



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**PATRONES DE EXPRESIÓN DE LOS GENES ASOCIADOS A LA BIOPELÍCULA EN
CEPAS DE *Escherichia coli* AISLADAS DE INFECCIONES VAGINALES**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ARELI BAUTISTA CERÓN

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ERIC MONROY PÉREZ

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. MARÍA DE LOS ÁNGELES PATRICIA MANZANO GAYOSSO

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

DRA. GLORIA LUZ PANIAGUA CONTRERAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

CD. MX. NOVIEMBRE 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



OFICIO CPCB/1109/2018
Asunto: Oficio de Jurado para Examen de Grado.


M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 15 de octubre de 2018, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **BAUTISTA CERON ARELI**, con número de cuenta 309091653, con la tesis titulada "**Patrones de expresión de los genes asociados a la biopelícula en cepas de *Escherichia coli* aisladas de infecciones vaginales.**", realizada bajo la dirección del **DR. ERIC MONROY PÉREZ**:

Presidente: DR. SERGIO VACA PACHECO
Vocal: DR. PEDRO RAMÍREZ GARCÍA
Secretario: DRA. GLORIA LUZ PANIAGUA CONTRERAS
Suplente: DR. ABRAHAM LANDA PIEDRA
Suplente: DRA. MARIA DE LOS ÁNGELES PATRICIA MANZANO GAYOSSO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 20 de noviembre de 2018.


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

AGRADECIMIENTOS

- Al **Posgrado en Ciencias biológicas, UNAM**
- A la **UNAM DGAPA PAPIIT IN216517** por el apoyo financiero para la realización de este proyecto.
- A la Comisión Nacional de Ciencia y tecnología (**CONACYT**) por otorgarme la beca durante los estudios de posgrado.
- A mi Tutor principal:
Dr. Eric Monroy Pérez
- Al comité tutor:
Dra. María de los Ángeles Patricia Manzano Gayosso
Dra. Gloria Luz Paniagua Contreras

DEDICATORIA

*“Yo me celebro y me canto,
Y cuanto hago mío será tuyo también,
porque no hay átomo en mí que no te pertenezca”.*

Walt Whitman. Canto a mí mismo

- **A mis padres:**

Por demostrarme que con esfuerzo y dedicación todo es posible. Gracias por apoyarme y motivarme en todo momento. Este logro también es de ustedes.

- **A Victor Hugo:**

Por estar siempre en primera fila en cada momento importante en mi vida y nunca soltar mi mano; gracias por tu amorosa paciencia, invaluable apoyo y tu sonrisa que siempre alegra mis días. Te amo

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 Características de <i>Escherichia coli</i>	3
1.2 Infecciones cérvico-vaginales.....	4
1.3 <i>E. coli</i> patógena cérvico-vaginal (CVPEC).....	6
1.4 Factores de virulencia	7
1.5 Adhesinas	9
1.5.1 Fimbria tipo 1 (Fim)	12
1.5.2 Pili asociado a Pielonefritis (Pap)	14
1.5.3 Fimbrias S/F1C	15
1.5.4 Adhesina afimbrial (afa).....	16
1.5.5 Fimbria G y Adhesina M.....	16
1.5.6 Adhesina homóloga al gen regulado por hierro (<i>iha</i>)	17
1.6 Biopelícula.....	17
1.6.1 Comunidades Bacterianas Intracelulares	18
1.7 Toxinas	20
1.8 Sistemas de adquisición de hierro.....	20
1.9 Resistencia bacteriana a los antibióticos	21
2. OBJETIVOS	27
2.1 Objetivo general	27
2.2 Objetivos particulares.....	27
3. ANTECEDENTES	28
4. METODOLOGÍA	30
4.1 Origen de las cepas	30
4.2 Susceptibilidad a los antibióticos en las cepas bacterianas	30
4.3 Extracción del DNA bacteriano.....	31
4.4 Detección de <i>E. coli</i> por PCR	32
4.5 Cuantificación de biopelícula en las cepas CVPEC	32
4.6 Detección de los genes de resistencia a antibióticos en las cepas por PCR.....	33
4.7 Detección de los genes de adhesión por PCR	36
4.8 Electroforesis	37

4.9 Infección del cultivo de la línea celular A431 para la expresión de los genes asociados a la biopelícula en cepas CVEC.	38
4.10 Extracción y purificación de RNA de las cepas de <i>E. coli</i>	38
4.11 Reversotranscripción.....	40
4.12 Expresión de los genes de adhesión por PCR en tiempo real (RT-PCR).....	41
4.13 Análisis estadístico.....	42
5. RESULTADOS	43
5.1 Pacientes analizadas.....	43
5.2 Identificación de <i>E. coli</i> por PCR.....	44
5.3 Susceptibilidad a los antibióticos.....	46
5.4 Detección de los genes de resistencia a los antibióticos de las cepas.....	47
5.5 Cuantificación de biopelícula.....	48
5.6 Detección y expresión de los genes de adhesión de las cepas CVPEC.....	48
5.7 Asociación de la expresión de los genes de adhesión con la formación de biopelícula en las cepas CVPEC.....	49
5.8 Patrones de expresión de los genes de adhesión en cepas CVPEC asociados a los genes de resistencia a los antibióticos.....	50
5.9 Asociación del número de antibióticos que resisten las cepas CVPEC con la formación de biopelícula.....	53
6. DISCUSIÓN	54
6.1 Infecciones cérvico-vaginales.....	54
6.2 Cepas CVPEC multirresistentes a los antibióticos.....	56
6.3 Detección de los genes de resistencia a los antibióticos en las cepas CVPEC.....	57
6.3.1 Genes de resistencia a los betalactámicos.....	58
6.3.2 Genes de resistencia a los aminoglucósidos.....	59
6.3.3 Genes de resistencia a cloranfenicol.....	59
6.3.4 Genes de resistencia a tetraciclina.....	60
6.3.5 Genes de resistencia a trimetoprim/sulfametoxazol.....	60
6.3.6 Genes de resistencia a quinolonas.....	61
6.4 Cepas CVPEC formadoras de biopelícula.....	61
6.5 Detección y expresión de los genes de adhesión en las cepas CVPEC.....	62
6.5.1 Gen <i>fimH</i> (fimbria tipo 1).....	63
6.5.2 Gen <i>iha</i> (adhesina homóloga al gen regulado por hierro).....	64
6.5.3 Gen <i>pap</i> (pili asociado a pielonefritis).....	64
6.5.4 Gen <i>sfa</i> (fimbria S) y gen <i>foc</i> (fimbria F1C).....	65
6.5.5 Gen <i>afa</i> (Adhesina afimbrial).....	66

6.5.6 Genes <i>gafD</i> (Fimbria G) y <i>bmaE</i> (Adhesina M)	66
6.6 Asociación de la expresión de los genes de adhesión con la formación de biopelícula en las cepas CVPEC	67
6.7 Patrones de expresión de los genes de adhesión en cepas CVPEC asociados a los genes de resistencia a los antibióticos	67
7. CONCLUSIONES	69
8. ANEXO	70
9. LITERATURA CITADA	86

RESUMEN

Escherichia coli es el principal agente etiológico de las infecciones genitourinarias, entre ellas las infecciones cérvico-vaginales. En este estudio se utilizó un modelo de infección *in vitro* de la línea celular A431 con *E. coli* cérvico-vaginal (CVPEC) para promover la expresión de los genes que codifican proteínas de adhesión, uno de los factores clave para el establecimiento de la infección. La expresión de los genes de adhesión se evaluó por PCR en tiempo real. Además, se determinó la frecuencia de cepas formadoras de biopelícula por la técnica de adhesión a placas de poliestireno y la prevalencia de genes de resistencia a los antibióticos por PCR. Se analizaron 200 cepas aisladas de pacientes con infección cervicovaginal provenientes de dos clínicas de IMSS en el Estado de México. Las cepas de *E. coli* fueron identificadas por pruebas bioquímicas y por PCR mediante la amplificación del gen *16S rRNA*. Los genes de adhesión expresados con mayor frecuencia por las cepas CVPEC fueron *iha* (n=103) y *papA* (n=28) con el 100%, en cada caso, seguidos por *fimH* con el 96.1% (n=172), *papG alelo II* con el 94% (n=63). El 73% (n=146) de las cepas CVPEC fueron formadoras de biopelícula, dentro de las cuales la mayoría se clasificó como formadora de biopelícula débil (44%, n=88). El 98.5% (n=197) de las cepas CVPEC analizadas fueron multirresistentes a los antibióticos, producto de la elevada prevalencia de genes que codifican resistencia a los antimicrobianos, entre los que destacan *aac(3)-II* con el 82.5% (n=165), *qnrB* con el 80.5% (n=161) y *TEM* con el 61.5% (n=123). Se detectaron 33 patrones de expresión de los genes de adhesión, siendo el más frecuente *fimH/iha* en el 21.5% (n=43) de las CVPEC. La adhesión y la producción de la biopelícula por *E. coli* son mecanismos importantes durante la patogénesis de las infecciones vaginales. Los resultados obtenidos evidenciaron que las cepas de *E. coli* expresaron diversos genes para la adhesión a las células vaginales A431 atributo que sumado a la capacidad de formar biopelícula y su resistencia a los antibióticos dificulta la erradicación de las infecciones y podría incrementar el riesgo de padecer infecciones del tracto urinario.

ABSTRACT

Escherichia coli is the primary cause of urogenital tract infections. For this study, an *in vitro* infection model of the A431 cell line with cervico-vaginal *E. coli* (CVPEC) was used to promote the expression of the genes that encode adhesion proteins, the most vital step in the establishment of the infection. The expression of the adhesion genes was evaluated by real-time PCR. In addition, *In vitro* biofilm formation by these isolates was determined using the 96-well microtiter-plate test, and PCR assays were used for detection of antimicrobial resistance genes of CVPEC. Totally, 200 strains isolates from Mexican women were characterized. The strains of *E. coli* were identified by biochemical tests and by PCR by amplification of the 16S rRNA gene. The most frequently adhesion genes expressed by the CVPEC strains were *iha* (n=103) and *papA* (n=28) with 100%, in each case, followed by *fimH* with 96.1% (n=172), *papG allele II* with 94% (n=63). Biofilm production assay showed that 73% (n = 146) of the total isolates were biofilm producers, among which most were weak biofilm producers (44%, n=88). A high percentage of the isolated strains (98.5%, n=197) were multiresistant to antibiotics, and harboured several antimicrobial resistance genes among which *aac(3)-II* (82.5%, n=165), *qnrB* (80.5%, n=161) and *TEM* (61.5%, n=123) were the most prevalent. Additionally, 43 (21.5%) strains expressed the pattern *fimH/iha*. The adhesion and biofilm production are important elements during the pathogenesis of vaginal infections. The results obtained showed that *E. coli* strains expressed several genes for adhering to A431 cells, which together with the ability to form biofilm and resistance to antibiotics make it difficult to eradicate infections and could increase the risk of infections of the urinary tract.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Características de *Escherichia coli*

La familia *Enterobacteriaceae* incluye a diversas especies de importancia médica, entre las cuales se encuentra *Escherichia coli*. Esta bacteria tiene la habilidad de colonizar numerosos nichos en el ambiente y es parte de la microbiota intestinal humana, donde comúnmente establece una relación simbiótica con su hospedero aportando nutrientes, señales clave para el desarrollo y regulación de la respuesta inmune, y protección contra bacterias patógenas. Paradójicamente, *E. coli* es el agente etiológico de diversas patologías intestinales y extraintestinales (Wiles *et al.*, 2008; Greenwood *et al.*, 2007).

Como otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, *E. coli* es un bacilo Gram negativo cuyo tamaño oscila entre 2 y 3 μm , no forma esporas, es anaerobio facultativo capaz de fermentar glucosa y otros azúcares, reduce nitrato a nitrito y produce catalasa, pero no oxidasa. Por su capacidad para fermentar lactosa, *E. coli* produce colonias redondas de color rosado en el agar McConkey y presenta colonias redondas con brillo verde metálico en el agar Eosina Azul de Metileno (EMB); además se detecta la producción de α -hemolisina en el agar sangre (Croxen *et al.*, 2013).

La envoltura celular de *E. coli* es una estructura multilaminar; la membrana citoplasmática consiste en una bicapa fosfolipídica que regula el paso de nutrientes, metabolitos y macromoléculas. La siguiente es una capa delgada de peptidoglucano adyacente a un espacio periplásmico que contiene una elevada concentración de proteínas. La membrana externa también es una bicapa de fosfolípidos que incluye lipopolisacáridos (LPS), lipoproteínas y porinas multiméricas (Puerta y Mateos, 2010). La superficie celular de *E. coli* está provista de cápsula; flagelos, que son estructuras utilizadas para la locomoción; fimbrias, con importante función de adhesión y el pili sexual, que media la transferencia de plásmidos (Prats, 2012). La estructura antigénica permite la tipificación de *E. coli*, con base en las diferencias entre los tres antígenos estructurales: O (somático; componente del lipopolisacárido), H (flagelar) y K (capsular). El serotipo de una

bacteria está definido por la combinación específica de antígenos O y H, y el serogrupo se determina por la identificación del antígeno somático. Se han descrito más de 200 antígenos somáticos y 53 flagelares, la presencia de serotipos específicos está asociada a patologías particulares (Kaper *et al.*, 2004).

Las cepas de *E. coli* frecuentemente permanecen como simbioses inocuos en la mucosa del colon, sin embargo, debido a su considerable diversidad genómica, existen cepas que divergen de su estado comensal y tienen la capacidad de diseminarse y colonizar otros sitios del hospedero incluyendo sangre, sistema nervioso central y aparato genitourinario, ocasionando diversas enfermedades (Lloyd, *et al.*, 2007; Yang y Wang, 2014). Las cepas patógenas de *E. coli* se clasifican como *E. coli* diarreogénicas y *E. coli* patógenas extraintestinales (ExPEC). Existen seis patotipos intestinales; *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) y *E. coli* difusa adherente (DAEC). Dentro de las ExPEC, 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 y Johnson, 2002).

1.2 Infecciones cérvico-vaginales

Las infecciones cérvico-vaginales son uno de los trastornos femeninos que generan altos índices de visitas al ginecólogo y tienen impacto significativo en la salud y vida social de las mujeres (Rashki *et al.*, 2014). En México, estas infecciones se encuentran dentro de los diez principales motivos de consulta en el servicio ginecológico del IMSS y representan el 38% de las consultas a mujeres de 20 a 59 años (Delgado *et al.*, 2015).

La vaginitis es un trastorno inflamatorio infeccioso, que puede presentarse como vaginosis bacteriana, candidosis vulvovaginal (*Candida* spp.) y tricomoniasis (*Trichomonas vaginalis*). La vaginosis bacteriana (VB) es la causa más frecuente de vaginitis, se ha estimado que afecta a alrededor del 30% de la población (Livengood, 2009). La VB es consecuencia del reemplazo de la microbiota vaginal normal (*Lactobacillus* spp.) por bacterias anaerobias ocasionando cambios en las

propiedades del fluido vaginal (Mendling, 2016). Se ha reportado que las infecciones vaginales están asociadas a diversas complicaciones ginecológicas y obstétricas como aumento en el riesgo de padecer enfermedad inflamatoria pélvica, resultados adversos en el embarazo, riesgo de infecciones de vías urinarias e infecciones de transmisión sexual, así como problemas de infertilidad (Schwebke, 2003).

La vaginosis bacteriana se asocia fuertemente a la sustitución de la microbiota normal por el patógeno anaerobio *Gardnerella vaginalis*, sin embargo, en la vaginosis aeróbica (VA) predominan otros agentes bacterianos como *Escherichia coli*, *Streptococcus* grupo B, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus* (Han *et al.*, 2014). La vaginosis aeróbica es un tipo de vaginitis cuyo diagnóstico evalúa las siguientes manifestaciones clínicas: flujo vaginal amarillento y fétido, pH vaginal elevado (>5), test de amina negativo en presencia de KOH y la presencia de grandes cantidades de leucocitos en la evaluación microscópica (hpf=400X) (Tempera y Furneri, 2010). Los criterios microscópicos para el diagnóstico de VA fueron descritos por Donders *et al.*, 2002 (Tabla 1), para lo cual se cuantifican los lactobacilos y otros morfotipos (Grado I: Lactobacilos predominantes, escasas bacterias cocoides; Grado IIa: Predominancia de lactobacilos y presencia de otras bacterias; Grado IIb: Disminución de lactobacilos y presencia de otras bacterias; Grado III: Predominancia de otras bacterias sin presencia de lactobacilos) además de otros cuatro parámetros: el número proporcional de leucocitos, la presencia de granulocitos, el tipo de morfotipo predominante (coliformes, cocos y cadenas) y la presencia de células epiteliales parabasales. El diagnóstico de VA es la suma del puntaje obtenido para cada uno de los parámetros antes mencionados; entonces el puntaje de 1-4 para VA representa a la microbiota vaginal normal, el puntaje de 3-4 indica VA leve, puntaje de 5-6 VA moderada y un puntaje entre 6 a 10 indica VA severa.

Tabla 1. Criterios para el diagnóstico microscópico de VA (400X, microscopio de contraste de fases).

Puntaje de VA	Grado de lactobacilos	No. de leucocitos	Proporción de granulocitos	Morfotipos bacterianos	Proporción de células parabasales
0	I y IIa	≤10/hpf	ninguno o esporádicos	insignificante o citolisis	ninguna o <1%
1	IIb	>10/hpf y 10/ células epiteliales	≤50% de leucocitos	coliformes pequeños	≤10%
2	III	>10/ células epiteliales	>50% de leucocitos	cocos o cadenas	>10%

1.3 *E. coli* patógena cérvico-vaginal (CVPEC)

E. coli patógena cérvico-vaginal (CVPEC) es el principal agente etiológico de las infecciones genitourinarias que afecta a alrededor del 60% de las mujeres a lo largo de su vida (Rashki *et al.*, 2014). Las CVPEC comparten genes de virulencia con otros patotipos extraintestinales como *E. coli* uropatógena (UPEC), estos factores de virulencia facilitan el desarrollo y persistencia de la infección, al permitir la colonización, la evasión de la respuesta inmune del hospedero, la inducción de la respuesta inflamatoria y el daño al tejido (Johnson y Stell, 2000). Dentro del tracto vaginal, CVPEC probablemente sigue un esquema de patogénesis similar al que exhibe UPEC. El proceso infeccioso comienza con la unión fuerte e irreversible del patógeno a la mucosa epitelial (Antão *et al.*, 2009), seguida por la invasión y multiplicación bacteriana dentro de las células del hospedero (Justice *et al.*, 2004; Rosen *et al.*, 2007). Este contacto con las bacterias patógenas, activa la respuesta inflamatoria del hospedero (Mulvey, 2002). Además de la protección que ofrece la replicación en el nicho intracelular, *E. coli* posee otras estrategias para evadir la respuesta inmune del hospedero como la expresión de la cápsula de lipopolisacáridos y otros factores que inhiben o interfieren con la acción bactericida del suero (Miajlovic y Smith, 2014). Los factores de virulencia de los patotipos de *E. coli* intervienen durante las diferentes etapas de la infección, en consecuencia, la presencia de factores particulares

podría vincularse con ciertas manifestaciones de la enfermedad (Lüthje y Brauner, 2014).

1.4 Factores de virulencia

Los factores de virulencia son atributos que permiten a un microorganismo establecerse y replicarse en/dentro del tejido de un hospedero, en consecuencia, dichos atributos potencian su patogenicidad (Köves y Wullt, 2016). Si bien la expresión de un solo factor de virulencia no es suficiente para la patogénesis, un arreglo complementario de genes que incluye adhesinas, toxinas, sistemas de adquisición de hierro y protectinas (Tabla 2) puede dirigir la interacción específica entre el patógeno y las células del hospedero que puede ocasionar enfermedad (Wurpel *et al.*, 2016).

La plasticidad genómica de los patotipos de *E. coli* se debe a que la mayoría de los genes de virulencia se encuentran como operones dentro de Islas de Patogenicidad (PAIs). Las PAIs típicamente exhiben sitios G+C que difieren del resto del cromosoma, contienen genes involucrados en la movilidad genética (Integrasas, transposasas y origen de replicación) que facilitan su diseminación por transferencia horizontal y están insertadas adyacentes a los genes *tRNA* (Hacker *et al.*, 1997; Croxen y Finlay, 2010). La adquisición de nuevo material genético por transferencia horizontal, ya sea directamente por transformación al incorporar DNA desnudo por transducción con fagos o mediante la incorporación de plásmidos por conjugación- es un mecanismo importante en la generación de diversidad genética entre las especies bacterianas (Frost *et al.*, 2005). Otro factor que contribuye a la adaptación de un patógeno a un nicho en particular es la reducción genómica por modificaciones en el DNA como mutaciones o rearrreglos cromosómicos (Ahmed *et al.*, 2008).

Tabla 2. Genes de virulencia de *E.coli*.

Gen (factor de virulencia)	Función	Referencia
ADHESINAS		
<i>fimH</i> (fimbria tipo 1)	Adhesión a la mucosa del epitelio, internalización y formación de biopelícula, inducción de citocinas.	Bergsten <i>et al.</i> , 2005; Anderson <i>et al.</i> , 2003; Martinez <i>et al.</i> , 2000.
<i>pap</i> (pili asociado a pielonefritis)	Adhesión a la mucosa y matriz extracelular del epitelio, inducción de citocinas	Wullt <i>et al.</i> , 2002; Hendlund <i>et al.</i> , 1999.
<i>sfaS</i> (fimbria S)	Adhesión a la mucosa epitelial de vías urinarias bajas y altas	Bien <i>et al.</i> , 2012.
<i>afa</i> (adhesina afimbrial)	Adhesión a la mucosa y matriz extracelular del epitelio, internalización, inducción de citocinas	Le Bouguéneq, 2005; Plançon <i>et al.</i> , 2003.
<i>iha</i> (adhesina homóloga al gen regulado por hierro)	Adhesión a las células de la vejiga.	Johnson <i>et al.</i> , 2005.
<i>focG</i> (fimbria F1C)	Adhesión a la mucosa y células endoteliales.	Emödy <i>et al.</i> , 2003.
<i>gafD</i> (fimbria G) <i>bmaE</i> (adhesina M)	Hemaglutininas	Rhen, <i>et al.</i> , 1986a.
TOXINAS		
<i>hlyA</i> (hemolisina α)	Citotoxicidad, hemólisis, inhibe la quimiotaxis y fagocitosis	Bien <i>et al.</i> , 2012; Dhakal y Mulvey, 2012.
<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.
ADQUISICIÓN DE HIERRO		
<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; Garcia <i>et al.</i> , 2011.
<i>fyuA</i> (yersiniabactina)	Receptor del sideróforo yersiniabactina, Formación de biopelícula.	Bien <i>et al.</i> , 2002; 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> , 2006.
PROTECTINAS		
<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.

1.5 Adhesinas

La superficie bacteriana de *E. coli* está provista de proteínas adhesivas que median su interacción con las células hospederas; cada tipo de adhesina reconoce componentes específicos expresados por las células eucariotas (Tabla 3). Las adhesinas se clasifican como fimbriales o afimbriales, dependiendo si son parte de los apéndices proteicos (fimbrias) que rodean la superficie bacteriana o se encuentran como proteínas monoméricas ancladas directamente a la superficie (Mulvey, 2002). La expresión de adhesinas es crítica durante las etapas tempranas de la infección: además de mediar el primer contacto entre las bacterias y las células hospederas; permiten la colonización de distintos tejidos y la formación de una biopelícula bacteriana en el nicho intracelular (Wright y Hultgren, 2006).

Tabla 3. Adhesinas en *E.coli*.

Adhesina	Gen	Receptores
Fimbria tipo 1	<i>fimH</i>	Glicoproteínas manosiladas, glicoproteína Tamm-Horshfall (uromodulina), IgA, componentes de la Matriz Extracelular (colágena tipo I y IV, laminina y fibronectina).
Pili P	<i>papG (I,II,III)</i>	Motivos galabiosa (Gal α 1-4Gal) en glucolípidos.
Fimbria S/F1C	<i>sfaS/focH</i>	Residuos de ácido siálico, plasminógeno
Adhesina afimbrial	<i>afa</i>	Factor Acelerador del Decaimiento (DAF)
Fimbria G	<i>gafD</i>	Motivos N-Acetilgalactosamina (β -GalNac-1,4-Gal)
Adhesina M (aglutinina M)	<i>bmaE</i>	Antígeno del grupo sanguíneo M (glicoforina α)
Curli	<i>csg</i>	Fibronectina, laminina, plasminógeno,
Hemaglutinina termosensible	<i>tsh</i>	Hemoglobina, fibronectina, colágena tipo IV

Cada tipo de fimbria está codificada por un operón que contiene la información para la expresión de las proteínas que conforman las subunidades fimbriales (pilinas) y la maquinaria de ensamble y secreción (Figura 1) (Kline et al., 2010). La mayoría de las fimbrias expresadas por las bacterias Gram negativas, son polimerizadas en la superficie bacteriana por la vía de secreción Chaperona-Usher (CU); *fim* y *pap* son las fimbrias mejor caracterizadas en UPEC, se ensamblan como polímeros lineales formados por cientos o miles de subunidades en cuyo extremo fibrilar exhiben la proteína de adhesión (Figura 2). Las fimbrias S/F1C, la adhesina afimbrial, la fimbria G y la adhesina M, también son sintetizadas por la vía CU en *E. coli* (Zav'yalov et al., 2010).

La vía Chaperona-Usher toma su nombre por los componentes de la maquinaria de secreción: una chaperona en el espacio periplasmático y una proteína de membrana externa denominada acomodador (Usher). La biogénesis fimbrial por esta vía implica la secreción de las pilinas a través de la membrana plasmática, cuyo plegamiento correcto es asistido por la chaperona periplásmica; el Usher actúa como plataforma de ensamblaje y como maquinaria de translocación, permitiendo la exportación de las fimbrias recién sintetizadas a la superficie extracelular (Wurpel et al., 2013).

Además del ensamble de adhesinas en estructuras fimbriales, las cepas de *E. coli* exhiben adhesinas ancladas directamente a su superficie bacteriana. Una considerable proporción de las adhesinas no fimbriales pertenece al grupo de las proteínas autotransportadoras (Lüthje y Brauner, 2014). La mayoría de estas adhesinas son ensambladas en la superficie por la vía de secreción tipo V (Henderson y Nataro, 2001). Las proteínas autotransportadoras se caracterizan por la presencia de dos subunidades (α y β) que contienen la información requerida para atravesar la membrana y alcanzar la superficie bacteriana. El dominio β se inserta en la membrana externa y al formar un poro, dirige la secreción del dominio funcional α que se ancla a la superficie donde permanecerá unida (Le Bouguéneq, 2005).

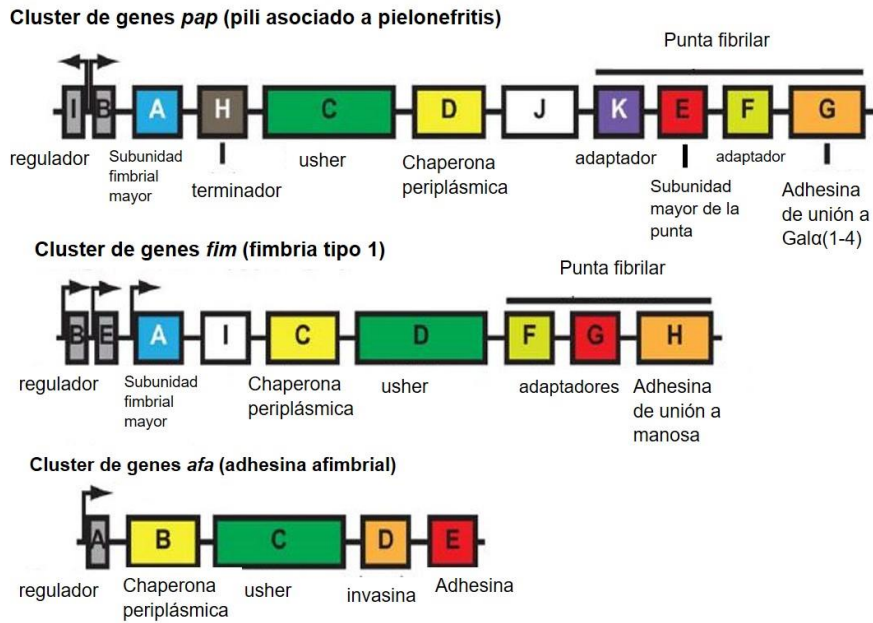


Figura 1. Organización y función de los diferentes operones que codifican para el pili asociado a pielonefritis (*pap*), la fimbria tipo 1 (*fim*) y la adhesina afimbrial (*afa*) (Tomada de Chahales y Thanassi, 2015).

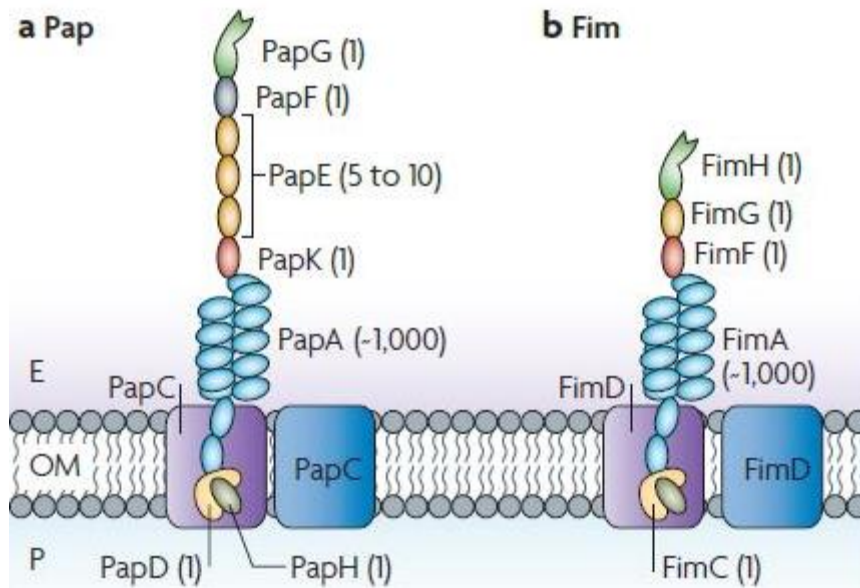


Figura 2. Representación esquemática del Pili P (a) y la Fimbria tipo 1 (b). Los números indican el número de copias de cada subunidad en la fimbria. E=espacio extracelular; P= Periplasma; OM= Membrana Externa (tomada de Waksman y Hultgren, 2009).

La expresión de adhesinas fimbriales y no fimbriales en *E. coli* está regulada por variación de fase (cambio reversible entre los estados de expresión/no expresión) en respuesta a diversas señales ambientales (Bloomfield, 2001; Snyder *et al.*, 2005). La intercomunicación (cross-talk) entre los operones de genes de adhesión permite la programación secuencial de los eventos de expresión génica, controlando así la especificidad de adherencia bacteriana (Xia *et al.*, 2000; Snyder *et al.*, 2005). Esto implica que, en una población bacteriana solo una proporción expresa un tipo de adhesina en un tiempo definido. La evolución de mecanismos de control coordinados que actúan sobre los operones de genes de adhesión previene la co-expresión de ciertas adhesinas y asegura su expresión secuencial, consolidando así el evento de colonización en diversos tejidos del hospedero (Holden y Galy, 2004; Snyder *et al.*, 2006).

Durante la patogénesis, las interacciones mediadas por adhesinas pueden estimular diversas respuestas en el hospedero que influyen directamente en el éxito de la infección. La fijación bacteriana activa la respuesta innata del hospedero, que incluye la inducción de citocinas y el reclutamiento de neutrófilos hacia el sitio de infección (Mulvey, 2002). Las moléculas de reconocimiento del patrón, como los receptores tipo Toll (TLR) son los principales efectores de esta respuesta; TLR-4 reconoce el lipopolisacárido (LPS) en la superficie de *E. coli* y TLR-5 reconoce la flagelina bacteriana (Lu *et al.*, 2008; Smith *et al.*, 2003). Se ha descrito que la unión de las fimbrias FimH y Pap a los componentes del urotelio promueve la respuesta inflamatoria a través de la vía TLR-4 (Bergnsten *et al.*, 2005); la fimbria tipo 1 aumenta la respuesta urotelial de citocinas mediante un mecanismo dependiente de LPS (Schilling *et al.*, 2003) y el pili P induce una respuesta independiente de LPS y dependiente de proteincinasas de serina y treonina (Hendlund *et al.*, 1999; Frendeus *et al.*, 2001).

1.5.1 Fimbria tipo 1 (Fim)

La fimbria tipo 1 está codificada en el operón *fim*, un elemento ampliamente distribuido en *E. coli* patógenas y comensales (Mulvey, 2002). Una bacteria que expresa la fimbria tipo 1, típicamente exhibe un arreglo peritrico de 200-500

fimbrias en su superficie; cada apéndice mide aproximadamente 1 μm de largo y consiste en una varilla gruesa formada por alrededor de 1000 copias de FimA unida a una estructura fibrilar que contiene dos proteínas adaptadoras, FimF y FimG, y la proteína adhesiva FimH en la punta (Schembri *et al.*, 2001) (Figura 2). La fimbria tipo 1 reconoce los motivos manosa en la superficie de las células y los epitopes de péptidos y glicoproteínas secretadas con estructuras similares (Bergsten *et al.*, 2005) (Tabla 2). La expresión de *fim* es crucial en el desarrollo de infecciones ocasionadas por *E. coli*, especialmente en vías urinarias donde media la colonización, invasión y persistencia de UPEC en el modelo murino (Flores *et al.*, 2015). El receptor para la adhesina FimH es la uroplaquina, una proteína altamente manosilada abundante en las células uroteliales (Figura 3) (Zhou *et al.*, 2001).

