



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA  
CARRERA DE BIOLOGÍA

**RESISTENCIA A AMINOGLUCÓSIDOS, QUINOLONAS,  
SULFAMETOXAZOL Y TRIMEOPRIM EN CEPAS DE *Escherichia  
coli* VAGINALES PORTADORAS DE PAI ICFT073, PAI IICFT073,  
PAI IJ96 Y PAI IJJ96.**

**TESIS**

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

PRESENTA

**MARTHA MELINA REYES MALDONADO**

DIRECTOR DE TESIS:

DR. ERIC MONROY PÉREZ

PROYECTO FINANCIADO POR LA DGAPA

UNAM, PAPIIT IN218614



Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, 2020



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.

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Eric Monroy Pérez por su dirección y tutoría, por los conocimientos compartidos, la paciencia y el tiempo dedicado para la realización de esta tesis. Muchas gracias.

A los miembros del comité revisor: Mtra. Alina Uribe García, Mtro. David Segura Cobos, Biól. Susana Esther González Almazán por sus acertadas e importantes observaciones y sugerencias en la elaboración de este trabajo. Muy especialmente a la Dra. Gloria Luz Paniagua Contreras por abrirme las puertas de su laboratorio y sobre todo por su invaluable apoyo y orientación.

Al Dr. Sergio Vaca Pacheco.

A la Biól. Patricia Sánchez Yáñez mi angelito del laboratorio.

## DEDICATORIAS

“A mi familia que son la fuente de inspiración y motor de mi vida”

A mis padres: Martha Maldonado y José Reyes por todo el apoyo, cariño y el esfuerzo realizado para permitirme llegar aquí. ¡Lo logramos!...

A mis hermanos:

Jesús Reyes gracias por siempre tener una palabra precisa y por tus valiosos consejos.

José Reyes mi querido hermanito tú, tú eres oro molido mi “chato”.

A mi cuñada Sandy por ser tan agradable persona y porque es un gran orgullo que formes parte de la familia.

A mis queridos sobrinos Jesús y Mariana por llenar mi vida de alegría con sus ocurrencias.

A Luis Espejel por estar conmigo a cada momento apoyándome y queriéndome. Te amo.

## ÍNDICE

1.	RESUMEN.....	1
2.	INTRODUCCIÓN .....	2
2.1.	Características de <i>Escherichia coli</i> .....	2
2.2.	Patogenicidad de <i>Escherichia coli</i> .....	3
2.3.	Infección del canal cérvico-vaginal.....	6
2.4.	Factores de virulencia.....	9
2.5.	Adhesinas .....	12
2.6.	Toxinas.....	13
2.7.	Sistemas de adquisición de hierro.....	14
2.8.	Sistemas para evadir la respuesta inmune del hospedero (Protectinas).....	16
2.9.	Islas de patogenicidad .....	17
2.10.	Características de las islas de patogenicidad.....	18
2.11.	Adquisición de las islas de patogenicidad .....	20
2.12.	El papel de las islas de patogenicidad en la evolución de <i>Escherichia coli</i> .....	22
2.13.	2.13 Islas de patogenicidad en <i>Escherichia coli</i> .....	25
2.14.	Resistencia bacteriana a los antibióticos.....	27
2.15.	Antibióticos que inhiben la síntesis de proteínas.....	30
2.16.	Antibióticos que inhiben la vía metabólica .....	31
2.17.	Antibióticos que inhiben la síntesis de ácidos nucleicos.....	32
2.18.	Antibióticos que dañan la membrana plasmática .....	33
2.19.	Antibióticos que inhiben la síntesis de la pared celular .....	33
2.20.	Resistencia a antibióticos beta-lactámicos.....	35
2.21.	Resistencia a antibióticos quinolonas .....	35
2.22.	Resistencia a trimetoprim/sulfametoxazol .....	35
2.23.	Resistencia a aminoglucósidos .....	36
3.	ANTECEDENTES .....	37
4.	OBJETIVOS .....	39
4.1.	Objetivo general .....	39

4.2.	Objetivos particulares.....	39
5.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	40
5.1.	Origen de las muestras.....	40
5.2.	Extracción del DNA.....	40
5.3.	Identificación de las cepas de <i>Escherichia coli</i> .....	40
5.4.	Identificación de Islas de Patogenicidad en las cepas de <i>Escherichia coli</i> vaginales.....	40
5.5.	Electroforesis.....	41
5.6.	Expresión de los genes de resistencia a antibióticos en cepas vaginales de <i>E. coli</i> .....	42
5.7.	Extracción de RNA de las cepas CVPEC.....	43
5.8.	Reversotranscripción.....	45
5.9.	Determinación de la expresión de los genes de resistencia a los antibióticos en las cepas de <i>E. coli</i> por PCR en tiempo real.....	46
6.	RESULTADOS.....	48
6.1.	Islas de patogenicidad.....	50
6.2.	Detección de la expresión de genes de resistencia a los antibióticos en las cepas de CVPEC.....	51
7.	DISCUSIÓN.....	55
7.1.	Infecciones cérvico-vaginales.....	55
7.2.	Islas de patogenicidad.....	55
7.3.	Detección de genes de resistencia a los antibióticos.....	56
7.4.	Genes de resistencia a aminoglucósidos.....	57
7.5.	Genes de resistencia a quinolonas.....	57
7.6.	Genes de resistencia a trimetoprim y sulfametoxazol.....	57
8.	CONCLUSIONES.....	59
9.	LITERATURA CITADA.....	60

# 1. RESUMEN

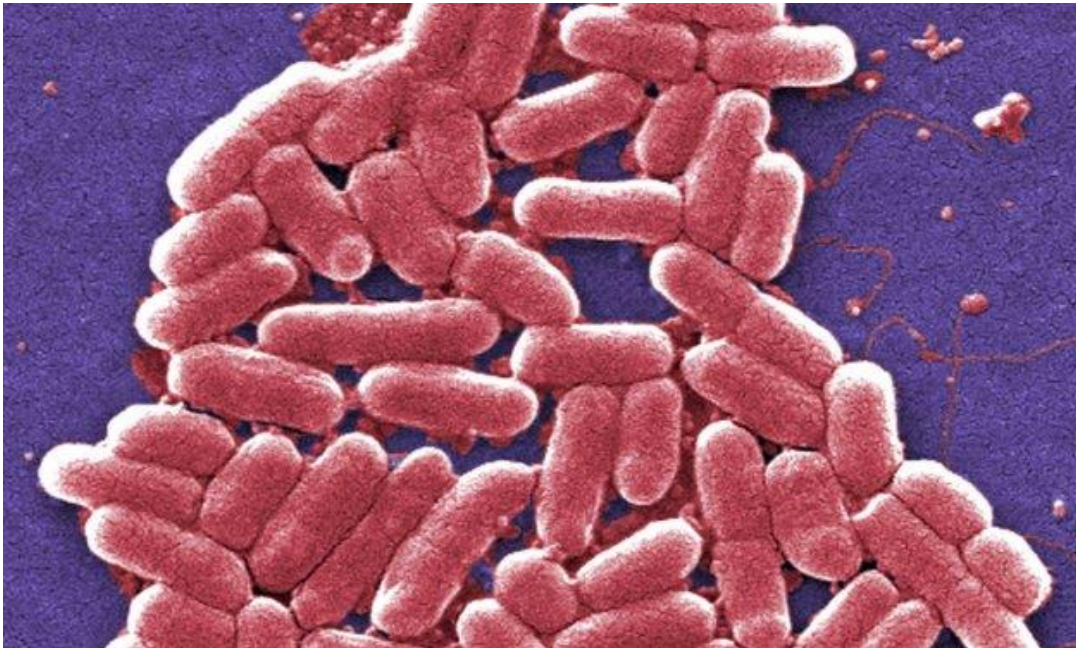
*E. coli* patógena cérvico-vaginal (CVPEC) es considerada la principal causa de las infecciones genitourinarias en mujeres en edad reproductiva. La patogenicidad de las CVPEC se debe a que posee genes de adhesión, sistemas de adquisición de hierro, protectinas y toxinas, los cuales frecuentemente se encuentran dentro de islas de patogenicidad (PAIs). El propósito de este estudio fue identificar las islas de patogenicidad PAI ICFT073, PAI IICFT073, PAI IJ96 y PAI IJ96 en cepas de *Escherichia coli* Patógenas Cérvico-vaginales e identificar la expresión de los genes de resistencia a quinolonas, aminoglucósidos, sulfametoxazol y trimetoprim. Se analizaron las muestras vaginales de 210 pacientes infectadas de dos unidades Médicas ambulatorias (UMA) del IMSS, Edo. de México. Las cepas de *E. coli* se identificaron por PCR mediante amplificación del gen 16S rRNA. Las PAIs ICFT073, IICFT073, IJ96 y IJ96 se detectaron por PCR convencional. Después de promover por el método de Kirby-Bauer la expresión de los genes de resistencia a los antibióticos en once cepas, el RNA fue extraído utilizando el robot QIAcube suministrado con el RNeasy Mini Kit (Qiagen). La primera cadena de cDNA se realizó con el kit Reverse transcription QuantiTect (Qiagen). La determinación de la expresión de los genes de resistencia a los antibióticos se realizó por PCR en Tiempo Real. *E. coli* fue identificada en el 95.2% (n=200) de las pacientes. El 39.5% (n=79) de las cepas de *E. coli* fue portadora de la PAI ICFT073, y 9% (n=18) de IICFT073. Las PAIs IJ96 y IJ96 no fueron identificadas en las bacterias. El gen de resistencia a los antibióticos más frecuente en las cepas fue *aac (3)-II* (gentamicina) con el 90% (n=10), seguido por *qnrB* (quinolonas) con el 81% (n=9) y *aadA1* con el 63% (n=7). La presencia en las cepas de *Escherichia coli* de las PAIs ICFT073 y IICFT073 que acarrean diferentes factores de virulencia, sumado a la expresión de múltiples genes de resistencia a los antibióticos, pueden ser factores importantes para la agudeza y cronicidad de las infecciones vaginales.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1. Características de *Escherichia coli*

*Escherichia coli* es un miembro importante de la microbiota intestinal, se presenta como una bacteria comensal del intestino humano y otros mamíferos; tiene la capacidad de colonizar el intestino pocas horas después del nacimiento, sin embargo, *E. coli* también puede ser un patógeno altamente versátil y frecuentemente mortal. Algunas cepas de *E. coli* pueden diferir de sus estado comensales, presentando una naturaleza más patógena y la capacidad de causar una enfermedad grave, tanto en el tracto intestinal como en cualquier otra parte del hospedero. Estas cepas patógenas se clasifican ampliamente como *E. coli* diarreogénicas que causan enfermedades entéricas, como diarrea o disentería, y las *E. coli* patógenas extraintestinales (ExPEC) que causan infecciones como meningitis y del tracto urinario (Kaper *et al*, 2004).

*Escherichia coli* es un bacilo que mide de 1-3  $\mu\text{m}$ , pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, que es el grupo más grande y heterogeneo de las bacterias con importancia médica (fig. 1). Son bacilos Gramnegativos, no formadores de esporas, son móviles debido a que poseen flagelos peritricos, pueden crecer en forma aerobia o anaerobia (aerobios facultativos), fermenta glucosa con producción de ácido y gas; hidroliza el peróxido en agua y oxígeno, por lo cual es considerada catalasa positiva (Murray *et al*, 2017).



**Figura 1.** Micrografía electrónica de *Escherichia coli*.



*Escherichia coli* puede crecer rápidamente en medios no selectivos o selectivos. En el medio MacConkey las colonias de *E. coli* son de color rosado, lisas, redondas, con bordes regulares y miden de 2-3 mm de diámetro, en el medio de cultivo salmonella-shigella las colonias son pequeñas que van del color rosa al rojo, en el agar sangre presenta producción de  $\alpha$ -hemolisina; mientras que en el medio EMB (Eosin Azul de Metileno) las colonias son elevadas o ligeramente convexas, de 2-3 mm de diámetro, presentan a la luz transmitida un centro azul-negro rodeado de un borde angosto y claro y brillo metálico azul verdoso (Paniagua *et al.*, 2007).

La población de bacterias intestinales comensales pueden proteger al huésped de la colonización de patógenos que se encuentran compitiendo por los sitios de unión epitelial y los nutrientes, fortaleciendo la respuesta inmunitaria intestinal (MacDonald & Monteleone, 2005). El establecimiento de la microbiota comienza con la exposición de los infantes a la microbiota materna. En un hospedero sano, el microbioma evoluciona en respuesta a factores internos, como el sistema inmune, y a externos, como la dieta y el uso de medicamentos (Gritz & Bhandari, 2015).

## **2.2. Patogenicidad de *Escherichia coli***

Una de las enfermedades que causan importantes niveles de morbilidad y mortalidad infantil son las diarreas, constituyendo un problema de salud pública. *Escherichia coli* es uno de los principales agentes bacterianos etiologicos de esta enfermedad. Esta bacteria Gram negativa, predomina en forma aerobia y anaerobia facultativa en el tubo digestivo de la mayor parte de los mamíferos. Se puede encontrar en el medio ambiente ya que es capaz de sobrevivir durante cierto tiempo en el agua y los alimentos, de manera que su aislamiento es un indicador de contaminación fecal reciente (Gyles, 1994).

Las cepas de *E. coli* patógenas pueden producir infecciones entéricas (diarrea, disentería, colitis hemorrágica, síndrome urémico hemolítico y enfermedad de los edemas); o extraintestinales (infecciones del tracto urinario, bacteriemias o septicemias, meningitis, peritonitis, mastitis e infecciones pulmonares y de heridas) (Donnenberg & Kaper 1992; Guerrant *et al.*, 1990).

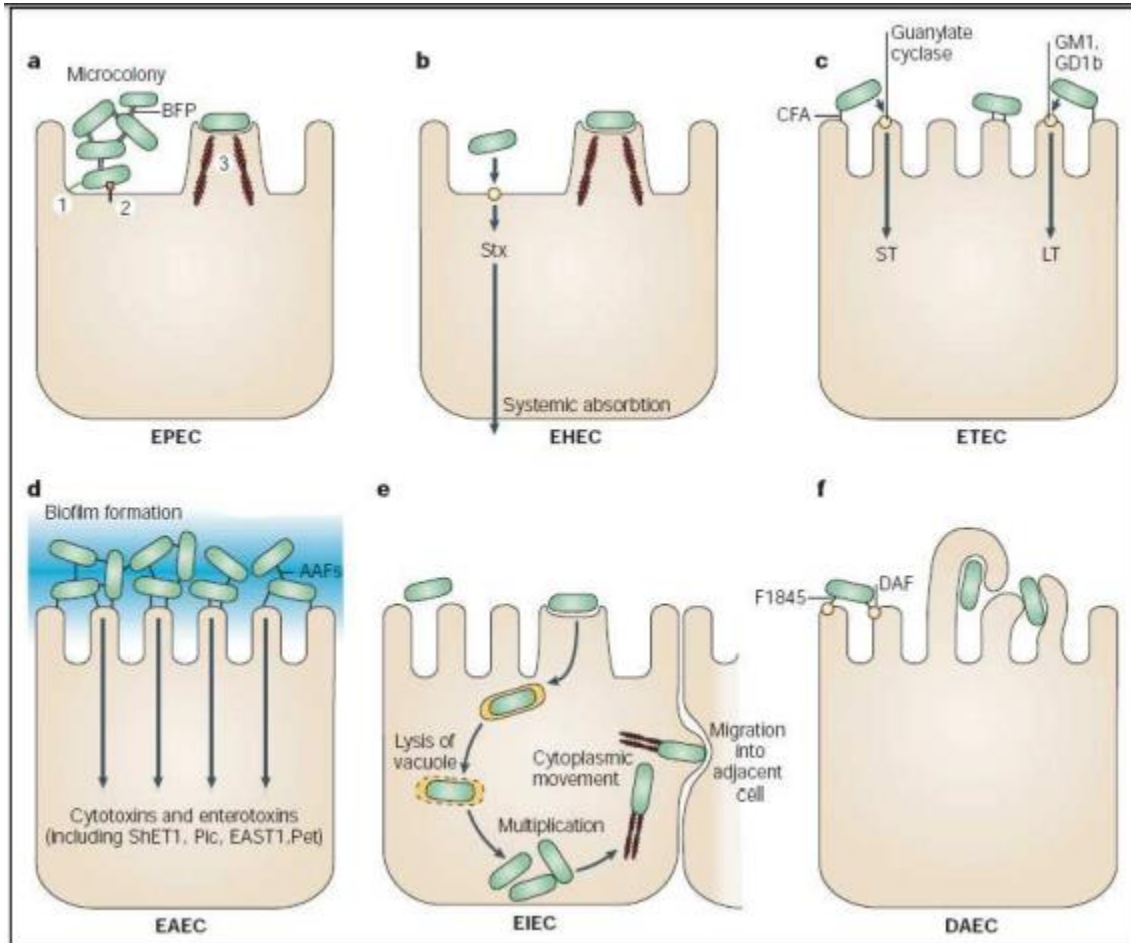
Las cepas patógenas de *E. coli* se clasifican como *E. coli* diarreogénicas y *E. coli* patógenas extraintestinales. Existen seis patotipos intestinales; *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* de adherencia difusa (DAEC), y *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) que afecta principalmente a niños menores de cinco años y es la principal causa de la “diarrea del viajero” que se desarrolla en personas que visitan países tropicales o subtropicales con condiciones de higiene diferentes (Tabla 1). Los seis patotipos intestinales de *E. coli* tienen características únicas en sus interacciones con las células eucarióticas (figura 2) (Kaper *et al.*, 2004). Entre las *E. coli* patógenas extraintestinales, se encuentran las cepas patógenas de *E. coli* que ocasionan infecciones del tracto urinario (UPEC),

infecciones cérvico-vaginales (CVPEC), meningitis neonatal y sepsis (MNEC) (Russo & Johnson, 2003).

*Escherichia coli* se clasifica utilizando métodos serológicos por la identificación de tres tipos de antígenos de superficie (O: K:H, o somático: capsular: flagelar); se conocen al menos 164 antígenos del grupo O, 100 del grupo K y 55 del grupo H, sin embargo, se ha encontrado que son un grupo relativamente bajo de serotipos O:H de *E. coli* los causantes de enfermedades humanas.

Patotipo	Población en riesgo	Sitio de colonización	Vectores	Vía de transmisión	Síntomas
ETEC	Niños de 0-5 años y visitantes de países tropicales y subtropicales <sup>1</sup> .	Intestino delgado	Humanos, cerdos, cabras, vacas, gatos y perros	Fecal-oral	Diarrea acuosa, sin sangre, con fiebre y vómito en la minoría de los casos.
EPEC	Niños de 0-5 años de países en desarrollo <sup>2</sup> .	Intestino delgado	Humanos, conejos, cerdos, gatos, cabras, perros y aves	Fecal-oral	Diarrea acuosa, abundante con vómito y poca fiebre
EHEC	Niños y adultos de todo el mundo <sup>3</sup> .	Íleon y colon	Humanos rumiantes y aves	Fecal-oral	Diarrea acuosa con sangre, con o sin fiebre. Disentería, colitis hemorrágica
EAEC	Niños y adultos de todo el mundo <sup>4</sup> .	Intestino delgado y/o colon	Humanos aves tlacuaches caballos vacas ovejas y cerdos	Fecal-oral	Diarrea acuosa con mucosidad, con o sin sangre, fiebre y con o sin vómito
EIEC	Niños de 0-5 años de países en desarrollo <sup>5</sup> .	Colon	Humanos, vacas, cerdos	Fecal-oral	Fiebre, dolor abdominal, diarrea con sangre y leucocitos en heces
DAEC	Niños de 0-1 años de edad <sup>6</sup> .	Colon	Humanos	Fecal-oral	Diarrea

**Tabla 1.** Características de los patotipos diarreogénicos de *E.coli*. <sup>1</sup>Masters *et al.*, 2003 <sup>2</sup>Ram *et al.*, 2008 <sup>3</sup>Croxen *et al.*, 2013 <sup>4</sup>Jensen *et al.*, 2014 <sup>5</sup>Tobias & Vutukuru, 2012 <sup>6</sup>Ferens & Hovde, 2011.



**Figura 2.** Esquemas de la patogenicidad de los patotipos intestinales de *E. coli* (Kaper *et al.*, 2004).

### 2.3. Infección del canal cérvico-vaginal

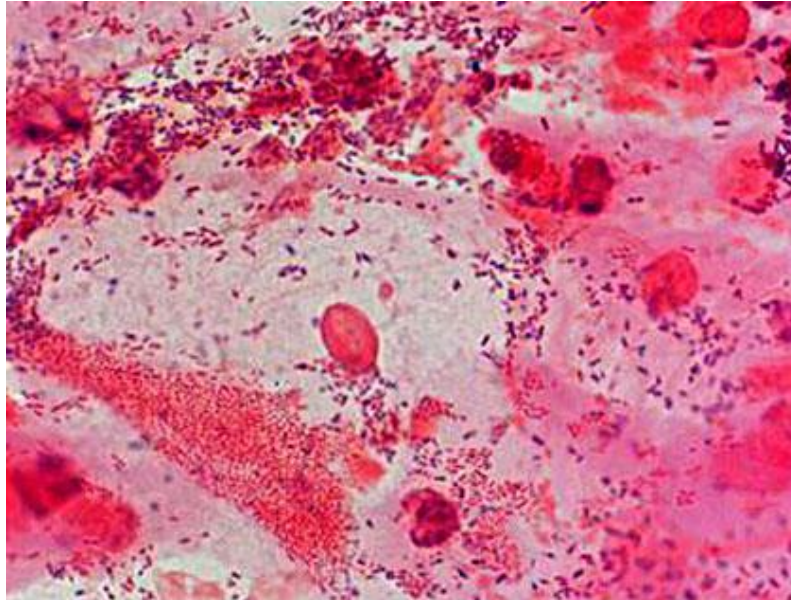
Las infecciones del aparato genital femenino presentan una sintomatología que puede ser común, como disuria, polaquiuria, prurito vulvar, dispareunia y leucorrea. Resulta muy difícil distinguir dichas infecciones entre sí, sólo sobre la base de la sintomatología, siendo absolutamente necesario fundamentarse en la exploración y el estudio microbiológico para establecer el diagnóstico (McKechnie *et al.*, 2009).

La infección vaginal se caracteriza habitualmente por la existencia de exudado vaginal, picor vulvar e irritación; también puede detectarse olor vaginal. Las tres causas más frecuentes de

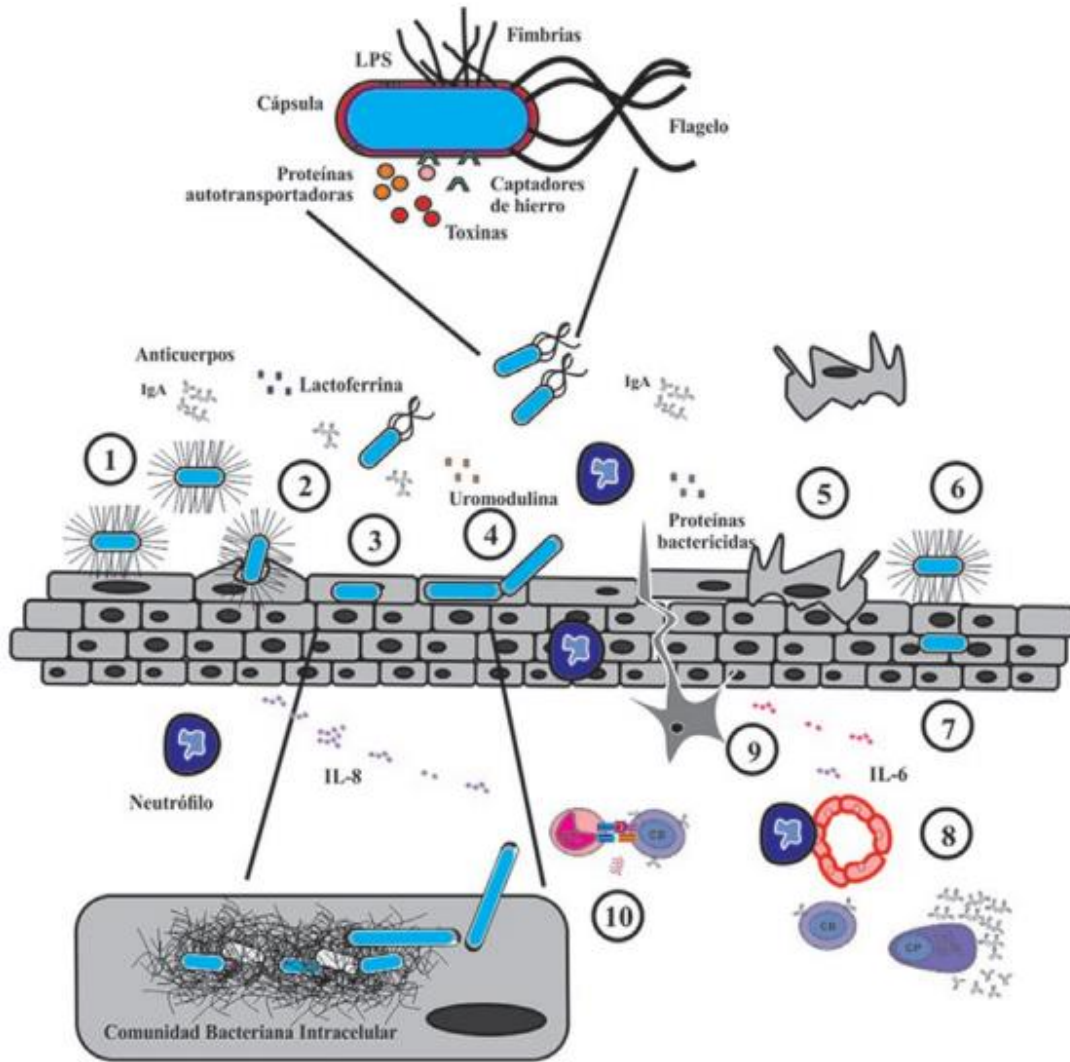
infección vulvovaginal son la vaginitis por *Trichomonas vaginalis*, la vaginitis candidiásica y la vaginosis bacteriana (VB) (Yin *et al.*, 2008).

