6.8 Infección de la Línea Celular A431 con cepas de <i>E. coli</i> patógenas cérvico-vaginales.....	20
6.9 Cosecha de <i>E. coli</i> del cultivo de la Línea Celular A431.....	21
6.10 Extracción de RNA de las cepas de <i>E. coli</i> patógenas cérvico- vaginales.....	21
6.11 Reversotranscripción.....	22
6.12 Expresión del gen capsular <i>kpsMTIII</i> por PCR en Tiempo Real....	24

7. RESULTADOS	25
7.1 Origen de las cepas de <i>E. coli</i>	25
7.2 Identificación de <i>E. coli</i> por pruebas bioquímicas.....	26
7.3 Identificación de <i>E. coli</i> por PCR convencional.....	26
7.4 Detección de los genes de resistencia a tetraciclinas, fluoroquinolonas y trimetoprim en las cepas de <i>E. coli</i> por PCR convencional.....	27
7.5 Detección y expresión del gen capsular <i>kpsMTIII</i> en las cepas vaginales de <i>E. coli</i>	30
8. DISCUSIÓN	32
8.1 Origen de las cepas de <i>E. coli</i>	32
8.2 Identificación de <i>E. coli</i> en las infecciones cérvico-vaginales de las pacientes.....	32
8.3 Detección de los genes de resistencia a tetraciclinas, fluoroquinolonas y trimetoprim en las cepas de <i>E. coli</i>	34
8.4 Detección y expresión del gen capsular <i>kpsMTIII</i> en las cepas vaginales de <i>E. coli</i>	35
9. CONCLUSIONES	36
10 LITERATURA CITADA	37

1. RESUMEN.

Las cepas de *E. coli* patógenas cérvico-vaginales (CVPEC) son la principal causa de las infecciones del tracto genitourinario. La selección de cepas de *E. coli* resistentes a los antibióticos en los últimos años ha dificultado el tratamiento médico de las infecciones vaginales. La presencia de cápsula en *E. coli* por un lado incrementa la patogenicidad mediante la evasión de la respuesta inmune del hospedero y por otro le brinda protección contra la actividad de los antimicrobianos. El objetivo de este estudio fue identificar los genes que codifican para resistencia a los antibióticos trimetoprim y tetraciclina y su asociación con el antígeno capsular *kpsMTIII* en un grupo de cepas de *E. coli* patógenas cérvico-vaginales (CVPEC).

Se analizaron 200 cepas de *Escherichia coli* aisladas de pacientes con infecciones cérvico-vaginales de la consulta externa de dos clínicas del IMSS en el Estado de México. La identificación de *Escherichia coli* se realizó mediante pruebas bioquímicas y por la amplificación del gen *16S rRNA* por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). Los genes de resistencia a antibióticos y el gen *kpsMTIII* de *E. coli* se detectaron por PCR convencional y la expresión de *kpsMTIII* después de la infección de la Línea Celular A431 con las cepas se realizó por PCR en Tiempo Real.

El 32.5% (n=65) de las cepas de *E. coli* fue portadora de las variantes de resistencia a trimetoprim: *dfrA1*, *dfrA5*, *dfrA15*, *dfrA15b*, *dfrA16*, *dfrA16b*; el 75% (n=150) de las variantes *dfrA12* y *dfrA13*; mientras que el 99% (n=198) de las cepas fue portadora del gen capsular *kpsMTIII*. Los genes de resistencia a tetraciclinas *tetD* y *tetE* no fueron identificados en ninguna de las cepas. Finalmente, la expresión del gen capsular *kpsMTIII* se detectó en un 29.5% de las cepas (n=59).

Los resultados obtenidos en este estudio evidenciaron que las cepas de *E. coli* responsables de las infecciones cérvico-vaginales presentaron distintas variantes del gen de resistencia al trimetoprim, que sumado a la presencia del gen capsular, demuestran la capacidad de las cepas para provocar infecciones crónicas o recurrentes.

2. INTRODUCCIÓN.

2.1 Características de *Escherichia coli*.

La familia *Enterobacteriaceae* tiene como hábitat natural el intestino del hombre y de varias especies de animales (Romero, 1999); incluye al género *Escherichia* que está integrado por cinco diferentes especies, como *E. coli*, *E. blattae*, *E. fergusini*, *E. hermanni* y *E. vulneris*. *E. coli* es una de las especies con más importancia clínica, porque además de formar parte de la microbiota intestinal del hombre y otros mamíferos, también se encuentra entre los principales agentes etiológicos causantes del síndrome diarreico y de otros padecimientos extraintestinales como infecciones urinarias, de heridas, pulmonares, meníngeas y septicémicas (Greenwood *et al.*, 2007; Spicer, 2009).

Escherichia coli es un bacilo Gramnegativo que mide de 2 a 3 micras, es móvil, posee fimbrias y flagelos, forma una cápsula y no producen esporas. Es anaerobio facultativo, es positivo para las pruebas bioquímicas de glucosa, lactosa e indol y negativa para las pruebas de manitol, citrato y urea.

E. coli es la bacteria más constantemente encontrada en las heces de los seres humanos y de muchas especies de animales, y por ello su presencia en el agua se considera un indicador de contaminación fecal. Muchas de estas cepas producen sustancias como las colicinas, que son útiles al hospedero ya que tienen un efecto inhibitor sobre otras bacterias que son potencialmente patógenas. *E. coli* es parte de la microbiota intestinal de los individuos sanos; sin embargo, ciertas cepas pueden causar infecciones extraintestinales e intestinales en individuos sanos e inmunocomprometidos (López, 2007). *E. coli* establece una relación simbiótica con su hospedero y tiene una función importante en la promoción de la estabilidad de la microbiota normal intestinal. Sin embargo, las infecciones causadas por *E. coli* extraintestinales son la principal causa de morbilidad, mortalidad y altos costos asociados a la salud (Miranda *et al*, 2017).

2.2 Factores de virulencia de *E. coli*.

La capacidad de *E. coli* para causar enfermedad depende de la expresión de los diferentes factores de virulencia que posee. La adherencia inicial de *E. coli* a las células epiteliales es considerado el primer paso para producir la enfermedad. Las adhesinas microbianas específicas (fimbrias o proteínas de la membrana externa) se unen selectivamente a ciertos receptores de las células epiteliales. Las toxinas son otro factor de virulencia, y son liberadas en el ambiente o dirigidas a las células del hospedero. El lipopolisacárido inicia la transcripción de una gran variedad de mediadores proinflamatorios y finalmente la presencia de una cápsula le da la capacidad de evadir la fagocitosis por las células del hospedero. (López, 2007).

Las cepas patógenas de *E. coli* economizan sus necesidades y productos metabólicos. Han creado sistemas complejos de transducción de señales para regular los genes que son importantes para la virulencia. Estos genes generalmente se encuentran en regiones llamadas Islas de Patogenicidad (PAI: pathogenicity islands) que son grandes grupos de genes relacionados con patogenicidad que se ubican en el cromosoma bacteriano. Las principales propiedades de las PAI son las siguientes: poseen uno o más genes de virulencia; aparecen en el genoma de patógenos de una especie, más no en los miembros no patógenos; son grandes y a menudo se les encuentra relacionados con elementos genéticos móviles. Con frecuencia, una serie de señales ambientales regulan la expresión de los genes de virulencia. Algunas de las señales más frecuentes son la temperatura, la disponibilidad de hierro, la osmolalidad, el pH e iones, como el calcio o nutrientes (Brooks *et al.*, 2014).

Las cepas de *E. coli* tienen que adaptarse al medio ambiente del hospedero y los factores de virulencia juegan un papel importante en las etapas iniciales de interacción con las células epiteliales. Los factores de virulencia son principalmente de 2 tipos: los expresados en la superficie celular, que desempeñan funciones de adhesión e invasión de tejidos además de formación de biopelículas e inducción de citosinas, y los producidos dentro de la célula bacteriana y que son exportados al sitio de infección (Miranda *et al.*, 2017).

