



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**CARACTERIZACIÓN DE GENOTIPOS DE VIRULENCIA DE *Escherichia coli* DE
ORIGEN VAGINAL**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIÓL. REYES SOLIS JOSÉ ROGELIO

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ERIC MONROY PÉREZ

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. GLORIA LUZ PANIAGUA CONTRERAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

M. EN C. MARÍA DE LOS ÁNGELES PATRICIA MANZANO GAYOSSO

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

MÉXICO, 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/1053/2018

Asunto: Oficio de Jurado para Examen de Grado.

Lic. 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 17 de septiembre de 2018, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **REYES SOLIS JOSE ROGELIO** con número de cuenta 309279396, con la tesis titulada "Caracterización de genotipos de virulencia de *Escherichia coli* de origen vaginal", realizada bajo la dirección del DR. ERIC MONROY PÉREZ:

Presidente: DR. SERGIO VACA PACHECO
Vocal: DR. LUIS EDUARDO SERVIN GARCIDUEÑAS
Secretario: DRA. GLORIA LUZ PANIAGUA CONTRERAS
Suplente: DRA. CLAUDIA ANDREA SEGAL KISCHINEVZKY
Suplente: DRA. ROCIO JETZABEL ALCÁNTARA HERNÁNDEZ

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 6 de octubre 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, por brindarme la oportunidad de continuar con mi formación profesional, adquirir los conocimientos necesarios que demanda el grado y para dejar en alto a la máxima casa de estudios del país.
- A UNAM-DGAPA_PAPIIT IN216517 por financiar el presente proyecto de investigación. A CONACYT por la beca otorgada sin la cual no me hubiera sido posible realizar el posgrado (CVU: 782230).
- Al Dr. Eric Monroy Pérez, mi tutor principal, por todo el apoyo brindado durante mi formación profesional. Fue un honor trabajar, aprender y convivir con un excelente investigador y persona.
- A la Dra. Gloria Luz Paniagua Contreras por toda la ayuda y el tiempo que me dedicó, siempre le estaré agradecido. El conocimiento y los consejos brindados los atesoraré por siempre.
- A la M. en C. María de los Ángeles Patricia Manzano Gayosso por sus acertadas observaciones. Le agradezco enormemente el apoyo y tiempo brindado para la realización de este trabajo.

A título personal

- A mis padres: Por el apoyo incondicional en todos los sentidos, por ser mi fuente de inspiración. Sin ustedes jamás hubiera sido posible culminar este objetivo, por esto y por todo, muchísimas gracias.
- A mis hermanas: Por siempre mostrarme el camino a seguir, por todo el apoyo y los regañones, por estar siempre a mi lado, infinitas gracias.
- A mi pequeña nueva familia: Andy y Dany, por ser la luz que ilumina mi camino, por todas las alegrías y momentos inolvidables, esto es por y para ustedes. Los amo.
- Al barrio: Ustedes saben quiénes son, más que amigos son mis hermanos, gracias por todo.
- A Paty y Susan: Por brindarme su amistad y ayuda durante mi estancia en el laboratorio, cada día de trabajo se aligeró con su profesionalismo, apoyo, compañía y risas. Muchas gracias.
- Al Dr. Luis Eduardo Servín Garcidueñas, a la Dra. Claudia Andrea Segal Kischinevzky y a la Dra. Rocío Jetzabel Alcántara Hernández, por su revisión, corrección y crítica a la tesis.
- A Dios.

Dedicatoria

“NO DEBEMOS OLVIDAR QUE CUANDO SE DESCUBRIÓ EL RADIO NADIE SABÍA QUE SERÍA ÚTIL EN LOS HOSPITALES. EL TRABAJO ERA DE CIENCIA PURA. Y ESTA ES UNA PRUEBA DE QUE EL TRABAJO CIENTÍFICO NO DEBE CONSIDERARSE DESDE EL PUNTO DE VISTA DE SU UTILIDAD DIRECTA. DEBE HACERSE POR SÍ MISMO, POR LA BELLEZA DE LA CIENCIA, Y ENTONCES SIEMPRE EXISTE LA POSIBILIDAD DE QUE UN DESCUBRIMIENTO CIENTÍFICO SE CONVIERTA EN UN BENEFICIO PARA LA HUMANIDAD”

Marie Curie

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 Infecciones del canal cérvico-vaginal	3
1.2 Características generales de <i>Escherichia coli</i>	4
1.3 Patogenia	6
1.4 Factores de virulencia	9
1.5 Adhesinas	11
1.5.1 Hemaglutinina sensible a temperatura (<i>tsh</i>)	12
1.6 Toxinas	12
1.6.1 Factor necrotizante citotóxico 1 (<i>cnf1</i>).....	13
1.6.2 Hemolisina α (<i>hlyA</i>).....	13
1.6.3 Proteína uropatógena específica (<i>usp</i>)	14
1.6.4 Toxina vacuolante autotransportadora (<i>vat</i>).....	15
1.6.5 Colicina A (<i>cva</i>).....	15
1.6.6 Enterotoxina 1 de <i>Shigella</i> (<i>set1</i>)	16
1.6.7 Enterotoxina 2 de <i>Shigella</i> (<i>sen</i>)	16
1.6.8 Toxina enteroagregativa termoestable (<i>astA</i>).....	16
1.7 Sistemas de adquisición de hierro (nutrición)	17
1.7.1 Aerobactina (<i>iuc</i>).....	18
1.7.2 Receptor férrico de aerobactina (<i>iutA</i>).....	18
1.7.3 Receptor de salmoquelina (<i>iroN</i>).....	18
1.7.4 Proteína capturadora de hierro 2 (<i>irp2</i>)	19
1.7.5 Receptor férrico de captación de yersiniabactina (<i>fyuA</i>).....	19
1.7.6 Elemento de respuesta al hierro A (<i>ireA</i>).....	20
1.7.7 Proteína para la captación de hierro férrico B (<i>feoB</i>).....	20
1.8 Sistemas para evadir la respuesta inmune del hospedero (protectinas)	20
1.8.1 Antígeno capsular (<i>kpsMTII</i>)	21
1.8.2 Proteasa T de membrana externa (<i>ompT</i>)	22
1.8.3 Proteína que incrementa la supervivencia en suero (<i>iss</i>)	22
1.8.4 Proteína de membrana externa (<i>traT</i>)	22
1.9 Islas de patogenicidad.....	23

1.9.1	Componente específico de la maltosa (<i>malX</i>)	24
1.9.2	Isla de patogenicidad <i>she</i> (<i>sigA</i> , <i>pic</i> y <i>sap</i>)	24
1.10	Serogrupos de <i>E. coli</i>	24
2.	OBJETIVOS	26
2.1	Objetivo general	26
2.2	Objetivos particulares	26
3.	ANTECEDENTES	27
4.	METODOLOGÍA	29
4.1	Origen de las cepas bacterianas y pruebas bioquímicas	29
4.2	Extracción del DNA bacteriano	29
4.3	Identificación de <i>E. coli</i> por PCR convencional.....	30
4.4	Identificación de los genes <i>tsh</i> , <i>vat</i> , <i>astA</i> , <i>irp2</i> e <i>iss</i> por PCR multiplex	32
4.5	Identificación de los genes <i>sigA</i> , <i>pic</i> y <i>sap</i> por PCR multiplex	32
4.6	Identificación de los genes de virulencia por PCR convencional	33
4.7	Identificación de los serogrupos O por PCR multiplex	35
4.8	Análisis de las muestras amplificadas por PCR mediante electroforesis	35
4.9	Infección del cultivo celular A431 con <i>E. coli</i> : Preparación del inóculo bacteriano e inoculación	37
4.10	Cosecha de <i>E. coli</i> de la superficie del cultivo de la línea celular A431	37
4.11	Extracción del RNA de las cepas CVPEC	37
4.12	Transcripción reversa o síntesis del cDNA	39
4.13	Expresión de los marcadores de virulencia por PCR en tiempo real.....	40
4.14	Análisis estadístico	41
5.	RESULTADOS.....	42
5.1	Origen de las cepas analizadas.....	42
5.2	Identificación bioquímica de <i>E. coli</i>	43
5.3	Identificación molecular de <i>E. coli</i>	43
5.4	Detección de los marcadores de virulencia en las cepas CVPEC	44
5.5	Expresión de los marcadores de virulencia en las cepas CVPEC	45
5.6	Patrones de expresión de los genes de virulencia en las cepas CVPEC	46
5.7	Detección de serogrupos O en las cepas CVPEC	46
5.8	Asociación entre patrones de expresión y serogrupos O en las cepas CVPEC.....	48
5.9	Análisis estadístico	50

6.	DISCUSIÓN	51
6.1	Infecciones cérvico-vaginales.....	51
6.2	Detección y expresión de los genes de virulencia de las cepas CVPEC	51
6.2.1	Adhesinas	52
6.2.2	Toxinas	53
6.2.3	Sistemas para la adquisición de hierro (nutrición).....	58
6.2.4	Sistemas para evadir la respuesta inmune del hospedero (protectinas).....	61
6.2.5	Islas de patogenicidad (PAIs).....	64
6.3	Serogrupos O (lipopolisacárido)	66
6.4	Patrones de expresión.....	67
7.	CONCLUSIONES	69
8.	ANEXO 1	71
8.1	Fotografías de los genes amplificados por PCR convencional	71
8.1.1	Toxinas	71
8.1.2	Sistemas de adquisición de hierro (nutrición).....	72
8.1.3	Sistemas para evadir la respuesta inmune del hospedero (protectinas).....	74
8.1.4	Islas de patogenicidad (PAIs).....	75
8.2	Fotografías de los genes de <i>E. coli</i> amplificados por PCR multiplex.....	76
8.2.1	Multiplex 1: <i>tsh</i> , <i>vat</i> , <i>astA</i> , <i>irp2</i> e <i>iss</i>	76
8.2.2	Multiplex 2: <i>sigA</i> , <i>sap</i> y <i>pic</i>	76
9.	ANEXO 2	77
9.1	Gráficas de PCR en tiempo real y curva de disociación (expresión de los marcadores de virulencia)	77
9.1.1	16S rRNA.....	77
9.1.1	Adhesina.....	78
9.1.2	Toxinas	79
9.1.3	Sistemas de adquisición de hierro (nutrición).....	82
9.1.4	Sistemas para evadir la respuesta inmune del hospedero (protectinas).....	88
9.1.4	Asociados a islas de patogenicidad (PAIs).....	92
10.	ANEXO 3	94
10.1	Fotografías de los amplicones para identificar los serogrupos O	94
11.	LITERATURA CITADA.....	96

RESUMEN

Las infecciones cérvico-vaginales (CVIs) ocasionadas por cepas de *E. coli* portadoras de múltiples marcadores de virulencia se encuentran entre los principales padecimientos inflamatorios en las mujeres y representan un serio problema de salud. En este estudio se utilizó un modelo de infección *in vitro* de la línea celular vaginal A431 con cepas de *E. coli* patógenas cérvico-vaginales (CVPEC) con el objetivo de determinar los distintos patrones de expresión de los genes de virulencia que codifican para adhesinas, toxinas, sistemas de adquisición de hierro, sistemas para evadir la respuesta inmune del hospedero (protectinas) y otros asociados a islas de patogenicidad (PAIs) y su relación con los distintos serogrupos O en las cepas CVPEC. Un total de 200 cepas de *E. coli* fueron aisladas de mujeres mexicanas con infecciones cérvico-vaginales de dos unidades médicas del Instituto Mexicano del Seguro Social. La identificación de *E. coli* se realizó por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) mediante la amplificación del gen 16S rRNA. La detección de los diferentes genes de virulencia y serogrupos O se realizó mediante múltiples corridas de PCR. La expresión de los genes de virulencia fue detectada por PCR en tiempo real después de la infección *in vitro* de células A431 derivadas de carcinoma de epidermis vulvar. Los genes de virulencia más frecuentes entre las cepas CVPEC fueron: *fyuA* 94.5% (n=189), *feoB* 91.5% (n=183), *traT* 81% (n=162), *kpsMTII* 75.5% (n=151) y *usp* 72.5% (n=145). Los serogrupos predominantes fueron: O25 (49.5%, n=99), O75 (9%, n=18) y O15 (7.5%, n=15). Los genes de virulencia expresados con mayor frecuencia entre las cepas CVPEC fueron: *fyuA* 94.5% (n=189), *feoB* 91% (n=182), *traT* 80% (n=160), *usp* 72.5% (n=145) y *kpsMTII* 72.5% (n=145). El patrón de expresión más frecuente entre las cepas CVPEC fue el conformado por los genes *fyuA/feoB/traT/kpsMTII/usp/iutA/irp2* con el 31.5% (n=63), teniendo correlación estadísticamente significativa ($p < 0.05$) con el serogrupo O25. Los resultados demostraron que las cepas de *Escherichia coli* expresaron de manera colectiva distintos genes de virulencia durante la patogénesis de la línea celular vaginal A431.

ABSTRACT

Cervico-vaginal infections (CVIs) caused by strains of *E. coli* carrying multiple virulence markers are among the main inflammatory diseases in women and represent a serious health problem. In this study, we used an *in vitro* model of infection the vaginal cell line A431 with pathogenic cervical-vaginal *E. coli* strains (CVPEC) to determine the expression patterns of virulence genes encoding for adhesins, toxins, iron-acquisition-systems, systems to evade the immune response of the host (protectins) and other associated with pathogenicity islands (PAIs) and their relationship with different O serogroups in the CVPEC strains. A total of 200 strains of *E. coli* were isolated from mexican women with cervical-vaginal infections from two medical units of the Instituto Mexicano del Seguro Social. The identification of *E. coli* was performed by the polymerase chain reaction (PCR) amplifying the 16S rRNA gene. Detection of different virulence genes and serogroups O was performed using multiple PCR runs. The expression of virulence genes was detected by real-time PCR after *in vitro* infection of A431 cells derived from vulvar epidermis carcinoma. The most frequent virulence genes in the CVPEC strains were: *fyuA* 94.5% (n=189), *feoB* 91.5% (n=183), *traT* 81% (n=162), *kpsMTII* 75.5% (n=151) and *usp* 72.5% (n=145). The predominant serogroups were: O25 (49.5%, n=99), O75 (9%, n=18) and O15 (7.5%, n=15). The most frequently expressed virulence genes among the CVPEC strains were: *fyuA* 94.5% (n=189), *feoB* 91% (n=182), *traT* 80% (n=160), *usp* 72.5% (n=145) y *kpsMTII* 72.5% (n=145). The most abundant expression pattern among the CVPEC strains was formed by the genes *fyuA/feoB/traT/kpsMTII/usp/iutA/irp2* with 31.5% (n=63), having a statistically significant correlation (p<0.05) with the serogroup O25. The results showed that strains of *Escherichia coli* collectively expressed different virulence genes during the pathogenesis of vaginal cell line A431.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Infecciones del canal cérvico-vaginal

Las infecciones cérvico-vaginales (CVIs) se encuentran entre los principales padecimientos inflamatorios en las mujeres (Hilbert *et al.*, 2008) y son consideradas una de las razones más comunes por las que las mujeres buscan atención médica (Lipsky *et al.*, 2000). Representan hasta un 55% del total de consultas de atención primaria, especializada y de urgencias, siendo *E. coli* el principal patógeno causal de las infecciones del tracto genitourinario (Donders, 2010). Las cepas patógenas de *Escherichia coli* cérvico-vaginal (CVPEC) afectan aproximadamente al 60% de las mujeres durante su vida (Rashki, 2014).

Algunas mujeres con infecciones cérvico-vaginales no presentan síntomas (pacientes asintomáticas), otras, sin embargo, pueden padecer signos y síntomas como eritema, ulceraciones superficiales o fisuras, secreción vaginal anormal (fluido fétido, abundante, grumoso, blanquecino o amarillento), dolor y prurito vulvar, dismenorrea, disuria y/o dolor pélvico (Tchoudomirova *et al.*, 2001). Puede ser difícil distinguir la etiología solo con base en los síntomas, por lo que es necesaria la exploración física y el estudio microbiológico para establecer un diagnóstico preciso. La prevalencia de los procesos infecciosos puede variar dependiendo de la población de estudio (Bradshaw *et al.*, 2005). En México (1995-1998) se reportó que la presencia de *E. coli* incrementó significativamente de 11 a 15% en muestras de exudados cérvico-vaginales en pacientes con infección sintomática (Flores-Paz *et al.*, 2003). Para el 2007 se reportó una prevalencia de *E. coli* aproximadamente del 17% en exudados cérvico-vaginales (González-Pedraza *et al.*, 2007), siendo esta prevalencia mayor en mujeres con menopausia, debido a que el déficit estrogénico provoca que el epitelio vaginal se adelgace, lo que da lugar a que las infecciones vaginales sean más frecuentes a esta edad (González-Pedraza *et al.*, 2007).

Entre los factores más importantes que favorecen las infecciones cérvico-vaginales se encuentran las relaciones sexuales sin protección. La conducta

sexual se ha relacionado a las infecciones vaginales debido a que el sexo vaginal practicado sin protección (uso de condón) resulta en la reducción de la actividad endógena antimicrobiana y en un crecimiento microbiano favorecido por el plasma seminal (Nakra *et al.*, 2016). Los diferentes métodos de planificación familiar como el uso del dispositivo intrauterino (DIU) ocasionan procesos inflamatorios y con ello puede incrementar hasta 5 veces la colonización e infección por cepas CVPEC (Smart *et al.*, 2004). Por último, las enfermedades crónicas como la diabetes mellitus (DM) incrementan las infecciones debido a la inmunosupresión tanto humoral como celular, lo que se ha asociado con una prevalencia relativamente alta en la expresión de factores de virulencia en infecciones por *E. coli* patógena extraintestinal (ExPEC) (Wang *et al.*, 2013).

1.2 Características generales de *Escherichia coli*

Escherichia coli es una bacteria que posee la capacidad de colonizar y persistir en numerosos nichos, principalmente en el tracto gastrointestinal de los mamíferos. *E. coli* y otras bacterias comensales de la microbiota intestinal frecuentemente forman una relación simbiótica benéfica con su hospedero, proporcionando sustancias nutritivas, señales clave para la regulación y desarrollo de la respuesta inmune, además de protección contra patógenos extraños (Yan & Polk, 2004). Es un bacilo Gram-negativo, móvil, cuya dimensión varía de 1 a 3 μm (Figura 1). Es una bacteria anaerobia facultativa que forma parte principal de la microbiota intestinal normal de los seres humanos. Las cepas comensales contribuyen a la salud de sus portadores debido a que inhiben el crecimiento de otras bacterias patógenas (Levine, 1987).

E. coli puede cultivarse con facilidad a partir de muestras biológicas, en agar MacConkey, en donde forma colonias de 2-3 mm de diámetro, de color rosado, suaves, redondas, lisas y con bordes regulares; también se puede cultivar en agar eosina azul de metileno (EMB) formando colonias de características similares pero de color verde metálico y con un distintivo punto de color negro en el centro de cada colonia (Zinnah *et al.*, 2007).

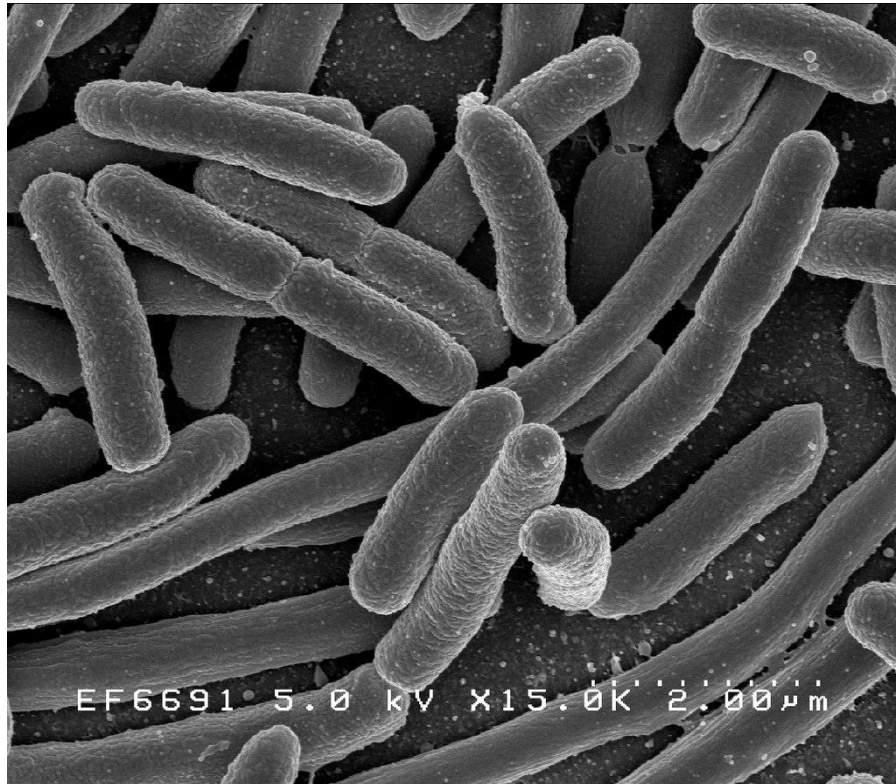


Figura 1. Micrografía electrónica de *Escherichia coli* (Tomada de Rocky Mountain Laboratories, NIH: NIAID, 2002).

Según el manual de Bergey (2005) de Bacteriología sistemática y conforme a la definición general de la familia *Enterobacteriaceae* a la que pertenecen, éstas son bacterias quimioheterótrofas facultativas que poseen los metabolismos fermentativos y respiratorios, no forman esporas, están desprovistas de oxidasa, producen catalasa y β -galactosidasa, pueden ser móviles por flagelos peritricos y normalmente reducen nitratos a nitritos.

El estudio de distintas reacciones bioquímicas puede ayudar en la diferenciación entre las especies bacterianas. Las principales pruebas bioquímicas que distinguen a *E. coli* de las demás especies son producción de indol, reacción negativa para el citrato de Simmons, producción de lisina descarboxilasa y fermentación de carbohidratos como maltosa, glucosa, D-sorbitol, L-arabinosa, lactosa y D-manitol (Scheutz & Strockbine, 2005).

1.3 Patogenia

E. coli es una especie bacteriana de considerable importancia científica, económica y médica. Están incluidas en esta especie cepas no patógenas y otras que son capaces de provocar enfermedades entéricas y diversos tipos de infecciones extraintestinales en mamíferos (Johnson, 2002).

Algunas cepas de *E. coli* tienen la capacidad de divergir de su estado comensal y adquirir una naturaleza patógena provocando enfermedades serias, tanto en el tracto digestivo como en otras partes del hospedero (Johnson, 2002). Estas cepas patógenas se clasifican como *E. coli* diarreogénica y *E. coli* patógena extraintestinal (Kaper *et al.*, 2004).

Dentro de cada uno de estos grupos existen cepas, conocidas como patotipos, que comparten factores de virulencia comunes y causan patologías similares (Marrs *et al.*, 2005; Sousa, 2006). Varios patotipos diarreogénicos de *E. coli* provocan gastroenteritis, pero rara vez provocan patologías fuera del tracto digestivo. Por otro lado ExPEC puede existir en el intestino sin causar molestias. Sin embargo, tiene la capacidad de diseminarse y colonizar otros lugares del hospedero, incluyendo sangre, sistema nervioso central y tracto urinario, ocasionando enfermedad (Russo & Johnson, 2003).

Algunos estudios sugieren que la colonización vaginal tiene un papel importante en las infecciones del tracto urinario (UTIs) (Gupta *et al.*, 1998). El amplio rango de factores de virulencia que posee *E. coli* provoca, en múltiples ocasiones, UTIs más severas (Poey *et al.*, 2012).

El mecanismo de patogenicidad de las cepas de *E. coli* patógena cérvico-vaginal (CVPEC) durante las infecciones vaginales ha sido muy poco estudiado (Hilbert *et al.*, 2008; Obata-Yasuoka *et al.*, 2002; Rashki, 2014). Sin embargo, este mecanismo ha sido mucho más estudiado en las cepas de *E. coli* uropatógenas (UPEC), que también poseen los mismos marcadores de virulencia (Lüthje & Brauner, 2014).

Dentro del tracto urinario, *E. coli* necesita superar varias líneas de defensa, como la fuerza mecánica del flujo de orina, sustancias antimicrobianas en la orina secretadas por las células epiteliales que recubren la vejiga y una respuesta inflamatoria del hospedero que permite la producción de citocinas, la afluencia de neutrófilos, la exfoliación de células epiteliales y la generación de diferentes compuestos antimicrobianos (Bower *et al.*, 2005; Chromek & Brauner, 2008, Mulvey *et al.*, 2001). Por lo tanto, el primer paso para establecer una infección exitosa es la adherencia firme e irreversible a las células epiteliales del hospedero.

Después de la adherencia, una pequeña proporción de bacterias entra en las células epiteliales degradando varios componentes estructurales del hospedero, incluyendo integrinas $\beta 1$ (glicoproteínas que participan en la unión de las células a la matriz extracelular), actina del citoesqueleto, microtúbulos y balsas lipídicas (Eto *et al.*, 2007; Dhakal & Mulvey, 2009). Además, las cepas de *E. coli* expresan un gran número de adhesinas, que tienen relevancia específica en diferentes regiones del tracto urinario (Lüthje & Brauner, 2014).

Una vez que se ha adherido y ha sido adoptada por las células del hospedero, *E. coli* entra en el citoplasma y se multiplica rápidamente, transitando en el interior de compartimentos ácidos unidos a la membrana, similares a endosomas tardíos o lisosomas (Anderson *et al.*, 2003; Eto *et al.*, 2007). Las toxinas permiten al patógeno extenderse a los tejidos más profundos después de irrumpir la integridad celular para obtener acceso a nutrientes dentro de la célula hospedera, o para destruir a las células efectoras inmunes y evadir su potencial actividad antibacteriana. Sin embargo, es probable que la actividad tóxica de lugar a una fuerte reacción inflamatoria, en respuesta a la necrosis o a la propia toxina (Lüthje & Brauner, 2014).

La disponibilidad de hierro es extremadamente restringida en el tracto urinario y por lo tanto las bacterias tienen que estar equipadas con sistemas para sobrevivir en este ambiente limitado. Los iones de hierro son altamente tóxicos y casi insolubles, por lo que las bacterias deben tratar con fuentes de hierro ligadas a proteínas del hospedero o unidos al grupo hemo. La regulación negativa de las

proteínas de unión a hierro, tales como la lactoferrina o la transferrina, es por tanto una reacción típica del hospedero a la infección bacteriana. Las bacterias también producen sus propias proteínas que se acoplan al hierro, conocidas como sideróforos (Lüthje & Brauner, 2014). La necesidad vital de la adquisición de hierro para *E. coli* en el tracto genitourinario se ilustra mediante la regulación positiva de los genes que codifican para los sistemas de adquisición de hierro durante las UTIs (Hagan *et al.*, 2010; Snyder *et al.*, 2004).

Tras la infección, el hospedero emite la respuesta proinflamatoria, seguida de influxo de neutrófilos y eliminación bacteriana. A diferencia de las variedades comensales, UPEC posee la capacidad de suprimir esta inducción de mediadores proinflamatorios. La bacteria utiliza como estrategia escapar del reconocimiento inmune, ya sea espacialmente ocultándose intracelularmente o cubriendo estructuras superficiales inmunogénicas, por ejemplo, mediante la formación de una biopelícula. Algunos genes de virulencia expresan proteínas con estas características que le permiten a *E. coli* evadir la respuesta inmune del hospedero (Lüthje & Brauner, 2014).

Eventualmente las bacterias emergen de las comunidades bacterianas intracelulares (IBCs) para colonizar nuevamente el epitelio e invadir nuevas células. Debido a la pérdida de células superficiales en el proceso de exfoliación, las células menos diferenciadas quedan expuestas a las bacterias (Lüthje & Brauner, 2014). Las IBCs son el sello distintivo de un estado agudo de infección cuando las bacterias se multiplican excesivamente durante varias generaciones (Justice *et al.*, 2004).

De esta manera, *E. coli* es capaz de romper los diferentes compartimentos celulares del hospedero para multiplicarse en el citoplasma y formar una biopelícula intracelular que le permite evadir la respuesta inmune del hospedero, la acción de diferentes antibióticos y además, constituir un reservorio para las infecciones recurrentes (Anderson *et al.*, 2003; Eto *et al.*, 2007; Mulvey *et al.*, 2001; Rosen *et al.*, 2007).

1.4 Factores de virulencia

Los síntomas, y el resultado final de una infección provocada por *E. coli* son influenciados por la combinación de diferentes factores de virulencia, así como por los mecanismos de la respuesta inmune del hospedero (Vejborg *et al.*, 2011). Entre los factores de virulencia bacteriana en cepas de *E. coli* se encuentran los que codifican para adhesinas, sistemas de adquisición de hierro, protectinas, citotoxinas y enterotoxinas (Gal-Mor & Finlay, 2006; Lloyd *et al.*, 2007) (Tabla 1), los cuales contribuyen a la colonización e invasión mediante la adhesión, daño tisular al penetrar las células epiteliales, adquisición de nutrientes esenciales y formación de biopelículas para evadir la respuesta inmune del hospedero (Justice *et al.*, 2004; Subashchandrabose & Mobley, 2015).

Los factores de virulencia en las cepas genitourinarias de *E. coli* son importantes durante los diferentes pasos de la patogénesis en las infecciones cérvico-vaginales y del tracto urinario (Samuelsson *et al.*, 2004) (Figura 2).

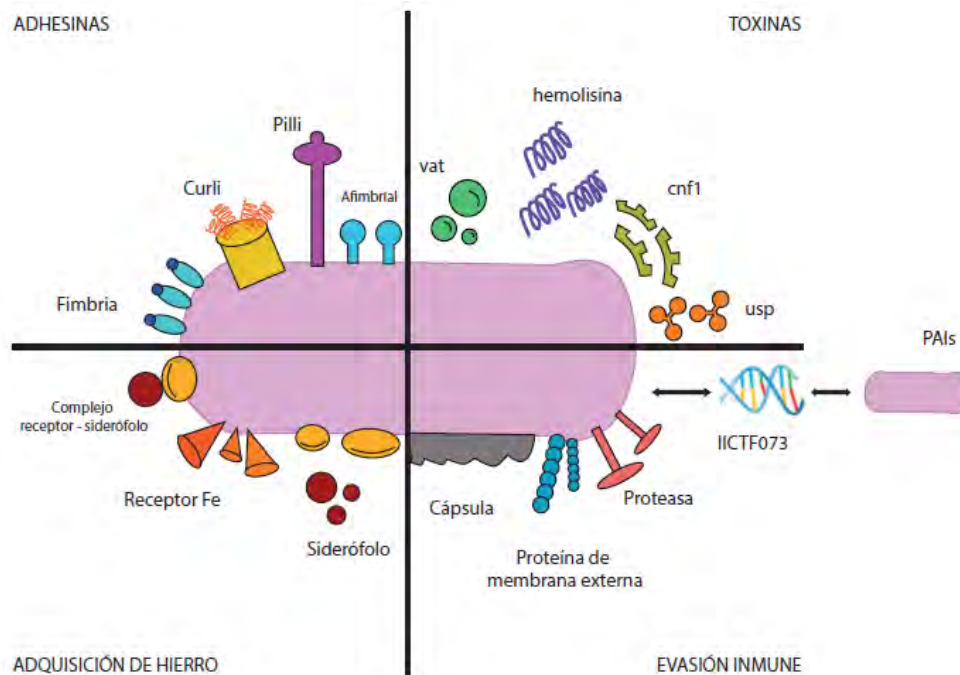


Figura 2. Factores de virulencia de las cepas UPEC y CVPEC. *E. coli* emplea diferentes estrategias para infectar el tracto genitourinario, evadir la respuesta inmune del hospedero, nutrirse y persistir (Adaptado de Lüthje & Brauner, 2014).