La vaginosis bacteriana es la causa más frecuente de exudado vaginal y de mal olor de vagina. La VB es una alteración de la microbiota vaginal, en la que los microorganismos habituales, constituida por bacilos Grampositivos (*Lactobacillus* spp.), se halla sustituida por bacilos Gramnegativos (*Escherichia coli* patógena cérvico-vaginal) y una cantidad variada de diversas especies anaerobias (fig. 3). La causa de esta disbacteriosis es desconocida, y se asocia con la existencia de múltiples parejas sexuales, duchas vaginales y pérdida de *Lactobacillus*, lo que provoca una elevación del pH vaginal (Yin *et al.*, 2008). Dentro del tracto vaginal, CVPEC comienza el proceso infeccioso similar al que exhibe UPEC con la unión fuerte e irreversible del patógeno a la mucosa epitelial, seguida por la invasión y multiplicación bacteriana dentro de las células del hospedero (Antao *et al.*, 2009) (fig. 4).

Se recomienda el tratamiento en mujeres embarazadas, pues reduce el riesgo de sufrir complicaciones como parto prematuro y endometritis puerperal. En la no embarazada también se recomienda, pues elimina los síntomas y signos de VB y reduce las complicaciones en caso de aborto o histerectomía (Donnenberg, 2002). La diversidad de mecanismos patogénicos de *Escherichia coli* en individuos aparentemente sanos es atribuida a la propiedad de una gran variedad de factores de virulencia específicos (Scheutz, 2005).



**Figura 3.** Tinción de Gram de la secreción vaginal de un paciente con VB donde se observa la abundancia de los cocobacilos Gram negativos y la escases de bacilos grandes Gram positivos (lactobacilos).



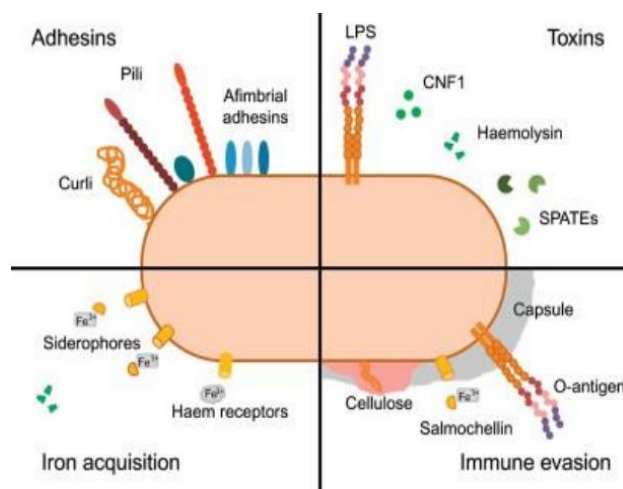
**Figura 4.** Mecanismo de patogenicidad de *Escherichia coli* uropatogénica (UPEC) en el tracto urinario (TU). La principal *E. coli* extraintestinal es UPEC, la cual puede colonizar el TU usando factores de virulencia (fimbrias, flagelo, cápsula, lipopolisacárido [LPS], proteínas autotransportadoras, toxinas y sideróforos). El mecanismo de patogenicidad se inicia por la adherencia íntima a las células superficiales del TU (1) activando un proceso de invasión (2), el cual permite a la bacteria permanecer intracelularmente para formar comunidades bacterianas intracelulares (3). La interacción de UPEC con la célula promueve un estado de oxidación intracelular, promoviendo la filamentación de la bacteria y su posterior eflujo por la lisis de la célula (4). La interacción célula-bacteria estimula un proceso de apoptosis y el desprendimiento de las células protectoras del TU, como un mecanismo de defensa en el TU (5). El epitelio intermedio del TU permanece expuesto y UPEC coloniza nuevamente para un nuevo ciclo de infección (6). Después de la reinfección, UPEC puede permanecer

intracelularmente en estado quiescente hasta por varios meses (7). El eflujo de UPEC es estimulado por la misma bacteria o a través de la célula del huésped, saliendo y colonizando el TU. Por otro lado, la lactoferrina, la uromodulina, los anticuerpos IgA, la catelicidina y las defensinas son secretados por diversos tipos celulares del huésped para inhibir la unión de UPEC al TU. El uroepitelio produce IL-6 e IL-8, estimulando la migración de células de la respuesta inmunitaria, principalmente de neutrófilos (8). La activación de las células presentadoras del antígeno (APC, por sus siglas en inglés) por la captación de antígenos asociados a UPEC (9) permite la presentación de péptidos a las células T y la diferenciación de células B a células plasmáticas (CP) que producen inmunoglobulinas (10) (Tomado de Luna *et al.*, 2018).

## 2.4. Factores de virulencia

La virulencia de las cepas de *Escherichia coli* condiciona en gran medida su potencial para establecer una infección, La capacidad de las cepas patógenas de *E. coli* para causar los distintos tipos enfermedades intestinales y extraintestinales procede de la expresión de múltiples factores de virulencia incluyendo adhesinas, toxinas, sideróforos y sistemas de secreción, entre otros (Blanco *et al.*, 2002). Esos factores no son necesarios para la replicación vegetativa y tampoco para el simple comensalismo, pero contribuyen al aumento de eficacia en la colonización de superficies específicas del hospedero, evasión de las defensas inmunológicas, o daño directo a sus células y tejidos lo que resulta en el establecimiento de la enfermedad (Johnson, 1991).

Las fimbrias superficiales que les permiten adherirse a la mucosa del intestino delgado y una vez que ha colonizado el intestino, cada patotipo de *Escherichia coli* puede agredir al hospedero de manera diferente; ya sea produciendo toxinas, con sistemas de adquisición de hierro, mecanismos evasores de la respuesta inmune y adhesinas (Lloyd *et al.*, 2007) (fig 5).



**Figura 5.** factores de virulencia de las cepas CVPEC



Los factores de virulencia son atributos de un patógeno que influyen específicamente en las funciones del hospedero, favoreciendo el establecimiento y replicación del microorganismo dentro del tejido del hospedero (Rodríguez *et al.*, 1999). La expresión de factores de virulencia específicos confiere una creciente capacidad de adaptación a nuevos nichos y permite causar un largo espectro de enfermedades (Kaper *et al.*, 2004). Así, las cepas ExPEC que son caracterizadas por la diversidad de factores de virulencia que poseen, pueden causar infecciones en una diversidad de sitios extraintestinales, tales como el tracto urinario, corriente sanguínea, meninges, cavidad peritoneal y pulmones (Russo & Johnson, 2003).

Los factores de virulencia que presenta esta bacteria están codificados en plásmidos o islas de patogenicidad, genes que pueden conjugarse o tienden a adaptarse en su hospedero para expresarse durante el proceso de infección, seleccionándose en cepas cada vez más virulentas (Faraldo & Sansom, 2003).

En la tabla 2 se detallan los principales factores de virulencia de *Escherichia coli* descritos hasta el momento.

Gen	Función	Referencia
<b>ADHESINAS</b>		
<i>pap</i> (pili asociado a pielonefritis)	Adhesión a la mucosa y matriz extracelular del epitelio, inducción de citocinas.	Wullt, 2003; Hedlund <i>et al.</i> , 1999.
<i>iha</i> (adhesina homóloga al gen regulado por hierro)	Adhesina homóloga a <i>irgA</i> (iron-regulated gene homologue adhesin)	Johnson <i>et al.</i> , 2005.
<i>gafD</i> (fimbria G) <i>bmaE</i> (adhesina M) <i>focG</i> (fimbria F1C)	Hemaglutininas.	Rhen <i>et al.</i> , 1986.
<i>afa</i> (adhesina afimbrial)	Adhesión a la mucosa y células endoteliales.	Emódy <i>et al.</i> , 2003.
<i>afa</i> (adhesina afimbrial)	Adhesión a la mucosa y matriz extracelular del epitelio, inducción de citocinas.	Le Bouguéneq, 2005; Plancon <i>et al.</i> , 2003.
<i>fimH</i> (fimbria tipo 1)	Adhesión a la mucosa del epitelio, internalización y formación de biopelícula, inducción de citosinas.	Bergten <i>et al.</i> , 2005; Anderson <i>et al.</i> , 2003; Martinez <i>et al.</i> , 2000.
<i>sfaS</i> (fimbria S)	Adhesión a la mucosa epitelial de vías urinarias bajas y altas.	Bien <i>et al.</i> , 2012.
<b>Toxinas</b>		
<i>hlyA</i> (hemolisina $\alpha$ )	Citotoxicidad, hemólisis,	Bien <i>et al.</i> , 2012; Dhakal &



	inhibe la quimiotaxis y fagocitosis.	Mulvey, 2012.
<i>astA</i>	Toxina enteroagregativa termoestable.	Momtaz <i>et al.</i> , 2013.
<i>Vat</i>	Toxina vacuolante autotransportadora	Momtaz <i>et al.</i> , 2013.
<i>cnf1</i> (factor citotóxico necrotizante)	Internalización, interferencia con fagocitosis, inducción de apoptosis.	Chung <i>et al.</i> , 2003; Mills <i>et al.</i> , 2000; Davis <i>et al.</i> , 2006.
<i>sat</i> (toxina secretada autotransportadora)	Citotoxicidad	Guyer <i>et al.</i> , 2002.
<i>Usp</i>	Proteína uropatógena específica	Nipic <i>et al.</i> , 2013
<b>ADQUISICIÓN DE HIERRO</b>		
<i>iutA</i> (aerobactina)	Receptor del sideróforo aerobactina	García <i>et al.</i> , 2011.
<i>iroN</i> (salmoquelina)	Receptor del sideróforo salmoquelina en el sistema de captación de hierro, evasión de la respuesta inmune	Russo <i>et al.</i> , 2002; García <i>et al.</i> , 2011.
<i>fyuA</i> (yersiniabactina)	Receptor del sideróforo yersiniabactina, formación de biopelícula.	Bien <i>et al.</i> , 2012; Hancock <i>et al.</i> , 2008.
<i>chuA</i> (receptor hemo)	Proteína receptora del grupo hemo, formación de biopelícula.	Olson <i>et al.</i> , 2015; Reigstad <i>et al.</i> , 2007.
<b>PROTECTINAS</b>		
<i>kpsMT</i> (antígeno capsular)	Protección contra fagocitosis, opsonización y lisis.	Johnson, 2003.
<i>traT</i> (proteína de membrana externa)	Resistencia a la actividad bactericida del suero.	Johnson, 2003.

**Tabla 2.** Principales factores de virulencia de las cepas CVPEC.

## 2.5. Adhesinas

En *Escherichia coli* la mayoría de estructuras adherentes son fimbrias proteicas que se unen a receptores específicos situados en las membranas de las células epiteliales. La adherencia a las células del hospedero puede ser mediada tanto por adhesinas fimbriales como afimbriales (Lüthje & Brauner, 2014). Una misma cepa puede contener simultáneamente varias adhesinas.

La fimbria tipo 1 está presente casi en la totalidad de las cepas de *Escherichia coli* y de otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae*. Su receptor es la  $\alpha$ -D-manosa presente en las membranas de la mayoría de las células del hospedero, en las vías urinarias se une a la proteína Tamm-Horsfall (uromucoide rico en manosa excretado por las células epiteliales urinarias), esta unión actúa como mecanismo de defensa inespecífico, ya que evita la unión de *Escherichia coli* a sus dos receptores urinarios principales, las uroplaquinas Ia e Ib. La unión a la proteína Tamm-horsfall favorece la eliminación de *E. coli* por la orina. El daño en la capa formada por la proteína Tamm-horsfall permite que gran número de *E. coli* queden adheridas al epitelio, este proceso representa el punto de inflexión en el que la colonización se convierte en infección (Balish *et al.*, 1982).

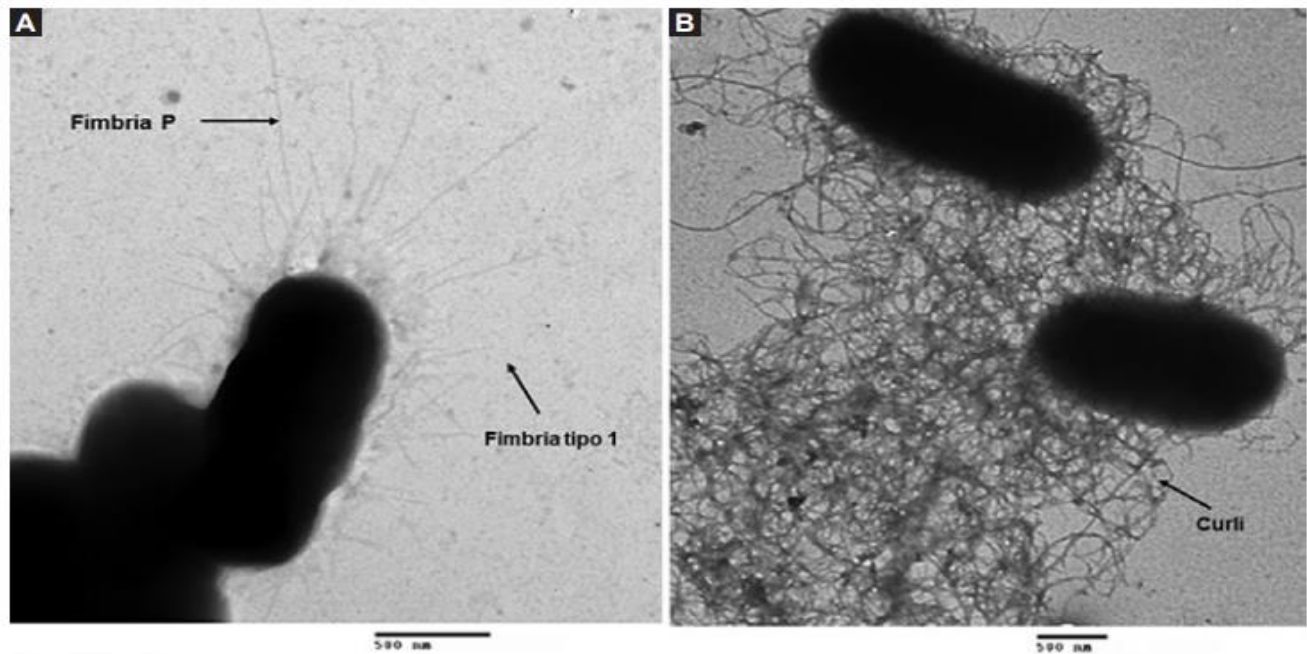
En la vejiga la señal para activar la cascada defensiva del hospedero que incluye la muerte programada, la exfoliación de las células del epitelio vesical y la activación de los mediadores de respuesta inflamatoria (interleucinas y factores de necrosis tumoral) es dada por la unión de FimH, la adhesina presente en el extremo distal de la fimbria tipo 1 que se une e interacciona con la uroplaquina (Mulvey *et al.*, 1998). *Escherichia coli* es capaz de eludir los mecanismos defensivos del hospedero invadiendo las capas profundas del tejido vesical, replicándose en el interior de sus células y creando biopelículas o pods que contienen bacterias inmersas en una matriz rica en polisacáridos y rodeados por una envoltura de uroplactina. Estas biopelículas pueden construir un reservorio para las cepas de *Escherichia coli* productoras de las infecciones urinarias recurrentes (Anderson *et al.*, 2003).

Las fimbrias P presentan tres variantes moleculares (I, II y III) que son codificadas por los correspondientes alelos (*papG* alelo I, *papG* alelo II, *papG* alelo III) y se unen a receptores distintos. Las fimbrias P variante II son de especial importancia en la producción de pielonefritis, esto se debe a que sus receptores, constituidos por los glucoesfingolípidos Gal ( $\alpha$ 1-4) contenidos en los antígenos del grupo sanguíneo, se encuentran en la vagina, la vejiga, los uréteres y los túbulos renales, lo que facilita la ascensión de *Escherichia coli* con fimbrias P a la pelvis renal (fig. 6) (Stapleton, 2003).

Otra adhesina importante es la fimbria S que se ha asociado especialmente con cepas causantes de septicemias y meningitis. Muchas ExPEC expresan conjuntamente las fimbrias P y S. Dichas fimbrias están codificadas en los operones cromosómicos *pap* y *sfa* respectivamente (Blanco *et al.*, 2002).

Las fimbrias curli están presentes en aproximadamente el 50% de las cepas ExPEC siendo óptimamente expresadas a temperatura ambiente por lo que se han correlacionado con la

colonización de la región perineal, lo que posibilitaría una ITU subsecuente (Emódy *et al.*, 2003).



**Figura 6.** Visualización de las fimbrias en la cepa de UPEC por microscopía electrónica de transmisión. A la izquierda se muestra una micrografía de la cepa UPEC en la que pueden verse fimbrias cortas y largas, que corresponden a las fimbrias tipo 1 y P, respectivamente. Morfológicamente, ambas son rectas y delgadas. A la derecha se muestra otra micrografía en la que se observan fibras finas en forma de rizos flexibles que forman estructuras denominadas curli. Las micrografías fueron generadas en la Central de Instrumentación de Microscopía de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional.

## **2.6. Toxinas**

Las toxinas son pequeñas moléculas capaces de causar enfermedad cuando entran en contacto o son absorbidas por tejidos del cuerpo, interactuando con macromoléculas biológicas como enzimas o receptores celulares.

La  $\alpha$ -hemolisina (*hlyA*) es una toxina secretada por *E. coli* que lisa eritrocitos ocasionando la liberación de hierro y otros nutrientes necesarios para el crecimiento bacteriano, su expresión está asociada con una mayor severidad clínica en pacientes con infecciones en el tracto urinario (Johnson, 1991; Blanco *et al.*, 2002). Las funciones del factor citotóxico necrotizante 1 (*cnf1*) en las infecciones del tracto urinario inducen la apoptosis de células epiteliales de vejiga in vitro y disminuye la fagocitosis por polimorfonucleares (Oelschlaeger *et al.*, 2002).

La toxina autotransportadora secretada (Sat) es codificada en el cromosoma CFT073 por el gen *sat* (secreted auto transporters), su tamaño es de 3,900 pb y se encuentra ubicada entre los nucleótidos 3456362-34600261, número de acceso AE014075. El gen *sat* está localizado en la isla de patogenicidad PAI II de *E. coli* CFT073; exhibe actividad citopática sobre células HEp-2, Vero y HK-2 de vejiga (Guyer et al., 1998; Sainz et al., 2008).

La toxina vacuolizante autotransportadora está asociada con las cepas de *E. coli* pielonefriticas y tiene actividad tóxica contra líneas celulares de origen renal o de vejiga, induce una gran variedad de efectos tóxicos incluyendo vacuolación e hinchazón (Restieri et al., 2007). La producción de la toxina dilatadora citoletal y de citolisina A también ha sido detectada en cepas de *Escherichia coli* patógena cérvico-vaginal (CVPEC). Las colicinas son sustancias antibióticas que son producidas por ciertos miembros de la familia *Enterobacteriaceae* y están compuestas por dominios estructurales especializados para cada uno de los diferentes pasos que son la orientación, la translocación y la muerte. La primera de las toxinas bloquea el ciclo celular y la segunda causa apoptosis de células del hospedero (Emódy et al., 2003). En las infecciones extraintestinales, el hierro se convierte en uno de los principales factores que limitan el crecimiento bacteriano y para poder incorporarlo la mayoría de las ExPEC posee sideróforos que generalmente son formados por un compuesto quelante del hierro que la bacteria excreta y puede volver a captar (Blanco et al., 2002).

El gen *hlyA* puede localizarse individualmente dentro de alguna isla de patogenicidad (PAI) en particular, sin embargo, en la isla de patogenicidad PAI IJ96, el gen *cnf1* siempre está vinculado a *hlyA* debido a su ubicación combinada (Landraud et al., 2003).

## **2.7. Sistemas de adquisición de hierro**

El hierro es un nutriente fundamental para el crecimiento bacteriano, ya que forma parte de numerosos procesos biológicos como el transporte de electrones, activación de oxígeno, reducción del peróxido, síntesis de aminoácidos, nucleótidos y ADN y fotosíntesis. Debido a su importancia como nutriente la adquisición de hierro es uno de los pasos esenciales en la supervivencia de un patógeno dentro del hospedero. Se ha comprobado que el aumento de la concentración de hierro en los tejidos del hospedero conlleva una mayor susceptibilidad a las infecciones por la mayoría de las bacterias patógenas invasivas. Por tanto la concentración de hierro es uno de los elementos más controlados dentro del hospedero, prácticamente no se encuentra en forma libre debido a las estrategias del propio hospedero para evitar su efecto tóxico y para impedir que los microorganismos dispongan de él.

El ión  $Fe^{+3}$  tiene una solubilidad de  $10^{-17}$  M y un pH de 7, una concentración insuficiente para el crecimiento bacteriano, ya que las bacterias requieren del orden de  $10^{-7}$  a  $10^{-5}$  M para alcanzar un crecimiento óptimo. La escasa disponibilidad del hierro hace que este elemento actúe como factor limitante para el desarrollo de la mayoría de los microorganismos patógenos, por lo que las bacterias han desarrollado distintas estrategias para poder captarlo (Bullen, 1981). *Escherichia coli* regula la expresión de los genes implicados en la adquisición

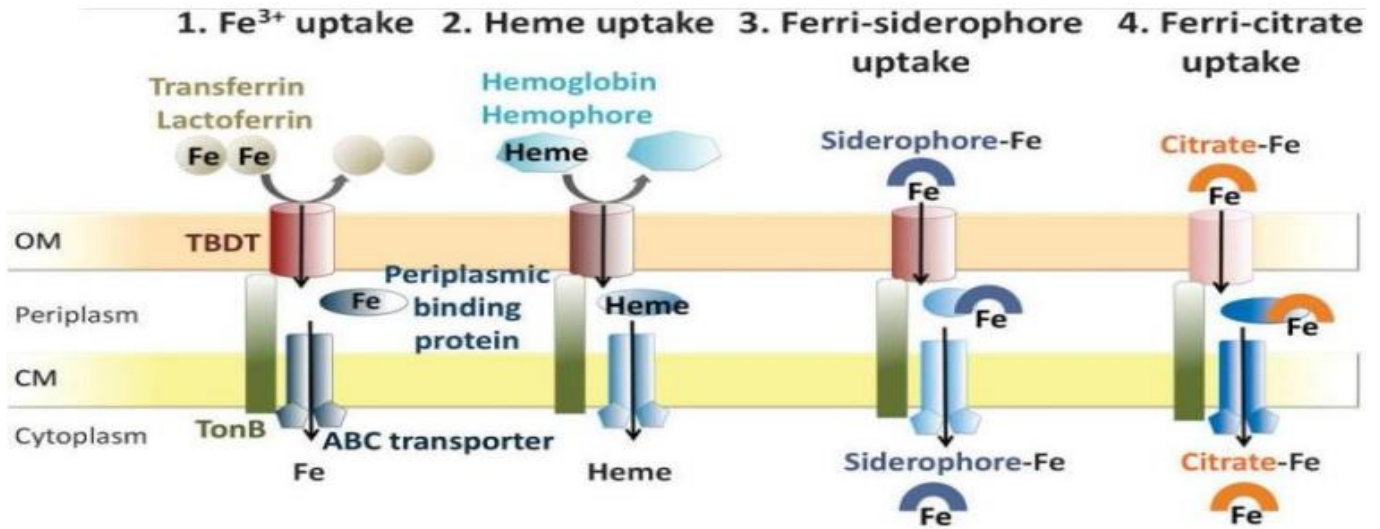
de hierro en respuesta a la limitación de hierro encontrada en el tracto genitourinario de mamíferos, para asegurar niveles adecuados de hierro intracelular (Hagan *et al.*, 2010).

Las bacterias patógenas pueden también poseer mecanismos de degradación de las proteínas almacenadoras de hierro, interacción directa con las proteínas del hospedero que transportan hierro (transferrinas, lactoferrinas, hemoglobinas, etc.) o la unión y captación del ión  $Fe^{+3}$  por medio de un transportador de la membrana interna FbpABC (Amin, 2009). Se ha demostrado que los patógenos de mamíferos que tienen un rango estrecho de hospederos, poseen sistemas de adquisición de hierro basados en receptores directos de superficie para las transferrinas (Morgenthau *et al.*, 2013).

Otro sistema de captación de hierro presente en las cepas de *Escherichia coli* Cérvico-vaginal es la capacidad para utilizar el grupo hemo del hospedero, formado por un anillo de protoporfirina IX, que alberga en su interior un átomo de hierro  $Fe^{+2}$ . El grupo hemo no suele encontrarse libre en el plasma sino unido a proteínas formando hemoproteínas como la hemoglobina, mioglobina y citocromos (Stojiljkovic & Perkins-Balding, 2002), siendo necesaria la acción de las hemolisinas y citotoxinas bacterianas para facilitar el acceso al contenido celular y poder utilizar el grupo hemo, el cual se unirá a un receptor de membrana específico que se encuentra asociado a un sistema de transporte de tipo ABC en las bacterias Gram-negativas (Occhino *et al.*, 1998).

Se ha descrito en *E. coli* que también pueden adquirir hierro a través de citrato (citrato férrico), el citrato se asimila mediante el receptor específico FecA dependiente de TonB, y un transportador ABC FecABCD en la membrana interna (Yue *et al.*, 2003).

En las bacterias Gram-negativas todos los receptores de membrana externa implicados en la adquisición de hierro, bien a través del grupo hemo, de citrato férrico, o de transferrinas, son dependientes de TonB, una molécula que le proporciona la energía necesaria para atravesar la membrana externa hasta el espacio periplásmico (fig. 7).



**Figura 7.** Diversas vías de asimilación de hierro en bacterias Gram-negativas: (1) y (2). Utilización de transferrinas, lactoferrinas y hemoglobinas que entregan el hierro o el grupo hemo a un receptor para a continuación ser internalizado, (3) asimilación a través de sideróforos (4) captación del citrato férrico. Todos los sistemas tienen receptores específicos dependientes de TonB, que les proporciona la energía para el transporte hacia el espacio periplásmico. El transporte desde el espacio periplásmico al interior celular de cada uno de los complejos se lleva a cabo a través de un transportador de tipo ABC (Schalk, 2013).