La principal adhesina involucrada en la adhesión e invasión a células epiteliales es el pili tipo 1, el cual se expresa en más del 90% de las cepas de *E. coli*, incluyendo tanto cepas patógenas como comensales. El pili tipo 1 está compuesto por repeticiones de subunidades de pilina *FimA1*, la parte distal del pili está formada por 2 adaptadores (proteínas *FimF* y *FimG*) y la adhesina unida a manosa *FimH*. Esta adhesina *FimH* media la adherencia de la bacteria a una serie de glucoproteínas en el epitelio celular que conducen a la internalización de la bacteria, formando comunidades bacterianas intracelulares. Ahora bien, 3 tipos de toxinas son producidas por *E. coli*: la α -hemolisina, el factor citotóxico necrotizante tipo 1 (*CNF1*) y la toxina secretada autotransportadora Sat. La α -hemolisina (*HlyA*), también denominada toxina formadora de poros, se inserta dentro de la membrana celular del hospedador provocando lisis celular y así facilita la liberación de hierro y nutrientes que son esenciales para el crecimiento bacteriano. El *CNF1* conduce a una activación constitutiva de los miembros de la familia Rho, resultando en el rearrreglo del citoesqueleto de la célula del hospedero, provocando apoptosis de dichas células. Finalmente, la toxina Sat, es una serin-proteasa que se encuentra predominantemente en cepas de UPEC (*Escherichia coli* uropatógena) y se caracteriza por tener efectos citopáticos en riñón y vejiga; esta toxina puede inducir vacuolización dentro del citoplasma de células uroepiteliales (Miranda *et al.*, 2017).

2.3 Patología de *E. coli*.

Dentro de las cepas de *E. coli* están incluidas cepas no patógenas (bacterias comensales de la microbiota intestinal) que proporcionan sustancias nutritivas y protección contra patógenos extraños a su hospedero, y algunas de éstas cepas pueden apartarse de su estado comensal y adquirir una naturaleza patógena, fomentando la presencia de enfermedades serias tanto en el tubo digestivo, como en otras partes del cuerpo del hospedero (Yan y Polk, 2004). Esto sucede principalmente porque estas bacterias han adquirido factores de virulencia específicos que incrementan su habilidad de colonizar nuevos nichos y causar enfermedades como resultado de la adquisición de genes por transferencia horizontal, codificados en plásmidos o en ADN de bacteriófagos. Estas cepas patógenas se clasifican como *E. coli* diarreogénicas y *E. coli* extraintestinales patógenas (ExPEC) (Russo y Johnson, 2000; Murray *et al.*, 2014).

Dentro de cada uno de estos grupos se encuentran cepas conocidas como patotipos que comparten factores de virulencia y provocan patologías similares. Varios patotipos diarreogénicos de *E. coli* ocasionan gastroenteritis, pero rara vez ocasionan algún malestar o molestia fuera del tubo digestivo. Entre los patotipos de *E. coli* diarreogénicas se encuentran las enterotoxigénicas (ETEC) que ocasionan la diarrea del viajero; las enterohemorrágicas (EHEC) que provocan diarrea sanguinolenta, colitis hemorrágica y el síndrome hemolítico urémico; las enteroinvasivas (EIEC) que se manifiestan con un cuadro similar a la disentería amibiana; las enteropatógenas (EPEC) que provoca la diarrea acuosa en neonatos y las enteroagregativas (EAEC) que provocan diarrea aguda y crónica (Nataro y Kaper, 1998).

Por el contrario, las ExPEC pueden encontrarse en el intestino como microbiota natural sin causar molestias; sin embargo, tienen la capacidad de diseminarse y colonizar otros lugares del hospedero, incluyendo la sangre, el sistema nervioso central y el tracto urinario ocasionando enfermedad (Foxman *et al.*, 2002). Dentro de las ExPEC se encuentran las cepas de *E. coli* uropatógenas (UPEC) que son la causa principal de infecciones del tracto urinario (IsTU) y las cepas de *E. coli* patógenas cérvico-vaginales (CVPEC) causantes de las infecciones cérvico-vaginales (CVIs).

2.4 Infecciones del tracto cérvico-vaginal.

Las infecciones cérvico-vaginales (CVIs) son uno de los trastornos inflamatorios femeninos que provocan un gran número de visitas ginecológicas y tiene profundas implicaciones en el estado de salud y la vida social de la mujer. *Escherichia coli* patógena cérvico-vaginal (CVPEC) es la principal causa de infecciones del tracto urogenital, que afecta a más del 60% de las mujeres durante su vida (Rashki, 2014). Las consecuencias de las infecciones vaginales son variables, ocasionando desde daño psicológico en las mujeres, hasta abortos espontáneos y bajo peso al nacer de los neonatos.

Los tres tipos más importantes de infecciones vaginales son la candidiasis, tricomoniasis y la vaginosis bacteriana, constituyendo aproximadamente el 90% de las enfermedades infecciosas que afectan el tracto genital femenino. *E. coli* ha sido frecuentemente aislada desde infecciones vaginales y actualmente existe controversia respecto del rol de esta bacteria como agente causal de este tipo de patologías. Se ha evidenciado que esta bacteria ha sido aislada, a menudo, de infecciones vaginales en cultivos polimicrobianos, asociada a reconocidos agentes de infección vaginal, y también de cultivos monomicrobianos. *E. coli* es un habitante normal del tracto gastrointestinal de animales y humanos. Es capaz de colonizar al hospedero sin causar enfermedad, produciéndose así un balance con el sistema inmune. Estudios sobre la microbiota normal vaginal han determinado que *E. coli* no es un miembro de la microbiota vaginal (Lobos *et al.*, 2013). La severidad de las CVI producidas por *E. coli* aumenta por la existencia de una amplia gama de factores de virulencia que le confieren la cérvicopatogenicidad a estas cepas (Rashki, 2014).

2.5 Mecanismos de resistencia a los antibióticos.

La alta frecuencia de cepas de *E. coli* multirresistentes a varias familias de antibióticos se considera un serio problema de salud (Kazemnia *et al.*, 2014). La resistencia bacteriana a los antibióticos puede ser natural (intrínseca) o adquirida. La resistencia natural es propia de cada familia, especie o grupo bacteriano. La resistencia adquirida ocurre por la transferencia de los genes de resistencia a los antimicrobianos a través de elementos genéticos móviles como lo son plásmidos, transposones e integrones (Hall y Collis, 1998).

Peleg y Hooper en el 2010 describieron siete mecanismos de resistencia a antibióticos en las bacterias Gramnegativas: 1) Disminución de las porinas, lo que reduce el movimiento de los antibióticos a través de la membrana bacteriana; 2) producción de β -lactamasas, que hidrolizan a los antibióticos β -lactámicos como la penicilina; 3) incremento de la expresión de las bombas de eflujo transmembranales, que conduce a la expulsión del antimicrobiano antes de que produzca su efecto; 4) presencia de enzimas que modifican el antibiótico, impidiendo que el medicamento actúe en el sitio de unión (sitio blanco); 5) mutaciones o modificaciones en el ribosoma, por lo que el antibiótico no puede unirse al sitio de acción y de esta forma no puede inhibir la síntesis de proteínas; 6) mecanismo bypass metabólico, que utiliza una enzima alternativa insensible al antibiótico; y 7) mutación en el lipopolisacárido, que impide a los antibióticos de la clase de las polimixinas unirse al blanco.

3. ANTECEDENTES.

Sáenz y colaboradores en el 2004 analizaron 17 cepas de *E. coli* no patógenas multirresistentes a los antibióticos. La presencia de genes de resistencia fue analizada por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Todas las cepas fueron resistentes a la penicilina, y fueron portadoras de los genes *tetA*, *aaa(3)-IV* y *dfrA1* que codifican para resistencia a la tetraciclina, gentamicina y trimetoprim, respectivamente.

En el 2009, Barreto y colaboradores analizaron la resistencia a antibióticos en cepas de *Escherichia coli* y *Enterococcus* spp. aisladas de heces de niños sanos. El 50% de las cepas de *E. coli* fue resistente a la ampicilina, el 20% a la tetraciclina y el 26% a la estreptomicina. Los genes de resistencia detectados por PCR fueron *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, *bla_{CTX-M}*, *tetA*, *tetB*, *aadA*, *cmiA*, *aac(3)II*, *aac(3)IV* y *sul1*, *sul2* o *sul3*.

Rashki en el 2014 determinó la prevalencia de distintos factores de virulencia y su asociación con serotipos, filogrupos y patrones de susceptibilidad a los antimicrobianos. Las cepas de *E. coli* analizadas (n=132) fueron resistentes a la ampicilina (94.7%), gentamicina (77.2%), tetraciclina (92.4%) y trimetoprim (67.4%). Los genes de virulencia detectados con más frecuencia fueron: *fimH*, *irp2*, *ompT*, *iucD* e *iroN*. Los serotipos más frecuentes fueron O25, O15 y O6. La mayoría de las cepas perteneció al grupo filogenético B12, el cual alberga todos los genes de virulencia encontrados.

4. JUSTIFICACIÓN.

Debido al incremento de la cronicidad de las infecciones cérvico-vaginales por *E. coli*, aunado a la elevada multirresistencia a los antibióticos por estas bacterias, este trabajo contribuirá a identificar los genes que codifican resistencia a tetraciclinas y trimetoprim y su asociación con el antígeno capsular *kpsMTIII* en un grupo de cepas patógenas cérvico-vaginales de *E. coli*.