Tabla 1. Principales factores de virulencia de las cepas CVPEC y UPEC.

Gen	Nombre	Referencia
Adhesinas		
<i>pap</i>	Pili asociado a pielonefritis (pilus associated with pyelonephritis)	Wiles <i>et al.</i> , 2008
<i>sfa</i>	Fimbria S (S fimbriae)	Antao <i>et al.</i> , 2009
<i>afal</i>	Adhesina afimbrial I (afimbrial adhesin I)	Le Bouguenec & Servin, 2006
<i>fim</i>	Fimbria tipo 1 (type-1 fimbriae)	Marrs <i>et al.</i> , 2005
<i>tsh</i>	Hemaglutinina sensible a la temperatura (temperature-sensitive hemagglutinin)	Heimer <i>et al.</i> , 2004
<i>iha</i>	Adhesina homologa a IrgA (iron-regulated gene homologue adhesin)	Johnson <i>et al.</i> , 2005
Toxinas		
<i>cnf1</i>	Factor necrotizante citotóxico 1 (cytotoxic necrotizing factor I)	Hertting <i>et al.</i> , 2008
<i>hlyA</i>	Hemolisina α (hemolysin α)	Yamamoto <i>et al.</i> , 1995
<i>usp</i>	Proteína uropatógena específica (uropathogenic specific protein)	Nipic <i>et al.</i> , 2013
<i>cva</i>	Colicina A (colicin A)	Ewers <i>et al.</i> , 2007
<i>vat</i>	Toxina vacuolante autotransportadora (vacuolating autotransporter toxin)	Momtaz <i>et al.</i> , 2013
<i>set1A</i>	Enterotoxina 1 de <i>Shigella</i> (<i>Shigella</i> enterotoxin 1)	Momtaz <i>et al.</i> , 2013
<i>sen</i>	Enterotoxina 2 de <i>Shigella</i> (<i>Shigella</i> enterotoxin 2)	Momtaz <i>et al.</i> , 2013
<i>astA</i>	Toxina enteroagregativa termoestable (EnteroAggregative heat stable toxin)	Momtaz <i>et al.</i> , 2013
Sistemas de adquisición de Hierro (Nutrición)		
<i>iuc</i>	Aerobactina (aerobactin)	Snyder <i>et al.</i> , 2004
<i>iutA</i>	Receptor férrico de aerobactina (ferric aerobactin receptor)	Landgraf <i>et al.</i> , 2012
<i>iroN</i>	Receptor de salmoquelina (salmochellin receptor)	Hantke <i>et al.</i> , 2003
<i>irp2</i>	Proteína capturadora de hierro 2 (iron-repressible protein 2)	Khasheii <i>et al.</i> , 2016
<i>fyuA</i>	Receptor férrico de captación de yersiniabactina (ferric yersiniabactin uptake receptor)	Spurbeck <i>et al.</i> , 2012
<i>ireA</i>	Elemento de respuesta al hierro (iron-responsive element)	Russo <i>et al.</i> , 2001
<i>feoB</i>	Proteína para la captación de hierro férrico B (ferric iron uptake B)	Runyen-Janecky <i>et al.</i> , 2003
Sistemas para evadir la respuesta inmune del hospedero (Protectinas)		
<i>kpsMTII</i>	Antígeno capsular (K-antigen: capsule synthesis gen)	Marrs <i>et al.</i> , 2005
<i>ompT</i>	Proteasa T de membrana externa (the outer membrane protease T)	Hui <i>et al.</i> , 2010
<i>iss</i>	Proteína que incrementa la supervivencia en suero (increased serum survival protein)	Agarwal <i>et al.</i> , 2012
<i>traT</i>	Proteína de membrana externa (Outer-membrane protein)	Rodríguez-Siek <i>et al.</i> , 2005
Islas de patogenicidad (PAIs)		
<i>malX</i>	Componente específico de la maltosa (maltose-specific component)	Agarwal <i>et al.</i> , 2013
<i>sigA</i>	Factor sigma A (factor sigma A: <i>shigella flexneri</i> cytotoxin)	Momtaz <i>et al.</i> , 2013
<i>pic</i>	Proteína involucrada en la colonización intestinal (protein involved in the intestinal colonization)	Momtaz <i>et al.</i> , 2013
<i>sap</i>	Péptido sensible a antimicrobianos (sensitive to antimicrobial peptide)	Soto <i>et al.</i> , 2009

1.5 Adhesinas

La adherencia está mediada por adhesinas que ayudan a reconocer y unirse a receptores de las células del hospedero. Las adhesinas están presentes en la superficie bacteriana y median la unión específica con moléculas en el epitelio, se unen primero a sus receptores mediante interacciones de Van der Waals y atracción hidrofóbica, lo que conduce a una unión de baja afinidad. Posteriormente, los enlaces se fortalecen mediante interacciones estereoquímicas (Sabitha *et al.*, 2016). La adherencia a las células del hospedero puede ser mediada tanto por adhesinas fimbriales como afimbriales (Lüthje & Brauner, 2014).

Las fimbrias o pilis, son estructuras complejas de proteínas codificadas por grupos de genes en los cuales se encuentra la secuencia para las subunidades fimbriales, así como los péptidos para el ensamblaje y la secreción (Spurbeck *et al.*, 2011). Estas fimbrias contienen una varilla, compuesta de varios cientos de miles de subunidades grandes de proteínas y una punta adhesiva formada por algunas subunidades pequeñas. Dentro del espacio periplasmático, las chaperonas facilitan el plegamiento de las subunidades que son ensambladas y secretadas en la membrana externa (Waksman & Hultgren, 2009).

La mayoría de las adhesinas afimbriales pertenecen al grupo de las proteínas autotransportadoras. Una proteína autotransportadora está compuesta por diferentes dominios que le permiten su propio transporte a través de la membrana bacteriana (Henderson *et al.*, 1998). Una secuencia señal dirige la secreción de la proteína a través de la membrana interna y es entonces removida de la poliproteína. Un dominio de translocación β se inserta en la membrana externa para formar un poro y mediar el transporte del dominio α . En contraste con el dominio β , el dominio α es altamente variable y determina la función de la proteína. Después de la secreción el dominio pasajero (dominio β) puede permanecer en la superficie celular y actuar como adhesina, o bien puede ser liberado como toxina al espacio circundante (Henderson & Nataro, 2001). Las secuencias que codifican para las proteínas autotransportadoras se encuentran ampliamente distribuidas entre las cepas comensales y las pertenecientes a

distintos patotipos de *E. coli*, sin embargo, algunas se concentran en cepas UPEC, lo que indica que tienen un rol importante en la urovirulencia (Restieri *et al.*, 2007).

1.5.1 Hemaglutinina sensible a temperatura (*tsh*)

Este factor de virulencia fue reportado por primera vez como un factor de hemaglutinación sensible a la temperatura en *E. coli* patógena aviar (APEC) (Provence & Curtiss, 1994). Su homólogo, la hemoglobina proteasa (Hbp), se describió como una proteína de unión al grupo hemo con una actividad de serín proteasa dirigida a la hemoglobina (Otto *et al.*, 1998).

Esta proteína posee un dominio que es secretado y es capaz de adherirse tanto a los glóbulos rojos como a la hemoglobina, así como a diferentes proteínas de la matriz extracelular como la fibronectina y la colágena IV (Antao *et al.*, 2009). Alternativamente, la adhesina Tsh puede procesar proteolíticamente una proteína en la superficie de *E. coli* que luego mediaría la hemaglutinación o podría modificar una proteína de superficie del eritrocito hospedero a la que la bacteria podría unirse (Provence & Curtiss, 1994).

1.6 Toxinas

La secreción de toxinas por bacterias patógenas es bien reconocida. El despliegue de las diferentes toxinas proporciona a las cepas de *E. coli* los medios para infligir daño extenso a los tejidos, facilitando la diseminación bacteriana, liberando nutrientes del hospedero y desactivando las células efectoras inmunes. Estas toxinas poseen también la capacidad de modular, en formas más sutiles, las rutas de señalización del hospedero que afectan innumerables procesos, incluidas las respuestas inflamatorias, la supervivencia celular, así como la dinámica del citoesqueleto (Wiles *et al.*, 2008). Las toxinas expresadas por *E. coli* no necesariamente son secretadas como proteínas desnudas, pueden estar asociadas a vesículas de membrana externa (OMVs); estas vesículas son utilizadas por diferentes especies de bacterias para facilitar la comunicación celular, el intercambio de material genético, la adherencia, la invasión a las células del hospedero y la distribución de toxinas (Kuehn & Kesty, 2005).

1.6.1 Factor necrotizante citotóxico 1 (*cnf1*)

La toxina Cnf1 activa las GTPasas Rho (una superfamilia de enzimas estructuralmente relacionadas que regulan diversas funciones biológicas) (Boquet, 2001). Al llevar a cabo esta activación, Cnf1 induce una serie de cambios en las células del hospedero basados en diferentes reordenamientos del citoesqueleto de actina. Una activación transitoria seguida de la degradación de las GTPasas Rho, promueve la internalización bacteriana en las células uroteliales del hospedero (Hertting *et al.*, 2008).

Para ejercer sus efectos, el factor citotóxico necrotizante debe tener acceso al citosol del hospedero mediante la unión al precursor del receptor de laminina en la superficie de las células blanco, desencadenando la aceptación y subsecuente tráfico de la toxina en el compartimento endosomal tardío. Las condiciones ácidas dentro de este compartimento inducen la traslocación del dominio catalítico de la toxina a través de la membrana vesicular y dentro del citosol del hospedero, donde estimula la familia de GTPasas Rho (Lemonnier *et al.*, 2007).

La presencia del gen *cnf1* está estrechamente ligada a la hemolisina α debido a la organización genética de los genes *cnf1* y *hlyA* (Blanco *et al.*, 1992). El gen *hlyA* puede localizarse individualmente dentro de alguna isla de patogenicidad (PAI) en particular, sin embargo, y exclusivamente en la isla de patogenicidad IJ96, el gen *cnf1* siempre está vinculado a *hlyA* debido a su ubicación combinada (Landraud *et al.*, 2003).

1.6.2 Hemolisina α (*hlyA*)

La Hemolisina α (*hlyA*) es codificada por aproximadamente el 50% de las cepas UPEC y su expresión está asociada con una mayor severidad clínica en pacientes con UTIs (Marrs *et al.*, 2005). HlyA es una toxina dependiente de calcio de 110 kDa que forma poros de 2 nm de ancho (Bhakdi *et al.*, 1988), llamada así por su actividad lítica contra eritrocitos. Sin embargo, HlyA es citotóxica también hacia varios tipos de células nucleadas, incluyendo células inmunitarias, endoteliales y epiteliales en el tracto urinario (Island *et al.*, 1998).

Además de la actividad lítica, las cepas de *E. coli* que expresan este gen inducen una pronunciada exfoliación temprana durante la infección (Smith *et al.*, 2008). Curiosamente, esta reacción no está directamente relacionada con el efecto citotóxico de HlyA; por el contrario, esta toxina estimula la actividad de las serín proteasas y caspasas que regulan la degradación de la paxilina (importante para estabilizar los contactos celulares) e inducen la apoptosis, respectivamente (Dhakal & Mulvey, 2012).

Por otro lado el suero confiere protección parcial contra la actividad tóxica, pero especialmente los neutrófilos son atacados por HlyA bajo condiciones fisiológicas, sugiriendo un rol de protección de HlyA contra la muerte mediada por neutrófilos (Bhakdi *et al.*, 1989). Adicionalmente, se ha encontrado que las concentraciones sublépticas de la hemolisina α potencialmente estimulan la inactivación de la serina/treonina cinasa Akt, que juega un papel central en la progresión del ciclo celular, metabolismo, tráfico vesicular y vías de señalización inflamatoria del hospedero (Wiles *et al.*, 2008).

1.6.3 Proteína uropatógena específica (*usp*)

El gen *usp*, que codifica para la proteína específica uropatógena, tiene un tamaño de 1.8 kb y está codificado en una pequeña isla de patogenicidad junto con 3 marcos de lectura abiertos (ORFs), *imu1-3* aproximadamente de 300 pb cada uno (Nipic *et al.*, 2013). El gen *usp* está asociado a cepas aisladas de pacientes con infecciones cérvico-vaginales, del tracto urinario, pielonefritis y prostatitis (Momtaz *et al.*, 2013; Rashki 2014; Yamamoto *et al.*, 2001).

La proteína uropatógena específica tiene la capacidad de hidrolizar DNA (presenta actividad de DNasa), además cuando se expresa con *imu2*, muestra actividad genotóxica en células de mamífero (Nipic *et al.*, 2013). El daño irreversible en el DNA hacia las células del hospedero resulta en apoptosis o senescencia (Elmore, 2007). La infección ocasionada por *E. coli usp+ imu1-3+* induce que la actividad de las caspasas 3/7 aumente y de esta manera perturba la estructura del citoesqueleto (Nipic *et al.*, 2013).

1.6.4 Toxina vacuolante autotransportadora (*vat*)

Parreira & Gyles (2003) describieron la toxina vacuolante autotransportadora en cepas patogénicas aviares de *Escherichia coli*. *Vat* es un miembro de la subfamilia serín proteasas autotransportadoras de *Enterobacteriaceae* (SPATEs). Esta toxina induce la formación de vacuolas intracelulares que producen efectos citotóxicos similares a los causados por la toxina *VacA* de *Helicobacter pylori* (Parreira & Gyles, 2003).

La toxina *Vat* fue inicialmente caracterizada por su capacidad para inducir una gran variedad de efectos tóxicos en células del hospedero, incluyendo vacuolación e hinchazón (Restieri *et al.*, 2007). Sin embargo, hasta el momento no existen reportes de la importancia de esta toxina en modelos *in vitro* o *in vivo* de infecciones por UPEC o CVPEC, aunque resultados experimentales no descartan la posibilidad de que esta toxina contribuya a los diferentes pasos iniciales durante la colonización bacteriana por *E. coli* que posteriormente conducen a UTIs y septicemias (Parham *et al.*, 2005).

1.6.5 Colicina A (*cva*)

Los plásmidos de virulencia ColV son un grupo heterogéneo de plásmidos grandes que codifican una toxina conocida como colicina V. Las colicinas son sustancias antibióticas que son producidas por ciertos miembros de la familia *Enterobacteriaceae* y tienen acción letal contra cepas sensibles relacionadas. Entre las colicinas descritas se encuentra la colicina A (*cva*) (Waters & Crosa, 1991). Al igual que muchas toxinas, las colicinas están compuestas por dominios estructurales especializados para cada uno de los diferentes pasos, como lo es la orientación, la translocación y la muerte. El grupo al que pertenece *Cva* se caracteriza por la capacidad de formar poros, permeabilizando de esta manera la membrana citoplasmática y destruyendo el potencial de membrana de la célula. Estas colicinas forman canales iónicos regulados por voltaje bien definidos en membranas artificiales (Pattus *et al.*, 1990).

1.6.6 Enterotoxina 1 de *Shigella* (*set1*)

La enterotoxina 1 de *Shigella* es un factor de virulencia de las cepas enteroagregativas de *E. coli* (EAEC), fue detectada por primera vez en *flexneri* (Telli *et al.*, 2010). Esta enterotoxina está codificada por los genes cromosomales *set*, los cuales contienen dos marcos de lectura abierta continuos, *set1A* y *set1B* (Fasano *et al.*, 1997).

El mecanismo de acción de Set1 aún no se conoce, pero podría contribuir a la diarrea secretora que acompaña a la infección por *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) y *Shigella* (Kaper *et al.*, 2004). Se desconoce la manera en la que Set1 participa durante las infecciones cérvico-vaginales y del tracto urinario.

1.6.7 Enterotoxina 2 de *Shigella* (*sen*)

La enterotoxina 2 de *Shigella* está codificada por el gen *sen* localizado en un plásmido invasivo de 140-MDa (Fasano *et al.*, 1995). Esta toxina ha sido reportada en diferentes especies de *Shigella* causando diarrea del viajero (Vargas *et al.*, 1999). Sen aumenta la conductancia transepitelial en un modelo *in vitro*, aunque se desconoce la relevancia de la toxina en la enfermedad clínica (Nataro *et al.*, 1995). Se desconoce la manera en la que Sen participa durante las infecciones cérvico-vaginales y del tracto urinario.

1.6.8 Toxina enteroagregativa termoestable (*astA*)

La toxina enteroagregativa termoestable, es un péptido de 38 residuos de aminoácidos, codificado por el gen *astA* localizado en el plásmido pAA, el cual es común en la mayoría de las cepas EAEC, incluso en las cepas comensales y no comensales (Savarino *et al.*, 1996). La toxina codificada por el gen *astA* estimula la producción de altos niveles de guanosín monofosfato cíclico (cGMP) en la célula, esto permite que el sistema de co-transporte de iones Na^+/Cl^- sea inhibido, reduciendo la absorción de agua y electrolitos del intestino a las vellosidades, resultando en una elevada secreción de Cl^- y agua en los espacios celulares. Sin

embargo, aún no se ha definido el papel de esta toxina en el desarrollo de la diarrea (Telli *et al.*, 2010). Se desconoce la manera en la que AstA participa durante las infecciones cérvico-vaginales y del tracto urinario.

1.7 Sistemas de adquisición de hierro (nutrición)

A pesar de que el hierro es uno de los metales más abundantes en la corteza terrestre, las bacterias patógenas encuentran una limitación de este elemento dentro de los hospederos (Subashchandrabose & Mobley, 2015). De hecho, la limitación del hierro es uno de los mecanismos de defensa innata del hospedero contra la supervivencia bacteriana (Haley & Skaar, 2012), donde el hierro elemental está unido a glucoproteínas como la transferrina y la lactoferrina o incorporado a los grupos hemo de proteínas como la hemoglobina y la mioglobina. Para asegurar niveles adecuados de hierro intracelular, *E. coli* regula la expresión de los genes implicados en la adquisición de hierro en respuesta a la limitación de hierro encontrada en el tracto genitourinario de mamíferos (Hagan *et al.*, 2010).

Escherichia coli uropatógena puede adquirir hierro a través de diferentes mecanismos. Estos mecanismos incluyen la expresión de sistemas de adquisición de hierro que utilizan sideróforos para la adquisición de hierro férrico (Fe^{+3}), el uso de transportadores de hierro para la adquisición de hierro ferroso (Fe^{+2}) y los receptores de grupos hemo para la adquisición de hierro a través de la membrana externa (Subashchandrabose & Mobley, 2015; Wiles *et al.*, 2008).

Los sideróforos son proteínas secretadas de bajo peso molecular que tienen una alta afinidad por Fe^{+3} , que es insoluble como un catión libre. Las bacterias recuperan sideróforos unidos a hierro mediante receptores que facilitan el transporte de los complejos sideróforo-hierro a través de la membrana bacteriana hacia el citosol donde se libera el hierro (Wiles *et al.*, 2008). Las cepas UPEC utilizan estas proteínas como mecanismo principal para la captación de hierro, codifican las proteínas necesarias para la biosíntesis y la absorción de diferentes sideróforos entre los que destacan: aerobactina, enterobactina, salmoquelina y yersiniabactina (Subashchandrabose & Mobley, 2015).

High Pathogenicity Island (HPI) o Alta Isla de Patogenicidad, es una isla de alta patogenicidad de 36 a 43 kb que codifica los principales sistemas de adquisición de hierro en bacterias, entre los que destacan: *irp1*, *irp2* y *fyuA* (Garenaux *et al.*, 2011). Esta isla de patogenicidad se encuentra ampliamente distribuida entre la familia *Enterobacteriaceae* (Bach *et al.*, 2000). En *E. coli* se encuentra en el 70% de las cepas causantes de infecciones del tracto urinario (Schubert *et al.*, 1998).

1.7.1 Aerobactina (*iuc*)

La aerobactina se aisló por primera vez a partir de *Aerobacter aerogenes* y se demostró que está compuesta de ácido cítrico conjugado en los grupos carboxilo con moles de N'-acetil-N'-hidroxi-L-lisina (Neilands & Nakamura, 1985). Es un sideróforo hidroxamato codificado por el operón plasmídico de 8 kb ColV (Ling *et al.*, 2013). La naturaleza del sistema en el cual participa la aerobactina aún no es clara, sin embargo, se ha observado que muchas cepas patógenas de *Escherichia coli* han adoptado este sistema especial de asimilación de Fe^{+3} en condiciones extremadamente limitantes de hierro durante el proceso infeccioso (De Lorenzo *et al.*, 1986).

1.7.2 Receptor férrico de aerobactina (*iutA*)

El receptor férrico de aerobactina (*iutA*) es un receptor sideróforo codificado por un gen del plásmido pColV-30 que le permite a la bacteria reconocer diferentes sideróforos para posteriormente internalizar Fe^{+3} (Williams, 1979). *iutA* está asociado con la virulencia de algunas cepas de *E. coli*, principalmente en cepas UPEC (Crosa & Walsh, 2002). Debido a la existencia de redundancia en los diferentes sistemas de adquisición de hierro, se sugiere que el receptor *iutA* puede ser una ventaja durante el establecimiento de un proceso infeccioso, sin embargo, no es esencial para dichas cepas (Landgraf *et al.*, 2012).

1.7.3 Receptor de salmoquelina (*iroN*)

Las enterobacterias, incluidas *Escherichia coli* y *Salmonella* entérica, a menudo producen el sideróforo catecolato enteroquelina (también llamado enterobactina)

(Young & Gibson, 1979). El receptor de membrana externa salmoquelina, IroN, está involucrado en el reconocimiento y transporte de varios de estos sideróforos catecolatos. Este complejo sideróforo-receptor se llamó salmoquelina porque parecía ser un complejo característico de las cepas de *Salmonella*. Curiosamente, ciertas cepas de *E. coli*, por ejemplo, las cepas UPEC, también poseen un grupo de genes *iroN* muy similar en la isla de patogenicidad III que le confieren la capacidad de internalizar Fe^{+3} hacia el citosol bacteriano (Dobrindt *et al.*, 2002).

1.7.4 Proteína capturadora de hierro 2 (*irp2*)

El gen *irp2* que codifica para la proteína 2 de alto peso molecular capturadora de hierro fue caracterizada por primera vez en la cepa de *E. coli* enteroagregativa 042 (Czeczulin *et al.*, 1999). Irp2 está involucrada en la biosíntesis del sideróforo yersiniabactina para la adquisición de hierro en *Yersinia*, así como en algunas bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*, incluida *E. coli* (Schubert *et al.*, 1998). Algunos autores han encontrado altas prevalencias de estos genes entre las cepas CVPEC y UPEC (Momtaz *et al.*, 2013; Rashki, 2014), aunque el papel de Irp2 en cepas genitourinarias no está claro.

1.7.5 Receptor férrico de captación de yersiniabactina (*fyuA*)

Todos los sistemas de adquisición de hierro generalmente se consideran factores importantes de virulencia. Un rango de enterobacterias contiene un operón de genes llamado alta isla de patogenicidad (HPI) que codifica para proteínas necesarias para la biosíntesis del sideróforo de yersiniabactina (Ybt) y su sistema de captación (FyuA) (Rakin *et al.*, 1999). La HPI está muy extendida entre los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* y es esencial para la virulencia en *Yersinia* y ciertos patotipos de *Escherichia coli* (Schubert *et al.*, 2004). Uno de los genes más importantes que residen en la HPI es *fyuA*, que codifica la proteína de membrana externa de 71 kDa yersiniabactina férrica, que actúa como un receptor para la captación de sideróforos férricos (Ybt) (Heesemann *et al.*, 1993).

1.7.6 Elemento de respuesta al hierro A (*ireA*)

El gen *ireA* codifica para una proteína de 75,3 kDa. Su expresión aumenta una media de tres veces en la orina humana; es una proteína de membrana receptora de sideróforos. Participa en la adquisición de Fe^{3+} . El elemento de respuesta al hierro probablemente también posee la capacidad de participar como adhesina en las infecciones genitourinarias. Debido a las diferentes capacidades reportadas para IreA se puede prever una ventaja evolutiva conferida por estas proteínas multifuncionales a los microorganismos que las expresan (Russo *et al.*, 2001).

1.7.7 Proteína para la captación de hierro férrico B (*feoB*)

Escherichia coli posee un sistema de transporte de hierro (FeoAB) que contribuye al suministro de este elemento a la bacteria en condiciones anaeróbicas. Éste sistema está codificado por dos genes, *feoA* que codifica para una proteína pequeña de 75 residuos de aminoácidos y *feoB* que codifica para una proteína de membrana con 773 residuos de aminoácidos (Kammler *et al.*, 1993). La proteína que regula la captación de hierro férrico tiene una masa molecular de 70 kDa y se localiza en la membrana citoplasmática, la cual presenta diferentes regiones idénticas con ATPasas, lo que indica que la captación de Fe^{3+} mediante este sistema de transporte puede ser impulsada por ATP (Runyen-Janecky *et al.*, 2003).

1.8 Sistemas para evadir la respuesta inmune del hospedero (protectinas)

Tras la infección, el hospedero provoca una fuerte respuesta proinflamatoria, seguido de influxo de neutrófilos y eliminación bacteriana. A diferencia de las cepas comensales, UPEC puede poseer la capacidad de suprimir esta inducción de mediadores proinflamatorios mediante la expresión de diferentes marcadores de virulencia. Las estrategias mediante las cuales *E. coli* es capaz de escapar del reconocimiento inmune son muy diversas. Las bacterias pueden colonizar intracelularmente, cubrir estructuras superficiales inmunogénicas, por ejemplo, mediante la formación de la biopelícula, etc. Algunos factores de virulencia

exhiben estas propiedades de tal manera que protegen a las cepas UPEC de la respuesta inmune del hospedero (Lüthje & Brauner, 2014).

1.8.1 Antígeno capsular (*kpsMTII*)

En las cepas ExPEC la expresión de la cápsula de polisacáridos les confiere una ventaja selectiva contra la respuesta inmune del hospedero. Los componentes principales de las cápsulas bacterianas son polisacáridos ácidos altamente hidratados y de alto peso molecular que les confieren una carga negativa total y propiedades hidrofílicas (Corbett & Roberts, 2008).

Existe una gran diversidad estructural en los polisacáridos capsulares, esta diversidad es una consecuencia de las unidades repetitivas de monosacáridos, así como de las diferencias en los enlaces entre estas unidades. No está clara la presión selectiva que ha impulsado esta diversidad. Sin embargo, una consecuencia de esta diversidad estructural es que existe una biblioteca de diversas estructuras de polisacáridos dentro del microbioma que permite el diseño de nuevas moléculas de polisacáridos con propiedades bioquímicas, farmacológicas o inmunológicas particulares (Corbett & Roberts, 2008).

Se han asignado varias funciones a las cápsulas bacterianas incluyendo adhesión, resistencia a la respuesta inmune innata y adaptativa del hospedero, así como supervivencia intracelular (Roberts, 1996). La mayoría de las cepas ExPEC, incluidas las cepas UPEC, producen el tipo capsular del grupo II (Whitfield, 2006). Estos tipos capsulares son altamente heterogéneos y se asemejan a varios glicoconjugados que se encuentran dentro de los hospederos vertebrados; este mimetismo molecular es parte de la estrategia de evasión inmune de la bacteria (Subashchandrabose & Mobley, 2015).

La expresión de las cápsulas del grupo II está asociada a cepas UPEC (King *et al.*, 2015), este factor de virulencia le confiere a la bacteria la capacidad de resistir a la muerte mediada por el complemento (Roberts, 1996). Además, se sabe que la expresión del antígeno K le permite combatir las defensas innatas del hospedero, evitando de esta manera la fagocitosis (Weiss *et al.*, 1982).

1.8.2 Proteasa T de membrana externa (*ompT*)

El gen *ompT* codifica para la proteasa de membrana externa, una aspartil proteasa expresada en la membrana externa de *E. coli*. Esta proteasa es un miembro de la familia denominada omptín proteasas que están presentes en algunas bacterias Gram negativas (Kramer *et al.*, 2000). Esta proteasa de membrana externa puede hidrolizar protamina en poco tiempo evitando que las bacterias sean eliminadas por estas proteínas. La proteína expresada por el gen *ompT* facilita la infección bacteriana al poseer la capacidad de degradar péptidos y proteínas antimicrobianos derivados del hospedero durante las interacciones patogénicas de *E. coli* con las células epiteliales urogenitales (Hui *et al.*, 2010).

1.8.3 Proteína que incrementa la supervivencia en suero (*iss*)

El complemento tiene la capacidad de opsonizar y lisar a una amplia gama de especies bacterianas, propiedades que se consideran mecanismos importantes de defensa del hospedero (Binns *et al.*, 1982). Algunas bacterias que provocan infecciones generalizadas con frecuencia son resistentes a la acción del complemento (Bjorksten & Kaijser, 1978). El gen *iss* codifica para una proteína que le confiere a la bacteria la capacidad de resistir al suero, evitando de esta manera que sea opsonizada y lisada por el sistema del complemento. Puede funcionar de forma individual o combinarse con los efectos del polisacárido capsular, cadenas laterales O-polisacárido y proteínas de superficie. Las cepas UPEC resistentes al suero están asociadas con pielonefritis, cistitis y especialmente bacteriemia (Agarwal *et al.*, 2012).

1.8.4 Proteína de membrana externa (*traT*)

Las actividades bactericidas y líticas en el suero representan defensas importantes primarias del hospedero contra la infección microbiana. La principal actividad letal del suero es el sistema del complemento, que ataca las capas superficiales de las bacterias invasoras. El complemento se puede activar mediante la formación de complejos antígeno-anticuerpo específicos (vía clásica) entre los antígenos de superficie de los microbios invasores y los anticuerpos preexistentes, o

directamente mediante estructuras de lipopolisacáridos de la envoltura celular (vía alternativa) (Moll *et al.*, 1980). La proteína codificada por el gen *traT*, que está presente en aproximadamente 21,000 copias por célula, es el principal componente estructural de la envoltura celular en *E. coli* y casi con certeza se encuentra en la superficie de la membrana externa y por lo tanto, cumple con las expectativas de un tipo de factor de resistencia al suero (Agarwal *et al.*, 2012; Moll *et al.*, 1980).