El mecanismo más utilizado por los microorganismos para la obtención de hierro, es la secreción de moléculas denominadas sideróforos, que con una afinidad por el ión  $Fe^{+3}$  muy elevada ( $K_s$  entre 1030 y 1052), pueden competir eficazmente y arrebatarse el ión  $Fe^{+3}$  a las fuentes del hospedador como la ferritina o la transferrina, las cuales tienen constantes de afinidad menores (Weaver et al., 2013).

### **2.8. Sistemas para evadir la respuesta inmune del hospedero (Protectinas)**

La inflamación es un proceso fisiológico esencial para el mantenimiento de la homeostasis y la recuperación del tejido tras la infección. Sin embargo, la prolongación de la inflamación puede ser destructiva y conducir a la destrucción tisular. Si tras la respuesta inflamatoria, la agresión se resuelve, los tejidos vuelven a sus funciones homeostáticas normales; cuando el proceso inflamatorio agudo no se resuelve, el proceso se vuelve crónico (Nathan, 2002).

Las cepas de ExPEC poseen cápsula que es una red de polímeros que cubre la superficie de la bacteria. La mayoría de las cápsulas están compuestas de polisacáridos. Si el polisacárido forma una capa homogénea y uniforme alrededor del cuerpo bacteriano se le llama cápsula y si sólo forma una red de trabéculas o una malla alrededor de la bacteria se le llama glucocalix. El papel de la cápsula bacteriana es proteger a la bacteria de la respuesta inflamatoria del hospedero, esto es, activación del complemento y muerte mediada por fagocitosis. La cápsula por sí misma es menos probable que sea opsonizada por C3b y la bacteria puede no ser ingerida por los fagocitos. La cápsula constituye el llamado antígeno K (capsular); Algunas

bacterias encapsuladas están compuestas de polisacáridos que no desencadenan la formación de anticuerpos porque dichos polisacáridos se parecen mucho a carbohidratos que son ubicuos en los tejidos del hospedero (ácido siálico y ácido hialurónico) (Shin & Brodsky, 2015).

La variación en los antígenos de superficie es otra forma de evadir la acción de los anticuerpos del hospedero, le confiere la capacidad de cambiar de un tipo de fimbria a otra, por lo tanto los anticuerpos preformados no se unen a la nueva fimbria formada. La bacteria también cambia otras proteínas de superficie que pueden servir como blanco para los anticuerpos (Jarczak *et al.*, 2013).

Las proteínas de la membrana externa desempeñan un papel importante en la patogénesis de la enfermedad, debido a que actúan como adhesinas (Bessen & Gotschlich, 1986; Sansonetti, 1991), puntos de fijación de los anticuerpos (Murphy & Bartos, 1988), porinas (Jeanteur *et al.*, 1991; McGuinness, 1990), receptores para proteínas solubles como los sideróforos (Stoebner & Payne, 1988) y proteínas del complemento (Hoffman *et al.*, 1992). por su localización estratégica, son responsables de la interacción de los patógenos con el hospedador (Sansonetti, 1991) por lo que las OMP's participan en los mecanismos de evasión de la respuesta inmune y, por ende, de la persistencia de las *Escherichia coli* en el hospedero (Blanco, 1990).

La proteína precursora del receptor de la aerobactina férrica (IutA) tiene actividad lectínica y es un receptor de sideróforo, codificado por un gen del plasmidio pColV-30, asociado con virulencia de algunas cepas de *E. coli* (Crosa & Walsh, 2002). Debido a la abundancia en los diferentes sistemas de adquisición de hierro, se sugiere que el receptor IutA puede ser una ventaja durante el establecimiento de un proceso infeccioso, sin embargo no es esencial para *Escherichia coli* (Landgraf *et al.*, 2012).

## **2.9. Islas de patogenicidad**

Los microorganismos patógenos a diferencia de sus parientes no patógenos han desarrollado la capacidad de causar enfermedades en otros organismos con factores de virulencia; la patogenicidad representa la adaptación a un nicho ecológico, es decir, otro estilo de vida bacteriano. Los factores de virulencia de las bacterias patógenas (adhesinas, toxinas, sistemas de adquisición de hierro y otros) están codificados por regiones particulares del genoma procariota denominadas islas de patogenicidad. El término islas de patogenicidad (PAI) fue acuñado por Hacker *et al.* (1997) para describir dos grandes regiones inestables en el cromosoma de *Escherichia coli* uropatógena (UPEC) (Hacker *et al.*, 1990). Las islas de patogenicidad comprenden grandes regiones genómicas [10-200 kilobases (kb) de tamaño] que están presentes en los genomas de cepas patógenas pero ausentes de los genomas de miembros no patógenos de la misma especie o especies relacionadas (Hacker & Kaper, 2000).

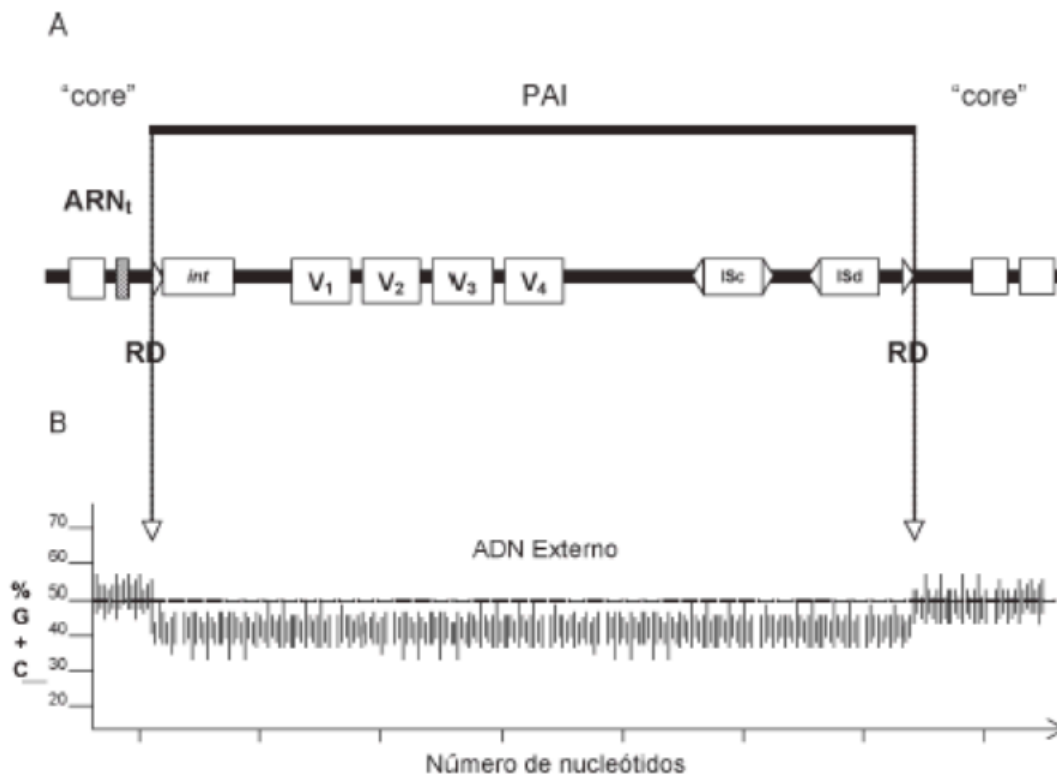
Los genes que codifican para los factores de virulencia, en muchos patógenos, son de alguna manera diferentes de otros genes en el cromosoma. Las diferencias a menudo incluyen



cambios en la composición global de nucleótidos, sesgo de uso de codones, asociación con elementos genéticos móviles y vinculación con genes de RNAt. Los genomas bacterianos consisten en una arquitectura de DNA en mosaico de varios segmentos de contenido de guanina y citosina (G + C). La mayor parte de la secuencia genómica (normalmente 70% - 80%) tiene un contenido homogéneo de G + C, que es típico de cada especie bacteriana. Este “genoma central” conservado y estable contiene la información genética que se requiere para las funciones celulares esenciales (Hacker & Kaper, 2000).

### 2.10. Características de las islas de patogenicidad

Las bacterias patógenas han adquirido PAI que codifican un amplio rango de determinantes patógenos. Estos incluyen mecanismos para resistir las defensas del hospedero, factores de colonización, adquisición de nutrientes y toxinas. Algunas de estas actividades están mediadas por sistemas especializados de secreción (Fernández *et al.*, 2004) (fig. 8).



**Figura 8.** Estructura general de una isla de patogenicidad. (A) las PAI típicas son regiones del DNA que están presentes en el genoma de las bacterias patógenas, pero ausentes en las no patógenas. La mayoría de las PAI están insertadas en sitios específicos como en los genes de ARNt. Portan genes de virulencia (V1, V2, V3, V4); genes de elementos móviles, tales como integrasas (*int*), elementos de inserción completos (ISc) o defectuosos (ISd)). Usualmente están flanqueados por repetidos directos (RD). (B) en esta grafica se observa la diferencia característica del contenido de porcentaje de G+C de la PAI en relación al ADN del núcleo del genoma (tomado de Fernández *et al.*, 2004).



Las islas de patogenicidad son diversas en estructura y función, sin embargo, muchas de ellas comparten varias características comunes. A menudo, las PAI tienen un contenido de G + C y un uso de codones que difiere del resto del genoma central. Las PAI están frecuentemente flanqueadas en un lado por un gen RNAt y, a menudo, por secuencias de repetición directa (DR). Además, las PAI comúnmente poseen genes que codifican factores que están involucrados en la movilidad genética, como integrasas, transposasas, genes de fagos y orígenes de replicación. Algunas de las características de las PAI y ejemplos específicos son los siguientes:

**Genes de virulencia:** Las diferentes funciones que codifican las PAI dependen en gran medida del contexto ambiental en el que vive la bacteria. El repertorio genético encontrado dentro de las PAI puede dividirse funcionalmente en varios grupos. Los grupos más comunes son: (i) Factores de adherencia, como el pili relacionado con las fimbrias P, S, el pili corregulado por toxina *Vibrio cholerae* (TCP) y la intimina. Estos componentes permiten que las bacterias se adhieran a las superficies del huésped y faciliten el proceso de infección. (ii) Sideróforos como la yersiniabactina o la aerobactina utilizadas para suministrar el elemento esencial hierro, apenas soluble bajo *pH* aeróbico o neutrocondiciones, en células microbianas. (iii) Exotoxinas como la  $\alpha$ -hemolisina y las enterotoxinas, que destruyen o afectan la función de las células eucariotas. (iv) Genes de invasión que median la entrada bacteriana en células eucariotas como los genes *inv* de *Salmonella* spp. (v) Sistemas de secreción de tipo III y IV (Type Three Secretion Systems, TTSS), el sistema TTSS, tiene forma de una inyección molecular, que inocula la proteína efectora directamente al citoplasma de la célula hospedera a través de las membranas celulares bacterianas y eucariotas. Los sistemas de secreción de tipo III (T3SS) se pueden encontrar en los PAI de muchos patógenos, incluida *Salmonella* [isla de patogenicidad (SPI) 1] y SPI 2, *Shigella*, *Yersinia*, *Citrobacter* y en diferentes especies de *E. coli*. Los ejemplos de PAI que albergan sistemas de secreción de tipo IV (T4SS) incluyen *Agrobacterium tumefaciens*, *Legionella pneumophila*, *Helicobacter pylori*, *Bordetella pertussis*, *Bartonella* spp. y *Brucella* spp (Hueck, 1998).

**Genes de movilidad funcional:** Las PAIs a menudo portan genes de movilidad crípticos o funcionales, como los genes de integrasa tipo fago, denominados *int* o genes para transposasas. La región asociada a virulencia (*vap*) contiene un marco de lectura abierto (ORF) con un alto nivel de similitud de secuencia con la integrasa de un fago de *E. coli* (Cheetham y Katz, 1995). Otras PAIs contienen genes que son similares a los genes resolvase de la integrasa de fagos y los transposones. Estos productos génicos están involucrados en la inserción de las regiones de ADN por recombinación entre DR flanqueantes, elementos IS o entre regiones de secuencias homólogas. Por lo tanto, un subconjunto de PAI de algunos patógenos como *H. pylori*, *Yersinia* spp. y UPEC son genéticamente inestables y pueden eliminarse espontáneamente (Fetherston *et al.*, 1992; Hacker *et al.*, 1997). Por el contrario, las PAI de *Salmonella* e intestinales de *E. coli* parecen estar permanentemente integradas en el cromosoma (Blum *et al.*, 1994).

Las secuencias de inserción son pequeños elementos genéticos móviles, capaces de transponerse dentro y entre genomas procariontes. IS proporciona sitios de repeticiones

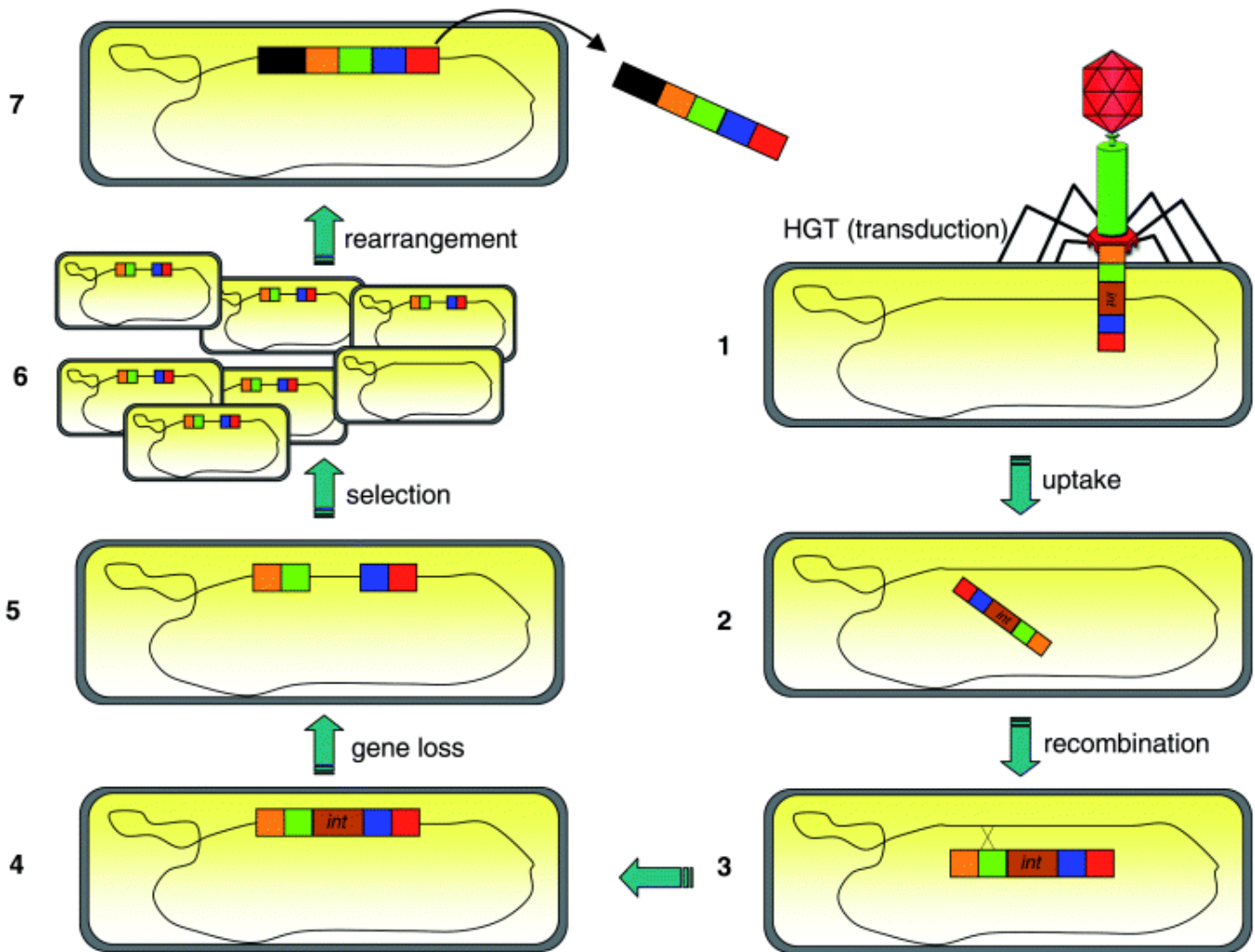
invertidas, en los que puede producirse una recombinación homóloga, y por lo tanto puede mediar la incorporación de elementos genéticos móviles en el cromosoma, lo que resulta en PAI, pero también puede contribuir a la inestabilidad de PAI ( Hacker *et al.*, 1997 ).

### **2.11. Adquisición de las islas de patogenicidad**

La adquisición de PAI no solo es un evento evolutivo antiguo que condujo a la aparición de patógenos bacterianos en una escala de tiempo de millones de años, sino que también puede representar un mecanismo que contribuye a la aparición de nuevos patógenos dentro de la vida humana (Schmidt & Hensel, 2004). Las islas de patogenicidad son adquiridas mediante la transferencia horizontal de genes por bacteriófagos, plásmidos o transposones (Ejrnaes *et al.*, 2011). La transferencia horizontal de genes (HGT, por sus siglas en inglés) consiste en la transmisión del genoma o parte de éste de un organismo a otro que no forma parte de su descendencia.

La transferencia horizontal de genes entre diferentes especies y géneros de bacterias en ambientes naturales es muy común. Existen tres mecanismos de transferencia: transformación, transducción y conjugación. El mecanismo de transducción consiste en el intercambio de genes entre dos bacterias mediante un bacteriófago. La transferencia por transformación es el proceso mediante el cual las bacterias captan DNA desnudo (Wolska, 2003). Aunque este mecanismo juega un papel importante en el ambiente no es tan común como la conjugación. La conjugación es la más extensa y la que más contribuye al *pool* de transferencia horizontal en procariontes (Llosa & De la Cruz, 2005), y consiste en la transferencia de material genético por contacto célula-célula de una bacteria donante a una receptora mediante una maquinaria de conjugación que usualmente está codificada a nivel plasmídico (Panicker *et al.*, 1985).

De acuerdo al modelo de Hacker y Carniel en el 2001, se puede imaginar cinco pasos que conducen a la formación de las islas de patogenicidad (PAI) (fig. 9):



**Figura 9.** Diferentes etapas en la evolución de una PAI. Un elemento genético es adquirido por una célula bacteriana, a través de una transferencia horizontal de genes (transducción en este caso) a partir de un grupo genético ambiental flexible (1). Después de una captación exitosa (2), recombinación que está mediada por una integrasa (*int*) u otros mecanismos (3) dan como resultado la integración del elemento adquirido en el cromosoma (4). La pérdida de los genes que participan en la movilidad del elemento conduce a una PAI integrada de forma estable en el cromosoma (5). Si la PAI incorporada confiere una ventaja al organismo en el nicho específico, una selección positiva operará para favorecer esta variante. Posteriormente, la frecuencia de esta variante aumentará en la población con el tiempo (6). Los reordenamientos genéticos o las nuevas adquisiciones de genes conducirán a una mayor evolución de la PAI. Ahora la PAI modificada puede recombinarse con el conjunto de genes disponibles en el medio ambiente y transferirse adicionalmente a un nuevo microorganismo receptor (7) (Tomado de Hsiao *et al.*, 2005).

l) La adquisición de genes de virulencia (a menudo como un operón) por transferencia horizontal de genes utilizando uno de los tres mecanismos existentes. La fuente de los genes adquiridos es un conjunto diverso de genes flexibles, disponibles en el medio ambiente.

II) Después de la captación exitosa de un elemento genético extraño, se lleva a cabo una integración en el cromosoma (o en un plásmido ya existente), mediante recombinación específica del sitio u otros mecanismos (Ott, 1993), y la integración de la PAI se produce de manera similar. El evento de integración es, probablemente, mediado por una integrasa o recombinasa. De este modo, los fragmentos de ADN de diferentes tamaños pueden encontrar su camino en un nuevo hospedero e incorporarse o recombinarse en el genoma central creando nuevas estructuras de islas genéticas distintas.

III) Posteriormente, un elemento genético móvil podría convertirse en una PAI por reordenamientos genéticos, pérdida de genes o adquisición adicional de otros elementos genéticos. Las PAI pueden quedar inmovilizadas debido a la inactivación o eliminación de los orígenes de una replicación de plásmidos (*ori*) o de genes que participan en la movilización y auto transferencia de plásmidos (*tra*, *mob*) o bacteriófagos (*int*). La "compensación" de este proceso es una asociación estable y una herencia con el cromosoma del hospedero (Hsiao *et al.*, 2005).

IV. Bajo ciertas circunstancias, los genes asimilados recién adquiridos podrían expresarse con éxito. Si esta expresión contribuye a la aptitud inclusiva de la bacteria (por ejemplo, aumento de la patogenicidad o transmisión al nuevo hospedero); Una selección positiva favorecerá estas variantes. Este tipo de selección natural da como resultado una expansión clonal y conducirá al aumento de la frecuencia de las variantes que albergan los genes beneficiosos en la población a lo largo del tiempo. En esta etapa, también se espera que evolucione una regulación distinta de los genes de virulencia. La regulación apropiada, que puede incluir reguladores recién codificados con PAI o ya existentes, proporcionará una expresión precisa que se combinará con otras funciones de virulencia del patógeno (Hsiao *et al.*, 2005).

V. Las PAI pueden evolucionar aún más por eventos consecutivos de recombinación, inserción o escisión que resultan en ganancias o pérdidas de información genética. De esta manera, las características de los elementos genéticos móviles también podrían recuperarse, lo que da como resultado la escisión cromosómica de toda la isla y permite su transferencia a otro receptor (Hsiao *et al.*, 2005).

## **2.12. El papel de las islas de patogenicidad en la evolución de *Escherichia coli***

La mayoría de las cepas de *E. coli* no son patógenas, sin embargo, un cierto número de cepas patógenas pueden causar un amplio rango de enfermedades, que van desde infecciones del tracto urinario, diarrea y síndrome urémico, hasta el shock séptico, meningitis y neumonía. En la mayoría de los casos, una cepa de *E. coli* en particular está asociada a una sola enfermedad. Se ha postulado que esto refleja la vía por la cual *E. coli* ha evolucionado y que diferentes cepas han emergido en paralelo de ancestros comensales a través de la adquisición de distintos "sets" de factores de virulencia (Blum *et al.*, 1995).

Un ejemplo del efecto de las PAIs en el fenotipo virulento de *E. coli* son las PAI-I y PAI-II de las cepas que causan infecciones de tracto urinario. Ambas PAIs codifican hemolisinas, mientras la PAI-II también contiene los genes para fimbria tipo Prf, necesaria para la adherencia a las células epiteliales (Blum *et al.*, 1994). Si estas PAIs se pierden del cromosoma, las cepas resultantes son incapaces de producir infecciones urinarias. Además

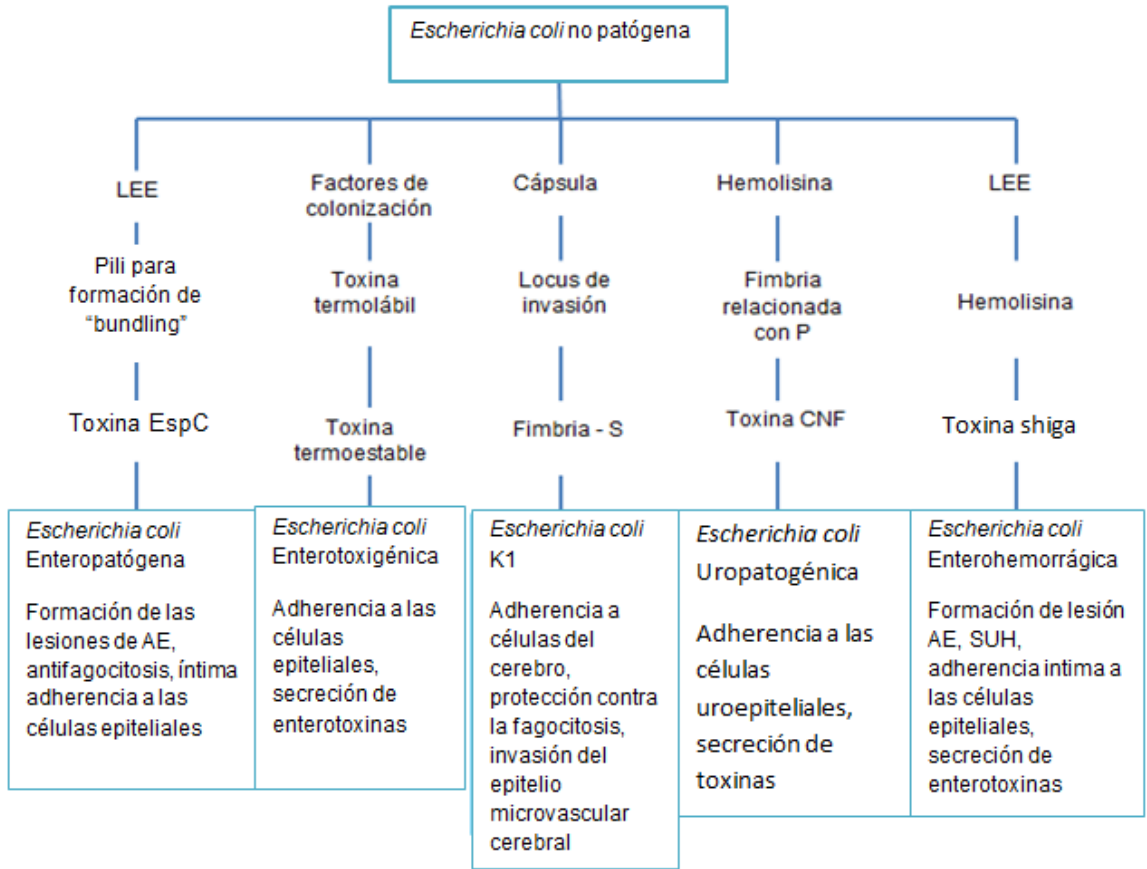
se ha demostrado que el determinante de la cápsula en la cepa 536 de *E. coli* Uropatógena (O6:k15:H31) está codificado en una PAI, designada PAI V536, la cual no se encuentra en el genoma de la *E. coli* K-12, una cepa no patógena (Schneider et al., 2004).