5. OBJETIVOS.

5.1 Objetivo general.

Identificar los genes que codifican para resistencia a los antibióticos trimetoprim y tetraciclina y su asociación con el antígeno capsular *kpsMTIII* en un grupo de cepas de *E. coli* patógenas cérvico-vaginales.

5.2 Objetivos particulares.

- Caracterizar los genes *tetD* y *tetE* (tetraciclinas), *floR* (fluoroquinolonas) y *drfA1*, *dfrA5*, *dfrA6*, *dfrA7*, *dfrA12*, *dfrA13*, *dfrA14*, *dfrA15*, *dfrA15b*, *dfrA16*, *dfrA16b*, *dfrA17*, *dfrB1*, *dfrB2* y *dfrB3* (trimetoprim) en las cepas de *E. coli* patógenas cérvico-vaginales.
- Identificar y establecer la expresión del genotipo *kpsMTIII* de las cepas de *E. coli* patógenas cérvico-vaginales utilizando un modelo *in vitro* de infección en la línea celular vaginal A431.

6. MATERIAL Y MÉTODOS.

6.1 Origen de las cepas de *E. coli*.

Para la realización de este trabajo se analizaron 210 cepas de *E. coli* previamente aisladas de pacientes que presentaron signos y síntomas de IsCV como ardor, comezón, mal olor y flujo anormal que acudieron a la Unidad de Medicina Familiar (UMF) N°62 del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) ubicada en Cuautitlán Izcalli y a la UMF N° 64 del IMSS ubicada en Tlalnepantla de Baz, ambas del Estado de México. Después de obtener el consentimiento informado se tomaron las muestras del canal vaginal mediante hisopos estériles con ayuda de un espejo vaginal. Las muestras se sembraron en medio líquido de BHI (Infusión Cerebro-Corazón, Bioxon) y se incubaron a 37°C por 24 horas. Posteriormente se resembraron en agar EMB (Azul Eosina de Metileno) y se incubaron a 37°C por 24 horas.

6.2 Identificación de *E. coli* por pruebas bioquímicas.

A partir del crecimiento en EMB las cepas de *E. coli* fueron identificadas por medio de las pruebas bioquímicas Kigler, Indol, Manitol, Sacarosa, Citrato y Urea.

6.3 Extracción de DNA bacteriano.

La extracción del DNA de las cepas de *E. coli* se realizó por el método de ebullición con forme a lo descrito por Ooka *et al.*, en el 2009. De cada una de las cepas se tomó una muestra de cuatro colonias con un asa estéril y se depositaron en tubos de rosca de 16x150 mm con 2 mL de agua desionizada estéril. Las muestras se agitaron en un vortex durante 20 segundos para posteriormente ponerlas en ebullición a 100°C durante 20 minutos. Pasado el tiempo las muestras se colocan en hielo durante 10 minutos y se centrifugaron en tubos eppendorf de 1.5 mL a 14 000 rpm por 10 min. Finalmente se recupera el sobrenadante que contenía el DNA genómico bacteriano y se almacenó a -20°C para su posterior utilización.

6.4 Identificación de *E. coli* por PCR convencional.

Las cepas de *E. coli* fueron identificadas por PCR mediante la amplificación del gen *16S rRNA* descrito por Li *et al.*, (2010). Los oligonucleótidos utilizados fueron WI-3110 (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) y WI-3111 (CCGTCAATTCATTGAGTT). Para un volumen final por mezcla de reacción 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), 9 µL de agua desionizada estéril libre de nucleasas y 2 µL de ADN molde. La amplificación del ADN se realizó en un termociclador marca BIO-RAD T100® modelo CGI-96. La cepa de *E. coli* ATCC 11775 fue utilizada como control positivo. La amplificación se realizó bajo las siguientes condiciones: una desnaturalización inicial a 95° durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos de amplificación que constan de una desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, una alineación a 55°C durante 1 minuto y una extensión a 72°C por 1 minuto. Por último se realizó una extensión final a 72°C durante 5 minutos.

6.5 Detección de los genes de resistencia a tetraciclinas, fluoroquinolonas y trimetoprim en las cepas de *E. coli* por PCR convencional.

La identificación de los genes que codifican resistencia a tetraciclina (*tet*), fluoroquinolonas (*floR*), y trimetoprim (*dfrA* y *dfrB*) se realizó por PCR convencional. Para un volumen final por mezcla de reacción 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 1), 9 µL de agua desionizada estéril libre de nucleasas y 2 µL de ADN molde. La amplificación del DNA se realizó en un termociclador marca BIO-RAD T100® modelo CGI-96 bajo las siguientes condiciones:

Gen *tetD*. Una desnaturalización inicial a 95°C durante 5 minutos, seguido de 25 ciclos de amplificación que constan de una desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, una alineación a 57°C durante 30 segundos y una extensión a 72°C por 20 segundos. Por último se realizó una extensión final a 72°C durante 7 minutos (Guardabassi *et al.*, 2000).

Gen *tetE*. Una desnaturalización inicial a 95°C durante 5 minutos, seguido de 23 ciclos de amplificación que constan de una desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, una alineación a 62°C durante 30 segundos y una extensión a 72°C por 45 segundos. Por último se realizó una extensión final a 72°C durante 7 minutos (Guardabassi *et al.*, 2000).

Gen *floR*. Una desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos de amplificación que consisten en una desnaturalización a 94°C por 30 segundos, una alineación a 55°C por 30 segundos y una extensión a 72°C por 1 minuto. Por último se realizó una extensión final a 72°C durante 5 minutos (Ng *et al.*, 1999).

Genes *dfrA1*, *dfrA5*, *dfrA15*, *dfrA15b*, *dfrA16*, *dfrA16b*, *dfrA7* y *dfrA17*. Una desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de amplificación que consisten en una desnaturalización a 94°C por 1 minuto, una alineación a 55°C por 1 minuto y una extensión a 72°C por 1 minuto; con una extensión final a 72°C durante 10 minutos (Navia *et al.*, 2003).

Genes *dfrA14*, *dfrA6*, *dfrB1*, *dfrB2*, *dfrB3*, *dfrA12* y *dfrA13*. Una desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de amplificación que constan de una desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, una alineación a 60°C durante 1 minuto y una extensión a 72°C por 1 minuto; con una extensión final a 72°C durante 10 minutos (Navia *et al.*, 2003).

Tabla 1. Secuencia de oligonucleótidos utilizados en la detección de los genes de resistencia a antibióticos.

	Gen	Nombre	Secuencia (5'-3')	Tamaño del producto (pb)	Referencia
Tetraciclinas	<i>tetD</i>	TetD-F	ATTACACTGCTGGACGCGAT	1104	6
		TetD-R	CTGATCAGCAGACAGATTGC		
	<i>tetE</i>	TetE-F	GTGATGATGGCACTGGTCAT	1179	6
		TetE-R	CTCTGCTGTACATCGCTCTT		
Quinolona	<i>floR</i>	FloR1	CACGTTGAGCCTCTATAT	868	21
		FloR2	ATGCAGAAGTAGAACGCG		
Trimetoprim	<i>dfrA1</i>	DfrIa-F	GTGAAACTATCACTAATGG	474	20
	<i>dfrA5</i>	DfrIa-R	TTAACCCCTTTTGCCAGATTT		
	<i>dfrA15</i>				
	<i>dfrA15b</i>				
	<i>dfrA16</i>				
	<i>dfrA16b</i>				
	<i>dfrA14</i>	DfrIb-F	GAGCAGCTICTITTIAAAGC	393	20
	<i>dfrA6</i>	DfrIb-R	TTAGCCCTTTIICCAATTTT		
	<i>dfrA7</i>	DfrVII-F	TTGAAAATTTTCATTGATT	474	20
	<i>dfrA17</i>	DfrVII-R	TTAGCCTTTTTTCCAAATCT		
	<i>dfrB1</i>	DfrII-F	GATCACGTGCGCAAGAAATC	141	
	<i>dfrB2</i>	DfrII-R	AAGCGCAGCCACAGGATAAAT		20
<i>dfrB3</i>					
<i>dfrA12</i>	DfrXII-F	GGTGGCAGAAGATTTTTTCGC	319	20	
<i>dfrA13</i>	DfrXII-R	TGGGAAGAAGGCGTCACCCTC			

6.6 Detección del gen capsular *kpsMTIII* por PCR convencional.

La identificación del gen capsular *kpsMTIII* se realizó por PCR convencional utilizando un par de oligonucleótidos como lo describió Johnson y Stell (2000). El volumen final para cada muestra de reacción fue de 25 μ L, para lo cual se tomó 1 μ L de cada uno de los oligonucleótidos (10 pmol, tabla 2), 12 μ L de Taq DNA polymerase 2X Master Mix RED, 9 μ L de agua desionizada estéril libre de nucleasas y 2 μ L de DNA molde.