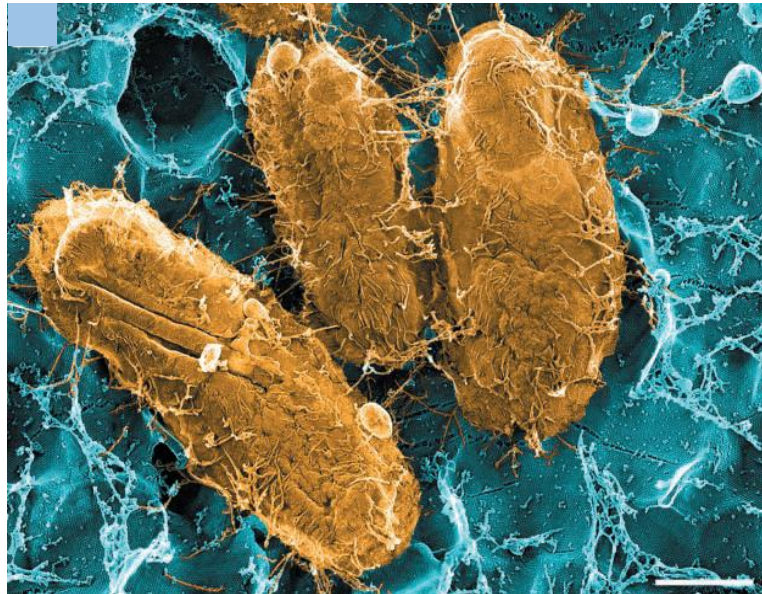


Figura 3. Adhesión de *E.coli* al epitelio de la vejiga mediada por la fimbria tipo 1. Imagen de microscopía electrónica con la técnica de grabado por congelación; barra=0.5 μm . (Tomada de Mulvey *et al.*, 2000).

Además de las uroplaquinas, las integrinas α_3 o β_1 (glicoproteínas abundantes en las células del urotelio) también son receptores para UPEC y permiten la colonización del interior celular. La unión FimH-integrinas desencadena vías de transducción de señales que activan a las GTPasas Rho, lo cual ocasiona rearrreglos focalizados de actina y la entrada de UPEC mediante un "mecanismo

zíper" en el cual una porción de membrana plasmática de la célula urotelial rodea y encierra a UPEC para su subsecuente internalización (Martínez y Hultgren, 2002).

La expresión de *fim* es regulada a nivel transcripcional por un promotor situado en un elemento invertible que puede cambiar entre dos orientaciones. La orientación ON permite la transcripción del gen de la subunidad estructural mayor, *fimA* y otros genes accesorios, resultando en la expresión de la fimbria tipo 1. Cuando el promotor está en la posición opuesta (OFF), no ocurre transcripción fimbrial (Gunther *et al.*, 2002). La orientación del elemento invertible, es determinada por dos recombinasas sitio específicas, *fimE* que promueve el cambio de fase ON a OFF y *fimB* que permite el cambio en ambas direcciones (Snyder *et al.*, 2006). Además de las recombinasas sitio específicas (FimB y FimE), aproximadamente 20 proteínas auxiliares están involucradas en el proceso de variación de fase (Schwan, 2011). Entre éstas se incluyen diversos reguladores globales como el Factor de Integración del Huésped (IHF), la Proteína Reguladora sensible a Leucina (Lrp) y la proteína estructurante del nucleoide tipo histona (H-NS) que influyen en la inversión del intercambiador *fim* (Schembri *et al.*, 2002) también las proteínas reguladoras de otros operones que afectan la expresión de *fim* a través de intercomunicación (cross-talk); los reguladores del pili P y la fimbria S (PapB y SfaB/SfaX, respectivamente) inhiben la expresión de la fimbria tipo 1 (Xia *et al.*, 2000; Holden *et al.*, 2006; Holden *et al.*, 2001).

1.5.2 Pili asociado a Pielonefritis (Pap)

El pili P codificado por el operón *pap* (Figura 1), es un factor de virulencia prevalente en las cepas patógenas de *E. coli* (Bergsten *et al.*, 2005). La estructura del pili P (Figura 2) es similar a la fimbria tipo 1, consiste en una varilla rígida formada por alrededor de 1000 copias de PapA, conectada a la punta fibrilar por la proteína adaptadora PapK. La punta fibrilar es flexible y exhibe en el extremo distal a la adhesina PapG más 5 ó 6 copias de la proteína adaptadora PapE (Waksman y Hultgren, 2009).

La expresión de *pap* es regulada por cambios epigenéticos reversibles dependientes de metilación. La fase variable del pili P está controlada por los reguladores globales Lrp y la metiltransferasa Dam (DNA adenina metilasa), así como los reguladores locales PapI y PapB (Hernday *et al.*, 2002). La competencia entre Lrp y la metiltransferasa Dam por el acceso a los dos sitios de unión en la región reguladora del promotor (*papBA*) determina si el operón *pap* es transcripcionalmente activo o no (Blomfield, 2001). La metilación del sitio GATC proximal al promotor permite la expresión del operón *pap*, en contraste la unión de Lrp a este sitio impide su metilación y la transcripción. Una vez que el operón se encuentra activo, un mecanismo innato lo mantiene en este estado (Subashchandrabose y Mobley, 2015). PapB activa la transcripción de *papI* y PapI promueve la unión de Lrp al sitio GATC distal, permitiendo a la RNA polimerasa iniciar la transcripción del operón *pap*, sin embargo a altas concentraciones PapB reprime la transcripción (Totsika *et al.*, 2008).

1.5.3 Fimbrias S/F1C

La fimbria S y la fimbria F1C están relacionadas genéticamente y su secuencia de nucleótidos exhibe un alto grado de homología, sin embargo, difieren en su especificidad por el receptor: la fimbria S tiene afinidad por los receptores que contienen motivos ácido siálico y la fimbria F1C se une a los residuos N-acetilgalactosamina (β -GalNac-1) y 4 β -Gal en los glucolípidos expresados por las células de los túbulos renales y de la vejiga (Khan *et al.*, 2000; Bäckhead *et al.*, 2002). El operón *foc* contiene 7 genes involucrados en la biogénesis de la fimbria F1C incluyendo *focA* que codifica para la subunidad fimbrial mayor, *focG/F* codifican la subunidad fimbrial menor, *focC* codifica la chaperona periplásmica y *focH* cuyo producto es la adhesina localizada en la punta fibrilar (Spurbeck y Mobley, 2013). El operón *sfa* también está constituido por 7 genes que codifican para la fimbria S, la subunidad fimbrial mayor (*sfaA*), tres subunidades menores (*sfaS/G/H*) y dos proteínas regulatorias (*sfaB/C*) (Antao *et al.*, 2009). La adhesina SfaS se encuentra en el extremo distal de la fimbria y media las interacciones con los receptores en la superficie de las células renales y endoteliales; también la subunidad mayor SfaA tiene propiedades adhesivas (Klemm *et al.*, 2010).

1.5.4 Adhesina afimbrial (*afa*)

Las adhesinas afimbriales son una familia de moléculas de adhesión producidas por *E. coli* que predominantemente tienen afinidad por el antígeno del grupo sanguíneo Dr (una proteína en la membrana celular de los eritrocitos, también llamada Factor Acelerador del Decaimiento, DAF); mientras algunas adhesinas son afimbriales como AFAI/II/III, otras son fimbriales como Dr y F1845 (Spurbeck y Mobley, 2013). La apariencia de las adhesinas afimbriales puede compararse a la de una fimbria trunca que carece de la subunidad mayor, compuesta únicamente por la subunidad menor en la base unida a la adhesina (Mainil, 2013).

El operón *afa* contiene la información genética para la biogénesis de las adhesinas *afa/Dr*, es expresado por cepas de *E. coli* patógenas asociadas a infecciones intestinales y extraintestinales en humanos y animales (Le Bouguéneec *et al.*, 2001). Los operones *afa/Dr* (Figura 1) están constituidos por al menos cinco genes, los genes *A-D* codifican proteínas accesorias que están altamente conservadas entre los diferentes tipos de operones, mientras el gen *E* cuyo producto es la molécula de adhesión muestra mayor divergencia (Servin, 2005).

1.5.5 Fimbria G y Adhesina M

Las fimbrias F17 son expresadas por *E. coli* patógena y han sido ampliamente detectadas entre animales con diarrea y/septicemia (Le Bouguéneec y Bertin, 1999). Estas fimbrias son heteropolímeros, constituidos por la subunidad estructural mayor F17A, donde cientos de copias se ensamblan para formar la base fimbrial y la adhesina en la subunidad menor F17-G; los polimorfismos en estas subunidades resultan en cambios en la especificidad del receptor (Bihannic *et al.*, 2014). El operón *gaf* codifica la variante G de las fimbrias F17; a través de la adhesina GafD la fimbria G tiene afinidad por los motivos N-Acetilgalactosamina (Saarela *et al.*, 1996). La adhesina M, es una hemaglutinina no fimbrial codificada por el operón *bma*, el gen *bmaE* codifica la adhesina con afinidad al antígeno del grupo sanguíneo M (Rhen *et al.*, 1986b).

1.5.6 Adhesina homóloga al gen regulado por hierro (*iha*)

La adhesina Iha fue identificada originalmente en la cepa de *E. coli* enterohemorrágica O157:H7 como una proteína con homología al receptor sideróforo de enterobactina IrgA en *Vibrio cholerae* (Tarr *et al.*, 2000); Iha es una proteína de membrana externa que además de conferir el fenotipo de adherencia a cepas de laboratorio no adherentes funciona como receptor de sideróforo en los sistemas de adquisición de hierro (Léveillé *et al.*, 2006).

1.6 Biopelícula

Las biopelículas son comunidades bacterianas complejas adheridas irreversiblemente a una superficie biótica o abiótica, embebidas en matriz extracelular producida por los propios microorganismos (Costerton *et al.*, 1999). La matriz extracelular está formada por diversos biopolímeros llamados Sustancias Poliméricas Extracelulares (EPS) incluyendo polisacáridos, proteínas (pili, flagelo y otras fibras adhesivas) y DNA extracelular; estos componentes actúan como un andamio estabilizador para la estructura tridimensional de la biopelícula (Flemming y Wingender, 2010). La matriz de *E. coli*, esta compuesta de celulosa, poliglucosamina y ácido colonico (Soto, 2007). La comunicación intra/inter-especies entre las bacterias dentro de la biopelícula ocurre a través de un mecanismo denominado Quorum Sensing (QS). En la vía de señalización QS, la sobreexpresión de sustancias Autoinductoras (AI) secretadas por los microorganismos una vez que la densidad poblacional es alta, permite la formación y maduración de la biopelícula. Los Autoinductores también están involucrados en otros procesos dentro de la biopelícula como secreción de factores de virulencia y regulación de la respuesta inmune del hospedero (Sharma *et al.*, 2016).

Las biopelículas son el modo de crecimiento predominante entre las bacterias, este arreglo maximiza su supervivencia en diversos nichos en el ambiente y en un hospedero (Jefferson, 2004). La habilidad de las bacterias para formar biopelícula está relacionada con la patología de diversas infecciones y dificulta su erradicación. *E. coli* formadora de biopelícula establece infecciones crónicas en el

intestino y en las vías urinarias, además de estar involucrada en infecciones asociadas a dispositivos médicos (como catéteres o prótesis) (Sharma *et al.*, 2016; Rossi *et al.*, 2018; Donlan, 2001).

1.6.1 Comunidades Bacterianas Intracelulares

Diversos patógenos anteriormente considerados estrictamente extracelulares pueden persistir en el interior de las células del hospedero al adaptarse al crecimiento en Comunidades Bacterianas Intracelulares parecidas a biopelícula (IBCs) (Kostakioti *et al.*, 2013), este tipo de crecimiento alternativo genera un ambiente protector que permite la evasión de la respuesta inmune del hospedero y de la acción de los antibióticos, además de constituir un reservorio para infecciones recurrentes (Lewis *et al.*, 2016; Mulvey *et al.*, 2001).

La primera descripción de crecimiento en IBCs se realizó en un modelo murino de infección con UPEC (Justice *et al.*, 2004; Anderson *et al.*, 2003; Wright *et al.*, 2007; Rosen *et al.*, 2007). Posterior a la adhesión, la internalización de UPEC a las células uroteliales es inducida independientemente por distintos factores de virulencia, incluyendo el Factor Citotóxico Necrotizante (CNF; Chung *et al.*, 2003), las fimbrias afa/Dr (Plançon *et al.*, 2003) y el pili tipo 1 (Fim; Martínez *et al.*, 2000). Dentro de la célula, UPEC es transportada en compartimentos ácidos parecidos a los endosomas tardíos (Eto *et al.*, 2007).

La formación de IBCs involucra diversas etapas que muestran características morfológicas distintivas (Figura 4) (Justice *et al.*, 2004): dentro de las primeras 6 h siguientes a la inoculación de la vejiga, UPEC se divide rápidamente resultando en la formación de pequeños agregados de bacterias baciliformes débilmente asociadas (IBCs tempranas); posteriormente entre las 6-8 h, las bacterias cocoides se compactan dentro de una estructura esférica altamente organizada correspondiente a la morfología de las IBCs maduras. En este arreglo de comunidad parecida a la biopelícula, las bacterias secretan una matriz de polisacárido, creando una zona a su alrededor que establece compartimentos individuales para cada bacteria. La compartimentalización y los diferentes patrones de expresión génica, resultan en la división de las funciones dentro de la

biopelícula realizadas por subpoblaciones altamente especializadas (Anderson *et al.*, 2004).

El estado de IBCs maduras es transitorio y comienzan su propagación horas después de ser formado. Durante esta etapa las bacterias pueden desprenderse de la biopelícula y migrar hacia el exterior celular adoptando una morfología filamentosa (Anderson *et al.*, 2003). Estas estructuras filamentosas son resistentes al ataque de los leucocitos polimorfonucleares (PMN) y facilitan la propagación de UPEC a otras células uroteliales o el ascenso hacia las vías urinarias altas; la internalización de UPEC en las células inmaduras, forma agregados llamados Reservorios Quiescentes Intracelulares (QUIRs) que son una fuente para las infecciones recurrentes (Mysorekar y Hultgreen, 2006).

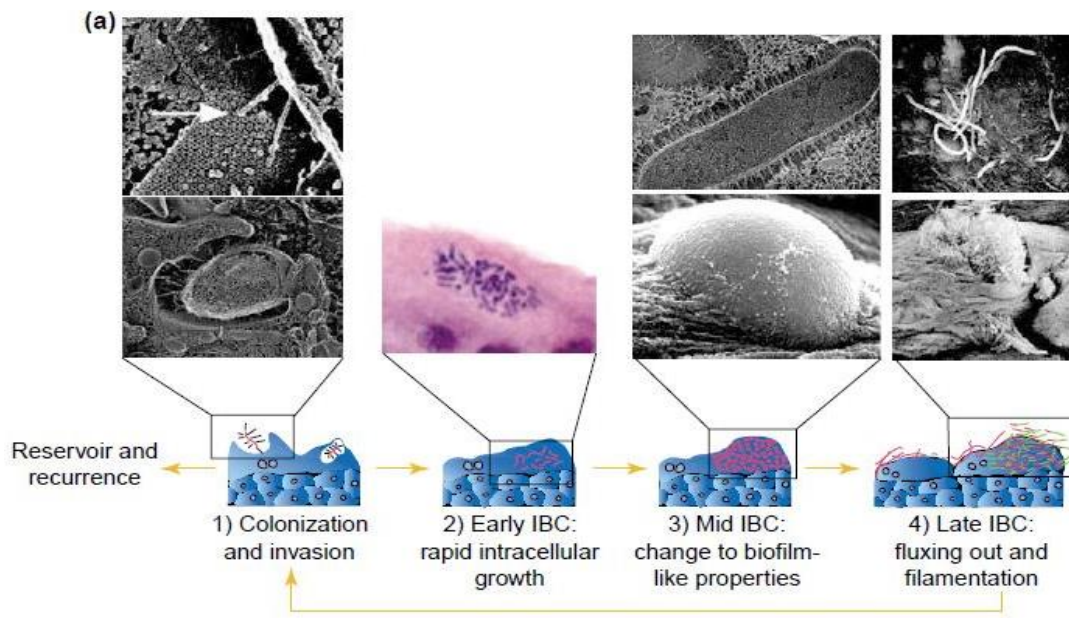


Figura 4. Representación de las etapas de formación y maduración de IBC. 1. Colonización e invasión; interacción de la fimbria tipo 1 con las uroplaquinas e internalización de UPEC mediante el mecanismo zipper. 2. Formación de IBC temprana. 3. Formación de la IBC intermedia, en la cual UPEC interactúa íntimamente con la matriz. 4. IBC madura caracterizada por filamentación y erupción desde la IBC (Tomado de Kau *et al.*, 2005).

1.7 Toxinas

La secreción de toxinas es otro factor importante para la diseminación bacteriana hacia los tejidos más profundos, al ocasionar daño directo a las células epiteliales o al inhabilitar a las células efectoras del sistema inmune del hospedero (Lüthje y Brauner, 2014). Una de las toxinas más comunes es la α -hemolisina (HlyA) que promueve la lisis celular mediante la formación de poros en la membrana, facilitando la liberación de nutrientes y otros factores como el ión férrico que son críticos para el crecimiento y supervivencia bacteriana (Totsika *et al.*, 2012). Otra toxina es el Factor Citotóxico Necrotizante (CNF), su secreción previene la apoptosis de las células epiteliales y contrarresta la actividad fagocítica y quimiotaxis de los Polimorfonucleares (PMN), protegiendo a las bacterias de las defensas del hospedero (Köves y Wullt, 2016).

1.8 Sistemas de adquisición de hierro

El hierro es un micronutriente esencial para el crecimiento bacteriano y se encuentra en bajas concentraciones en el tracto urinario; esta limitación de hierro es una de las defensas innatas contra los patógenos bacterianos, conocida como inmunidad nutricional (Wiles *et al.*, 2008). Para asegurar los niveles intracelulares de Fe^{3+} , las bacterias sobreexpresan genes involucrados en la adquisición de hierro en respuesta a estas limitantes nutricionales (Subaschandrabose y Mobley, 2015). Los sideróforos son moléculas de bajo peso molecular con alta afinidad al Fe^{3+} secretadas por las bacterias; este sistema de adquisición de hierro, está compuesto por la maquinaria molecular de ensamble del sideróforo; el sideróforo que es la molécula de captación de hierro; y el receptor de membrana que internaliza el complejo sideróforo-hierro (Flores *et al.*, 2015). Se han identificado y caracterizado cuatro diferentes sistemas sideróforos: enterobactina, salmoquelina, yersiniabactina y aerobactina (Wiles *et al.*, 2008). Además de la captación de hierro con sideróforos, UPEC posee receptores que se unen directamente a las proteínas transportadoras de Fe^{3+} (p.ej. lactoferrina, transferrina) y a la hemoglobina (Olson *et al.*, 2015).

1.9 Resistencia bacteriana a los antibióticos

La emergencia de cepas patógenas multirresistentes a los antibióticos es un problema de salud que dificulta el tratamiento de las enfermedades infecciosas. Existe un incremento alarmante de cepas multirresistentes que ocasionan infecciones nosocomiales y comunitarias, incluyendo *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) y *Enterococcus* spp. resistente a vancomicina. La Organización Mundial de la Salud considera que la resistencia a los antibióticos es una de las mayores amenazas para la salud mundial en el siglo XXI (Munita y Arias, 2016; Alekshun y Levy, 2007).

Existen más de 15 clases de antibióticos cuyos mecanismos de acción involucran la inhibición de funciones bacterianas fisiológicas o metabólicas, incluyendo la síntesis de pared celular, de proteínas, de ácidos nucleicos o la interferencia con alguna vía metabólica específica, además de la desorganización de la membrana celular (Tenover, 2006; Walsh, 2000). En la tabla 4 se presentan los sitios blanco y los mecanismos de acción de los distintos grupos de antibióticos.

Tabla 4. Mecanismos de acción de distintos grupos de antibióticos.

Antibiótico	Sitio blanco	Mecanismo de acción
Interferencia con la síntesis de Pared celular		
betalactámicos - penicilinas - cefalosporinas - carbapenémicos - monobactámicos	Transpeptidasas PBP (Penicilin binding protein)	Interfiere con la actividad enzimática para la síntesis de la capa de peptidoglucano.
glucopéptidos - vancomicina	Residuos D-Ala del peptidoglucano naciente	Secuestro del sustrato requerido para el entrecruzamiento.
Inhibición de la Síntesis proteica		
macrólidos - eritromicina, - lincomicina, - clindamicina	Subunidad 50S del ribosoma	Interrupción de la actividad del centro peptidil transferasa
cloranfenicol		
tetraciclina	Subunidad 30S del ribosoma	Inhíbe la fase de elongación
aminoglucósidos - estreptomina, - gentamicina, - neomicina		Inhíbe la translocación
Interferencia con la síntesis de ácidos nucleicos		
quinolonas	DNA girasa	Impide la replicación del DNA
rifampicina	RNA polimerasa	Impide la transcripción
Inhibición de vía metabólica		
sulfametoxazol	Enzima dihidropteroato sintasa	Inhíbe la síntesis de ácido fólico, necesario para la síntesis de purinas
trimetoprim	Enzima dihidrofolato reductasa	
Desorganización de la membrana bacteriana		
polimixina	Membranas de las bacterias Gram (-)	Incremento en la permeabilidad, ocasiona muerte celular.

Las bacterias poseen mecanismos de resistencia tan variados como los antibióticos mismos. Esos mecanismos incluyen la reducción de la permeabilidad de la membrana a través de la expresión reducida o ausencia de porinas; la producción de betalactamasas en el espacio periplasmático que degradan los antibióticos betalactámicos; la sobreexpresión de bombas de eflujo transmembranales que expulsan el antibiótico antes de alcanzar el sitio blanco; la producción de enzimas modificadoras de antibiótico, que cambian su estructura y afinidad por el sitio de acción; la mutación del sitio blanco, que inhibe la unión del antibiótico al sitio de acción; las modificaciones o mutaciones en el ribosoma, que evitan la unión del antibiótico permitiendo la síntesis de proteínas; el bypass metabólico que produce un isotipo resistente de la enzima para evadir el efecto inhibitorio del antibiótico y finalmente, la mutación en el lipopolisacárido que impide la unión de polimixina al sitio blanco (Peleg y Hopper, 2010). Entre los genes de resistencia a antibióticos se encuentran: a estreptomicina (*aadA1*), a gentamicina (*aac(3)-IV*), a sulfonamida (*sul1*), a betalactámicos (*blaSHV* y *CITM*), a cloranfenicol (*cat1* y *cmLA*), a tetraciclinas (*tet(A)* y *tet(B)*), a trimetoprim (*dfrA1*) y a quinolonas (*qnr*), en la tabla 5 se presentan los genes y mecanismos de resistencia frecuentes en *E. coli*.

Tabla 5. Principales mecanismos de resistencia de *E. coli* a diferentes grupos de antibióticos

Antibiótico	Mecanismo de resistencia	Genes involucrados	Referencias
Aminoglucósidos	Enzimas modificadoras de aminoglucósidos (AMEs): modifican estos antibióticos mediante reacciones de adenilación, acetilación y fosforilación.	<i>aac(3)/I-IV</i> codifica para N-acetil-transferasa.	Garneau y Labbyb, 2016; Shaw <i>et al.</i> , 1993.
		<i>aadA</i> codifica para O-nucleotidil-transferasa (adenilil-transferasa)	
Trimetoprim-sulfametoxazol	Alteración del sitio blanco	<i>sul1</i> expresa variante de la enzima dihidropteroato sintasa.	Rådström y Swedberg, 1988; Sköld, 2001
		<i>dfrA</i> codifica para variante de la dihidrofolato reductasa	
Betalactámicos	Betalactamasas: Enzimas que hidrolizan el enlace amida del anillo betalactámico, inactivando así el antibiótico.	<i>blaSHV</i> , <i>CITM</i> , <i>blaTEM</i>	Busch y Jacoby, 2010
Cloranfenicol	Inactivación enzimática por acetilación	<i>cat</i> codifica acetil-transferasa	Schwarz <i>et al.</i> , 2004
	Reducción de la permeabilidad de la membrana	<i>cmLA</i> codifica sistemas de exportadores específicos.	
Tetraciclinas	Bombas de eflujo específicas	<i>tet(A)</i> , <i>tet(B)</i> codifican sistemas de eflujo.	Speer <i>et al.</i> , 1992
Quinolonas	Defensa del sitio blanco	<i>qnr</i> codifica pequeñas proteínas que protegen a la DNA topoisomerasa tipo II	Strahilevitz <i>et al.</i> , 2009

La resistencia a los antibióticos tiene origen por mecanismos intrínsecos o adquiridos. Los mecanismos intrínsecos, involucran a los genes ubicados naturalmente dentro del cromosoma bacteriano, como el locus cromosómico *mar* (resistencia múltiple a los antibióticos) encontrado en *E. coli* y otros miembros de

la familia *Enterobacteriaceae* o los genes que codifican betalactamasas tipo *AmpC*. La adquisición de nuevas determinantes de resistencia por transferencia horizontal de elementos genéticos móviles incluyendo plásmidos, transposones o integrones, es uno de los principales factores que contribuyen al aumento de multirresistencia bacteriana (Alekhun y Levy, 2007).

Un plásmido es una molécula de DNA circular de doble cadena que contiene diversos módulos genéticos funcionales, organizados en una unidad autoreplicable o replicón (Frost *et al.*, 2005). Los plásmidos típicamente acarrean genes que otorgan una ventaja selectiva a las bacterias que los portan, como factores de virulencia, adhesinas y genes de resistencia a los antibióticos (Harbottle, 2006). Los plásmidos que acarrean genes de resistencia han sido descritos en bacterias Gram (+), Gram (-) y cepas comensales. La presencia de Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE) es prevalente en *Klebsiella pneumoniae* y *E. coli*, estos genes que codifican betalactamasas con amplio rango de actividad contra penicilinas y cefalosporinas frecuentemente se encuentran insertos en plásmidos que típicamente acarrean otros genes de resistencia a los aminoglucósidos, sulfonamidas y quinolonas; otorgando multirresistencia a las bacterias portadoras (Flores *et al.*, 2015).

Los transposones son elementos genéticos móviles que pueden existir integrados en plásmidos, otros transposones o en el cromosoma del hospedero. En general estos fragmentos contienen regiones terminales y transposasas involucradas en la recombinación en una región genómica específica (Alekhun y Levy, 2007). Los integrones son sistemas de recombinación sitio específicos capaces de reclutar marcos de lectura abiertos en forma de casetes genéticos móviles (Munita y Arias, 2016). Los integrones generalmente se clasifican de acuerdo con la secuencia de la proteína (integrasa) que tiene la función de recombinación. Existen cinco clases de integrones que están involucradas en la diseminación de genes de resistencia a los antibióticos; todas están asociadas a elementos de movilidad genética como secuencias de inserción, transposones y plásmidos conjugativos los cuales permiten la transmisión genética intra/inter específica. La mayoría de los casetes

genéticos de resistencia a los antibióticos prevalentes en las cepas patógenas pertenecen a los integrones de clase I. Estos elementos confieren resistencia a todos los betalactámicos, aminoglucósidos, cloranfenicol, trimetoprim, rifampicina, eritromicina, fosfomicina, lincomicina y antisépticos derivados del amonio cuaternario (Mazel, 2006). Los superintegrones incorporan cientos de casetes genéticos, como el detectado en el cromosoma de *Vibrio cholerae* que acarrea alrededor de 179 casetes genéticos (Mazel *et al.*, 1998).

La multiresistencia a los antibióticos es atribuida principalmente a la adquisición de elementos genéticos móviles, sin embargo los mecanismos intrínsecos como el locus *mar* (resistencia múltiple a los antibióticos) también son relevantes. El locus *mar* de *E. coli* controla la resistencia a diversos compuestos estructuralmente no relacionados incluyendo antibióticos, desinfectantes y solventes orgánicos. Este locus está constituido por cuatro genes *marCRAB*, su expresión es regulada por dos factores de transcripción MarR (represor de resistencia múltiple a los antibióticos) y MarA (activador de resistencia múltiple a los antibióticos). Cuando MarR está activo, la expresión es reprimida y si es inactivado por pequeñas moléculas o está mutado incrementa la transcripción de *marRAB*. El factor de transcripción *marA* regula la expresión de diversos genes incluyendo aquellos específicos para bombas de eflujo y otras proteínas (porinas) que median la susceptibilidad a los antibióticos (Alekshun y Levy, 2004).

La distribución de los diferentes marcadores de virulencia involucrados en la formación de la biopelícula en cepas de *E. coli* uropatógenas ha sido estudiada recientemente (Fattahi *et al.*, 2015), sin embargo, actualmente se desconocen los diferentes perfiles de expresión de estos marcadores de virulencia durante la formación de la biopelícula, por lo que en este estudio se utilizará un modelo *in vitro* de infección de la línea celular vaginal A431 para determinar por PCR en Tiempo Real los distintos patrones de expresión de los genes asociados con la formación de la biopelícula en un grupo de cepas de *E. coli* aisladas de mujeres con infección cérvico-vaginal.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Determinar los diferentes patrones de expresión de los genes involucrados en la formación de la biopelícula en cepas de *E. coli* cérvico-vaginales utilizando un modelo de infección *in vitro* de células vaginales humanas .

2.2 Objetivos particulares

- Determinar el fenotipo de resistencia a antibióticos por el método de Kirby-Bauer en las cepas de CVPEC.
- Cuantificar la formación de la biopelícula de las cepas de CVPEC mediante la adhesión a placas de microtítulo de poliestireno.
- Identificar por PCR convencional los genes asociados a la biopelícula, adhesina afimbrial (*afa*), fimbria M (*bmaE*), fimbria tipo 1 (*fimH*), fimbria G (*gafD*), adhesina no hemaglutinante (*iha*), pili asociado a pielonefritis (*papA*, *papC*, *papEF*, *papG alelo I*, *papG alelo II*, *papG alelo III*), fimbria S (*sfa* y *sfaS*) y fimbria F1C (*focG*) participan en la adhesión en las cepas de CVPEC.
- Detectar los genes que codifican para resistencia a estreptomicina (*aadA1*), gentamicina (*aac(3)-I*, *aac(3)-II*, *aac(3)-III* y *aac(3)-IV*), sulfonamida (*sul1*), betalactámicos (*blaSHV* y *CITM*), cloranfenicol (*cat1* y *cmLA*), tetraciclinas [*tet(A)* y *tet(B)*], trimetoprim (*dfra1*) y quinolonas (*qnrA*, *qnrB* y *qnrS*), en las cepas de CVPEC por PCR convencional.
- Determinar por PCR en Tiempo Real la expresión de los genes asociados a la biopelícula de las cepas de CVPEC utilizando un modelo *in vitro* de infección de células vaginales humanas.

3. ANTECEDENTES

Obata *et al.*, 2002 (Japón) detectaron el perfil de diez factores de virulencia, serogrupos y grupos filogenéticos en 88 cepas de *E. coli* cérvico-vaginales. La frecuencia de los genes de adhesión fueron *fimH* (100%), *papC* (45%), *sfaDE* (20%) y *afa/draBC* (6%).

Snyder *et al.*, 2004 (EUA) evaluaron el perfil de expresión *in vivo* de la cepa de *E. coli* uropatógena CFT037 mediante microarreglos de DNA. Los genes que codifican para la maquinaria de traducción presentaron mayor tasa de expresión. Detectaron una alta sobrerregulación de *fimH*, de los genes que codifican para los sistemas de adquisición de hierro, el antígeno capsular, la síntesis del lipopolisacárido y mecanismo de resistencia a los antibióticos; por otro lado los genes fimbriales *pap*, *foc/sfa* y genes relacionados con la movilidad y quimiotaxis fueron regulados a la baja.

Hilbert *et al.*, 2008 (EUA) caracterizaron dieciocho factores de virulencia, serogrupos y filogrupos de 50 cepas de *E. coli* cérvico-vaginales. Entre los genes de adhesión, el más frecuente fue *fimH* (98%), seguido por *pap* (52%), *sfa/foc* (30%), *iha* (26%) y *afa* (5%).

Ejrnaes *et al.*, 2011 (Suecia) identificaron veintinueve factores de virulencia, grupos filogenéticos y la formación de biopelícula en cepas de *E. coli* aisladas de 155 mujeres con infección de vías urinarias bajas. El gen fimbrial más frecuente fue *fimH* (98%), seguido por *papAH* (47%), *sfa/focDE* (46%), *iha* (23%), *focG* (21%), *afa/draBC* (4%); los genes *gafD* y *bmaE* no fueron detectados.

Argawal *et al.*, 2013 (India) determinaron el perfil filogenético, factores de virulencia y la formación de biopelícula *in vitro* de cepas UPEC aisladas de 172 mujeres con cistitis aguda. El 84% de las cepas fueron productoras de biopelícula. Detectaron la prevalencia de 15 genes de virulencia, el gen de adhesión más frecuente fue *fimH* (87%), seguido por *papGII* (38%), *papA* (26%), *sfa/focDE* (20%), *afa/draBC* y *papGIII* (17%) y *papGI* (4%).