Las cepas patogénicas de *E. coli* que causan infecciones intestinales también han adquirido PAIs. El fenotipo compartido por las células de EPEC y EHEC es su habilidad de adherirse íntimamente a las células epiteliales e inducir la formación de lesiones de Adherencia y Borrado (Attachment/Effacement, AE), caracterizadas por la pérdida de las microvellosidades y la formación de pedestales ricos en actina, en los cuales se coloca la bacteria (Giron et al., 1991).

El fenotipo AE es dependiente de la PAI LEE (Locus of Enterocyte Effacing), la cual porta los genes que codifican para un TTSS y varias proteínas secretoras. Aunque el LEE está presente en más de una cepa patógena de *E. coli*, recientes análisis filogenéticos muestran que al menos dos linajes diferentes de *E. coli*, adquirieron el LEE en ocasiones independientes (Reid et al., 2000).

Aunque la lesión AE es de importancia para la virulencia tanto para EPEC como para EHEC, las dos variedades causan enfermedades diferentes debido a la presencia de otro elemento transmitido horizontalmente. EHEC ha adquirido un bacteriófago que codifica la toxina "Shiga", que se piensa que causa el síndrome urémico, y una hemolisina codificada en un plásmido. Se ha propuesto que el clon de EHEC O157:H7 emergió de un progenitor EPEC parecido al clon O55:H7 que ya era capaz de producir la lesión AE, el cual fue lisogenizado con el bacteriófago que contenía los genes de la toxina "Shiga" (McDaniel et al., 1995).

Cualquier cepa de *E. coli* tiene el potencial de convertirse en patógena, simplemente por la adquisición de nuevos determinantes de virulencia por transferencia horizontal, y se propone que esto ha pasado independientemente varias veces y en paralelo, resultando en una variedad de cepas con diferente potencial patogénico (figura 10).



**Figura 10.** Las cepas de *Escherichia coli* viven como comensales en el tracto gastrointestinal, y han adquirido islas genómicas que les permiten la adquisición de hierro. Se sugiere que las cepas de *E. coli* han evolucionado de forma independiente por la adquisición de PAIs que codifican para factores de virulencia apropiados para los nichos particulares. Esto ha dado como resultado un amplio rango de mecanismos de virulencia y diferentes estilos de vida patogénicos. LEE (Locus of Enterocyte Effacing), AE (Adherencia y Borrado), SUH (Síndrome Urémico Hemolítico).



### 2.13. 2.13 Islas de patogenicidad en *Escherichia coli*

En *E. coli* uropatógena se han descrito ocho islas de patogenicidad (tabla 3). Cada PAI codifica distintos factores de virulencia, aunque algunos pueden coincidir en más de una PAI. Una misma cepa de *E. coli* puede albergar diversas PAI.

Cepas de <i>E. coli</i>	PAI	Factores de virulencia que codifica	Referencia
536	PAI I	$\alpha$ -hemolisina, fimbrias tipo F17, fimbrias tipo CS12	Dobrindt et al. 2002
	PAI II	Adhesina Hek, fimbrias relacionadas con P, $\alpha$ -hemolisina, adhesina tipo hemaglutinina	Dobrindt et al. 2002
	PAI III	Fimbria S, salmochelin, receptor de hemo similar a HmuR, toxina Sat, proteasa de hemoglobina similar a Tsh, antígeno 43	Dobrindt et al. 2002
	PAI IV	Sistema sideróforo yersiniabactina	Dobrindt et al. 2002
CFT 073	PAI I	fimbria P, proteínas reguladas por hierro	Rasko et al., 2001
J96	PAI II	Fimbria P, genes reguladores de hierro	Rasko et al., 2001
	PAI I	$\alpha$ -hemolisina, fimbria P	Bidé et al. 2005
	PAI II	$\alpha$ -hemolisina, Prs fimbriae, citotóxico, factor necrotizante	Bidé et al. 2005

**Tabla 3.** Las islas de patogenicidad y las funciones codificadas.

La PAI I536 está asociada con el gen de codificación de ARNt *seI/C*. Esta isla tiene un tamaño de 76.843 pb, está flanqueada por repeticiones directas de 16 pb y tiene un contenido de G + C del 46%. Contienen genes asociados a la virulencia como el grupo de genes que codifican alfa-hemolisina y dos determinantes de adhesina putativos aún no identificados (Hale et al., 1998). Las secuencias de aminoácidos junto con su organización genética indican que los supuestos ORF 15 I536a ORF 18 I536y ORF 37 I536a ORF 42 I536 representan grupos de genes que codifican para adhesinas tipo F17 y CS12, respectivamente. El producto génico codificado por el supuesto ORF 18 I536 muestra homología con la subunidad fimbrial F17a, así como con la proteína de adherencia de células uroepiteliales UcaA de *Proteus mirabilis*, lo que indica que las fimbrias que contienen esta subunidad pueden estar involucradas en infecciones del tracto urinario (Heithoff et al., 1999).

La PAI II 536 está asociado con el gen codificador de ARNt *leuX*. Esta isla tiene un tamaño de 102.200 pb, está flanqueada por repeticiones directas de 18 pb y tiene un contenido de G + C del 46%. Los factores de virulencia ya conocidos localizados en PAI II 536 son el determinante *prf* (ORF 6 II 536 a ORF 17 II 536), que codifica la adhesina fimbrial P y otro grupo de genes que codifican alfa-hemolisina (ORF 22 II 536 a ORF 25 II 536). Otros genes asociados a la virulencia putativos presentes en esta PAI son ORF 4 II 536, que codifica la adhesina Hek descrita para *E. coli* (Dobrindt et al. 2002).

La PAI III 536 está asociado con el gen que codifica RNAt *thrW*. Esta isla tiene un tamaño de 68.124 pb y tiene un contenido de G + C del 47%. Los determinantes de virulencia portados en PAI III 536 son el grupo de genes que codifican la adhesina fimbrial S *sfa* (ORF 17 III-536 a ORF 25 III 536) y el grupo de genes que codifican el sistema sideróforo *iro* (Dobrindt *et al.*, 2001).

La PAI IV 536 está asociado con el gen que codifica el ARNt *asnT*. tiene un tamaño de aproximadamente 30,2 kb y tiene un contenido de G + C del 57%. Las estructuras repetidas flanqueantes están ausentes en PAI IV 536 , que contiene el grupo de genes requerido para la biosíntesis del sistema de sideróforos yersiniabactina (Schubert *et al.*, 1999).

La PAI II J96 es una de las PAI más grandes descritas hasta la fecha (~110 kb). Contiene al menos cuatro genes u operones, incluidos los que codifican hemolisina (*hly*), factor de necrotización citotóxica (*cnf1*), fimbrias P (*pap*) con la variante adhesina alélica (*papG* clase III alelo [*papGIII*]) y aglutinina resistente al calor (*hra*) (Blum *et al.*, 1995). PAI II J96 contribuye a la virulencia de las cepas de cistitis, pielonefritis y meningitis neonatal (Swenson *et al.*, 1996).

La cepa CFT073 contiene 2 operones *pap* funcionales que pueden distinguirse por sus patrones de restricción y la movilidad electroforética de sus subunidades de PapA (Mobley *et al.*, 1993). La primera isla de patogenicidad identificada en la cepa CFT073 contiene uno de los 2 operones *pap*. La porción secuenciada de la PAI IICFT073 tiene un contenido de G+C de 48.8% y es un operón responsable de la hidrólisis y el metabolismo de la lisina (Blattner *et al.*, 1997). La prevalencia de elementos genéticos móviles entre las secuencias de PAI IICFT073 indica que la PAI puede ser genéticamente inestable, como lo son muchas PAI (Knapp *et al.*, 1986). En los dos operones de *pap* CFT073, son evidentes algunas diferencias significativas (fig.11) (Guyer *et al.*, 1998).

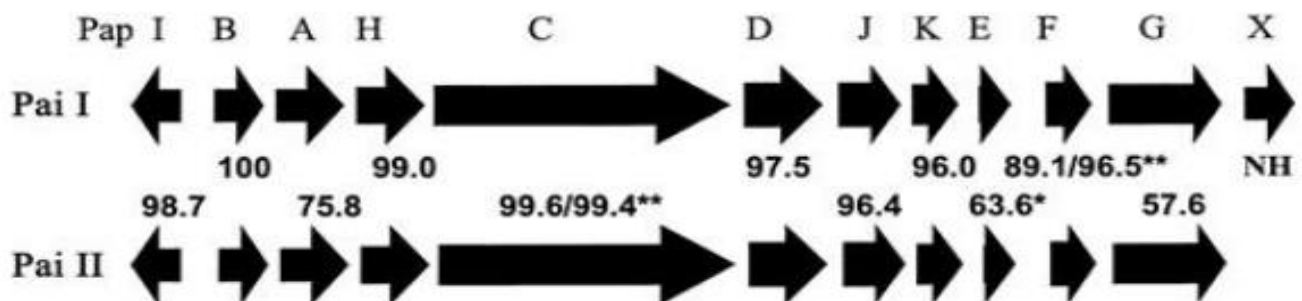


Figura 11. Comparación de operones *pap* de 2 islas de patogenicidad (PAI) de *Escherichia coli* CFT073. Los números entre los marcos de lectura abierta (ORF) indican el grado de identidad de aminoácidos. PapX se ha identificado sólo en el operón contenido en PAI I CFT073; por lo tanto, NH indica que "no se ha identificado ningún homólogo". Hay una disminución de la homología entre 2 proteínas PapA, PapE y PapG. La mutación Frameshift



es responsable de la disminución de la identidad de las proteínas PapE, mientras que PapA y PapG son alelos diferentes del gen, lo que conduce al polimorfismo. PapF y PapG también contienen mutaciones aparentes de cambio de marco que conducen a 2 ORF que son homólogas a las porciones respectivas de ORF completo. PapE tiene una mutación de cambio de marco que conduce a una disminución de la identidad. PAI II CFT073 PapC y PapF tienen un alto nivel de homología con ORF único de PAI I CFT073.

Los genes clave, *papA* y *papG* que codifican la subunidad de pilina principal y la subunidad de adhesina, respectivamente, difieren significativamente. La expresión de los diferentes tipos de subunidades de pilus por la cepa CFT073 puede proporcionar a este aislado la posibilidad de evadir la respuesta inmune o expresar un pilus con una función específica durante la infección. PapG, la subunidad adhesina, es responsable de la especificidad de unión al pilus (Stromberg et al., 1990). La proteína PapG de Pai IICFT073 es un alelo PapG II, más comúnmente asociado con aislamientos de pielonefritis, mientras que el PapG de Pai ICFT073 es un alelo PapG III, más común a los aislados de cistitis (Stromberg et al., 1990).

Otra diferencia importante entre los operones *pap* de PAI I CFT073 y PAI II CFT073 es la ausencia del gen *papX* al final del operón PAI II CFT073 *pap*. El gen *papX* tiene el mayor grado de homología con la familia Mar de reguladores transcripcionales (Del Castillo et al., 1991). CFT073 PapX es funcionalmente homólogo a MrpJ, codificado por el operón de fimbriae *Proteus mirabilis* resistente a manosa. *mirabilis* MrpJ coordina la expresión de flagelos y fimbrias durante la motilidad enjambre (Li et al., 2001).

El factor de virulencia más fácilmente identificable contenido en PAI II CFT073 es el operón responsable de la producción de fimbrias P (Mobley et al., 1993). *E. coli* contienen copias del operón *pap*, lo que sugiere que la fimbria contribuye a la colonización del tracto urinario y la supervivencia del organismo, las *E. coli* que carecen de fimbrias P no son tan eficientes como los organismos de tipo salvaje en la colonización del tracto urinario humano (Marklund et al., 1992).

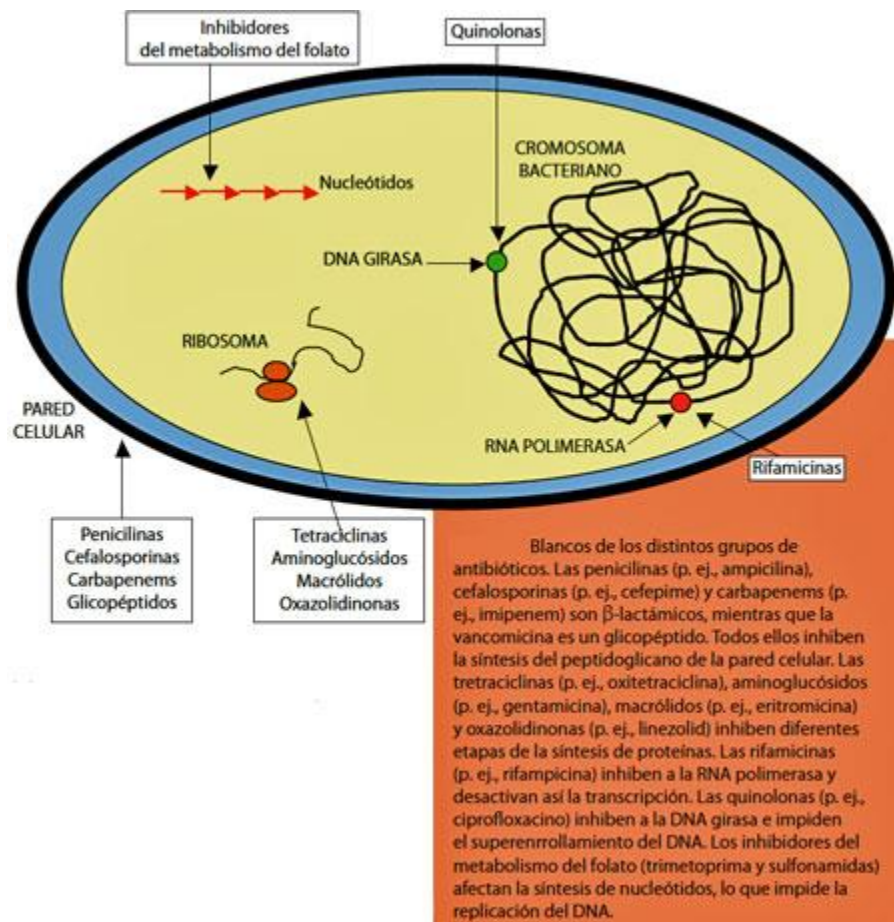
## **2.14. Resistencia bacteriana a los antibióticos**

El descubrimiento y empleo de los antibióticos fue un avance importante para salvar millones de vidas, sin embargo, desde hace años, el surgimiento de bacterias resistentes a los antibióticos es considerado un serio problema de salud (Alós, 2015), que disminuye las alternativas de tratamiento, sobre todo en infecciones ocasionadas por bacterias multirresistentes (OMS, 2017).

El incremento de la resistencia a antibióticos ha sido impulsado por un conjunto diverso de factores, incluyendo la prescripción y venta inapropiada de antibióticos, el uso de antibióticos fuera del sector salud, sobre todo, en animales en los que se ha creado la diseminación de la resistencia, y factores intrínsecos de las bacterias por mutaciones genéticas (Casellas, 2011). El uso indiscriminado de antibióticos en procesos infecciosos ha influido considerablemente

en la selección de bacterias resistentes a los antimicrobianos, al igual que el abandono de los tratamientos por algunos pacientes, la falta de vigilancia global por parte de los Comités de Infección Hospitalaria en las instituciones, abuso de antibióticos profilácticos, el aumento de pacientes oncológicos cuyos tratamientos los llevan a inmunodeficiencia y el reclamo de prescripción por parte de pacientes por falta de educación sanitaria al respecto (Marston *et al.*, 2016).

Los antibióticos pueden dividirse en dos grupos; 1) bactericidas: cuya acción es letal, llevando a la lisis bacteriana y 2) bacteriostáticos: donde las concentraciones que alcanzan en el suero o tejidos impiden el desarrollo y multiplicación bacteriana pero sin llegar a destruir las células. De hecho, cuando se retira el antibiótico, el microorganismo se puede multiplicar de nuevo. De acuerdo al mecanismo de acción se clasifican en diferentes grupos: aminoglucósidos, cefalosporinas, cloranfenicol, macrólidos, quinolonas, betalactámicos, sulfonamidas y tetraciclinas (fig. 12) (tabla 4).



**Figura 12.** Blancos bacterianos de los distintos grupos de antibióticos. Tomado de: Mendoza (2011).

Antibiótico	Mecanismo de acción	Sitio blanco
<b>Inhibición de la síntesis de proteínas</b>		
<b>Aminoglucósidos</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Estreptomina</li> <li>• Gentamicina</li> <li>• Neomicina</li> </ul>	Inhíbe la translocación	Subunidad ribosomal 30S
<b>Oxazolidinona</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Linezolid</li> </ul>	Inhíbe la traducción del mRNA	Proteínas que tienen lugar en el ribosoma
<b>Tetraciclina</b>	Inhíbe la fase de elongación	
<b>Macrólidos</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Eritromicina</li> <li>• Lincomicina</li> <li>• Clindamicina</li> </ul>	Interrupción de la actividad del centro peptidil transferasa	Subunidad ribosomal 50S
<b>Cloranfenicol</b>		
<b>Inhibición de vía metabólica</b>		
<b>Trimetoprim</b>	Inhíbe la síntesis de ácido fólico que participa en la síntesis de purinas	Enzima dihidrofolato reductasa
<b>Sulfametoxazol</b>		Enzima dihidropteroato sintasa
<b>Inhibición de síntesis de ácidos nucleicos</b>		
<b>Quinolonas</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Levofloxacino</li> <li>• Ciprofloxacino</li> <li>• Moxifloxacino</li> </ul>	Inhíbe la actividad de la DNA girasa, afectando la replicación del DNA	DNA girasa
<b>Rifamicina</b>	Impide la transcripción	RNA polimerasa
<b>Daño en la membrana plasmática</b>		
<b>Polimixina</b>	Incremento en la permeabilidad, ocasiona lisis celular	Membrana de las bacterias Gram (-)
<b>Inhibición de la síntesis de la pared celular</b>		
<b>Betalactámicos</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Monobactámicos</li> <li>• Penicilinas</li> <li>• Carbapenémicos</li> <li>• Cefalosporinas</li> </ul>	Interfiere con la actividad enzimática para la síntesis de la capa de peptidoglucano	Transpeptidasas
<b>Glucopéptidos</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Vancomicina</li> </ul>	Secuestro del sustrato para el entrecruzamiento	Peptidoglucano naciente

**Tabla 4.** Diferentes mecanismos de acción de los grupos de antibióticos sobre las bacterias.

## 2.15. Antibióticos que inhiben la síntesis de proteínas

Los ribosomas 70S bacterianos están constituidos por dos subunidades designadas como subunidad 30S y subunidad 50S. Estas subunidades constituyen el sitio de acción de agentes antimicrobianos, localizándose en ellas proteínas específicas a las cuales se unen las drogas. El ARNm dispone de un codón específico para la fijación del ARNt que porta el aminoácido formilmetionina. Ambos se unen en la subunidad 30S, y posteriormente a la subunidad 50S, y constituye el complejo de iniciación de la síntesis de proteínas. En este complejo hay 2 sitios activos, el locus A, en el que se fijan los aminoacil-ARNt, y el locus P, donde se engarza el péptido en formación y donde se ubicará el formilmetionil-ARNt que inicia la cadena peptídica. En esta fase de inicio de la síntesis actúan las oxazolidinonas y los aminoglucósidos (Calvo & Martínez, 2009).

Los aminoglucósidos (estreptomina, neomicina, kanamicina, amikacina, tobramicina, gentamicina, espectinomicina, paromomicina), son azúcares complejos obtenidos de varias especies de *Streptomyces* e interfieren con la función ribosomal bacteriana, específicamente con la subunidad 30S, donde se unen a diferentes proteínas S y al ARN 16S. Bloquean la actividad normal del complejo de iniciación, impiden el inicio de la síntesis y provocan también una lectura errónea del ARNm (Calvo & Martínez, 2009).

Los aminoglucósidos tienen un efecto bactericida dependiente de su concentración y poseen un importante efecto postantibiótico, es decir que una breve exposición de la bacteria a estos compuestos induce una supresión de su crecimiento, aun cuando el antimicrobiano no alcance ya concentraciones que inhiban o maten al microorganismo. Son activos frente a un amplio número de especies bacterianas, especialmente frente a microorganismos Gramnegativos aerobios (Lacy *et al.*, 1998).

Las tetraciclinas constituyen una familia de productos naturales (clortetraciclina, oxitetraciclina, tetraciclina, demeclociclina) y semisintéticos (metaciclina, doxiciclina, minociclina, limeciclina, rolitetraciclina, tigeciclina, PTK 7906) derivados de diferentes especies de *Streptomyces* spp. Actúan inhibiendo la síntesis de las proteínas bacterianas mediante la unión a la subunidad ribosomal 30S de las bacterias y causan bloqueo del RNAt con la consecuente liberación de cadenas incompletas. Son agentes básicamente bacteriostáticos, con actividad frente a una gran variedad de microorganismos, por lo que se convirtieron en antibióticos de uso habitual tanto en seres humanos como en animales, y también se utilizaron en algunas áreas de la agricultura (Chopra & Roberts, 2001).

Tres clases importantes de antibióticos actúan en la subunidad ribosomal 50S: cloranfenicol, macrólidos y lincinoides (lincomicina, clindamicina). El cloranfenicol es un agente bacteriostático que actúa contra organismos Grampositivos y Gramnegativos inhibiendo la formación de uniones peptídicas al bloquear la enzima peptidil transferasa. Los macrólidos (eritromicina, oleandomicina), son compuestos con grandes anillos de lactona y al unirse a la subunidad 50S interfieren con la actividad de la peptidil transferasa, con la translocación o con ambas funciones. El más importante es la eritromicina que actúa sobre bacterias

Grampositivas y algunas Gramnegativas como *Haemophilus*, *Chlamydia* y *Legionella*, inhibe la formación de cadenas nuevas del péptido y es bacteriostático (Molina, 2015).

Las oxazolidinonas inhiben la síntesis proteica e impiden la formación del complejo de iniciación 70S, formado por formilmetionil-ARNt, ARNm, diversas proteínas y las subunidades ribosómicas 30S y 50S. El linezolid se fija a la subunidad ribosómica 50S, en el centro peptidiltransferasa dentro del ARN ribosómico 23S, distorsiona así el punto de unión del formilmetionil-ARNt y evita la formación del complejo de iniciación. El linezolid es bacteriostático frente a bacterias Gram positivas (incluidas cepas multirresistentes de *S. aureus* y *Enterococcus* spp.) y carece de actividad frente a la totalidad de las bacterias Gram negativas (Molina, 2015).

## **2.16. Antibióticos que inhiben la vía metabólica**

Para la obtención de las bases púricas y pirimidícas de los nucleótidos, se requiere la síntesis de folatos, que algunas bacterias son incapaces de obtener del medio. La síntesis de ácido tetrahidrofólico se obtiene a partir de una molécula de pteridina y de ácido paraaminobenzoico (PABA), y mediante la enzima dihidropteroatosintetasa se forma el ácido dihidropteroico. Posteriormente, por adición de ácido glutámico se forma el ácido dihidrofólico (ácido fólico), que reducido por la dihidrofolato reductasa forma el ácido tetrahidrofólico (ácido folínico) (Calvo & Martínez, 2009).

Las sulfamidas son análogos del ácido paraaminobenzoico, por tanto, compiten por la enzima dihidropteroatosintetasa, impidiendo así la formación de ácido dihidropteroico, precursor del ácido fólico. A diferencia de las células eucarióticas de los mamíferos (que toman el ácido fólico previamente sintetizado), las bacterias tienen que sintetizar su propio ácido fólico. Por esta razón las bacterias son más sensibles a las sulfonamidas que el hospedero. Su espectro de acción es amplio, abarca la mayoría de los microorganismos Gram positivos y muchos Gram negativos, especialmente estos últimos, pero su uso se ha limitado debido al desarrollo de resistencia (Masters *et al.*, 2003).

El trimetoprim es una 2,4-diaminopirimidina, antimetabolito de la síntesis de ácido fólico. Se emplea preferentemente en combinación fija con el sulfametoxazol, sulfadiazina y sulfamoxol. Inhibe la dihidrofolato-reductasa de bacterias y protozoos, con una sensibilidad 50.000-100.000 veces superior que la enzima de las células humanas. De este modo interfiere en la transformación de dihidrofolato en tetrahidrofolato y, secundariamente, en síntesis de ácido desoxitimidílico, resultando en una inhibición de la síntesis de DNA y proteínas bacterianas (Masters *et al.*, 2003).

### 2.17. Antibióticos que inhiben la síntesis de ácidos nucleicos

El genoma bacteriano contiene información para la síntesis de proteínas que se transmite a través del ARN mensajero producido a partir del molde de ADN (transcripción), y para la síntesis de ARN ribosómico que formará parte de los ribosomas bacterianos. La información del ADN debe duplicarse (replicación) cuando la bacteria se divide, para transmitir esta información a la descendencia. La replicación y la transcripción del ADN se realizan en varias fases con la participación de diferentes enzimas y sustratos, además del ADN molde, que constituyen dianas para la acción de diversos antibióticos. Dentro de este grupo se incluyen las rifamicinas y las quinolonas que actúan en enzimas que participan en los procesos de transcripción y replicación. La mayoría de los antibióticos que actúan sobre el ADN son bactericidas rápidos y normalmente independientes de la fase de crecimiento bacteriano (Calvo & Martínez, 2009).