1.9 Islas de patogenicidad

La adquisición de DNA mediante la transferencia horizontal de material genético (HGT) es un mecanismo eficaz para generar diversidad entre las especies bacterianas. La adquisición de plásmidos, bacteriófagos y la participación de los transposones también juegan un papel importante en la generación de la diversidad genómica (Dobrindt *et al.*, 2003). HGT resulta en un grado de similitud inusualmente alto en la composición del DNA entre la región intercambiada de los genomas del donante y del receptor (Ochman *et al.*, 2000). Si el DNA recién adquirido confiere una ventaja al organismo, entonces se conserva y puede integrarse de forma estable en el genoma a través del proceso de selección natural (Lawrence, 1999). Se cree que la HGT es esencial para la evolución adaptativa de especies bacterianas (Saunders *et al.*, 1999). La cantidad de material genético que se ha adquirido a través de HGT es inesperadamente alta en una serie de patógenos bacterianos, incluidas las cepas UPEC (Lloyd *et al.*, 2007).

Con frecuencia entre cepas bacterianas grandes regiones de DNA genómico que contienen genes asociados a la virulencia se intercambian. Estas regiones se denominan islas de patogenicidad (PAIs) (Lloyd *et al.*, 2007). Las PAIs son regiones grandes (>30 kb) e inestables de DNA cromosómico que contienen genes de virulencia bacteriana. El contenido de GC en las PAIs con frecuencia difiere del resto del genoma. Además, las PAIs se encuentran comúnmente en cepas patógenas y están ausentes o se encuentran raramente en cepas no patógenas (Hacker *et al.*, 1997).

1.9.1 Componente específico de la maltosa (*malX*)

El gen *malX* codifica para la enzima II del sistema fosfotransferasa, que reconoce la maltosa y la glucosa (Reidl & Boos, 1991), tiene una prevalencia elevada en cepas que provocan infecciones extraintestinales (Sannes *et al.*, 2004). Este gen es un marcador específicamente asociado a la presencia de diferentes PAIs en el cromosoma bacteriano, principalmente a las PAIs IV₅₃₆ y II_{CTF073}, por lo que su detección en las diferentes cepas patógenas de *E. coli* es un determinante para la detección de estas PAIs (Ostblom *et al.*, 2011).

1.9.2 Isla de patogenicidad *she* (*sigA*, *pic* y *sap*)

La isla de patogenicidad *she* contiene los genes *set1A* y *set1B* que codifican las dos subunidades de la enterotoxina ShET1, el gen *sigA* (factor sigma A) que codifica una proteasa autotransportadora citopática la cual contribuye a la acumulación de líquido según lo reportado en un modelo de infección de asa ileal de conejo (Al-Hasani *et al.*, 2000). Un tercer gen de virulencia, *pic* (proteína involucrada en la colonización intestinal) codifica una mucinasa con actividad de hemaglutinina que participa en la colonización bacteriana (Henderson *et al.*, 1999) y el gen *sap* (péptido sensible a antimicrobianos) que codifica una proteína que es sensible a péptidos antimicrobianos (Soto *et al.*, 2009). La secuencia completa de nucleótidos y la organización genética de la PAI *she* reveló que tiene muchas de las características de las PAIs de varios patógenos Gram-negativos (Al-Hasani *et al.*, 2001A). La PAI *she* parece haber sido adquirida por transferencia horizontal de material genético, sin embargo, la transmisión de la PAI *she* de un microorganismo a otro aún no se ha demostrado experimentalmente (Al-Hasani *et al.*, 2001B).

1.10 Serogrupos de *E. coli*

La caracterización de los serogrupos puede ser utilizada como un marcador epidemiológico en la patogenicidad de las cepas de *E. coli* (Bertschinger, 1999). Las cepas de *E. coli* son identificadas serológicamente por los antígenos de superficie O (lipopolisacárido), K (capsular) y H (flagelar). Se han descrito 174 serogrupos O de *E. coli* (Liu *et al.*, 2008). Los serogrupos O de las cepas de *E. coli*

están relacionados con ciertos genes de virulencia fuertemente asociados a UTIs. Estudios previos han reportado que los serogrupos O1, 2, 4, 6, 7, 8, 15, 16, 18, 21, 22, 25, 75 y 83 están preferencialmente asociados con cepas UPEC y CVPEC (Bidet *et al.*, 2007).

El antígeno O es parte del lipopolisacárido (LPS) presente en la membrana externa de bacterias Gram-negativas y está compuesto de unidades de oligosacáridos repetidas (unidades O), que típicamente comprenden de tres a seis residuos de azúcar. El antígeno O aporta la mayor variabilidad antigénica a la superficie celular y está sujeto a una selección intensa por parte del sistema inmune del hospedero y otros factores ambientales, como los bacteriófagos, que pueden explicar el mantenimiento de diversas formas de antígeno O dentro de una especie (Reeves, 1995).

Los genes implicados en la síntesis del antígeno O se clasifican normalmente en tres grupos principales: 1) genes de la biosíntesis de la ribosa de nucleótidos; 2) genes que codifican para glicosiltransferasa; y 3) genes de procesamiento de unidades O (Reeves y Wang, 2002). Los genes de las dos últimas clases son normalmente específicos de los antígenos O individuales y pueden utilizarse como DNA blanco en la tipificación molecular por PCR (Ren *et al.*, 2008). Se ha estudiado poco los serogrupos O asociados a las cepas CVPEC. Sin embargo, es muy probable que exista una relación entre los factores de virulencia y los serogrupos O, al igual que ocurre en las cepas UPEC (Hilbert *et al.*, 2008).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Determinar los distintos patrones de expresión de los marcadores de virulencia en cepas de *E. coli* cérvico-vaginales utilizando un modelo *in vitro* de infección de la línea celular vaginal A431.

2.2 Objetivos particulares

- A. Determinar la frecuencia de cepas CVPEC en un grupo de mujeres con infecciones vaginales.
- B. Identificar por PCR convencional y multiplex los genes que codifican para: adhesinas (*tsh*), toxinas (*cnf1*, *hlyA*, *usp*, *vat*, *cva*, *set1*, *sen* y *astA*), sistemas de adquisición de hierro (*iuc*, *iutA*, *ironN*, *irp2*, *fyuA*, *ireA* y *feoB*), protectinas (*kpsMTII*, *ompT*, *iss* y *traT*) y otros asociados a las PAIs (*malX*, *sigA*, *pic* y *sap*) en las cepas de *E. coli* de origen vaginal.
- C. Detectar los diferentes serogrupos O en las cepas de *E. coli* de origen vaginal por PCR multiplex.
- D. Determinar por PCR en tiempo real la expresión de los genes de virulencia de las cepas de *E. coli* utilizando un modelo *in vitro* de infección de la línea celular vaginal humana A431.
- E. Correlacionar los diferentes patrones de expresión de los marcadores de virulencia con los serogrupos O en las cepas de *E. coli* de origen vaginal.

3. ANTECEDENTES

Los avances en genética molecular durante la última década han permitido investigar la fisiopatología de la infección urogenital inflamatoria. Estos éxitos están conduciendo hacia importantes avances tanto en el tratamiento como en la prevención de aquellas infecciones inflamatorias para las que se han identificado diferentes genes de virulencia, además de aumentar nuestra comprensión del funcionamiento normal de los sistemas biológicos. Las infecciones cérvico-vaginales son uno de los principales trastornos inflamatorios femeninos que tienen profundas implicaciones en el estado de salud y la vida social de las personas que lo padecen (Hilbert *et al.*, 2008; Rashki, 2014).

Las cepas urogenitales de *E. coli* se han caracterizado con cierto detalle por diversos enfoques, que incluyen el análisis filogenético, la serotipificación y la caracterización molecular de genes (Obata-Yasuoka *et al.*, 2002). Muchos de estos estudios mediante diversos protocolos de PCR punto final y el diseño de oligonucleótidos iniciadores, han conducido a la caracterización molecular de un gran número de marcadores de virulencia (Ewers *et al.*, 2005; Lane *et al.*, 1985; Momtaz *et al.*, 2013; Rodriguez-Siek *et al.*, 2005; Soto *et al.*, 2009).

Se han reportado múltiples genes de virulencia implicados en la patogenicidad de cepas UPEC. Diferentes estudios alrededor del mundo (Momtaz *et al.*, 2013; Munkhdelger *et al.*, 2017; Zhao *et al.*, 2009), y en México (Morales-Espinosa *et al.*, 2016; Paniagua-Contreras *et al.*, 2015) han reportado importantes genes de adhesión como *fimH*, *iha* y *papC*, genes que codifican toxinas entre los que destacan *usp*, *cnf1*, *hlyA*, *cva* y *set1*, genes involucrados en la adquisición de hierro y nutrición bacteriana como *iroN*, *iuc*, *irp2* y *iutA*, además de genes para la evasión de la respuesta inmune del hospedero (protectinas) principalmente *kpsMTII*, *traT*, *ompT* e *iss* que tienen gran relevancia en el desarrollo de infecciones del tracto urinario (UTIs). Aunado a esto, diferentes trabajos han reportado para las cepas UPEC, una estrecha asociación entre los genes de virulencia y algunos serogrupos O entre los que destacan el serogrupo O25, O16, O75 y O15 (Bidet *et al.*, 2007; Molina-López *et al.*, 2011).

Por otro lado, En México, hasta la fecha no hay ningún estudio que caracterice molecularmente las cepas CVPEC. Además, alrededor del mundo la caracterización molecular de las cepas de *E. coli* patógenas cérvico-vaginales ha sido apenas estudiada. De manera general, los diferentes estudios que han caracterizado los genes de virulencia y los serogrupos O en cepas de *E. coli* patógenas cérvico-vaginales han reportado gran cantidad de genes que codifican para diferentes factores de virulencia y serogrupos O que han sido caracterizados previamente en cepas UPEC (Obata-Yasuoka *et al.*, 2002; Hilbert *et al.*, 2008; Rashki, 2014).

Es importante mencionar que si bien la caracterización molecular de genes de virulencia tanto en cepas de *E. coli* uropatógenas como en cepas de *E. coli* cérvico-vaginales ha ido en aumento, hasta el momento no hay un solo estudio global de expresión de dichos marcadores de virulencia de cepas cérvico-vaginales. En la actualidad el único estudio de esta índole se realizó en cepas de *E. coli* uropatógenas empleando un modelo *in vitro* de infección (Paniagua *et al.*, 2017).

Debido a que no se ha estudiado la expresión de los distintos marcadores de virulencia relevantes para la patogénesis de las infecciones vaginales por *E. coli*, este proyecto contribuirá a caracterizar los marcadores de virulencia así como establecer los diferentes patrones de expresión de los genotipos de virulencia y su asociación con los distintos serogrupos O en cepas de *E. coli* cérvico-vaginales utilizando un modelo *in vitro* de infección de la línea celular vaginal A431.

4. METODOLOGÍA

4.1 Origen de las cepas bacterianas y pruebas bioquímicas

El proyecto fue aprobado por el comité de ética del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) y el comité de bioseguridad de la FES Iztacala de la UNAM. Un total de 210 mujeres, bajo firma de consentimiento informado participaron en el presente estudio, las cuales presentaron signos y síntomas de infecciones cérvico-vaginales durante su asistencia al departamento de Ginecología, de la Clínica Universitaria de la Salud Integral (CUSI) FES Iztacala, Clínica 64 del IMSS unidad Tequesquihuac y Clínica 62 del IMSS unidad Cuautitlán, Estado de México durante el periodo de septiembre del 2016 a enero del 2017. A cada mujer se le aplicó un cuestionario para obtener información como edad, antecedentes de infecciones cérvico-vaginales, enfermedades crónicas, etc. Las mujeres con tratamiento previo de antibióticos (3 meses) fueron excluidas del estudio. Las mujeres que decidieron participar en el estudio se presentaron por la mañana en el Laboratorio de Análisis Clínicos de cada dependencia y por medio de hisopos estériles y con ayuda de un espejo vaginal se les tomó la muestra de la cavidad vaginal. Las muestras fueron sembradas en caldo BHI (infusión cerebro corazón) (Bioxon®, México) y se incubaron a 37°C por 24 horas. Al término se sembraron en los medios: agar sangre (Bioxon®, México), Sabouraud (Bioxon®, México), S-110 (Bioxon®, México) y eosina azul de metileno (EMB) (Bioxon®, México) y se incubaron a 37°C por 24 horas. A partir del crecimiento bacteriano, una colonia con morfología típica de *Escherichia coli* fue seleccionada para la identificación por las pruebas bacteriológicas estándares como: Tinción de Gram, indol, kligler, manitol, citrato y urea. Las cepas de *E. coli* identificadas fueron guardadas en caldo LB (Lysogenic Broth) con glicerol a 4°C (Paniagua-Contreras *et al.*, 2007).

4.2 Extracción del DNA bacteriano

Se realizó la extracción del DNA genómico de las cepas de *E. coli* mediante el método de ebullición descrito por Ooka *et al.*, (2009). Después de obtener el crecimiento óptimo bacteriano a 37°C por 24 horas en agar Mueller Hinton (MH)

(Bioxon®, México) se tomó una colonia de cada cepa con una asa de siembra estéril y se depositó en un tubo de rosca de 16x150 mm, estéril, con 2 mL de agua desionizada estéril Ultrapure™. El inóculo se mezcló vigorosamente con un Apollo Vortex Mixer® durante 30 segundos y se llevó a ebullición durante 20 minutos, posteriormente la muestra se colocó en hielo (0°C) durante 20 minutos. Un volumen de 1.5 mL fue depositado en un microtubo y se centrifugaron en una microcentrifuga Microfuge Beckman Coulter™ a 14,000 rpm durante 15 minutos. Al término, se desechó la pastilla y se recuperó el sobrenadante que contenía el DNA el cual fue transferido a un microtubo de 1.5 mL estéril y se almacenó a -20°C hasta su utilización para la reacción de PCR.

4.3 Identificación de *E. coli* por PCR convencional

Las cepas de *Escherichia coli* fueron identificadas mediante la detección del marcador cromosómico 16S rRNA. Los oligonucleótidos (Tabla 2) y las condiciones de PCR (Tabla 3) para amplificar el gen fueron los descritos por Lane *et al.*, (1985). Para la amplificación por PCR se utilizó la mezcla Kapa Taq Ready Mix™ 2X (Kapa Biosystems™) que contiene DNA polimerasa (0.5 u/μL), buffer de reacción con Mg²⁺ y 0.4 mM de dNTPs (desoxinucleósidos trifosfatos) como sustrato. Para un volumen final por mezcla de reacción de 20 μL se agregaron los siguientes componentes: 10 μL de Kapa Taq Ready Mix™, 1 μL (10 pmol) de cada oligonucleótido (integrated DNA technologies™), 5 μL de agua estéril libre de nucleasas y 3 μL (20 ng) de DNA genómico. La amplificación del DNA se realizó en un termociclador marca BIO-RAD T100® modelo CGI-96. Se utilizó como control positivo la cepa de *E. coli* ATCC 11775.

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para la identificación de *E.coli* mediante la amplificación del gen 16S rRNA.

Gen	Primer	Secuencia (5´-3´)	Tamaño del amplicón (pb)	Referencia
16S rRNA	wl-3110	AGAGTTTGATCGTGGCTACG	919	Lane <i>et al.</i> , 1985
	wl-3111	CCGTCAATTCATTTGAGTTT		

Tabla 3. Condiciones de PCR utilizadas para la identificación de los genes de virulencia en las cepas cérvico-vaginales.

Gen	D1	C	D2	A	E1	E2
16S rRNA	95°C 5´	30	95°C 30´´	55°C 1´	72°C 1´	72°C 5´
Multiplex 1						
<i>tsh</i>						
<i>vat</i>						
<i>astA</i>	94°C 3´	25	94°C 30´´	58°C 30´´	68°C 3´	72°C 10´
<i>irp2</i>						
<i>iss</i>						
Multiplex 2						
<i>sigA</i>						
<i>pic</i>	94°C 3´	30	94°C 30´´	55°C 1´	72°C 1´	72°C 5´
<i>sap</i>						
Convencional						
<i>cnf1</i>	94°C 3´	30	94°C 1´	63°C 30´´	72°C 3´	72°C 7´
<i>hlyA</i>	94°C 3´	30	94°C 1´	63°C 30´´	72°C 3´	72°C 7´
<i>usp</i>	94°C 6´	30	94°C 45´´	58°C 1´	72°C 1´15´´	72°C 8´
<i>cva</i>	95°C 12´	25	94°C 30´´	63°C 30´´	68°C 3´	72°C 10´
<i>set1</i>	95°C 3´	30	95°C 50´´	55°C 1´30´´	72°C 2´	72°C 7´
<i>sen</i>	95°C 3´	30	95°C 50´´	55°C 1´30´´	72°C 2´	72°C 7´
<i>iuc</i>	94°C 3´	40	94°C 1´	58°C 1´10´´	72°C 1´10´´	72°C 6´
<i>iroN</i>	94°C 6´	30	94°C 45´´	58°C 1´	72°C 1´15´´	72°C 8´
<i>iutA</i>	95°C 6´	25	94°C 30´´	63°C 30´´	68°C 3´	72°C 10´
<i>fyuA</i>	95°C 6´	25	94°C 30´´	63°C 30´´	68°C 3´	72°C 10´
<i>ireA</i>	95°C 6´	25	94°C 30´´	63°C 30´´	68°C 3´	72°C 10´
<i>feoB</i>	94°C 5´	30	94°C 30´´	57°C 30´´	72°C 30´´	72°C 5´
<i>kpsMTII</i>	94°C 10´	30	94°C 1´	60°C 1´	72°C 1´	72°C 5´
<i>ompT</i>	95°C 12´	25	94°C 30´´	63°C 30´´	68°C 30´´	72°C 10´
<i>traT</i>	95°C 6´	25	94°C 30´´	63°C 30´´	68°C 3´	72°C 10´
<i>malX</i>	95°C 6´	25	94°C 30´´	63°C 30´´	68°C 3´	72°C 10´

D1: Desnaturalización 1; **C:** Ciclos; **D2:** Desnaturalización 2; **A:** Alineamiento; **E1:** Extensión 1; **E2:** Extensión 2. *Los ciclos incluyen únicamente D2, A y E1.

4.4 Identificación de los genes *tsh*, *vat*, *astA*, *irp2* e *iss* por PCR multiplex

Las condiciones de PCR (Tabla 3) y los oligonucleótidos para amplificar los genes *tsh*, *vat*, *astA*, *irp2*, e *iss* fueron los descritos previamente por Ewers *et al.*, (2005) (Tabla 4). Se utilizó la mezcla Kapa Taq Ready Mix™ 2X (Kapa Biosystems™). Para un volumen final por mezcla de reacción de 20 µL se agregaron los siguientes componentes: 7 µL de Kapa Taq Ready Mix™, 1 µL (10 pmol) de cada oligonucleótido (10 oligonucleótidos en total) (integrated DNA technologies™) y 3 µL (20 ng) de DNA genómico. La amplificación del DNA se realizó en un termociclador marca BIO-RAD T100® modelo CGI-96.

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para la identificación de 5 factores de virulencia por PCR multiplex.

Gen	Primer	Secuencia (5´-3´)	Tamaño del amplicón (pb)	Referencia
<i>tsh</i>	tsh-F	ACTATTCTCTGCAGGAAGTC	824	Ewers <i>et al.</i> , 2005
	tsh-R	CTTCCGATGTTCTGAACGT		
<i>vat</i>	vat-F	TCCTGGGACATAATGGTCAG	981	
	vat-R	GTGTCAGAACGGAATTGT		
<i>astA</i>	asta-F	ATGCCATCAACACAGTATAT	110	
	asta-R	GCGAGTGACGGCTTTGTAGT		
<i>irp2</i>	irp2-F	AAGGATTCGCTGTTACCGGAC	413	
	irp2-R	AACTCCTGATACAGGTGGC		
<i>iss</i>	iss-F	ATCACATAGGATTCTGCCG	309	
	iss-R	CAGCGGAGTATAGATGCCA		

4.5 Identificación de los genes *sigA*, *pic* y *sap* por PCR multiplex

Las condiciones de PCR (Tabla 3) y los oligonucleótidos para amplificar los genes *sigA*, *pic* y *sap* fueron los descritos previamente por Soto *et al.*, (2009) (Tabla 5). Se utilizó la mezcla Kapa Taq Ready Mix™ 2X (Kapa Biosystems™). Para un volumen final por mezcla de reacción de 20 µL se agregaron los siguientes componentes: 10 µL de Kapa Taq Ready Mix™, 1 µL (10 pmol) de cada

oligonucleótido (6 oligonucleótidos en total) (integrated DNA technologies™), 1 µL de agua estéril libre de nucleasas y 3 µL (20 ng) de DNA genómico. La amplificación del DNA se realizó en un termociclador marca BIO-RAD T100® modelo CGI-96.

Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados para la identificación de 3 factores de virulencia por PCR multiplex.

Gen	Primer	Secuencia (5´-3´)	Tamaño del amplicón (pb)	Referencia
<i>sigA</i>	sigA-F	TCCTCGGTATTATTTTATCC	408	Soto <i>et al.</i> , 2009
	sigA-R	CGTAACCCCTGTTGTTTCACC		
<i>pic</i>	pic-F	ACTGGATCTTAAGGCTCAGGAT	500	
	pic-R	GACTTAATGTCACTGTTTCAGCG		
<i>sap</i>	sap-F	TACCCTCCACAACAGAGAATG	832	
	sap-R	TACCCTCCACAACAGAGAATG		

4.6 Identificación de los genes de virulencia por PCR convencional

Las condiciones de PCR (Tabla 3) y los oligonucleótidos para amplificar los 16 genes de virulencia restantes fueron los descritos previamente por Momtaz *et al.*, (2013) y por Rodriguez-Siek *et al.*, (2005) (Tabla 6). Se utilizó la mezcla Kapa Taq Ready Mix™ 2X (Kapa Biosystems™). Para un volumen final por mezcla de reacción de 20 µL para cada uno de los 16 genes por separado se agregaron los siguientes componentes: 10 µL de Kapa Taq Ready Mix™, 1 µL (10 pmol) de cada oligonucleótido (integrated DNA technologies™), 5 µL de agua estéril libre de nucleasas y 3 µL (20 ng) de DNA genómico. La amplificación del DNA se realizó en un termociclador marca BIO-RAD T100® modelo CGI-96.

Tabla 6. Oligonucleótidos utilizados para la identificación de 16 factores de virulencia por PCR convencional.

Gen	Primer	Secuencia (5´-3´)	Tamaño del amplicón (pb)	Referencia
<i>cnf1</i>	cnf1-F	AAGATGGAGTTTCCTATGCAGGAG	498	Momtaz <i>et al.</i> , 2013
	cnf1-R	TGGAGTTTCCTATGCAGGAG		
<i>hlyA</i>	hlyA-F	AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT	1177	
	hlyA-R	ACCATATAAGCGGTCATTCCCGTCA		
<i>usp</i>	usp-F	ACATTCACGGCAAGCCTCAG	440	
	usp-R	AGCGAGTTCCTGGTCAAAGC		
<i>cva</i>	cva-F	TGGTAGAATGTGCCAGAGCAAG	1181	
	cva-R	GAGCGTTTGTAGCGAAGCC		
<i>set1</i>	set1-F	GTGAACCTGCTGCCGATATC	147	
	set1-R	ATTTGTGGATAAAAATGACG		
<i>sen</i>	sen-F	ATGTGCCTGCTATTATTTAT	799	
	sen-R	CATAATAATAAGCGGTCAGC		
<i>iuc</i>	iuc-F	ATGAGAATCATTATTGACATAATTG	1482	
	iuc-R	CTCACGGGTGAAAATATTTT		
<i>iroN</i>	iron-F	AAGTCAAAGCAGGGGTGCCCCG	665	
	iron-R	GACGCCGACATTAAGACGCAG		
<i>iutA</i>	iuta-F	GGCTGGACATCATGGGAAGTGG	302	
	iuta-R	CGTCGGGAACGGGTAGAATCG		
<i>fyuA</i>	fyua-F	TGATTAACCCCGCGACGGGAA	787	
	fyua-R	CGCAGTAGGCACGATGTTGTA		
<i>ireA</i>	irea-F	GATGACTCAGCCACGGGTAA	254	
	irea-R	CCAGGACTCACCTCACGAAT		
<i>feoB</i>	feob-F	AATTGGCGTGCATGAAGATAACTG	470	
	feob-R	AGCTGGCGACCTGATAGAACAATG		
<i>kpsMTII</i>	kpsmt-F	GCGCATTTGCTGATACTGTTG	272	
	kpsmt-R	CATCCAGACGATAAGCATGAGCA		
<i>ompT</i>	ompt-F	ATCTAGCCGAAGAAGGAGGC	559	
	ompt-R	CCCGGGTCATAGTGTTTCATC		
<i>traT</i>	trat-F	GGTGTGGTGCGATGAGCACAG	290	
	trat-R	CACGGTTCAGCCATCCCTGAG		
<i>malX</i>	malx-F	GGACATCCTGTTACAGCGCGCA	925	
	malx-R	TCGCCACCAATCACAGCCGAAC		

4.7 Identificación de los serogrupos O por PCR multiplex

La identificación de los serogrupos O en las cepas de *E. coli* se realizó mediante dos grupos de PCR multiplex utilizando la mezcla Kapa Taq Ready Mix™ (Kapa Biosystems™). Las condiciones de PCR (Tabla 7) y los oligonucleótidos (Tabla 8) fueron los descritos previamente por Li *et al.*, (2010). El primer ensayo de PCR multiplex (grupo 1) fue diseñado para identificar los serogrupos O1, O6, O7, O8, O16, O21 y O75 y el segundo ensayo multiplex (grupo 2) para los serogrupos O2, O4, O15, O18, O22, O25 y O83. El volumen final de la mezcla de reacción de cada grupo fue de 30 µL: 10 µL de Kapa Taq Ready Mix™, 1 µL (10 pmol) de cada oligonucleótido (14 oligonucleótidos en total) (integrated DNA technologies™), 3 µL de agua estéril libre de nucleasas y 3 µL de DNA genómico. La amplificación del DNA se realizó en un termociclador marca BIO-RAD T100® modelo CGI-96.

Tabla 7. Condiciones de PCR utilizadas para la identificación de los serogrupos O en las cepas cérvico-vaginales.

	D1	C	D2	A	E1	E2
Serogrupos	95°C 5´	30	95°C 30´´	55°C 1´	72°C 1´	72°C 5´

D1: Desnaturalización 1; **C:** Ciclos; **D2:** Desnaturalización 2; **A:** Alineamiento; **E1:** Extensión 1; **E2:** Extensión 2. *Los ciclos incluyen únicamente D2, A y E1.

4.8 Análisis de las muestras amplificadas por PCR mediante electroforesis

Una vez realizada la amplificación del DNA de los diferentes genes de virulencia y serogrupos O, 3 µL de cada producto de PCR (amplicones) fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 2% teñidos con el colorante Midori Green (0.7%) (Nipon Genetics, Europe Gmph). La electroforesis se realizó bajo las siguientes condiciones: 120 volts y 94 miliamperes durante 90 minutos. Los geles de agarosa fueron fotografiados bajo luz UV utilizando el sistema de fotodocumentación GEL LOGIC 100™ KODAK® (Paniagua *et al.*, 2007).

Tabla 8. Oligonucleótidos utilizados para la identificación de los serogrupos O por PCR multiplex.

Serogrupo	Primer	Secuencia (5'-3')	Amplicón (pb)	Referencia	
Grupo 1					
O1	wl-14632	(F)GTGGCAAAAGTGAAATAAGGAACG	1098	Li <i>et al.</i> , 2010	
	wl-14633	(R)CGCTGATACGAATACCATCCTAC			
O6	wl-14646	(F)GGATGACGATGTTTTGGCTAAC	783		
	wl-14647	(R)TCTGGGTTTGCTGTGTATGAGGC			
O7	wl-14648	(F)CTATCAAATACCTCTGCTGGAATC	610		
	wl-14649	(R)TGGCTTCGAGATTAACCTATTCCCT			
O8	wl-14652	(F)CCAGAGGCATAATCAGAAATAACAG	448		
	wl-14653	(R)GCAGAGTTAGTCAACAAAAGGTCAG			
O16	wl-14654	(F)GGTTTCAATCTCACAGCAACTCAG	302		
	wl-14655	(R)GTTAGAGGGATAATAGCCAAGCGG			
O21	wl-14676	(F)CTGCTGATGTCGCTATTATTGCTG	209		
	wl-14677	(R)TGAAAAAAGGGAAACAGAAGAGCC			
O75	wl-17413	(F)GAGATATACATGGGGAGGTAGGCT	511		
	wl-17414	(R)ACCCGATAATCATATTCTTCCCAAC			
Grupo 2					
O2	wl-14636	(F)AGTGAGTTACTTTTTAGCGATGGAC	770		Li <i>et al.</i> , 2010
	wl-14637	(R)AGTTTAGTATGCCCTGACTTTGAA			
O4	wl-14642	(F)TTGTTGCGATAATGTGCATGTTCC	664		
	wl-14643	(R)AATAATTTGCTATACCCACACCCTC			
O15	wl-14672	(F)TCTTGTTAGAGTCATTGGTGTATCG	183		
	wl-14673	(R)ATAAACGAGCAAGCACCACACC			
O18	wl-14656	(F)GTTCGGTGGTTGGATTACAGTTAG	551		
	wl-14657	(R)CTACTATCATCCTCACTGACCACG			
O22	wl-14660	(F)TTCATTGTGCGCCACTACTTTCCG	468		
	wl-14661	(R)GAAACAGCCCATGACATTACTACG			
O25	wl-14666	(F)AGAGATCCGTCTTTTATTTGTTTCGC	230		
	wl-14667	(R)GTTCTGGATACCTAACGCAATACCC			
O83	wl-14668	(F)GTACACCAGGCAAACCTCGAAAG	362		
	wl-14669	(R)TTCTGTAAGCTAATGAATAGGCACC			

4.9 Infección del cultivo celular A431 con *E. coli*: Preparación del inóculo bacteriano e inoculación

El método de inoculación fue descrito previamente por Schaller *et al.*, (2003). Se prepararon diluciones de las cepas de *E. coli*, que fueron sembradas en tubos con 2 mL de caldo BHI (Bioxon®, México) y se incubaron por 24 horas a 37°C en agitación constante. Posteriormente se realizaron diluciones 1:5 de los cultivos en caldo estéril de BHI hasta alcanzar una absorbancia de 0.4 a 600 nm, lo que correspondió a una concentración de 1×10^9 células/mL.