La amplificación del DNA se realizó en un termociclador marca BIO-RAD T100® modelo CGI-96 bajo las siguientes condiciones: una desnaturalización inicial a 95° durante 12 minutos, seguido de 25 ciclos de amplificación que constan de una desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, una alineación a 63°C durante 30 segundos y una extensión a 68°C por 3 minutos. Por último se realizó una extensión final a 72°C durante 10 minutos.

Tabla 2. Secuencias de oligonucleótidos empleados para amplificar el gen *kpsMTIII*.

Gen	Nombre	Secuencia (5'-3')	Tamaño del producto (pb)	Referencia
<i>kpsMTIII</i>	KpsIII-F	TCCTCTTGCTACTATTCCCCCT	392	10
	KpsIII-R	AGGCGTATCCATCCCTCCTAAC		

6.7 Análisis de los productos de PCR convencional.

Después de la amplificación del DNA, 10 µL de los amplicones fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 2%, teñidos con el colorante Midori Green. El buffer Tris-Borato 1X (TBE) se utilizó para conducir la corriente eléctrica bajo las siguientes condiciones: 120 volts y 94 miliamperes por 120 minutos. Los geles fueron fotografiados bajo luz ultravioleta (UV) utilizando el sistema de fotodocumentación modelo GEL LOGIC 100™ KODAK®.

6.8 Infección de la Línea Celular A431 con cepas de *E. coli* patógenas cérvico-vaginales.

Una colonia de cada cepa bacteriana crecida en agar EMB fue sembrada en medio líquido BHI (Infusión-Cerebro-Corazón, Bioxon) a 37°C durante 24 horas en agitación constante. Posteriormente se realizaron diluciones 1:10 a cada una de las cepas para poder obtener una absorbancia de 0.4 a 600 nm, que correspondió a una concentración de 1×10^9 células.

A partir de esta dilución se depositaron 50 μ L del cultivo bacteriano y se depositaron sobre la superficie del cultivo celular (Línea A431). Las placas con la línea celular infectada fueron incubadas a 37°C durante 48 horas con 5% de CO₂ y humedad saturada.

6.9 Cosecha de *E. coli* del cultivo de la Línea Celular A431.

Las bacterias fueron colectadas del cultivo de la línea celular tomando 300 μ L de cada uno de los pozos de la placa y se depositaron en tubos eppendorf de 1.5 mL con 500 μ L de buffer PBS para lavar las células bacterianas. Los tubos se centrifugaron a 12 000 rpm durante 5 minutos, se decantó el sobrenadante y se conservó la pastilla para usarla posteriormente en la extracción de RNA.

6.10 Extracción de RNA de las cepas de *E. coli* patógenas cérvico-vaginales.

La extracción total de RNA de las cepas de *E. coli* se realizó utilizando el equipo robotizado QIAcube y el MiniKit RNeasy (QIAGEN, Hilden, Germany). El equipo robotizado fue alimentado con 25 mL de cada uno de los reactivos del kit RNeasy: amortiguador de pH de lisis que contiene tiocianato de guanidina (RLT), amortiguadores de pH de lavado (RW1 y RPE), agua libre de RNasas y etanol al 100% (ETOH). Es importante mencionar que el amortiguador de pH RLT utilizado en esta etapa contiene 10 μ L de β -mercaptoethanol (β -ME) por cada mL, de manera que para el volumen final de 25 mL de amortiguador RLT se adicionaron 250 μ L de β -ME.

Para el amortiguador de pH de lisis celular (TE) se preparó una solución con 10 mM Tris-HCl y 1 mM de EDTA, el pH se ajustó a 8 y finalmente se le adicionó 1 mg/mL de lisozima (Sigma Catálogo L7651).

El equipo robotizado adicionó 100 μ L 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 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 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, el equipo centrifugó a 10 000 rpm durante 15 segundos para lavar la membrana y 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®) esperando obtener una concentración igual o mayor a 30 ng/ μL . Debido a la inestabilidad del RNA, se procedió inmediatamente a realizar la reversotranscripción a DNA complementario (cDNA).

6.11 Reversotranscripción.

Para llevar a cabo el procedimiento de reversotranscripción de RNA a cDNA se utilizó el kit comercial Quantitec Reverse Transcription de Qiagen.

Para asegurar que el RNA extraído se encontrara libre de DNA se realizó la eliminación de DNA genómico. Para ello se depositó en un tubo eppendorf de 0.2 mL los componentes de la tabla x, para un volumen de reacción final de 19 μ L.

Tabla 3. Componentes de reacción para la eliminación del DNA genómico.

Componente	Volumen
gDNA Wipeout buffer 7X	2 μ L
RNA templado	10 μ L
Agua libre de RNasas	7 μ L
Volumen total	19 μL

Cada reacción se incubó a 42°C durante 2 minutos e inmediatamente se colocó en hielo.

Para el proceso de la reversotranscripción de RNA a cDNA se preparó la mezcla de reacción para cada muestra en tubos eppendorf de 0.2 mL con un volumen final de 20 μ L que contiene todos los componentes (tabla 4) necesarios para la síntesis de la primera cadena de cDNA.

Tabla 4. Componentes de reacción para la reversotranscripción.

Componente	Volumen
Quantiscript Reverse Transcriptasa (contiene inhibidor de RNasas)	1 μ L
Quantiscript RT buffer 5X (incluye Mg ²⁺ y dNTPs)	4 μ L
RT Primer Mix	1 μ L
RNA templado (obtenido de la reacción anterior)	14 μ L
Volumen total	20 μL

Cada uno de los tubos se mantuvo en hielo, se agitaron suavemente y se incubaron a 42°C durante 15 minutos. Finalmente, para inactivar la transcriptasa reversa se incubaron los tubos a 95°C durante 3 minutos. La concentración final de cDNA se midió en un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific®) y se almacenó a -20°C hasta su utilización para PCR en Tiempo Real.

6.12 Expresión del gen capsular *kpsMTIII* por PCR en Tiempo Real.

Para determinar la expresión del gen capsular se utilizó el aparato de PCR en Tiempo Real Corbette de Rotor Gene. El volumen final por mezcla de reacción fue de 25 µL, que contiene 12.5 µL del Master Mix SYBR Green, 1 µL de cada uno de los oligonucleótidos del gen capsular (tabla x), 8.5 µL de agua estéril libre de nucleasas y 2 µL de cDNA. La amplificación se realizó bajo las siguientes condiciones: una desnaturalización inicial a 95° durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos de amplificación (una desnaturalización a 95°C durante 20 segundos, una alineación a 60°C durante 30 segundos y una extensión a 72°C por 20 segundos). El control interno para cada ensayo fue el gen *16S rRNA*. La melting point se realizó en cada corrida de PCR en Tiempo Real.

7. RESULTADOS

7.1 Origen de las cepas de *E. coli*.

En este estudio se analizaron las cepas de CVPEC (n=210) previamente aisladas de pacientes que acudieron a la UMF N° 62 y N° 64 del IMSS, ambas ubicadas en el Estado de México por presentar signos y síntomas de infección cérvico-vaginal.

La distribución de las pacientes según el rango de edad se observa en la figura 1. El 39% (n=82) de los pacientes correspondió al rango de edad de 36 a 53 años; el 28.6% (n=60) de 18 a 35 años de edad; el 25.7% (n=54) de 54 a 71 años y el 2.9% (n=6) corresponde al rango de edad de 72 a 89 años. El 3.8% (n=8) de las pacientes no dieron un reporte de su edad.

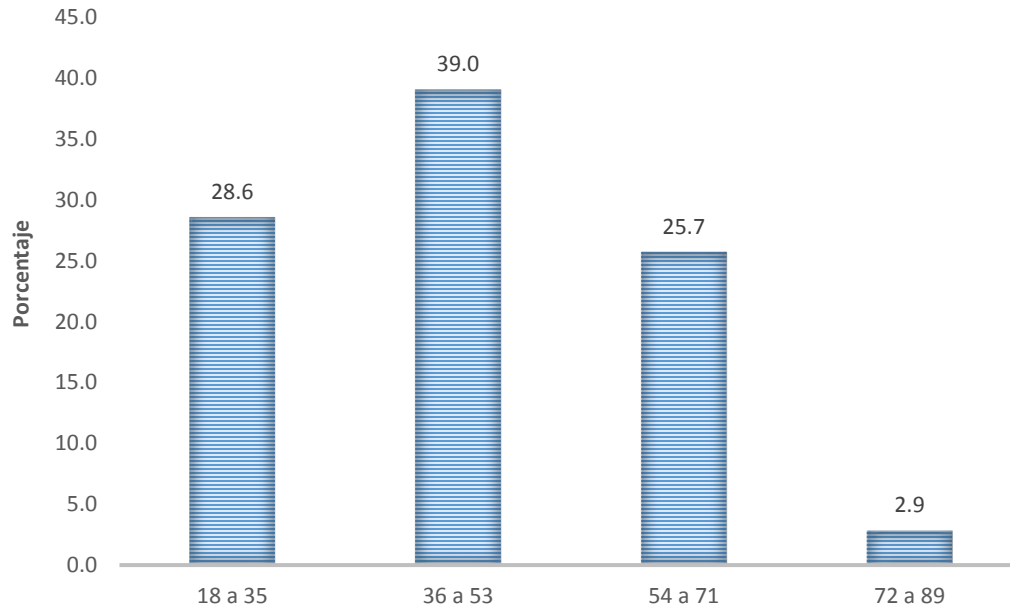


Figura 1. Rango de edad de las pacientes con infecciones cérvico-vaginales.