Las quinolonas actúan en el ADN cromosómico bacteriano, uniéndose a algunas de las topoisomerasas e inhibiendo su acción. Las topoisomerasas son enzimas que participan en el proceso de síntesis del ADN, por desenrollamientos y enrollamientos del ADN cromosómico. En Gramnegativos la topoisomerasa que inhiben principalmente es la ADN-girasa, que tiene una subunidad A y una subunidad B. La función más importante de la ADN-girasa es mantener un nivel de enrollamiento del ADN que facilite el movimiento hacia los complejos que se forman en la replicación y la transcripción. También libera enrollamientos negativos en un proceso dependiente de ATP (Drlica & Malik, 2003). En la girasa las quinolonas interactúan con aminoácidos de las alfa-hélices cercanas a la tirosina del centro activo, que está implicado en la rotura del ADN. Un paso importante en el mecanismo de acción de las quinolonas es la formación de un complejo quinolona-enzima-ADN que contiene ADN roto. La unión de una quinolona a la ADN-girasa provoca un cambio conformacional en el complejo girasa-ADN causante de la inhibición de la enzima (Drlica & Muhammad, 2008).

Las rifamicinas Inhiben la síntesis de ARN ribosómico y mensajero al bloquear la subunidad beta de la ARN polimerasa ADN-dependiente bacteriana codificada por el gen *rpoB28*. Impide el inicio del proceso de transcripción, pero carece de efecto antimicrobiano si la transcripción ya se ha iniciado. La rifampicina, derivado semisintético de la rifamicina B, es el antibiótico representativo de este grupo y tiene actividad bactericida frente a microorganismos Gram positivos, *Neisseria* spp., *Chlamydia* spp. y *Mycobacterium* spp. (Calvo & Martínez, 2009).

## **2.18. Antibióticos que dañan la membrana plasmática**

La membrana citoplasmática es vital para todas las células, ya que interviene activamente en los procesos de difusión y transporte activo, y de esta forma controla la composición del medio interno celular. Las sustancias que alteran esta estructura modifican la permeabilidad, y provocan la salida de iones potasio, elementos esenciales para la vida bacteriana, o la entrada de otros que a altas concentraciones alteran el metabolismo bacteriano normal (Falagas & Kasiakou, 2005).

Las polimixinas aumentan la permeabilidad de la membrana externa fijando su porción catiónica (polipéptido) a la porción aniónica (lipopolisacárido) de la membrana de las bacterias Gram negativas. Esta capacidad para fijar el lipopolisacárido pudiera traducirse en un efecto protector frente al shock inducido por endotoxina (Landman *et al.*, 2008).

## **2.19. Antibióticos que inhiben la síntesis de la pared celular**

La pared celular protege la integridad anatomofisiológica de la bacteria y soporta su gran presión osmótica interna (mayor en las bacterias Gram positivas). La ausencia de esta estructura condicionaría la destrucción del microorganismo, inducida por el elevado gradiente de osmolaridad que suele existir entre el medio y el citoplasma bacteriano (Dover *et al.*, 2007).

El mecanismo de acción de los betalactámicos consiste en la inhibición de las fases finales de la síntesis del peptidoglucano, en la que intervienen activamente las proteínas fijadoras de penicilina (PBP). Las PBP tienen actividad transpeptidasa, transglucosilasa y carboxipeptidasa, por lo que pueden entrelazar los componentes del peptidoglucano (García de Lomas & Navarro, 2006).

La vancomicina actúa interfiriendo con la síntesis de la pared celular bacteriana, una estructura rígida situada por fuera de la membrana citoplásmica, esencial para la vida de la bacteria en medio hipotónico. Existe en todos los grupos bacterianos salvo en los micoplasmas y está compuesta básicamente de peptidoglucano, un polímero formado por cadenas lineales de N-acetil-D-glucosamina y de ácido N-acetil murámico. Éstas se unen entre sí a través de un péptido de glicina en las bacterias Grampositivas o bien forman directamente una malla en las bacterias Gramnegativas. La síntesis del peptidoglucano parietal es un proceso en el que intervienen varias enzimas; la vancomicina interrumpe este proceso formando un complejo con la porción D-alanina-D-alanina del péptido precursor y evita su transferencia hasta la capa de peptidoglucano en formación bloqueando las reacciones de transpeptidación. El bloqueo de la síntesis de peptidoglucano por los glucopéptidos ocurre en una fase más temprana que el debido a la acción de las penicilinas por lo que no existe resistencia cruzada entre estos antibióticos. Vancomicina también puede actuar alterando la síntesis del ARN y afectando a los protoplastos por alteración de la permeabilidad de su membrana citoplasmática (Cánovas *et al.*, 2002).

El incremento de resistencia antibiótica de *Escherichia coli* se debe a la adquisición de diferentes mecanismos moleculares de resistencia mediante mutaciones puntuales a nivel cromosómico o transferencia horizontal de material genético entre especies relacionadas o diferentes, facilitada por algunos elementos genéticos tales como los integrones.

Los mecanismos moleculares de resistencia a antibióticos más comunes en *E.coli* son la inactivación enzimática, alteraciones en el sitio blanco y alteraciones de la permeabilidad (tabla 5).

Familia de antibióticos	Mecanismos de resistencia	Genes implicados
Betalactámicos	Betalactamasas: enzimas que se caracterizan por hidrolizar el enlace amida del núcleo betalactámico, inactivando de esta manera el antibiótico	Genes que codifican betalactamasas: <i>blaTEM</i> , <i>blaSHV</i> , <i>blaCARB</i> , <i>blaOXA</i> , <i>blaCTX-M</i> y <i>blaGES</i> .
Aminoglucósidos	Mutación en el sitio de unión del ribosoma Baja penetración	<i>aac(3)-I</i> , <i>aac(3)-II</i> , <i>aac(3)-III</i> , <i>aac(3)-IV</i> y <i>aadA1</i>
Quinolonas	Mutaciones puntuales que generan el cambio de aminoácidos en la enzima blanco del antibiótico  Sistemas de expulsión  Presencia de genes plasmídicos de resistencia antibiótica	Mutaciones a nivel de <i>gyrA</i> (gen que codifica una subunidad de la ADN girasa) y <i>parC</i> (gen que codifica una subunidad de la topoisomerasa IV)  <i>AcrAB-like</i> (sistemas presente en diferentes enterobacterias).  Familia de genes <i>qnr</i> (A, B, C, D S) que codifican proteínas Qnr que impiden la Unión del antibiótico al blanco. Gen que codifica la variante <i>cr</i> de la acetiltransferasa 6' ( <i>AAC (6')-Ib-cr</i> ), capaz de acetilar fluoroquinolonas
Cloranfenicol	Inactivación enzimática por Acetilación	Gen <i>cat</i> que codifica a la enzima cloranfenicol Acetiltransferasa
Trimetoprim -Sulfametoxazol	Presencia de genes que codifican formas mutantes de la enzima blanco	Genes <i>sul1</i> y <i>sul2</i> (sulfametoxazol) y genes <i>dfr</i> (trimetoprim)

**Tabla 5.** Principales mecanismos de resistencia antibiótica estudiados en *E. coli* (tomada de Mosquito *et al.*, 2011).



## **2.20. Resistencia a antibióticos beta-lactámicos**

La hidrólisis enzimática es uno de los principales mecanismos de resistencia hacia beta-lactámicos, que es debida a la presencia de enzimas llamadas “beta-lactamasas” que se caracterizan por hidrolizar el enlace amida del núcleo beta-lactámico, inactivando de esta manera el antibiótico antes de que genere cualquier efecto (Bush & Jacoby, 2009). Dentro de las más de 890 beta-lactamasas que actualmente se han caracterizado, las familias más comunes dentro de las enterobacterias son: blaTEM, blaSHV, blaOXA-1 y blaCARB. Las dos primeras son penicilasas, inhibidas por el ácido clavulánico y que en algunos casos también tienen acción contra cefalosporinas de tercera generación. En el caso de blaOXA-1, pertenece a las penicilasas que se caracterizan por la hidrólisis de cloxacilina (oxacilina); por su parte blaCARB se caracteriza por tener penicilasas con acción hidrolítica contra carbenicilina (Lahey Clinic. 2011).

## **2.21. Resistencia a antibióticos quinolonas**

Entre los mecanismos de resistencia a estos antibióticos se encuentran las alteraciones en los blancos de quinolonas, las bombas de expulsión activa y la transferencia de genes de resistencia plasmídicos (Ruiz, 2003). En las alteraciones en los blancos de quinolonas mediante una mutación puntual, hay un cambio en el codón 83 y se codifica otro aminoácido de manera que se modifica la enzima blanco, con lo que se logra una alta resistencia a quinolonas como el ácido nalidíxico. La alta resistencia hacia fluoroquinolonas, tales como la ciprofloxacina, se relaciona con más de una mutación a nivel de *gyrA* (normalmente además de la posición 83 se afecta la posición 87) o con mutaciones además en *gyrA* a nivel de otros genes como *parC* (codones 80 u 84 de manera usual) (Ruiz, 2003). Otro tipo de mecanismos de resistencia a quinolonas es el relacionado con la transferencia de genes mediante plásmidos, como es el caso de los genes *qnr* que codifican a la familia de las proteínas Qnr (QnrA, QnrB, QnrS, QnrC y QnrD) que se unen a la ADN girasa (*gyrA* y *gyrB*) y a la topoisomerasa IV (*parC* y *parE*) disminuyendo la acción de las quinolonas.

La resistencia a fluoroquinolonas, específicamente a ciprofloxacino y norfloxacino, se ha relacionado con la variante cr de la acetiltransferasa 6' (*AAC (6')-Ibcr*), que debido a la presencia de dos cambios de aminoácidos en los codones 102 y 179, es capaz de acetilar no solo aminoglucosidos (*AAC (6')-Ib*), sino también algunas fluoroquinolonas (Cattoir & Nordmann, 2009).

## **2.22. Resistencia a trimetoprim/sulfametoxazol**

Los mecanismos de resistencia a sulfonamidas y a trimetoprim mayormente descritos son los relacionados con la adquisición de genes alterados mediante elementos móviles. En *Escherichia coli*, la resistencia a trimetoprim-sulfametoxazol a menudo se correlaciona con la presencia de genes de dihidrofolato reductasa (DHFR) y dihidropteroato sintasa (DHPS) en integrones (White *et al.*, 2001). En el caso de las sulfonamidas se han descrito los genes *sul1*, *sul2* y *sul3* relacionados con integrones y que codifican formas mutantes de la

enzima dihidropteroato sintasa que no pueden ser inhibidas por el antibiótico. Lo mismo sucede en el caso del trimetropim, se han descritos múltiples genes *dfr* que generan resistencia antibiótica. El gen *sul1* generalmente se encuentra en el integrón de clase 1 en el extremo 3', mientras que *sul2* generalmente se encuentra en plásmidos pequeños que pertenecen a la familia IncQ u otro tipo representado por pBP1 (Huovinen *et al.*, 1995).

### **2.23. Resistencia a aminoglucósidos**

La resistencia a los aminoglucosidos puede ser natural o adquirida. Una forma de resistencia natural es la que se presenta en bacterias anaerobias estrictas, ya que la entrada de los aminoglucosidos a la célula es un proceso activo que precisa oxígeno. La resistencia adquirida de una bacteria a los aminoglucósidos puede ser debida a tres mecanismos distintos: la disminución de la acumulación intracelular del antibiótico, las alteraciones de la diana y la inactivación enzimática del antibiótico por parte de enzimas modificadoras de aminoglucosidos (EMAG) (Acosta *et al.*, 2000).

La disminución de la acumulación intracelular del antibiótico puede deberse a alteraciones en la permeabilidad de la membrana a la hora de la penetración del antibiótico a la célula o a la presencia de bombas de expulsión activa (Acosta *et al.*, 2000). La disminución de la permeabilidad refleja la pérdida de componentes de la cadena respiratoria, pero este mecanismo reduce a su vez la tasa de crecimiento bacteriano y confiere sólo una resistencia de bajo nivel (Taber *et al.*, 1987).

Uno de los mecanismos de resistencia agrupa a las alteraciones en la diana del antibiótico, que pueden ser debidas a mutaciones puntuales o a metilación del RNA. Las mutaciones puntuales ribosomales no afectan a todas las bacterias por igual. La diferencia depende básicamente de las copias del operón RNA ribosomal que exista en cada especie, así *E. coli* tiene siete copias de ese operón, y la resistencia recién se manifiesta cuando más del 50% de los ribosomas están afectados (Wilson *et al.*, 1973). Existen más de 50 tipos diferentes de EMAG que se pueden agrupar en tres tipos según la reacción que catalizan: N-acetiltransferasas (*aac*) que catalizan una acetilación, transfiriendo un grupo acetato desde la acetilcoenzimaA a un grupo amino del aminoglucósido. O-fosfotransferasas (*aad*) que catalizan una fosforilación, transfiriendo un grupo fosfato desde un ATP a un grupo hidroxilo del aminoglucósido; y los O-nucleotidiltransferasas (*aph*) que catalizan una nucleotidilación, que es la transferencia de un nucleótido monofosfato desde un nucleótido trifosfato a un grupo hidroxilo del aminoglucósido (Shaw *et al.*, 1993).

### 3. ANTECEDENTES

Najafi *et al.*, (2017) realizaron un estudio con 140 cepas de *E. coli* uropatógenas (UPEC) colectadas de pacientes con infecciones del tracto urinario en Bushehr, Iran para identificar la distribución de islas de patogenicidad (PAI) y factores de virulencia asociados a los grupos filogenéticos. La presencia de PAI en las cepas de UPEC fueron evaluadas por la técnica de reacción en cadena de polimerasa (PCR) multiplex. La isla de patogenicidad más prevalente fue PAI IV536 (77.14%), mientras que las islas de patogenicidad menos frecuentes fueron PAI III536 (13.57%), PAI IJ96 (12.86%), y PAI II536 (12.14%). La PAI IJ96 no fue detectada.

Sabaté *et al.*, (2006) en Barcelona desarrollaron dos ensayos para detectar ocho islas de patogenicidad (PAI), en 50 cepas de *E. coli* comensales y 100 cepas *E. coli* uropatógenas (UPEC), que fueron aisladas de heces de mujeres sanas sin síntomas de infecciones del tracto urinario, 50 aisladas de pacientes con pielonefritis y 50 de pacientes con sepsis urinaria. En total, el 40% de las cepas de *E. coli* comensales y el 93% de las UPEC fueron portadoras de PAIs. A pesar de esta diferencia, la isla de patogenicidad más prevalente en ambos grupos fue PAI IV536 (38% comensal vs. 89% UPEC), seguido de PAI ICFT073 (26% vs. 73%), PAI IICFT073 (14% vs. 46%), PAI IJ96 (8% vs. 34%), PAI I536 (8% contra 33%) y PAI II536 (4% vs. 20%). PAI III536 se detectó solo en UPEC (2%), mientras que PAI IJ96 no se detectó en ninguna cepa.

Li *et al.*, en 2010 realizaron un estudio de grupos filogenéticos y marcadores de islas de patogenicidad (PAI) en cepas de *Escherichia coli* fecales de pacientes chinos, en donde reportaron que el 46.8% (103/220) de las cepas portaban islas de patogenicidad. Detectaron un total de 161 PAI. La PAI IV536 fue la más común (38.2%), seguida de PAI ICFT073 (20.9%), PAI IICFT073 (10.9%), PAI II536 (1.8%) y PAI I536 (1.3%), respectivamente. Mientras tanto, no se detectaron tres PAI (III536, IJ96 y IJ96).

Sáez *et al.*, (2016) caracterizaron la epidemiología, susceptibilidad antimicrobiana y virulencia de 84 cepas de *E. coli* vaginales de mujeres embarazadas de Marruecos y Mozambique. Observaron niveles bajos de resistencia microbiana para la mayoría de antibióticos (ampicilina, amoxicilina / ácido clavulánico, cefuroxima, cefotaxima, tetraciclina, gentamicina, ácido nalidíxico, ciprofloxacina, cloranfenicol) excepto para trimetoprim-sulfametoxazol con el 61% y 12% de cepas resistentes en Mozambique y Marruecos respectivamente.

Anago *et al.*, (2015) realizaron un análisis de resistencia a antibióticos en cepas de *Escherichia coli* aisladas de infecciones nosocomiales en Cotonou, Benin, que se aislaron de varias muestras biológicas, como orina, pus, torunda vaginal, esperma, sangre, líquido cefalorraquídeo y catéter.. El antibiótico más activo fue imipenem (96.4% como tasa de susceptibilidad), seguido de ceftriaxona (58.3%) y gentamicina (54.8%). Se observaron altas tasas de resistencia con amoxicilina (92.8%), ampicilina (94%) y trimetoprim / sulfametoxazol (85.7%).

Ho *et al.*, (2016) investigaron la aparición y distribución de las principales metilasas de ARN y los genes que codifican las enzimas modificadoras de aminoglucósidos (AME) en *E. coli*

resistente a aminoglucósidos. Se detectó elevada resistencia a gentamicina, amikacina y netilmicina en 98.4% (185/188), 19.7% (37/188) y 8.0% (15/188) de las cepas, respectivamente. También se encontró que 171 cepas (91%) fueron portadoras del gen de resistencia a aminoglucósidos *aac (3) –II*.

Shahbazi *et al.*, (2018) evaluaron la resistencia a los antimicrobianos en cepas UPEC y su correlación con los factores de virulencia. Fenotípicamente, el 67.5% de las cepas produjeron alguna BLEE y fueron resistentes a diferentes clases de antimicrobianos. En total, el 83.3% de las cepas acarreó genes ESBL, especialmente *bla TEM* y *bla CTX-M*, y 32.5% fue positivo para los genes de resistencia a quinolona *qnrS* y *qnrB*.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo general

Identificar la expresión de los genes de resistencia a quinolonas, aminoglucósidos, sulfametoxazol y trimetoprim en cepas de *Escherichia coli* vaginales, portadoras de las islas de patogenicidad PAI ICFT073, PAI IICFT073, PAI IJ96 y IJ96.

### 4.2. Objetivos particulares

- Determinar la frecuencia de *Escherichia coli* en un grupo de mujeres con infecciones cérvico-vaginales.
- Identificar las islas de patogenicidad: PAI ICFT073, PAI IICFT073 y PAI IJ96 en las cepas cérvico-vaginales de *Escherichia coli*.
- Determinar la expresión de los genes de resistencia a las quinolonas (*qnrA*, *qnrB* y *qnrS*) en las cepas cepas.
- Determinar la expresión del gen de resistencia a trimetoprim (*dfrA1*), sulfametoxazol (*sul1*) y aminoglucósidos [*aac (3)-I*, *aac (3)-II*, *aac (3)-III*, *aac (3)-IV* y *aadA1*] en las cepas.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Origen de las muestras

En el presente estudio se analizaron 210 cepas con características morfológicas y bioquímicas para *E. coli*, previamente aisladas de pacientes con infecciones vaginales, con un rango de edad de 18 a 89 años. Las cepas fueron aisladas durante el periodo de septiembre del 2016 a enero del 2017 de las Unidades Médicas Ambulatorias (UMAs) No. 62 y No.64 del IMSS, ubicadas en el municipio de Tlalnepantla, Estado de México.

### 5.2. Extracción del DNA

Las cepas de *Escherichia coli* fueron sembradas en el medio Muller-Hinton e incubadas a 37°C durante 24 h, posteriormente se realizó la extracción de DNA por el método de ebullición. Para lo cual, por medio de un asa de siembra estéril, se tomaron varias colonias que fueron suspendidas en tubos de rosca de 16x150 mm con 2 mL de agua desionizada estéril. Los tubos fueron agitados en un vórtex durante 20 segundos y se colocaron en baño maría (100°C) durante 20 minutos. Posteriormente, las muestras fueron colocadas en hielo (0°C) por 10 minutos y se centrifugaron a 14,000 rpm por 10 minutos. Se recuperó sólo el sobrenadante con el DNA en tubos Eppendorf estériles y fueron almacenados a -20°C hasta su utilización (Paniagua *et al.*, 2007).

### 5.3. Identificación de las cepas de *Escherichia coli*

Las cepas de *E. coli* fueron identificadas mediante la amplificación del gen 16S rRNA por PCR convencional, con los oligonucleótidos *wl-3110* (F-AGAGTTTGATCTGGCTCAG) y *wl-3111* (R-CCGTCAATTCATTTGAGTTT) (Li *et al.*, 2010; Lane *et al.*, 1985). Para cada ensayo de PCR se utilizó como control positivo la cepa *E. coli* ATCC11775. Se utilizó el equipo comercial Taq DNA Polymerase Master Mix RED que contenía 0.2 u/μL de DNA polimerasa, amortiguador de reacción con 4Mm MgCl<sub>2</sub> y 0.4 mM de dNTPs (deoxinucleótidos trifosfato). En la mezcla de reacción se agregaron 12.5 μL de Taq DNA Polymerase Master Mix RED, 1 μL de cada oligonucleótido (Integrated DNA Technologies; 10 pmol) 3 μL de DNA molde (100 ng) y 2.5 μL de agua libre de nucleasas, para un volumen final de 20 μL. Las condiciones de amplificación fueron una desnaturalización inicial a 95°C durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos con una desnaturalización por 30 segundos a 95 °C, alineamiento a 55°C por 1 minuto y extensión a 72°C por 1 minuto. Por último, la extensión se prolongó durante 5 minutos a 72°C.

### 5.4. Identificación de Islas de Patogenicidad en las cepas de *Escherichia coli* vaginales

Para detectar cuatro de las islas de patogenicidad que han sido descritas en cepas de *Escherichia coli* PAI ICFT073, PAI IICFT073, PAI IJ96 y PAI IJ96, se realizó un PCR convencional y un PCR multiplex. Con la técnica de PCR convencional se detectó sólo la PAI IICFT073; mientras que con la PCR multiplex se detectaron tres islas de patogenicidad: PAI ICFT073, PAI IJ96 y PAI IJ96. Los oligonucleótidos utilizados para identificar las islas de patogenicidad fueron los descritos en la tabla 6.

Se utilizó el equipo comercial Taq DNA Polymerase Master Mix RED que contenía 0.2 u/μL de DNA polimerasa, amortiguador de reacción con 4Mm MgCl<sub>2</sub> y 0.4 mM de dNTPs (deoxinucleótidos trifosfato). Para la mezcla de reacción del PCR convencional con un volumen final de 25 μL se agregaron 12.5 μL de Taq DNA Polymerase Master Mix RED, 1 μL de cada oligonucleótido (Integrated DNA Technologies;10 pmol) 3 μL de DNA molde (100 ng) y 7.5 μL de agua libre de nucleasas. En la mezcla de reacción del PCR multiplex con un volumen final de 25 μL se agregaron 12.5 μL de Taq DNA Polymerase Master Mix RED, 1 μL de cada oligonucleótido (Integrated DNA Technologies;10 pmol) 3 μL de DNA molde (100 ng) y 3.5 μL de agua libre de nucleasas.

PAI	Nombre del primer	Secuencia ( 5´ a 3´)	Referencia
ICFT073	RPAi	GGA CAT CCT GT ACA GCG CGC A	(Johnson <i>et al.</i> , 2000)
	RPAf	TCG CCA CCA ATC ACA GC GAA C	
IICFT073	cft073.2Ent1	ATG GAT GTT GTA TCG CGC	(Sabaté <i>et al.</i> 2006)
	cft073.2Ent2	ACG AGC ATG TGG ATC TGC	
IJ96	papGlf	TCG TGC TCA GGT CCG GAA TTT	(Johnson <i>et al.</i> , 2000)
	papGlr	TGG CAT CCC ACA TTA TCG	
IIJ96	Hlyd	GGA TCC ATG AAA ACA TGG TTA ATG GG	(Landraud <i>et al.</i> , 2003)
	Cnf	GAT ATT TTT GTT GCC ATT GGT TAC C	

**Tabla 6.** Oligonucleótidos utilizados para la detección de cuatro islas de patogenicidad en las cepas de *E. coli*.

### **5.5. Electroforesis**

Después de la amplificación del DNA para detectar *Escherichia coli* y las islas de patogenicidad PAI ICFT073, PAI IICFT073, PAI IJ96 y PAI IIJ96, se analizaron 5 μL de cada muestra en geles de agarosa al 2% teñidos con Midori Green (0.3 μL), para la conducción eléctrica se utilizó el amortiguador TBE 1X (Tris-borato) bajo las siguientes condiciones: 120 volts, 94 miliamperes durante 15 minutos. El tamaño de los amplicones se determinó a partir de la comparación con el marcador de peso molecular de 100 pb (Ladder). Los geles fueron visualizados en un transiluminador de luz ultravioleta y digitalizados con el KODAK, LOGIC 100 (fig. 13) (Paniagua *et al.*, 2007).



**Figura 13.** Los amplicones fueron visualizados en el el transiluminador y digitalizados con el KODAK, LOGIC 100,

### **5.6. Expresión de los genes de resistencia a antibióticos en cepas vaginales de *E. coli***

Para promover la expresión de los genes de resistencia a las quinolonas (*qnrB*, *qnrS*), trimetoprim (*dhfrA1*), sulfametoxazol (*sul1*) y aminoglucósidos [*aac (3)-I*, *aac (3)-II*, *aac (3)-III*, *aac(3)-IV* y *aadA1*] en cepas de *E. coli* se utilizó el método de difusión en disco de Kirby-Bauer (1996). Para lo cual, con un hisopo estéril se tomaron 5 colonias del crecimiento bacteriano en EMB (Eosina Azul de Metileno) y se inocularon en el agar Muller Hinton (MH) formando un tapiz. Con pinzas estériles se colocó un sensidisco (Bio-Rad, México) con 12 antibióticos (ampicilina, carbenicilina, cefalotina, nitrofurantoína, trimetoprim & sulfametoxazol, norfloxacin, ciprofloxacina, netilmicina, gentamicina, cefotaxima, cloranfenicol y amikacina) y se incubó a 37°C por 24 h. Las cepas se clasificaron como sensibles (S), intermedio (I) o resistentes (R) de acuerdo con los criterios del diámetro de los halos de inhibición establecidos por el fabricante (tabla 7). La cepa de *E. coli* ATCC 25922 fue utilizada como control para la reproducibilidad del método. Después de la incubación con una asa estéril se tomaron varias colonias de las bacterias multirresistentes a los antibióticos (n=11); quinolonas, trimetoprim, sulfametoxazol y aminoglucósidos y se depositaron en tubos eppendorf con 500 µL de PBS (phosphate buffer saline, solución 1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O, 1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O), posteriormente los tubos se agitaron en un vortex para homogeneizar y lavar las células bacterianas y se prepararon suspensiones con 1x10<sup>9</sup> células/mL de *E. coli* que correspondieron a una DO de 0.4 a 600 nm. Los tubos se centrifugarán a 8,000 rpm durante 2 minutos. El sobrenadante se decantó conservando sólo la pastilla para la extracción del RNA.