Para promover la expresión de los marcadores de virulencia, un inóculo de 50 μ L (1×10^9) del cultivo bacteriano fue depositado sobre la superficie del cultivo celular de la línea A431 derivada de carcinoma de epidermis vulvar (ATCC® CRL-1555™). Las placas con la línea celular infectada fueron incubadas en medio de cultivo DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium) a 37°C por 48 horas con 5% de CO₂ y saturación de humedad.

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

Las bacterias fueron recolectadas de la superficie del cultivo de la línea celular tomando 300 μ L de cada pozo y depositándolos en microtubos con 500 μ L de PBS (phosphate buffer saline, solución 1 M Na₂HPO₄·12H₂O, 1 M NaH₂PO₄·H₂O), posteriormente los tubos se agitaron en un vórtex para homogeneizar y lavar las células bacterianas y se prepararon suspensiones con 1×10^9 células/mL. Una suspensión con una concentración bacteriana de 1×10^9 células/mL de *E. coli* corresponde a una DO de 0.4 a 600 nm. Los tubos se centrifugaron a 8,000 rpm durante 2 minutos. El sobrenadante se decantó conservando solo la pastilla para la extracción de RNA (Green *et al.*, 2004).

4.11 Extracción del RNA de las cepas CVPEC

La extracción total de RNA se realizó con el kit comercial MiniKit RNeasy (Qiagen, Hilden, Germany) utilizando el equipo robotizado QIAcube (Figura 3). Las pastillas bacterianas obtenidas de la infección celular fueron colocadas en la placa de

agitación del equipo. Al mismo tiempo en la posición “A” de la sección correspondiente al buffer de lisis se colocó el buffer TE (solución preparada a pH 8.0 con 10 Mm Tris-Cl, 1 Mm de EDTA y 1 mg/mL de lizosima). Después de alimentar el equipo QIAcube con los diferentes reactivos del kit RNeasy, se llenó el contenedor con puntas de 1 mL y se depositaron tubos de columna y elución en el carrusel (centrifuga) del equipo. Finalmente el QIAcube se programó para la extracción de RNA con lisis celular siguiendo el protocolo del fabricante (RNeasy Protect Bacteria® Qiagen, Hilden, Germany) y se inició la corrida. El equipo robotizado adicionó 100 μ L de buffer TE a cada tubo con la pastilla celular bacteriana cosechadas después de la infección celular A431. Los tubos fueron agitados para lisar las paredes celulares bacterianas. Posteriormente el robot QIAcube adicionó volúmenes de los distintos buffers del kit comercial RNeasy y realizó repetidos pasos de centrifugación y agitación para los diferentes procedimientos: Adicionó 350 μ L de buffer RLT (amortiguador de pH de lisis con isotiocianato de guanidina con 100 μ L/mL de β -mercaptoetanol) que permitió inactivar las RNAsas y favorecer la unión del RNA a la membrana de sílica de la columna utilizada en el QIAcube.

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

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

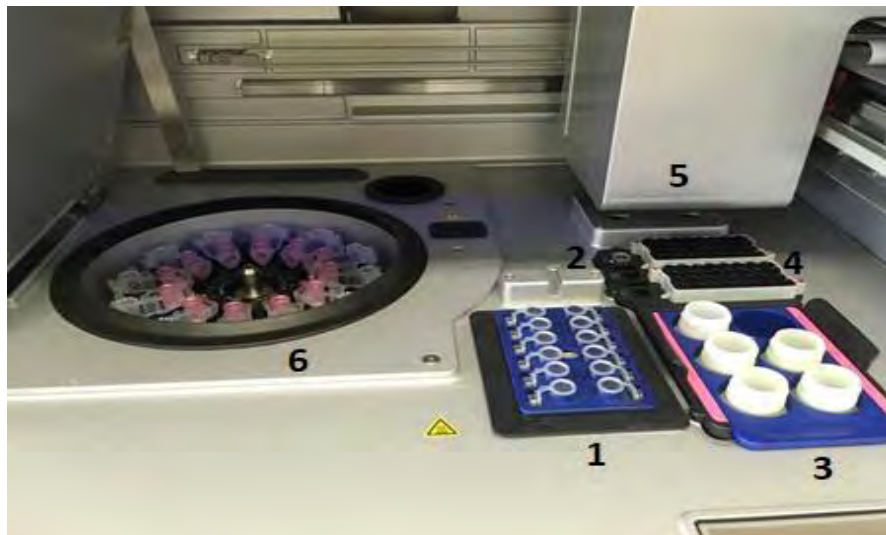


Figura 3. Interior del equipo QIAcube. **1.** Placa de agitación, **2.** Posición para buffer de lisis, **3.** Posición para reactivos MiniKit RNeasy, **4.** Sistema de pipeteo, **5.** Brazo robótico, **6.** Carrusel (centrifuga).

4.12 Transcripción reversa o síntesis del cDNA

Para el proceso de la transcripción reversa de RNA a cDNA se utilizó el kit comercial QuantiTec Reverse transcription (Qiagen®) siguiendo las instrucciones del fabricante. Primero se realizó la eliminación de DNA genómico. Para un volumen final por mezcla de reacción de 14 μ L se agregaron los siguientes componentes: Para cada muestra se depositó en un microtubo 2 μ L de gDNA Wipeout buffer7x®, 7 μ L de H₂O libre de RNAsas y 5 μ L de RNA molde (200 ng/ μ l) que correspondieron a 1 μ g. Posteriormente se incubó a 42°C durante 2 minutos e inmediatamente se colocó en hielo. Posteriormente para la transcripción reversa se preparó la mezcla de reacción en un microtubo con todos los componentes

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

4.13 Expresión de los marcadores de virulencia por PCR en tiempo real

Los oligonucleótidos utilizados para la expresión de los diferentes genes de virulencia fueron los mismos que se utilizaron para la identificación de los genotipos de virulencia por PCR convencional (Tabla 4-6). Para determinar la expresión de los diferentes genes de virulencia se utilizó el aparato de PCR en tiempo real Corbette® (Rotor Gene). El volumen final por mezcla de reacción fue de 20 µL: 10 µL de RealQ Plus 2x Master Mix Green® (AMPLIQON), 1 µL del oligonucleótido *forward* (10 pmol), 1 µL del oligonucleótido *reverse* (10 pmol), 7 µL de agua libre de nucleasas y 1 µL de cDNA templado (500 ng/µL). Las condiciones de amplificación se muestran en la tabla 9.

Para cada ensayo de PCR se utilizó el gen 16S rRNA como *House Keeping* (gen constitutivo), el cual ha sido previamente utilizado en PCR en tiempo real (Fey *et al.*, 2004; Takle *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2009). También se incluyó una curva de calibración del control positivo (cDNA de cepas portadoras del gen a analizar) y dos NTC (no control templado) como controles negativos. La curva de calibración se preparó de la siguiente manera: para cada corrida de PCR en tiempo real se realizaron tres diluciones a diferentes concentraciones (1000 ng/µL, 500 ng/µL, 250 ng/µL). A partir del control positivo portador del gen en particular (2000 ng/µL) se realizó una primer dilución con agua desionizada estéril Ultrapure™ 1:2 (1000 ng/µL). Posteriormente, a partir de la dilución anterior se realizó una segunda dilución 1:2 (500 ng/µL) y finalmente, a partir de la segunda dilución se realizó una última dilución 1:2 (250 ng/µL).

A partir de la curva de calibración el equipo de PCR en tiempo real determinó el número de copias del cDNA con base en el número de ciclos que ocurrieron para que la señal alcanzará el nivel de fluorescencia denominado *threshold cycle* (ciclo umbral o Ct por sus siglas en ingles) el cual interceptó la curva en la fase exponencial, y fue determinado automáticamente por el software del equipo. De esta manera para cada Ct de las muestras y con base en las curvas de calibración, al final el software generó el número de copias obtenidas en la PCR en tiempo real. La *melting curve* (curva de disociación) se realizó en cada corrida de PCR en tiempo real.

Tabla 9. Condiciones de PCR utilizadas para la expresión de los factores de virulencia en las cepas cérvico-vaginales.

	D1	C	D2	A	E1
RT-PCR	95°C 15'	40	95°C 20''	55°C 30''	72°C 30''

D1: Desnaturalización 1; **C:** Ciclos; **D2:** Desnaturalización 2; **A:** Alineamiento; **E1:** Extensión 1. *Los ciclos incluyen únicamente D2, A y E1.

4.14 Análisis estadístico

La correlación entre los distintos patrones de expresión de los genes de virulencia con los serogrupos O de las cepas CVPEC fue analizada por la prueba de χ^2 con $P < 0.05$ utilizando el software Minitab® (versión 18.1 Inc. USA).

5. RESULTADOS

5.1 Origen de las cepas analizadas

En este estudio participaron 210 mujeres con signos y síntomas de infección cérvico-vaginal (CVI) que acudieron al departamento de Ginecología de la Clínica Universitaria de la Salud Integral (CUSI) FES Iztacala, Clínica 64 del IMSS unidad Tequesquihuac y Clínica 62 del IMSS unidad Cuautitlán, Estado de México, durante el periodo de septiembre del 2016 a enero del 2017. Se encontró que el 5.7% de las mujeres presentó una edad en el intervalo de 18 a 19 años (n=12), el 30.5% entre 20 a 39 años (n=64), 40.5% entre 40 a 59 años (n=85), 16.7% correspondió a una edad entre 60 a 89 años (n=35), únicamente el 6.7% de las mujeres no reportó su edad (n=14) (Figura 4).

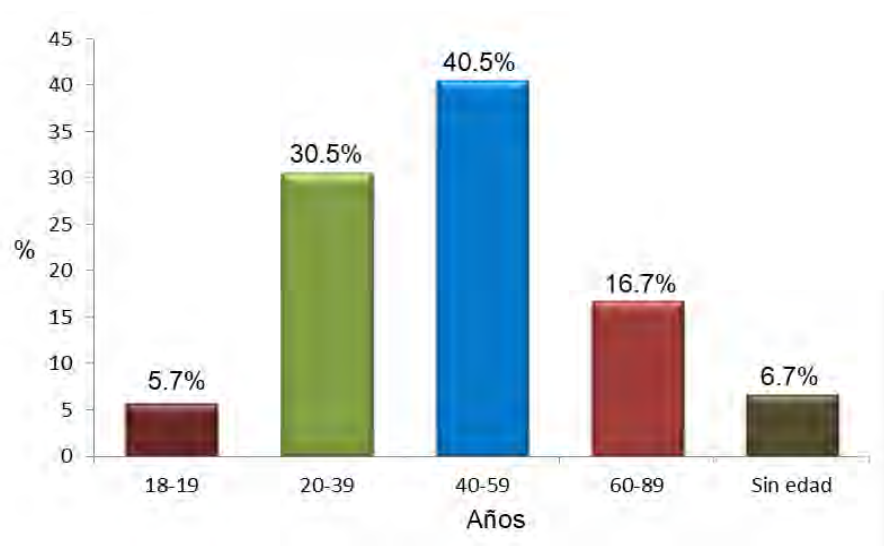


Figura 4. Distribución de las mujeres por intervalos de edad (años).

En la tabla 10 se presentan los antecedentes patológicos por rango de edad de las mujeres que participaron en el proyecto. Se encontró que el 49% de las mujeres reportó padecer algún tipo de enfermedad crónica (n=98), mientras que el 51% (n=102) no reportó otro padecimiento. El 24% reportó episodios recurrentes de infecciones vaginales (n=48), 12.5% hipertensión (n=25), 8.5% diabetes (n=17), 3% obesidad (n=6) y 1% cáncer (n=2).

Tabla 10. Enfermedades crónicas de las mujeres con CVIs (n=98).

Patología	Intervalos de edad (años)	No. (%)
Infecciones recurrentes	18-19	2 (1)
	20-39	14 (7)
	40-59	20 (10)
	60-89	12 (6)
Hipertensión	18-19	0 (0)
	20-39	1 (0.5)
	40-59	6 (3)
	60-89	18 (9)
Diabetes	18-19	0 (0)
	20-39	0 (0)
	40-59	9 (4.5)
	60-89	8 (4)
Obesidad	18-19	2 (1)
	20-39	1 (0.5)
	40-59	1 (0.5)
	60-89	2 (1)
Cáncer	18-19	0 (0)
	20-39	1 (0.5)
	40-59	1 (0.5)
	60-89	0 (0)

5.2 Identificación bioquímica de *E. coli*

A partir de las 210 cepas aisladas de las mujeres con infecciones cérvico-vaginales, únicamente 200 (95.2%) presentaron las características bioquímicas para *E. coli* (Indol+, Kligler+, sacarosa+, manitol-, citrato de Simmons-, urea-). *E. coli* fue identificada individualmente en el 45.5% (n=91) y se encontró asociada con *Staphylococcus* spp en el 18.5% (n=37), *Candida albicans* en el 11% (n=22), *Staphylococcus aureus* en el 5% (n=10) y *Enterococcus faecalis* en el 4.5% (n=9) (Tabla 11).

5.3 Identificación molecular de *E. coli*

Todas las cepas (n=200) identificadas por pruebas bioquímicas como *E. coli*, fueron confirmadas molecularmente mediante la detección del gen 16S *rRNA* (Figura 5).

Tabla 11. Microorganismos identificados en los cultivos vaginales (n=200).

No.	Microorganismos asociados	No. (%)
1	<i>E. coli</i>	91 (45.5)
2	<i>E. coli/ Staphylococcus spp</i>	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)
8-17	Otros	19 (9.5)

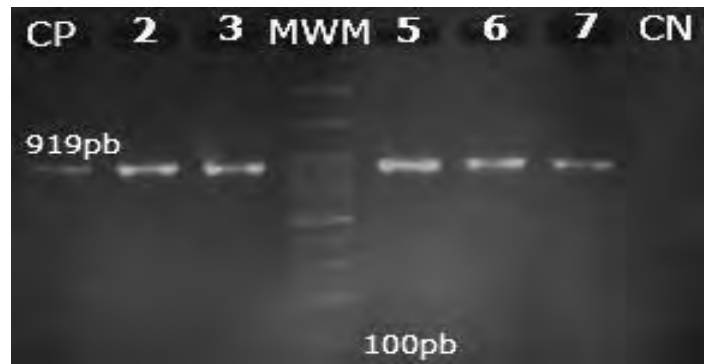


Figura 5. Detección del gen 16S *rRNA* (919 pb) por PCR. Carriles 2, 3 y 5-7: gen 16S *rRNA* en cepas CVPEC; MWM: marcador de peso molecular (100 pb); CP: control positivo (*E. coli* ATCC 11775); CN: control negativo (sin DNA molde).

5.4 Detección de los marcadores de virulencia en las cepas CVPEC

Se determinó la frecuencia de 24 genes que codifican para diferentes factores de virulencia en las cepas de *E. coli* (Tabla 12). El gen identificado con mayor frecuencia fue *fyuA* con un 94.5% (n=189), seguido por los genes *feoB* con un 91.5% (n=183), *traT* con un 81% (n=162), *kpsMTII* con un 75.5% (n=151) y *usp* con un 72.5% (n=145). Mientras que los genes con menor frecuencia fueron *sap* con 6% (n=12), *cva* con un 5.5% (n=11), *astA* con un 3% (n=6), *tsh* con un 2% (n=4) y *vat* con el 1% (n=2) (Ver figuras de PCR 7-23, en el anexo 1). El gen *sen* no se encontró en ninguna de las cepas.

5.5 Expresión de los marcadores de virulencia en las cepas CVPEC

Se analizó la expresión de 23 genes de virulencia en las cepas de *E. coli*, de los cuales 16 fueron expresados de manera global después de la infección del cultivo de la línea celular A431 (Tabla 12). Los genes expresados con mayor frecuencia fueron *fyuA* (Figura 6) con el 94.5% (n=189), *feoB* con el 91% (n=182), *traT* con el 80% (n=160), *usp* con el 72.5% (n=145) y *kpsMTII* con el 72.5% (n=145) (Ver figuras 24-40 de PCR en tiempo real en el anexo 2). Los genes *hlyA*, *vat*, *cva*, *set1*, *iuc*, *malX* y *sap* no fueron expresados por ninguna de las cepas.

Tabla 12. Porcentajes de detección y expresión de los marcadores de virulencia en las cepas CVPEC (n=200).

Gen	Porcentaje de detección		Porcentaje de expresión	
	No.	%	No.	%
Adhesinas				
<i>tsh</i>	4	2	2	1
Toxinas				
<i>cnf1</i>	67	33.5	67	33.5
<i>hlyA</i>	46	23	0	0
<i>usp</i>	145	72.5	145	72.5
<i>vat</i>	2	1	0	0
<i>cva</i>	11	5.5	0	0
<i>set1</i>	23	11.5	0	0
<i>astA</i>	6	3	4	2
Sistemas de adquisición de hierro (nutrición)				
<i>iuc</i>	55	27.5	0	0
<i>iutA</i>	132	66	132	66
<i>iroN</i>	118	59	65	32.5
<i>irp2</i>	121	60.5	117	58.5
<i>fyuA</i>	189	94.5	189	94.5
<i>ireA</i>	20	10	11	5.5
<i>feoB</i>	183	91.5	182	91
Sistemas para evadir la respuesta inmune del hospedero (Protectinas)				
<i>kpsMTII</i>	151	75.5	145	72.5
<i>ompT</i>	57	28.5	48	24
<i>iss</i>	15	7.5	8	4
<i>traT</i>	162	81	160	80
Islas de patogenicidad (PAIs)				
<i>malX</i> (IV ₅₃₆ , II _{CTF073})	85	42.5	0	0
<i>sigA</i> (<i>she</i>)	43	21.5	6	3
<i>pic</i> (<i>she</i>)	32	16	8	4
<i>sap</i> (<i>she</i>)	12	6	0	0

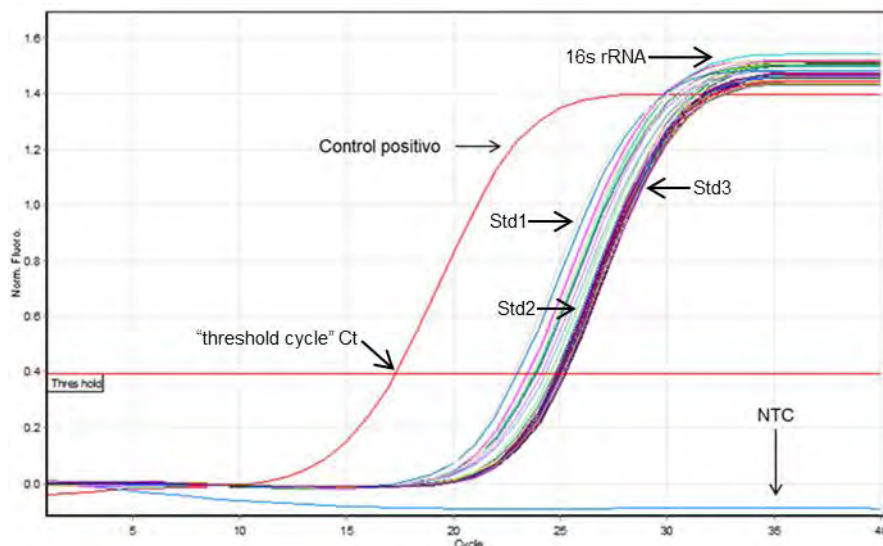


Figura 6. Expresión del gen *fyuA* (gen expresado con mayor frecuencia en las cepas CVPEC). La lectura se realizó en el canal verde. Control positivo: cepa de *E. coli* portadora del gen *fyuA*. Se realizó una curva de calibración a tres concentraciones: DNA a 1000 ng/ μ L, 500 ng/ μ L y 250 ng/ μ L de *E. coli* portadora de este gen. Gen constitutivo: 16s rRNA. NTC: control negativo (sin DNA molde).

5.6 Patrones de expresión de los genes de virulencia en las cepas CVPEC

Se identificaron 31 diferentes patrones de expresión de los marcadores de virulencia, dentro de los cuales el patrón no. 1 está conformado por los genes *fyuA/feoB/traT/kpsMTII/usp/iutA/irp2* y se encontró en 63 cepas (31.5%), seguido por el patrón no. 2 (*fyuA/feoB/traT/kpsMTII/usp*) con 32 cepas (16%), también se encontró que 8 cepas (4%) expresaron dos genes y 2 cepas (1%) expresaron sólo un gen (Tabla 13).

5.7 Detección de serogrupos O en las cepas CVPEC

En este estudio se encontró que el 79.5% (n=159) de las cepas CVPEC (n=200) se distribuyeron en 10 de los 14 serogrupos estudiados. El serogrupo detectado con mayor frecuencia fue O25 con un 49.5% (n=99). En el 20.5% de las cepas restantes (n=41) no se logró determinar el serogrupo (Tabla 14) (Ver figuras de PCR 41-45, en el anexo 3).

Tabla 13. Patrones de expresión de los marcadores de virulencia de las cepas CVPEC (n=200).

No.	Patrones de expresión	No. de cepas (%)
1	<i>fyuA/feoB/traT/kpsMTII/usp/iutA/irp2</i>	63 (31.5)
2	<i>fyuA/feoB/traT/kpsMTII/usp</i>	32 (16)
3	<i>fyuA/feoB/traT/kpsMTII</i>	13 (6.5)
4	<i>fyuA/feoB/iutA/irp2</i>	13 (6.5)
5	<i>fyuA/feoB/iutA/irp2/usp/cnf1</i>	7 (3.5)
6	<i>cnf1/usp/iroN</i>	7 (3.5)
7	<i>cnf1/usp/traT/iutA</i>	6 (3)
8	<i>ompT/traT/fyuA</i>	5 (2.5)
9	<i>traT/feoB/fyuA</i>	5 (2.5)
10	<i>iroN/kpsMTII/feoB</i>	4 (2)
11	<i>sigA/traT/feoB/fyuA</i>	3 (1.5)
12	<i>kpsMTII/feoB/fyuA</i>	3 (1.5)
13	<i>kpsMTII/irp2/feoB/fyuA/usp</i>	3 (1.5)
14	<i>kpsMTII/feoB/fyuA/iutA/usp</i>	3 (1.5)
15	<i>traT/feoB/fyuA/iutA</i>	3 (1.5)
16	<i>KpsMTII/iutA/cnf1/usp</i>	2 (1)
17	<i>traT/irp2/feoB/fyuA</i>	2 (1)
18	<i>feoB/fyuA/usp</i>	2 (1)
19	<i>traT/feoB/fyuA/iutA/usp</i>	2 (1)
20-31	Patrones únicos	12 (6)
	2 genes	8 (4)
	1 gen	2 (1)
Total		200 (100)

Patrones únicos: Patrón encontrado únicamente en una cepa CVPEC; **2 genes:** cepas que únicamente expresaron dos marcadores de virulencia; **1 gen:** cepas que únicamente expresaron un marcador de virulencia.

Tabla 14. Serogrupos O identificados en las cepas CVPEC (n=200).

No.	Serogrupo	No. de cepas (%)
1	O25	99 (49.5)
2	O75	18 (9)
3	O15	15 (7.5)
4	O16	7 (3.5)
5	O8	5 (2.5)
6	O6	5 (2.5)
7	O1	3 (1.5)
8	O21	3 (1.5)
9	O18	3 (1.5)
10	O4	1 (0.5)
11	O83	0 (0)
12	O7	0 (0)
13	O22	0 (0)
14	O2	0 (0)

5.8 Asociación entre patrones de expresión y serogrupos O en las cepas CVPEC

En este estudio se demostró que 25 de los 31 patrones de expresión identificados en las cepas CVPEC estuvieron relacionados con al menos uno de los serogrupos O identificados (Tabla 15). El patrón No.1 (*fyuA/feoB/traT/kpsMTII/usp/iutA/irp2*) identificado en 63 cepas se encontró asociado a los serogrupos O25 (n=45), O15 (n=3), O75 (n=3), O1 (n=2), O16 (n=2), O18 (n=2) y O8 (n=1), mientras que el patrón No. 2 (*fyuA/feoB/traT/kpsMTII/usp*) identificado en 32 cepas se encontró asociado a los serogrupos O25 (n=17), O75 (n=4), O16 (n=2), O4 (n=1), O6 (n=1) y O15 (n=1).

Tabla 15. Asociación entre patrones de expresión y serogrupos O (n=200).

No.	Patrones de expresión	No. de cepas (%)	Serogrupos	No. de cepas (%)
1	<i>fyuA/feoB/traT/kpsMTII/usp/iutA/irp2</i>	63 (31.5)	O25 O15 O75 O1 O16 O18 O8 NO ID	45 (22.5) 3 (1.5) 3 (1.5) 2 (1) 2 (1) 2 (1) 1 (0.5) 5 (2.5)
2	<i>fyuA/feoB/traT/kpsMTII/usp</i>	32 (16)	O25 O75 O16 O4 O6 O15 NO ID	17 (8.5) 4 (2) 2 (1) 1 (0.5) 1 (0.5) 1 (0.5) 6 (3)
3	<i>fyuA/feoB/traT/kpsMTII</i>	13 (6.5)	O25 O75 O6 O15 NO ID	6 (3) 1 (0.5) 1 (0.5) 1 (0.5) 4 (2)
4	<i>fyuA/feoB/iutA/irp2</i>	13 (6.5)	O25 O75 O1 NO ID	6 (3) 4 (2) 1 (0.5) 2 (1)
5	<i>fyuA/feoB/iutA/irp2/usp/cnf1</i>	7 (3.5)	O25 O15	6 (3) 1 (0.5)
6	<i>cnf1/usp/iroN</i>	7 (3.5)	O25 O6 O8 O16 NO ID	2 (1) 2 (1) 1 (0.5) 1 (0.5) 1 (0.5)
7	<i>cnf1/usp/traT/iutA</i>	6 (3)	O25 NO ID	4 (2) 2 (1)
8	<i>OmpT/traT/fyuA</i>	5 (2.5)	O15 O8 NO ID	3 (1.5) 1 (0.5) 1 (0.5)
9	<i>traT/feoB/fyuA</i>	5 (2.5)	O15 O75 NO ID	1 (0.5) 1 (0.5) 3 (1.5)
10	<i>iroN/kpsMTII/feoB</i>	4 (2)	O15 O6 NO ID	2 (1) 1 (0.5) 1 (0.5)
11	<i>sigA/traT/feoB/fyuA</i>	3 (1.5)	O25	3 (1.5)
12	<i>kpsMTII/feoB/fyuA</i>	3 (1.5)	O8 O16 NO ID	1 (0.5) 1 (0.5) 1 (0.5)
13	<i>kpsMTII/irp2/feoB/fyuA/usp</i>	3 (1.5)	O25 O75	2 (1) 1 (0.5)
14	<i>kpsMTII/feoB/fyuA/iutA/usp</i>	3 (1.5)	O75 O25	2 (1) 1 (0.5)
15	<i>traT/feoB/fyuA/iutA</i>	3 (1.5)	O18 NO ID	1 (0.5) 2 (1)
16	<i>kpsMTII/iutA/cnf1/usp</i>	2 (1)	O25 O75	1 (0.5) 1 (0.5)
17	<i>traT/irp2/feoB/fyuA</i>	2 (1)	O15 O16	1 (0.5) 1 (0.5)
18	<i>feoB/fyuA/usp</i>	2 (1)	O25 NO ID	1 (0.5) 1 (0.5)
19	<i>traT/feoB/fyuA/iutA/usp</i>	2 (1)	O15 O25	1 (0.5) 1 (0.5)
20-31	Patrones únicos	12 (6)	O25 O21 O75 NO ID	3 (1.5) 2 (1) 1 (0.5) 6 (3)
	2 genes	8 (4)	O25 O8 O15 O21 NO ID	2 (1) 1 (0.5) 1 (0.5) 1 (0.5) 3 (1.5)
	1 gen	2 (1)	NO ID	2 (1)
Total		200 (100)		200 (100)

NO ID: No identificado.

5.9 Análisis estadístico

La correlación entre los distintos patrones de expresión de los genes de virulencia con los diferentes serogrupos O en las cepas CVPEC fue estadísticamente significativa únicamente para el patrón no. 1 (*fyuA/feoB/traT/kpsMTII/usp/iutA/irp2*) en combinación con el serogrupo O25 ($p < 0.05$) (Tabla 16).

Tabla 16. Correlación estadísticamente significativa entre patrones de expresión y serogrupos O.

No.	Correlación entre patrón de expresión y serogrupo O	Valor <i>p</i>
1.	Patrón no. 1 (<i>fyuA/feoB/traT/kpsMTII/usp/iutA/irp2</i>)/serogrupo O25	$p < 0.001$

6. DISCUSIÓN

6.1 Infecciones cérvico-vaginales

Las infecciones cérvico-vaginales (CVIs) se encuentran entre los padecimientos más comunes que afectan a las mujeres (Koumans *et al.*, 2007), siendo *Escherichia coli* uno de los principales patógenos responsables de este tipo de infecciones (Hoffman *et al.*, 2014; Koumans *et al.*, 2007; Padilla *et al.*, 2014; Sáenz-López *et al.*, 2016), por lo cual nosotros seleccionamos cepas de *E. coli* (n=200) de mujeres con signos y síntomas de infección cérvico-vaginal. Estudios previos han mostrado que la colonización vaginal persistente por *E. coli* ha sido asociada con el desarrollo de infecciones urinarias recurrentes en mujeres, siendo de esta manera el primer paso en la patogénesis de la cistitis aguda (Kunin *et al.*, 1980).

La mayoría de las cepas de *E. coli* fueron aisladas de mujeres entre 20 a 39 (30.5%) y 40 a 59 (40.5%) años de edad (Figura 4). Estos porcentajes coinciden con lo descrito por Allsworth *et al.*, (2008), quienes mencionaron que las CVIs afectan principalmente a las mujeres en edad reproductiva, mientras que en mujeres menopáusicas y postmenopáusicas el porcentaje varía entre 23 a 38% (González-Pedraza *et al.*, 2007; Hoffman *et al.*, 2014).

6.2 Detección y expresión de los genes de virulencia de las cepas CVPEC

La distribución de los marcadores de virulencia en cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con infecciones del tracto urinario (UTIs) de diferentes partes del mundo (Momtaz *et al.*, 2013; Munkhdelger *et al.*, 2017; Salehzadeh & Zamani, 2017; Zhao *et al.*, 2009), incluyendo México (Miranda-Estrada *et al.*, 2016; Morales-Espinosa *et al.*, 2016; Paniagua-Contreras *et al.*, 2015) ha sido ampliamente estudiada, sin embargo, actualmente existe muy poca información sobre la caracterización molecular de las cepas de *E. coli* patógenas cérvico-vaginales (Hilbert *et al.*, 2008; Obata-Yasuoka *et al.*, 2002; Rashki, 2014).