Rashki, 2014 (Irán) reportó la prevalencia de ocho factores de virulencia y su asociación con los grupos filogenéticos y serogrupos, además del patrón de susceptibilidad a antibióticos en 132 cepas de *E. coli* cérvico-vaginales aisladas de mujeres embarazadas y no embarazadas. Los factores de virulencia más frecuentes fueron *fimH* (71%), seguido por *irp2* (63%), *ompT* (45%), *iucD* (37%) e *iron* (31%) y menor prevalencia de *hlyA*, *iha* y *cnf* en 17%, 10% y 9%, respectivamente, distribuidos entre 26 patrones de detección. Las cepas presentaron mayor porcentaje de resistencia a ampicilina, amikacina y cefazolina.

Fattahi *et al.*, 2015 (Irán). Determinaron la formación de biopelícula y los factores de virulencia en 100 cepas de *E. coli* uropatógenas. El 92% de las cepas fue productora de biopelícula. El gen detectado con mayor frecuencia fue *fimA* (94%), seguido por *papC* (43%) y *hly* (26%). Estos autores describieron una fuerte asociación entre *papC* y la formación de biopelícula.

Paniagua *et al.*, 2017 (México) evaluaron la expresión *in vitro* de 22 marcadores de virulencia en 194 cepas de *E. coli* uropatógenas, además de ocho genes de resistencia a los antibióticos. Detectaron 107 patrones de expresión; las adhesinas expresadas con mayor frecuencia fueron *iha*, *fim*, *papC* y *papGII* en el 65%, 58%, 34% y 15%, respectivamente; las menos frecuentes fueron *afa* (12%), *papGIII* (6%), *papGI* (4%) *tsh* (3%) y *sfa* (2.6%). El gen de resistencia a los antibióticos más prevalente fue *tetA* (34%), seguido por *sul1* (31%), *TEM* (26%), *tetB* (17%), *dfrA1* y *cat1* (11%), *cmLA* (4%) y *aadA1* (2%).

4. METODOLOGÍA

4.1 Origen de las cepas

El presente proyecto fue aprobado por el comité de ética de la FES Iztacala (UNAM) y del IMSS. Se seleccionaron 210 mujeres con signos y síntomas de infección cérvico-vaginal (flujo abundante con olor fétido, prurito, irritación y/o ardor, dispareunia y disuria) quienes acudieron a la Clínica Universitaria de Salud Integral (CUSI), FES Iztacala, y al departamento de ginecología de las Unidades de Medicina Familiar (UMF) No. 62 y 64 del IMSS ubicadas en la zona norte del Edo. de México. A las pacientes seleccionadas y bajo firma de consentimiento informado, se les aplicó un cuestionario para obtener información como edad, antecedentes patológicos y recurrencia de las infecciones. Mujeres con tratamiento previo de antibióticos en los últimos seis meses fueron excluidas del estudio. Las muestras fueron tomadas de la cavidad vaginal con hisopos estériles y con ayuda de un espejo vaginal. Estas muestras fueron incubadas en caldo infusión-cerebro-corazón (BHI; Bioxon) a 37° C por 24 h. Al término las muestras fueron sembradas en Agar Sangre (Bioxon), medio Dextrosa-Sabouraud (Bioxon), medio S-110 (Bioxon) y medio Eosina Azul de Metileno (EMB, Bioxon) y se incubaron a 37° C por 24 h. A partir del crecimiento bacteriano en EMB, una colonia con morfología típica de *Escherichia coli* se seleccionó para su identificación por las pruebas bacteriológicas estándares: tinción de Gram y pruebas bioquímicas incluyendo Kligler, citrato, urea, manitol e Indol. Las cepas positivas a la identificación de *E. coli* fueron almacenadas en caldo Luria-Bertani/glicerol a 8° C.

4.2 Susceptibilidad a los antibióticos en las cepas bacterianas

Para evaluar la susceptibilidad y/o resistencia a los antibióticos en las cepas de *E. coli* se utilizó la técnica de difusión en disco (Bauer *et al.*,1966). Para lo cual, con un hisopo estéril se tomaron 5 colonias del cultivo en EMB y se inocularon en el agar Mueller Hinton (MH) formando un tapiz. Posteriormente, con pinzas estériles se colocó un sensidisco (Bio-Rad, México) con 12 antibióticos (ampicilina, carbenicilina, cefalotina, nitrofurantoína, trimetoprim & sulfametoxazol,

norfloxacina, ciprofloxacina, netilmicina, gentamicina, cefotaxima, cloranfenicol y amikacina) a determinar sobre el tapiz bacteriano y se incubó a 37° C por 24 h. Las cepas se clasificaron como resistentes (R) o sensibles (S) de acuerdo con los criterios del diámetro de los halos de inhibición establecidos por el fabricante (Tabla 6).

Tabla 6. Diámetro de los halos de inhibición para la clasificación de las cepas como resistentes o sensibles a los antibióticos.

Antibiótico	Siglas	Concentración (mcg)	Diámetro del halo de inhibición (mm)		
			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/ sulfametoxazol	SXT	25	≤10	11-15	≥16
Norfloxacina	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

4.3 Extracción del DNA bacteriano

Las cepas de *E.coli* fueron sembradas en MH e incubadas a 37° C durante 24 h. Una vez obtenido el crecimiento bacteriano óptimo, se realizó la extracción de DNA por el método de ebullición, para lo cual con un asa estéril se tomaron varias colonias y se suspendieron en tubos de rosca de 16X150 con 2 mL de agua desionizada estéril. Los tubos se agitaron en un vórtex durante 20 segundos, posteriormente se mantuvieron en baño maría (100° C) por 20 minutos. Al término,

la muestra se colocó en hielo (0° C) por 10 minutos y se centrifugó a 14,000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante con el DNA fue transferido a tubos Eppendorf estériles y almacenado a -20° C hasta su utilización (Paniagua *et al.*, 2007).

4.4 Detección de *E. coli* por PCR

Las cepas de *E. coli* fueron identificadas mediante la amplificación del gen 16S *rRNA* por PCR convencional, con los oligonucleótidos *wl-3110* (F-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) y *wl-3111* (R-CCGTCAATTCATTTGAGTTT) descritos por Li *et al.*, 2010. Se utilizó el equipo comercial Taq DNA Polymerase Master Mix RED (Ampliqon) que contenía 0.2 u/μL de DNA polimerasa, amortiguador de reacción con 4mM MgCl₂ y 0.4mM de dNTPs (deoxinucleósidos trifosfato). Para un volumen final de 20 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 2.5 μL de agua libre de nucleasas. Las condiciones de amplificación consistieron en desnaturalización inicial por 5 minutos a 95° C, 30 ciclos (desnaturalización a 95° C por 30 segundos, alineamiento a 55° C por 1 minuto y extensión a 72° C por 1 minuto). Finalmente, la extensión se prolongó por 5 minutos a 72° C. Para cada ensayo de PCR la cepa de *E. coli* ATCC 11775 fue utilizada como control.

4.5 Cuantificación de biopelícula en las cepas CVPEC

Para cuantificar la biopelícula de *E. coli*, se utilizó la técnica de adhesión a placas de microtítulo de poliestireno descrito por Fattahi *et al.*, (2015). Las cepas fueron sembradas por estría cruzada en placas de agar EMB (Bioxon) a 37° C/24 h. Al término se tomaron 5 colonias, se suspendieron en tubos de rosca con 5 mL de medio líquido Luria-Bertani (LB) y se incubaron en agitación a 37° C/24 h. Posteriormente, se realizó la dilución 1:10 (~10⁵ UFC) del cultivo bacteriano en medio LB estéril, se agitó en un vortex por 30 segundos y se dispensaron por triplicado 200 μL de la suspensión celular en los pozos de la placa de microtítulo de poliestireno (96 pozos). Los controles negativos (sólo caldo LB), fueron dispensados en ocho pozos por cada placa. Después de 24 horas de incubación a 37°C, se retiró el contenido de los pozos, se realizaron tres lavados con 250 μL de

solución salina fisiológica estéril y se agitaron suavemente las placas para remover las bacterias no adheridas. La biopelícula se fijó con 200 μ L de metanol al 99% por 15 minutos, que posteriormente fue desechado y la placa se dejó secar en posición invertida a temperatura ambiente por 30 minutos. Se agregaron 200 μ L de cristal violeta al 2% a cada pozo para teñir la biopelícula. Posteriormente se solubilizaron las células adheridas teñidas, al dispensar 160 μ L de ácido acético glacial al 33% y se dejaron reposar por 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se midió la densidad óptica (DO_{570nm}) en un lector de ELISA. Las cepas fueron clasificadas en cuatro clases con base en la densidad óptica del punto de corte (DOc) bajo los siguientes criterios (Fattahi *et al.*, 2015):

- $DO_{570nm} \leq DOc =$ **no formadora de biopelícula (-)**.
- $DOc < DO_{570nm} \leq 2 \times DOc =$ **formadora leve de biopelícula (+)**.
- $2 \times DOc < DO_{570nm} \leq 4 \times DOc =$ **formadora moderada de biopelícula (++)**.
- $4 \times DOc < DO_{570nm} =$ **formadora fuerte de biopelícula (+++)**.
- **Densidad óptica del punto de corte (DOc)** = \bar{x} DO del control negativo + 3X desviaciones estándar del control negativo.

4.6 Detección de los genes de resistencia a antibióticos en las cepas por PCR

Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación por PCR de los genes de resistencia a los antibióticos en las cepas de *E. coli* se aprecian en la Tabla 8. Se realizaron tres PCR multiplex con diferentes combinaciones de genes: 1) *sul1* y *cat*, 2) *aac (3)-IV*, *CITM* y *cmLA* 3) *TEM* y *SHV* con los oligonucleótidos y condiciones de amplificación descritos por Van *et al.*, 2008 y Dallene *et al.*, 2010. Para un volumen final de 20 μ L en la mezcla de reacción, se agregaron 12.5 μ L de Taq DNA Polymerase Master Mix RED, 1 μ L de cada par de oligonucleótidos (Integrated DNA Technologies; 10 pmol), 3 μ L de DNA molde (100 ng) y el resto de agua libre de nucleasas. Las condiciones de amplificación para las PCR multiplex I y II consistieron en desnaturalización inicial por 15 minutos a 95° C, 30 ciclos (desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, alineamiento a 58 °C por 30 segundos y extensión a 72° C por 1 minuto). Finalmente, la extensión se prolongó

por 10 minutos a 72 °C. Por otro lado, las condiciones de amplificación para el multiplex III fueron desnaturalización inicial por 10 minutos a 94° C, 30 ciclos (desnaturalización a 94° C por 40 segundos, alineamiento a 60° C por 30 segundos y extensión a 72° C por 1 minuto). Finalmente, la extensión se prolongó por 7 minutos a 72° C.

La detección de los genes de resistencia a tetraciclina, quinolonas, aminoglucósidos y trimetoprim se realizó individualmente por PCR con las condiciones de amplificación y los oligonucleótidos descritos por Randall *et al.*, 2004 (*tetA* y *tetB*); Van *et al.*, 2008 (*tetC* y *aadA1*); Wang *et al.*, 2008 (*qnrA*, *qnrB* y *qnrS*); Shervington *et al.*, 2001 (*aac(3)-I*, *aac(3)-II* y *aac(3)-III*) y Toro *et al.*, 2004 (*dfrA1*) (Tabla 8). Para un volumen final de 20 µL en la mezcla de reacción, se agregaron 12.5 µL de Taq DNA Polymerase Master Mix RED, 1 µL de cada par de oligonucleótidos (Integrated DNA Technologies; 10 pmol), 3 µL de DNA molde (100 ng) y 2.5 µL de agua libre de nucleasas. Las condiciones de amplificación para *tetA* y *tetB* consistieron en desnaturalización inicial por 7 minutos a 95° C, 30 ciclos (desnaturalización a 94° C por 30 segundos, alineamiento a 56° C por 30 segundos y extensión a 72° C por 1 minuto). Finalmente, la extensión se prolongó por 7 minutos a 72° C. Por otro lado, las condiciones de amplificación para *tetC* y *aadA1* fueron las siguientes: desnaturalización inicial por 5 minutos a 94° C, 30 ciclos (desnaturalización a 94° C por 30 segundos, alineamiento a 50° C por 30 segundos y extensión a 72° C por 1 minuto) y un ciclo de amplificación final por 10 minutos a 72° C. Para *qnrA*, *qnrB*, y *qnrS* el protocolo de PCR consistió en: desnaturalización inicial por 5 minutos a 94° C, 32 ciclos (desnaturalización a 94° C por 45 segundos, alineamiento a 53° C por 45 segundos y extensión a 72° C por 1 minuto) y amplificación final por 10 minutos a 72° C. Las condiciones de amplificación para *aac(3)-I*, *aac(3)-II*, *aac(3)-III* fueron: desnaturalización inicial por 3 minutos a 94° C, 32 ciclos (desnaturalización a 94° C por 30 segundos, alineamiento a 60° C por 45 segundos y extensión a 72° C por 2 minutos) más un ciclo de amplificación final por 10 minutos a 72° C. El protocolo para la amplificación de *dfrA1* fue el siguiente: desnaturalización inicial por 5 minutos a 95° C, 30 ciclos (desnaturalización a 92° C por 1 minuto, alineamiento a 50° C por

30 segundos y extensión a 72° C por 1 minuto) seguido por extensión final por 10 minutos a 72° C.

Tabla 8. Oligonucleótidos utilizados para la detección de genes de resistencia a los antibióticos.

Antibiótico	Gen	Secuencia 5'-3'	Tamaño del amplicon (pb)	Referencia
Multiplex I				
sulfonamida	<i>sul1</i>	(F) TTCGGCATTCTGAATCTCAC (R) ATGATCTAACCCTCGGTCTC	822	Van <i>et al.</i> , 2008
cloranfenicol	<i>cat1</i>	(F) AGTTGCTCAATGTACCTATAACC (R) TGTAATTCATTAAGCATTCTGCC	547	
Multiplex II				
gentamicina	<i>aac(3)-IV</i>	(F) TTCAGGATGGCAAGTTGGT (R) TCATCTCGTTCTCCGCTCAT	286	Van <i>et al.</i> , 2008
betalactámicos	<i>CITM</i>	(F) TGGCCAGAAGTACAGGCAAA (R) TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC	462	
cloranfenicol	<i>cmLA</i>	(F) CCGCCACGGTGTGTTGTTATC (R) CACCTTGCCTGCCCATCATTAG	698	
Multiplex III				
betalactámicos	<i>TEM</i>	(F) CATTTCGGTGTGCGCCCTTATTC (R) CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC	800	Dallene <i>et al.</i> , 2010
	<i>SHV</i>	(F) AGCCGCTTGAGCAAATTA AAC (R) ATCCCGCAGATAAATCACCCAC	713	
PCR individual				
tetraciclinas	<i>tet(A)</i>	(F) GGTTCACTCGAACGACGTCA (R) CTGTCCGACAAGTTGCATGA	577	Randall <i>et al.</i> , 2004
	<i>tet(B)</i>	(F) CCTCAGCTTCTCAACGCGTG (R) GCACCTTGCTGATGACTCTT	634	
	<i>tet(C)</i>	(F) ACTTGGAGCCACTATCGAC (R) CTACAATCCATGCCAACCC	880	Van <i>et al.</i> , 2008
estreptomicinas	<i>aadA1</i>	(F)TATCCAGCTAAGCGC GAACT (R) ATTTGCCGACTACCTTGGTC	447	
quinolonas	<i>qnrA</i>	(F)ATTTCTCACGCCAGGATTTG (R)GATCGGCAAAGGTTAGGTCA	516	Wang <i>et al.</i> , 2008
	<i>qnrB</i>	(F)GATCGTGAAAGCCAGAAAGG (R)ACGATGCCTGGTAGTTGTCC	469	
	<i>qnrS</i>	(F)ACGACATTCGTCAACTGCAA (R)TAAATTGGCACCCCTGTAGGC	417	
aminoglucósidos	<i>aac(3)-I</i>	(F) ACCTACTCCCAACATCAGCC (R) ATATAGATCTCACTACGCGC	169	Shervington <i>et al.</i> , 2001
	<i>aac(3)-II</i>	(F)ACTGTGATGGGATACGCGTC (R) CTCCGTGACGCTTTCAGCTA	237	
	<i>aac(3)-III</i>	(F) ACAAGAACGTGGTCCGCTA (R) ACAGGTAAGCATCCGCATC	185	
trimetoprim	<i>dfra1</i>	(F) GGAGTGCCAAAGGTGAACAGC (R)GAGGCCGAAGTCTTGGGTA AAAAC	367	Toro <i>et al.</i> , 2004

4.7 Detección de los genes de adhesión por PCR

La detección de los genes de adhesión se realizó por PCR con las condiciones de amplificación y los oligonucleótidos descritos por Johnson y Stell, 2000 (Tabla 9). Se realizaron 5 PCR multiplex con diferentes combinaciones de genes: 1) *fimH*, *papA* y *papEF*; 2) *sfa*, *bmaE* y *papG alelo II*; 3) *papG alelo I* y *papC*; 4) *papG alelo II*, *focG* y *gafD*; 5) *iha* y *sfaS*. La detección del gen *afa* se realizó por PCR convencional de acuerdo con lo descrito por Le Bouguéneec *et al.*, (1992; Tabla 7). Para un volumen final de 20 μ L en la mezcla de reacción, se agregaron 12.5 μ L de Taq DNA Polymerase Master Mix RED, 1 μ L de cada par de oligonucleótidos (Integrated DNA Technologies; 10 pmol), 3 μ L de DNA molde (100 ng) y un volumen variable de agua libre de nucleasas hasta completar los 20 μ L. Las condiciones de amplificación para los 5 PCR multiplex consistieron en desnaturalización inicial por 12 minutos a 95° C, 25 ciclos (desnaturalización a 94° C por 30 segundos, alineamiento a 63° C por 30 segundos y extensión a 68° C por 3 minutos). Finalmente, la extensión se prolongó por 10 minutos a 72° C. Las condiciones de amplificación para *afa* consistieron en desnaturalización inicial por 5 minutos a 95° C, 25 ciclos (desnaturalización a 94° C por 2 minutos, alineamiento a 65° C por 1 minuto y extensión a 72° C por 2 minutos). Finalmente, la extensión se prolongó por 5 minutos a 72° C.

Tabla 9. Oligonucleótidos utilizados para la detección de genes de adhesión en *E. coli*.

Multiplex	Gen	Secuencia 5'-3'	Tamaño del amplicon (pb)
I	<i>fimH</i>	(F)TCGAGAACGGATAAGCCGTGG (R)GCAGTCACCTGCCCTCCGGTA	508
	<i>papA</i>	(F)ATGGCAGTGGTGTGTTTGGTG (R)CGTCCCACCATACGTGCTCTTC	717
	<i>papEF</i>	(F)GCAACAGCAACGCTGGTTGCATCAT (R)AGAGAGAGCCACTCTTATACGGACA	326
II	<i>sfa</i>	(F)CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC (R)CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA	410
	<i>papG alelo III</i>	(F)GGCCTGCAATGGATTTACCTGG (R)CCACCAAATGACCATGCCAGAC	258
	<i>bmaE</i>	(F) ATGGCGCTAACTTGCCATGCTG (R) AGGGGGACATATAGCCCCCTTC	507
III	<i>papC</i>	(F)GTGGCAGTATGAGTAARGACCTTA (R)ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA	205
	<i>papG alelo I</i>	(F) TCGTGCTCAGGTCCGGAATTT (R) TGGCATCCCCCAACATTATCG	461
IV	<i>papG alelo II</i>	(F)GGGATGGCGGGCCTTTGAT (R)CGGGCCCCCAAGTAACTCG	190
	<i>focG</i>	(F)CAGCACAGGCAGTGGATACGA (R)GAATGTGCGCTGCCATTGCT	364
	<i>gafD</i>	(F) TGTTGGACCGTCTCAGGGCTC (R) TCCCGGAACCTCGCTGTTACT	952
V	<i>iha</i>	(F)CTGGCGGAGGCTCTGAGATCA (R)TCCTTAAGCTCCCGCGGCTGA	829
	<i>sfaS</i>	(F) GTGGATACGACGATTACTGTG (R) CCGCCAGCATTCCCTGTATTC	244
	<i>afa</i>	(F) GCTGGGCAGCAAACCTGATAACTCTC (R)CATCAAGCTGTTTGTTCGTCCGCCG	750

4.8 Electroforesis

Después de la amplificación del DNA, 5 µL de cada muestra fueron analizados en geles de agarosa al 2% teñidos con Midori Green (0.3 µL), se utilizó el amortiguador TBE 1X (Tris-borato) para la conducción eléctrica bajo las siguientes condiciones: 120 volts, 94 miliamperes durante 120 minutos. El tamaño del amplicón se determinó a partir de la comparación con el marcador molecular de 100 pb (Ladder). Los geles fueron fotografiados bajo luz ultravioleta con el digitalizador de imágenes Gel Logic 100 KODAK (Paniagua *et al.*, 2007).

4.9 Infección del cultivo de la línea celular A431 para la expresión de los genes asociados a la biopelícula en cepas CVEC.

El método de inoculación se realizó de acuerdo con lo descrito por Schaller *et al.*, 2003. Para la preparación del inóculo de *E. coli*, las cepas fueron sembradas en tubos con 2 mL de caldo BHI y se incubaron en agitación durante 24 h a 37° C. Posteriormente se realizaron diluciones 1:5 en caldo BHI estéril hasta obtener una $DO_{600\text{ nm}} = 0.4$, lo que indicó una concentración de 1×10^9 células. Las células bacterianas fueron recuperadas por centrifugación a 2000 xg por 3 minutos, al término la pastilla fue resuspendida en amortiguador Fosfato Salino (PBS). El inóculo bacteriano de 50 μL fue depositado en la placa del cultivo de la línea celular A431 derivada de carcinoma de epidermis vulvar (ATCC® CRL-1555™). Los cultivos infectados se incubaron a 37° C por 48 h con 5% de CO_2 y humedad saturada. Posteriormente las células bacterianas fueron cosechadas de la superficie de la monocapa de células vaginales humanas, para lo cual se tomaron 300 μL de cada pozo y se depositaron en tubos eppendorf con 500 μL de PBS. Los tubos se centrifugaron a 8000 xg por 5 minutos, se descartó el sobrenadante y las pastillas celulares fueron utilizadas para la extracción del RNA.

4.10 Extracción y purificación de RNA de las cepas de *E. coli*

La extracción del RNA bacteriano se realizó con el Minikit RNeasy (Qiagen; No. de catálogo 74104) y el equipo automatizado QIAcube (Figura 5). Primero se alimentó el equipo con los reactivos y componentes necesarios; en la sección de reactivos del QIAcube 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 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de β -mercaptoethanol); RW1 (amortiguador de pH de lavado con etanol y una pequeña cantidad de tiocianato de guanidina); 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%. Los tubos eppendorf con las pastillas bacterianas se depositaron en la placa de agitación y el tubo eppendorf con 2 mL de buffer TE (10mM Tris-HCL, 1mM EDTA, pH 8) y 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de lisozima fue colocado en la posición "A" de la región correspondiente al buffer de lisis. Además, se rellenó el contenedor con puntas de 1 mL y los contenedores de plástico con los tubos de columna y elución

en la posición correcta, se depositaron en el interior de la centrifuga. Finalmente se seleccionó el protocolo para la extracción de RNA con lisis celular.

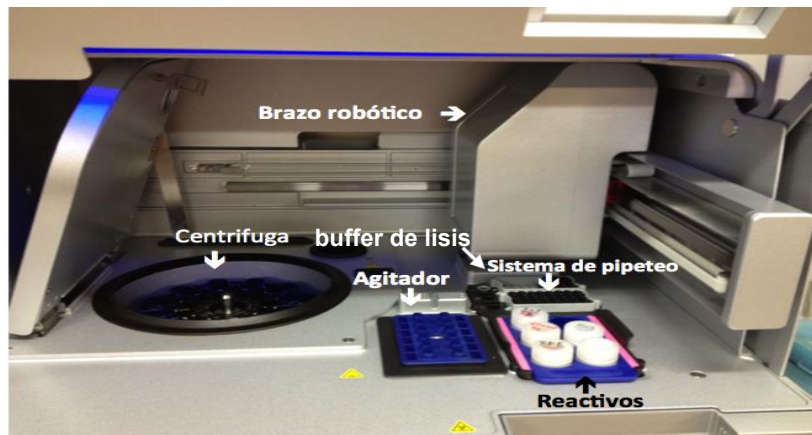


Figura 5. Interior del equipo QIAcube. Es un sistema automatizado para la extracción de ácidos nucleicos y proteínas que controla diversos instrumentos integrados que incluyen una centrifuga, un agitador con calefacción, un sistema de pipeteo y un brazo robótico. Este sistema combina las propiedades de unión selectiva de la membrana de sílica con la velocidad de la tecnología microspin. Un sistema de buffer alto en sal promueve la unión del RNA >200 pb a la membrana de sílica, enriqueciendo así el mRNA.

El primer paso que realizó el QIAcube fue la lisis enzimática, para lo cual adicionó 100 μL de buffer TE a cada tubo con la pastilla bacteriana y los incubó en agitación a 25° C por 5 minutos. Posteriormente agregó 350 μL del buffer RLT y lo agitó vigorosamente. Este buffer es altamente desnaturizante y contiene tiocianato de guanidina, lo que inactivó inmediatamente las RNasas. Finalmente, el equipo agregó 350 μL 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 el aparato llevó a cabo la purificación del RNA total, para lo cual 700 μL del lisado bacteriano fueron transferidos a una columna contenida en un tubo de 2 mL, centrifugó los tubos a 10 000 xg y descartó el líquido de flujo. Este paso permitió la unión del RNA a la membrana de sílica. Al término agregó 700 μL 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 sílice como proteínas, lípidos y carbohidratos fue desechado.

Después el equipo adicionó 500 μL del amortiguador RPE a las columnas en cada uno de los siguientes pasos de lavado necesarios para la eliminación de los restos de sal, el primero fue centrifugado a 10 000 xg por 15 segundos y se descartó el líquido de flujo, para el segundo 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. Finalmente el equipo adicionó 30 μL de agua libre de RNAsas directamente sobre la membrana de la columna y se centrifugó a 10 000 rpm durante 1 minuto para obtener el RNA. La concentración y pureza del RNA se midió utilizando el espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). El RNA es muy inestable, por lo que inmediatamente se realizó la reversotranscripción a cDNA.

4.11 Reversotranscripción

Para el proceso de la reversotranscripción de RNA a cDNA se utilizó el equipo comercial QuantiTec Reverse transcription (Qiagen), que incluye la eliminación del ADN genómico, siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la eliminación del DNA genómico, los reactivos del equipo fueron descongelados a temperatura ambiente (15-25° C). Para una mezcla de reacción con volumen final de 14 μL , se agregaron a un tubo eppendorf de 0.2 mL los componentes descritos en la tabla 10. Posteriormente los tubos se incubaron a 42° C por 2 minutos e inmediatamente se colocaron en hielo.

Tabla 10. Preparación de la mezcla de reacción para la eliminación de DNA genómico.

Componente/reactivo	Volumen (μL)
gDNA Wipeout buffer 7X	2
RNA templado	5 (1 μg)
Agua libre de RNasa	7

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 µL se agregaron a un tubo eppendorf de 0.2 mL de los componentes descritos en la tabla 11.

Tabla 11. Preparación de la mezcla de reacción para la reversotranscripción.

Componente/reactivo	Volumen (µL)
Quantiscrip Reverse Transcriptasa (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

Después de homogeneizar el contenido de los tubos, se mantuvieron 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). Al finalizar, el cDNA fue almacenado a -20° C hasta su utilización para la PCR en tiempo real.

4.12 Expresión de los genes de adhesión por PCR en tiempo real (RT-PCR)

Para determinar la expresión de los genes de adhesión (*afa*, *fimH*, *iha*, *papA*, *papC*, *papEF*, *papG alelo II*, *papG alelo III*, *sfa* y *focG*) (Tabla 9) en las cepas de *E. coli* por PCR en Tiempo Real se utilizó el termociclador Rotor-Gene Q (Qiagen) y el equipo de PCR RealQ Plus 2X Master Mix SYBR Green (AMPLIQON). El volumen final de la mezcla de reacción fue de 25 µL; 12.5 µL de Master Mix Green, 1 µL del oligonucleótido forward (10 pmol), 1 µL del oligonucleótido reverse (10 pmol), 1 µL de cDNA (500 ng/µL) y 9.5 µL de agua estéril libre de nucleasas. Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo de activación de la HotStart a 95° C durante 15 minutos y 40 ciclos de amplificación (desnaturalización a 95° C por 25 segundos, alineación a 60° C por 30 segundos y extensión a 72° C por 30

segundos). En cada corrida se utilizó el gen *rRNA* como house keeping y se incluyó una curva de calibración del control positivo (cDNA de cepas portadoras de cada gen) y dos NTC (control sin DNA molde), además se obtuvo la melting point (punto de fusión) en cada ensayo. La curva de calibración se preparó con diluciones seriadas a partir de una concentración conocida del control positivo. Con esta información, el equipo de PCR TR determinó el número de copias del DNAC con base al número de ciclos que ocurrieron para que la señal alcanzará un nivel de fluorescencia llamado “ciclo umbral” o “threshold cycle” (Ct por sus siglas en inglés), el cual interceptó la curva en la fase exponencial y fue determinado automáticamente por el software del equipo.

4.13 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con SPSS Statistics 24. Para determinar si existe correlación entre la formación de biopelícula y la expresión de los genes de adhesión se utilizó la prueba de chi cuadrado (χ^2) ó el test exacto de Fisher según su aplicabilidad. Se consideraron significativos los valores de $p \leq 0.05$.

5. RESULTADOS

5.1 Pacientes analizadas

En el grupo de 210 pacientes con infección cérvico-vaginal atendidas en las Unidades de Medicina Familiar (UMF) No. 62 y No.64 y en la CUSI, FES Iztacala, se encontró que el rango de edad entre 40 y 59 años fue el más abundante (40.5%, n= 85), seguido por el de 20-39 años con el 30.5% (n=64); en el 6.7% (n=14) de las pacientes restantes no se registró la edad (Figura 6).

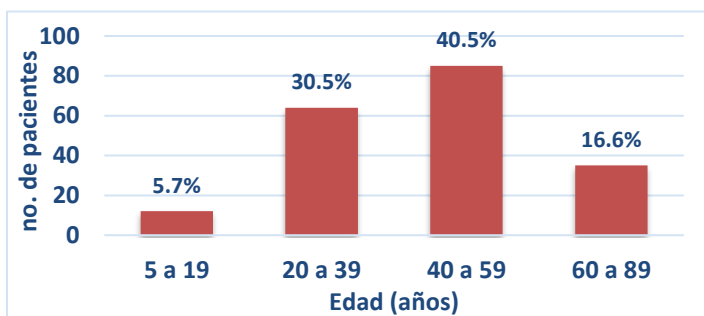


Figura 6. Distribución de las pacientes por edad.

En este estudio se encontró que el 54.3% (n=114) de las mujeres estudiadas con infección cérvico-vaginal no reportó algún otro trastorno metabólico o enfermedad, mientras que el 45.7% (n=98) si lo reportó, siendo la más frecuente la hipertensión arterial con el 11.9% (n=25) e infecciones vaginales recurrentes con el 22.8% (n= 48) (Tabla 12).

Tabla 12. Síndromes metabólicos y/o padecimientos en las pacientes analizadas.

Rango de edad	Síndromes metabólicos y/o padecimientos (n= 210) No. (%)					
	hipertensión	obesidad	diabetes	infecciones vaginales recurrentes	cáncer	Sin síndrome o padecimiento
5-19	0	2 (1)	0	2 (1)	0	114 (54.3)
20-39	1(0.5)	1 (0.5)	0	14 (6.7)	1 (0.5)	
40-59	6 (2.9)	1 (0.5)	9 (4.3)	20 (9.5)	1 (0.5)	
60-89	18 (8.6)	2 (1)	8 (3.8)	12 (5.7)	0	
Total	25 (11.9)	6 (2.9)	17 (8)	48 (22.8)	2 (1)	114

5.2 Identificación de *E. coli* por PCR

El 95.2% (n=200) de las cepas de *E. coli* fueron identificadas por pruebas bioquímicas y moleculares mediante la detección por PCR del gen *16S rRNA*, mientras que el 4.7% (n=10) de las cepas restantes fueron negativas a la detección molecular (Anexo: Figura 8). *E. coli* fue identificada individualmente en el 45.5% (n=91; Tabla 13), y se encontró asociada con *Staphylococcus* spp. en el 18.5% (n=37), con *Candida albicans* en el 11% (n=22), con *Staphylococcus aureus* en el 5% (n=10) y *Enterococcus faecalis* en el 4.5% (n=9).

Tabla 13. Microorganismos identificados en los cultivos vaginales.

No.	Microorganismos asociados	No. (%) n=200
1	<i>E.coli</i>	91 (45.5)
2	<i>E. coli/Staphylococcus</i> spp.	37 (18.5)
3	<i>E. coli/Candida albicans</i>	22 (11)
4	<i>E. coli/Staphylococcus aureus</i>	10 (5)
5	<i>E. coli/Enterococcus faecalis</i>	9 (4.5)
6	<i>E. coli/Staphylococcus epidermidis</i>	6 (3)
7	<i>E. coli/Streptococcus agalactiae</i>	6 (3)
8	<i>E. coli/C. albicans/Staphylococcus</i> spp.	4 (2)
9	<i>E. coli/Candida</i> spp.	3 (1.5)
10	<i>E. coli/E. faecalis/Staphylococcus</i> spp.	3 (1.5)
11	<i>E. coli/Candida</i> spp./ <i>Staphylococcus</i> spp.	2 (1)
12	<i>E. coli/C. albicans/S. epidermidis</i>	2 (1)
13	<i>E. coli/Klebsiella pneumoniae</i>	1(0.5)
14	<i>E. coli/Trichomonas vaginalis</i>	1 (0.5)
15	<i>E. coli/C. albicans/K. pneumoniae</i>	1 (0.5)
16	<i>E. coli/C.albicans/Candida</i> spp./ <i>Staphylococcus</i> spp.	1 (0.5)
17	<i>E. coli/Candida</i> sp/ <i>E. feacalis/Staphylococcus</i> spp.	1 (0.5)

5.3 Susceptibilidad a los antibióticos

Un alto porcentaje de cepas de CVPEC fue resistente a los antibióticos betalactámicos como ampicilina en el 97% (n=194), carbenicilina en 93.5% (n=187) y cefalotina en 77% (n=154). Los porcentajes de resistencia menores fueron para cloranfenicol y amikacina en el 29.5% (n=59) y el 22.5% (n=45), respectivamente (Tabla 14).