7.2 Identificación de *E. coli* por pruebas bioquímicas.

A partir de las 210 cepas analizadas mediante pruebas bioquímicas, el 95% (n=200) de las cepas presentó características bioquímicas para *E. coli* (tabla 5).

Tabla 5. Resultados de las pruebas bioquímicas de *E. coli*.

Prueba	<i>Escherichia coli</i>
Indol	Positivo (+)
Kligler	Positivo (+)
Manitol	Negativo (-)
Citrato	Negativo (-)
Urea	Negativo (-)

7.3 Identificación de *E. coli* por PCR convencional.

Las 200 cepas de *E. coli* se identificaron molecularmente por la presencia del gen 16S *rRNA* (figura 2).

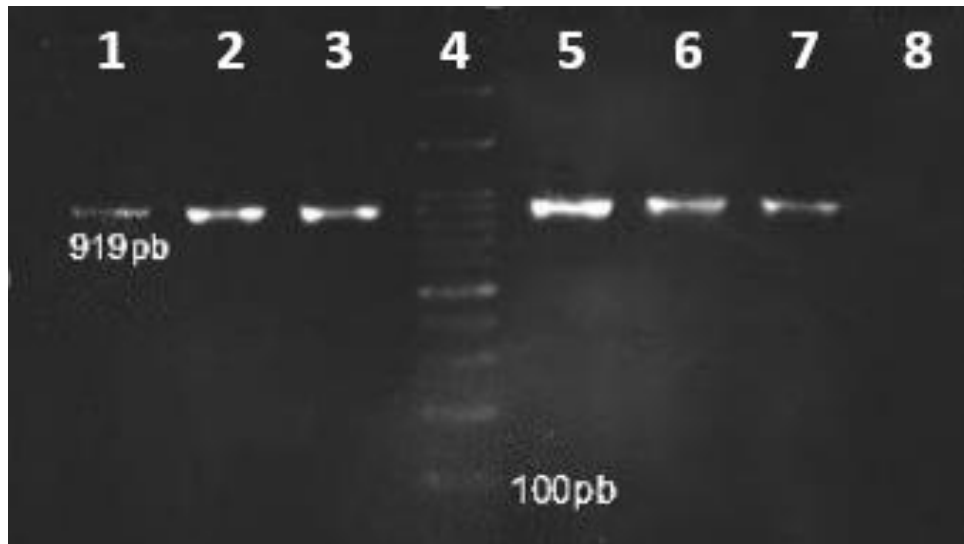


Figura 2. Detección del gen *16S rRNA* por PCR convencional. Carriles 1-3 y 5-6: amplicones del gen *16S rRNA* (919 pb) en cepas de *E. coli*; carril 4: Marcador de Peso Molecular (MWM) (100pb); carril 7: control positivo (*E. coli* ATCC 11775); carril 8: control negativo (sin DNA molde).

7.4 Detección de los genes de resistencia a tetraciclinas, fluoroquinolonas y trimetoprim en las cepas de *E. coli* por PCR convencional.

En las cepas de *E. coli* (n=200) se analizó la presencia de dos genes de resistencia a tetraciclina, uno de quinolonas y quince para el trimetoprim (tabla 1; n=200). Los genes identificados con mayor frecuencia fueron *dfrA12* y *dfrA13* (trimetoprim) con el 75.5% (n=151), mientras que los genes con menor prevalencia fueron *floR* (quinolonas) con el 37.5% (n=75) y *dfrA1*, *dfrA5*, *dfrA15*, *dfrA15b*, *dfrA16* y *dfrA16b* (trimetoprim) con el 32.5% (n=65). Los genes de resistencia a tetraciclinas (*tetD* y *tetE*) y a trimetoprim (*dfrA14*, *dfrA6*, *dfrA7*, *dfrA17*, *dfrB1*, *dfrB2* y *dfrB3*) no fueron detectados en ninguna de las cepas de *E. coli*.

Tabla 6. Detección de genes que confieren resistencia a antibióticos (tetraciclinas, fluoroquinolonas y trimetoprim) en 200 cepas de *E. coli*.

	Gen	Número de cepas (n=200)	Porcentaje
Tetraciclinas	<i>tetD</i>	-	-
	<i>tetE</i>	-	-
Quinolonas	<i>floR</i>	75	37.5
Trimetoprim	<i>dfrA1</i>	65	32.5
	<i>dfrA5</i>	65	32.5
	<i>dfrA15</i>	65	32.5
	<i>dfrA15b</i>	65	32.5
	<i>dfrA16</i>	65	32.5
	<i>dfrA16b</i>	65	32.5
	<i>dfrA14</i>	-	-
	<i>dfrA6</i>	-	-
	<i>dfrA7</i>	-	-
	<i>dfrA17</i>	-	-
	<i>dfrB1</i>	-	-
	<i>dfrB2</i>	-	-
	<i>dfrB3</i>	-	-
	<i>dfrA12</i>	151	75.5
	<i>dfrA13</i>	151	75.5

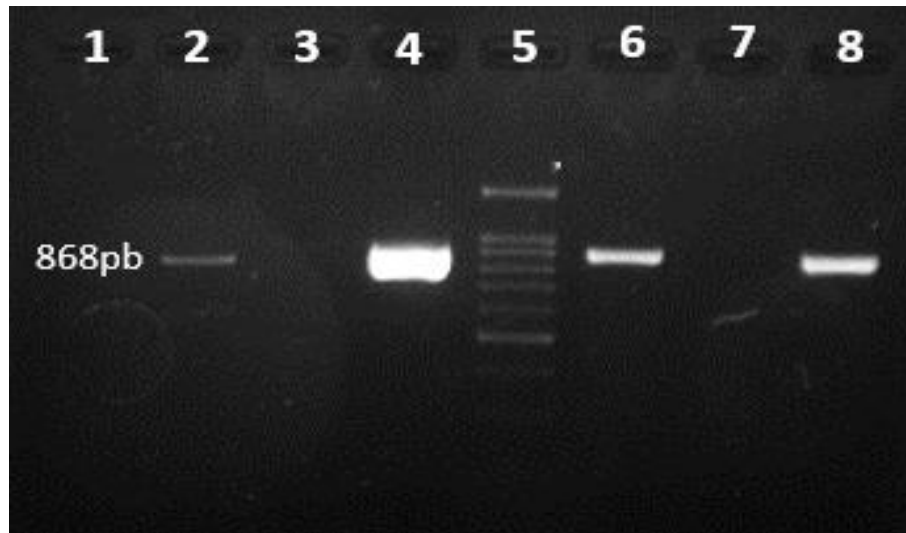


Figura 3. Detección del gen *floR* por PCR convencional. Carriles 2, 4 y 6: amplicones del gen *floR* (868pb) en cepas vaginales de *E. coli*; carril 5: Marcador de Peso Molecular (MWM) (100pb); carril 7: control negativo (sin DNA molde); carril 8: control positivo (*E. coli* del cepario del Laboratorio Clínico, CUSI).