La participación colectiva de varios de los marcadores de virulencia de *E. coli* durante la patogénesis de las infecciones urogenitales podría ser un factor importante para la agudeza o cronicidad de las infecciones, por lo que es muy importante estudiar los diferentes patrones de expresión de los genes de virulencia de *E. coli in vivo* o *in vitro*. Hasta el momento sólo existe un estudio global de expresión de los marcadores de virulencia de cepas UPEC empleando un modelo *in vitro* de infección (Paniagua *et al.*, 2017). El propósito de este estudio fue determinar la expresión de múltiples factores de virulencia de cepas de *Escherichia coli* patógenas cervico-vaginales utilizando un modelo *in vitro* de infección en células epiteliales vaginales humanas y su relación con los distintos serogrupos O.

6.2.1 Adhesinas

Las adhesinas son consideradas el factor más importante de patogenicidad para *E. coli*, ya que desencadenan las vías de señalización entre la bacteria y las células del hospedero y además, promueven la colonización e invasión a los tejidos (Mulvey *et al.*, 2002).

En este estudio el gen *tsh* (hemaglutinina sensible a temperatura) se detectó en el 2% (n=4) de las cepas CVPEC analizadas (Tabla 12, figura 22). Este porcentaje es similar al descrito por Ewers *et al.*, (2007), donde el gen *tsh* fue identificado en el 4.5% (n=3/66) de las cepas UPEC aisladas de pacientes de diferentes instituciones de salud en Alemania. Sin embargo, es inferior al descrito por Rodriguez-Siek *et al.*, (2005), quienes reportaron una prevalencia mayor, del 39.5% (n=79/200) en cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con infecciones urinarias en Dakota del Norte, Estados Unidos, y también al 63% (n=87/138) detectado en cepas UPEC (Heimer *et al.*, 2004). Por último, Momtaz *et al.*, (2013), reportaron la ausencia del gen *tsh* (n=0/123) en cepas UPEC aisladas de pacientes con infecciones del tracto urinario de un hospital de Teherán, Irán.

Después de la infección de la línea celular vaginal A431 con las cepas CVPEC, se determinó que la adhesina Tsh se expresó en el 1% (n=2) de las cepas (Tabla 12,

figura 25). La expresión del gen *tsh* fue demostrada *in vivo* en un modelo de infección urinaria en ratón utilizando la cepa de *E. coli* CTF073 (Heimer *et al.*, 2004), lo que sugiere que esta proteína de adhesión puede tener un papel importante durante el desarrollo de las infecciones genitourinarias. Además, se demostró que en cepas de *E. coli* aviar, la proteína codificada por el gen *tsh* fue capaz de modificar una proteína de superficie de los eritrocitos del hospedero a la que la bacteria puede adherirse, también presenta actividad proteolítica y media la hemaglutinación (Provence & Curtiss, 1994).

6.2.2 Toxinas

Durante las infecciones genitourinarias las cepas de *E. coli* tienen la capacidad de sintetizar diferentes toxinas. Estas toxinas facilitan la diseminación bacteriana, provocan daño tisular extenso y permiten la internalización bacteriana en las células epiteliales. De esta manera las toxinas facilitan la liberación de nutrientes que la bacteria utiliza para realizar diferentes actividades metabólicas y mediante la internalización bacteriana evadir la respuesta inmune del hospedero (Lüthje & Brauner, 2014).

Los genes *cnf1* (factor necrotizante citotóxico 1) y *hlyA* (hemolisina α) fueron identificados en el 33.5% (n=67) y 23% (n=46) de las cepas CVPEC analizadas, respectivamente (Tabla 12, figuras 7 y 8). Estos porcentajes son muy interesantes debido a que difieren con lo reportado en diversos estudios, donde mencionan que las cepas UPEC positivas para el gen *cnf1* son hemolíticas, es decir, se ha reportado que el gen *cnf1* generalmente está vinculado al gen *hlyA* en cepas de *E. coli* uropatógenas (Blanco *et al.*, 1992; Landraud *et al.*, 2003; Landraud *et al.*, 2000). En México, y en sustento a los datos obtenidos en este trabajo, se ha descrito una frecuencia del 79% (n=38) y 58% (n=28) para los genes *cnf1* y *hlyA*, respectivamente, en un grupo de 48 cepas UPEC obtenidas de pacientes con cistitis y prostatitis (Morales-Espinosa *et al.*, 2016). Estos hallazgos permiten suponer que la distribución geográfica puede ser un factor determinante que condiciona la prevalencia de los diferentes factores de virulencia en cepas de *E. coli* genitourinarias, por lo que es necesario realizar estudios filogenéticos para

determinar si existen diferencias filogenéticas entre las cepas de *E. coli* uropatógenas y cérvico-vaginales mexicanas con respecto a las cepas de otros países. Por otro lado, el porcentaje para el gen *hlyA* detectado en este estudio en las cepas CVPEC coincide con el 22% descrito por Obata *et al.*, (2002) en un grupo de cepas de *E. coli* vaginales (n=88) en Japón. Sin embargo, la frecuencia del gen *cnf1* detectada en este estudio es superior al 19% reportado por estos autores. La presencia de los genes *cnf1* y *hlyA* identificados en las cepas CVPEC podrían ser importantes marcadores de virulencia que participan en el desarrollo de la patogénesis de las infecciones vaginales.

Posteriormente, tras la infección de la línea celular vaginal A431 con las cepas CVPEC, la toxina Cnf1 se expresó en el 33.5% (n=67) de las cepas; sin embargo. La toxina HlyA no se expresó en ninguna (n=0) de las cepas (Tabla 12, figura 26). La expresión de *cnf1* durante el modelo *in vitro* de infección probablemente indicaría que este marcador de virulencia es necesario para la colonización e invasión de las células epiteliales vaginales, Estos resultados corroboran lo propuesto por Hertting *et al.*, (2008), en un estudio realizado en Suecia, en donde estudiaron *in vitro* el papel de la toxina Cnf1 en células uroepiteliales, así como en cepas aisladas de niños y adultos con infecciones urinarias esporádicas y recurrentes ocasionadas por *E. coli*. Los resultados de estos autores sugieren que *cnf1* puede promover la unión bacteriana, la invasión y puede inducir una respuesta inflamatoria en células epiteliales del tracto urinario *in vitro*, pero su función *in vivo* es posiblemente menor en comparación con otros factores de virulencia de *E. coli* uropatógena. Por otro lado el hecho de que *hlyA* no se haya expresado en ninguna de las cepas después de la infección *in vitro* de la línea A431 puede deberse a que la actividad de la proteína HlyA es principalmente contra eritrocitos, coincidiendo con lo descrito por Island *et al.*, (1998) en Estados Unidos, en un estudio de infección con *E. coli in vitro* en monocapas de células T24 de la vejiga humana. Estos autores sugieren que la toxina HlyA es una proteína formadora de poros que presenta actividad lítica en eritrocitos y varios tipos de células nucleadas, incrementando de esta manera la agudeza de las infecciones genitourinarias.

La prevalencia para el gen *usp* (proteína específica uropatógena) obtenida en las cepas CVPEC fue del 72.5% (n=145) (Tabla 12, figura 9). Este porcentaje es semejante a lo descrito por Hilbert *et al.*, (2008), donde reportaron una frecuencia del 72% (n=36) para *usp* en un grupo de 50 cepas CVPEC aisladas de pacientes de un hospital de New Jersey, Estados Unidos. En México, para cepas uropatógenas de *E. coli* se ha reportado una prevalencia del 81% (n=39) en un grupo de 48 cepas UPEC obtenidas de pacientes con cistitis y prostatitis (Morales-Espinosa *et al.*, 2016), el cual también es parecido al obtenido en este trabajo.

Una vez realizada la infección de la línea celular vaginal A431, la toxina Usp se expresó en el 72.5% (n=145) de las cepas CVPEC (Tabla 12, figura 27). La actividad de la proteína Usp codificada por *usp* fue estudiada por Nipic *et al.*, (2013), quienes realizaron un estudio en el cual aislaron la proteína Usp y examinaron su actividad contra DNA plasmídico, células endoteliales de vena umbilical humana y células de riñón embrionario humano. Estos autores demostraron que la expresión de *usp* en cepas de *E. coli* permite que la bacteria pueda hidrolizar DNA (presenta actividad de DNasa), exhibe actividad genotóxica en células de mamífero, afecta la viabilidad de las células de mamíferos, induce una mayor actividad de caspasas y perturba la estructura del citoesqueleto celular. Además de su actividad como genotoxina, se ha encontrado que la proteína uropatógena específica (Usp) promueve la infectividad en un modelo murino de infección en el tracto urinario superior (Yamamoto *et al.*, 2001) y está asociada con cepas de *E. coli* que provocan pielonefritis, prostatitis y bacteremia (Rijavec *et al.*, 2008). La expresión elevada del gen *usp* en cepas CVPEC abre el debate en cuanto a la especificidad de esta proteína en cepas UPEC y la estrecha relación filogenética que muy posiblemente compartan estos patotipos.

La frecuencia para el gen *vat* (toxina vacuolante autotransportadora) en las cepas CVPEC estudiadas fue muy baja, tan solo del 1% (n=2) (Tabla 12, figura 22). Este porcentaje es muy inferior al descrito en otros estudios alrededor del mundo en cepas UPEC, que fueron del 5.7% (n=11/194) para cepas mexicanas (Paniagua-Contreras *et al.*, 2015), 9.7% (n=12/123) para cepas iraníes (Momtaz *et al.*, 2013)

y 54.5% (n=35/66) para cepas alemanas (Ewers *et al.*, 2007). Una vez que se realizó la infección de la línea celular vaginal A431, la toxina Vat no se expresó en ninguna (n=0) de las cepas CVPEC (Tabla 12). Hasta el momento no existen reportes de la importancia de esta toxina en modelos *in vitro* o *in vivo* de infecciones por cepas UPEC o CVPEC, aunque resultados experimentales no descartan la posibilidad de que esta toxina contribuya a los diferentes pasos iniciales durante la colonización bacteriana por *E. coli* debido a su capacidad para inducir vacuolación e hinchazón en células del hospedero que posteriormente podrían conducir a UTIs y septicemias (Parham *et al.*, 2005; Restieri *et al.*, 2007).

El gen *cva* (colicina A) se encontró en el 5.5% (n=11) de las cepas CVPEC estudiadas (Tabla 12, figura 10). Este resultado es semejante al descrito por Hilbert *et al.*, (2008), quienes reportaron una frecuencia del 4% (n=2) para *cva* en un grupo de 50 cepas CVPEC aisladas de pacientes de un hospital en Estados Unidos y es superior al descrito en México en cepas de *E. coli* aisladas de mujeres diagnosticadas con UTIs, donde se reportó una prevalencia de 2.8% (n=3/108) (López-Banda *et al.*, 2014). Porcentajes superiores para *cva* han sido reportados también por otros autores en diferentes regiones del mundo: 15% (n=11/75) en cepas de pacientes con urosepsis en Seattle, Estados Unidos (Johnson & Stell, 2010), 10% (n=4/39) en cepas de pacientes con infecciones en las vías urinarias en Beijín, China (Luo *et al.*, 2012) y 20% (n=11/53) en cepas UPEC de pacientes con UTIs en Campinas, Brasil (Maluta *et al.*, 2014).

Tras la infección de la línea celular vaginal A431, la toxina Cva no se expresó en ninguna de las cepas CVPEC (n=0) (Tabla 12). Las colicinas se caracterizan por poseer la capacidad de formar poros que permiten permeabilizar la membrana citoplasmática, se ha demostrado que pueden formar canales iónicos regulados por voltaje bien definidos en membranas artificiales (Pattus *et al.*, 1990). La proteína una vez que es liberada en el ambiente del hospedero ayuda a reducir la competencia por nutrientes con otras cepas bacterianas, es decir, presenta un efecto bactericida (Feldgarden & Riley, 1999). Debido a que estos genes son altamente regulados por *E. coli* y, al poseer en el cultivo de la línea celular vaginal

un ambiente altamente regulado en el que crecieron únicamente las bacterias cérvico-vaginales inoculadas, muy probablemente estas cepas no tuvieron que realizar el gasto energético que implica la síntesis de las colicinas para la eliminación de otras especies bacterianas que compitieran por el nicho y los nutrientes.

Los porcentajes de los genes que codifican para enterotoxinas en las cepas CVPEC fueron: para *set1* (Enterotoxina 1 de *Shigella*) el 11.5% (n=23), para *astA* (toxina enteroagregativa termoestable) el 3% (n=46), mientras que *sen* (enterotoxina 2 de *Shigella*) no se detectó (n=0) en ninguna de las cepas (Tabla 12, figuras 11 y 22). Estos porcentajes contrastan con el estudio realizado por Momtaz *et al.*, (2013), donde determinaron la frecuencia de estos mismos tres genes de enterotoxinas en un grupo de cepas UPEC obtenidas de pacientes iraníes. Estos autores describieron un porcentaje mayor para el gen *set1* (79.6%) (n=98/123) y para el gen *astA* (21.1%) (n=26/123), mientras que el gen *sen*, al igual que en este trabajo, no se detectó en ninguna de las cepas estudiadas (n=0/123).

La presencia de estos genes en cepas urogenitales, los cuales se creía que estaban altamente restringidos a cepas patógenas intestinales, probablemente se deba al intercambio de material genético entre diferentes patotipos bacterianos e inclusive de manera interespecífica. La transferencia horizontal de material genético y los elementos genéticos móviles como los transposones han favorecido la adquisición de estos genes, propiciando la evolución de diferentes patógenos bacterianos (Hacker *et al.*, 1997).

Después de la infección de la línea celular vaginal A431, la enterotoxina AstA se expresó en el 2% (n=4) de las cepas CVPEC. Sin embargo la enterotoxina Set1 no se expresó en ninguna de estas cepas (Tabla 12, figura 28). Experimentalmente se ha demostrado que la toxina codificada por *set1* induce la acumulación de líquido en el asa ileal del conejo y puede promover diarrea acuosa inicial que ocurre en las primeras etapas de las infecciones por *S. flexneri* (Fasano *et al.*, 1995). Por otra parte la toxina codificada por el gen *astA* desempeña un papel en

la patogenicidad enteroagregativa de *E. coli* reduciendo la absorción de agua y electrolitos del intestino a las vellosidades, propiciando un desequilibrio osmótico (Savarino *et al.*, 1996), la toxina codificada por el gen *sen* aumenta la conductancia transepitelial en un modelo *in vitro*, aunque se desconoce la relevancia de la toxina en la enfermedad clínica (Nataro *et al.*, 1995). Hasta el momento se desconoce la manera en la que estas enterotoxinas participan durante las infecciones cérvico-vaginales y del tracto urinario.

6.2.3 Sistemas para la adquisición de hierro (nutrición)

El hierro es un elemento esencial para la supervivencia de las bacterias y facilita numerosas actividades celulares en el organismo, incluida la reducción del peróxido, el transporte de electrones y la biosíntesis de nucleótidos (Braun, 2001). Las bacterias han desarrollado múltiples estrategias para la adquisición de hierro durante la infección, como la expresión de receptores de membrana y sideróforos que permiten capturar el hierro del medio ambiente y posteriormente internalizarlo en el citosol bacteriano (Zipfel *et al.*, 2007).

En este estudio, se encontró que los genes que codifican para los sideróforos *iuc* (aerobactina) e *irp2* (proteína capturadora de hierro 2) se detectaron en el 27.5% (n=55) y 60.5% (n=121) de las cepas CVPEC analizadas, respectivamente (Tabla 12, figuras 12 y 22). Porcentajes similares fueron reportados para el gen *iuc* (35%) en un grupo de cepas vaginales de *E. coli* (n=88) en Japón (Obata-Yasuoka *et al.*, 2002) y para *irp2* (63.3%) en cepas cérvico-vaginales de *E. coli* (n=132) en Irán (Rashki, 2014). Mientras que en México en cepas UPEC se ha encontrado porcentajes del 70.8% (n=34/48) para *iuc* (Morales-Espinosa *et al.*, 2016) y del 79.3% (n=154/194) para *irp2* (Paniagua-Contreras *et al.*, 2015).

Los genes *iutA* (receptor férrico de aerobactina), *iroN* (receptor de salmoquelina), *fyuA* (receptor férrico de captación de yersiniabactina), *ireA* (elemento de respuesta al hierro) y *feoB* (proteína para la captación de hierro férrico B) que codifican para proteínas de membrana externa receptoras de sideróforos fueron detectados en este trabajo en el 66% (n=132), 59% (n=118), 94.5% (n=189), 10%

(n=20) y 91.5% (n=183) de las cepas CVPEC analizadas, respectivamente (Tabla 12, figuras 13-17). El porcentaje de detección del gen *iutA* en las cepas CVPEC es parecido al 54.2% (n=58) descrito por Miranda-Estrada *et al.*, (2016) en cepas UPEC (n=107) en México, mientras que para el gen *iroN* se ha descrito un porcentaje del 50.4% (n=256) en cepas UPEC (n=508) de Estados Unidos (Bauer *et al.*, 2008). Para el gen *fyuA* se ha reportado una prevalencia del 84% (n=42) en un grupo de 50 cepas cérvico-vaginales de Estados Unidos, (Hilbert *et al.*, 2008), mientras que Lee *et al.*, (2015) en Corea del Sur y Rodriguez-Siek *et al.*, (2005) en Estados Unidos, reportaron prevalencias para el gen *feoB* en cepas UPEC del 98.2% (n=57/58) y del 99% (n=198/200), respectivamente. También han sido descritos porcentajes menores para estos genes en cepas de *E. coli* en otros estudios, en donde el gen *iutA* ha sido identificado en el 48.1% (n=52) en cepas UPEC mexicanas (López-Banda *et al.*, 2014), el gen *iroN* en el 31% (n=41) en cepas UPEC iraníes (Rashki, 2014), el gen *fyuA* en el 52% (n=52) en cepas UPEC iraníes (Salehzadeh & Zamni, 2017), además Rodriguez-Siek *et al.*, (2005), reportaron una prevalencia superior, del 24% (n=48) para el gen *ireA* en cepas UPEC estadounidenses.

Los resultados encontrados en las cepas CVPEC estudiadas, reflejan que en las cepas de *E. coli* genitourinarias los porcentajes de los diferentes genes que codifican proteínas participes en la captación de hierro son muy frecuentes y heterogéneos. Estos hallazgos posiblemente se deban a la existencia de una alta redundancia de los diferentes sistemas de adquisición (Landgraf *et al.*, 2012), lo que demostraría la capacidad de las cepas para sobrevivir y multiplicarse durante los procesos infecciosos.

Posteriormente, tras la infección de la línea celular vaginal A431 con las cepas CVPEC, se encontró que *fyuA* se expresó en el 94.5% (n=189), *feoB* en el 91% (n=182), *iutA* en el 66% (n=132) e *irp2* en el 58.5% (n=117). Mientras que *iroN* e *ireA* se expresaron en menos de la mitad de las cepas CVPEC, con el 32.5% (n=65) y el 5.5% (n=11) respectivamente (Tabla 12, figuras 29-34).

Estos resultados coinciden con los descritos previamente en un modelo de infección del tracto urinario *in vivo* en ratón, en el que se demostró que los genes de transporte de hierro en la cepa de *E. coli* analizada se regulan positivamente durante la UTI (Snyder *et al.*, 2004). Por otro lado, Zhao *et al.*, (2009) en China, en modelos *in vivo* de infección del tracto urinario murino y de pollo reportaron una regulación positiva en la expresión de los genes *iutA* e *iuc*, demostrando que la adquisición de hierro es importante para que *E. coli* prevalezca en el tracto urinario. También se ha reportado que las cepas UPEC expresan de manera simultánea diferentes genes involucrados en la adquisición de hierro en respuesta a las limitaciones de este metal (Alteri & Mobley, 2007).

El gen *irp2* expresado en más del 50% de las cepas CVPEC presenta características bioquímicas específicas que le confieren el papel de metalóforo universal, capaz de formar complejos estables con varios iones metálicos además del hierro, como cobre y zinc, además se ha reportado como un sideróforo esencial para la patogenicidad en diferentes modelos de infección (Chaturvedi *et al.*, 2012; Koh *et al.*, 2015).

El gen *iuc* no fue expresado por ninguna de las cepas CVPEC, sin embargo se ha observado que muchas cepas patógenas de *Escherichia coli* han adoptado este sistema especial de asimilación de Fe^{+3} en condiciones extremadamente limitantes de hierro durante el proceso infeccioso (De Lorenzo *et al.*, 1986), lo cual posiblemente explique que el gen *iuc* no se haya expresado en el modelo de infección utilizado en este trabajo.

Las cepas de *E. coli* cérvico-vaginales y uropatógenas cuentan con una amplia gama de genes. Esta diversidad genética permite que las bacterias puedan expresar, dependiendo del entorno y la disponibilidad energética, los genes necesarios para el establecimiento de un proceso infeccioso, para evadir la respuesta inmune del hospedero y para contrarrestar la acción de los diferentes antimicrobianos.

6.2.4 Sistemas para evadir la respuesta inmune del hospedero (protectinas)

Las cepas de *E. coli* urogenitales poseen la capacidad de suprimir la respuesta proinflamatoria y evadir el sistema inmune del hospedero mediante la expresión de diferentes marcadores de virulencia. Las estrategias mediante las cuales *E. coli* es capaz de escapar del reconocimiento inmune son muy diversas, algunos factores de virulencia exhiben estas propiedades de tal manera que protegen a las cepas de *E. coli* durante el proceso infeccioso (Lüthje & Brauner, 2014).

El porcentaje para el gen *kpsMTII* (antígeno capsular) encontrado en las cepas CVPEC fue del 75.5% (n=151) (Tabla 12, figura 18). Hilbert *et al.*, (2008) reportaron un porcentaje similar del 74% (n=37) para *kpsMTII* en un grupo de cepas CVPEC (n=50) en Estados Unidos. Sin embargo, en México, para cepas uropatógenas de *E. coli* se reportó un porcentaje más elevado, del 92.2% (n=179) en un grupo de cepas aisladas de pacientes con UTIs (n=194) (Paniagua-Contreras *et al.*, 2015). Alrededor del mundo se ha descrito una elevada prevalencia de los genes involucrados en la síntesis de la cápsula bacteriana en cepas de *E. coli* asociadas a infecciones del tracto urinario (Johnson & Stell, 2000; Munkhdelger *et al.*, 2017; Yun *et al.*, 2014).

Una vez realizada la infección de la línea celular vaginal A431 con las cepas CVPEC, se encontró que la protectina KpsMTII se expresó en el 72.5% (n=145) de las cepas portadoras de este gen (Tabla 12, figura 35). Berry *et al.*, (2009) realizaron un estudio en el cual desarrollaron un modelo *in vitro* para estudiar la proliferación de cepas UPEC en células uroteliales humanas inmortalizadas donde reportaron que el gen *kpsD* se sobreexpresa en este modelo, lo que indica que la UPEC regula diferencialmente los factores de virulencia en el entorno intracelular. En un modelo *in vivo* de ratón de UTI se reportó que algunos de los genes que codifican para la cápsula de una cepa de *E. coli* (*kpsE*, *D*, *C* y *S*) se regulan positivamente durante la infección del tracto urinario (Snyder *et al.*, 2004).

Se ha demostrado que la expresión del gen que codifica para la cápsula le confiere a las cepas de *E. coli* uropatógenas la capacidad de aumentar la

resistencia a la fagocitosis (Burns & Hull, 1999), así como resistir a los efectos bactericidas del suero humano (Buckles *et al.*, 2009) y también puede estar involucrado en la formación de biopelículas (Valle *et al.*, 2006). El elevado porcentaje de expresión del gen capsular *kpsMTII* en las cepas CVPEC probablemente sea un factor importante de patogenicidad durante las CVIs.

Por otro lado, el gen *ompT* (proteasa T de membrana externa) fue identificado en el 28.5% (n=57) de las cepas CVPEC analizadas (Tabla 12, figura 19). Rashki *et al.*, (2014) reportaron una frecuencia superior, del 45.4% (n=60) para este gen en un grupo de cepas CVPEC (n=132) en Irán. Diferentes estudios alrededor del mundo reportan distintos porcentajes del gen *ompT* en cepas UPEC. 83.5% (n=167/200) en cepas estadounidenses (Rodriguez-Siek *et al.*, 2005), 92% (n=60/65) en cepas alemanas (Ewers *et al.*, 2007) y 4.8% (n=6/123) en cepas iraníes (Momtaz *et al.*, 2013).

Una vez que se realizó la infección de la línea celular vaginal A431 con las cepas vaginales de *E. coli* se encontró que la protectina OmpT se expresó en el 24% (n=48) de las cepas portadoras de este gen (Tabla 12, figura 36). La expresión de *ompT* facilita la infección bacteriana al poseer la capacidad de degradar péptidos antimicrobianos durante las interacciones patogénicas de *E. coli* con las células urogenitales (Hui *et al.*, 2010). He *et al.*, (2015) desarrollaron un experimento para determinar el papel de OmpT en la patogénesis de UPEC, se usó una línea celular epitelial de vejiga humana, se estableció un modelo murino de UTI para estudiar la formación de IBCs en el proceso de las UTIs y se examinaron las citoquinas durante la patogénesis. Sus resultados sugieren que la expresión de *ompT* desempeña un papel multifacético en la patogénesis de la UTI, incluido un aumento de la adhesión e invasión bacteriana, la formación de IBCs y la sobre regulación de las citoquinas proinflamatorias. Esto sugiere que esta proteína es muy importante durante las infecciones genitourinarias.

El gen *iss* (proteína que incrementa la supervivencia en suero) se encontró únicamente en el 7.5% (n=15) de las cepas CVPEC analizadas (Tabla 12, figura 22). Resultados similares son reportados por Momtaz *et al.*, (2013) y Luo *et al.*,

(2012) quienes reportaron para cepas UPEC frecuencias del 8.1% (n=10/123) en Irán y 13% (n=5/39) en China, respectivamente. También se han descrito porcentajes superiores para *iss*. 25% (n=16/65) en cepas UPEC alemanas (Ewers *et al.*, 2007) y 30% (n=16/53) en cepas UPEC brasileñas (Maluta *et al.*, 2014). Después de la infección de la línea celular vaginal A431 con las cepas CVPEC la protectina *Iss* se expresó en el 4% (n=8) de las cepas portadoras de este gen (Tabla 12, figura 37). El gen *iss* codifica para una proteína que le confiere a la bacteria la capacidad de resistir al suero, evitar la opsonización y lisis por el sistema del complemento (Agarwal *et al.*, 2012). Binns *et al.*, (1979) reportaron que la expresión del gen *iss* clonado (que está estrechamente relacionado con la producción de colicina V en pColV) aumenta en 100 veces la resistencia sérica y la virulencia de una cepa de *E. coli* sensible al suero.

La frecuencia obtenida para el gen *traT* (proteína de membrana externa) fue del 81% (n=162) en las cepas CVPEC analizadas (Tabla 12, figura 21). Este porcentaje es semejante a lo descrito por Hilbert *et al.*, (2008) donde reportaron una frecuencia del 74% (n=37) para el gen *traT* en un grupo de cepas CVPEC (n=50) en New Jersey, Estados Unidos. En México, para cepas uropatógenas de *E. coli* se reportó una prevalencia del 77.8% (n=84) en un grupo de cepas UPEC (n=108) obtenidas de pacientes con UTIs (López-Banda *et al.*, 2014).

Después de la infección de la línea celular vaginal A431 con las cepas CVPEC, la protectina *TraT* se expresó en el 80% (n=160) de las cepas portadoras de este gen (Tabla 12, figura 38). Agüero *et al.*, (1984) realizaron un estudio donde demostraron experimentalmente que la proteína codificada por el gen *traT* es un inhibidor pasivo de la fagocitosis. La inhibición de la fagocitosis se produce porque la proteína antagoniza la opsonización por el complemento, además de aumentar la resistencia sérica. En cepas de *E. coli* en UTIs se ha reportado que la expresión del gen *traT* se asocia frecuentemente con la producción de la cápsula K1 y con el transporte de plásmidos ColV (Montenegro *et al.*, 1985).

Nuestros hallazgos, en concordancia con otros estudios, reflejan la importancia de la expresión del gen *traT* como determinante significativo de la resistencia sérica en cepas patógenas de *E. coli* uropatógenas y cérvico-vaginales.

6.2.5 Islas de patogenicidad (PAIs)

Las islas de patogenicidad son elementos genéticos distintivos en los cromosomas de un gran número de patógenos bacterianos, codifican diversos factores de virulencia y normalmente están ausentes en cepas no patógenas de la misma especie. Las PAIs se consideran una subclase de islas genómicas que se adquieren mediante la transferencia horizontal de material genético (Gal-Mor & Finlay, 2006).

En este estudio el gen *malX* (componente específico de la maltosa) se detectó en el 42.5% (n=85) de las cepas CVPEC analizadas (Tabla 12, figura 21). Este porcentaje es similar a lo descrito por Zhao *et al.*, (2009) en China, donde el gen *malX* fue identificado en el 46% (n=93/202) de cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con UTIs. Por otro lado, el porcentaje para *malX* detectado en las cepas vaginales de *E. coli* es superior al 23.3% (n=40/172) de las cepas UPEC aisladas de pacientes con cistitis de un hospital de la India (Agarwal *et al.*, 2013). También al 16.5% (n=14/85) en cepas UPEC aisladas de pacientes de un hospital de Irán (Derakhshandeh *et al.*, 2015). El gen *malX* codifica para una enzima que reconoce la maltosa y la glucosa (Reidl & Boos, 1991), la cual no fue expresada en ninguna (n=0/85) de las cepas portadoras de este gen después de la infección de la línea celular vaginal A431 (Tabla 12). Sin embargo, la detección de este gen es importante debido a que es un marcador específicamente asociado a la presencia de las islas de patogenicidad IV₅₃₆ y II_{CTF073} (Ostblom *et al.*, 2011).

Las islas de patogenicidad, como elementos genéticos distintivos fueron descritas por primera vez en la cepa UPEC₅₃₆ (O6:K15:H31) (Blum *et al.*, 1994), esta cepa fue aislada originalmente de un paciente con pielonefritis severa (Hacker & Hughes, 1985). PAI IV₅₃₆ tiene 30.2 Kb de longitud, representa el elemento central del HPI y codifica los genes de virulencia *irp1* (sideróforo yersiniabactina), *irp2*

(proteína capturadora de hierro 2) y *fyuA* (receptor férrico de captación de yersiniabactina) (Chaturvedi *et al.*, 2012; Dobrindt *et al.*, 2002). Lo anterior, aunado a la elevada prevalencia del gen *malX* nos permite aseverar la elevada prevalencia de la PAI IV₅₃₆ en las cepas CVPEC analizadas en el presente estudio.