Tabla 14. Resistencia a los antibióticos en CVPEC

Antibióticos	No. de cepas resistentes (%)	Antibióticos	No. de cepas resistentes (%)
Ampicilina	194 (97)	Ciprofloxacina	116 (58)
Carbenicilina	187 (93.5)	Netilmicina	83 (41.5)
Cefalotina	154 (77)	Gentamicina	83 (41.5)
Nitrofurantoína	142 (71)	Cefotaxima	76 (38)
Trimetoprim/sulfametoxazol	121 (60.5)	Cloranfenicol	59 (29.5)
Norfloxacina	117 (58.5)	Amikacina	45 (22.5)

Además, se detectó un elevado porcentaje de cepas multirresistentes a los antibióticos; el 31.5% (n=63) de las cepas mostró resistencia en el rango de 3-5 antibióticos, el 47.5% (n= 95) de 6-9 antibióticos y el 19.5% (n=39) de 10-12 antibióticos (Figura 7). Tres cepas (1.5%) presentaron resistencia a dos o menos antibióticos.

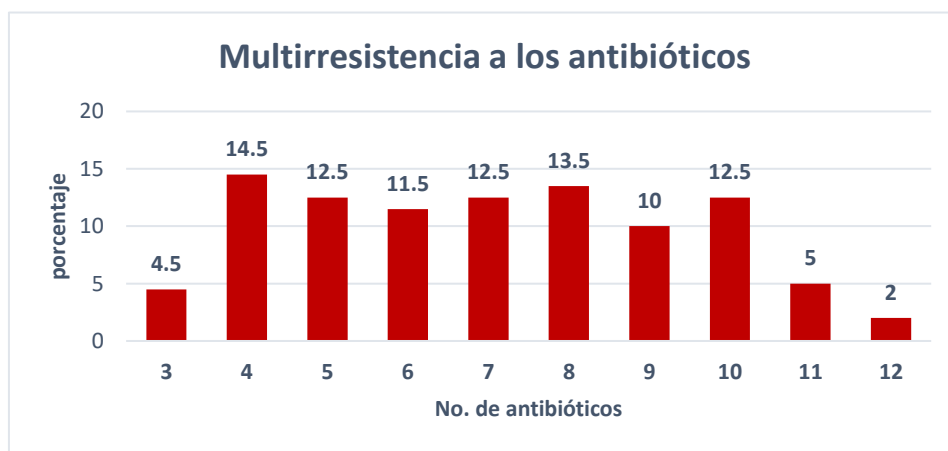


Figura 7. Porcentaje de cepas de *E. coli* multirresistentes a los antibióticos.

5.4 Detección de los genes de resistencia a los antibióticos de las cepas

Se estableció la frecuencia de 18 genes de resistencia a diferentes grupos de antibióticos en las cepas de *E. coli* (Tabla 15; Anexo: Figuras 9-21). El gen de resistencia a los antibióticos más frecuente fue *aac (3)-II* (gentamicina) en el 82.5% (n=165), seguido de *qnrB* (quinolonas) y *TEM* (betalactámico), en el 80.5% (n=161) y 61.5% (n=123), respectivamente. Los genes detectados con menor frecuencia fueron *cat1* (cloranfenicol) en el 9% (n=18), *cmLa* (cloranfenicol) y *aac(3)-IV* (gentamicina) en el 4.5% (n=9), en cada caso.

Tabla 15. Genes de resistencia a los antibióticos detectados en las cepas CVPEC.

Antibiótico		Gen	No. de cepas (%) (n=200)
betalactámicos		<i>CITM</i>	29 (14.5)
		<i>TEM</i>	123 (61.5)
		<i>SHV</i>	71 (35.5)
cloranfenicol		<i>cat1</i>	18 (9)
		<i>cmLa</i>	9 (4.5)
tetraciclina		<i>tetA</i>	112 (56)
		<i>tetB</i>	72 (36)
		<i>tetC</i>	44 (22)
quinolonas		<i>qnrA</i>	69 (34.5)
		<i>qnrB</i>	161 (80.5)
		<i>qnrS</i>	91 (45.5)
trimetoprim/ sulfametoxazol		<i>dfrA</i>	81 (40.5)
		<i>sul1</i>	71 (35.5)
Aminoglucósidos	gentamicina	<i>aac(3)-I</i>	41 (20.5)
		<i>aac(3)-II</i>	165 (82.5)
		<i>aac(3)-III</i>	39 (19.5)
		<i>aac(3)-IV</i>	9 (4.5)
	estreptomicina	<i>aadA1</i>	84 (42)

5.5 Cuantificación de biopelícula

La cuantificación de biopelícula por la técnica de adhesión a las placas de microtítulo de poliestireno mostró que el 73% (n=146) de las cepas fueron formadoras de biopelícula dentro de las cuales, el 44% (n=88) fueron formadoras débiles, el 18% (n=36) formadoras fuertes y el 11% (n=22) formadoras moderadas (Tabla 16).

Tabla 16. Categorías de formación de biopelícula en las cepas CVPEC.

Categoría de formación de biopelícula	No. de cepas (%) (n=200)
no formadora ($DO_{570nm} \leq 0.222$)	54 (27)
débil ($DO_{570nm} \geq 0.222$)	88 (44)
moderada ($DO_{570nm} \geq 0.444$)	22 (11)
fuerte ($DO_{570nm} \geq 0.888$)	36 (18)

5.6 Detección y expresión de los genes de adhesión de las cepas CVPEC

Se analizó la presencia de 14 genes de adhesión por PCR convencional, de los cuales sólo se detectaron 10 en las cepas CVPEC (Tabla 17; Anexo: Figuras 22-28). Los genes de adhesión más frecuentes entre las cepas fueron *fimH* con el 89.5% (n=179), seguido por *iha* con el 51.5% (n=103) y *papC* con el 41% (n=82); por otro lado, los genes de adhesión menos frecuentes fueron *focG* y *afa* con el 9% (n=18), en cada caso y *papG alelo III* con el 3% (n=6). Los genes *bmaE*, *gafD*, *sfaS* y *papGI* no fueron detectados en las cepas CVPEC.

Durante la infección *in vitro* del cultivo de la línea celular A431, las cepas CVPEC expresaron 9 de los 10 genes analizados (Tabla 17, Anexo: Figuras 29-48). Los genes de adhesión expresados con mayor frecuencia fueron *fimH* en el 86% (n=172), seguido por *iha* en el 51.5% (n=103) de las cepas; por otro lado los genes de adhesión expresados con menor frecuencia fueron *afa* en el 3.5% (n=7) y *papG alelo III* el 1.5% (n=3). El gen *papEF* no fue expresado por ninguna cepa.

Tabla 17. Frecuencia de detección y expresión de los genes de adhesión de las cepas CVPEC

Gen	Frecuencia	
	Detección (%) (n=200)	Expresión (%)
<i>fimH</i>	179 (89.5)	172 (86)
<i>iha</i>	103 (51.5)	103 (51.5)
<i>papGII</i>	67 (33.5)	63 (31.5)
<i>papC</i>	82 (41)	58 (29)
<i>papA</i>	28 (14)	28 (14)
<i>sfa</i>	29 (14.5)	20 (10)
<i>focG</i>	18 (9)	12 (6)
<i>afa</i>	18 (9)	7 (3.5)
<i>papGIII</i>	6 (3)	3 (1.5)
<i>papEF</i>	53 (26.5)	0

5.7 Asociación de la expresión de los genes de adhesión con la formación de biopelícula en las cepas CVPEC

El gen expresado con mayor frecuencia entre las cepas formadoras de biopelícula fue *fimH* con el 84.9% (n=124), seguido por *iha* y *papGII* con el 51.3% (n=75) y con el 35.6% (n=52), respectivamente. Por otro lado, los genes con menor frecuencia de expresión fueron *focG*, *afa* y *papGIII*, con el 5.5 % (n=8), con el 4.1% (n=6) y 2% (n=3), respectivamente. La tabla 18 presenta la asociación entre la expresión de los genes de adhesión y los grupos de cepas formadoras de biopelícula. El análisis estadístico indicó que no existe correlación entre la expresión de los genes de adhesión y la formación de biopelícula ($p \leq 0.05$).

Tabla 18. Distribución de la expresión de los genes de adhesión entre los distintos grupos de cepas formadoras de biopelícula.

gen	Formación de biopelícula (n=146)			
	fuerte n=36 (%)	moderada n=22 (%)	débil n=88 (%)	total No. (%)
<i>fimH</i>	27 (18.5)	18 (12.3)	79 (54.1)	124 (84.9)
<i>iha</i>	16 (11)	10 (6.8)	49 (33.5)	75 (51.3)
<i>papC</i>	10 (6.8)	5 (3.4)	29 (19.8)	44 (30.1)
<i>papGII</i>	10 (6.8)	8 (5.5)	34 (23.3)	52 (35.6)
<i>sfa</i>	6 (4.2)	2 (1.3)	7 (4.8)	15 (10.3)
<i>papA</i>	1 (0.7)	5 (3.4)	15 (10.3)	21 (14.4)
<i>afa</i>	1 (0.7)	2 (1.3)	3 (2.1)	6 (4.1)
<i>focG</i>	0 (0)	1 (0.7)	7 (4.8)	8 (5.5)
<i>papGIII</i>	0 (0)	1 (0.7)	2 (1.3)	3 (2)

5.8 Patrones de expresión de los genes de adhesión en cepas CVPEC asociados a los genes de resistencia a los antibióticos

En este estudio se identificaron 33 patrones de expresión en las cepas CVPEC (Tabla 19), dentro de los cuales el patrón 1 (*fimH/iha*) se detectó en el 21.5% (n=43) de las cepas, el patrón 2 (*fim/iha/papC/papGII*) en el 6.5% (n=13) y el patrón 3 (*fimH/iha/papGII*) en el 5% (n=10) de las cepas. Los patrones no. 21 al 33 se encontraron representados por una sola cepa en cada caso. Todos los patrones detectados se asociaron con 4 o más genes de resistencia a diferentes grupos de antibióticos. Además, se detectaron 53 (26.5%) cepas que expresaron sólo un gen de adhesión, 4 (2%) que no expresaron ninguno durante la infección *in vitro* de la línea celular A431 y 7 (3.5%) cepas que no portaron ningún gen de adhesión.

Tabla 19. Patrones de expresión de los genes de adhesión y su asociación con los genes de resistencia a los antibióticos en las cepas de *E. coli*

No. Patron	Patrón adhesinas	No. de cepas (%)	Genes de resistencia a antibióticos																	
			<i>aac(3)II</i>	<i>qnrB</i>	<i>tet(A)</i>	<i>qnrS</i>	<i>aadA1</i>	<i>dfra1</i>	<i>tet(B)</i>	<i>sul1</i>	<i>qnrA</i>	<i>tet(C)</i>	<i>aac(3)I</i>	<i>aac(3)III</i>	<i>CITM</i>	<i>cat1</i>	<i>cmLa</i>	<i>aac(3)-IV</i>	<i>TEM</i>	<i>SHV</i>
1	<i>fimH/iha</i>	43 (21.5)	38	32	21	23	12	20	19	15	16	10	13	8	9	6	3	2	30	12
2	<i>fim/iha/papC/ papGII</i>	13 (6.5)	13	10	12	6	7	3	6	8	6	4	3	1	0	3	1	0	6	5
3	<i>fimH/iha/papGII</i>	10 (5)	9	9	7	7	8	6	4	4	6	4	2	5	2	0	0	1	8	2
4	<i>fimH/iha/papC/ papGII/papA</i>	9 (4.5)	9	9	8	7	4	4	3	6	1	0	3	1	0	0	1	0	6	0
5	<i>fimH/papC</i>	6 (3)	6	4	3	4	1	3	1	4	1	0	0	2	0	0	0	0	6	3
6	<i>fimH/papGII</i>	5 (2.5)	5	4	4	0	3	2	2	2	3	0	0	1	1	0	1	0	4	3
7	<i>fimH/iha/afa</i>	5 (2.5)	4	5	3	2	1	3	2	2	2	3	3	2	0	0	0	1	5	0
8	<i>fimH/sfa</i>	4 (2)	4	4	2	1	2	0	2	2	1	1	0	0	0	1	0	0	2	1
9	<i>fimH/papC/sfa</i>	3 (1.5)	2	3	2	0	0	1	2	1	1	1	0	1	0	0	0	0	3	0
10	<i>fimH/iha/papC</i>	3 (1.5)	3	2	2	2	1	0	2	2	1	1	1	2	2	0	0	0	1	2
12	<i>fimH/papC/ papGII</i>	3 (1.5)	2	3	1	0	2	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	2	1
13	<i>fimH/papC/papGII/ papA</i>	3 (1.5)	3	3	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	3	2

No. Patron	Patrón adhesinas	No. de cepas (%)	Genes de resistencia a antibióticos																	
			<i>aac(3)II</i>	<i>qnrB</i>	<i>tet(A)</i>	<i>qnrS</i>	<i>aadA1</i>	<i>dfrA1</i>	<i>tet(B)</i>	<i>sul1</i>	<i>qnrA</i>	<i>tet(C)</i>	<i>aac(3)I</i>	<i>aac(3)III</i>	<i>CITM</i>	<i>cat1</i>	<i>cmLa</i>	<i>aac(3)-IV</i>	<i>TEM</i>	<i>SHV</i>
8	<i>fimH/iha/papGII/papA</i>	2 (1)	2	2	2	2	1	1	1	1	1	2	1	2	0	1	0	0	0	2
14	<i>fimH/iha/papGII/sfa/papA</i>	2 (1)	2	2	1	1	1	0	1	1	0	2	2	2	1	0	1	1	0	2
15	<i>fimH/papA</i>	2 (1)	1	2	0	1	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0
16	<i>fimH/focG</i>	2 (1)	2	2	2	2	2	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1
17	<i>fimH/iha/papC/papGII/papA/focG</i>	2 (1)	2	2	0	1	1	2	0	1	1	0	2	1	0	0	1	0	1	0
18	<i>fimH/iha/papC/papGII/sfa</i>	2(1)	2	2	2	1	1	1	0	1	1	2	0	0	0	1	0	0	1	0
19	<i>fim/iha/sfa/focG</i>	2(1)	1	2	2	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	2	0
20	<i>fimH/papC/sfa/papA/papGIII</i>	2(1)	2	0	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21 - 33	otras combinaciones	13 (6.5)	10	10	6	6	9	6	4	5	5	4	2	2	2	0	1	1	4	7
34	1 gen	53 (26.5)	36	40	29	19	23	23	19	12	13	7	5	8	9	3	0	2	31	24
35	sin expresión	4 (2)	2	3	2	2	1	1	1	1	2	1	2	0	0	1	0	0	1	3
36	sin gen	7(3.5)	5	6	1	1	2	0	1	0	2	0	0	0	2	1	0	0	5	1
TOTAL		200 (100)	¹⁶⁵	161	112	91	84	81	72	71	69	44	41	39	29	18	9	9	123	71

5.9 Asociación del número de antibióticos que resisten las cepas CVPEC con la formación de biopelícula

El 97.9% (n=143) de las cepas CVPEC formadoras de biopelícula presentó multirresistencia a los antibióticos (Tabla 20). La mayoría de las cepas multirresistentes fueron formadoras de una biopelícula débil y presentaron multirresistencia a 4, 5 y 9 antibióticos en el 9.5% (n=14), el 11.6% (n=17) y el 7.5% (n=11) respectivamente. La tabla 20 muestra los porcentajes de resistencia a cada antibiótico en las cepas CVPEC formadoras de biopelícula.

Tabla 20. Número de antibióticos que resisten las CVPEC formadoras de biopelícula.

No. de antibióticos	Cepas formadoras de biopelícula (n=146) No. (%)		
	débil (%)	moderada (%)	fuerte (%)
Dos	2 (1.4)	1 (0.7)	0
Tres	3 (2.1)	0	1 (0.7)
Cuatro	14 (9.6)	2 (1.4)	6 (4.1)
Cinco	17 (11.6)	1 (0.7)	2 (1.4)
Seis	9 (6.1)	3 (2.1)	3 (2.1)
Siete	9 (6.1)	2 (1.4)	7 (4.8)
Ocho	9 (6.1)	5 (3.4)	7 (4.8)
Nueve	11 (7.5)	3 (2.1)	1 (0.7)
Diez	9 (6.1)	2 (1.4)	8 (5.5)
Once	3 (2.1)	3 (2.1)	1 (0.7)
Doce	2 (1.4)	0	0
Total	88 (60,2)	22 (15)	36 (24.6)

Tabla 21. Fenotipo de resistencia a los antibioticos en las cepas CVPEC formadoras de biopelícula.

antibiótico	fenotipo de resistencia		
	productoras de biopelícula n=146 (%)	no productoras de biopelícula n=54 (%)	total no. (%)
ampicilina	144 (72)	50 (25)	194 (97)
carbenciina	138 (69)	49 (24.5)	187 (93.5)
cefalotina	110 (55)	44 (22)	154 (77)
nitrofurantoina	108 (54)	34 (17)	142 (71)
trimetoprim/sulfametoxazol	86 (43)	35 (17.5)	121 (60.5)
norfloxacina	84 (42)	33 (16.5)	117 (58.5)
ciprofloxacina	87 (43.5)	29 (14.5)	116 (58)
gentamicina	58 (29)	25 (12.5)	83 (41.5)
netilmicina	62 (31)	21 (10.5)	83 (41.5)
cefotaxima	59 (29.5)	17 (8.5)	76 (38)
cloranfenicol	39 (19.5)	20 (10)	59 (29.5)
amikacina	33 (16.5)	12 (6)	45 (22.5)

6. DISCUSIÓN

6.1 Infecciones cérvico-vaginales

Las infecciones vaginales son un problema de salud pública que genera altos índices de visitas al ginecólogo y tiene un impacto significativo en la calidad de vida de las mujeres (Rashki *et al.*, 2014; Fan *et al.*, 2012). En este estudio se analizaron los cultivos vaginales de 210 mujeres con infección cérvico-vaginal provenientes de las clínicas del IMSS (no. 64 y 62) y la Clínica Universitaria de Salud Integral, FES Iztacala; *Escherichia coli* fue identificada en el 95.2% (n=200) de las muestras mediante pruebas bioquímicas y moleculares. La frecuencia de *E. coli* en infecciones vaginales es superior a la reportada en otros estudios alrededor del mundo, de acuerdo con la revisión sistemática realizada por Tansarli *et al.*, (2013), donde *E. coli* fue el patógeno Gram negativo identificado con mayor frecuencia con una prevalencia de hasta el 23%. La alta incidencia de las

infecciones genitourinarias por *E. coli* en mujeres, se atribuye a la proximidad que existe entre el colon, la uretra y la vagina, la cual facilita la colonización por bacterias patógenas en dichos sitios (Foxman, 2010).

En este estudio *E. coli* se encontró asociada con otros microorganismos en el 45.5% (n=91) de las infecciones vaginales, principalmente con *Staphylococcus* spp. (18.5%), *Candida albicans* (11%), *Staphylococcus aureus* (5%) y *Enterococcus faecalis* (4.5%). Diversos estudios confirman que la vaginosis aeróbica usualmente es una infección ocasionada por patógenos mixtos principalmente de los géneros *Streptococcus*, *Staphylococcus* y de la familia *Enterobacteriaceae* (Sianou *et al.*, 2017; Tempera *et al.*, 2006). La frecuencia de asociación *E. coli*-*C. albicans* detectada en este estudio (11%) es inferior al 25.5% reportado en un estudio de vaginitis aeróbica (n= 51) (Jahic *et al.*, 2013). Las infecciones mixtas representan un desafío para el correcto diagnóstico y tratamiento de la vaginitis, ya que ignorar esta condición podría resultar en la prescripción de una terapia inadecuada y en la recurrencia de las infecciones (Han *et al.*, 2015).

La composición de la microbiota vaginal está influenciada por diferentes características del hospedero como edad, niveles hormonales (durante la menstruación, menopausia, embarazo o con el uso de anticonceptivos hormonales) y las prácticas sexuales e higiénicas (Kaambo *et al.*, 2018). En este estudio, la mayor incidencia de infecciones vaginales (40.5%) se detectó en pacientes entre los 40 a 59 años, lo cual coincide con lo reportado en un estudio que incluyó 55 mujeres menopáusicas mexicanas, quienes mostraron mayor prevalencia de *E. coli* (32.7%) (Gonzalez *et al.*, 2007). Esto puede explicarse debido a que durante la menopausia ocurren diversos cambios en el medio vaginal relacionados con los niveles bajos de estrógeno como adelgazamiento del epitelio; incremento del pH; cambios en la cantidad, viscosidad y concentración de glicoproteínas en el moco; niveles bajos de glucógeno y en consecuencia disminución en la abundancia de *Lactobacillus* spp., además de la variación en la respuesta inmune (Muhleisen y Herbst, 2016).

En este estudio la frecuencia de infección vaginal en el grupo de edad de 20 a 39 años fue tan solo del 30.5% (Figura 6). Se ha descrito que el principal factor de riesgo de vaginosis bacteriana en mujeres en edad fértil está asociado con la actividad sexual (Madhivanan *et al.*, 2008; Bitew *et al.*, 2017). El 22.8% de las mujeres estudiadas reportó infecciones vaginales recurrentes. Este porcentaje es menor al descrito en un estudio prospectivo realizado por Bradshaw *et al.*, (2006), quienes encontraron que cerca del 60% de las mujeres tuvieron infecciones recurrentes posteriores a 12 meses de tratamiento con metronidazol. Las mujeres que padecen vaginosis bacteriana tienen mayor riesgo de padecer complicaciones en el embarazo, enfermedad inflamatoria pélvica y enfermedades de transmisión sexual como VIH (Marshall, 2015). La recurrencia y cronicidad de las infecciones genitourinarias está relacionada con la capacidad de *E. coli* para formar biopelícula y comunidades bacterianas intracelulares, como ya se ha mencionado esta forma de crecimiento favorece su persistencia y constituye un reservorio para infecciones recurrentes (Blango y Mulvey, 2010). Por otro lado, el 8% de las mujeres incluidas en este estudio, padecía diabetes. Se ha descrito que la causa más frecuente de vaginitis en pacientes diabéticas es la candidosis vulvovaginal, debido a los altos niveles de glucosa circulante que favorecen la infección y recurrencia de *Candida* spp. (Donders, 2002).

6.2 Cepas CVPEC multirresistentes a los antibióticos

El tratamiento de las infecciones ocasionadas por *E. coli* se ha complicado debido a la emergencia de cepas multirresistentes a los antibióticos (Pitout, 2012). En este estudio el 98.5% (n=197) de las cepas CVPEC fue multirresistente en el rango de 3 a 12 antibióticos. Este elevado porcentaje de multirresistencia coincide con el reportado por otros estudios realizados en UPEC alrededor del mundo (Lee *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2017). El abuso en la prescripción de los antibióticos por parte de los médicos y la automedicación son factores que contribuyen a potenciar la presión selectiva de los antibióticos y favorecer la emergencia de cepas multirresistentes (Amábile, 2010). La multirresistencia bacteriana a los

antibióticos resulta en la reducción de las opciones de tratamiento, elevando su costo, además de prolongar la enfermedad (Da Silva y Medonca, 2012).

En este estudio la mayoría de las cepas CVPEC fue resistente a los antibióticos betalactámicos ampicilina (97%, n=194), carbencilina (93.5%, n= 187) y cefalotina (77%, n= 154), además del 71% (n=142) de cepas resistentes a nitrofurantoína y del 60.5% (n=121) a Trimetoprim/sulfametoxazol. Se han descrito porcentajes semejantes de resistencia a ampicilina (94.7%), y trimetoprim- sulfametoxazol (67.5%) en cepas CVPEC aisladas en Irán (Rashki, 2014), así como en cepas UPEC aisladas de pacientes mexicanas (Molina *et al.*, 2011; Miranda *et al.*, 2016). Por otro lado, se han reportado porcentajes inferiores a los descritos en este trabajo para ampicilina (76.7%) y trimetoprim-sulfametoxazol (23.3%) para cepas CVPEC aisladas en Etiopía (Bitew *et al.*, 2017). Los elevados porcentajes de resistencia a ampicilina y trimetoprim-sulfametoxazol encontrados en este estudio pueden explicarse debido a que estos medicamentos son de primera elección para el tratamiento de infecciones genitourinarias.

En este estudio los porcentajes menores de resistencia de las cepas fueron para cefotaxima, cloranfenicol y amikacina con el 38% (n=76), 29.5% (n=59) y 22.5% (n=45), respectivamente. El porcentaje de resistencia a cefotaxima es muy inferior al descrito por Rashki (2014) en cepas CVPEC (86.9%) y por Miranda *et al.*, (2016) en cepas UPEC (57%). Por el contrario Bitew *et al.*, (2017) reportaron porcentajes menores de resistencia a cefotaxima (14%) y a amikacina (13.9%) en cepas de *E. coli*.

El 58% de las cepas analizadas fue resistente a las quinolonas norfloxacin y ciprofloxacina, respectivamente, y el 41.5% presentó resistencia a gentamicina y netilmicina, en cada caso. Estos porcentajes de resistencia son similares a los encontrados en cepas UPEC, donde el 45.8% fue resistente a norfloxacin y ciprofloxacina, en cada caso, y el 32.7% a gentamicina (Miranda *et al.*, 2016).

6.3 Detección de los genes de resistencia a los antibióticos en las cepas CVPEC

El uso indebido de antimicrobianos en medicina humana, veterinaria y actividades agrícolas acelera el proceso de selección de bacterias multirresistentes a ellos (Levy y Marshal, 2004). Si bien existen bacterias intrínsecamente resistentes a los

antibióticos, esta resistencia también puede ser adquirida por mutaciones puntuales de los genes cromosómicos y/o mediante la adquisición de DNA por transferencia horizontal. La transferencia horizontal tiene un papel central en la evolución bacteriana y en la diseminación de genes de resistencia a los antibióticos los cuales frecuentemente se encuentran insertos en elementos genéticos móviles como plásmidos, transposones o integrones (Blair *et al.*, 2015). Una vez seleccionadas y establecidas las clonas resistentes a los antibióticos, proliferan y pueden alcanzar otros nichos ecológicos (Barbosa y Levy, 2000).

6.3.1 Genes de resistencia a los betalactámicos

La inactivación por hidrólisis de los antibióticos betalactámicos es el mecanismo más común de resistencia a este tipo de antimicrobianos en las bacterias Gram negativas. Se han descrito más de 1000 betalactamasas y este número aumenta de forma continua, las enzimas están agrupadas de acuerdo con sus características bioquímicas, principalmente en su especificidad al sustrato (Bush y Jacoby, 2010; Munita y Arias, 2016). En este estudio se detectó el gen *TEM* en el 61.5% (n=123) de las cepas CVPEC, *SHV* en el 35.5% (n= 71) y *CITM* en el 14.5% (n=29). Los genes *TEM* y *SHV* codifican penicilinasas, enzimas que hidrolizan ampicilina, carbencilina, oxacilina y cefalotina sin actividad frente a cefalosporinas de amplio espectro (Paterson y Bonomo, 2005). La alta prevalencia de *TEM* y la baja detección de *SHV* coincide con lo reportado por otros estudios realizados en Benin e Irán (Anago *et al.*, 2015; Shahbazi *et al.*, 2018). Por otro lado, el gen *CITM* codifica un grupo de betalactamasas AmpC mediadas por plásmido, las cuales confieren resistencia a los betalactámicos de amplio espectro, incluyendo penicilinas, cefalosporinas con grupo oximino, cefamicinas y aztreonam (Jacoby, 2009). La baja detección de *CITM* en las cepas CVPEC, puede deberse a que las betalactamasas AmpC mediadas por plásmido se encuentran con mayor frecuencia en cepas nosocomiales de *E. coli* y *K. pneumoniae* (Pérez y Hanson, 2002).

6.3.2 Genes de resistencia a los aminoglucósidos

La inactivación enzimática es el mecanismo más frecuente de resistencia bacteriana a los aminoglucósidos, otros mecanismos son las mutaciones o modificaciones en el ribosoma por acción de metiltransferasas y la reducción de la permeabilidad de la membrana (Garneau y Labby, 2016). La susceptibilidad de los aminoglucósidos a la acción de las enzimas modificadoras (AMEs) se debe a su estructura que contiene diversos sitios con grupos amida e hidroxilo expuestos (Blair *et al.*, 2014). En este estudio se detectaron genes que codifican subclases de acetiltransferasas, *aac (3)-II* en el 82.5% (n=165) de las CVPEC, seguido por *aac (3)-I* en el 20.5% (n=41), *aac (3)-III* en el 19.5% (n=39) y *aac (3)-IV* en el 4.5% (n=9). El alto porcentaje de cepas portadoras del gen *aac(3)-II* coincide con los reportes para *E. coli* de origen sanguíneo (91%) y UPEC (84.1%) (Ho *et al.*, 2014; Ho *et al.*, 2010). El gen *aac(3)-II* confiere resistencia a gentamicina, tobramicina, dibekacina y netilmicina (Shaw *et al.*, 1993). Por otro lado, en el estudio de Fernandez *et al.*, (2015) realizado en España, no se detectaron los genes *aac(3)-I* y *aac(3)-IV* en las cepas de *E. coli* resistentes a amoxicilina-ácido clavulánico. El gen *aadA1* codifica una adeniltransferasa que confiere resistencia a espectinomicina y estreptomycin; estas enzimas son la clase más común de nucleotidil- transferasas (Ramirez y Tomalsky, 2010). *aadA1* fue detectado en el 42% (n=42) de las cepas CVPEC, este resultado es mayor al 14.7% encontrado en cepas clínicas de *E. coli* por Xiao y Hu, (2012) y menor a lo reportado en cepas no patógenas de *E. coli* (82.3%) (Saenz *et al.*, 2004). Los genes *aadA1* frecuentemente se encuentran en casetes genéticos como parte de integrones, plásmidos y transposones lo que facilita su diseminación (Ramirez y Tomalsky, 2010).

6.3.3 Genes de resistencia a cloranfenicol

El mecanismo de resistencia bacteriana más común al cloranfenicol es la inactivación enzimática por acetilación a través de acetiltransferasas (CATs). Sin embargo, existen otros mecanismos como bombas de eflujo, inactivación por fosfotransferasas, mutación del sitio blanco y barreras de permeabilidad (Schwarz

et al., 2004). En este estudio, se detectaron bajos porcentajes de *cat1* y *cmLa* en las cepas CVPEC (9%, n=18; 4.5%, n=9 respectivamente); *cat1* codifica para una acetiltransferasa y *cmLa* codifica un sistema de bombas de eflujo específico (Schwarz *et al.*, 2004). Los porcentajes en otros estudios alrededor del mundo son variables, en cepas *E. coli* diarreogénicas en Irán reportan 59.7% para *cat1* y 60.4% para *cmLa* (Heldary *et al.*, 2014), otro estudio también realizado en Irán, reporta el 15.4% de detección de *cmLa* y *cat1* en cepas UPEC (Momtaz *et al.*, 2013), finalmente en cepas UPEC mexicanas se reporta el 11% y 4% de detección para *cat1* y *cmLa*, respectivamente (Paniagua *et al.*, 2017).

6.3.4 Genes de resistencia a tetraciclina

Los mecanismos prevalentes de resistencia a tetraciclina en cepas clínicas son las bombas de eflujo y la protección ribosómica por proteínas citoplásmicas. Los genes *tet(A-J)* codifican proteínas asociadas a la membrana que expulsan la tetraciclina de la célula (Alekshun y Levy, 2007). En este estudio se detectó *tet(A)* en el 56% (n=112) de las CVPEC, seguido por *tet(B)* en el 36% (n=72) y *tet(C)* en el 22% (n=44). Estos porcentajes son superiores a los reportados para cepas UPEC en México con el 34% de *tet(A)* y el 17% de *tet(B)* (Paniagua *et al.*, 2017). Se ha reportado que estos genes de resistencia a tetraciclina se encuentran con frecuencia en cepas de *E. coli* provenientes de carne de animales (pollo, cerdo, res, mariscos) resaltando la importancia de los alimentos como reservorios de cepas con genes de resistencia a los antibióticos (Shin *et al.*, 2015; Van *et al.*, 2008). Las tetraciclinas son extensamente usadas en medicina humana y veterinaria debido a su amplio espectro de actividad, bajo costo, vía de administración y escasos efectos secundarios (Chopra y Roberts, 2001).