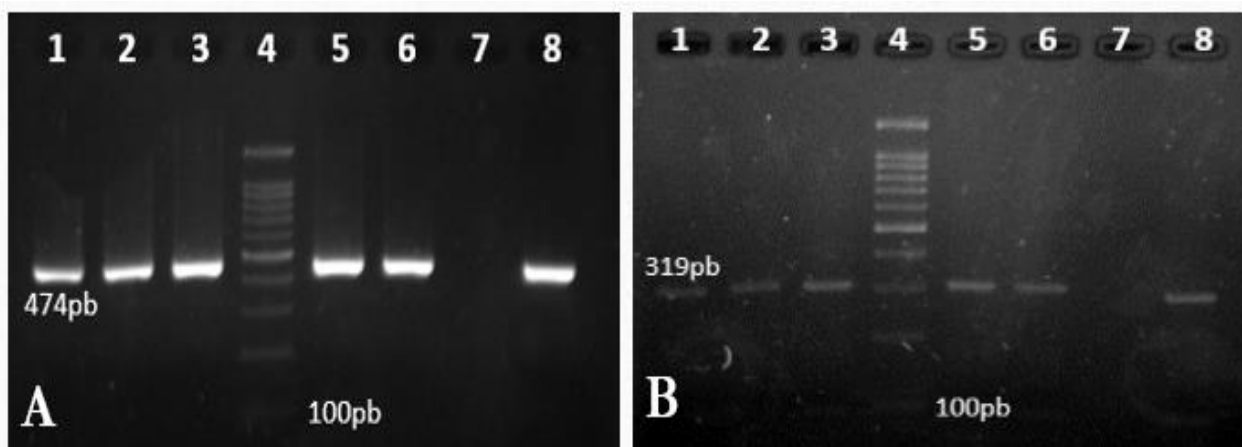


Figura 4. (A) Detección de la región de los genes *dfrA1*, *dfrA5*, *dfrA15*, *dfrA15b*, *dfrA16*, *dfrA16b* por PCR convencional en cepas de *E. coli* vaginales. Carriles 1-3, 5-6: amplicones de cepas de *E. coli* positivas (474 pb); carril 4: Marcador de Peso Molecular (MWM) (100 pb); carril 7: control negativo (sin DNA molde); carril 8: control positivo (*E. coli* del cepario del Laboratorio Clínico, CUSI). (B) Detección de la región de los genes *dfrA12* y *dfrA13*. Carriles 1- 3 y 5-6: amplicones de cepas de *E. coli* positivas (319 pb); carril 4: Marcador de Peso Molecular (MWM) (100 pb); carril 7: control negativo (sin DNA molde); carril 8: control positivo (*E. coli* del cepario del Laboratorio Clínico, CUSI).

7.5 Detección y expresión del gen capsular *kpsMTIII* en las cepas vaginales de *E. coli*.

El gen capsular *kpsMTIII* se detectó por PCR convencional en el 99% (n=198) de las cepas de *E. coli* (tabla 7 y figura 5). Después de la infección de la Línea Celular vaginal A431 con las cepas de *E. coli*, el marcador *kpsMTIII* se expresó en el 29.7% (n=59) de las cepas (tabla 7 y figura 6).

Tabla 7. Detección y expresión de *kpsMTIII* en cepas de *E. coli*.

Gen	Frecuencia de detección		Frecuencia de expresión	
	Número	Porcentaje	Número	Porcentaje
<i>kpsMTIII</i>	198	99	59	29.7

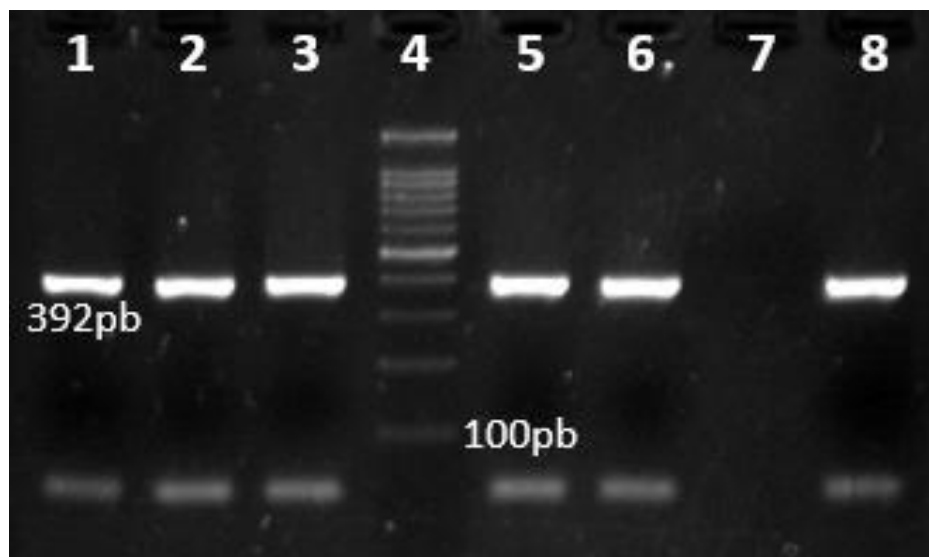


Figura 5. Detección del gen *kpsMTIII* por PCR convencional. Carriles 1-3, 5 y 6: amplicones del gen *kpsMTIII* (392 pb) en cepas vaginales de *E. coli*; carril 4: Marcador de Peso Molecular (MWM) (100pb); carril 7: control negativo (sin DNA molde); carril 8: control positivo (*E. coli* del cepario del Laboratorio Clínico, CUSI).

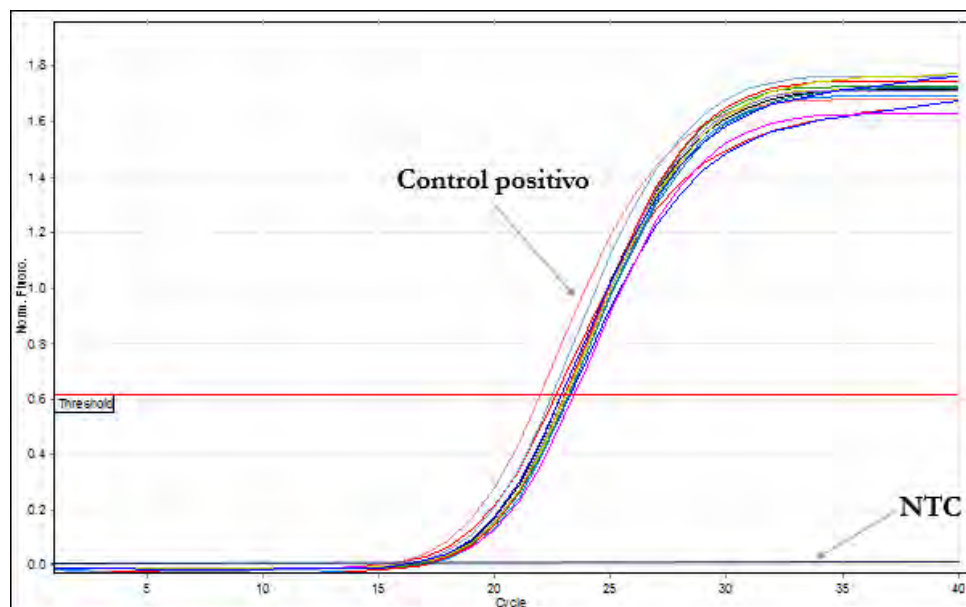


Figura 6. Detección de la expresión del gen capsular *kpsMTIII* en cepas de *E. coli* de origen vaginal. La fluorescencia se leyó a 60°C en el canal verde. Control positivo: cepa de *E. coli* ATCC 11775; No Control Template (NTC): sin DNA complementario.

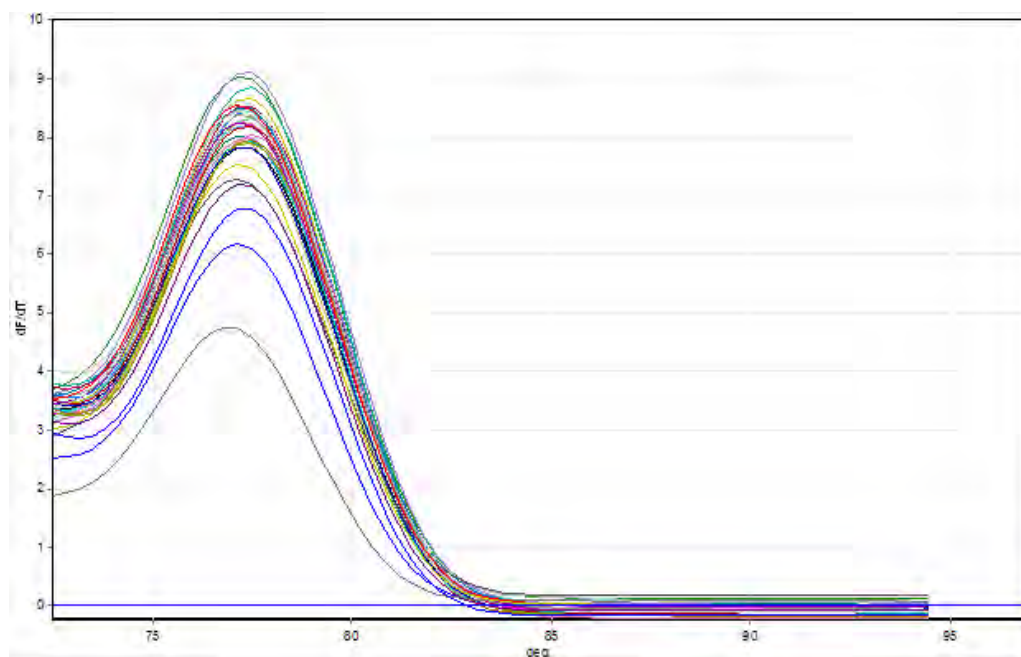


Figura 7. Curva de fusión (Melting point) de la expresión de *kpsMTIII* en cepas de *E. coli* de origen vaginal. Los productos específicos muestran una temperatura de disociación más alta que los productos inespecíficos.