La cepa UPEC_{CFT073} se aisló de la sangre y la orina de una mujer con pielonefritis. La PAI II_{CFT073} tiene 71.6 Kb de longitud. La porción secuenciada comprende 89 marcos de lectura abierta (ORFs) y contiene un operón *pap*, el gen que codifica para la fimbria P, genes regulados por hierro, genes que codifican la hemolisina α , el factor necrotizante citotóxico 1 y la hemaglutinina resistente al calor y una gran cantidad de genes desconocidos (Schmidt & Hensel, 2004). La elevada frecuencia del gen *malX* confirma la presencia de esta PAI en las cepas de origen vaginal analizadas. Nuestro resultado confirma que la detección del gen *malX* en las diferentes cepas patógenas de *E. coli* es un determinante para la detección de las PAIs IV₅₃₆ y II_{CFT073}.

Los genes *sigA* (factor sigma A), *pic* (proteína involucrada en la colonización intestinal) y *sap* (péptido sensible a antimicrobianos) que conforman a la PAI *she* fueron detectados en el 21.5% (n=43), 16% (n=32) y 6% (n=12) de las cepas CVPEC analizadas, respectivamente (Tabla 12, figura 23). Momtaz *et al.*, (2013) en Irán, reportaron en cepas UPEC porcentajes similares para los genes *sigA* y *pic*, 21% (n=26/123) y 3% (n=16/123) respectivamente, mientras que para el gen *sap* fue del 26% (n=32/123). Después de la infección del cultivo de la línea celular vaginal A431 con las cepas CVPEC, encontramos que el gen *sigA* que codifica para una proteasa autotransportadora citopática que contribuye a la acumulación de líquido (Al-Hasani *et al.*, 2000) se expresó en el 3% (n=6) de las cepas portadoras de este gen, mientras que el gen *pic* que codifica para una mucinasa con actividad hemaglutinina para la colonización bacteriana (Henderson *et al.*, 1999), se expresó en el 4% (n=8) de las cepas portadoras de este gen. Sin embargo, el gen *sap* que codifica para una proteína sensible a péptidos antimicrobianos no se expresó en ninguna (n=0/12) de las cepas portadoras de este gen (Tabla 12, figuras 39 y 40).

La isla de patogenicidad *she* fue descrita por primera vez en *Shigella flexneri*. Consiste en 46.6 Kb, se localiza río abajo del gen *pheV* tRNA. Además, contiene un gen de integrasa del bacteriófago P4, secuencias relacionadas con plásmidos y los genes *pic*, *sigA*, *sap*, *set1A* y *set1B* (Al-Hasani *et al.*, 2001A).

En este estudio el 26.5% (n=53) de las cepas CVPEC presentó un marcador de la PAI *she*, el 6% (n=12) presentó dos marcadores de esta PAI y únicamente el 1% (n=2) presentó los tres marcadores de la PAI *she* y, por lo tanto, toda la isla de patogenicidad. Paniagua-Contreras *et al.*, (2015) en México y Soto *et al.*, (2009) en España, reportaron la prevalencia de la isla de patogenicidad *she* en 194 y 170 cepas UPEC, respectivamente. Ambos estudios reportan una ínfima prevalencia de la isla de patogenicidad completa. Sin embargo, la variabilidad en la presencia de los diferentes genes de la PAI *she* podría deberse a la alta inestabilidad que muestra esta PAI (Al-Hasani *et al.*, 2001A). Lo que conlleva a la producción de diferentes formas estructurales de *she* (Soto *et al.*, 2009).

Estos hallazgos permiten especular sobre la muy posible transferencia horizontal de material genético para la adquisición de esta y otras PAIs que les confieren a las bacterias una ventaja selectiva al poseer una gran cantidad de genes de virulencia que eventualmente van a ser expresados durante un proceso infeccioso.

6.3 Serogrupos O (lipopolisacárido)

Estudios previos han reportado que los serogrupos O1, 2, 4, 6, 7, 8, 15, 16, 18, 21, 22, 25, 75 y 83 están preferentemente asociados con cepas genitourinarias (Bidet *et al.*, 2007; Hilbert *et al.*, 2008). En este estudio se identificaron diez serogrupos, siendo los serogrupos O25 (49.5%), O75 (9%) y O15 (7.5%) los que se detectaron con mayor frecuencia (Tabla 14). Estos porcentajes coinciden con lo descrito por Rashki (2014) en Irán, quien reporta que los serogrupos O25 (24%) y O15 (19%) fueron los serogrupos más frecuentes identificados en un grupo de 132 cepas CVPEC. Además, en México, se ha reportado que el serogrupo O25 está asociado preferentemente con cepas obtenidas de pacientes con cistitis (Morales-Espinosa

et al., 2016), y ha sido previamente reportado como el serogrupo O más frecuente encontrado en cepas UPEC en la Ciudad de México (Molina-López *et al.*, 2011).

Diferentes serogrupos (O1, O2, O4, O6, O15, O16, O18, O25, O75 y O83) poseen factores de virulencia específicos, lo cual les confiere a las cepas genitourinarias de *E. coli* mayor capacidad de adhesión celular, colonización, evasión de la respuesta inmune y daño a los tejidos del hospedero (Jadhav *et al.*, 2011; Momtaz *et al.*, 2013). En este estudio se encontró que los serogrupos O25, O75 y O15 presentaron mayor frecuencia de toxinas, principalmente la proteína específica uropatógena (*usp*) y el factor necrotizante citotóxico 1 (*cnf1*); protectinas, primordialmente la cápsula (*kpsMTII*); sistemas para la nutrición, en especial la proteína capturadora de hierro 2 (*irp2*), además de los receptores de membrana externa aerobactina (*iutA*) y yersiniabactina (*fyuA*). La frecuencia de los serogrupos O detectados en las cepas vaginales de *E. coli*, también coincide con lo descrito recientemente por otros autores en cepas UPEC (Momtaz *et al.*, 2013; Paniagua *et al.*, 2015). Estos hallazgos nos llevan a reforzar la hipótesis propuesta por Gupta *et al.*, (1998), quienes sugirieron que la colonización de la vagina por cepas de *E. coli* podría ser un factor importante para el surgimiento de infecciones del tracto urinario.

6.4 Patrones de expresión

Recientemente se han descrito algunos patrones de asociación y patrones de expresión de marcadores de virulencia en cepas UPEC (Derakhshandeh *et al.*, 2015; Paniagua-Contreras *et al.*, 2017). Sin embargo, los patrones de expresión en cepas CVPEC hasta este trabajo no habían sido descritos.

En este estudio se encontraron numerosos patrones de expresión (n=31) de los genes de virulencia relacionados a los distintos serogrupos de las cepas CVPEC (Tabla 13), dentro de los cuales la mayoría de las cepas, principalmente las pertenecientes al serogrupo predominante O25, presentaron genes involucrados en la nutrición celular, evasión de la respuesta inmune del hospedero y toxinas. El patrón no. 1 (*fyuA/feoB/traT/KpsMTII/usp/iutA/irp2*) conformado por siete genes de

virulencia, se encontró distribuido en el 31.5% (n=63) de las cepas CVPEC y tuvo una relación estadísticamente significativa ($p < 0.05$) con el serogrupo O25 (Tablas 15 y 16). Las cepas CVPEC pertenecientes al serogrupo O25 fueron las que presentaron mayor número de patrones de expresión. La mayoría de los patrones de expresión presentaron entre tres y cinco genes de virulencia, en donde el patrón no. 1 fue el más grande, con siete genes (Tabla 13). La combinación de genes como *fyuA*, *feoB*, *kpsMTII* y *traT* encontrada en 3 patrones de expresión (n= 108 cepas); *irp2* y *usp* encontrada en otros 3 patrones de expresión (n= 73 cepas) además de *cnf1* y *usp* encontrada de la misma manera en otros 3 patrones de expresión (n= 20 cepas) (Tabla 13). Esto sugiere probablemente que estas cepas tienen la capacidad de provocar infecciones recurrentes, debido a que una gran cantidad de genes asociados a infecciones de vías urinarias se expresaron en las cepas CVPEC estudiadas tal y como lo mencionan diferentes autores para cepas UPEC (Anderson *et al.*, 2010; Ejrnaes *et al.*, 2008; Yun *et al.*, 2014).

Estos hallazgos demuestran que durante la patogénesis de la infección *in vitro* de la línea celular vaginal A431, las cepas CVPEC fueron capaces de expresar simultáneamente diferentes genes necesarios para adherirse a las células epiteliales, internalizarse, multiplicarse y también expresaron los genes involucrados en la evasión de la respuesta inmune del hospedero. Se ha descrito que la expresión individual de los diferentes marcadores de virulencia no es suficiente para que las cepas de *E. coli* ocasionen enfermedad, sino que se requiere la expresión colectiva de estos genes para causar patología en el hospedero (Marrs *et al.*, 2005), por lo que la asociación colectiva de los marcadores de virulencia demuestra la virulencia y la capacidad de las cepas para ocasionar infecciones vaginales crónicas o recurrentes y en consecuencia, infecciones de vías urinarias o mixtas.

Los hallazgos de este trabajo podrían tener aplicación en el diseño y desarrollo de estrategias para el tratamiento contra infecciones cérvico-vaginales ocasionadas por *E. coli* y para estudios epidemiológicos en México.

7. CONCLUSIONES

- Este es el primer trabajo enfocado en determinar en un modelo *in vitro* de infección de células vaginales humanas, la expresión global de diferentes marcadores de virulencia en cepas cérvico-vaginales de *E. coli* pertenecientes a diferentes serogrupos O, lo que permite ampliar el conocimiento en la patogénesis de las infecciones del canal vaginal.
- Durante el proceso infeccioso *in vitro* de células A431 se observó que a las 48 h, las cepas cérvico-vaginales de *Escherichia coli* tienen la capacidad de expresar diferentes toxinas (*cnf1* y *usp*), inclusive toxinas involucradas en procesos diarreogénicos (*astA*), con lo que se demuestra que las cepas de *E. coli* portadoras de toxinas diarreogénicas son capaces de infectar eventualmente el canal cérvico-vaginal.
- La expresión del gen que codifica la proteína específica uropatógena (*usp*) en más de la mitad de las cepas cérvico-vaginales de *E. coli* demostró que este factor de virulencia tiene un papel importante en la patogenicidad durante las infecciones cérvico-vaginales y al mismo tiempo sugiere una estrecha relación filogenética con las cepas de *E. coli* uropatógenas.
- La presencia del gen que codifica el factor necrotizante citotóxico 1 (*cnf1*) en bacterias no hemolíticas demostró que la distribución geográfica puede ser un factor determinante que condiciona la prevalencia de los diferentes factores de virulencia en cepas de *E. coli* genitourinarias, por lo que es necesario la realización de múltiples estudios filogenéticos alrededor del mundo.
- La expresión de los diferentes genes para la nutrición bacteriana (*iuta*, *fyuA*, *feoB*, *irp2*, *iroN* e *ireA*) por las cepas cérvico-vaginales de *E. coli* durante el modelo de infección *in vitro*, demostró la capacidad de las cepas para sobrevivir y multiplicarse en las células epiteliales vaginales. Además

confirmó una alta distribución y redundancia de los diferentes sistemas de adquisición de hierro que le confieren a la bacteria una ventaja selectiva durante el establecimiento de un proceso infeccioso.

- La frecuente expresión de diferentes genes de protectinas (*traT*, *ompT* e *iss*) y en particular el gen capsular (*kpsMTII*) por las cepas cérvico-vaginales de *E. coli* durante el modelo *in vitro* de infección, evidenció la capacidad de las cepas para evadir la respuesta inmune del hospedero, así como la protección contra la acción de los antimicrobianos.
- La elevada frecuencia del gen *malX* en las cepas cérvico-vaginales de *E. coli* analizadas confirmó una elevada presencia de las PAIs IV536 y IICTF073 involucradas en la patogénesis de las infecciones genitourinarias.
- La presencia elevada de los serogrupos O25, O75 y O15 en las cepas cérvico-vaginales de *E. coli* reafirmó que estos grupos son los más frecuentes asociados a las infecciones cérvico-vaginales y a las infecciones del tracto urinario en México. Las cepas sin identificar sugieren un probable incremento de otros serogrupos O asociados a las infecciones cérvico-vaginales.
- Durante el modelo de infección de la línea celular vaginal A431 se observó que las cepas de *E. coli* presentaron diferentes patrones de expresión a las 48 h, principalmente de genes necesarios para la colonización, internalización, nutrición y evasión de la respuesta inmune del hospedero, evidenciando la importante carga genética de factores de virulencia y en consecuencia la notable patogenicidad de las cepas para provocar infecciones vaginales recurrentes.

8. ANEXO 1

8.1 Fotografías de los genes amplificados por PCR convencional

8.1.1 Toxinas

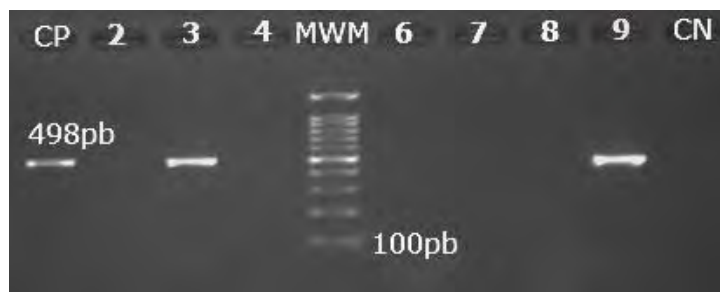


Figura 7. Detección del gen de la citotoxina *cnf1* (498 pb). Carriles 3 y 9: gen *cnf1* en cepas CVPEC; MWM: marcador de peso molecular (100 pb); CP: control positivo (*E. coli* del cepario del laboratorio clínico); CN: control negativo (sin DNA molde).

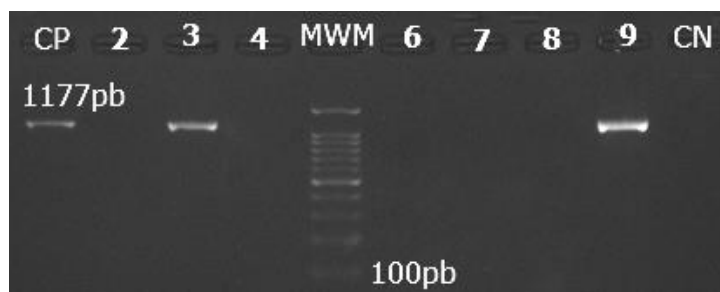


Figura 8. Detección del gen de la citotoxina *hlyA* (1177 pb). Carriles 3 y 9: gen *hlyA* en cepas CVPEC; MWM: marcador de peso molecular (100 pb); CP: control positivo (*E. coli* del cepario del laboratorio clínico); CN: control negativo (sin DNA molde).

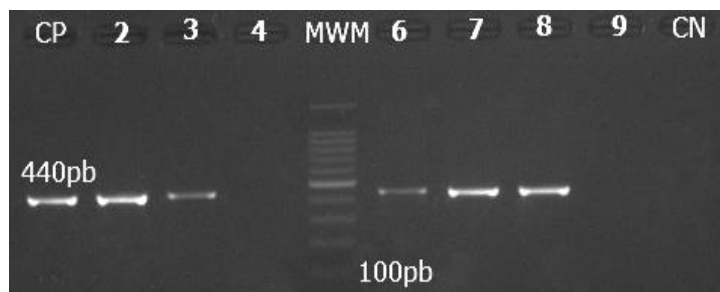


Figura 9. Detección del gen de la citotoxina *usp* (440 pb). Carriles 2, 3 y 6-8: gen *usp* en cepas CVPEC; MWM: marcador de peso molecular (100 pb); CP: control positivo (*E. coli* del cepario del laboratorio clínico); CN: control negativo (sin DNA molde).

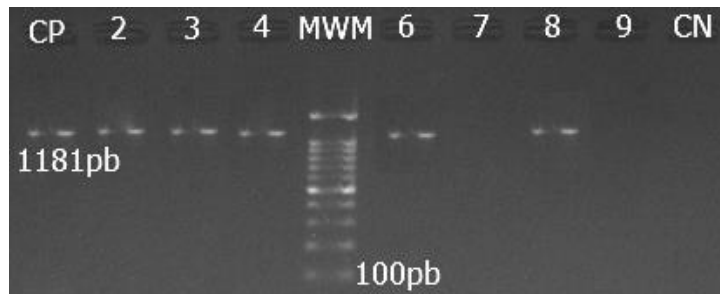


Figura 10. Detección del gen de la citotoxina *cva* (1181 pb). Carriles 2-4, 6 y 8: gen *cva* en cepas CVPEC; MWM: marcador de peso molecular (100 pb); CP: control positivo (*E. coli* del cepario del laboratorio clínico); CN: control negativo (sin DNA molde).

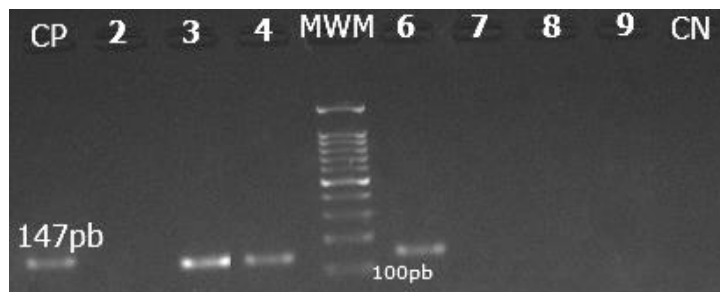


Figura 11. Detección del gen de la enterotoxina *set1* (147 pb). Carriles 3, 4 y 6: gen *set1* en cepas CVPEC; MWM: marcador de peso molecular (100 pb); CP: control positivo (*E. coli* del cepario del laboratorio clínico); CN: control negativo (sin DNA molde).

8.1.2 Sistemas de adquisición de hierro (nutrición)

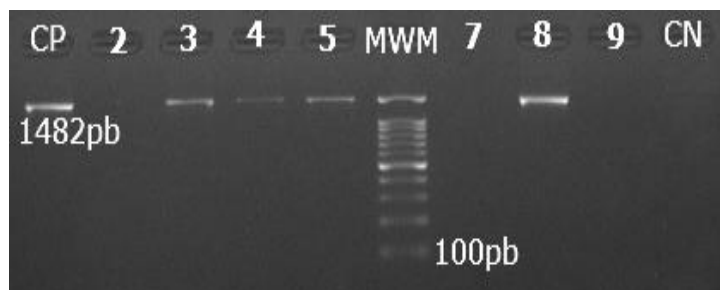


Figura 12. Detección del gen para la adquisición de hierro *iuc* (1482 pb). Carriles 3-5 y 8: gen *iuc* en cepas CVPEC; MWM: marcador de peso molecular (100 pb); CP: control positivo (*E. coli* del cepario del laboratorio clínico); CN: control negativo (sin DNA molde).

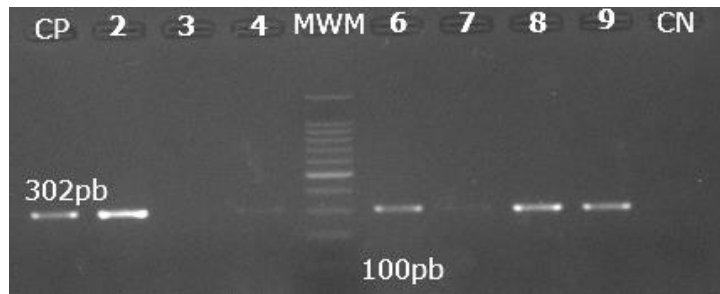


Figura 13. Detección del gen para la adquisición de hierro *iutA* (302 pb). Carriles 2, 4 y 6-9: gen *iutA* en cepas CVPEC; MWM: marcador de peso molecular (100 pb); CP: control positivo (*E. coli* del cepario del laboratorio clínico); CN: control negativo (sin DNA molde).

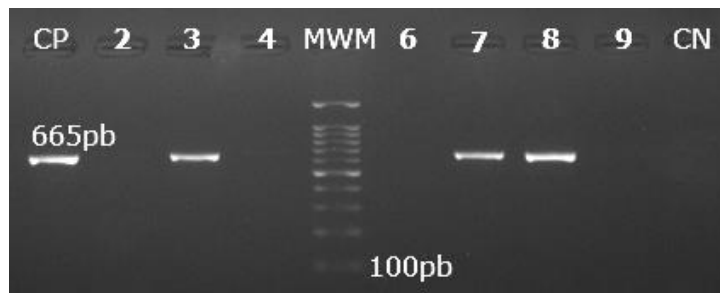


Figura 14. Detección del gen para la adquisición de hierro *iroN* (665 pb). Carriles 3, 7 y 8: gen *iroN* en cepas CVPEC; MWM: marcador de peso molecular (100 pb); CP: control positivo (*E. coli* del cepario del laboratorio clínico); CN: control negativo (sin DNA molde).

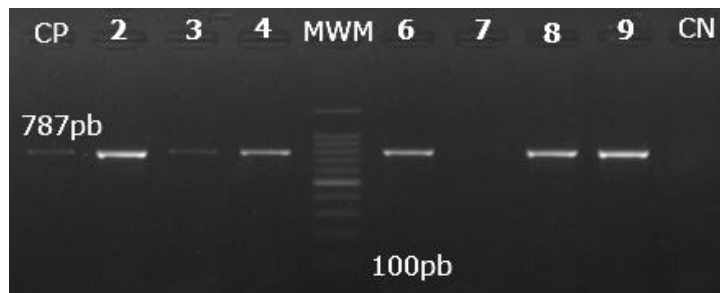


Figura 15. Detección del gen para la adquisición de hierro *fyuA* (787 pb). Carriles 2-4, 6, 8 y 9: gen *fyuA* en cepas CVPEC; MWM: marcador de peso molecular (100 pb); CP: control positivo (*E. coli* del cepario del laboratorio clínico); CN: control negativo (sin DNA molde).

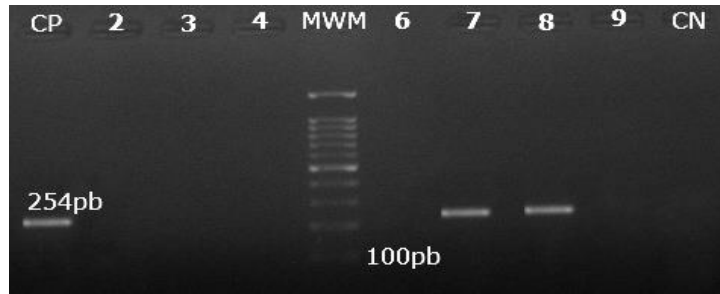


Figura 16. Detección del gen para la adquisición de hierro *ireA* (254 pb). Carriles 7 y 8: gen *ireA* en cepas CVPEC; MWM: marcador de peso molecular (100 pb); CP: control positivo (*E. coli* del cepario del laboratorio clínico); CN: control negativo (sin DNA molde).

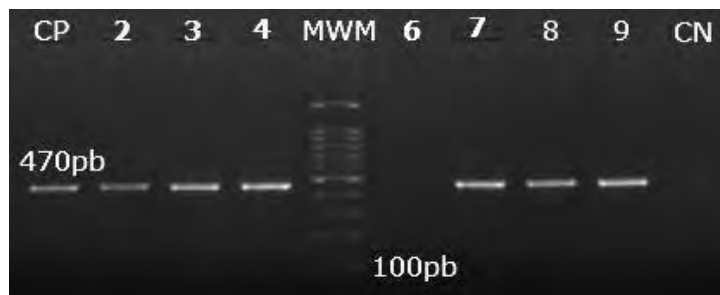


Figura 17. Detección del gen para la adquisición de hierro *feoB* (470 pb). Carriles 2-7-9: gen *feoB* en cepas CVPEC; MWM: marcador de peso molecular (100 pb); CP: control positivo (*E. coli* del cepario del laboratorio clínico); CN: control negativo (sin DNA molde).

8.1.3 Sistemas para evadir la respuesta inmune del hospedero (protectinas)

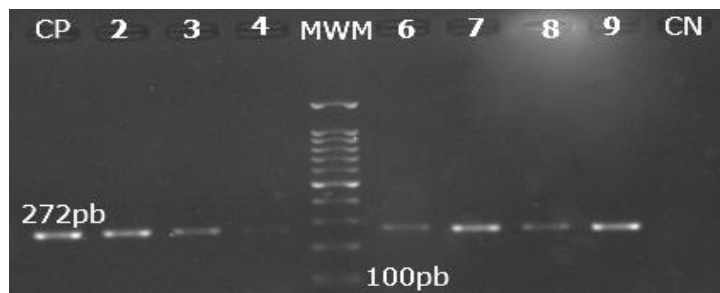


Figura 18. Detección del gen para evadir la respuesta inmune *kpsMTII* (290 pb). Carriles 2-4 y 6-9: gen *kpsMTII* en cepas CVPEC; MWM: marcador de peso molecular (100 pb); CP: control positivo (*E. coli* del cepario del laboratorio clínico); CN: control negativo (sin DNA molde).

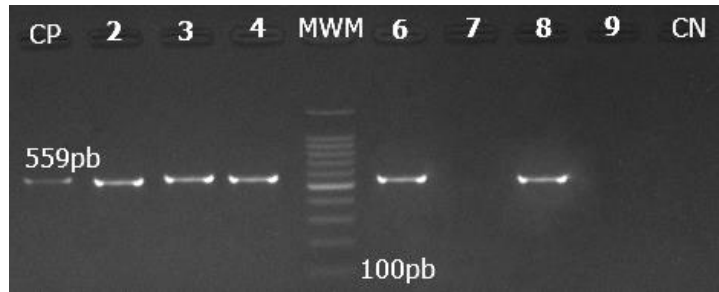


Figura 19. Detección del gen para evadir la respuesta inmune *ompT* (559 pb). Carriles 2-4, 6 y 8: gen *ompT* en cepas CVPEC; MWM: marcador de peso molecular (100 pb); CP: control positivo (*E. coli* del cepario del laboratorio clínico); CN: control negativo (sin DNA molde).

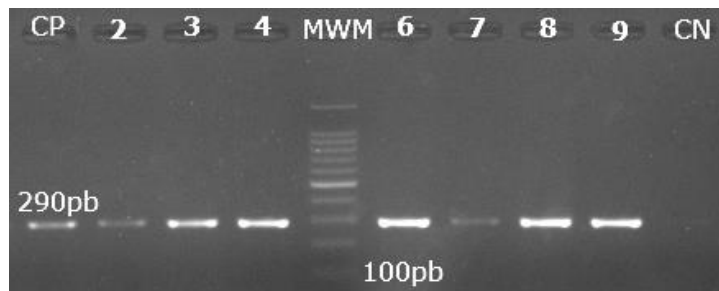


Figura 20. Detección del gen para evadir la respuesta inmune *traT* (290 pb). Carriles 2-4 y 6-9: gen *traT* en cepas CVPEC; MWM: marcador de peso molecular (100 pb); CP: control positivo (*E. coli* del cepario del laboratorio clínico); CN: control negativo (sin DNA molde).

8.1.4 Islas de patogenicidad (PAIs)

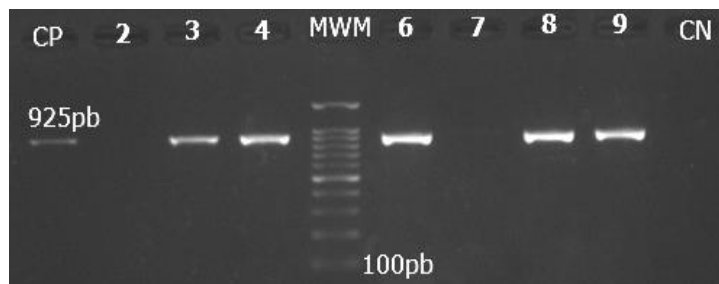


Figura 21. Detección del gen *malX* (925 pb) asociado a PAIs. Carriles 3, 4, 6, 8 y 9: gen *malX* en cepas CVPEC; MWM: marcador de peso molecular (100 pb); CP: control positivo (*E. coli* del cepario del laboratorio clínico); CN: control negativo (sin DNA molde).

8.2 Fotografías de los genes de *E. coli* amplificados por PCR multiplex

8.2.1 Multiplex 1: *tsh*, *vat*, *astA*, *irp2* e *iss*

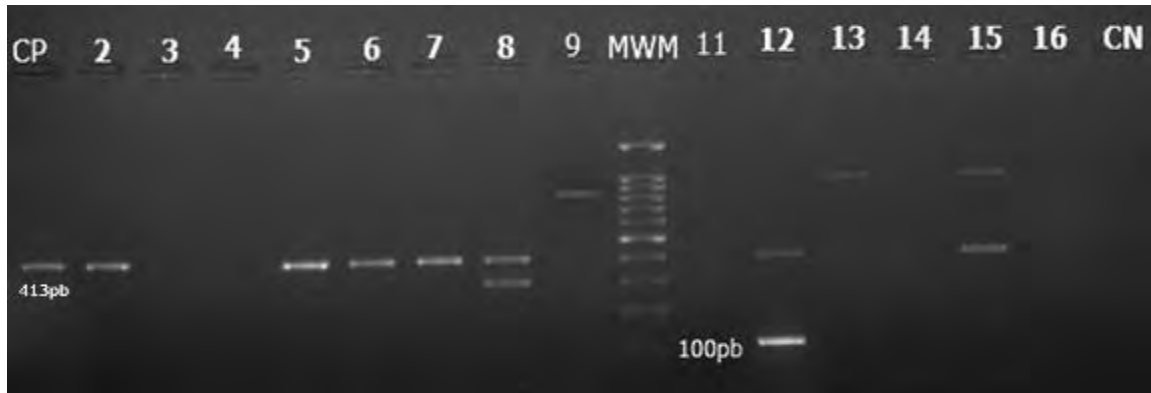


Figura 22. Detección de cinco genes por PCR multiplex: el gen de la adhesina *tsh* (824 pb), el gen de la citotoxina *vat* (981 pb), el gen de la enterotoxina *astA* (110 pb), el gen para la adquisición de hierro *irp2* (413 pb) y el gen para evadir la respuesta inmune *iss* (309 pb). Genes en cepas CVPEC: carril 9 positivo para *tsh*, carriles 13 y 15 positivos para *vat*, carril 12 positivos para *astA*, carriles 2, 5-8, 12 y 15 positivos para *irp2* y carril 8 positivo para *iss*. MWM: marcador de peso molecular (100 pb); CP: control positivo (*E. coli* del cepario del laboratorio clínico); CN: control negativo (sin DNA molde).