6.3.5 Genes de resistencia a trimetoprim/sulfametoxazol

La administración de trimetoprim en combinación con sulfametoxazol (sulfonamida) se debe a su efecto sinérgico, ya que ambos bloquean etapas sucesivas del metabolismo bacteriano del ácido fólico (Huovinen, 2001). Sin

embargo la resistencia bacteriana a estos antibióticos se ha incrementado debido a la adquisición de enzimas codificadas en elementos genéticos móviles que difieren en peso molecular, tienen escasa afinidad por el antimicrobiano y garantizan la continuación de la vía metabólica (Shaik *et al.*, 2015). En este estudio el 40.5% (n=81) de las CVPEC fue portadora del gen *dfrA1* y el 35.5% (n=71) del gen *sul1*. El porcentaje de detección del gen *sul1* es similar a lo reportado para cepas UPEC en México e Irán, y el porcentaje de cepas portadoras del gen *dfrA1* es ligeramente superior al reportado en las cepas UPEC mencionadas anteriormente (Paniagua *et al.*, 2017; Momtaz *et al.*, 2013). Se ha descrito que la mayoría de los genes de resistencia a trimetoprim y sulfonamida se encuentran dentro de integrones; *sul1* se encuentra casi exclusivamente en plásmidos conjugativos e integrones clase I, mientras *dfrA1* es un componente estático de los integrones clase II (Blahna *et al.*, 2006).

6.3.6 Genes de resistencia a quinolonas

La resistencia a quinolonas en Enterobacterias, se debe principalmente a mutaciones en los genes que codifican la topoisomerasa tipo II y/o a cambios en la permeabilidad y expresión de las bombas de eflujo (Ruiz, 2003). Recientemente se han descrito genes *qnrA*, *B*, *S* insertos en plásmidos que codifican una proteína perteneciente a una familia de pentapéptidos repetidos que protegen a la DNA girasa de la acción de las quinolonas (Jacoby *et al.*, 2006). En este estudio se detectó que el 80.5% (n=161) de las cepas CVPEC portaron *qnrB*, el 45.5% (n=91) *qnrS* y el 34.5% (n=69) *qnrA*. Estos porcentajes son superiores a lo reportado para cepas UPEC en Irán y Pakistán (Shahbazi *et al.*, 2018; Ali *et al.*, 2015).

6.4 Cepas CVPEC formadoras de biopelícula

La capacidad de formar biopelícula por cepas patógenas aumenta la cronicidad de las infecciones y dificulta su erradicación. Se ha descrito que cerca del 65% de las infecciones nosocomiales y el 80% de las infecciones microbianas son

ocasionadas por cepas formadoras de biopelícula (Soto, 2014). En este estudio, el 73% (n=146) de las CVPEC fueron formadoras de biopelícula, dentro de las cuales, el 44% (n=88) fueron formadoras débiles, el 11% (n=22) formadoras moderadas y el 18% (n=36) formadoras fuertes. Todas las cepas causantes de infecciones vaginales recurrentes formaron biopelícula (24%, n=48) dentro de las cuales el 43.8% (n=21) formaron biopelícula fuerte, el 33.3% (n=16) formaron biopelícula moderada y el 22.9% (n=11) formaron biopelícula débil. Estos datos resaltan la importancia de la biopelícula como reservorio para infecciones vaginales recurrentes (Blango y Mulvey, 2010). La mayoría de las cepas CVPEC fueron formadoras débiles de biopelícula, lo cual coincide con lo reportado para cepas UPEC aisladas en India (60.7%) e Irán (56.3%) (Argawal *et al.*, 2013; Tajbaksh *et al.*, 2016). La presencia de cepas formadoras de biopelícula débil es importante en infecciones polimicrobianas porque pueden incorporarse a una biopelícula establecida o interactuar sinérgicamente con otras especies para formarla (Sanchez *et al.*, 2013). Por otro lado, Fatahi *et al.*, (2015) reportaron un mayor porcentaje de cepas UPEC formadoras fuertes de biopelícula (38%) y en un estudio realizado en México con cepas UPEC aisladas de pacientes con cistitis describieron 33.6% de cepas formadoras débiles, 32.8% formadoras moderadas y 33.6% formadoras fuertes (Miranda *et al.*, 2016). La formación de biopelícula en las cepas UPEC varía de acuerdo con la infección que ocasionan, se ha descrito que *E. coli* que causa prostatitis aguda tiene mayor capacidad de formar biopelícula *in vitro* que aquellas que causan cistitis o pielonefritis (Soto *et al.*, 2007). Como ya se ha mencionado, UPEC puede internalizarse a las células del urotelio y formar Comunidades Bacterianas Intracelulares parecidas a la biopelícula, lo cual otorga protección frente a la respuesta inmune y la acción de los antibióticos, además de que el establecimiento de reservorios intracelulares incrementa la cronicidad de las infecciones del tracto urinario (Lewis *et al.*, 2016).

6.5 Detección y expresión de los genes de adhesión en las cepas CVPEC

La principal función de las proteínas de adhesión es facilitar la colonización al mediar la fijación de las bacterias al tejido del hospedero, sin embargo las

adhesinas también contribuyen a la virulencia de otras maneras, pueden activar directamente vías de señalización en el hospedero, facilitar la liberación de otros productos bacterianos hacia los tejidos del hospedero y promover la internalización bacteriana (Mulvey, 2002).

6.5.1 Gen *fimH* (fimbria tipo 1)

El operon *fim* que codifica para la fimbria tipo 1, es un elemento ampliamente distribuido entre las cepas de *E. coli* patógenas y comensales (Zhang y Foxman, 2003). En este estudio, el gen *fimH* fue detectado en el 89.5% (n=179) de las CVPEC, este alto porcentaje coincide con los reportes para cepas CVPEC en Estados Unidos (98%), Chile (89%), Japón (100%) e Irán (71.2%) (Hilbert *et al.*, 2008; Padilla *et al.*, 2013; Obata *et al.*, 2002; Rashki, 2014). Estudios en cepas de *E. coli* uropatógenas realizados en México (Ramírez *et al.*, 2018), China (Gao *et al.*, 2017) y Corea del Sur (Lee *et al.*, 2016) reportaron porcentajes de detección de *fimH* del 71.8%, 92.3% y 100%, respectivamente.

Por otra parte, en este estudio durante la infección del cultivo de la línea celular A431 se encontró que el 86% (n=172) de las cepas CVPEC expresó el gen *fimH*. Como ya se ha mencionado, *fimH* codifica para la proteína de adhesión de la fimbria tipo 1, uno de los factores de virulencia más importantes en el establecimiento de las infecciones del tracto urinario porque además de participar en la adherencia bacteriana, está involucrado en la invasión de las células del hospedero y la formación de biopelícula intracelular (Bergsten *et al.*, 2005; Anderson *et al.*, 2003; Martinez *et al.*, 2000). Este resultado coincide con lo descrito en un modelo murino de infección del tracto urinario, donde se detectó la sobreexpresión de los genes del operon *fim* en las cepas UPEC, siendo el gen *fimA* que codifica para la subunidad estructural mayor de la fimbria uno de los genes con mayor tasa de expresión (Snyder *et al.*, 2004). En contraste, se ha reportado un porcentaje del 52.8% de cepas UPEC que expresaron el gen *fim* en un modelo de infección *in vitro* (Paniagua *et al.*, 2017).

6.5.2 Gen *iha* (adhesina homóloga al gen regulado por hierro)

En este estudio, el 51.5% (n=103) de las cepas CVPEC fue portadora del gen *iha* que codifica para una proteína de membrana externa que además de su función como adhesina, es un sideróforo catecolato en el sistema de adquisición de hierro (Léveillé *et al.*, 2006). Este porcentaje es mayor al reportado por Hilbert *et al.*, 2008 (26%) y Rashki, 2014 (9.8%) en cepas CVPEC. La frecuencia de este gen en cepas UPEC alrededor del mundo es variable, del 51.5% en Corea del Sur (Lee *et al.*, 2016), 26.5% en Estados Unidos (Rodríguez *et al.*, 2005) y 17.9% en Irán (Momtaz *et al.*, 2013). En cepas de *E. coli* productoras de la toxina Shiga (STEC) se ha reportado el 91% de prevalencia del gen *iha* (Toma *et al.*, 2004). Se ha descrito que para cepas de UPEC, *iha* es un factor de virulencia que contribuye a la colonización en el modelo murino de infección del tracto urinario, así como la adherencia *in vitro* a las células de la vejiga del cultivo T-24 (Johnson *et al.*, 2005). En este estudio, el 51.5% (n=103) de las cepas CVPEC portadoras del gen *iha* lo expresó durante el modelo de infección *in vitro*. Este porcentaje es menor al 64.9% de cepas UPEC que expresaron *iha* en un modelo *in vitro* (Paniagua *et al.*, 2017). Otro estudio realizado en cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con bacteriuria asintomática, reporta sobreexpresión del gen *iha*, así como escasa o nula expresión de las fimbrias tipo 1, F1C y el pili P que desencadenan la respuesta inmune del hospedero como producción de citocinas, inflamación y exfoliación de las células epiteliales infectadas (Ross y Klemm, 2006).

6.5.3 Gen *pap* (pili asociado a pielonefritis)

El pili asociado a pielonefritis codificado por el gen *pap* es un factor de virulencia significativamente prevalente en las cepas UPEC causantes de pielonefritis y se ha detectado en otras cepas patógenas como *E. coli* causante de meningitis neonatal y patógena aviar (Lane y Mobley, 2007; Ewers *et al.*, 2006). En este estudio, se detectaron diversos genes *pap* en las cepas CVPEC, siendo *papC* el más prevalente con el 41% (n=82), seguido por *papGII* con 33.5% (n=67), *papEF* con 26.5% (n=53), *papA* con 14% (n=28) y *papGIII* con el 3% (n=6); el gen *papGI* no fue detectado en las cepas estudiadas. Se han descrito porcentajes de

detección en cepas CVPEC del 52% (Hilbert *et al.*, 2008) para *pap* y del 34.9% al 45% para *papC* (Padilla *et al.*, 2013; Obata *et al.*, 2002). En un estudio realizado por Johnson *et al.* (2005), describieron mayor prevalencia de *papC* y *papEF* (60%), seguida por *papA* (56%), *papGII* (40%) y *papGIII* (31%) en cepas UPEC aisladas de pacientes con cistitis, pielonefritis y prostatitis. La elevada frecuencia de cepas CVPEC portadoras de genes *pap* refleja el potencial de las cepas para ocasionar también infecciones de vías urinarias. En este estudio se detectó la expresión elevada de los genes involucrados en la biogénesis del pili tipo 1 en las cepas CVPEC, el 31.5% (n=63) de las cepas expresó el gen *papGII*, el 29% el gen *papC* (n=58), el 14% (n=28) el gen *papA* y el 1.5% (n=3) el gen *papGIII*, por otro lado el gen *papEF* no fue expresado por ninguna cepa. Estos porcentajes son similares a los reportados para cepas UPEC, las cuales expresaron *papC* (33.5%), *papGI* (4.1%), *papGII* (15.4%) y *papGIII* (5.7%) durante el modelo de infección *in vitro* (Paniagua *et al.*, 2017). La proteína de adhesión en el pili P, es PapG la cual se une a los motivos Gal α 1-4Gal presentes en los globósidos de eritrocitos humanos y células uroteliales. Los tres alelos predominantes de la adhesina PapG (I, II y III), tienen afinidad por las variantes del receptor globotriaoscilceramida y se han asociado clínicamente a diversas patologías, *papGII* se detecta principalmente en cepas de *E. coli* causantes de pielonefritis y bacteremia, *papGIII* es frecuente en *E. coli* causante de cistitis y la escasa prevalencia de *papGI* impide establecer una asociación (Strömberg *et al.*, 1990; Lane y Mobley, 2007).

6.5.4 Gen *sfa* (fimbria S) y gen *foc* (fimbria F1C)

En este estudio los porcentajes de detección de *sfa* y *focG* fueron del 14.5% (n=29) y 9% (n=18) respectivamente, mientras que el 10% (n=20) de las cepas CVPEC expresó el gen *sfa* y el 6% (n=12) el gen *focG*. La detección de estos genes en cepas CVPEC en estudios previos fue del 20-54.1% (Hilbert *et al.*, 2008; Padilla *et al.*, 2013; Obata *et al.*, 2002). Se ha descrito que las fimbrias S y F1C están involucradas en la patogénesis del tracto urinario ya que tienen afinidad por las células epiteliales y endoteliales de las vías urinarias bajas y el riñón (Klemm

et al., 2010). La prevalencia de estos genes en cepas UPEC se ha reportado del 81% para *sfa* y del 16% para *foc* (Rahdar *et al.*, 2015). Además de facilitar la diseminación bacteriana en el tejido del hospedero, la fimbria S se asocia principalmente a cepas de *E. coli* causantes de sepsis y meningitis neonatal (Bien, 2012). Se ha reportado que la fimbria F1C está involucrada en la formación de biopelícula y es importante para la adherencia y colonización del epitelio intestinal murino por cepas comensales de *E. coli* (Lasaro *et al.*, 2009). Por otra parte, Paniagua *et al.*, (2017) reportaron el 2.6% de expresión *in vitro* del gen *sfa* en cepas UPEC, un porcentaje menor al obtenido en este estudio; se ha descrito que los niveles de expresión de los genes fimbriales *in vivo* (como *sfa* y *foc*) son bajos debido a que la expresión constitutiva de *fim* ocasiona la regulación a la baja de la expresión de otras fimbrias (Snyder *et al.*, 2004).

6.5.5 Gen *afa* (Adhesina afimbrial)

En este estudio el porcentaje de detección del gen *afa* fue del 9% (n=18) y el 3.5% (n=7) de las cepas lo expresaron en el modelo de infección *in vitro*. La prevalencia de *afa* en cepas CVPEC en estudios previos fue del 6% (Obata *et al.*, 2002) y 8% (Hilbert *et al.*, 2008), mientras que el porcentaje de expresión *in vitro* reportado en cepas UPEC previamente fue del 12.4% (Paniagua *et al.*, 2017). Se ha descrito que el gen *afa* está asociado principalmente a cepas de *E. coli* causantes de infecciones intestinales en niños (patotipo Difuso Adherente, DAEC), debido a su capacidad para promover la internalización bacteriana (Le Bouguéneq, 2005). Además se ha establecido la asociación de cepas de *E. coli* que expresan *afa* con la capacidad de ocasionar cistitis y pielonefritis en mujeres embarazadas (Zalewska, 2011).

6.5.6 Genes *gafD* (Fimbria G) y *bmaE* (Adhesina M)

Los genes *gafD* y *bmaE* no fueron detectados en las cepas CVPEC ni fueron expresados por ellas en el modelo *in vitro* de infección. Johnson *et al.* (2005) reportó que los genes *gafD* y *bmaE* están asociados a pielonefritis con un

porcentaje de detección del 18% en cepas de *E. coli*. Otros estudios realizados en cepas UPEC reportaron frecuencias del 1% (Yun et al., 2014) y 9% (Zhao et al., 2009) para *bmaE* y 0% para *gafD*. Los otros miembros de la familia de fimbrias F17 (a la cual pertenece la fimbria G) son producidos por *E. coli* asociada a diarrea/septicemia en bovinos (Le Bouguéneq y Bertin, 1999).

6.6 Asociación de la expresión de los genes de adhesión con la formación de biopelícula en las cepas CVPEC

En este estudio se encontró que los genes *fim*, *iha*, *papC*, *papGII*, *sfa* y *papA* se expresaron en la mayoría de las cepas con producción de biopelícula débil. Este hecho puede deberse a que la producción de la biopelícula durante la patogénesis de las infecciones genitourinarias generalmente ocurre intracelularmente (Lewis et al., 2016). En este estudio la producción de la biopelícula se realizó *in vitro*, en placas de microtítulo de poliestireno. No obstante, los resultados encontrados evidencian de manera global la expresión de los genes de adhesión, principalmente *fim* y *papC* que han sido asociados a la formación de la biopelícula (Fattahi et al., 2015), lo que reflejaría la capacidad de las cepas CVPEC para ocasionar infecciones crónicas y/o recurrentes, al evadir la respuesta inmune del hospedero y la acción de los antibióticos.

6.7 Patrones de expresión de los genes de adhesión en cepas CVPEC asociados a los genes de resistencia a los antibióticos

Después de la infección de la línea celular vaginal A431 con las cepas vaginales de *E. coli* se identificaron 33 patrones de expresión de los genes de adhesión relacionados con los marcadores de resistencia a los antibióticos, dentro de los cuales el patrón más frecuente fue *fimH/iha* (n=43) asociado principalmente a los genes de resistencia a gentamicina (*aac(3)II*), quinolonas (*qnrB* y *qnrS*), betalactámicos (*TEM*), tetraciclina (*tetA*) y trimetoprim (*dfrA1*). La asociación colectiva de la expresión de los distintos marcadores de adhesión en las cepas CVPEC involucrados en la iniciación, unión y maduración de la biopelícula con los genes de resistencia a betalactámicos, tetraciclina, quinolonas, sulfametoxazol,

trimetoprim, estreptomina, cloranfenicol y aminoglucósidos, demuestran la capacidad de las cepas para ocasionar infecciones vaginales crónicas o recurrentes, y en consecuencia, infecciones de vías urinarias y en algunos casos mixtas. Recientemente se han descrito algunos patrones de asociación de marcadores de virulencia en cepas UPEC (Derakhshandeh *et al.*, 2015), sin embargo los patrones en cepas CVPEC aun no se han descrito.

7. CONCLUSIONES

1. *E. coli* fue la principal bacteria asociada a las infecciones cérvico-vaginales del grupo de pacientes estudiadas.
2. En el modelo de infección *in vitro* de la línea celular vaginal A431, se detectó la expresión de múltiples genes (*fimH*, *iha*, variantes alélicas de *pap*, *sfa*, *afa*, *focG*) para la adhesión bacteriana a la línea celular vaginal, lo que refleja la capacidad de *E. coli* para iniciar la colonización del canal cérvico-vaginal.
3. Durante la infección de la línea celular la mayoría de las cepas expresaron el gen *fimH*, evidenciando el potencial de las cepas de *E. coli* para internalizarse a las células epiteliales e iniciar la formación de biopelícula intracelular.
4. Las cepas de *E. coli* vaginales expresaron genes de adhesión comúnmente detectados en otras cepas extraintestinales como UPEC (variantes alélicas de *pap*) lo que incrementaría el riesgo de ocasionar infección de las vías urinarias.
5. La elevada frecuencia de cepas de *E. coli* productoras de biopelícula señala su capacidad para incrementar los procesos infecciosos, al constituir un reservorio para infecciones recurrentes y dificultar su erradicación al generar un ambiente protector contra la respuesta inmune y la acción de los antibióticos.
6. Este es el primer estudio de expresión de genes de adhesión de cepas CVPEC utilizando un modelo *in vitro* de infección de células vaginales humanas, lo cual es un aporte al conocimiento sobre la patogénesis de las cepas de *E. coli* aisladas de pacientes mexicanas diagnosticadas con infecciones vaginales.

8. ANEXO

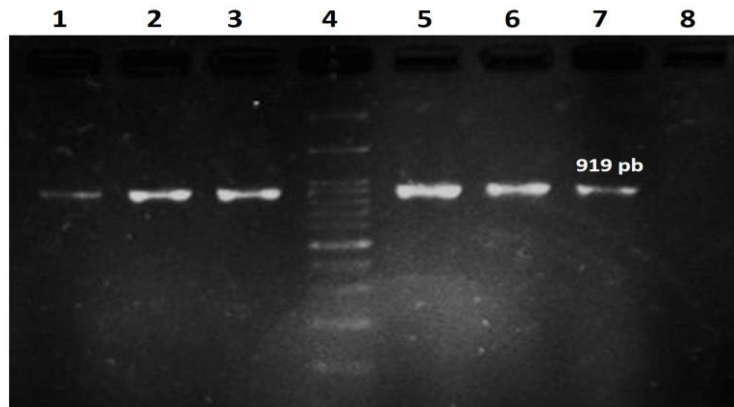


Figura 8. Detección del gen *16S rRNA* (amplicon de 919 pb). Carriles 1-3,5,6 cepas CVPEC; carril 4, MWM (100 pb); carril 7, control positivo (*E. coli* ATCC 11775); carril 8, control negativo (sin DNA molde) .

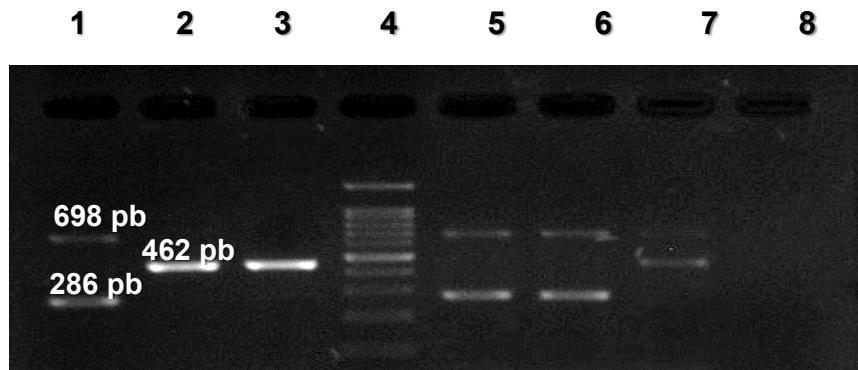


Figura 9. Detección de los genes *cmIA* (amplicon 698 pb), *CITM* (amplicon de 462 pb) y *aac(3)-IV* (amplicon de 286 pb). Carriles 1,2 controles positivos (cepario laboratorio clínico); Carriles 3, 5-7 cepas CVPEC; carril 8, control

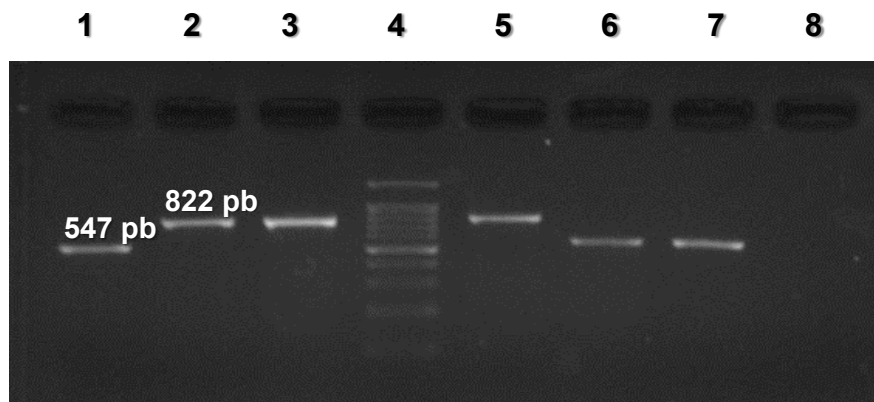


Figura 10. Detección de los genes *sul1* (amplicon de 822 pb) y *cat1* (amplicon de 547 pb). Carriles 1,2 controles positivos (cepario laboratorio clínico); Carriles 3, 5-7 cepas⁷⁰ CVPEC; carril 4, MWM (100 pb); carril 8, control negativo (sin DNA molde).

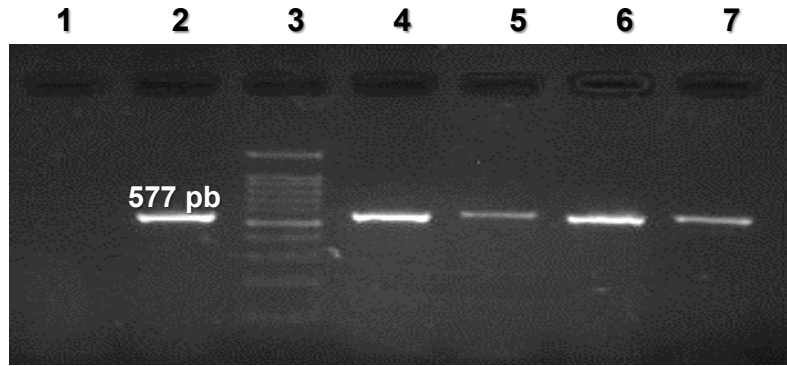


Figura 11. Detección del gen *tet(A)* (amplicon de 577 pb). Carril 1, control negativo (sin DNA molde); carril 2, control positivo (cepario laboratorio clínico); carril 3, MWM (100 pb); carriles 4-7 cepas CVPEC.

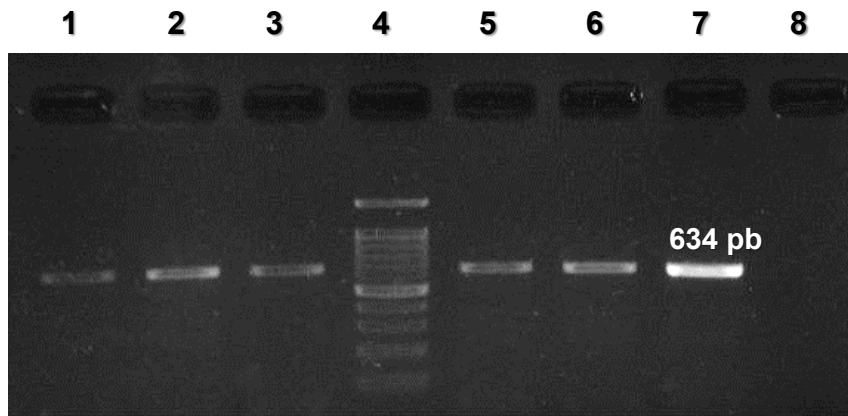


Figura 12. Detección del gen *tet(B)* (amplicon de 634 pb). Carriles 1-3,5,6 cepas CVPEC; carril 4, MWM (100 pb); carril 7, control positivo (cepario laboratorio clínico); carril 8, control negativo (sin DNA molde) .

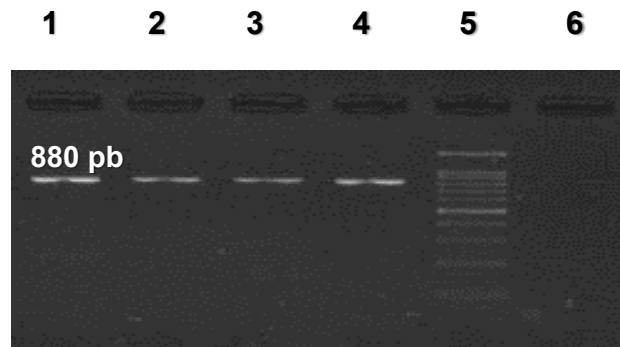


Figura 13. Detección del gen *tet(C)* (amplicon de 880 pb). Carriles 1, control positivo (cepario laboratorio clínico); Carriles 2-4, cepas CVPEC; carril 5, MWM (100 pb); carril 8, control negativo (sin DNA molde) .

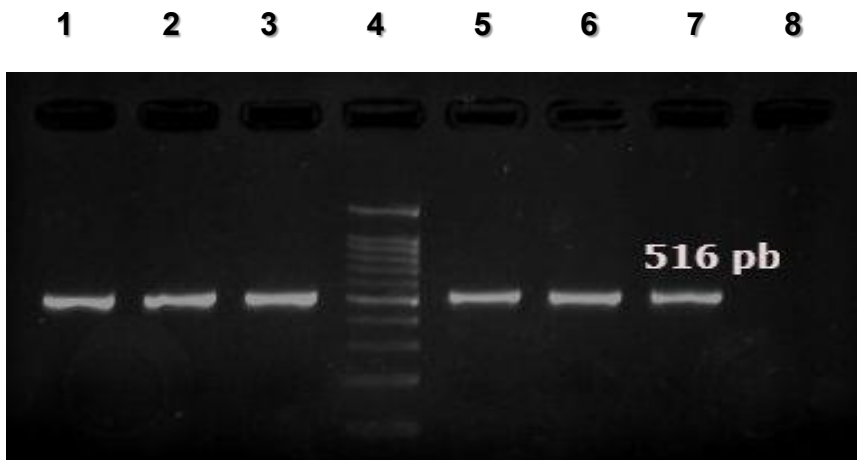


Figura 14. Detección del gen *qnrA* (amplicon de 516 pb). Carriles 1-3, 5,6 cepas CVPEC; carril 4, MWM (100 pb);carril 7, control positivo (cepario del laboratorio clínico); carril 8, control negativo (sin DNA molde) .

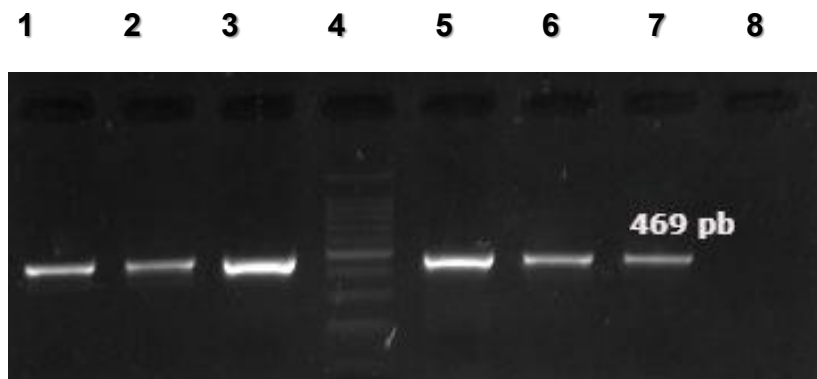


Figura 15. Detección del gen *qnrB* (amplicon de 469 pb). Carriles 1-3, 5, 6 cepas CVPEC; carril 4, MWM (100 pb);carril 7, control positivo (cepario del laboratorio clínico); carril 8, control negativo (sin DNA molde) .

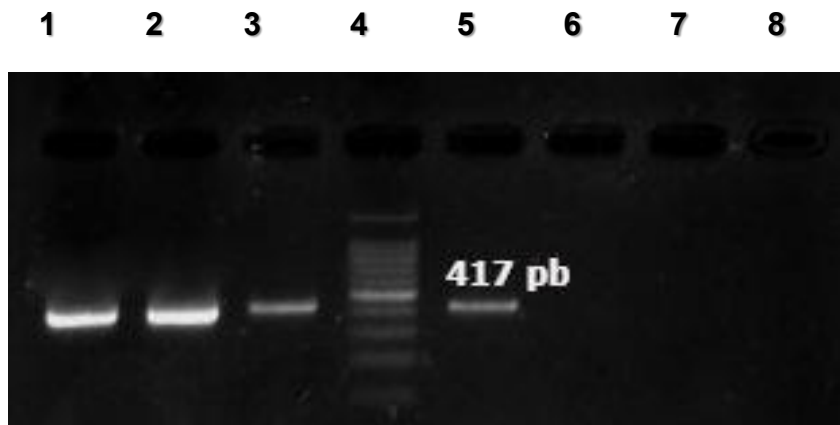


Figura 16. Detección del gen *qnrS* (amplicon de 417 pb). Carriles 1-3, 6, 7 cepas CVPEC; carril 4, MWM (100 pb);carril 5, control positivo (cepario del laboratorio clínico); carril 8, control negativo (sin DNA molde) .

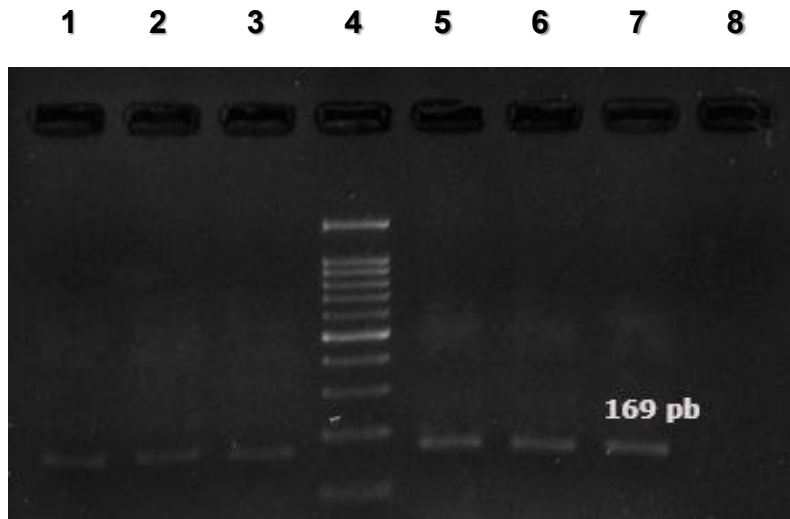


Figura 17. Detección del gen *aac(3)-I* (amplicon de 169 pb). Carriles 1-3, 5, 6 cepas CVPEC; carril 4, MWM (100 pb); carril 7, control positivo (cepario del laboratorio clínico); carril 8, control negativo (sin DNA molde) .

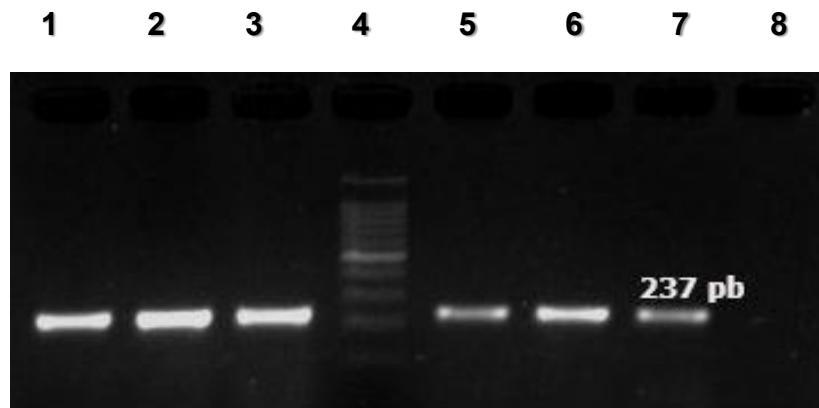


Figura 18. Detección del gen *aac(3)-II* (amplicon de 237 pb). Carriles 1-3, 5,6 cepas CVPEC; carril 4, MWM (100 pb); carril 7, control positivo (cepario del laboratorio clínico); carril 8, control negativo (sin DNA molde) .