8. DISCUSIÓN

8.1 Origen de las cepas de *E. coli*

Para el desarrollo de este estudio se analizaron molecularmente 210 cepas de *E. coli* previamente aisladas de pacientes que acudieron a la UMF N° 62 y N° 64 del IMSS, por presentar signos y síntomas de infecciones cérvico-vaginales (CVIs). Las CVIs son uno de los trastornos inflamatorios más frecuentes que genera índices elevados de visitas al ginecólogo (Hilbert *et al.*, 2008; Salas *et al.*, 2009). *E. coli* es la principal causa de las infecciones del tracto genitourinario, afectando al 60% de las mujeres durante su vida (Rashki, 2014), debido a la proximidad del espacio vaginal al ano, facilitando el acceso de las bacterias al canal vaginal.

En estudios realizados a nivel mundial se ha encontrado que el 90% de las infecciones son causadas por bacterias anaerobias que producen vaginosis bacteriana, entre las cuales se puede encontrar *E. coli*, levaduras del género *Candida* spp. y *Trichomonas vaginalis* (Salas *et al.*, 2009).

En este estudio el rango de edad más abundante de las pacientes con infecciones cérvico-vaginales osciló entre los 36 a 53 años (figura 1). Esto puede deberse a los inicios de la etapa de la menopausia, lo que provoca cambios hormonales que pueden favorecer al desarrollo de infecciones cérvico-vaginales y el aumento excesivo de la presencia de *E. coli* asociada a estas infecciones (Padilla *et al.*, 2007).

Las infecciones cérvico-vaginales por cepas de *E. coli* frecuentemente acarrearán un gran número de factores de virulencia que incrementan la patogenicidad (Hilbert *et al.*, 2008).

8.2 Identificación de *E. coli* en las infecciones cérvico-vaginales de las pacientes.

En este trabajo se identificaron 200 cepas de *E. coli* mediante la amplificación del gen 16S *rRNA* por PCR convencional (figura 2). La amplificación del gen 16S *rRNA* es un método de biología molecular preciso para la identificación de microorganismos (Janda y Abbott, 2007).

Se ha descrito que *Escherichia coli* patógena cérvico-vaginal (CVPEC) es la principal causa de infecciones del tracto urogenital y la severidad de dichas infecciones se debe al amplio rango de factores de virulencia que poseen. Estudios recientes confirman que las cepas de CVPEC poseen varios factores de virulencia que no se localizan en las cepas de *E. coli* comensales, entre los que aparecen, genes que codifican para adhesinas, toxinas, sistemas de captación de hierro y protectinas. Entre los factores de virulencia más importantes se encuentran las adhesinas que permiten la adhesión al urogenitoeptelio para dar inicio a la patogénesis. Por ello se sugiere que la transferencia horizontal de las Islas de patogenicidad (PAIs) entre cepas de *E. coli* es un factor importante para la adquisición de genes de virulencia y para la agudeza de las infecciones vaginales (Rashki, 2014).

Estudios previos han mostrado que la colonización vaginal por *E. coli* es un primer paso en la patología de otras infecciones urinarias, como la cistitis aguda y la persistente colonización vaginal con *E. coli* ha sido asociada con el desarrollo de infecciones urinarias recurrentes en las mujeres. Se ha descrito que las cepas de *E. coli* patógenas extraintestinales (ExPEC), dentro de las cuales se encuentran UPEC y CVPEC, generalmente pertenecen al grupo filogenético B2 y en menor medida al grupo D, mientras que las cepas comensales se derivan de grupos A y B1 (Rashki, 2014; Moreno *et al.*, 2006). Rashki (2014) reportó que de las 132 cepas de *E. coli* aisladas de infecciones cérvico-vaginales, 82 pertenecieron al grupo B2, indicando que la mayor parte de estas infecciones eran provocadas por cepas ExPEC.

Lobos y colaboradores (2013) analizaron la presencia de diferentes genes de virulencia en 146 cepas de *E. coli* de origen vaginal. Las cepas estudiadas por estos autores mostraron una elevada frecuencia de los factores de virulencia, principalmente de *fimH*, demostrando que las cepas CVPEC poseen características patogénicas similares a las de cepas UPEC, en las cuales las fimbrias tipo 1 permanecen activas durante las etapas iniciales de la infección, facilitando la colonización genito-urinaria.

8.3 Detección de los genes de resistencia a tetraciclinas, fluoroquinolonas y trimetoprim en las cepas de *E. coli*.

Las 200 cepas de *E. coli* analizadas en este trabajo presentaron genes de resistencia para quinolonas (*floR*) y trimetoprim (*dfrA*; tabla 6). Las variantes del gen de resistencia a trimetoprim *dfrA1*, *dfrA5*, *dfrA15*, *dfrA15b*, *dfrA16* y *dfrA16* fueron encontradas en el 32.5% (n=65) de las cepas, mientras que las variantes *dfrA12* y *dfrA13* fueron identificadas en el 75% (n=150) de las cepas. El gen *floR* tuvo una frecuencia del 37.5% (n=75) y los genes de resistencia a tetraciclinas (*tetD* y *tetE*) no fueron identificados en ninguna cepa. La elevada frecuencia de las variantes de los genes de resistencia al trimetoprim en las cepas de *E. coli* vaginales puede deberse al hecho de que en el Sector Salud de México, se prescribe frecuentemente el trimetoprim para combatir las infecciones, tanto para bacterias Grampositivas, como Gramnegativas, seleccionando con el tiempo bacterias resistentes a este antimicrobiano, en cuyo caso, la diseminación de estas variantes puede transferirse horizontalmente de una bacteria a otra mediante la conjugación. Recientemente la resistencia al trimetoprim fue descrita por Rashki (2014) en cepas CVPEC (n=132), en donde encontró que el 64.7% (n=89) de las cepas fue resistente al trimetoprim y el 92.4% (n=122) a tetraciclina.

La presencia de los genes de resistencia al trimetoprim también ha sido detectada en cepas de materia fecal, como lo demuestra el estudio realizado por Sáenz *et al.*, (2004) en cepas de *E. coli* no patógenas obtenidas de muestras fecales de humanos y animales, así como de alimentos. Estos autores identificaron los genes *dfrA1* y *dfrA12* en el 58.8% (n=10) de las cepas, mientras que el 100% de las cepas fue portadora de los genes *tetA* y *tetB* que codifican para resistencia a la tetraciclina, en donde los genes *tetC*, *tetD* y *tetE*, así como el gen *floR*, que codifica resistencia a quinolonas, no fueron identificados. Los resultados de estos autores coinciden para los genes de resistencia a trimetoprim identificados en las cepas vaginales de *E. coli* estudiadas.

El hecho de que los genes *tetD* y *tetE* que no fueron detectados en las cepas vaginales de *E. coli* estudiadas puede deberse a que es más frecuente que estén presentes los genes *tetA* y *tetB*, como lo describe Barreto *et al.*, (2009), quienes analizaron 92 cepas

de *E. coli* comensales e identificaron los genes *tetA* y *tetB* con una frecuencia del 69.5% (n=16). Las tetraciclinas son una familia de antibióticos cuyo mecanismo de acción es inhibir la síntesis de proteínas tras unirse a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano. El mecanismo de resistencia más común hacia este antibiótico es mediante el sistema de eflujo, que en los Gramnegativos es codificado por los genes *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD*, *tetE*, *tetI* y *tetY*. Estudios realizados en cepas de *E. coli* comensales aisladas de infantes muestran que *tetA* y *tetB* fueron los genes de resistencia a tetraciclinas más prevalentes, 49% y 51%, respectivamente (Mosquito *et al.*, 2011).

8.4 Detección y expresión del gen capsular *kpsMTIII* en las cepas vaginales de *E. coli*

El gen capsular *kpsMTIII* fue identificado en el 99% (n=198) de las cepas, coincidiendo con las frecuencias descritas para cepas CVPEC (Hilbert 2008) y para cepas UPEC (Yun *et al.*, 2014). Después de la infección de la línea celular vaginal A431 con las cepas de *E. coli* se encontró que *kpsMTIII* se expresó en el 29.7% (n=59) de las cepas (Tabla 7, figura 6). La expresión del antígeno capsular de *E. coli* encontrado en este estudio pone de manifiesto que el gen *kpsMTIII* puede ser un importante marcador de virulencia para la cronicidad o recurrencia de las infecciones vaginales, debido a que se ha demostrado que el antígeno capsular K promueve la resistencia a la fagocitosis y evade la muerte bacteriana mediada por el complemento (Buckles *et al.*, 2009), además protege a las bacterias contra la acción de los antimicrobianos.