8.2.2 Multiplex 2: *sigA*, *sap* y *pic*

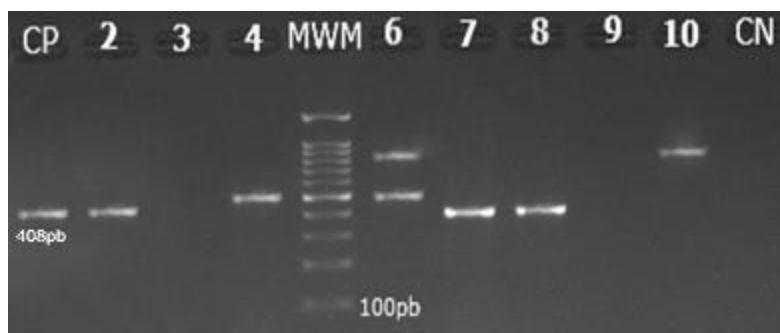


Figura 23. Detección de tres genes por PCR multiplex: genes asociados a la isla de patogenicidad *she*: *sigA* (408 pb), *pic* (500 pb) y *sap* (832 pb). Genes en cepas CVPEC: carriles 7 y 8 positivos para *sigA*, carriles 4 y 6 positivo para *pic*, carriles 6 y 10 positivos para *sap*. MWM: marcador de peso molecular (100 pb); CP: control positivo (*E. coli* del cepario del laboratorio clínico); CN: control negativo (sin DNA molde).

9. ANEXO 2

9.1 Gráficas de PCR en tiempo real y curva de disociación (expresión de los marcadores de virulencia)

9.1.1 16S rRNA

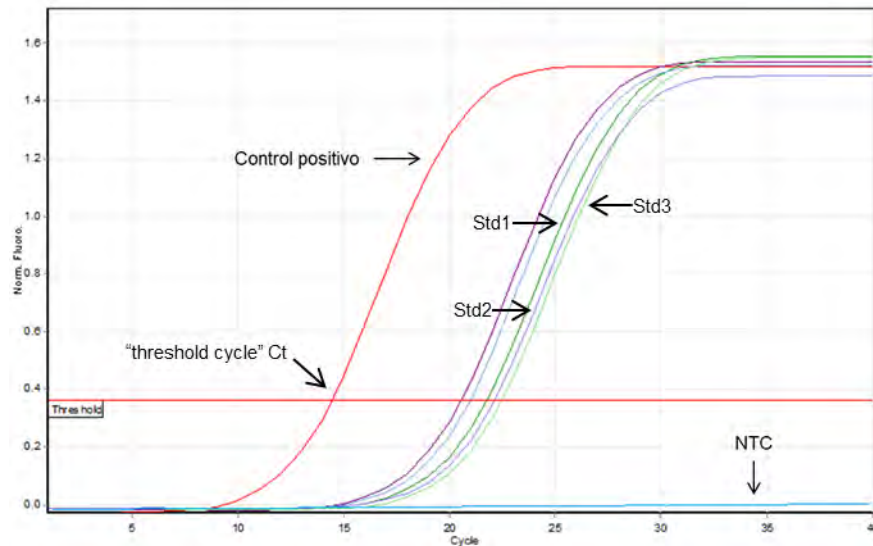


Figura 24. Expresión del gen **16S rRNA** en las cepas CVPEC. La lectura se realizó en el canal verde. Control positivo: *E. coli* ATCC11775. Se realizó una curva de calibración a tres concentraciones (Diluciones 1:2) de DNA de *E. coli*. NTC: control negativo (sin DNA molde).

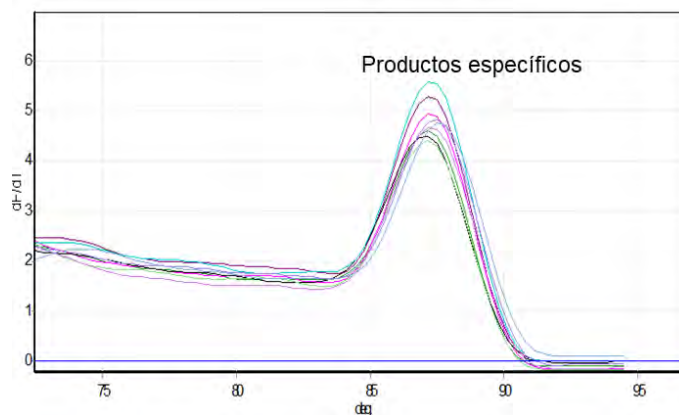


Figura 24A. Curva de disociación (*Melting curve*) de la expresión del gen **16S rRNA**. Los productos específicos muestran una temperatura de fusión más alta que los productos inespecíficos.

9.1.1 Adhesina

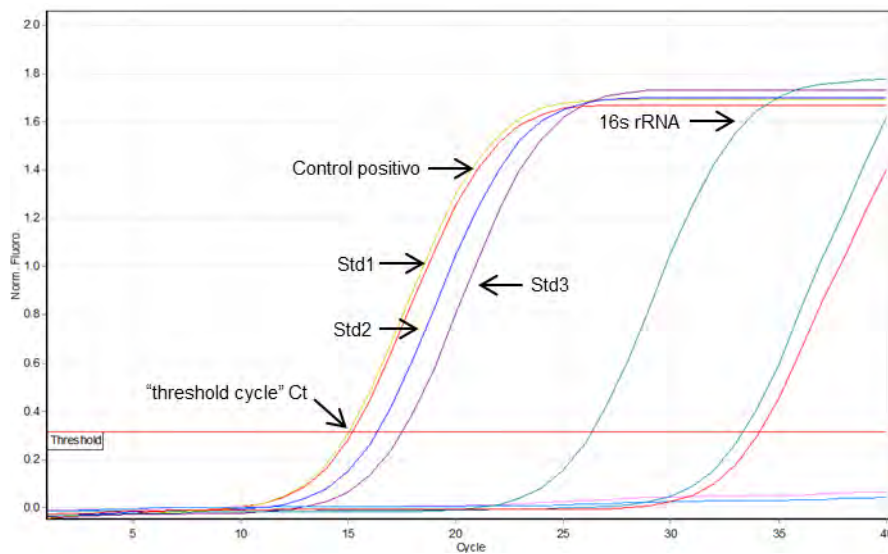


Figura 25. Expresión del gen *tsh* en las cepas CVPEC. La lectura se realizó en el canal verde. Control positivo: *E. coli* portadora del gen *tsh*. Se realizó una curva de calibración a tres concentraciones (Diluciones 1:2) de DNA de *E. coli* portadora de este gen. Gen constitutivo: 16s rRNA. NTC: control negativo (sin DNA molde).

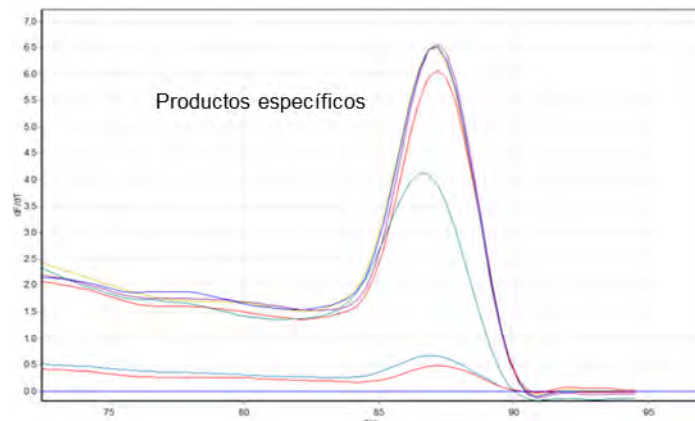


Figura 25A. Curva de disociación (*Melting curve*) de la expresión del gen *tsh*. Los productos específicos muestran una temperatura de fusión más alta que los productos inespecíficos.

9.1.2 Toxinas

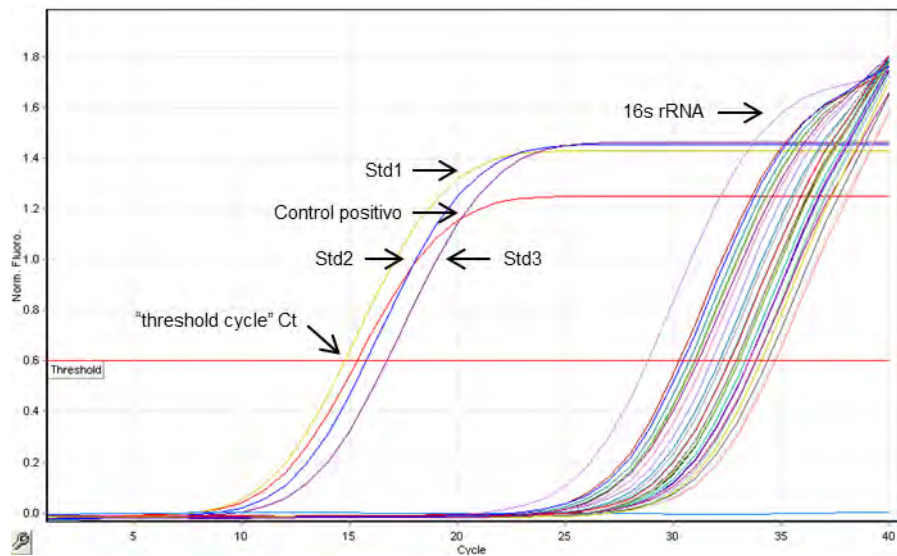


Figura 26. Expresión del gen *cnf1* en cepas CVPEC. La lectura se realizó en el canal verde. Control positivo: *E. coli* portadora del gen *cnf1*. Se realizó una curva de calibración a tres concentraciones (Diluciones 1:2) de DNA de *E. coli* portadora de este gen. Gen constitutivo: 16s rRNA. NTC: control negativo (sin DNA molde).

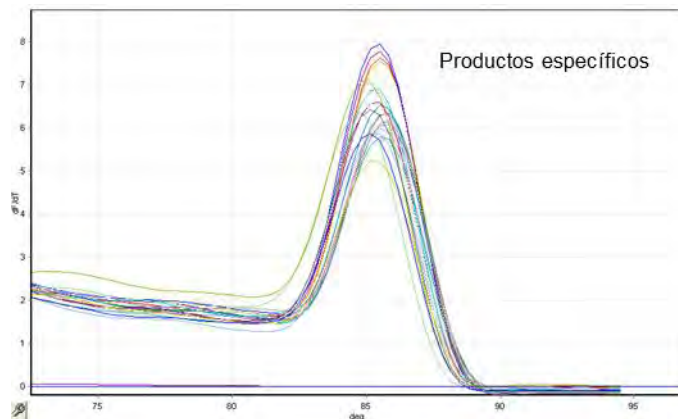


Figura 26A. Curva de disociación (*Melting curve*) de la expresión del gen *cnf1*. Los productos específicos muestran una temperatura de fusión más alta que los productos inespecíficos.

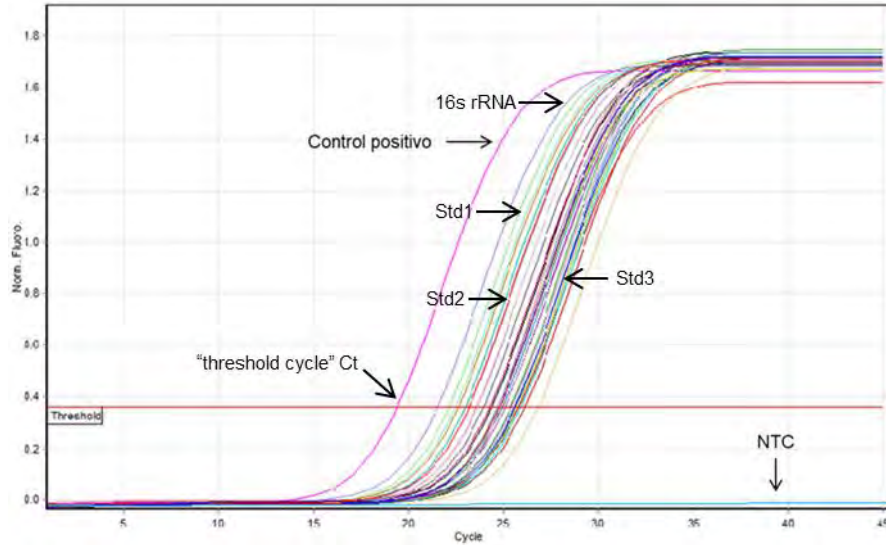


Figura 27. Expresión del gen *usp* en cepas CVPEC. La lectura se realizó en el canal verde. Control positivo: *E. coli* portadora del gen *usp*. Se realizó una curva de calibración a tres concentraciones (Diluciones 1:2) de DNA de *E. coli* portadora de este gen. Gen constitutivo: 16s rRNA. NTC: control negativo (sin DNA molde).

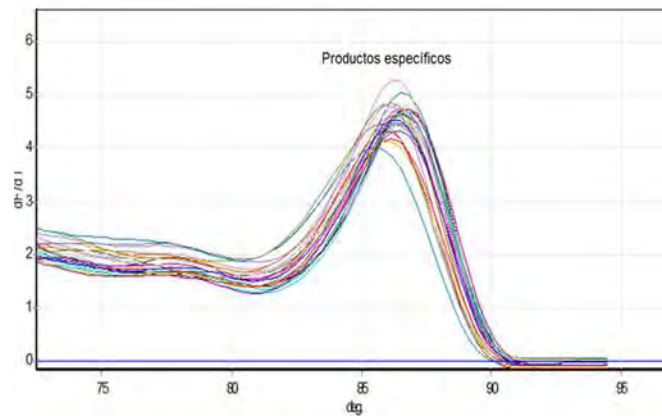


Figura 27A. Curva de disociación (*Melting curve*) de la expresión del gen *usp*. Los productos específicos muestran una temperatura de fusión más alta que los productos inespecíficos.

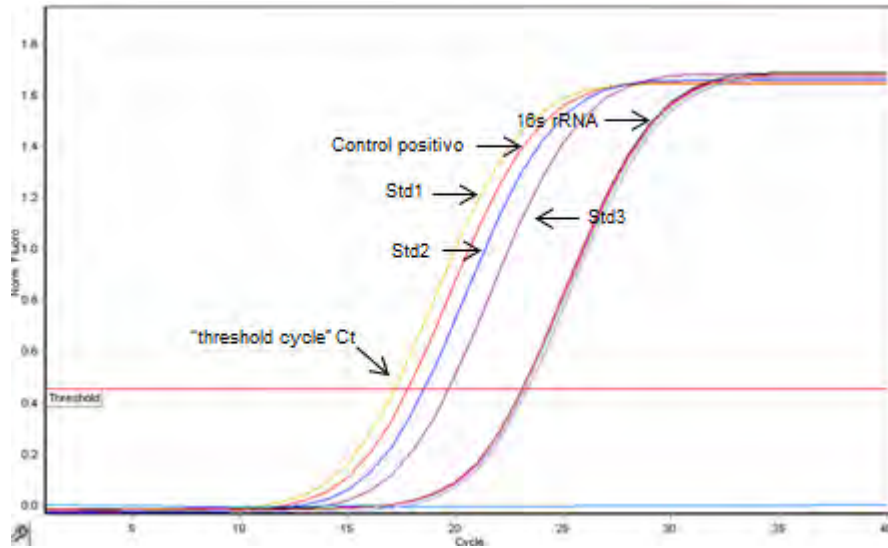


Figura 28. Expresión del gen *astA* en cepas CVPEC. La lectura se realizó en el canal verde. Control positivo: *E. coli* portadora del gen *astA*. Se realizó una curva de calibración a tres concentraciones (Diluciones 1:2) de DNA de *E. coli* portadora de este gen. Gen constitutivo: 16s rRNA. NTC: control negativo (sin DNA molde).

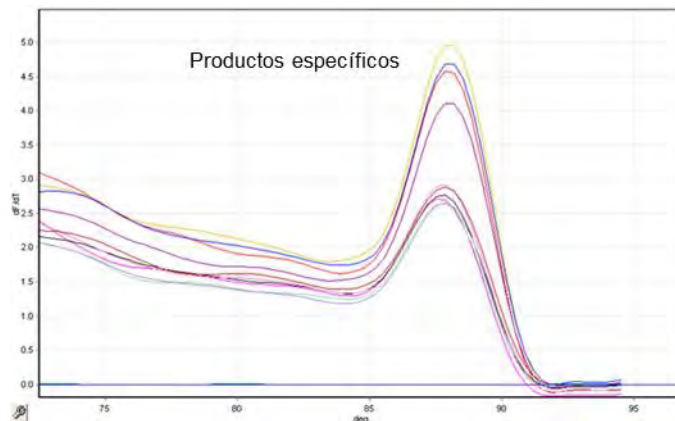


Figura 28A. Curva de disociación (*Melting curve*) de la expresión del gen *astA*. Los productos específicos muestran una temperatura de fusión más alta que los productos inespecíficos.

9.1.3 Sistemas de adquisición de hierro (nutrición)

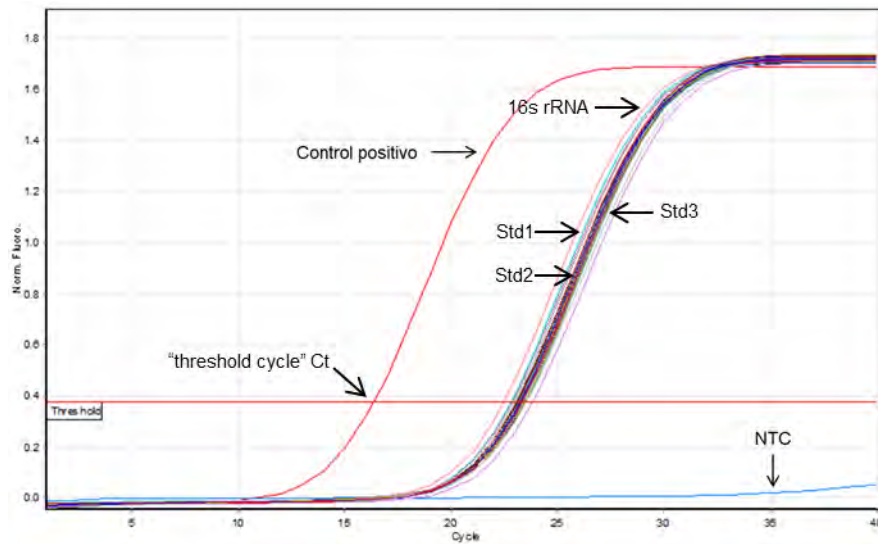


Figura 29. Expresión del gen *iutA* en cepas CVPEC. La lectura se realizó en el canal verde. Control positivo: *E. coli* portadora del gen *iutA*. Se realizó una curva de calibración a tres concentraciones (Diluciones 1:2) de DNA de *E. coli* portadora de este gen. Gen constitutivo: 16s rRNA. NTC: control negativo (sin DNA molde).

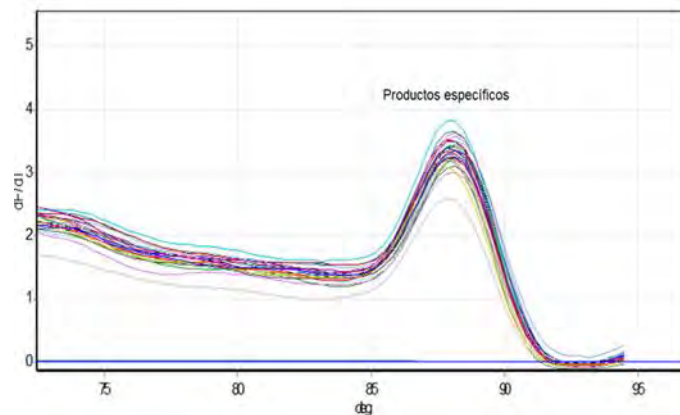


Figura 29A. Curva de disociación (*Melting curve*) de la expresión del gen *iutA*. Los productos específicos muestran una temperatura de fusión más alta que los productos inespecíficos.

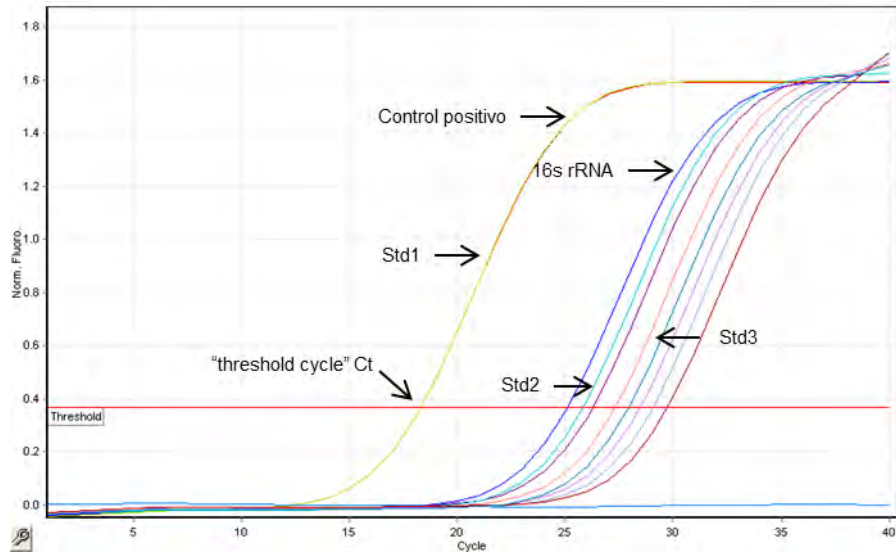


Figura 30. Expresión del gen *iroN* en cepas CVPEC. La lectura se realizó en el canal verde. Control positivo: *E. coli* portadora del gen *iroN*. Se realizó una curva de calibración a tres concentraciones (Diluciones 1:2) de DNA de *E. coli* portadora de este gen. Gen constitutivo: 16s rRNA. NTC: control negativo (sin DNA molde).

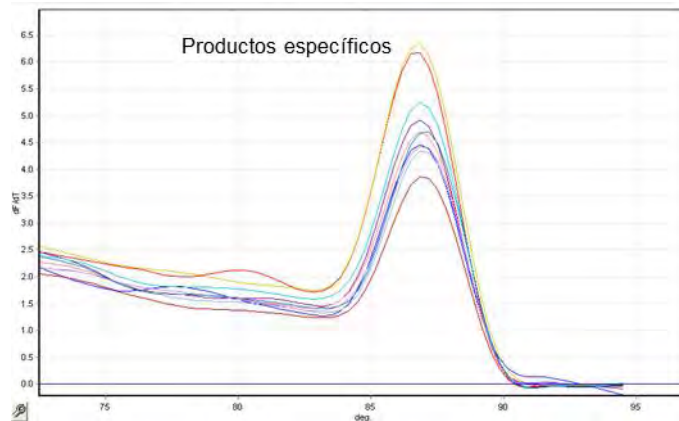


Figura 30A. Curva de disociación (*Melting curve*) de la expresión del gen *iroN*. Los productos específicos muestran una temperatura de fusión más alta que los productos inespecíficos.

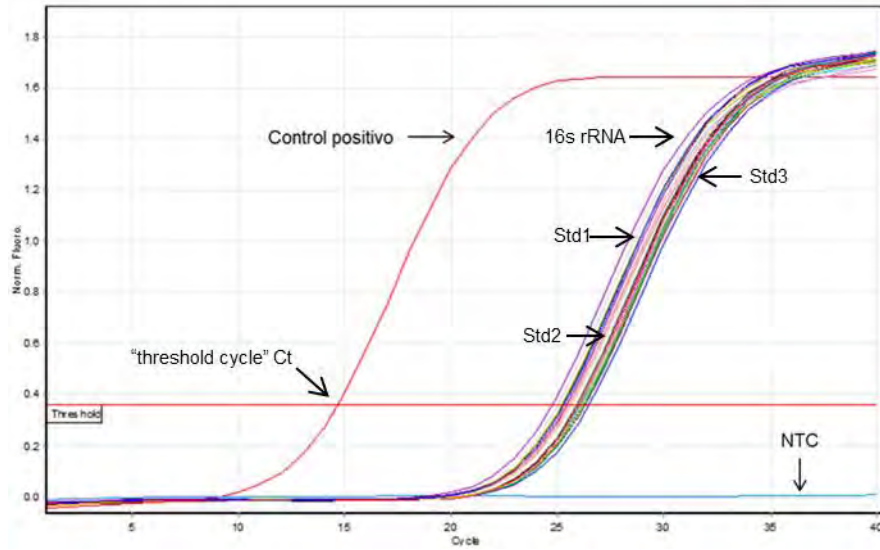


Figura 31. Expresión del gen *irp2* en cepas CVPEC. La lectura se realizó en el canal verde. Control positivo: *E. coli* portadora del gen *irp2*. Se realizó una curva de calibración a tres concentraciones (Diluciones 1:2) de DNA de *E. coli* portadora de este gen. Gen constitutivo: 16s rRNA. NTC: control negativo (sin DNA molde).

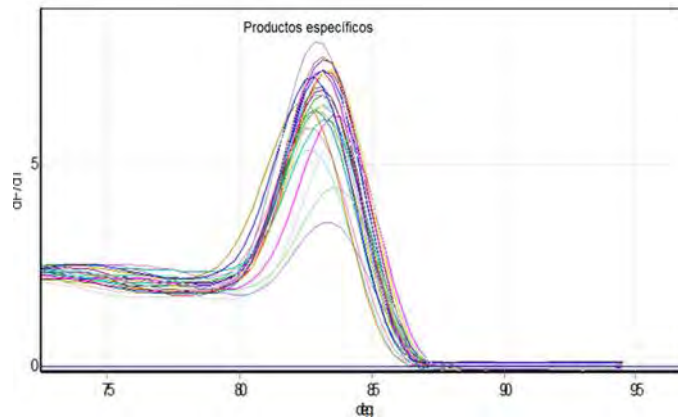


Figura 31A. Curva de disociación (*Melting curve*) de la expresión del gen *irp2*. Los productos específicos muestran una temperatura de fusión más alta que los productos inespecíficos.

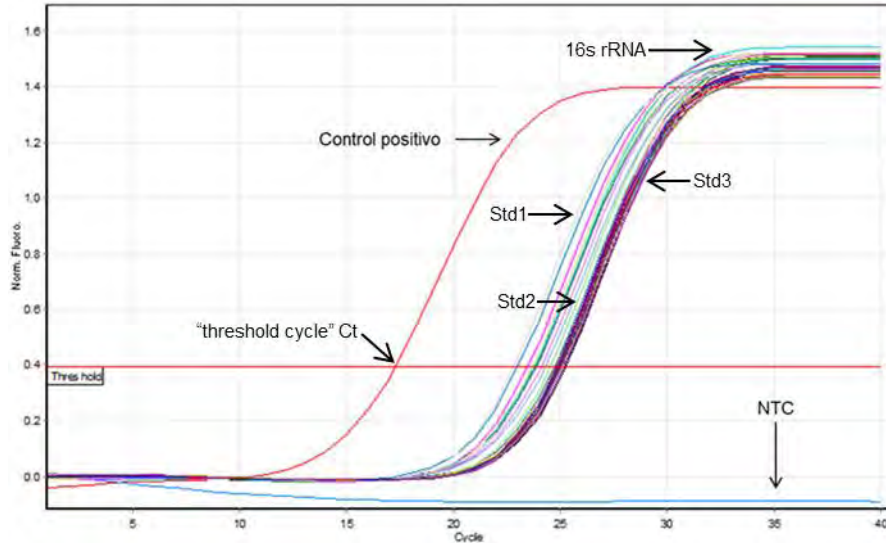


Figura 32. Expresión del gen *fyuA* en cepas CVPEC. La lectura se realizó en el canal verde. Control positivo: *E. coli* portadora del gen *fyuA*. Se realizó una curva de calibración a tres concentraciones (Diluciones 1:2) de DNA de *E. coli* portadora de este gen. Gen constitutivo: 16s rRNA. NTC: control negativo (sin DNA molde).

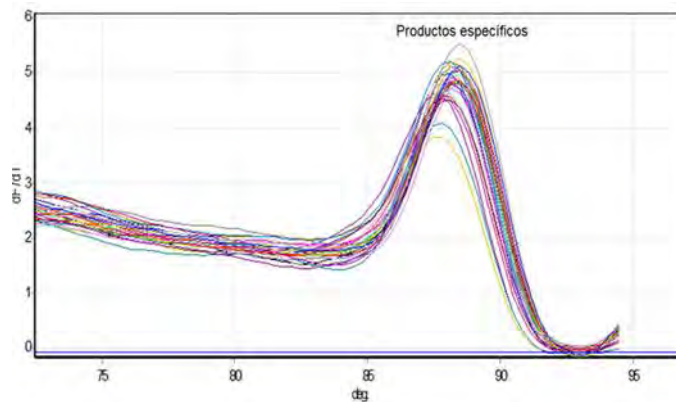


Figura 32A. Curva de disociación (*Melting curve*) de la expresión del gen *fyuA*. Los productos específicos muestran una temperatura de fusión más alta que los productos inespecíficos.

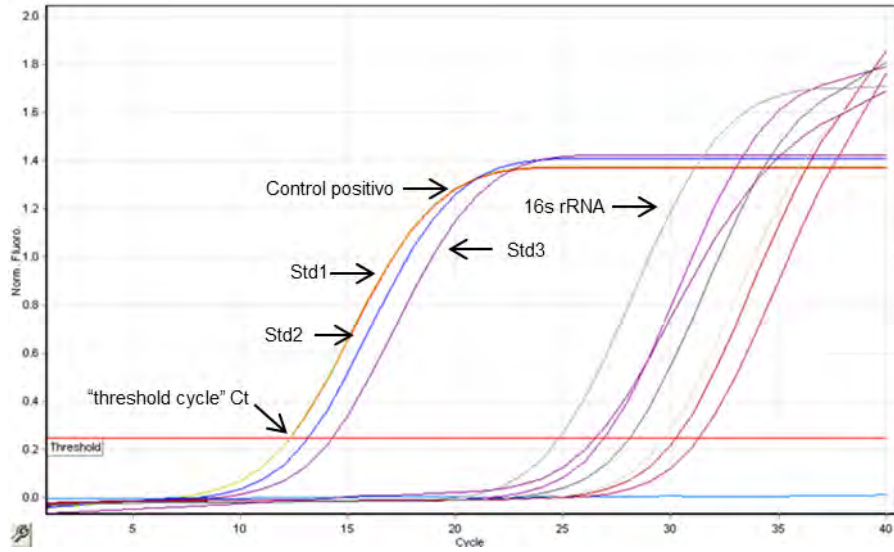


Figura 33. Expresión del gen *ireA* en cepas CVPEC. La lectura se realizó en el canal verde. Control positivo: *E. coli* portadora del gen *ireA*. Se realizó una curva de calibración a tres concentraciones (Diluciones 1:2) de DNA de *E. coli* portadora de este gen. Gen constitutivo: 16s rRNA. NTC: control negativo (sin DNA molde).