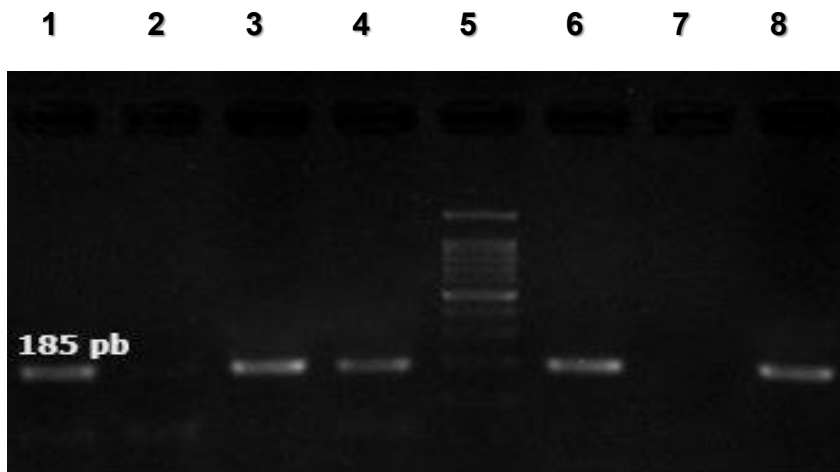


Figura 19. Detección del gen *aac(3)-III* (amplicon de 185 pb). Carriles 1-4, 6 cepas CVPEC; carril 5, MWM (100 pb); carril 8, control positivo (cepario del laboratorio clínico); carril 7, control negativo (sin DNA molde) .

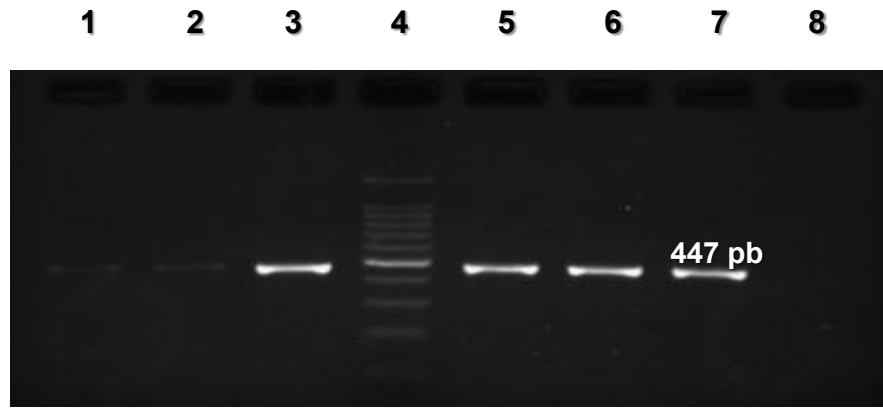


Figura 20. Detección del gen *aadA1* (amplicon de 447 pb). Carriles 1-3,5,6 cepas CVPEC; carril 4, MWM (100 pb); carril 7, control positivo (cepario laboratorio clínico); carril 8, control negativo (sin DNA molde) .

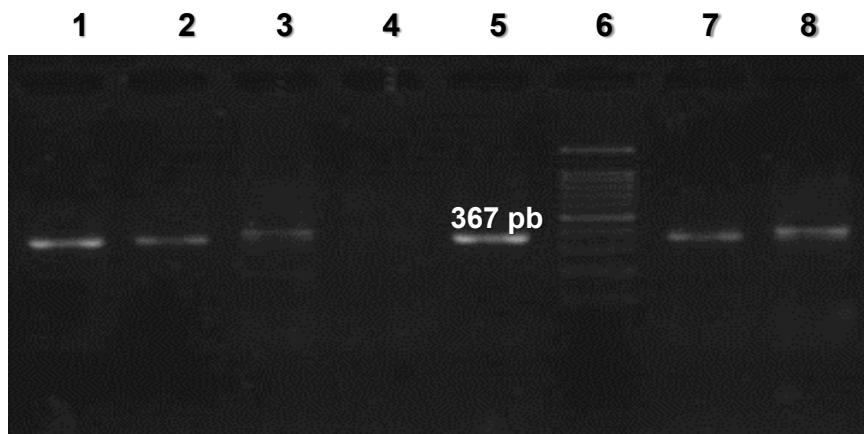


Figura 21. Detección del gen *dfrA1* (amplicon de 367 pb). Carriles 1-3, 7,8, cepas CVPEC; carril 4, control negativo (sin DNA molde); carril 5, control positivo (cepario laboratorio clínico); carril 6, MWM (100 pb).

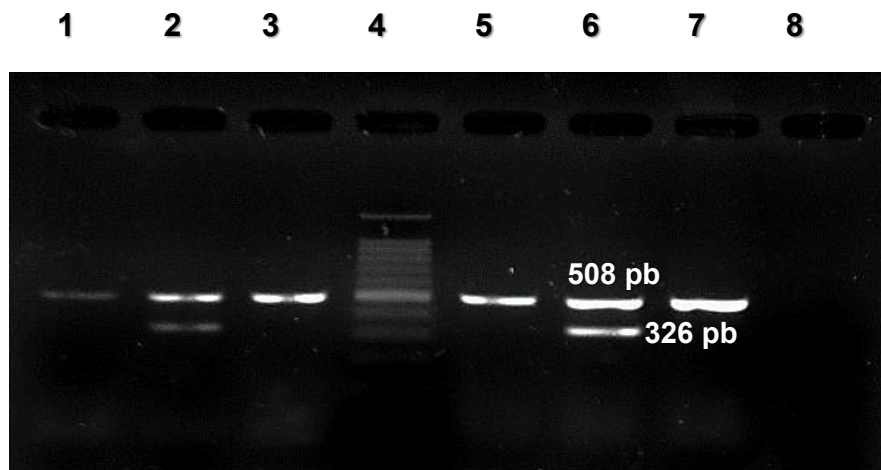


Figura 22. Detección de los genes *fimH* (amplicon de 508 pb) y *papEF* (amplicon de 326 pb). Carriles 1-3,4,7 cepas CVPEC; carril 4, MWM (100 pb); carril 6, control positivo (cepario del laboratorio clínico); carril 8, control negativo (sin DNA molde) .

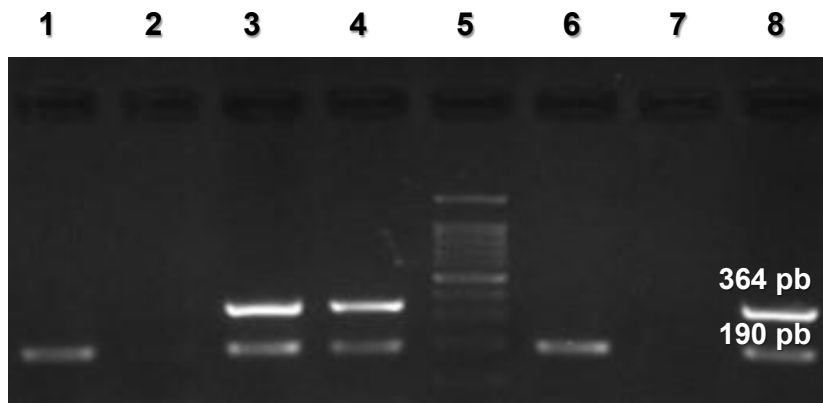


Figura 23. Detección de los genes *focG* (amplicon de 364 pb) y *papGII* (amplicon de 190 pb). Carriles 1-4,6 cepas CVPEC; carril 5, MWM (100 pb); carril 7, control negativo (sin DNA molde); carril 8, control positivo (cepario del laboratorio clínico).

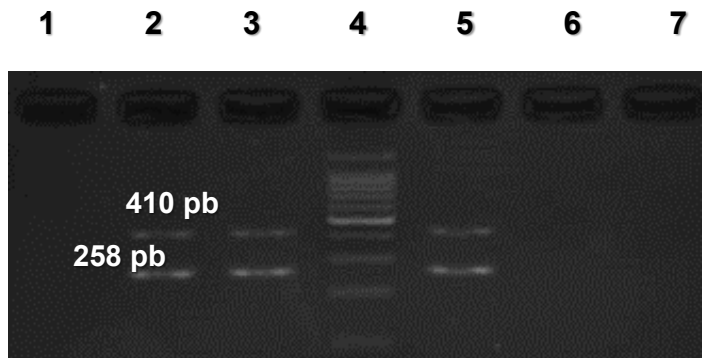


Figura 24. Detección de los genes *sfa* (amplicon de 410 pb) y *papGIII* (amplicon de 258 pb). Carril 1, control negativo (sin DNA molde); Carril 2, control positivo (cepario laboratorio clínico); Carriles 3, 5-7 cepas CVPEC; carril 4, MWM (100 pb).

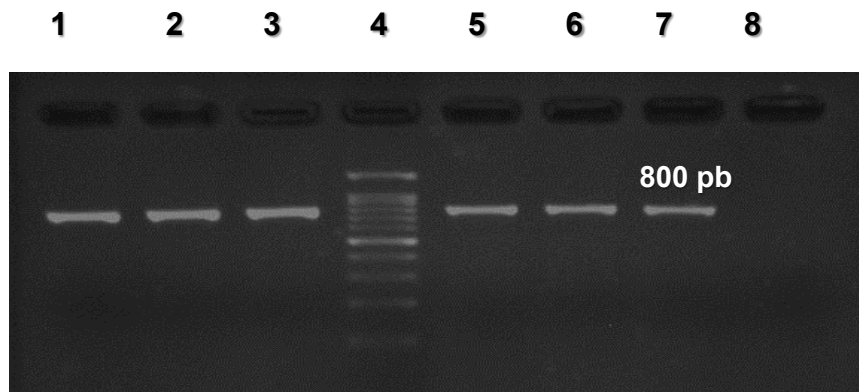


Figura 25. Detección del gen *afa* (amplicon de 800 pb). Carriles 1-3,5,6 cepas CVPEC; carril 4, MWM (100 pb); carril 7, control positivo (cepario del laboratorio clínico); carril 8, control negativo (sin DNA molde).

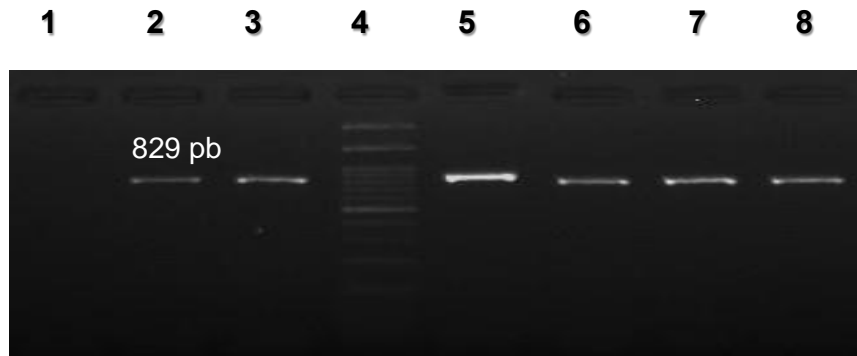


Figura 26. Detección del gen *iha* (amplicon de 829 pb). Carril 1, control negativo (sin DNA molde); carril 2, control positivo (cepario del laboratorio clínico); carriles 3, 5-8 cepas CVPEC; carril 4, MWM (100 pb).

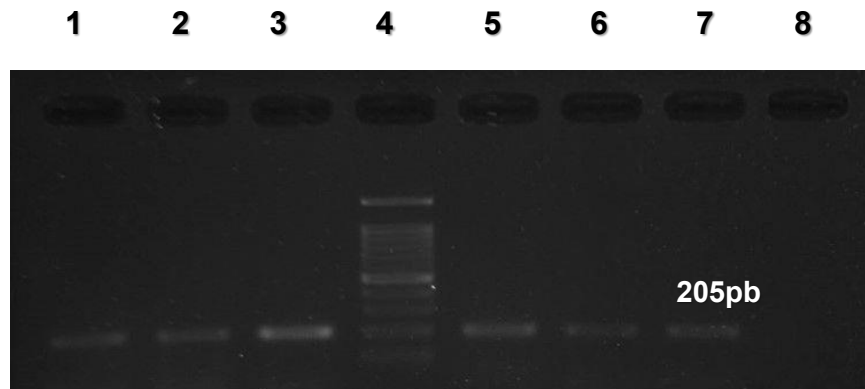


Figura 27. Detección del gen *papC* (amplicon de 205 pb). Carriles 1-3, 5,6 cepas CVPEC. carril 4, MWM (100 pb); carril 7, control positivo (cepario del laboratorio clínico); carril 8, control negativo (sin DNA molde).

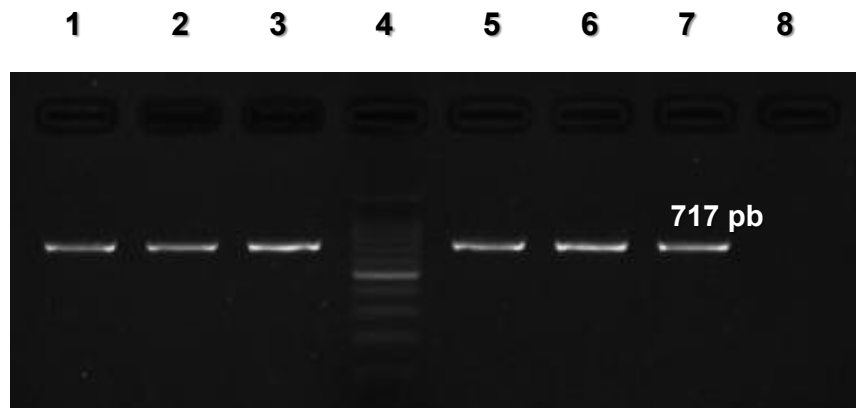


Figura 28. Detección del gen *papA* (amplicon de 717 pb). Carriles 1-3,5,6 cepas CVPEC; carril 4, MWM (100 pb); carril 7, control positivo (cepario laboratorio clínico); carril 8, control negativo (sin DNA molde).

Gráficas de PCR en tiempo real y curvas de fusión

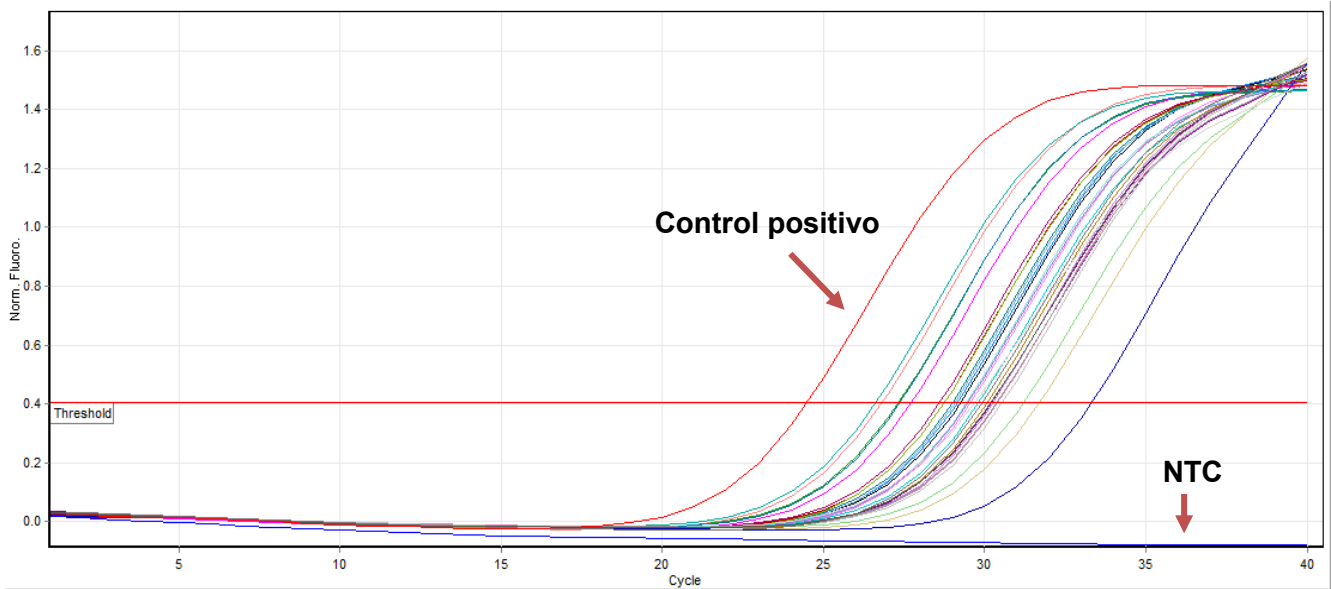


Figura 31. Expresión del gen *fimH* en cepas CVPEC por PCR en tiempo real. Control positivo: *E. coli* del cepario del laboratorio clínico. NTC: Control sin DNA molde.

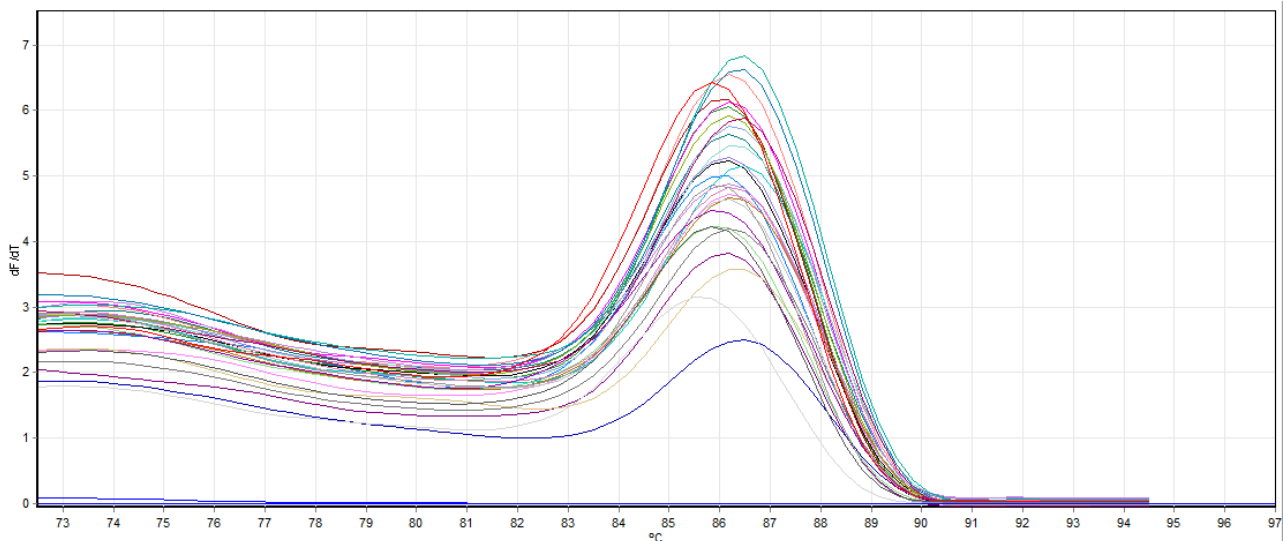


Figura 32. Curva de fusión (Melting point) de la expresión del gen *fimH*.

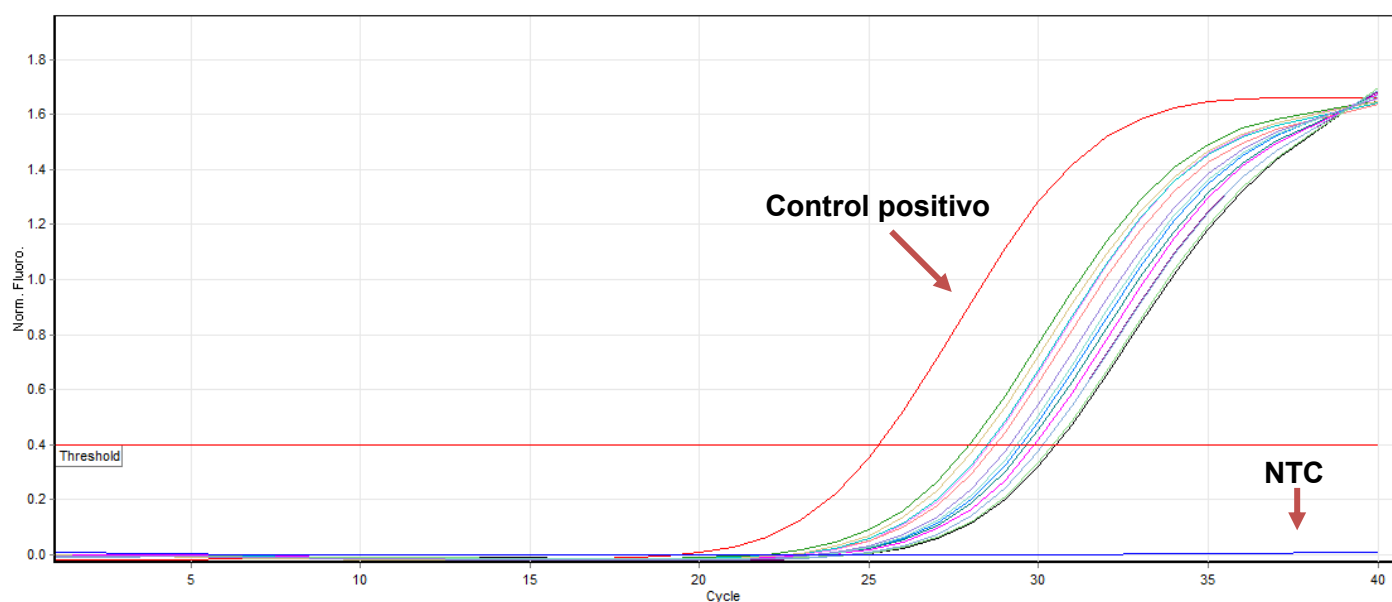


Figura 33. Expresión del gen *ihA* en cepas CVPEC por PCR en tiempo real. Control positivo: *E. coli* del cepario del laboratorio clínico. NTC: Control sin DNA molde.

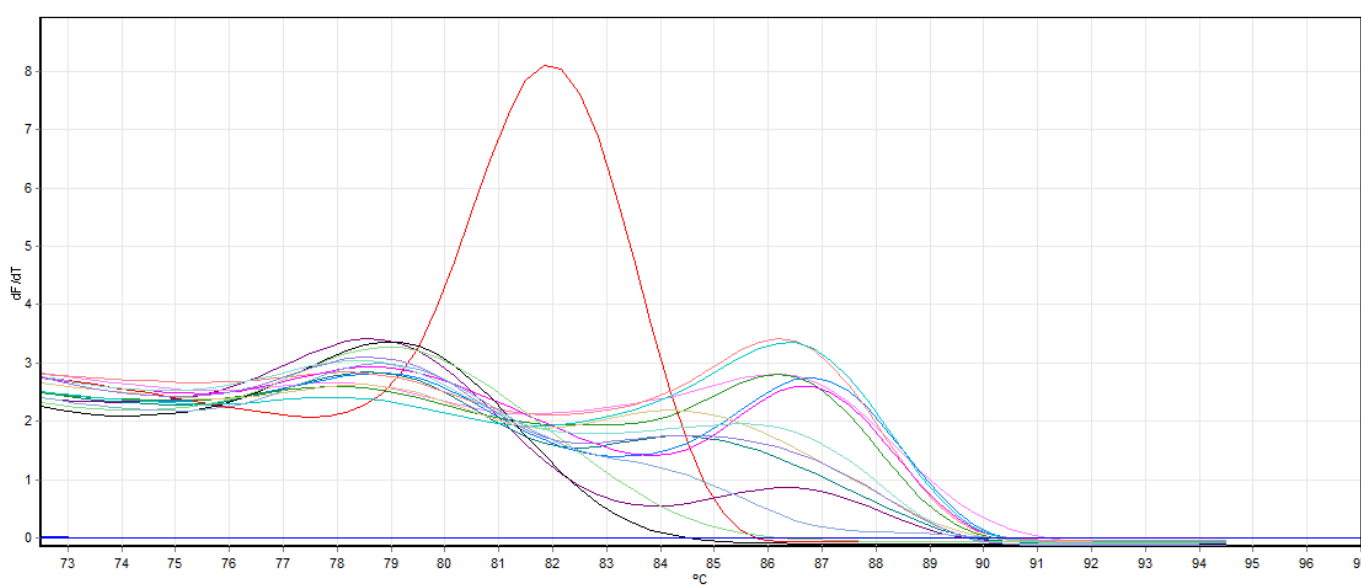


Figura 34. Curva de fusión (Melting point) de la expresión del gen *ihA*.

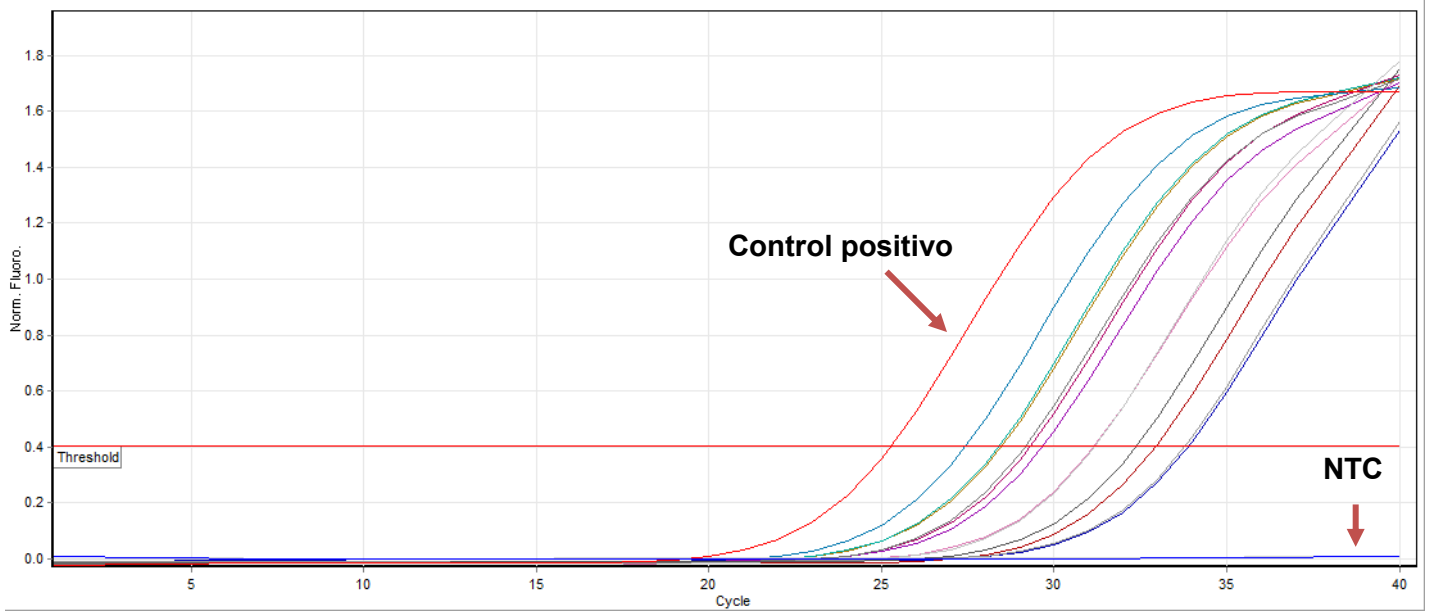


Figura 35. Expresión del gen *papG* alelo II en cepas CVPEC por PCR en tiempo real. Control positivo: *E. coli* del cepario del laboratorio clínico. NTC: Control sin DNA molde.

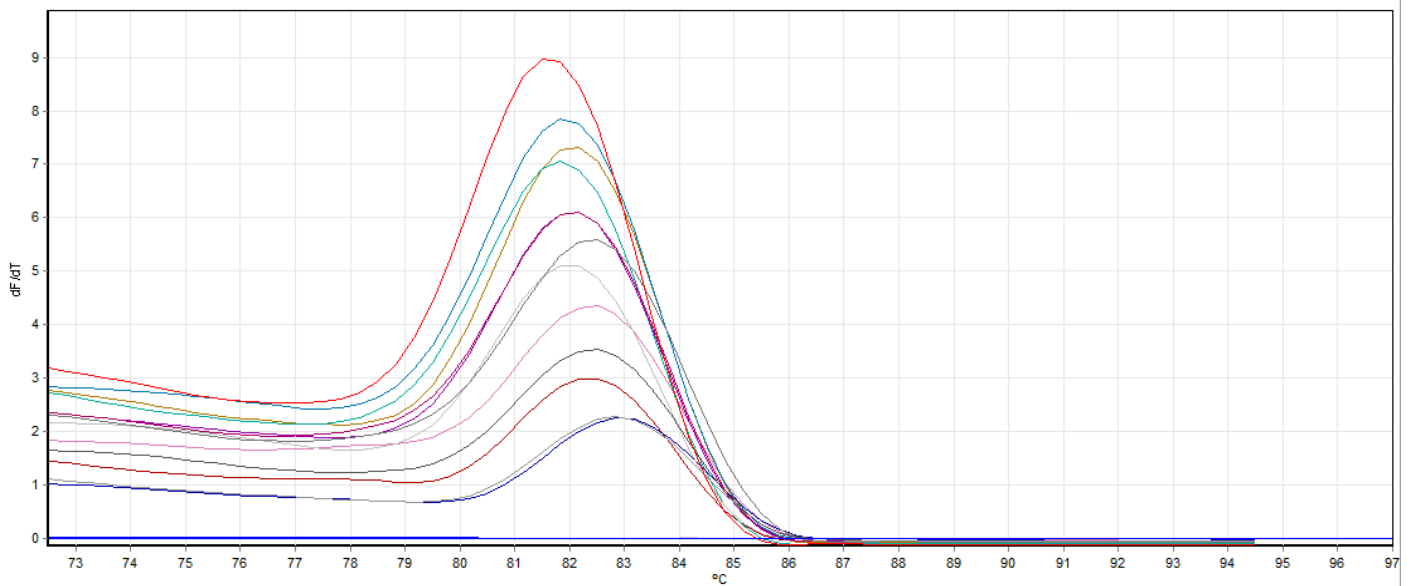


Figura 36. Curva de fusión (Melting point) de la expresión del gen *papG* alelo II.

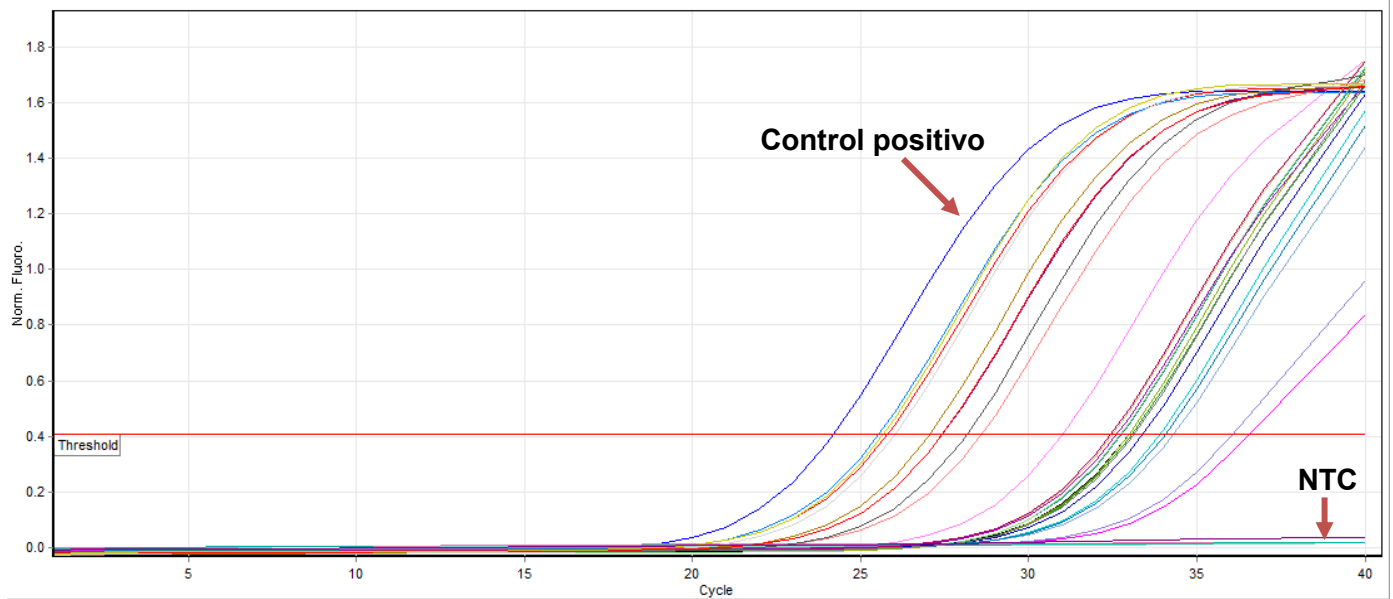


Figura 37. Expresión del gen *papC* en cepas CVPEC por PCR en tiempo real. Control positivo: *E. coli* del cepario del laboratorio clínico. NTC: Control sin DNA molde.