Los resultados obtenidos en este estudio evidencian la necesidad de establecer por un lado programas de vigilancia y monitoreo que ayuden a disminuir los riesgos de infección y por otros programas que ayuden a mejorar las alternativas de tratamiento médico para erradicar las infecciones y evitar la propagación de cepas multirresistentes.

9. CONCLUSIONES

- En este estudio *Escherichia coli* fue la principal bacteria responsable de las infecciones cérvico-vaginales.
- Los genes que codifican para resistencia a trimetoprim identificados con mayor frecuencia fueron *dfrA12* y *dfrA13* mientras que los menos frecuentes fueron *dfrA1*, *dfrA5*, *dfrA15*, *dfrA15b*, *dfrA16* y *dfrA16*.
- El mecanismo de resistencia al antibiótico tetraciclina mediado por los genes *tetD* y *tetE* no se identificó en ninguna de las cepas vaginales de *E. coli*.
- En este estudio se demostró que el gen *kpsMTIII* fue capaz de expresarse en la tercera parte de las cepas de *E. coli* después de la infección de la línea celular A431.
- La presencia de los genes de resistencia al trimetoprim, aunado a las presencia del gen *kpsMTIII* en las cepas de *E. coli* estudiadas, refleja la capacidad de las cepas para provocar infecciones crónicas o recurrentes, por lo que es necesario que se establezcan programas que ayuden mejorar los tratamientos para la erradicación de las infecciones vaginales por esta bacteria.

10. LITERATURA CITADA

1. Barreto A, Guimaraes B, Radhouani H, Araujo C, Goncalves A, Gaspar E, Rodríguez J, Igrejas G, Poeta P. 2009. Detection of antibiotic resistant *E. coli* and *Enterococcus* spp. in stool of healthy growing children in Portugal. *J Basic Microbiol.* 49 (6): 503-512.
2. Brooks GJ, Karroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA. 2014. *Microbiología clínica: Jawetz, Melnick y Adelberg.* (26ª edición). México: McGraw-Hill Interamericana Editores.
3. Buckles EL, Wang X, Lane MC, Lockett CV, Johnson DE, Rasko DA. 2009. Role of the K2 capsule in *Escherichia coli* urinary tract infection and serum resistance. *J Infect Dis.* 199 (11):1689-1697.
4. Foxman B. 2002. Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity and economic cost. *Am J Med.* 113 (1): 5S-13S.
5. Greenwood D, Slack R, Peutherer J y Barer M. 2007. *Medical microbiology: a guide to microbial infections.* Ed. Elsevier: 275-283.
6. Guardabassi L, Dijkshoorn L, Collard JM, Olsen JE, Dalsgaard A. 2000. Distribution and in-vitro transfer of tetracycline resistance determinants in clinical and aquatic *Acinetobacter* strains. *J. Med. Microbiol.* 49 (10), 929-936.
7. Hall RM y Collis, CM. 1998. Antibiotic resistance in gram-negative bacteria: the role of gene cassettes and integrons. *Drug Resist Updat.* 1 (2): 109-119.
8. Hilbert DW, Paulish TE, Mordechai E, Adelson ME, Trama JP. 2008. O serogroups, phylogeny, and virulence factors of cervicovaginal and rectal *Escherichia coli* isolates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 27 (8):1265-1268.
9. Janda J, Abbott S. 2007. 16S *rRNA* gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory pluses, perils and pitfalls. *J Clin Microbiol.* 45 (9): 2761-2764.
10. Johnson JR y Stell 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.

11. Kazemnia A, Ahmadi M y Dilmaghani M. 2014. Antibiotic resistance pattern of different *Escherichia coli* phylogenetic groups isolated from human urinary tract infection and avian colibacillosis. *Iran Biomed J.* 18 (4): 219-224.
12. Li D, Liu B, Chen M, Guo D, Guo X, Liu F, Feng L y Wang L. 2010. A multiplex PCR method to detect 14 *Escherichia coli* serogroups associated with urinary tract infections. *J Microbiol Methods*, 82 (1):71-77.
13. Lobos O, Padilla A y Padilla C. 2013. Análisis genético y propiedades virulentas de cepas de *Escherichia coli* aisladas desde infección vaginal. *Rev Chilena Infectol.* 30 (4): 381-387.
14. López J. 2007. Capítulo 11: Enterobacterias y otros bacilos gramnegativos. En *Fundamentos básicos de medicina: microbiología de las infecciones humanas* (pp.130-154). Medellín, Colombia: Corporación para investigaciones biológicas.
15. Miranda-Estrada LI, Ruíz-Rosas M, Molina-López J, Parra-Rojas I, González-Villalobos E y Castro-Alarcón N. 2017. Relación entre factores de virulencia, resistencia a antibióticos y los grupos filogenéticos de *Escherichia coli* uropatógena en dos localidades de México. *Enferm Infecc y Microbiol Clin.* 35 (7): 426-433.
16. Moreno E, Prats G, Planells I, Pérez T y Andreu A. 2006. Caracterización de *Escherichia coli* de los grupos filogenéticos A y B1 causantes de infección extraintestinal. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 24 (8): 483-489.
17. Mosquito S, Ruíz J, Bauer JL y Ochoa T. 2011. Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en *Escherichia coli* asociadas a diarrea. *Rev Peru Med Exp Salud Pública.* 28 (4): 648-656.
18. Murray P, Rosenthal K y Pfaller M. 2014. *Microbiología médica*. (Séptima edición). Barcelona, España: Editorial Elsevier Saunders. 111-136; 259-264.
19. Nataro JP y Kaper JB. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.* 11 (1):142-201.
20. Navia M, Ruiz J, Sánchez-Céspedes J y Vila J. 2003. Detection of dihydrofolate reductase genes by PCR and RFLP. *Diagn. Microb. Infect. Dis.* 46 (4): 295-298.
21. Ng LK, Mulvey MR, Martín I, Peters GA y Johnson W. 1999. Genetic characterization of antimicrobial resistance in Canadian isolates of *Salmonella*

- serovar Typhimurium DT104. *Antimicrob Agents Chemother.* 43 (12): 3018-3021.
22. Ooka T, Terajima J, Kusumoto M, Iguchi A, Kurokawa K, Ogura Y, Asadulghani M, Nakayama K, Murase K, Ohnishi M, Iyoda S, Watanabe H y Hayashi T. 2009. Development of a multiplex PCR-based rapid typing method for enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains. *J Clin Microbiol.* 47 (9): 2888-2894.
23. Padilla C, Lobos GO, Padilla ER, Fuentes L y Nuñez FL. 2007. Aislamiento de cepas de *Escherichia coli* desde casos clínicos de infección vaginal: asociación con otros microorganismos y susceptibilidad antibacteriana. *Rev Chil Obstet Gineol.* 72 (4): 222-228.
24. Peleg AY y Hooper RC. 2010. Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. *N Engl J Med.* 362 (19): 1804-1813.
25. Rashki A. 2014. Cervico-vaginopathogenic *Escherichia coli* in Iran: serogroup distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties. *Microb Pathog.* 75: 29-34.
26. Romero R. 1999. *Microbiología y parasitología humana. Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas.* Segunda edición. Distrito Federal, México: Editorial Médica Panamericana. 287-293.
27. Russo TA y Johnson JR. 2000. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExpEC. *J Infect Dis.* 181 (5): 1753-1754.
28. Sáenz Y, Briñas L, Domínguez 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.
29. Salas N, Ramírez J F, Ruíz B, Torres E, Jaramillo L N, Gómez-Marín J E. 2009. Prevalencia de microorganismos asociados a infecciones vaginales en 230 mujeres gestantes y no gestantes sintomáticas del Centro de Salud La Milagrosa en el municipio de Armenia (Colombia). *Rev Colomb Obstet Ginecol.* 60 (2): 135-142.

30. Spicer WJ. 2009. *Microbiología clínica y enfermedades infecciosas: texto y atlas en color*. (2ª edición). Barcelona, España: Elsevier.
31. Yan F y Polk DB. 2004. Commensal bacteria in the gut: learning who our friends are. *Curr Opin Gastroenterol*. 20 (6): 565-571.
32. Yun KW, Kim HY, Park HK, Kim W, Lim IS. 2014. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* of urinary tract infections and asymptomatic bacteriuria in children. *J Microbiol Immunol Infect*. 47 (6):455-461.