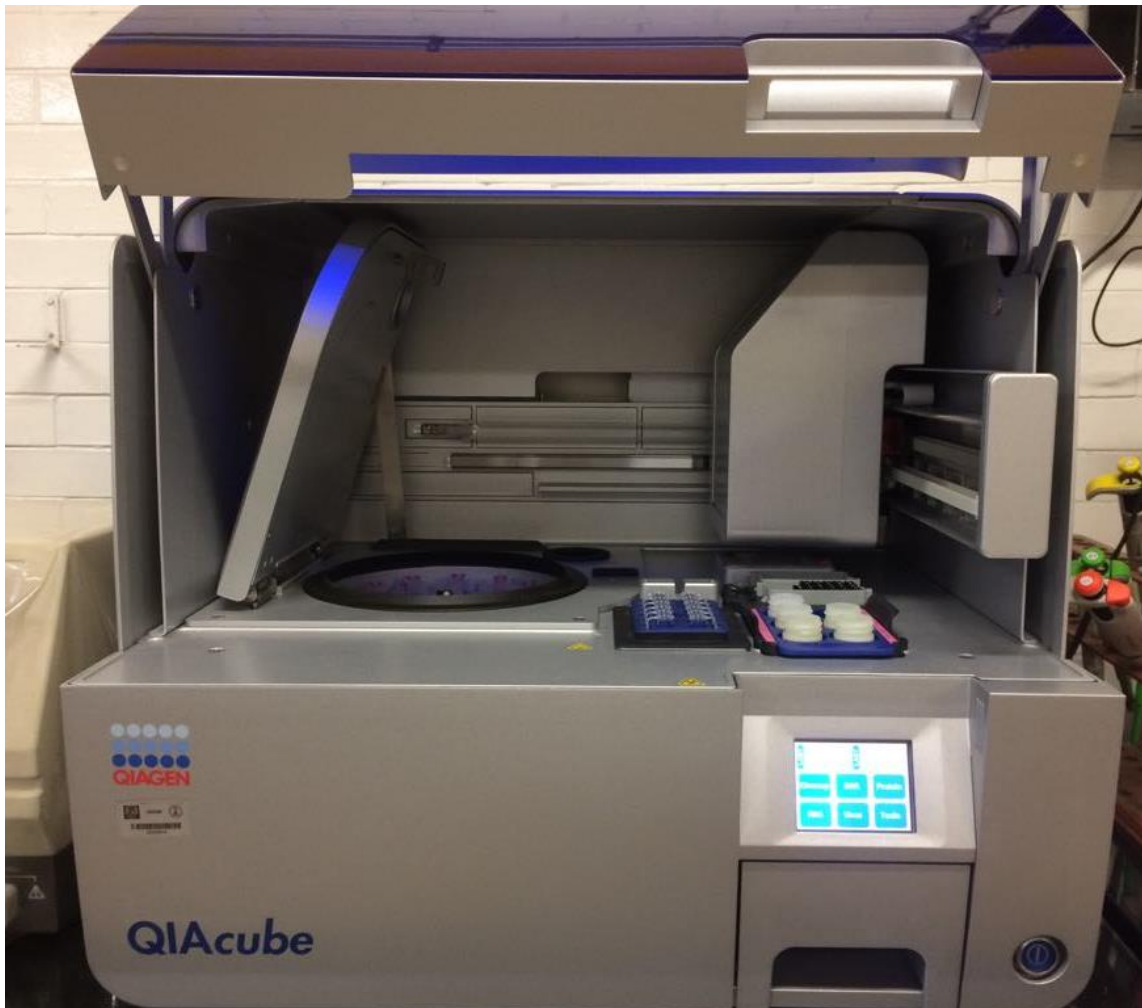


Anibiótico	Siglas	Concentración (mcg)	Resistente	Intermedio	Sensible
Ampicilina	AM	10	≤11	12-13	≥14
Carbenicilina	CB	100	≤18	19-22	≥23
Cefalotina	CF	30	≤14	15-17	≥18
Nitrofurantoina	NF	300	≤14	15-16	≥17
Trimetoprim/ Sulfameoxazol	SXT	25	≤10	11-15	≥16
Norfloxacin	NOF	10	≤12	13-16	≥17
Ciprofloxacina	CPF	5	≤15	16-20	≥21
Netilmicina	NET	30	≤12	13-14	≥15
Gentamicina	GE	10	≤12	13-14	≥15
Cefotaxima	CFX	30	≤14	15-22	≥23
Cloranfenicol	CL	30	≤12	13-17	≥18
Amikacina	AK	30	≤14	15-16	≥17

**Tabla 7.** Parámetros para la clasificación de las cepas como resistentes o sensibles a los antibióticos con base en el diámetro de los halos de inhibición.

### **5.7. Extracción de RNA de las cepas CVPEC**

La extracción del RNA bacteriano se realizó con el robot QIAcube (fig.14) y el Minikit RNeasy (Qiagen; No. del catálogo 74104). Para comenzar con la extracción del RNA se suministró al QIAcube con los reactivos y componentes necesarios; en la sección de reactivos del equipo se colocaron botellas con 25 mL de amortiguador de pH de lisis RLT que contenía tiocianato de guanidina (se le agregó un volumen de 10 $\mu$ L /mL de  $\beta$ -mercaptoethanol); RW1 (amortiguador de pH de lavado con etanol); RPE (amortiguador de pH de lavado, antes de usarse se le adicionaron 4 volúmenes de etanol al 96%); agua libre de RNasas y etanol al 96%. También se depositaron los tubos eppendorf con las pastillas bacterianas en la placa de agitación y en la posición "A" se colocó un tubo eppendorf con 2 mL de buffer TE (10Mm Tris-HCL, 1mM EDTA, pH 8) con 1 $\mu$ L /mL de lisozima. El contenedor se rellenó con puntas de 1mL y los contenedores de plástico con los tubos de columna y elución se depositaron en el interior de la centrifuga en la posición correcta. Finalmente se seleccionó el protocolo para la extracción de RNA con lisis celular.



**Figura 14.** Equipo robotizado QIAcube

El QIAcube realizó primero la lisis enzimática, para lo cual adicionó 100  $\mu\text{L}$  de buffer TE a cada tubo con la pastilla bacteriana y los incubó en agitación a 25°C por 5 minutos. Posteriormente agrego 350  $\mu\text{L}$  del buffer RLT y los agito vigorosamente. Este buffer es altamente desnaturizante y contiene tiocianato de guanidina, lo que inactivó inmediatamente las RNasas. Finalmente el equipo agregó 350  $\mu\text{L}$  de etanol al 95% y mezcló suavemente. El etanol creó las condiciones adecuadas para promover la unión selectiva del RNA a la membrana de sílica.

Posteriormente para llevar a cabo la purificación del RNA total 700  $\mu\text{L}$  del lisado bacteriano fueron transferidos a una columna contenida en un tubo de 2 mL, centrifugó los tubos a 10 000 xg, lo decantó y conservó sólo la pastilla, en este paso se dió la unión del RNA a la membrana de sílica. Al terminar agregó 700  $\mu\text{L}$  del buffer de lavado RW1 a la columna y centrifugó a 10 000 xg durante 15 segundos, el líquido de flujo que contenía biomoléculas que no son afines a la membrana de sílica como proteínas, lípidos y carbohidratos fue desechado.

Se adicionaron 500  $\mu\text{L}$  del amortiguador de lavado RPE a los tubos con las columnas para la eliminación de los restos de sal, y centrifugó a 10 000 xg por 15 segundos, se descartó el líquido de flujo, y nuevamente centrifugó los tubos de columna a 10 000 xg durante 2 minutos, y desechó el líquido de flujo. Al término el equipo depositó la columna en un tubo colector de 2 mL nuevo y centrifugó a máxima velocidad durante 1 minuto para obtener el RNA. La pureza y concentración del RNA se midió utilizando el espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). Inmediatamente se realizó la reversotranscripción a cDNA, debido a que el RNA es muy inestable.

### **5.8. Reversotranscripción**

El proceso de la reversotranscripción de RNA a cDNA se llevó a cabo con el kit comercial QuantiTec Reverse transcription (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante, este incluyó la eliminación del DNA genómico. Para la eliminación del DNA genómico, los reactivos del equipo fueron descongelados a temperatura ambiente (15-25°C). Para la mezcla de reacción se agregaron 2  $\mu\text{L}$  (gDNA Wipeout buffer 7X) a un tubo eppendorf de 0.2 mL, 5  $\mu\text{L}$  de RNA templado (5  $\mu\text{g}$ ) y 7 $\mu\text{L}$  de agua libre de RNasa. Para obtener una mezcla de reacción con un volumen final de 14  $\mu\text{L}$ . Los tubos fueron incubados a 42°C por 2 minutos e inmediatamente se colocaron en hielo.

Una vez eliminado el DNA genómico, para la reversotranscripción se preparó una mezcla de reacción con todos los componentes necesarios para la síntesis de la primera cadena de cDNA. Para un volumen final de 20  $\mu\text{L}$  se agregaron los componentes descritos en la tabla 8 en un tubo eppendorf de 0.2 mL.

Componente	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
Quantiscrip Reverse TTranscritasa (contiene inhibidor de RNasa)	1
Quantiscrip RT buffer (incluye Mg 2+ y dNTPs)	4
RT primer mix	1
RNA templado (obtenido de la reacción anterior)	14

**Tabla 8.** preparación de la mezcla de reacción para la reversotranscripción.

Después de homogeneizar el contenido de los tubos, se colocaron en hielo hasta que fueron incubados a 42°C por 15 minutos. Para inactivar la transcriptasa reversa, los tubos fueron incubados a 95°C durante 3 minutos. La concentración de cDNA fue medida con el espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). El cDNA fue almacenado a -20°C hasta su utilización para PCR en tiempo real.

### **5.9. Determinación de la expresión de los genes de resistencia a los antibióticos en las cepas de *E. coli* por PCR en tiempo real**

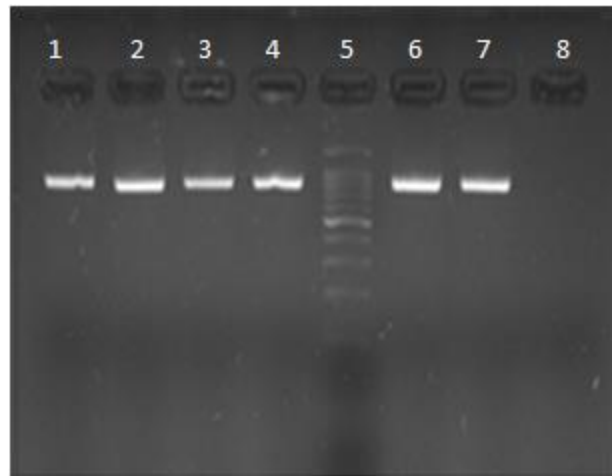
Los oligonucleótidos utilizados para identificar los genes de resistencia a las quinolonas (*qnrB*, *qnrB*, *qnr*), trimetoprim (*dfrA1*), sulfametoxazol (*sul1*) y aminoglucósidos [*aac (3)-I*, *aac (3)-II*, *aac (3)-III*, *aac (3)-IV* y *aadA1*] fueron los que se muestran en la tabla 9. Para determinar la expresión de los diferentes genes de resistencia a antibióticos se utilizó el equipo de PCR en Tiempo Real Corbette® (Rotor Gene) utilizando el KIT SYBRGREEN (Qiagen). Para un volumen final de 13.5 µL de la mezcla de reacción, se agregaron 6.25 µL de Taq DNA Polymerase Master Mix Red, 1 µL de cada par de oligonucleótido, 1 µL de DNA molde y 4.25 µL de agua libre de RNAsas. Las condiciones de amplificación fueron desnaturalización inicial de 95°C por 15 minutos, y 40 ciclos de; desnaturalización a 95°C por 20 segundos, alineamiento 55°C por 30 segundos y extensión de 72°C por 30 segundos. En cada corrida de PCR en Tiempo Real se utilizaron los genes *RPO* y *ARCA* como controles internos (house keeping) y se incluyó una curva de calibración del control positivo (cDNA de cepas portadoras de cada gen) y un NTC (control sin DNA molde). La curva de calibración se preparó con diluciones seriadas de 100, 200 y 300 ng, además se obtuvo la melting point (punto de fusión) en cada ensayo. El equipo de PCR en tiempo real determinó el número de copias del DNAC para que la señal alcanzara un nivel de fluorescencia llamado threshold cycle o “ciclo umbral” el cual fue determinado automáticamente por el software del equipo.

Antibiótico	Gen	Secuencia 5'- 3'	Tamaño (pb)	Referencia
Quinolonas	<i>qnrA</i>	(F)ATTTCTCACGCCAGGATTTG (R)GATCGGCAAAGGTTAGGTCA	516	Wang <i>et al.</i> , 2009
	<i>qnrB</i>	(F)GATCGTGAAAGCCAGAAAGG (R)ACGATGCCTGGTAGTTGTCC	469	
	<i>qnrS</i>	(F)ACGACATTTCGTCAACTGCAA (R)TAAATTGGCACCCCTGTAGGC	417	
Aminoglucósidos	<i>aac(3)-I</i>	(F)ACCTACTCCCAACATCAGCC (R)ATATAGATCTCACTACGCGC	169	Van <i>et al.</i> , 2008
	<i>aac(3)-II</i>	(F)ACTGTGATGGGATACGCGTC (R)CTCCGTCAGCGTTTCAGCTA	237	
	<i>aac(3)-III</i>	(F)ACAAGAACGTGGTCCGCTA (R)ACAGGTAAGCATCCGCATC	185	
	<i>aac(3)-IV</i>	(F)TTCAGGATGGCAAGTTGGT (R)TCATCTCGTTCTCCGCTCAT	286	
	<i>aadA1</i>	(F)TATCCAGCTAAGCGCGAACT (R)ATTTGCCGACTACCTTGGTc	447	
Trimetoprim	<i>dfrA1</i>	(F)GGAGTGCCAAAGGTGAACAG C (R)GAGGCGAAGTCTTGGGTAAA AA	367	Toro <i>et al.</i> , 2005
sulfametoxazol	<i>sul1</i>	(F)TTCGGCATTCTGAATCTCAC (R)ATGATCTAACCCTCGGTCTC	822	Van <i>et al.</i> , 2008

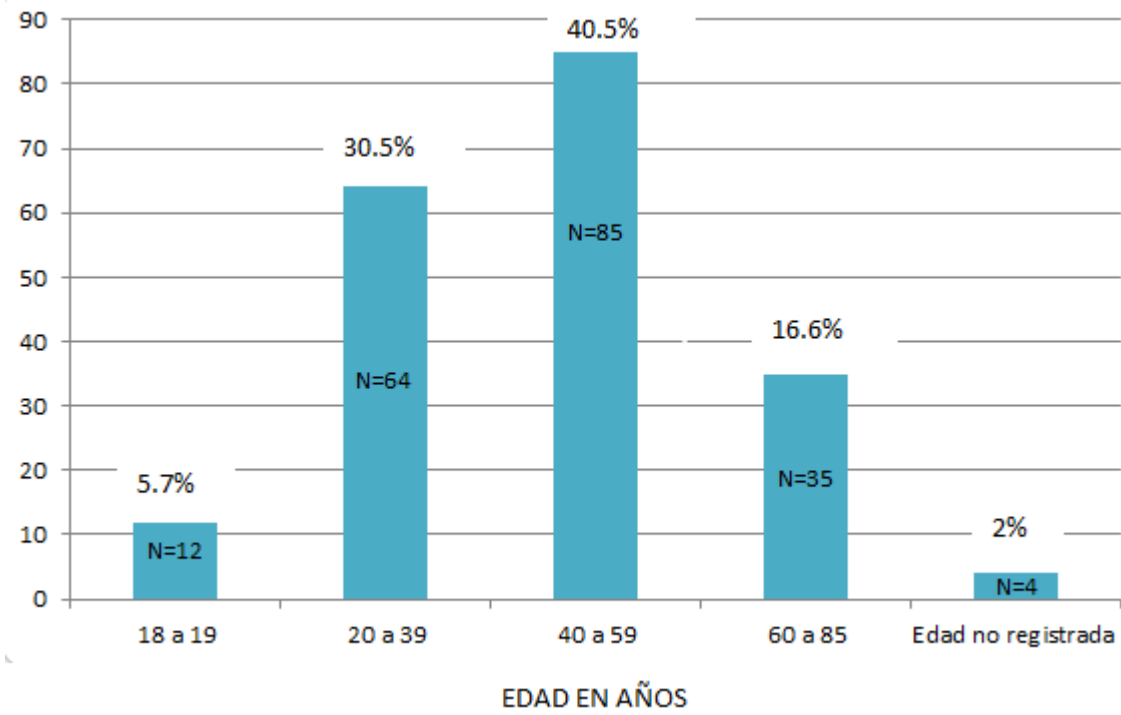
**Tabla 9.** Oligonucleótidos utilizados para la detección de genes de resistencia a los antibióticos en las cepas de *E. coli*.

## 6. RESULTADOS

*Escherichia coli* fue identificada por PCR convencional en el 95.2% (n=200) (fig 15) de las pacientes con infección cérvico-vaginal atendidas en las Unidades de Medicina Familiar (UMF) No. 62 y No.64; se encontró que el rango de edad entre 40 y 59 años fue el más recurrente en infecciones cérvico-vaginales con un (40.5%), seguido por el de 20 a 39 años (30.5 %), en el 2% (n=4) de las pacientes restantes no se registro la edad (fig.16).



**Figura 15.** Identificación de *E. coli* mediante amplificación del gen 16sRNA. Carriles 1-3 y 6,7 cepas positivas (amplicón de 919 pb); carril 4, control positivo (*E. coli* ATCC 25922); carril 5, MWM (100 pb); carril 8, control negativo (sin DNA molde).



**Figura 16.** Recurrencia de infecciones cérvico-vaginales de las pacientes por rango de edad.

### 6.1. Islas de patogenicidad

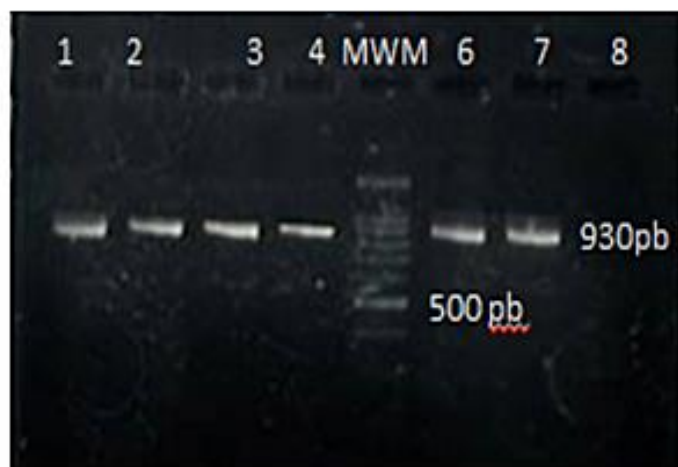
Se encontró que el 48.5% (n=81) de las cepas de CVPEC presentó al menos una de las PAIs estudiadas. Las PAIs más frecuentes entre las cepas de *Escherichia coli* cervico-vaginal fueron PAI ICFT073 (39.5%), seguida por PAI IICFT073 (9%) (Tabla 10, fig. 17), mientras que las islas PAI IJ96 y PAI IIJ96 no fueron detectadas en las cepas estudiadas. El tamaño de las islas de patogenicidad fue determinado a partir de la comparación con el marcador de peso molecular de 100 pb. El 10% de las cepas (n=8) presentó la combinación simultánea de PAI ICFT073 y PAI IICFT073.

PAI	Número de cepas	Porcentaje
ICFT073	79	39.5
IICFT073	18	9
IJ96	0	0
IIJ96	0	0
Asociación de PAIs		
ICFT073 / IICFT073	<u>7</u>	3.5

**Tabla 10.** Porcentaje de islas de patogenicidad en cepas de *E. coli* cérvico-vaginales



(A)



(B)

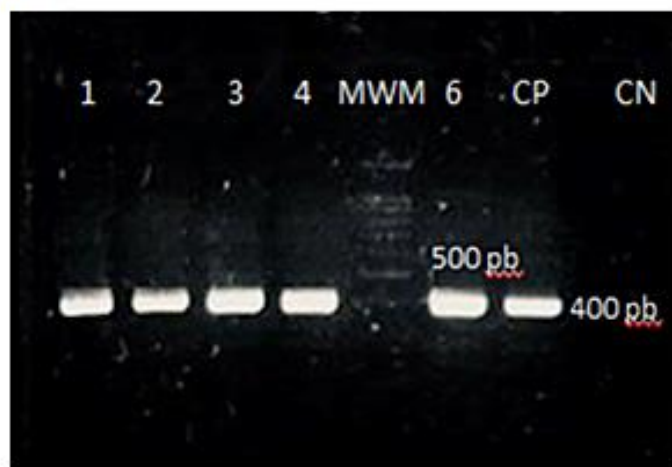
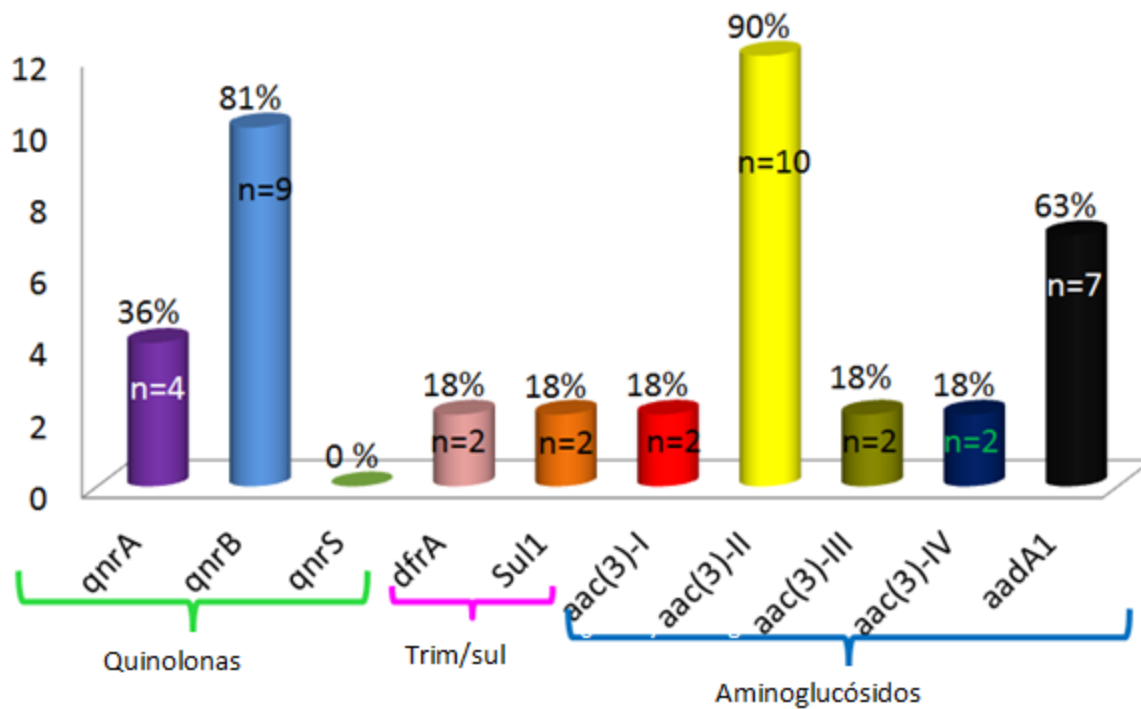


Figura 17. Detección por PCR convencional de las islas de patogenicidad en cepas de *E. coli* cérvico-vaginal. (A) PAI ICFT073 (930 pb) y (B) PAI IICFT073 (400 pb). Línea 1-4 y 6, cepas positivas. Línea 5 MWM (100 pb). Línea 7, control positivo (cepa de *E. coli* del cepario del lab. clín. portadora de las PAIs). Línea 8, control negativo (sin DNA molde).

## **6.2. Detección de la expresión de genes de resistencia a los antibióticos en las cepas de CVPEC**

Se estableció la frecuencia de expresión de 10 genes de resistencia a los antibióticos: quinolonas (*qnrB*, *qnrB*, *qnrS*), trimetoprim (*dfrA1*), sulfametoxazol (*sul1*) y aminoglucósidos [*aac (3)-I*, *aac (3)-II*, *aac (3)-III*, *aac (3)-IV* y *aadA1*] en cepas de *E. coli* cérvico-vaginales. El gen de resistencia a los antibióticos expresado más frecuentemente fue *aac (3)-II* (gentamicina) con el 90% (n=10), seguido por *qnrB* (quinolonas) con el 81% (n=9) y *aadA1* con el 63% (n=7) (fig.18, 19). Algunos genes de resistencia a los antibióticos presentaron cierto patron de asociación en su expresión (tabla 11).