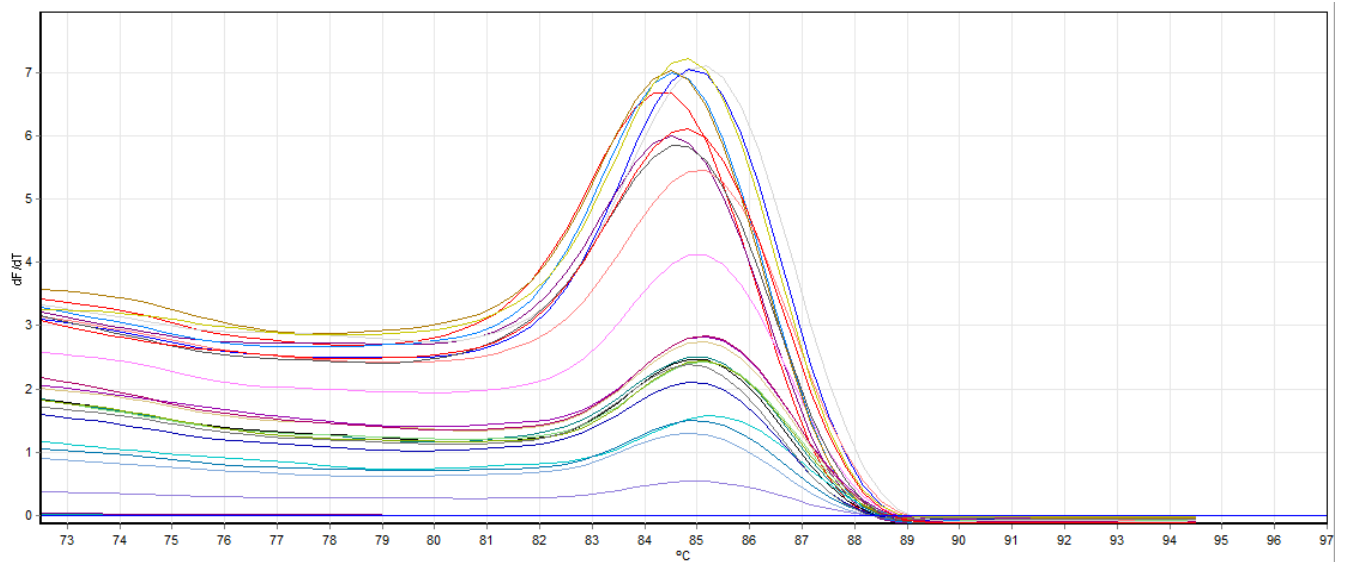


Figura 38. Curva de fusión (Melting point) de la expresión del gen *papC*.

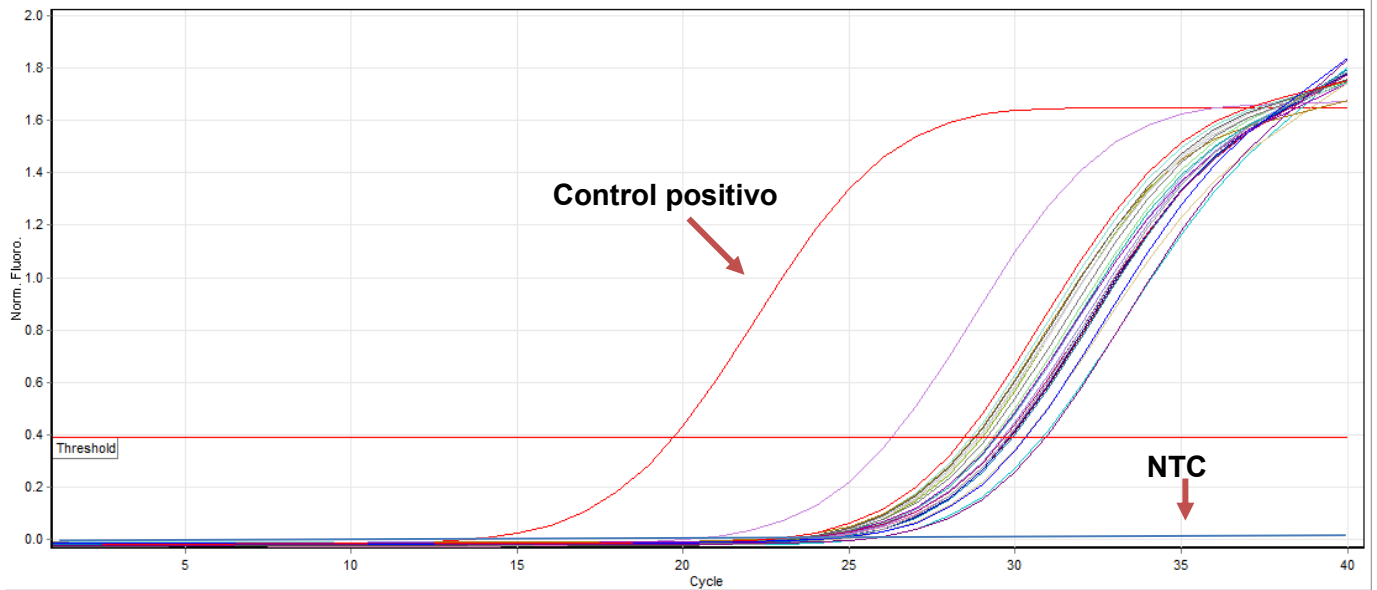


Figura 39. Expresión del gen *papA* en cepas CVPEC por PCR en tiempo real. Control positivo: *E. coli* del cepario del laboratorio clínico. NTC: Control sin DNA molde.

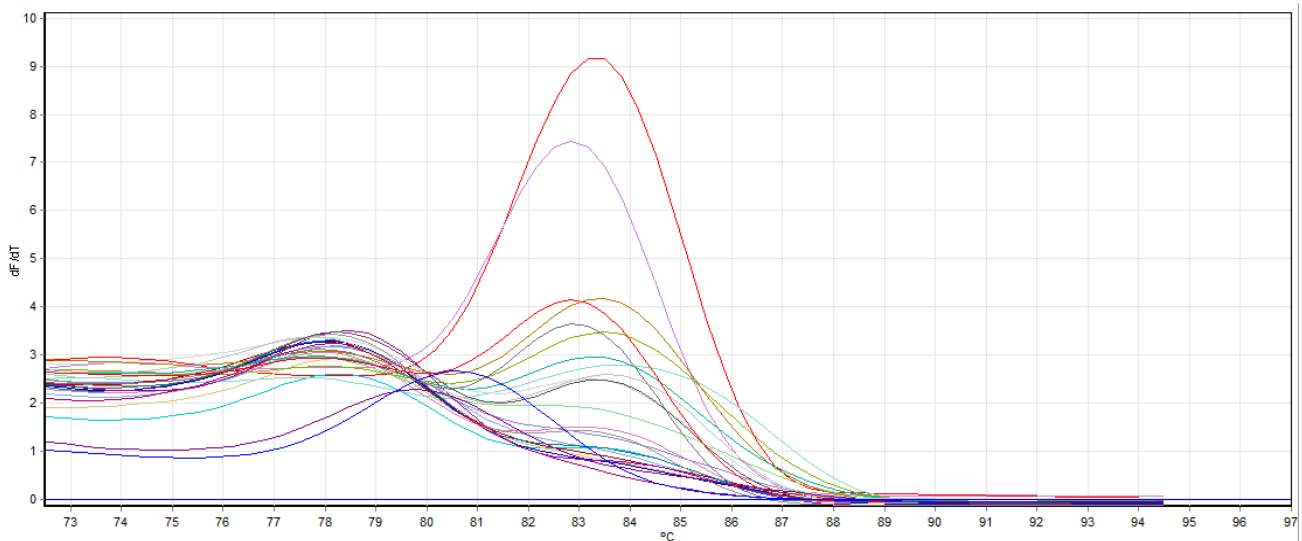


Figura 40. Curva de fusión (Melting point) de la expresión del gen *papA*.

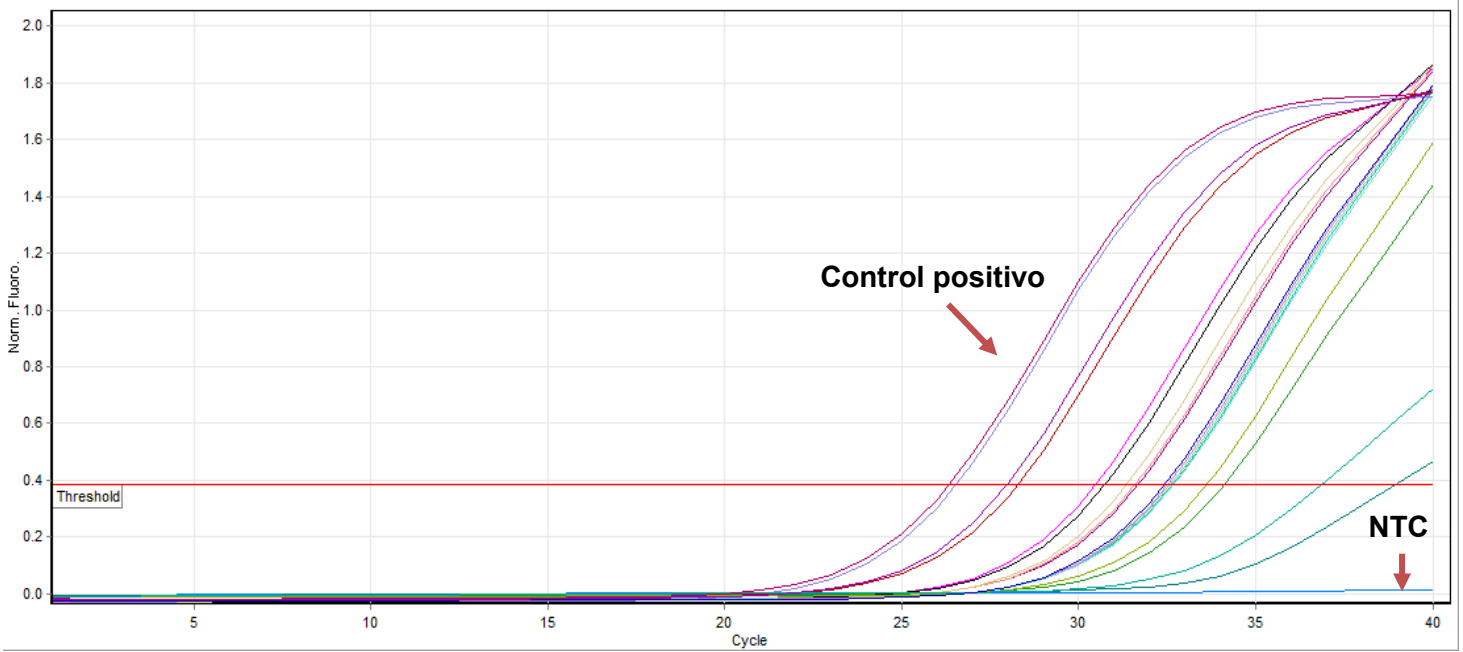


Figura 41. Expresión del gen *sfa* en cepas CVPEC por PCR en tiempo real. Control positivo: *E. coli* del cepario del laboratorio clínico. NTC: Control sin DNA molde.

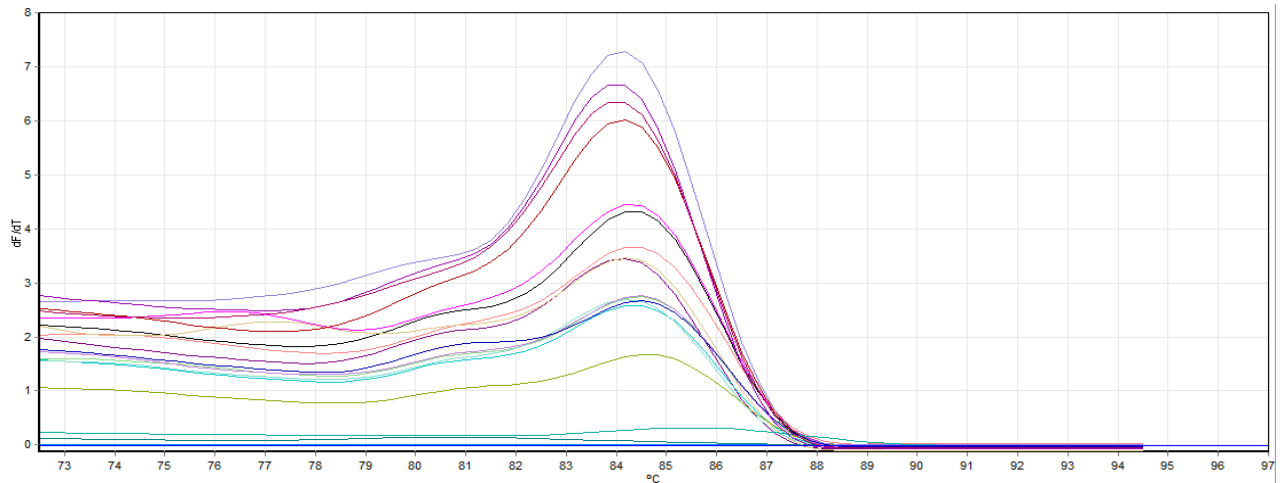


Figura 42. Curva de fusión (Melting point) de la expresión del gen *sfa*.

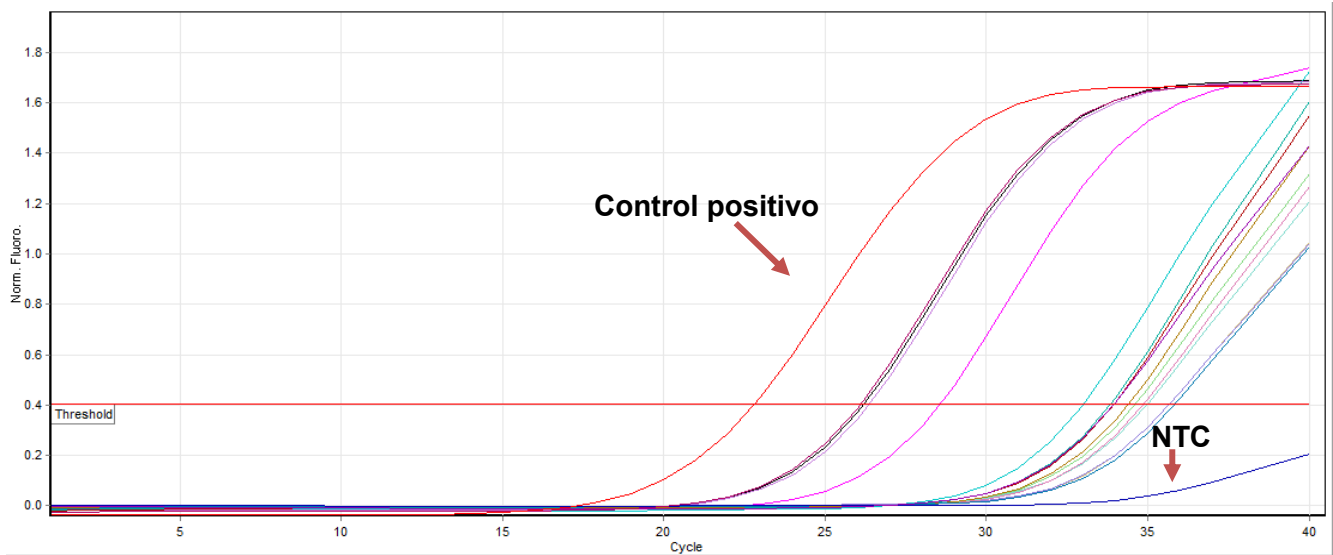


Figura 43. Expresión del gen *focG* en cepas CVPEC por PCR en tiempo real. Control positivo: *E. coli* del cepario del laboratorio clínico. NTC: Control sin DNA molde.

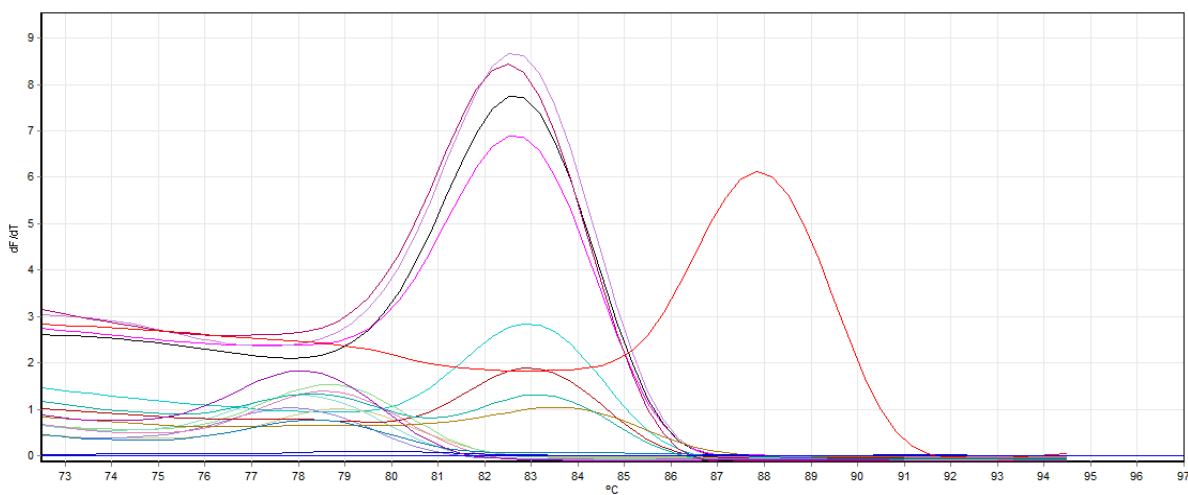


Figura 44. Curva de fusión (Melting point) de la expresión del gen *focG*.

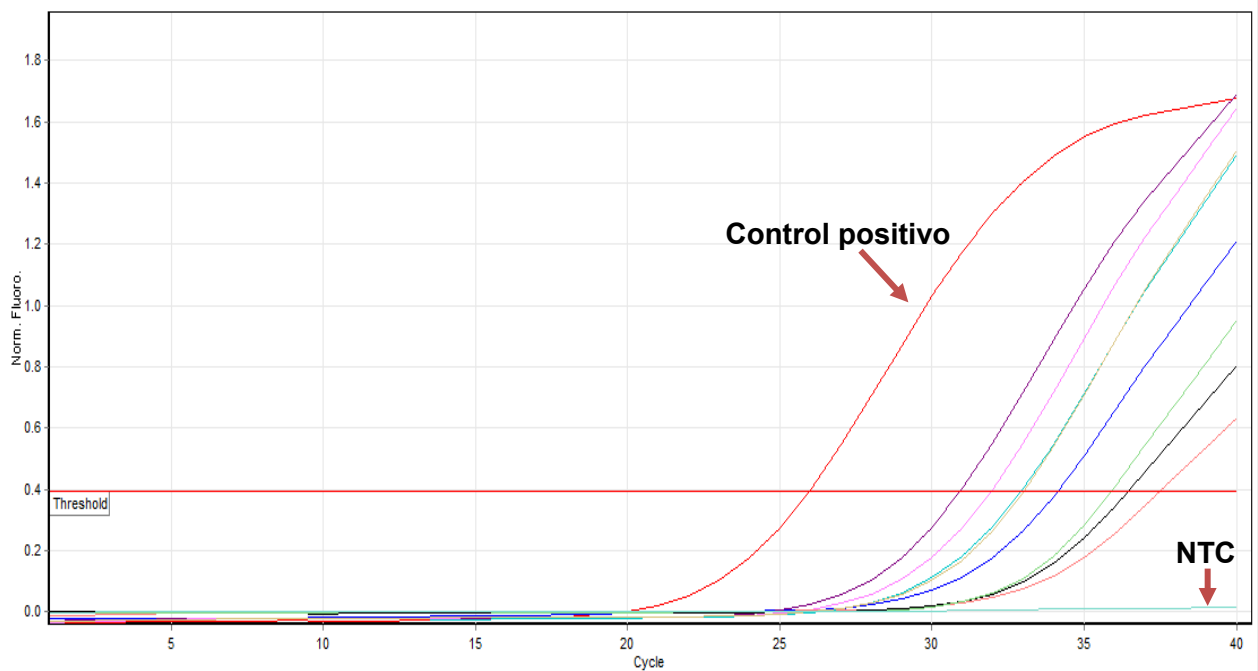


Figura 45. Expresión del gen *afa* en cepas CVPEC por en tiempo real PCR. Control positivo: *E. coli* del cepario del laboratorio clínico. NTC: Control sin DNA molde.

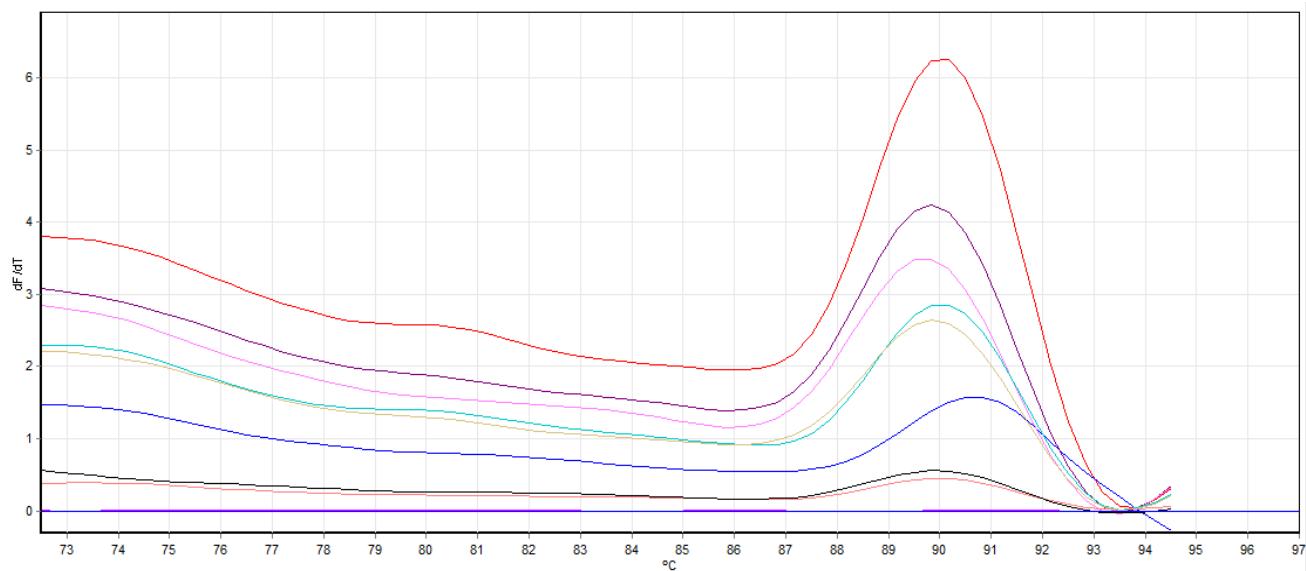


Figura 46. Curva de fusión (Melting point) de la expresión del gen *afa*.

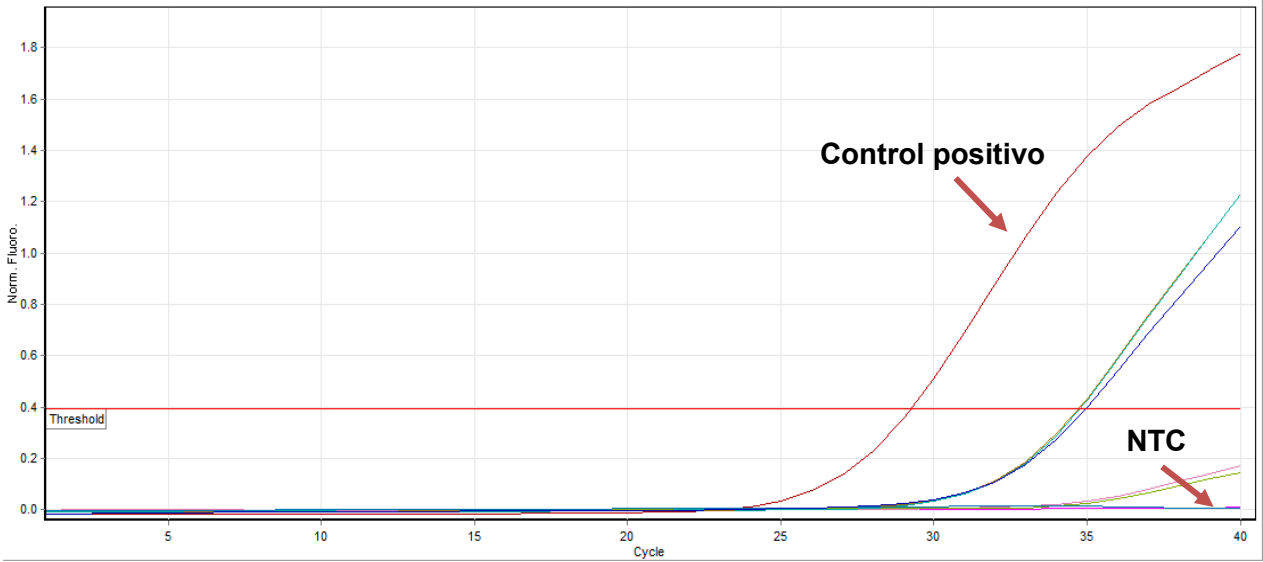


Figura 47. Expresión del gen *papG* alelo III en cepas CVPEC por PCR. En tiempo real
Control positivo: *E. coli* del cepario del laboratorio clínico. NTC: Control sin DNA molde.

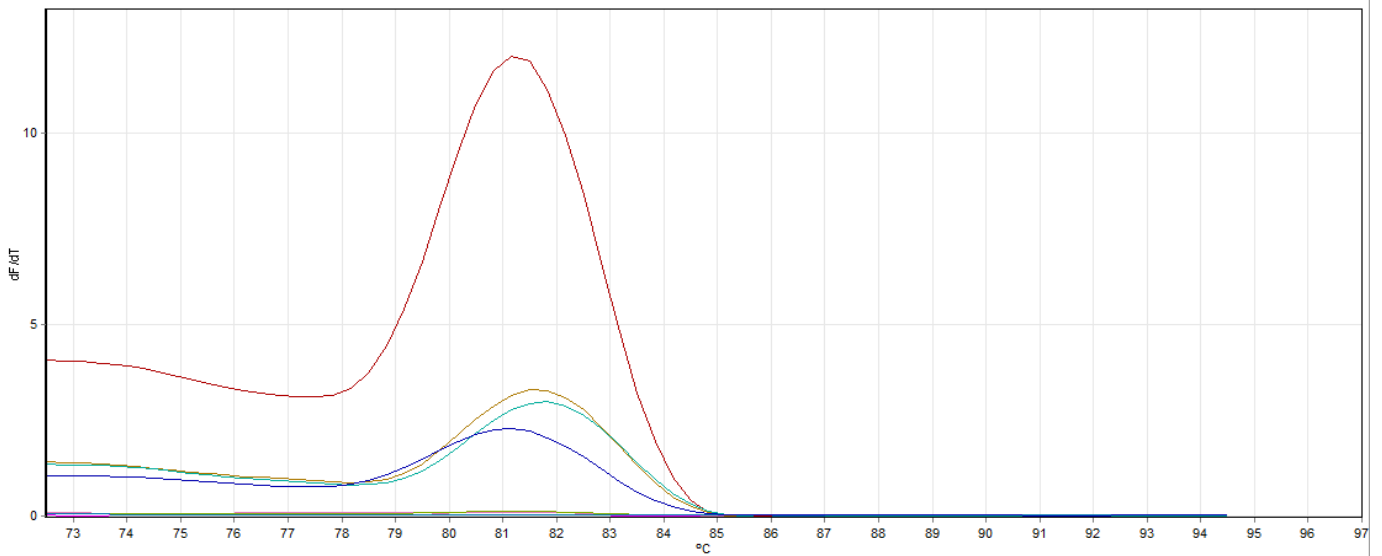


Figura 48. Curva de fusión (Melting point) de la expresión del gen *papG* alelo III.

9. LITERATURA CITADA

1. Ahmed N, Dobrindt U, Hacker J, Hasnain SE. 2008. Genomic fluidity and pathogenic bacteria: applications in diagnostics, epidemiology and intervention. *Nat Rev Microbiol* 6(5):387-394.
2. Alekshun MN, Levy SB. 2004. The *Escherichia coli mar* locus Antibiotic resistance and more. *ASM News-American Society for Microbiology* 70(10): 451-456.
3. Alekshun MN, Levy SB. 2007. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell* 128(6):1037-1050.
4. Ali I, Rifaqat Z, Ahmed S, Malik S, Dasti JI. 2015. Prevalence of multi-drug resistant uropathogenic *E. coli* in Potohar region of Pakistan. *Asian Pac J Trop Biomed* 6(1): 60-66.
5. Amábile C. 2010. Antibiotic resistance in Mexico: a brief overview of the current status and its causes. *J Infect Dev Ctries* 4(3):126-131.
6. Anago E, Ayi-Fanou L, Akpovi CD, Hounkpe WB, Agassounon-Djikpo Tchibozo M, Bankole HS, Sanni A. 2015. Antibiotic resistance and genotype of beta-lactamase producing *Escherichia coli* in nosocomial infections in Cotonou, Benin. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 17(14):5.
7. Anderson GG, Palermo JJ, Schilling JD, Roth R, Heuser J, Hultgren SJ. 2003. Intracellular bacterial biofilm-like pods in urinary tract infections. *Science* 301(5629):105-107.
8. Anderson GG, Martin SM, Hultgren SJ. 2004. Host subversion by formation of intracellular bacterial communities in the urinary tract. *Microbes Infect* 6(12):1094-1101.
9. Antão EM, Wieler LH, Ewers C. 2009. Adhesive threads of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Pathog* 1(1):22.
10. Agarwal J, Mishra B, Srivastava S, Srivastava R. 2013. Genotypic characteristics and biofilm formation among *Escherichia coli* isolates from Indian women with acute cystitis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 107(3):183–187.
11. Bäckhed F, Alsén B, Roche N, Angström J, von Euler A, Breimer ME, Westerlund-Wikström B, Teneberg S, Richter-Dahlfors A. 2002. Identification of target tissue glycosphingolipid receptors for uropathogenic, F1C-fimbriated *Escherichia coli* and its role in mucosal inflammation. *J Biol Chem* 277(20):18198-18205.
12. Barbosa TM, Levy SB. 2000. The impact of antibiotic use on resistance development and persistence. *Drug Resist Updat*. 3(5):303-311.
13. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* 45(4):493-496.
14. 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.

15. Bien J, Sokolova O, Bozko P. 2012. Role of Uropathogenic *Escherichia coli* Virulence Factors in Development of Urinary Tract Infection and Kidney Damage. *Int J Nephrol* 2012:681473.
16. Bihannic M, Ghanbarpour R, Auvray F, Cavalié L, Châtre P, Boury M, Brugère H, Madec JY, Oswald E. 2014. Identification and detection of three new F17 fimbrial variants in *Escherichia coli* strains isolated from cattle. *Vet Res* 45:76.
17. Bitew A, Abebaw Y, Bekele D, Mihret A. 2017. Prevalence of Bacterial Vaginosis and Associated Risk Factors among Women Complaining of Genital Tract Infection. *Int J Microbiol.* 2017:4919404.
18. Blair JM, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJ. 2015. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol.* 13(1):42-51.
19. Blahna MT, Zalewski CA, Reuer J, Kahlmeter G, Foxman B, Marrs CF. 2006. The role of horizontal gene transfer in the spread of trimethoprim-sulfamethoxazole resistance among uropathogenic *Escherichia coli* in Europe and Canada. *J Antimicrob Chemother* 57(4):666-672.
20. Blango MG, Mulvey MA. 2010. Persistence of uropathogenic *Escherichia coli* in the face of multiple antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother.* 54(5):1855-1863.
21. Blomfield IC. 2001. The regulation of pap and type 1 fimbriation in *Escherichia coli*. *Adv Microb Physiol* 45:1-49.
22. Bradshaw CS, Morton AN, Hocking J, Garland SM, Morris MB, Moss LM, Horvath LB, Kuzevska I, Fairley CK. 2006. High recurrence rates of bacterial vaginosis over the course of 12 months after oral metronidazole therapy and factors associated with recurrence. *J Infect Dis* 193(11):1478-86.
23. Bush K, Jacoby G. 2010. Updated Functional Classification of β -lactamases. *Antimicrob Agent Chemother* 54(3): 969-976.
24. Chahales P, Thanassi DG. 2015. Structure, Function, and Assembly of Adhesive Organelles by Uropathogenic Bacteria. *Microbiol Spectr* 3(5): UTI-0018-2013.
25. Chopra I, Roberts M. 2001. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* 65(2):232-260.
26. Chung JW, Hong SJ, Kim KJ, Goti D, Stins MF, Shin S, Dawson VL, Dawson TM, Kim KS. 2003. 37-KDa laminin receptor precursor modulates cytotoxic necrotizing factor 1 mediated RhoA activation and bacterial uptake. *J Biol Chem* 278(19):16857-16862.
27. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284(5418):1318-1322.
28. Croxen MA, Finlay BB. 2010. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat Rev Microbiol* 8(1):26-38.
29. Croxen MA, Law RJ, Scholz R, Keeney KM, Wlodarska M, Finlay BB. 2013. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 26(4):822-880.
30. Da Silva GJ, Mendonca N. 2012. Association between antimicrobial resistance and virulence in *Escherichia coli*. *Virulence* 3(1):18-28.

31. Dallenne C, Da Costa A, Decré D, Favier C, Arlet G. 2010. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother.* 65(3):490-495.
32. Davis JM, Carvalho HM, Rasmussen SB, O'Brien AD. 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.
33. Derakhshandeh A, Firouzi R, Motamedifar M, Motamedi BA, Bahadori M, Arabshahi S, Novinrooz A, Heidari S. 2015. Distribution of virulence genes and multiple drug-resistant patterns amongst different phylogenetic groups of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from patients with urinary tract infection. *Lett Appl Microbiol.* 60(2):148-154.
34. Dhakal BK, Mulvey MA. 2012. The UPEC Pore Forming Toxin α -Hemolysin Triggers Proteolysis of Host Proteins to Disrupt Cell Adhesion, Inflammatory and Survival Pathways. *Cell Host Microbe* 11(1): 58–69.
35. Delgado EG, Valdivia WG, Navarro C, Pulido C, Angulo RA. 2015. Prevalencia de los gérmenes más frecuentes en pacientes con cervicovaginitis en primer nivel de atención. *Revista Médica MD* 6(4): 268-272.
36. Donders GG. 2002. Lower Genital Tract Infections in Diabetic Women. *Curr Infect Dis Rep* 4(6):536-539.
37. Donders GG, Vereecken A, Bosmans E, Dekeersmaecker A, Salembier G, Spitz B. 2002. Definition of a type of abnormal vaginal flora that is distinct from bacterial vaginosis: aerobic vaginitis. *BJOG* 109(1):34-43.
38. Donlan RM. 2001. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Clin Infect Dis* 33(8):1387-1392.
39. Emödy L, Kerényi M, Nagy G. 2003. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli*. *Int J Antimicrob Agents* 2:29-33.
40. Eto D, Jones T, Sundsbak JL, Mulvey MA. 2007. Integrin-Mediated Host Cell Invasion by Type 1-Piliated Uropathogenic *Escherichia coli*. *PLoS Pathog* 3(7): 80-100.
41. Ejrnæs K, Stegger M, Reisner A, Ferry S, Monsen T, Holm SE, Lundgren B, Frimodt-Møller 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.
42. Ewers C, Li G, Wilking H, Kiessling S, Alt K, Antão EM, Laternus C, Diehl I, Glodde S, Homeier T, Böhnke U, Steinrück H, Philipp HC, Wieler LH. 2007. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: how closely related are they? *Int J Med Microbiol* 297(3):163-176.
43. Fan A, Yue Y, Geng N, Zhang H, Wang Y, Xue F. 2012. Aerobic vaginitis and mixed infections: comparison of clinical and laboratory findings. *Arch Gynecol Obstet.* 287(2):329-335.
44. Fattahi S, Kafil HS, Nahai MR, Asgharzadeh M, Nori R, Aghazadeh M. 2015. Relationship of biofilm formation and different virulence genes in UPEC isolates from Northwest Iran. *GMS Hyg Infect Control* 13(10):1-7.

45. Fernández M, Miró E, Ortega A, Bou G, González JJ, Oliver A, Pascual A, Cercenado E, Oteo J, Martínez L, Navarro F. 2015. Molecular identification of aminoglycoside-modifying enzymes in clinical isolates of *Escherichia coli* resistant to amoxicillin/clavulanic acid isolated in Spain. *Int J Antimicrob Agents* 46(2):157-163.
46. Flemming HC, Wingender J. 2010. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* 8(9):623-633.
47. Flores AL, Walker JN, Caparon M, Hultgren SJ. 2015. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nat Rev Microbiol* 13(5):269-284.
48. Frendéus B, Wachtler C, Hedlund M, Fischer H, Samuelsson P, Svensson M, Svanborg C. 2001. *Escherichia coli* P fimbriae utilize the Toll-like receptor 4 pathway for cell activation. *Mol Microbiol* 40(1):37-51.
49. Frost LS, Leplae R, Summers AO, Toussaint A. 2005. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat Rev Microbiol* 3(9):722-732.
50. Foxman B. 2010. The epidemiology of urinary tract infection. *Nat Rev Urol* 7:653-660.
51. Gao Q, Zhang D, Ye Z, Zhu X, Yang W, Dong L, Gao S, Liu X. 2017. Virulence traits and pathogenicity of uropathogenic *Escherichia coli* isolates with common and uncommon O serotypes. *Microb Pathog* 104:217-224.
52. Garcia EC, Brumbaugh AR, Mobley HL. 2011. Redundancy and specificity of *Escherichia coli* iron acquisition systems during urinary tract infection. *Infect Immun* 79(3):1225-1235.
53. Garneau S, Labbyb K. 2016. Mechanisms of Resistance to Aminoglycoside Antibiotics: Overview and Perspectives. *Medchemcomm* 1;7(1):11-27.
54. González A, Ortiz C, Dávila R, Valencia CM. 2007. Infecciones cervicovaginales más frecuentes; prevalencia y factores de riesgo. *Rev Cubana Obstet Ginecol* 33(2):1-11.
55. Greenwood D, Slack R, Peutherer J, Barer M. 2007. Medical microbiology: A guide to microbial infections. Ed. Elsevier. 258-283.
56. Gunther NW, Snyder JA, Lockett V, Blomfield I, Johnson DE, Mobley HL. 2002. Assessment of virulence of uropathogenic *Escherichia coli* type 1 fimbrial mutants in which the invertible element is phase-locked on or off. *Infect Immun* 70(7):3344-3354.
57. Guyer DM, Radulovic S, Jones FE, Mobley HL. 2002. Sat, the secreted autotransporter toxin of uropathogenic *Escherichia coli*, is a vacuolating cytotoxin for bladder and kidney epithelial cells. *Infect Immun* 70(8):4539-4546.
58. Hacker J, Blum-Oehler G, Mühldorfer I, Tschäpe H. 1997. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol Microbiol* 23(6):1089-1097.
59. Han C, Wu W, Fan A, Wang Y, Zhang H, Chu Z, Wang C, Xue F. 2014. Diagnostic and therapeutic advancements for aerobic vaginitis. *Arch Gynecol Obstet* 291(2): 251-257.

60. Hancock V, Ferrières 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(Pt 1):167-175.
61. Harbottle H, Thakur S, Zhao S, White DG. 2006. Genetics of antimicrobial resistance. *Anim Biotechnol* 17(2):111-124.
62. Hedlund M, Wachtler C, Johansson E, Hang L, Somerville JE, Darveau RP, Svanborg C. 1999. P fimbriae-dependent, lipopolysaccharide-independent activation of epithelial cytokine responses. *Mol Microbiol* 33(4):693-703.
63. Heidary M, Momtaz H, Madani M. 2015. Characterization of Diarrheagenic Antimicrobial Resistant *Escherichia coli* Isolated From Pediatric Patients in Tehran, Iran. *Iran Red Crescent Med J* 16(4):e12329.
64. Henderson IR, Nataro JP. 2001. Virulence functions of autotransporter proteins. *Infect Immun* 69(3):1231-1243.
65. Hernday A, Krabbe M, Braaten B, Low D. 2002. Self-perpetuating epigenetic pili switches in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (Suppl 4):16470-16476.
66. Hilbert D, Paulish T, Mordechai E. 2008. O serogroups, phylogeny, and virulence factors of cervicovaginal and rectal *Escherichia coli* isolates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 27(12):1265-1268.
67. Ho PL, Leung LM, Chow KH, Lai EL, Lo WU, Ng TK. 2016. Prevalence of aminoglycoside modifying enzyme and 16S ribosomal RNA methylase genes among aminoglycoside-resistant *Escherichia coli* isolates. *J Microbiol Immunol Infect* 49(1):123-126.
68. Ho PL, Wong RC, Lo SW, Chow KH, Wong SS, Que TL. 2010. Genetic identity of aminoglycoside-resistance genes in *Escherichia coli* isolates from human and animal sources. *J Med Microbiol* 59(6):702-707.
69. Holden NJ, Uhlin BE, Gally DL. 2001. PapB paralogues and their effect on the phase variation of type 1 fimbriae in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 42(2):319-330.
70. Holden NJ, Gally DL. 2004. Switches, cross-talk and memory in *Escherichia coli* adherence. *J Med Microbiol* 53(Pt 7):585-593.
71. Holden NJ, Totsika M, Mahler E, Roe AJ, Catherwood K, Lindner K, Dobrindt U, Gally DL. 2006. Demonstration of regulatory cross-talk between P fimbriae and type 1 fimbriae in uropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology* 152(Pt 4):1143-1153.
72. Huovinen P. 2001. Resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole. *Clin Infect Dis* 32(11):1608-1614.
73. Jacoby GA, Walsh KE, Mills DM, Walker VJ, Oh H, Robicsek A, Hooper DC. 2006. *qnrB*, another plasmid-mediated gene for quinolone resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 50(4):1178-82.
74. Jacoby GA. 2009. AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev* 22(1):161-182.
75. Jahic M, Mulavdic M, Nurkic J, Jahic E, Nurkic M. 2013. Clinical characteristics of aerobic vaginitis and its association to vaginal candidiasis, trichomonas vaginitis and bacterial vaginosis. *Med Arch* 67(6):428-430.
76. Jefferson KK. 2004. What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiol Lett* 236(2):163-173.

77. Johnson JR. 2003. Microbial virulence determinants and the pathogenesis of urinary tract infection. *Infect Dis Clin North Am* 17(2):261-278.
78. Johnson JR, Jelacic S, Schoening LM, Clabots C, Shaikh N, Mobley HL, Tarr PI. 2005. The IrgA homologue adhesin Iha is an *Escherichia coli* virulence factor in murine urinary tract infection. *Infect Immun* 73(2):965-971.
79. Johnson JR, Kuskowski MA, Gajewski A, Soto S, Horcajada JP, Jimenez de Anta MT, Vila J. 2005a. Extended virulence genotypes and phylogenetic background of *Escherichia coli* isolates from patients with cystitis, pyelonephritis, or prostatitis. *J Infect Dis*.191(1):46-50.
80. Johnson JR, Stell AL. 2000. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *J Infect Dis* 181(1):261-272.
81. Justice SS, Hung C, Theriot JA, Fletcher DA, Anderson GG, Footer MJ, Hultgren SJ. 2004. Differentiation and developmental pathways of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(5):1333-1338.
82. Kaambo E, Africa C, Chambuso R, Passmore JS. 2018. Vaginal Microbiomes Associated With Aerobic Vaginitis and Bacterial Vaginosis. *Front Public Health*. 26;6:78.
83. Kaper J, Nataro J, Andrew S, Mobley H. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2(2):123-140.
84. Khan AS, Knierp B, Oelschlaeger TA, Van Die I, Korhonen T, Hacker J. 2000. Receptor structure for F1C fimbriae of uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 68(6):3541-3547.
85. Klemm P, Hancock V, Schembri MA. 2010. Fimbrial adhesins from extraintestinal *Escherichia coli*. *Environ Microbiol Rep* 2(5):628-640.
86. Kline KA, Dodson KW, Caparon MG, Hultgren SJ. 2010. A tale of two pili: assembly and function of pili in bacteria. *Trends Microbiol* 18(5):224-232.
87. Kostakioti M, Hadjifrangiskou M, Hultgren SJ. 2013. Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. *Cold Spring Harb Perspect Med* 3(4): a010306.
88. Köves B, Wullt B. 2016. The Roles of the Host and the Pathogens in Urinary Tract Infections. *Eur Urol Sup* 15(4): 88-94.
89. Lane MC, Mobley HL. 2007. Role of P-fimbrial-mediated adherence in pyelonephritis and persistence of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) in the mammalian kidney. *Kidney Int* 72(1):19-25.
90. Lasaro MA, Salinger N, Zhang J, Wang Y, Zhong Z, Goulian M, Zhu J. 2009. F1C fimbriae play an important role in biofilm formation and intestinal colonization by the *Escherichia coli* commensal strain Nissle 1917. *Appl Environ Microbiol* 75(1):246-51.
91. Le Bouguéne C. 2005. Adhesins and invasins of pathogenic *Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol* 295(6-7):471-478.
92. Le Bouguéne C, Archambaud M, Labigne A. 1992. Rapid and specific detection of the *pap*, *afa*, and *sfa* adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 30(5): 1189–1193.

93. Le Bouguéne C, Bertin Y. 1999. AFA and F17 adhesins produced by pathogenic *Escherichia coli* strains in domestic animals. *Vet Res* 30(2-3):317-342.
94. Le Bouguéne C, Lalioui L, du Merle L, Jouve M, Courcoux P, Bouzari S, Selvarangan R, Nowicki BJ, Germani Y, Andremont A, Gounon P, Garcia MI. 2001. Characterization of AfaE adhesins produced by extraintestinal and intestinal human *Escherichia coli* isolates: PCR assays for detection of Afa adhesins that do or do not recognize Dr blood group antigens. *J Clin Microbiol* 39(5):1738-1745.
95. Lee JH, Subhadra B, Son YJ, Kim DH, Park HS, Kim JM, Koo SH, Oh MH, Kim HJ, Choi CH. 2016. Phylogenetic group distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties of uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from patients with urinary tract infections in South Korea. *Lett Appl Microbiol* 62(1):84-90.
96. Léveillé S, Caza M, Johnson JR, Clabots C, Sabri M, Dozois CM. 2006. Iha from an *Escherichia coli* urinary tract infection outbreak clonal group A strain is expressed in vivo in the mouse urinary tract and functions as a catecholate siderophore receptor. *Infect Immun* 74(6):3427-3436.
97. Levy SB, Marshall B. 2004. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat Med* 10(12 Suppl): S122-9.
98. Lewis AJ, Richards AC, Mulvey MA. 2016. Invasion of Host Cells and Tissues by Uropathogenic Bacteria. *Microbiol Spectr* 4(6).
99. Li D, Liu B, Chen M, Guo D, Guo X, Liu F, Feng L, Wang L. 2010. A multiplex PCR method to detect 14 *Escherichia coli* serogroups associated with urinary tract infections. *J Microbiol Methods* 82(1):71-77.
100. Liu SW, Xu XY, Xu J, Yuan JY, Wu WK, Zhang N, Chen ZL. 2017. Multi-drug resistant uropathogenic *Escherichia coli* and its treatment by Chinese medicine. *Chin J Integr Med* 23(10):763-769.
101. Livengood CH. 2009. Bacterial vaginosis: an overview for 2009. *Rev Obstet Gynecol* 2(1):28-37.
102. Lloyd AL, Rasko DA, Mobley HL. 2007. Defining genomic islands and uropathogen specific genes in uropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 189(9): 3532-3546.
103. Lobos O, Padilla A, Padilla C. (2013). Análisis genético y propiedades virulentas de cepas de *Escherichia coli* aisladas desde infección vaginal. *Revista chilena de infectología* 30(4): 381-387.
104. Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS. 2008. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* 42(2): 145-151.
105. Lüthje P, Brauner A. 2014. Virulence factors of uropathogenic *E. coli* and their interaction with the host. *Adv Microb Physiol* 65:337-372.
106. Madhivanan P, Krupp K, Chandrasekaran V, Karat C, Arun A, Cohen CR, Reingold AL, Klausner JD. 2008. Prevalence and correlates of bacterial vaginosis among young women of reproductive age in Mysore, India. *Indian J Med Microbiol* 26(2):132-137.
107. Mainil J. 2013. *Escherichia coli* virulence factors. *Vet Immunol Immunopathol* 152(1-2):2-12.

108. Marshall AO. 2015. Managing Recurrent Bacterial Vaginosis: Insights for Busy Providers. *Sex Med Rev* 3(2):88-92.
109. Martinez JJ, Hultgren SJ. 2002. Requirement of Rho-family GTPases in the invasion of Type 1-piliated uropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol* 4(1):19-28.
110. Martinez JJ, Mulvey MA, Schilling JD, Pinkner JS, Hultgren SJ. 2000. Type 1 pilus- mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells. *EMBO J* 19(12):2803-2812.
111. Mazel D. 2006. Integrons: agents of bacterial evolution. *Nat Rev Microbiol* 4(8):608-620.
112. Mazel D, Dychinco B, Webb VA, Davies J. 1998. A distinctive class of integron in the *Vibrio cholerae* genome. *Science* 280 (5363):605-608.
113. Mendling W. 2016. Vaginal Microbiota en A. Schwartz (ed.), *Microbiota of the Human Body, Advances in Experimental Medicine and Biology*. (pp. 83-93). Switzerland: Springer International Publishing.
114. Miajlovic H, Smith SG. 2014. Bacterial self-defence: how *Escherichia coli* evades serum killing. *FEMS Microbiol Lett* 354(1):1-9.
115. Mills M, Meysick KC, O'Brien AD. 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.
116. Miranda-Estrada LI, Ruíz M, Molina J, Parra I, González E, Castro N. 2016. Relación entre factores de virulencia, resistencia a antibióticos y los grupos filogenéticos de *Escherichia coli* uropatógena en dos localidades de México. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 35(7): 426-433.
117. Molina J, Aparicio G, Ribas RM, Gavilanes S, Chávez ME, Hernández R, Manjarrez HÁ. 2011. Drug resistance, serotypes, and phylogenetic groups among uropathogenic *Escherichia coli* including O25-ST131 in Mexico City. *J Infect Dev Ctries* 5(12):840-849.
118. Muhleisen AL, Herbst MM. 2016. Menopause and the vaginal microbiome. *Maturitas* 91:42-50.
119. Mulvey MA. 2002. Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol* 4(5):257-271.
120. Mulvey MA, Schilling JD, Hultgren SJ. 2001. Establishment of a persistent *Escherichia coli* reservoir during the acute phase of a bladder infection. *Infect Immun* 69(7):4572-4579.
121. Mulvey MA, Schilling JD, Martinez JJ, Hultgren SJ. 2000. Bad bugs and beleaguered bladders: interplay between uropathogenic *Escherichia coli* and innate host defenses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(16):8829-8835.
122. Munita JM, Arias CA. 2016. Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiol Spectrum* 4(2):VMBF-0016-2015.
123. Mysorekar IU, Hultgren SJ. 2006. Mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli* persistence and eradication from the urinary tract. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(38):14170-14175.
124. Obata-Yasuoka M, Ba-Thein W, Tsukamoto T, Yoshikawa H, Hayashi H. 2002. Vaginal *Escherichia coli* share common virulence factor profiles, serotypes and phylogeny with other extraintestinal *E. coli*. *Microbiology* 148 (Pt 9):2745-2752.

125. Olson P, Justice S, Hunstad D. 2015. *Escherichia coli* in urinary tract infections. En Sussman M. (comp.) Molecular medical microbiology. 1373-1387.
126. Paniagua-Contreras GL, Hernández-Jaimes T, Monroy-Pérez E, Vaca-Paniagua F, Díaz-Velásquez C, Uribe-García A, Vaca S. 2017. Comprehensive expression analysis of pathogenicity genes in uropathogenic *Escherichia coli* strains. *Microb Pathog* 103:1-7.
127. 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. 43-70.
128. Paterson DL, Bonomo RA. 2005. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev*. 18(4):657-686.
129. Peleg AY, Hooper DC. 2010. Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. *N Engl J Med* 362(19):1804-1813.
130. Pérez FJ, Hanson ND. 2002. Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol*. 40(6):2153-2162.
131. Pitout JD. 2012. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: an update on antimicrobial resistance, laboratory diagnosis and treatment. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 10(10):1165-1176.
132. Plançon L, Du Merle L, Le Friec S, Gounon P, Jouve M, Guignot J, Servin A, Le Bouguéne C. 2003. Recognition of the cellular β 1 chain integrin by the bacterial *afaD* invasin is implicated in the internalization of *afa*-expressing pathogenic *Escherichia coli* strains. *Cell Microbiol* 5(10):681-693.
133. Prats G. 2012. Microbiología y parasitología médicas. Ed. Medica Panamericana. España. 181-189.
134. Puerta A, Mateos F. 2010. Enterobacterias. *Medicine*. 10: 3426-31.
135. Rådström P, Swedberg G. 1988. RSF1010 and a conjugative plasmid contain *sulII*, one of two known genes for plasmid-borne sulfonamide resistance dihydropteroate synthase. *Antimicrob Agents Chemother* 32(11): 1684-1692.
136. Rahdar M, Rashki A, Miri HR, Rashki M. 2015. Detection of *pap*, *sfa*, *afa*, *foc*, and *fim* Adhesin-Encoding Operons in Uropathogenic *Escherichia coli* Isolates Collected From Patients With Urinary Tract Infection. *Jundishapur J Microbiol* 8(8):e22647.
137. Ramírez FY, Moreno AC, Avelar FJ, Márquez F, Harel J, Guerrero AL. 2018. An evaluation of multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates in urinary tract infections from Aguascalientes, Mexico: cross-sectional study. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 17(1):34.
138. Ramirez MS, Tolmasky ME. 2010. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist Updat* 13(6):151-171.
139. Randall LP, Cooles SW, Osborn MK, Piddock LJ, Woodward MJ. 2004. Antibiotic resistance genes, integrons and multiple antibiotic resistance in thirty-five serotypes of *Salmonella enterica* isolated from humans and animals in the UK. *J Antimicrob Chemother* 53(2):208-216.

140. Rashki A. 2014. Cervico-vaginopathogenic *Escherichia coli* in Iran: Serogroup distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties. *Microb Pathog.* 75:29-34.
141. Reigstad CS, Hultgren SJ, Gordon JI. 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.
142. Rhen M, Väisänen V, Saraste M, Korhonen T. 1986a. 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.
143. Rhen M, Klemm P, Korhonen TK. 1986b. Identification of two new hemagglutinins of *Escherichia coli*, N-acetyl-D-glucosamine-specific fimbriae and a blood group M-specific agglutinin, by cloning the corresponding genes in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 168(3): 1234–1242.
144. Rodriguez KE, Giddings CW, Doetkott C, Johnson TJ, Fakhr MK, Nolan LK. 2005. Comparison of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis. *Microbiol* 151(Pt 6):2097-2110.
145. Roos V, Klemm P. 2006. Global gene expression profiling of the asymptomatic bacteriuria *Escherichia coli* strain 83972 in the human urinary tract. *Infect Immun* 74(6):3565-3575.
146. Rosen DA, Hooton TM, Stamm WE, Humphrey PA, Hultgren SJ. 2007. Detection of intracellular bacterial communities in human urinary tract infection. *PLoS Med* 4(12): 1949-1958.
147. Rossi E, Cimmins A, Lüthje P, Brauner A, Sjöling Å, Landini P, Röm Ling U. 2018. "It's a gut feeling" - *Escherichia coli* biofilm formation in the gastrointestinal tract environment. *Crit Rev Microbiol* 44(1):1-30.
148. Ruiz J. 2003. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *J Antimicrob Chemother* 51(5):1109-1117.
149. Russo TA, Johnson JR. 2000. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *J Infect Dis* 181(5): 1753-1754.
150. Russo TA, McFadden CD, Carlino-MacDonald UB, Beanan JM, Barnard TJ, Johnson JR. 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.
151. Saarela S, Westerlund B, Rhen M, Korhonen TK. 1996. The GafD protein of the G (F17) fimbrial complex confers adhesiveness of *Escherichia coli* to laminin. *Infect Immun* 64(7):2857-2860.
152. Sáenz Y, Briñas L, Domínguez E, Ruiz J, Zarazaga M, Vila J, Torres C. 2004. Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains of human, animal, and food origins. *Antimicrob Agents Chemother* 48(10):3996-4001.

153. Sanchez CJ, Mende K, Beckius ML, Akers KS, Romano DR, Wenke JC, Murray CK. 2013. Biofilm formation by clinical isolates and the implications in chronic infections. *BMC Infect Dis* 29;13:47.
154. Schaller M, Bein M, Korting CH, Baur S, Hamm G, Monod M, Beinhauer S, Hube B. 2003. The Secreted Aspartyl Proteinases Sap1 and Sap2 Cause Tissue damage in an in vitro Model of Vaginal Candidiasis Based on Re-constituted Human Vaginal Epithelium. *Infect Immun* 71(6):3227-3234.
155. Schembri MA, Kjaergaard K, Sokurenko EV, Klemm P. 2001. Molecular characterization of the *Escherichia coli* FimH adhesin. *J Infect Dis* 183 Suppl 1:S28-31.
156. Schembri MA, Ussery DW, Workman C, Hasman H, Klemm P. 2002. DNA microarray analysis of fim mutations in *Escherichia coli*. *Mol Genet Genomics* 267(6):721-729.
157. Schwan WR. 2011. Regulation of fim genes in uropathogenic *Escherichia coli*. *World J Clin Infect Dis* 1(1): 17–25.
158. Schwarz S, Kehrenberg C, Doublet B, Cloeckaert A. 2004. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiol Rev.* 28(5): 519-542.
159. Schwebke JR. 2003. Gynecologic consequences of bacterial vaginosis. *Obstet Gynecol Clin North Am* 30(4):685-694.
160. Servin AL. 2005. Pathogenesis of Afa/Dr Diffusely Adhering *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 18(2): 264–292.
161. Shahbazi S, Asadi Karam MR, Habibi M, Talebi A, Bouzari S. 2018. Distribution of extended-spectrum β -lactam, quinolone and carbapenem resistance genes, and genetic diversity among uropathogenic *Escherichia coli* isolates in Tehran, Iran. *J Glob Antimicrob Resist.* 23(14):118-125.
162. Shaikh S, Fatima J, Shakil S, Rizvi SM, Kamal MA. 2015. Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. *Saudi J Biol Sci* 22(1):90-101.
163. Sharma G, Sharma S, Sharma P, Chandola D, Dang S, Gupta S, Gabrani R. 2016. *Escherichia coli* biofilm: development and therapeutic strategies. *J Appl Microbiol* 121(2):309-319.
164. Shaw K, Rather P, Hare R, Miller G. 1993. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol Rev* 57(1):138-163.
165. Shervington A, Abbasi L, Bdour S. 2001. PCR amplification of four genes coding for aminoglycoside-modifying enzymes in bacteria of clinical isolates from Jordan University Hospital. *World J Microbiol Biotechnol* 17: 139-142.
166. Shin SW, Shin MK, Jung M, Belaynehe KM, Yoo HS. 2015. Prevalence of Antimicrobial Resistance and Transfer of Tetracycline Resistance Genes in *Escherichia coli* Isolates from Beef Cattle. *Appl Environ Microbiol* 81(16): 5560-5566.
167. Sianou A, Galyfos G, Moragianni D, Baka S. 2017. Prevalence of vaginitis in different age groups among females in Greece. *J Obstet Gynaecol.* 37(6):790-794.

168. Sköld O. 2001. Resistance to trimethoprim and sulfonamides. *Vet Res* 32(3-4): 261-273.
169. Smith KD, Andersen E, Hayashi F, Strobe K, Bergman MA, Barrett SL, Cookson BT, Aderem A. 2003. Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility. *Nat Immunol* 4(12): 1247-1253.
170. Snyder JA, Haugen BJ, Buckles EL, Lockett CV, Johnson DE, Donnenberg MS, Welch RA, Mobley HL. 2004. Transcriptome of uropathogenic *Escherichia coli* during urinary tract infection. *Infect Immun* 72(11):6373-6381.
171. Snyder JA, Haugen BJ, Lockett CV, Maroncle N, Hagan EC, Johnson DE, Welch RA, Mobley HL. 2005. Coordinate expression of fimbriae in uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 73(11):7588-7596.
172. Snyder JA, Lloyd AL, Lockett CV, Johnson DE, Mobley HL. 2006. Role of phase variation of type 1 fimbriae in a uropathogenic *Escherichia coli* cystitis isolate during urinary tract infection. *Infect Immun* 74(2):1387-1393.
173. Soto SM. 2014. Importance of Biofilms in Urinary Tract Infections: New Therapeutic Approaches. *Advances in Biology* 13.
174. Soto SM, Smithson A, Martinez JA, Horcajada JP, Mensa J, Vila J. 2007. Biofilm formation in uropathogenic *Escherichia coli* strains: relationship with prostatitis, urovirulence factors and antimicrobial resistance. *J Urol* 177(1):365-8.
175. Speer B, Shoemaker N, Salyers A. 1992. Bacterial resistance to tetracycline: mechanisms, transfer, and clinical significance. *Clin Microbiol Rev.* 5(4): 387–399.
176. Spurbeck R, Mobley H. 2013. Uropathogenic *Escherichia coli*. En Donnenberg M. (ed.), *Escherichia coli: Pathotypes and principles of pathogenesis*. 275-304.
177. Strahilevitz J, Jacoby G, Hooper D, Robicsek A. 2009. Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clin Microbiol Rev* 22(4): 664-689.
178. Strömberg N, Marklund BI, Lund B, Ilver D, Hamers A, Gaastra W. 1990. Host-specificity of uropathogenic *Escherichia coli* depends on differences in binding specificity to Gal α 1-4Gal β -containing isoreceptors. *EMBO J.* 9:2001.
179. Subashchandrabose S, Mobley HL. 2015. Virulence and Fitness Determinants of Uropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr* 3(4).
180. Tajbakhsh E, Ahmadi P, Abedpour E, Arbab N, Khamesipour F. 2016. Biofilm formation, antimicrobial susceptibility, serogroups and virulence genes of uropathogenic *E. coli* isolated from clinical samples in Iran. *Antimicrob Resist Infect Control* 1(5):11.
181. Tansarli GS, Kostaras EK, Athanasiou S, Falagas ME. 2013. Prevalence and treatment of aerobic vaginitis among non-pregnant women: evaluation of the evidence for an underestimated clinical entity. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 32(8):977-984.

182. Tarr PI, Bilge SS, Vary JC Jr, Jelacic S, Habeeb RL, Ward TR, Baylor MR, Besser TE. 2000. Iha: a novel *Escherichia coli* O157:H7 adherence-conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure. *Infect Immun* 68(3):1400-1407.
183. Tempera G, Abbadessa G, Bonfiglio G, Cammarata E, Cianci A, Corsello S, Raimondi A, Ettore G, Nicolosi D, Furneri PM. 2006. Topical kanamycin: an effective therapeutic option in aerobic vaginitis. *J Chemother* 18(4):409-414.
184. Tempera G, Furneri P. 2010. Management of aerobic vaginitis. *Gynecol Obstet Invest* 70(4):244-249.
185. Tenover FC. 2006. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am J Infect Control* 34(5 Suppl 1):S3-10.
186. Toma C, Martínez Espinosa E, Song T, Miliwebsky E, Chinen I, Iyoda S, Iwanaga M, Rivas M. 2004. Distribution of putative adhesins in different seropathotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 42(11):4937-46.
187. Toro CS, Farfán M, Contreras I, Flores O, Navarro N, Mora GC, Prado V. 2005. Genetic analysis of antibiotic-resistance determinants in multidrug-resistant Shigella strains isolated from Chilean children. *Epidemiol Infect* 133(1):81-86.
188. Totsika M, Beatson SA, Holden N, Gally DL. 2008. Regulatory interplay between pap operons in uropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 67(5):996-1011.
189. Totsika M, Moriel DG, Idris A, Rogers BA, Wurpel DJ, Phan MD, Paterson DL, Schembri MA. 2012. Uropathogenic *Escherichia coli* mediated urinary tract infection. *Curr Drug Targets* 13(11):1386-1399.
190. Van TT, Chin J, Chapman T, Tran LT, Coloe PJ. 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.
191. Waksman G, Hultgren SJ. 2009. Structural biology of the chaperone-usher pathway of pilus biogenesis. *Nat Rev Microbiol* 7(11):765-774.
192. Walsh C. 2000. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature* 406(6797):775-781.
193. Wang A, Yang Y, Lu Q, Wang Y, Chen Y, Deng L, Ding H, Deng Q, Zhang H, Wang C, Liu L, Xu X, Wang L, Shen X. 2008. Presence of qnr gene in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* resistant to ciprofloxacin isolated from pediatric patients in China. *BMC Infect Dis* 8:68.
194. Wiles T, Kulesus R, Mulvey M. 2008. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Exp Mol Pathol* 85(1):11-19.
195. Wright KJ, Seed PC, Hultgren SJ. 2007. Development of intracellular bacterial communities of uropathogenic *Escherichia coli* depends on type 1 pili. *Cell Microbiol* 9(9):2230-2241.

196. Wullt B. 2003. The role of P fimbriae for *Escherichia coli* establishment and mucosal inflammation in the human urinary tract. *Int J Antimicrob Agents* 21(6):605-621.
197. Wurpel DJ, Beatson SA, Totsika M, Petty NK, Schembri MA. 2013. Chaperone-Usher Fimbriae of *Escherichia coli*. *PLoS ONE* 8(1): e52835.
198. Wurpel DJ, Totsika M, Allsopp LP, Webb RI, Moriel DG, Schembri MA. 2016. Comparative proteomics of uropathogenic *Escherichia coli* during growth in human urine identify UCA-like (UCL) fimbriae as an adherence factor involved in biofilm formation and binding to uroepithelial cells. *J Proteomics* 10;131:177-189.
199. Xia Y, Gally D, Forsman-Semb K, Uhlin BE. 2000. Regulatory cross-talk between adhesin operons in *Escherichia coli*: inhibition of type 1 fimbriae expression by the PapB protein. *EMBO J* 19(7):1450-1457.
200. Xiao Y, Hu Y. 2012. The major aminoglycoside-modifying enzyme AAC(3)-II found in *Escherichia coli* determines a significant disparity in its resistance to gentamicin and amikacin in China. *Microb Drug Resist* 18(1):42-6.
201. Yang X, Wang H. 2014. Pathogenic *E. coli*. en C Batt (ed.) *Encyclopedia of food microbiology*. (695-701). Academic Press.
202. Zalewska BM. 2011. Urinary tract infections of *Escherichia coli* strains of chaperone-usher system. *Pol J Microbiol* 60(4):279-85.
203. Zav'yalov V, Zavialov A, Zav'yalova G, Korpela T. 2009. Adhesive organelles of Gram-negative pathogens assembled with the classical chaperone/usher machinery: structure and function from a clinical standpoint. *FEMS Microbiol Rev* 34(3):317-378.
204. Zhang L, Foxman B. 2003. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* mediated urinary tract infections. *Front Biosci* 1(8):235-244.
205. Zhao L, Gao S, Huan H, Xu X, Zhu X, Yang W, Gao Q, Liu X. 2009. Comparison of virulence factors and expression of specific genes between uropathogenic *Escherichia coli* and avian pathogenic *E. coli* in a murine urinary tract infection model and a chicken challenge model. *Microbiology*. 155(5):1634-1644.
206. Zhou G, Mo WJ, Sebbel P, Min G, Neubert TA, Glockshuber R, Wu XR, Sun TT, Kong XP. 2001. Uroplakin Ia is the urothelial receptor for uropathogenic *Escherichia coli*: evidence from in vitro FimH binding. *J Cell Sci* 114(Pt 22):4095-4103.