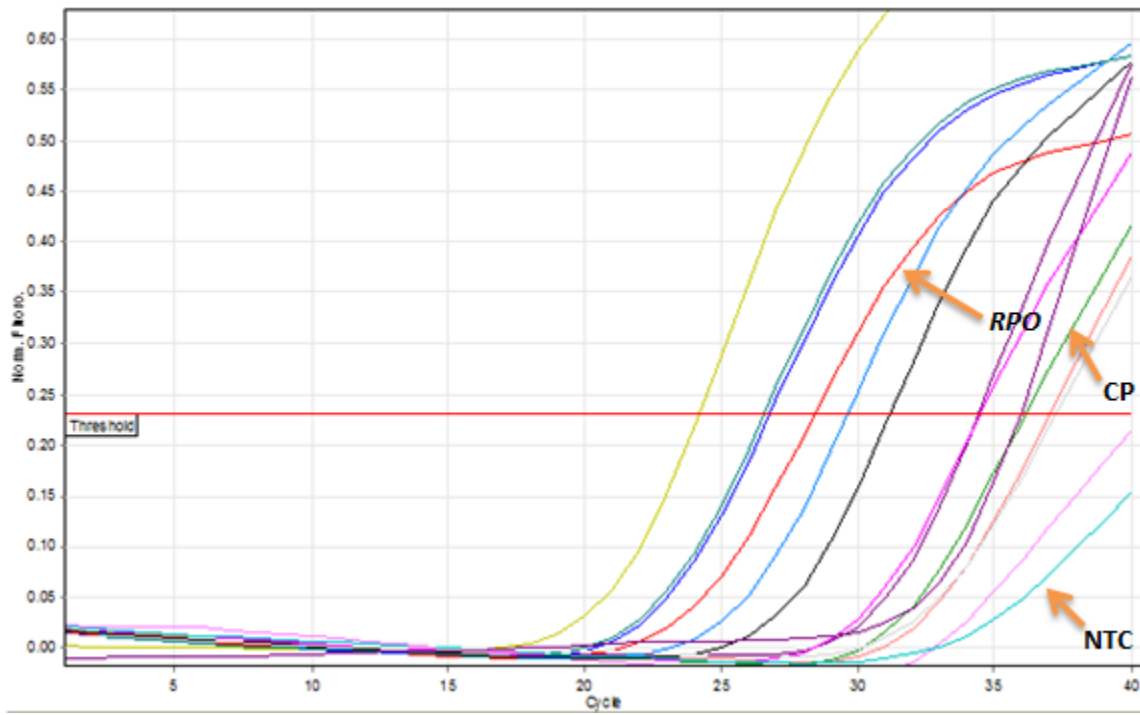


**Figura 18.** Expresión de genes de resistencia a antibióticos en las cepas de *E. coli*.

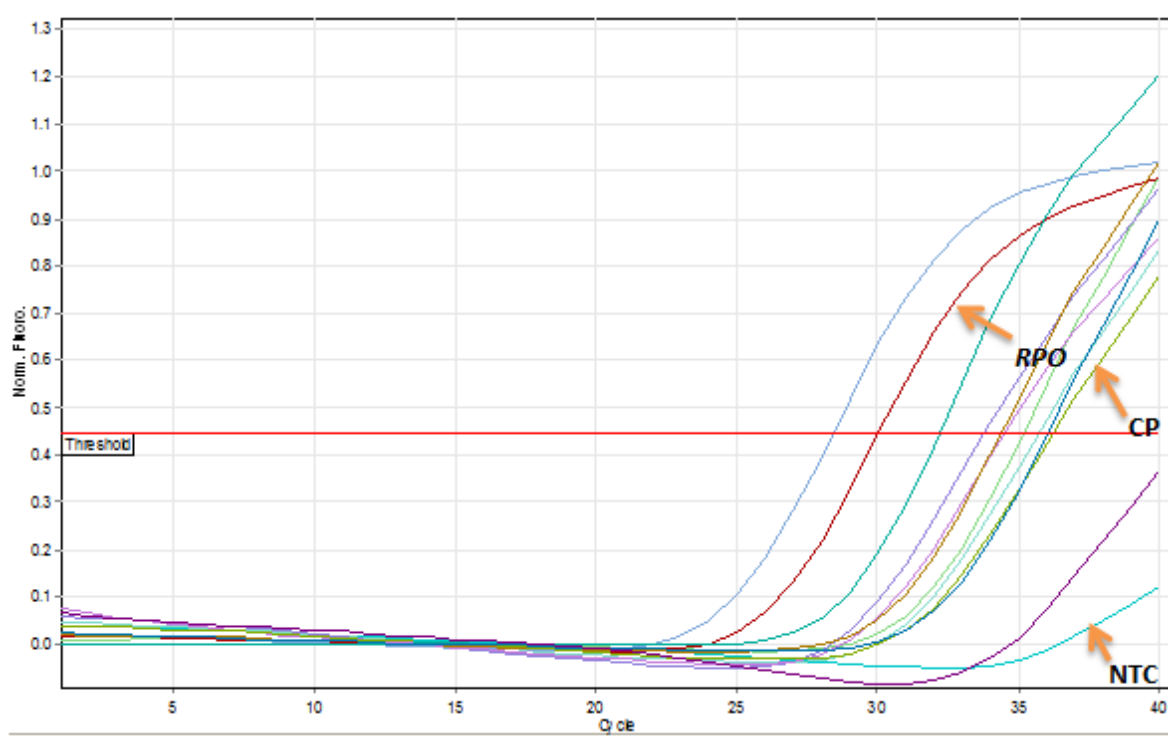
No. de patrón	Patrón	No. de cepas (n=11)	%
1	<i>aac(3)-IV/ qnrA / aac(3)-I / aac(3)-2</i>	2	18.1
2	<i>qnrA / qnrB</i>	3	27.2
3	<i>qnrB / aac(3)-II</i>	4	36.3
4	<i>aac(3)-III / aadA1</i>	2	18.1

**Tabla 11.** Patrones de expresión de genes de resistencia a los antibióticos

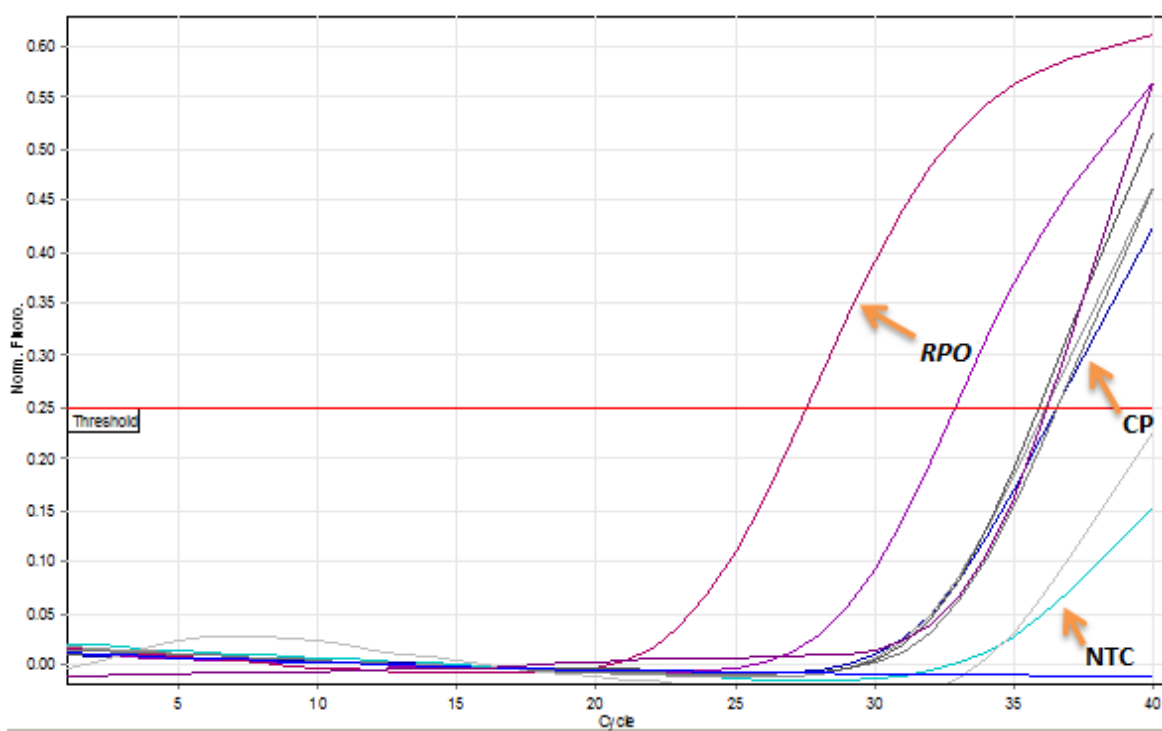
A)



B)



C)



**Figura 19.** (A) Detección de la expresión del gen *aac (3)-II* de resistencia aminoglucósidos, gen *qnrB* de resistencia a quinolonas (B) y del gen *aadA1* (C) en las cepas de *E. coli* por PCR en tiempo real, utilizando el kit Rotor Gene SYBR Green PCR (Qiagen). La lectura se realizó en el canal verde. Control positivo (cepa portadora del gen). NTC (control no templado). Control interno (House keeping; *RPO*).

## 7. DISCUSIÓN

### 7.1. Infecciones cérvico-vaginales

Una de las causas más frecuentes de las visitas ginecológica es la presencia de flujo vaginal anormal, entendiendo por flujo a toda pérdida no hemática proveniente del cérvix; se sabe que el flujo puede ser de origen fisiológico también llamado leucorrea fisiológica por ser de color blanquecino y se constituye por células descamadas del epitelio vaginal cervical, además de microbiota bacteriana, agua, electrolitos, y sustancias químicas, se caracteriza por ser de color blanca, sin olor de consistencia acuosa y con predilección en las zonas declives de la vagina. La descarga vaginal anormal o también llamada leucorrea patológica frecuentemente se asocia a infecciones vaginales (Sánchez *et al.*, 2013). En el presente estudio se analizaron 210 muestras previamente aisladas de pacientes diagnosticadas con infecciones cérvico-vaginales, en un rango de edad de entre 18 y 89 años. *Escherichia coli* fue identificada por PCR convencional en el 95.2% (n=200) de las pacientes con infección cérvico-vaginal (figura 15). Este resultado coincide con lo descrito por Sáez *et al.*, (2016), que señalan a *Escherichia coli* como uno de los principales factores etiológicos de las infecciones cérvico-vaginales. Las cepas de *Escherichia coli* fueron aisladas en su mayoría de mujeres entre 40 y 59 años de edad (40.5%) y entre 20 y 30 años de edad (30.5%) (fig. 16) lo que coincide con lo descrito por González *et al.*, (2007), quienes mencionan que 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. El hecho de que se haya aislado *E. coli* con mayor frecuencia de las mujeres mayores de 40 años puede deberse a que durante la premenopausia y menopausia existen cambios hormonales que podrían favorecer el incremento de las infecciones vaginales.

### 7.2. Islas de patogenicidad

Las bacterias patógenas son definidas como microorganismos capaces de causar una enfermedad (Méthot & Alizon, 2014). En la mayoría de los casos, la patogenicidad involucra la expresión de un gran número de productos génicos (Finlay & Falkow, 1989). En la célula se deben expresar los genes cuyos productos son requeridos para los procesos fisiológicos básicos, pero además, otras clases de genes relacionados con la virulencia, que se

encuentran sólo en cepas patógenas, y sus productos juegan un rol específico en el proceso patógeno (Fernandez *et al.*, 2004).

Las cepas de *E. coli* extraintestinales pueden albergar varios factores de virulencia, tales como adhesinas, fimbrias, hemolisina y sistemas de adquisición de hierro que pueden contribuir a la patogénesis bacteriana. Estos genes generalmente se encuentran en islas de patogenicidad (PAIs) (Schmidt *et al.*, 2004). Cada PAI alberga distintos factores de virulencia, aunque algunos pueden coincidir en más de una PAI. Una misma cepa de *E. coli* puede albergar diversas PAI. Las islas de patogenicidad son adquiridas mediante la transferencia horizontal de genes por bacteriófagos, plasmidos o transposones (Ejrnaes *et al.*, 2011). En el presente estudio se realizó la detección de cuatro islas de patogenicidad que han sido descritas en cepas de *Escherichia coli*; PAI ICFT073, PAI IICFT073, PAI IJ96 y PAI IIJ96 (tabla 10). Se encontró que el 48.5% (n=81) del total de las cepas de CVPEC aisladas, presentó al menos uno de las cuatro PAI estudiadas. La isla de patogenicidad más frecuentemente encontrada fue PAI ICFT073 (39.5 %) (fig.17), lo que coincide con estudios realizados previamente (Sabaté *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2010), donde señalan que PAI ICFT073 es la segunda isla más frecuente después de PAI IV(536). La isla de patogenicidad ICFT073 porta los genes *pap*, *sfa* y *hly* que codifican para adhesinas, toxinas y hemolisinas (Debra *et al.*, 1998), que facilita a las bacterias la diseminación y colonización de nuevos sitios anatómicos de su hospedero. La PAI IICFT073 fue encontrada en el 9% (n= 18; Tabla 10, fig. 17), mientras que las islas PAI IJ96 y PAI IIJ96 no fueron detectadas en las cepas estudiadas, lo cual contrasta con lo descrito por Bingen *et al.*, (2002), realizado en cepas de *E. coli* productora de urosepsis, quienes describieron que la PAI IV 536 fue detectada en el 92% de las cepas, PAI II J96 en el 24% y PAI I CFT073 en el 19%, mientras que PAI II CFT073 no se estudió. La PAI IJ96 no ha sido detectada en ninguna de las cepas de *E. coli* de los estudios previos (Bingen *et al.*, 2002; Sabaté *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2010; Najafi *et al.*, 2017).

### **7.3. Detección de genes de resistencia a los antibióticos**

En los últimos años el tratamiento de las infecciones por cepas de *E. coli* se ha complicado debido a la selección de cepas multirresistentes a varios grupos de antibióticos (Ochoa *et al.*, 2016), situación a la que ha contribuido el hombre por el uso indiscriminado de los antimicrobianos, tanto para uso humano, como veterinario y agrícola. La resistencia

bacteriana a los antimicrobianos es actualmente un serio problema de salud, que disminuye las alternativas de tratamiento de las infecciones (Girard *et al.*, 2003). La resistencia a los antibióticos puede ser adquirida mediante la adquisición de DNA por transferencia horizontal o por mutaciones puntuales de los genes cromosómicos. La transferencia horizontal tiene un papel central en la diseminación de genes de resistencia a los antibioticos (Blair *et al.*, 2015). En este estudio se estableció la frecuencia de 10 genes de resistencia a los antibióticos: quinolonas (*qnrB*, *qnrB*, *qnrS*), trimetoprim (*dfpA1*), sulfametoxazol (*sul1*) y aminoglucósidos [*aac (3)-I*, *aac (3)-II*, *aac (3)-III*, *aac (3)-IV* y *aadA1*] en cepas de *E. coli* cérvico-vaginales.

#### **7.4. Genes de resistencia a aminoglucósidos**

El gen de resistencia a los aminoglucósidos expresado con más frecuencia entre las cepas de *E. coli* fue *aac (3)-II* (90%, figura 18) que coincide con el 91% de detección descrito por Ho y colaboradores (2016) en cepas de *E. coli* de origen sanguíneo; mientras que el otro gen de resistencia a aminoglucósidos (*aadA1*) se expresó en el 63%. Se ha descrito que el gen *aac (3)-II* codifica para una adeniltransferasa que es la clase más común de enzimas nucleotidiltransferasa y le confiere resistencia bacteriana a estreptomycin, espectinomycin (Ramirez & Tolmasky, 2010), tobramicina, netilmicina, gentamicina y dibekacina (Shaw *et al.*, 1993). Los genes *aac (3)-I*, *aac (3)-III* y *aac (3)-IV* fueron expresados sólo en el 18% de las cepas estudiadas, todos pertenecen al grupo resistencia a los aminoglucosidos (fig.17 y 18 A).

#### **7.5. Genes de resistencia a quinolonas**

Entre los mecanismos de resistencia a estos antibióticos se encuentran las alteraciones en los blancos de quinolonas, las bombas de expulsión activa y la transferencia de genes de resistencia plasmídicos (Ruiz, 2003). El gen de resistencia a las quinolonas *qnrB* fue el segundo gen de resistencia expresado con más frecuencia entre las cepas estudiadas con un 81% (n=9), mientras que *qnrA* se expreso en el 36% (n=4) y *qnrS* no fue expresado, lo cual discrepa de lo reportado por Shahbazi *et al.* (2018), donde el 32.5% de las cepas fue positiva para los genes de resistencia a quinolona *qnrS* y *qnrB*.

#### **7.6. Genes de resistencia a trimetoprim y sulfametoxazol**

En *Escherichia coli*, la resistencia a trimetoprim-sulfametoxazol a menudo se asocia con la presencia de genes de dihidrofolato reductasa (DHFR) y dihidropteroato sintasa (DHPS) en integrones (White *et al.*, 2001). En el caso de las sulfonamidas se han descrito los genes *sul1*, *sul2* y *sul3* relacionados con integrones que codifican formas mutantes de la enzima dihidropteroato sintasa que no pueden ser inhibidas por el antibiótico. Lo mismo sucede en el caso del trimetropim, donde se han descrito múltiples alelos del gen *dfp* que generan resistencia. Los genes *dfpA* y *sul1*, de resistencia a trimetoprim y sulfametoxazol respectivamente, fueron expresados en el 18% de las cepas (figura 17), que es semejante al 12% de detección reportado por Sáez *et al.* (2016) para trimetoprim-sulfametoxazol en cepas

de *E. coli* aisladas en Marruecos y contrasta con el 61% detectado en cepas en Mozambique y con el 85.7% descrito por Anago *et al.* (2015) en cepas bacterianas.

Los resultados obtenidos en este estudio ponen de manifiesto por un lado la elevada expresión de genes de resistencia a antibióticos en las cepas de *E. coli* vaginales, sobre todo considerando las diferentes combinaciones de asociación de la expresión entre las cepas (tabla 11), lo que refleja que es indispensable que se diseñen programas de monitoreo de la resistencia bacteriana a los antimicrobianos con el propósito de mejorar las alternativas de tratamiento de las infecciones vaginales por *E. coli*. Por otro lado, la presencia de dos islas de patogenicidad en las cepas estudiadas indica de manera indirecta la presencia de genes de virulencia que podrían, en determinado momento, agudizar los procesos infecciosos.



## 8. CONCLUSIONES

- Las infecciones cérvico-vaginales de las pacientes estudiadas se encontraron asociadas principalmente a *Escherichia coli*.
- La isla de patogenicidad identificada con mayor frecuencia en las cepas de *Escherichia coli* fue PAI ICFT073 que acarrea genes que codifican para adhesinas y toxinas.
- La mayoría de las cepas vaginales de *E. coli* expresaron los genes de resistencia a aminoglucósidos y quinolonas.
- La presencia en las cepas de *Escherichia coli* de las PAIs ICFT073 y IICFT073 que acarrean diferentes factores de virulencia, sumado a la expresión de múltiples genes de resistencia a los antibióticos, pueden ser factores importantes para la agudeza y cronicidad de las infecciones vaginales.

## 9. LITERATURA CITADA

1. Acosta M, Ferreira R, Padilla G, FERREIRA L, Costa S. 2000. Altered expression of oligopeptide-binding protein (OppA) and aminoglycoside resistance in laboratory and clinical *Escherichia coli* strains. *Journal of Medical Microbiology* 49:409-13.
2. Alós I. 2015. Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. *Rev Elsevier* 33 (10): 692-699.
3. Amin S. 2009. Vibrioferrin, an unusual marine siderophore: Iron binding, photochemistry, and biological implications. *Inorganic Chemistry* 48: 11451-11458.
4. Anago E, Ayi-Fanou L, Akpovi C, Hounkpe W, Agassounon-Djikpo Tchibozo M, Bankole H, Sanni A. 2015. Antibiotic resistance and genotype of beta-lactamase producing *Escherichia coli* in nosocomial infections in Cotonou, Benin. *Rev. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 14: 13-20.
5. Antao E, Wieler L, Ewers C. 2009. Adhesive threads of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Pathog* 1(1):22.
6. Anderson G, Palermo J, Schilling J, Roth R, Heuser J, Hultgren S. 2003. Intracellular bacterial biofilm-like pods in urinary tract infections. *Science* 301:105-7.
7. Balish M, Jensen J, Uehling D. 1982. Bladder mucin: a scanning electron microscopy study experimental cystitis. *J Urol* 128:1060-3.
8. Bergsten G, Wullt B, Svanborg C. 2005. *Escherichia coli*, fimbriae, bacterial persistence and host response induction in the human urinary tract. *Int J Med Microbiol* 295(6-7):487-502.
9. Bessen D, Gotschlich E. 1986. "Interactions of gonococci with HeLa cells: attachment, detachment, replication, penetration, and the role of protein II". *Infect. Immun.* 54(1):154-160.
10. Bidé P, Bonacorsi S, Clermont O, De Montille C, Brahimi N, Bingen E. 2005. Multiple insertional events, restricted by the genetic background, have led to acquisition of pathogenicity island IJ96-like domains among *Escherichia coli* strains of different clinical origins. *Infect. Immun.* 73:4081-4087.
11. Bien J, Sokolova O, Bozco P. 2012. Role of Uropathogenic *Escherichia coli* Virulence Factors in Development of Urinary Tract Infection and Kidney Damage. *Int J Nephrol* 681473.
12. Bingen-Bidois M, Clermont O, Bonacorsi S. 2002. Análisis filogenético y prevalencia de cepas de urosepsis de *Escherichia coli* con dominios similares a islas de patogenicidad. *Infect Immun* 70: 3216-3226.
13. Blair J, Webber M, Baylay A, Ogbolu D, Pidoock L. 2015. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol* 13(1):42-51.
14. Blanco J, Blanco M, Blanco JE, Mora A, Alonso MP, González EA, Bernárdez MI. 2002. Enterobacterias: características generales. Género *Escherichia* In: Manual de Microbiología Veterinaria, Vadillo S, Píriz S, Mateos E, Eds., McGraw-Hill Interamericana España. 301- 325.

15. Blanco D. 1990. "A complement activation limits the rate of in vitro treponemicidal activity and correlates with antibody-mediated aggregation of *Treponema pallidum* outer membrane protein "TROMP"" *J. Immunol.* 14(45): 1914–1921.
16. Blattner FR, Plunkett G, Bloch CA. 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K12, *Science* 277: 1453-74.
17. Blum G, Falbo V, Caprioli A. 1995. Gene clusters encoding the cytotoxic necrotizing factor type 1, Prs-fimbriae and alpha-hemolysin from the pathogenicity island II of the uropathogenic *Escherichia coli* strain J96. *FEMS Microbiol Lett.* 126:189-195.
18. Blum G, Ott M, Lischewski A, Ritter A, Imrich H, Tschape H, Hacker J. 1994. Escisión de grandes regiones de ADN denominadas islas de patogenicidad específicas de tRNA loci en el cromosoma de un patógeno de tipo salvaje *Escherichia coli*. *Infect Immun* 62: 606 - 614.
19. Bullen, J. 1981. The significance of iron in infection. *Reviews of Infectious Diseases* 3: 1127- 1138.
20. Bush K, Jacoby G. 2009. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 54(3):969-76.
21. Calvo J, Martínez L. 2009. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enferm Infec Microbiol Clin* 27(1):44–52.
22. Cánovas A, de la Prieta R, Barreiro J, Alonso J, Ciriaco Aguirre C. 2002. Antibióticos glucopeptidos. Programa de Formación Médica Continuada Acreditado, ISSN 0304-5412, 8(66):3528-3534.
23. Casellas J. 2011. Resistencia a los antibacterianos en América Latina: Consecuencias para la infectología. *Rev Panam Salud Pública* 30(6):519-28.
24. Cattoir V, Nordmann P. 2009. Plasmid-mediated quinolone resistance in gram-negative bacterial species: an update. *Curr Med Chem* 16:1028-46.
25. Cheetham B, Katz M. 1995. Un papel para los bacteriófagos en la evolución y transferencia de determinantes de virulencia bacteriana. *Mol Microbiol* 18: 201 - 208.
26. Chopra I, Roberts M. 2001. Tetracycline antibiotics: Mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Rev. Microbiol Mol Biol* 65: 232-260.
27. Chung J, Hong S, Kim K, Goti D, Stins M, Shin S, Dawson V, Dawson T, Kim K. 2003. 37-KDa laminin receptor precursor modulates cytotoxic necrotizing factor 1 mediated RhoA activation and bacterial uptake. *J Biol Chem* 278(19):16857-16862.
28. Crosa J, Walsh C. 2002. Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* 66(2):223-49.
29. Croxen M, Law R, Scholz R, Keeney K, Wlodarska M, Finlay B. 2013. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews* 26(4), 822-880.
30. Davis J, Carvalho H, Rasmussen S, O'Brien A. 2006. Cytotoxic necrotizing factor type 1 delivered by outer membrane vesicles of uropathogenic *Escherichia coli* attenuates polymorphonuclear leukocyte antimicrobial activity and chemotaxis. *Infect Immun* 74(8):4401-4408.
31. Debra M, Shyang K, Mobley H. 1998. Genomic Analysis of a Pathogenicity Island in Uropathogenic *Escherichia coli* CFT073: Distribution of Homologous Sequences among Isolates from Patients with Pyelonephritis, Cystitis, and Catheter-Associated Bacteriuria and from Fecal Samples. *American Society for Microbiology* 66: 4411-4416.

32. Dhakal B, Mulvey M. 2012. The UPEC Pore Forming Toxin  $\alpha$ -Hemolysin Triggers Proteolysis of Host Proteins to Disrupt Cell Adhesion, Inflammatory and Survival Pathways. *Cell Host Microbe* 11(1):58-69.
33. Dover L, Alderwick L, Brown A, Futterer K, Besra G. 2007. Regulation of cell wall synthesis and growth. *Curr Mol Med.* 7:247–76
34. Dobrindt U, Blum-Oehler G, Nagy G, Schneider G, Johann A, Gottschalk G. 2002. Genetic structure and distribution of four pathogenicity islands (PAI I536 to PAI IV536) of uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. *Infect Immun.* 270:6365-72.
35. Donnenberg MS. 2002. Introduction. In: *Escherichia Coli: Virulence Mechanisms of a Versatile Pathogen.* Elsevier Science Inc. USA xxi-xxv.
36. Donnenberg M, Kaper J. 1992. "Enteropathogenic *Escherichia coli*." *Infect. Immun* 60(10): 3953-3961.
37. Drlica K, Malik M. 2003. Fluoroquinolones: action and resistance. *Curr Top Med Chem* 3: 249-282.
38. Drlica K, Muhammad M. 2008. Quinolone-mediated bacterial death. *Antimicrob Agents Chemother* 52: 385-392.
39. Ejrnaes K, Stegger M, Reisner A, Ferry S, Monsen T, Holms S, Lundgren B, Frimodt-Moller N. 2011. Characteristics of *Escherichia coli* causing persistence or relapse of urinary tract infections: phylogenetic groups, virulence factors and biofilm formation. *Virulence* 2(6):528-537.
40. Emödy L, Kerényi M, Nagy G. 2003. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli*. *Int J Antimicrob Agents* 22: 29-33.
41. Falagas M, Kasiakou S. 2005. Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. *Clin Infect Dis* 40: 1333-1341.
42. Faraldo J, Sansom S. 2003. "Acquisition of siderophores in gram-negative bacteria". *Rev. Nature, Molecular cell Biology* 4: 105-116.
43. Ferens W, Hovde C. 2011. *Escherichia coli* O157: H7: animal reservoir and sources of human infection. *Foodborne Pathogens and Disease* 8(4): 465-487.
44. Fernández F, Alonso G, Toro E. 2004. Estructura de mosaico del cromosoma bacteriano: Islas patogénicas. *Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel.* 35 (2).
45. Fetherston J, Schuetze P, Perry R. 1992. La pérdida del fenotipo de pigmentación en *Yersinia pestis* se debe a la eliminación espontánea de 102 kb de ADN cromosómico que está flanqueado por un elemento repetitivo. *Mol Microbiol* 6: 2693 - 2704.
46. Finlay B, Falkow S. 1989. Common themes in microbial pathogenicity. *Rev. Microbiol* 53(2):210-230.
47. García de Lomas J, Navarro D. 2006. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. En (García Rodríguez Ed) *Antimicrobianos en Medicina.* Barcelona- Prous Science. 2ª Edición 13-23.
48. Garcia E, Brumbaugh A, Mobley H. 2011. Redundancy and specificity of *Escherichia coli* iron acquisition systems during urinary tract infection. *Infect Immun* 79(3):1225-1235.
49. Girard R, Perraud M, Pruss A, Savey A, Tikhomirov E, Thuriaux M, Vanhems P. 2003. Epidemiología de las infecciones nosocomiales. Organización Mundial de Salud (OMS). 2 ed. 45.

50. Giron J, Ho A, Schoolnik G. 1991. An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science* 254:710-3.
51. González A, Ortiz C, Dávila R, Valencia C. 2007. Infecciones cervicovaginales más frecuentes; prevalencia y factores de riesgo. *Rev Cubana Obstet Ginecol* 33 (2).
52. Gritz E, Bhandari V. 2015. Corrigendum: the human neonatal gut microbiome: a brief review. *Front Pediatr* 3:60.
53. Guerrant RL, Hugues JM, Lima NL, Crane J. 1990. "Diarrhea in developed and developing countries: Magnitude, special settings, and etiologies". *Rev Infect Dis* 12(1): S41-S50.
54. Guyer D, Radulovic S, Jones F, Mobley H. 2002. Sat, the Secreted Autotransporter Toxin of Uropathogenic *Escherichia coli*, Is a Vacuolating Cytotoxin for Bladder and Kidney Epithelial Cells. *Infect. Immun.* 70:4539-4546.
55. Guyer D, Kao J, Mobley H. 1998. Genomic analysis of a pathogenicity island in uropathogenic *Escherichia coli* CFT073: distribution of homologous sequences among isolates from patients with pyelonephritis, cystitis, and catheter-associated bacteriuria and from fecal samples, *Infect Immun* 66 (pg. 4411-7)
56. Gyles C. 1994. "*Escherichia coli* in domestic animals and humans." CAB International, Wallingford, UK.
57. Hacker J, Bender L, Ott M, Wingender J, Lund B, Marre R, Goebel W. 1990. Las deleciones de regions cromosomicas que codifican fimbrias y hemolisinas se producen in vitro e in vivo en varios aislados extraintestinales de *Escherichia coli*. *Microb Pathog* 8:213-225.
58. Hacker J, Kaper J. 2000. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu Rev Microbiol* 54:641-679.
59. Hacker J, Blum-Oehler G, Muhldorfer I, Tschape H. 1997. Islas de patogenicidad de bacterias virulentas: estructura, función e impacto en la evolución microbiana. *Mol Microbiol* 23: 1089 - 1097.
60. Hagan E, Lloyd A, Rasko D, Faerber G, Mobley H. 2010. *Escherichia coli* global gene expression in urine from women with urinary tract infection. *PLoS Pathog.* 6(11):e1001187.
61. Hale W, van der Woude M, Braaten B. 1998. Regulación de la expresión de adhesina uropatógena de *Escherichia coli* por metilación del ADN. *Low DA Mol Genet Metab* 65 (3): 191-6.
62. Hancock V, Ferrieres L, Klemm P. 2008. The ferric yersiniabactin uptake receptor FyuA is required for efficient biofilm formation by urinary tract infectious *Escherichia coli* in human urine. *Microbiology* 154(Pt1):167-175
63. Hedlund M, Wwachtler C, Johansson E, Hang L, Somerville J, Darveau R, Svanborg C. 1999. P fimbriae-dependent, lipopolysaccharide-independent activation of epithelial cytokine responses. *Mol Microbiol* 33(4):693-703.
64. Heithoff D, Sinsheimer R, Low D, Mahan M. 1999. Un papel esencial para la metilación de la adenina del ADN en la virulencia bacteriana. *Ciencias.* 284 (5416): 967-70.
65. Ho P, Leung L, Chow K, Lai E, Lo W, Keung T. 2016. Prevalence of aminoglycoside modifying enzyme and 16S ribosomal RNA methylase genes among aminoglycoside-resistant *Escherichia coli* isolates. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* 49(1): 123-126.

66. Hoffman P, Ripley M, Weeratna R. 1992. "Cloning and nucleotide sequence of a gene (ompS) encoding the major outer membrane protein of *Legionella pneumophila*". *J. Bacteriol.* 174: 914–920.
67. Hsiao W, Ung K, Aeschliman D, Bryan J, Finlay B, Brinkman F. 2005. Evidence of a large novel gene pool associated with prokaryotic genomic islands. *PLoS Genet* 1: e62.
68. Hueck C. 1998. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62:379-433.
69. Huovinen P, Sundstrom L, Swedberg G, Skold O. 1995. Trimetoprima y resistencia a la sulfonamida. *Agentes antimicrobianos Chemother* 39:279 - 289.
70. Jarczак J, Kościuczuk E, Lisowski P, Strzałkowska N, Jóźwik A, Horbańczuk J, Krzyżewski J, Zwierzchowski L, Bagnicka E. 2013. Defensins: Natural component of human innate immunity. Review Article. *Human Immunology* 74(9):1069-1079
71. Jeanteur D, Lekey J, Patus F. 1991. "The bacterial porin superfamily: sequence alignment and structure prediction". *Mol. Microbiol.* 5 (9): 2153– 2164.
72. Jensen B, Olsen K, Struve C, Krogfelt k, Petersen A. 2014. Epidemiology and clinical manifestations of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews* 27(3), 614-630.
73. Johnson J. 1991. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Rev Clin Microbiol* 4: 80-128.
74. Johnson J. 2003. Microbial virulence determinants and the pathogenesis of urinary tract infection. *Infect Dis Clin North Am* 17(2):261-278.
75. Johnson J, Jelacic S, Schoening L, Clabots C, Shaikh N, Mobley H, Tarr P. 2005. The IrgA homologue adhesion Iha is an *Escherichia coli* virulence factor in murine urinary tract infection. *Infect Immun* 73(2):965-971.
76. Johnson J, Stell A. 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.
77. Kaper J, J Nataro, H Mobley. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Rev. Nature Reviews Microbiology* 2: 123 – 140.
78. Knapp S, Hacker J, Jarchau T, Goedel W. 1986. Large unstable inserts in the chromosome affect virulence properties of uropathogenic *Escherichia coli* O6 strain 536. *J bacterial* 168: 22-30.
79. Lacy M, Nicolau D, Nightingale C, Quintiliani R. 1998. The pharmacodynamics of aminoglycosides. *Clin Infect Dis* 27: 23-27.
80. Lahey Clinic. 2011.  $\beta$ -Lactamase Classification and Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant Enzymes. Burlington, MA: Lahey Clinic Foundation.
81. Landman D, Georgescu C, Martin D, Quale J. 2008. Polymyxins revisited. *Clin Microbiol Rev* 21: 449-465.
82. Landgraf T, Berlese A, Freitas F, Mlanezi M, Martinez R, Panunto-Castelo A. 2012. The ferric aerobactin receptor lutA, a protein isolated on agarose column, is not essential for uropathogenic *Escherichia coli* infection. *Rev Latino-Am Enfermagem* 20(2):340-345.
83. Landraud L, Gilbert M, Popoff M, Boquet P, Gauthier M. 2003. Expression of *cnf1* by *Escherichia coli* J96 involves a large upstream DNA region including the hlyCABD operon, and is regulated by the RfaH protein. *Mol microbiol.* 47(6):1653-1667.

84. Lane D, Pace B, Olsen J, Stahl D, Sogin M, Pace N. 1985. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proc Natl Acad Sci USA*. 82:6955-9.
85. Le Bouguéne C. 2005. Adhesins and invasins of pathogenic *Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol* 295(6-7):471-478.
86. Li B, Sun J, Han Y, Huang L, Fu X, Ni Y. 2010. Phylogenetic groups and pathogenicity island markers in fecal *Escherichia coli* isolates from asymptomatic humans in China. *Applied and environmental microbiology* 76: 6698-700.
87. Li X, Rasko D, Lockett C, Johnson D, Mobley H. 2001. Repression of bacterial motility by a novel fimbrial gene product, *J EMBO* 20: 4854-62.
88. Llosa M, De la Cruz F. 2005. Bacterial Conjugation: a Potential Tool for Genomic engineering. *Research in Microbiology* 156 (1): 1-6.
89. Lloyd A, Rasko D, Mobley H. 2007. Defining genomic islands and uropathogen-specific genes in uropathogenic *Escherichia coli*. *J bacterial* 189(9):3532-3546.
90. Luna V, Ochoa S, Cruz A, Córdova V, Cázares D, Vélez F, Hernández R, Xicohtencatl J. 2018. Infecciones del tracto urinario, inmunidad y vacunación. *Bol Med Hosp Infant Mex*. 75:67-78
91. Lüthje P, Brauner A. 2014. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* and their interaction with the host. *Adv Microb Physiol* 65(1):338-357.
92. MacDonald T, Monteleone G. 2005. Immunity, inflammation, and allergy in the gut. *Science*. 307: 1920 – 1925.
93. Martinez J, Mulvey M, Schilling J, Pinkner J, Hultgren S. 2000. Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells. *EMBO J* 19(12):2803-2812.
94. Marklund B, Tennen J, Garcia E. 1992. Horizontal gene transfer of the *Escherichia coli* pap and prs pili operons as a mechanism for the development of tissue-specific adhesive properties, *Mol Microbiol* 6:2225-42.
95. Marston H, Dixon D, Knisely J, Palmore T, Fauci A. 2016. Antimicrobial resistance. *Jama* 316(11): 1193-1204.
96. Masters P, O'Bryan T, Zurlo J, Miller D, Joshi N. 2003. Trimethoprim-sulfamethoxazole revisited. *Arch Intern Med* 163:402–10.
97. Méthot P, Alizon S. 2014. What is a pathogen? Toward a process view of host-parasite interactions. *Virulence*, 5(8), 775–785.
98. McDaniel T, Jarvis K, Donnenberg M. 1995. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA*. 92:1664-1668.
99. McGuinness B. 1990. "Comparative sequence analysis of the class 1 protein gene (porA) from three strains of *Neisseria meningitidis*: synthetic peptides define the epitopes responsible for serosubtype specificity". *J. Exp. Med.* 171: 1871–1882.
100. McKechnie M, Hillman R, Couldwell D, Kong F, Freedman E, Wang H. 2009. Simultaneous identification of 14 genital microorganisms in urine by use of a multiplex PCR-based reverse line blot assay. *J Clin Microbiol* 47:1871-7.
101. Mendoza A. 2011. El formidable reto de la resistencia bacteriana a los antibióticos. *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM* 54(1): 20-21.
102. Mills M, Meysick K, O'Brien A. 2000. Cytotoxic necrotizing factor type 1 of uropathogenic *Escherichia coli* Kills cultured human uroepithelial 5637 cells by an apoptotic mechanism. *Infect Immun* 68(10):5869-5880.

103. Mobley H, Jarvis K, Elwood J. 1993. Isogenic P- fimbrial deletion mutants of pyelonephritic *Escherichia coli*: the role of  $\alpha$ Gal (1-4)  $\beta$ Gal binding in virulence of a wild type strain, *Mol Microbiol* 10: 143-55.
104. Molina J. 2015. Drogas antibacterianas. Departamento de microbiología y parasitología- recursos en bacteriología. Facultad de medicina UNAM.
105. Momtaz H, Karimian A, Madani M, Safapoor F, Ranjbar R, Sarshar M, Souod N. 2013. Uropathogenic *Escherichia coli* in Iran: Seregroup distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties. *Ann clinMicrobiol Antimicrob*. 12(8):1-12.
106. Morgenthau A, Pogoutse A, Adamiak P, Moraes T, Schryvers A. 2013. Bacterial receptors for host transferrin and lactoferrin: Molecular mechanisms and role in host-microbe interactions. *Future Microbiology* 8, 1575-1585.
107. Mosquito S, Ruiz J, Bauer J, Ochoa T. 2011. Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en *Escherichia coli* asociadas con diarrea. *Rev Peru Med Exp Salud Pública* 28(4):648-56.
108. Mulvey MA, López-Boado YS, Wilson CL, Roth R, Parks WC, Heuser J. 1998. Induction and evasion of host defenses by type 1-piliated uropathogenic *Escherichia coli*. *Science* 282:1494-7.
109. Murphy T, Bartos L. 1998. "Human bactericidal antibody response to outer membrane protein P2 of nontypeable *Haemophilus influenzae*". *Infect. Immun*. 56(10): 2673–2679.
110. Murray R, Rosenthal S, Pfaller A. 2017. Microbiología médica. 8a. ed. Elsevier España
111. Nathan C. 2002. Points of control in inflammation. *Nature* 420:846-852.
112. Najafi K, Hasanpour M, Askary A, Aziemzadeh M, Hashemi N. 2017. Distribution of pathogenicity island markers and virulence factors in new phylogenetic groups of uropathogenic *Escherichia coli* isolates. 63: 335- 343.
113. Nipic D, Podlesek Z, Budic M, Crnigob M, Zqur-Bertok D. 2013. *Escherichia coli* uropathogenic-specific protein, Usp, is a bacteriocin-like genotoxin. *J Infect Dis* 208(10):1545-1552.
114. Occhino D, Wyckoff E, Henderson D, Wrona T, Payne S. 1998. *Vibrio cholerae* iron transport: Haem transport genes are linked to one of two sets of tonB, exbB, exbD genes. *Molecular Microbiology* 29: 1493-1507.
115. Ochoa S, Cruz-Córdova A, Luna-Pineda V, Reyes-Grajeda J, Cázares-Domínguez V, Escalona G, Sepúlveda M, López F, Arellano J, López B, Parra I, Giono S, Hernández R, D de la Rosa Z , Xicohtencatl J. 2016. Multidrug- and Extensively Drug-Resistant Uropathogenic *Escherichia coli* Clinical Strains: Phylogenetic Groups Widely Associated with Integrons Maintain High Genetic Diversity. *Front Microbiol*. 7;2042.
116. Oelschlaeger T, Dobrindt U, Hacker J. 2002. Virulence factors of uropathogens. *Curr Opin Urol* 12: 33-38.
117. Olson P, Justice S, Hunstad D. 2015. *Escherichia coli* in urinary tract infections. En Sussman M. *Molecular medical microbiology* 1373-1387.
118. OMS. 2017. ¿Qué es la resistencia a los antimicrobianos?. [Internet] Consultado: 2019 Sep 18, Disponible en: <http://www.who.int/features/qa/75/es/>.
119. Ott M. 1993. Dynamics of the bacterial genome: deletions and integrations as mechanisms of bacterial virulence modulation. *Zentralbl Bakteriol* 278: 457–468.



120. Paniagua GL, Monroy-Pérez E, Vaca S. 2007. PCR Manual de identificación de *Escherichia coli* y *Salmonella* spp en materia fecal. Universidad Nacional Autónoma de México: 21 – 23.
121. Panicker M, Minkley E. 1985. DNA Transfer Occurs During a Cell Surface Contact Stage of F Sex Factor-Mediated Bacterial Conjugation. *Journal of Bacteriology* 162 (2): 584-590.
122. Plancon L, Du Merle L, Le Friec S, Gounon P, Jouve M, Guignot J, Servin A, Le Bouguéne C. 2003. Recognition of the cellular  $\beta$ 1 chain integrin by the bacterial *afaD* invasion is implicated in the internalization of *afa*-expressing pathogenic *Escherichia coli* strains. *Cell Microbiol* 5(10):681-693.
123. Ram S, Vaipayee P, Shanker R. 2008. Rapid culture-independent quantitative detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* in surface waters by real-time PCR with molecular beacon. *Environmental Science and Technology* 42(12), 4577-4582.
124. Ramirez M, Tolmasky M. 2010. Aminoglycoside modifying enzyme. *Drug Resist Updat* 13(6):151-171.
125. Rasko D, Phillips J, Li X, Mobley H. 2001. Identification of DNA sequences from a second pathogenicity island of uropathogenic *Escherichia coli* CFT073: probes specific for uropathogenic populations. *J. Infect. Dis.* 184:1041-1049.
126. Reid S, Herbelin C, Bumbaugh A. 2000. Parallel evolution of virulence in pathogenic *Escherichia coli*. *Nature* 406:64-67.
127. Reigstad C, Hultgren S, Gordon J. 2007. Functional genomic studies of uropathogenic *Escherichia coli* and host urothelial cells when intracellular bacterial communities are assembled. *J Biol Chem* 282(29):21259-21267.
128. Restieri C, Garriss G, Locas M, Dozois C. 2007. Autotransporter-encoding sequences are phylogenetically distributed among *Escherichia coli* clinical isolates and reference strains. *Appl Environ Microbiol* 73(5):1553-1562.
129. Rhen M, Vaisanen V, Saraste M, Korhonen T. 1986. Organization of genes expressing the blood-group-M-specific hemagglutinin of *Escherichia coli*: identification and nucleotide sequence of the M-agglutinin subunit gene. *Gene* 4(3):351-360.
130. Rodríguez J, García J, Picazo J. 1999. *Compendio de microbiología médica*. Elsevier España.
131. Ruiz J. 2003. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *J Antimicrob Chemother* 51:1109-
132. Russo T, Johnson J. 2003. Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes and Infection* 5: 449-456.
133. Russo T, McFadden C, Carlino-MacDonald UB, Beanan J, Barnard T, Johnson J. 2002. *IroN* functions as a siderophore receptor and is a urovirulence factor in an extraintestinal pathogenic isolate of *Escherichia coli*. *Infect Immun* 70(12):7156-7160.
134. Sáez E, Cossa A, Benmessaoud R, Madrid L, Moraleda C, Villanueva S, Tligui H, Moiane B, Alami H, Massora S, Bezad R, Mandomado I, Bosch J, Bassat Q, soto S. 2016. Characterization of vaginal *Escherichia coli* Isolated from pregnant women in two different African sites. *PLoS One*.11(7): e0158695.
135. Sabaté M, Moreno E, Pérez T, Andreu A, Prats G. 2006. Pathogenicity island markers in commensal and uropathogenic *Escherichia coli* isolates. *Clin Microbiol Infect* 12: 880–886.

136. Sáez E, Cossa A, Benmessaoud R, Madrid L, Moraleda C, Villanueva S, Tligui H, Moiane B, Alami H, Massora S, Bezad R, Mandomando I, Bosch J, Vila J, Bassat Q, Soto S. 2016. Characterization of Vaginal *Escherichia coli* Isolated from Pregnant Women in Two Different African Sites. *J pone* 11(7).
137. Sainz E., Teresita del Rosario, Reyes M., Violeta, Vicente P., Jazmin, Serapio-Alva, Reyna, Zárate, Martha Patricia, Navarro, Armando, Eslava C. 2008. Resistencia a antimicrobianos de cepas de *Escherichi coli* de diversos serotipos aisladas de pacientes de un hospital psiquiátrico. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* 39: 18-25.
138. Sánchez J, Castellanos S, Rivera A. 2013. Leucorrea como signo de infecciones cérvicovaginales. *Rev Costarr Salud Pública* 22: 56-60.
139. Sansonetti P. 1991. "Genetic and molecular basis of epithelial cell invasion by *Shigella* species". *Rev. Infct. Dis.* 13(4): 285–292.
140. Schalk I. 2013. Innovation and originality in the strategies developed by bacteria to get access to iron. *Chembiochem.* 14, 293-294.
141. Scheutz F, Strockbine NA. Genus I. 2005. *Escherichia* Castellani and Chalmers 1919, 941TAL In: *Bergey's Manual of systematic bacteriology*. Second edition, volume two. Garrity GM, Ed., Bergey's Manual Trust USA. 607-624.
142. Schmidt H, Hensel M. 2004. Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clin Microbiol Rev.* 17(1):14-56.
143. Schneider G, Dobrindt U, Bruggemann H, Nagy G, Janke B, Blum G. 2004. The pathogenicity island-associated K15 capsule determinant exhibits a novel genetic structure and correlates with virulence in uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. *Infect Immun.* 72(10):5993-6001.
144. Schubert S, Rakin A, Fischer D, Sorsa J, Heesemann J. 1999. Caracterización del sitio de integración de la isla Yersinia de alta patogenicidad en *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 179 (2): 409-14.
145. Shahbazi S, Asadi Karam M, Habibi M, Talebi A, Bouzari S. 2018. Distribution of extended-spectrum betalactamicos, quinolone and carbapenem resistance genes, and genetic diversity among uroathogenic *Escherichia coli* isolates in Tehran, Iran. *J Glob Antimicrob Resist* 14: 118-125.
146. Shaw K, Rather P, Hare R, Miller G. 1993. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Rev Microbiol* 57(1):138-63.
147. Shin S, Brodsky I. 2015. The inflammasome: Learning from bacterial evasion strategies. *Semin Immunol.* .27(2):102-110.
148. Stapleton A. 2003. Novel approaches to prevention of urinary tract infections. *Infect Dis Clin N Am* 17:457-71.
149. Stoebner J, Payne S. 1998. "Iron-regulated hemolysin production and utilization of heme and hemoglobin by *Vibrio cholerae*". *Infection and Immunity* 58(11): 2891–2895.
150. Stojiljkovic I, Perkins-Balding D. 2002. Processing of heme and heme-containing proteins by bacteria. *DNA and Cell Biology* 21, 281-295.
151. Stromberg norte, Marklund BI, Lund B. 1990. Host specificity of uropatogenic *Escherichia coli* depends on differences in binding specificity to Gal $\alpha$ 1-4Gal-containing isoreceptors, *J EMBO* 9: 2001-12.

152. Swenson D, Bukanov N, Berg D, Welch R. 1996. Two pathogenicity islands in uropathogenic *Escherichia coli* J96: cosmid cloning and sample sequencing. *Infect Immun* 64 (9): 3736-43.
153. Taber H, Mueller J, Miller P, Arrow A. 1987. Absorción bacteriana de antibióticos aminoglucósidos. *Rev. Microbiol* 51 (4): 439–457.
154. Tobias J, Vutukuru S. 2012. Simple and rapid multiplex PCR for identification of the main human diarrheagenic *Escherichia coli*. *Microbiological Research* 167, 564-570.
155. Toro C, Farfán M, Contreras I, Flores O, Navarro N, Mora G, Prado V. 2005. Genetic analysis of antibiotic-resistance determinants in multidrug-resistant Shigella strains isolated from Chilean children. *Epidemiol Infect* 133(1):81-86.
156. Van T, Chin J, Chapman T, Tran L, Coloe P. 2008. Safety of raw meat and shellfish in Vietnam: an analysis of *Escherichia coli* isolations for antibiotic resistance and virulence genes. *Int J Food Microbiol* 124(3):217-223.
157. Wang S, Deng K, Zaremba S, Deng X, Lin C, Wang Q, Lou-Tortorello M, Zhang W. 2009. Transcriptomic response of *Escherichia coli* O157:H7 to oxidative stress. *Appl Environ Microbiol*. 75(19):6110-6123.
158. Weaver E, Wyckoff E, Mey A, Morrison R, Payne S. 2013. FeoA and FeoC are essential components of the *Vibrio cholerae* ferrous iron uptake system, and FeoC interacts with FeoB. *Journal of Bacteriology* 195: 4826-4835.
159. White P, Mclver C, Rawlinson W. 2001. Integrones y casetes de genes en las enterobacterias. *Agentes antimicrobianos Chemother* 45: 2658 - 2661.
160. White P, Mclver C, Rawlinson W. 2001. Integrones y casetes de genes en las enterobacterias. *Agentes antimicrobianos Chemother* 45: 2658 - 2661.
161. Wilson T, Mahon W, Inaba T, Johnson G, Kadar D. 1973. Elimination of tritiated gentamicin in normal human subjects and in patients with severely impaired renal function. *Clin Pharmacol Ther* 14(5):815-22.
162. Wullt B. 2003. The role of P fim fimbriae for *Escherichia coli* establishment and mucosal inflammation in the human urinary tract. *Int J Antimicrob Agents* 21(6):605-621.
163. Yin Y, Wu Z, Lin C, Guan J, Wen Y, Li L. 2008. NIMH Collaborative HIV/STD Prevention Trial Group. Syndromic and laboratory diagnosis of sexually transmitted infection: a comparative study in China. *Int J STD AIDS* 19:381-4.
164. Yue W, Grizot S, Buchanan S. 2003. Structural evidence for iron-free citrate and ferric citrate binding to the TonB-dependent outer membrane transporter FecA. *Journal of Molecular Biology* 332: 353-368.