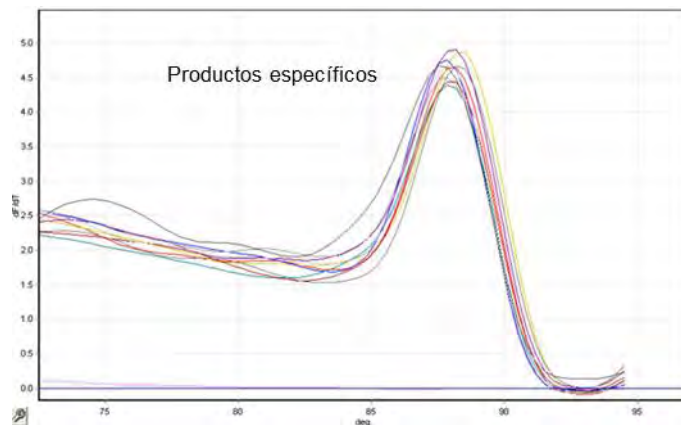


Figura 33A. Curva de disociación (*Melting curve*) de la expresión del gen *ireA*. Los productos específicos muestran una temperatura de fusión más alta que los productos inespecíficos.

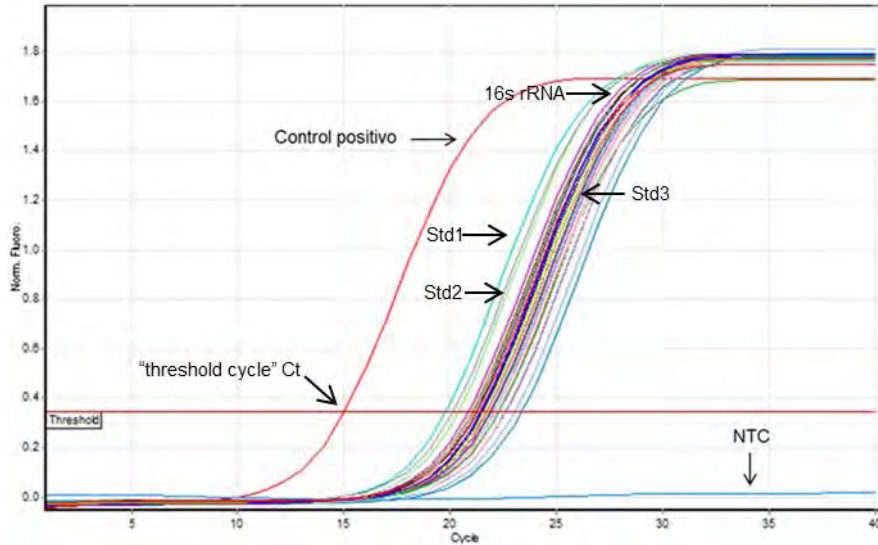


Figura 34. Expresión del gen *feoB* en cepas CVPEC. La lectura se realizó en el canal verde. Control positivo: *E. coli* portadora del gen *feoB*. Se realizó una curva de calibración a tres concentraciones (Diluciones 1:2) de DNA de *E. coli* portadora de este gen. Gen constitutivo: 16s rRNA. NTC: control negativo (sin DNA molde).

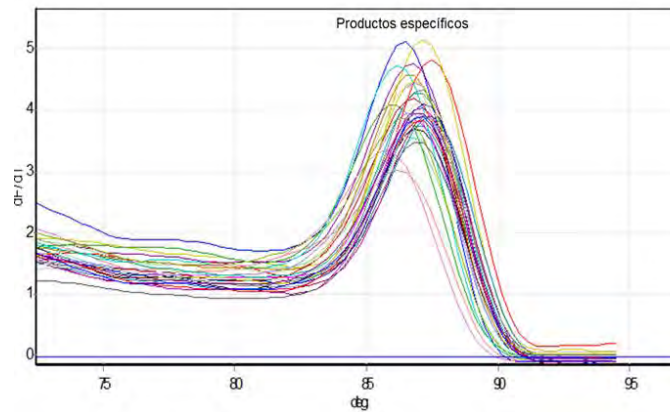


Figura 34A. Curva de disociación (*Melting curve*) de la expresión del gen *feoB*. Los productos específicos muestran una temperatura de fusión más alta que los productos inespecíficos.

9.1.4 Sistemas para evadir la respuesta inmune del hospedero (protectinas)

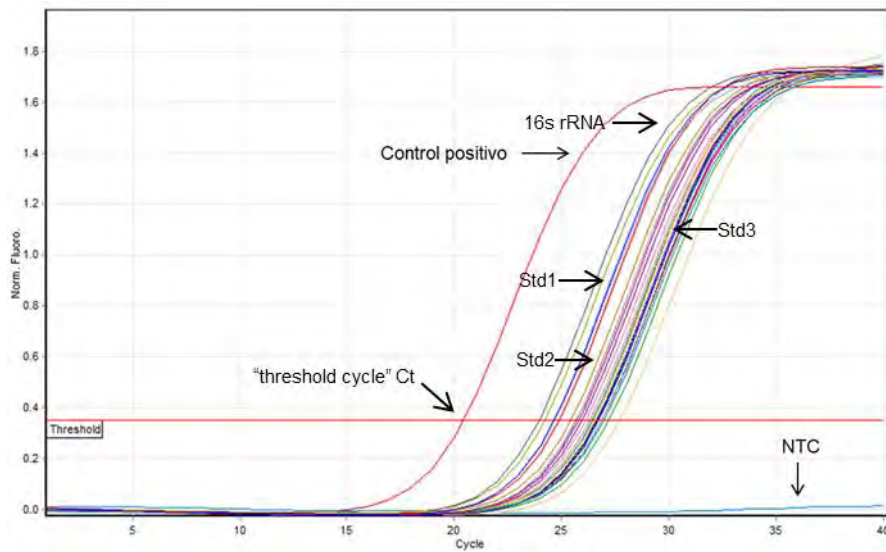


Figura 35. Expresión del gen *kpsMTII* en cepas CVPEC. La lectura se realizó en el canal verde. Control positivo: *E. coli* portadora del gen *kpsMTII*. Se realizó una curva de calibración a tres concentraciones (Diluciones 1:2) de DNA de *E. coli* portadora de este gen. Gen constitutivo: 16s rRNA. NTC: control negativo (sin DNA molde).

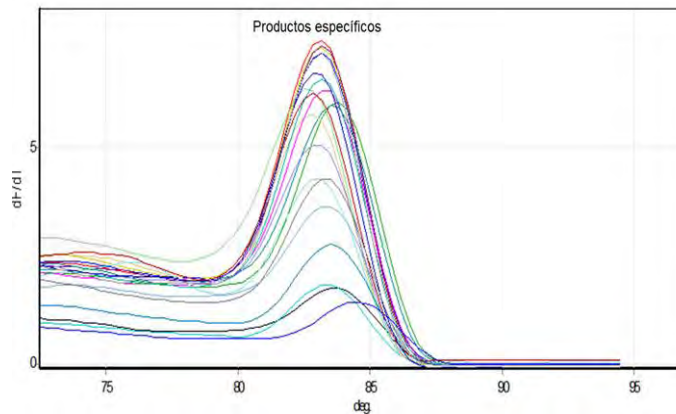


Figura 35A. Curva de disociación (*Melting curve*) de la expresión del gen *kpsMTII*. Los productos específicos muestran una temperatura de fusión más alta que los productos inespecíficos.

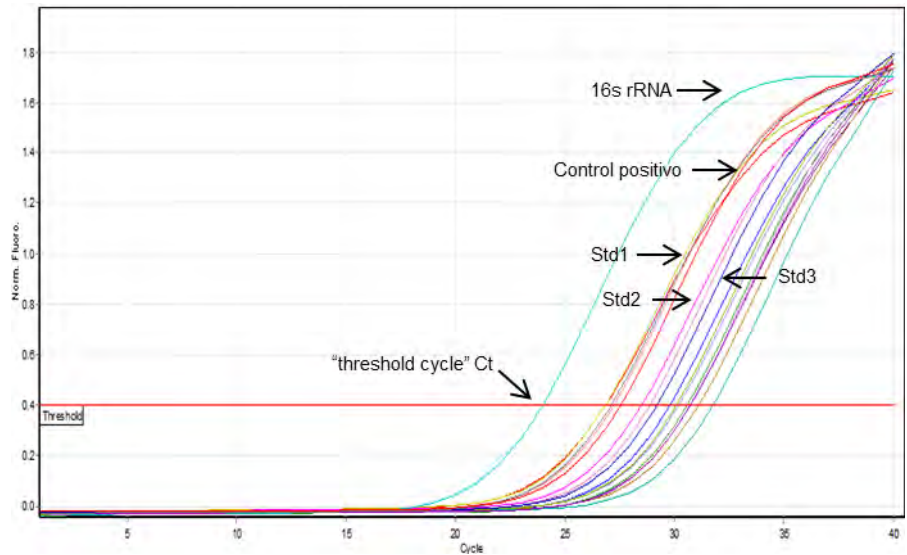


Figura 36. Expresión del gen *ompT* en cepas CVPEC. La lectura se realizó en el canal verde. Control positivo: *E. coli* portadora del gen *ompT*. Se realizó una curva de calibración a tres concentraciones (Diluciones 1:2) de DNA de *E. coli* portadora de este gen. Gen constitutivo: 16s rRNA. NTC: control negativo (sin DNA molde).

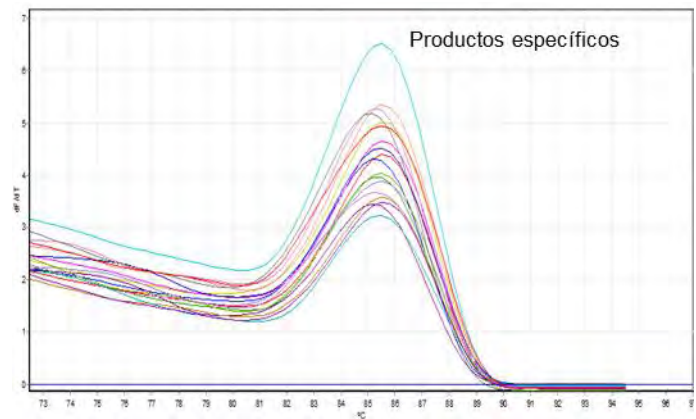


Figura 36A. Curva de disociación (*Melting curve*) de la expresión del gen *ompT*. Los productos específicos muestran una temperatura de fusión más alta que los productos inespecíficos.

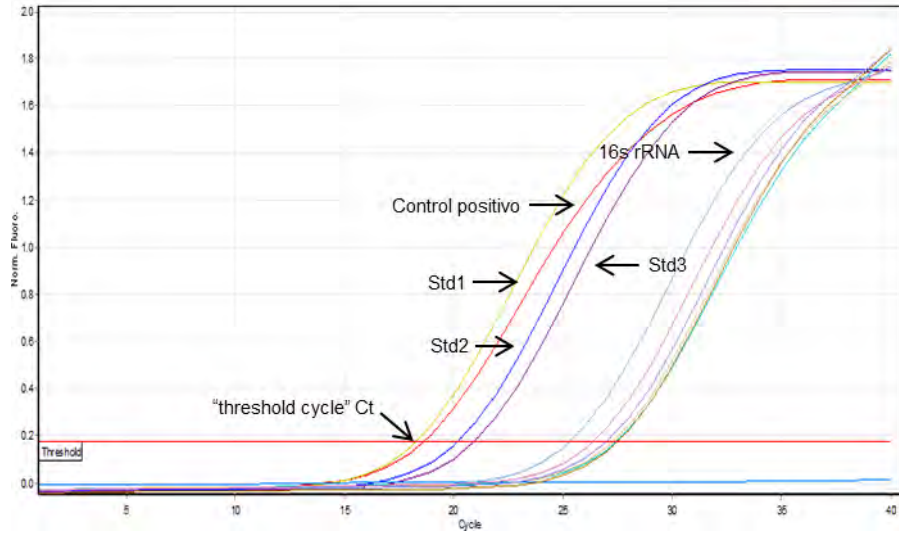


Figura 37. Expresión del gen *iss* en cepas CVPEC. La lectura se realizó en el canal verde. Control positivo: *E. coli* portadora del gen *iss*. Se realizó una curva de calibración a tres concentraciones (Diluciones 1:2) de DNA de *E. coli* portadora de este gen. Gen constitutivo: 16s rRNA. NTC: control negativo (sin DNA molde).

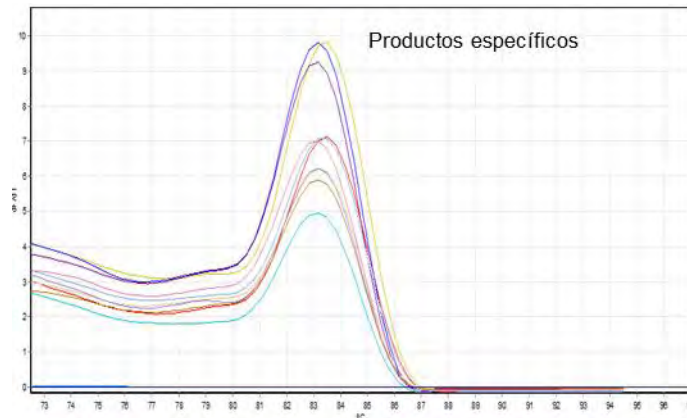


Figura 37A. Curva de disociación (*Melting curve*) de la expresión del gen *iss*. Los productos específicos muestran una temperatura de fusión más alta que los productos inespecíficos.

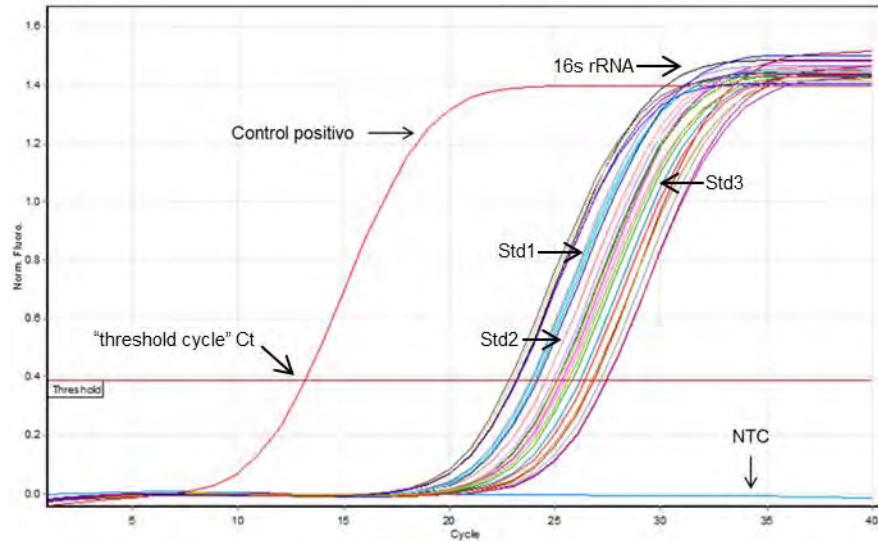


Figura 38. Expresión del gen *traT* en cepas CVPEC. La lectura se realizó en el canal verde. Control positivo: *E. coli* portadora del gen *traT*. Se realizó una curva de calibración a tres concentraciones (Diluciones 1:2) de DNA de *E. coli* portadora de este gen. Gen constitutivo: 16s rRNA. NTC: control negativo (sin DNA molde).

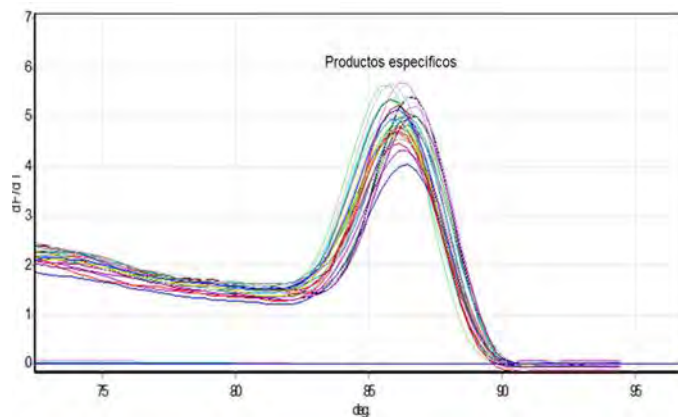


Figura 38A. Curva de disociación (*Melting curve*) de la expresión del gen *traT*. Los productos específicos muestran una temperatura de fusión más alta que los productos inespecíficos.

9.1.4 Asociados a islas de patogenicidad (PAIs)

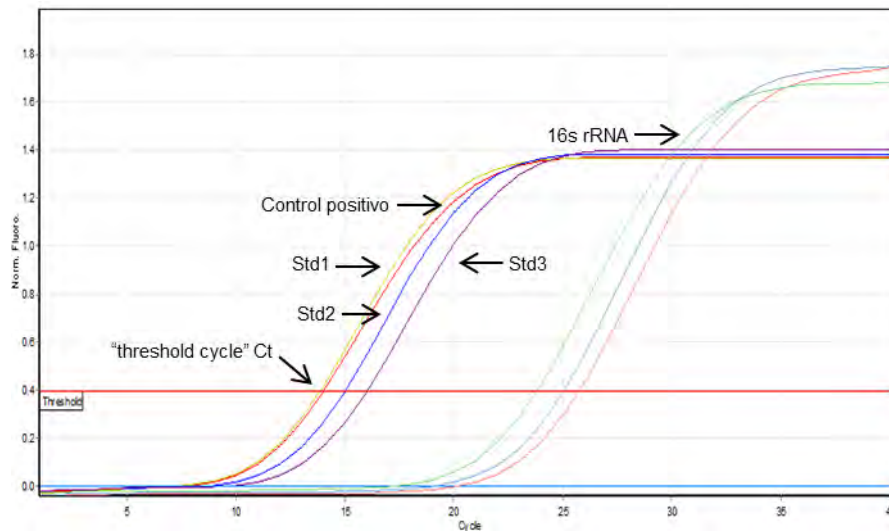


Figura 39. Expresión del gen *sigA* en cepas CVPEC. La lectura se realizó en el canal verde. Control positivo: *E. coli* portadora del gen *sigA*. Se realizó una curva de calibración a tres concentraciones (Diluciones 1:2) de DNA de *E. coli* portadora de este gen. Gen constitutivo: 16s rRNA. NTC: control negativo (sin DNA molde).

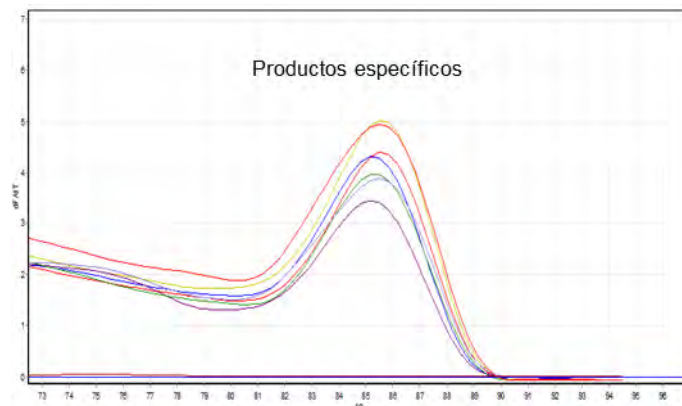


Figura 39A. Curva de disociación (*Melting curve*) de la expresión del gen *sigA*. Los productos específicos muestran una temperatura de fusión más alta que los productos inespecíficos.

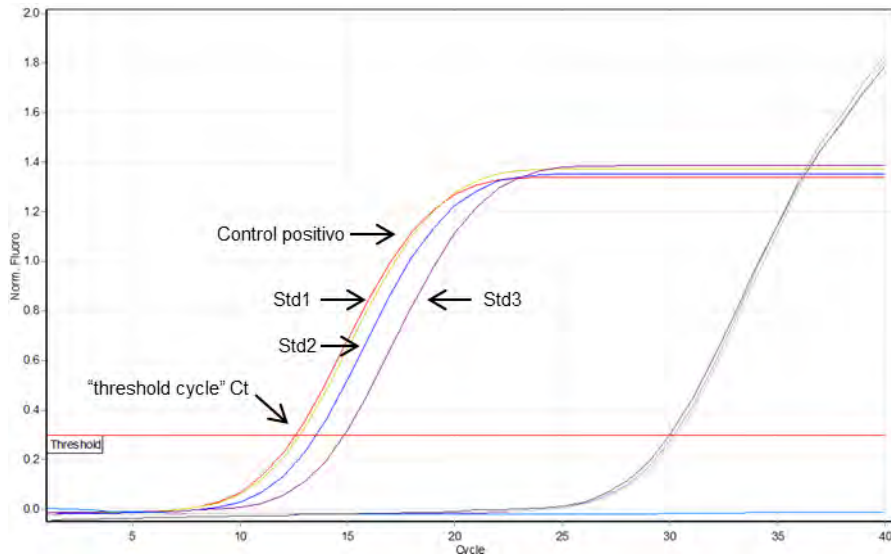


Figura 40. Expresión del gen *pic* en cepas CVPEC. La lectura se realizó en el canal verde. Control positivo: *E. coli* portadora del gen *pic*. Se realizó una curva de calibración a tres concentraciones (Diluciones 1:2) de DNA de *E. coli* portadora de este gen. Gen constitutivo: 16s rRNA. NTC: control negativo (sin DNA molde).

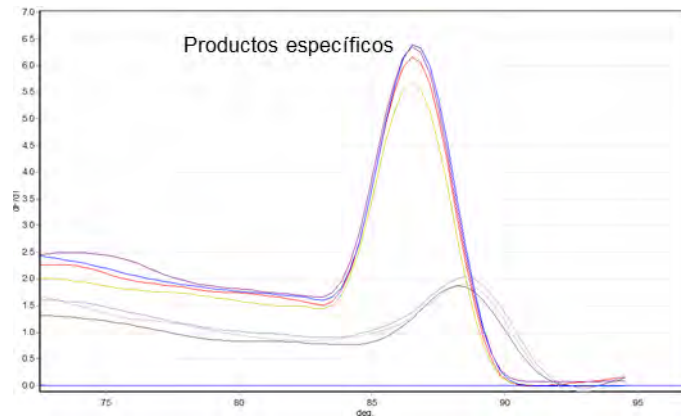


Figura 40A. Curva de disociación (*Melting curve*) de la expresión del gen *pic*. Los productos específicos muestran una temperatura de fusión más alta que los productos inespecíficos.

10. ANEXO 3

10.1 Fotografías de los amplicones para identificar los serogrupos O

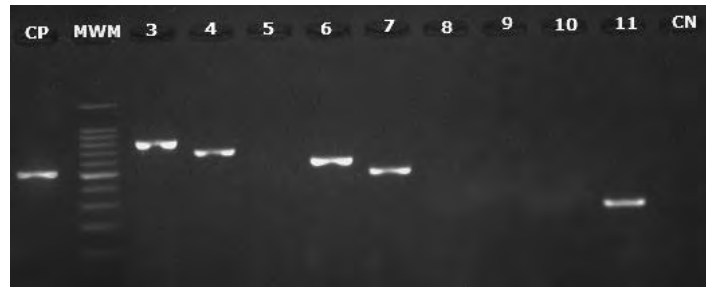


Figura 41. Detección de 5 serogrupos O en cepas CVPEC. Carril 3: serogrupo **O6** (783 pb), carril 4: serogrupo **O4** (664 pb), carril 6: serogrupo **O18** (551 pb), carril 7: serogrupo **O75** (511 pb), carril 11: **O16** (302 pb). MWM: marcador de peso molecular (100 pb); CP: control positivo (*E. coli* del cepario del laboratorio clínico); CN: control negativo (sin DNA molde).

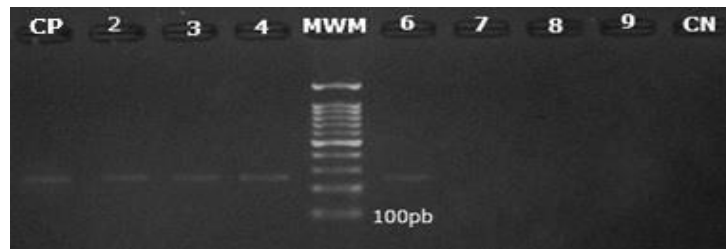


Figura 42. Detección del serogrupo **O25** en cepas CVPEC. Carriles 2-4 y 6 serogrupo **O25** (230 pb). MWM: marcador de peso molecular (100 pb); CP: control positivo (*E. coli* del cepario del laboratorio clínico); CN: control negativo (sin DNA molde).

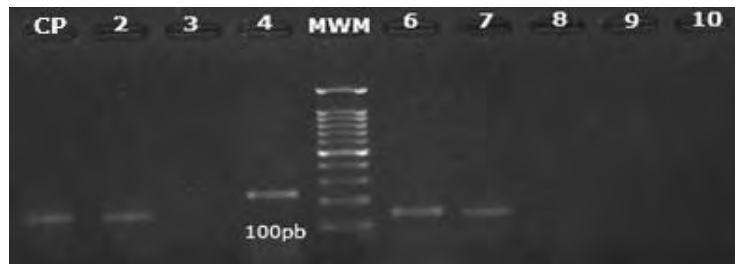


Figura 43. Detección de los serogrupos **O21** y **O15** en cepas CVPEC. Carril 4: serogrupo **O21** (209 pb), carriles 2, 6 y 7: serogrupo **O15** (183pb). MWM: marcador de peso molecular (100 pb); CP: control positivo (*E. coli* del cepario del laboratorio clínico); Carril 10: control negativo (sin DNA molde).

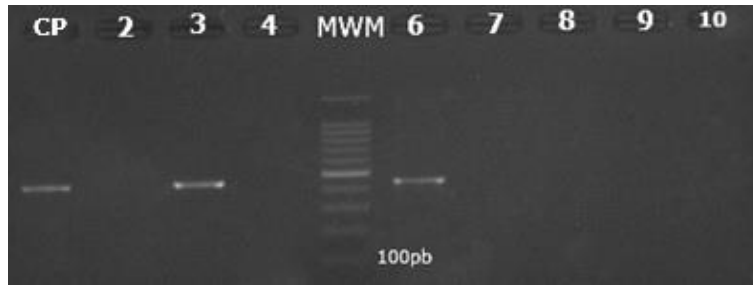


Figura 44. Detección del serogrupo **O8** en cepas CVPEC. Carriles 3 y 6: serogrupo **O8** (448 pb). MWM: marcador de peso molecular (100 pb); CP: control positivo (*E. coli* del cepario del laboratorio clínico); Carril 10: control negativo (sin DNA molde).



Figura 45. Detección del serogrupo **O1** en cepas CVPEC. Carril 8: serogrupo **O1** (1098 pb). MWM: marcador de peso molecular (100 pb); CP: control positivo (*E. coli* del cepario del laboratorio clínico); CN: control negativo (sin DNA molde).

11. LITERATURA CITADA

1. 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.
2. Agarwal J, Srivastava S, Singh M. 2012. Pathogenomics of uropathogenic *Escherichia coli*. *Indian J Med Microbiol.* 30(2):141-149.
3. Agüero ME, Aron L, DeLuca AG, Timmis KN, Cabello FC. 1984. A plasmid-encoded outer membrane protein, TraT, enhances resistance of *Escherichia coli* to phagocytosis. *Infect Immun.* 46(3):740-746.
4. Al-Hasani K, Rajakumar K, Bulach D, Robins-Browne R, Adler B, Sakellaris H. 2001A. Genetic organization of the *she* pathogenicity island in *Shigella flexneri* 2a. *Microb Pathog.* 30(1):1-8.
5. Al-Hasani K, Adler B, Rajakumar K, Sakellaris H. 2001B. Distribution and structural variation of the *she* pathogenicity island in enteric bacterial pathogens. *J Med Microbiol.* 50(9):780-786.
6. Al-Hasani K, Henderson IR, Sakellaris H, Rajakumar K, Grant T, Nataro JP, Robins-Browne R, Adler B. 2000. The *sigA* gene which is borne on the *she* pathogenicity island of *Shigella flexneri* 2a encodes an exported cytopathic protease involved in intestinal fluid accumulation. *Infect Immun.* 68(5):2457-2463.
7. Allsworth JE, Lewis VA, Peipert JF. 2008. Viral sexually transmitted infections and bacterial vaginosis: 2001-2004 National Health and Nutrition Examination Survey data. *Sex Transm Dis.* 35(9):791-796.
8. Alteri CJ, Mobley HL. 2007. Quantitative profile of the uropathogenic *Escherichia coli* outer membrane during growth in human urine. *Infect Immun.* 75(6):2679-2688.
9. Anderson GG, Goller CC, Justice S, Hultgren SJ, Seed PC. 2010. Polysaccharide capsule and sialic acid-mediated regulation promote biofilm-like intracellular bacterial communities during cystitis. *Infect Immun.* 78(3):963-975.
10. 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.
11. Antao EM, Wieler LH, Ewers C. 2009. Adhesive threads of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Pathog.* 1(1):22.
12. Bach S, de Almeida A, Carniel E. 2000. The Yersinia high-pathogenicity island is present in different members of the family *Enterobacteriaceae*. *FEMS Microbiol Lett.* 183(2):289-294.
13. Bauer RJ, Zhang L, Foxman B, Siitonen A, Jantunen ME, Saxen H, Marrs CF. 2002. Molecular Epidemiology of 3 Putative Virulence Genes for *Escherichia coli* Urinary Tract Infection, *usp*, *iha*, and *iroN* (*E. coli*). *J Infect Dis.* 185(10):1521–1524.

14. Berry RE, Klumpp DJ, Schaeffer AJ. 2009. Urothelial cultures support intracellular bacterial community formation by uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 77(7):2762-2772.
15. Bertschinger HU. 1999. Postweaning *E. coli* diarrhea and edema disease. In: Straw BE, D'Allaire S, Mengeling WL, Taylor DJ. Diseases of Swine. Iowa State University Press, Ames. 441–454.
16. Bhakdi S, Greulich S, Muhly M, Eberspacher B, Becker H, Thiele A. 1989. Potent leukocidal action of *Escherichia coli* hemolysin mediated by permibilization of target cell membranes. *J Exp Med.* 169(1):737-754.
17. Bhakdi S, Mackman N, Menestrina G, Gray L, Hugo F, Seeger W, Holland B. 1988. The hemolysin of *Escherichia coli*. *Eur J Epidemiol.* 4(2):135-143.
18. Bidet P, Mahjoub-Messai F, Blanco J, Blanco J, Dehem M, Aujard Y, Bingen E, Bonacorsi S. 2007. Combined multilocus sequence typing and O serogrouping distinguishes *Escherichia coli* subtypes associated with infant urosepsis and/or meningitis. *J Infect Dis;* 196(2):297–303.
19. Binns MM, Mayden J, Levine RP. 1982. Further characterization of complement resistance conferred on *Escherichia coli* by the plasmid genes *traT* of R100 and *iss* of *CoIV I-K94*. *Infect Immun.* 35(2):654-659.
20. Binns MM, Davies DL, Hardy KG. 1979. Cloned fragments of the plasmid *CoIV,I-K94* specifying virulence and serum resistance. *Nature.* 279(5716):778-781.
21. Bjorksten B, Kaijser B. 1978. Interaction of human serum and neutrophils with *Escherichia coli* strains: differences between strains isolated from urine of patients with pyelonephritis or asymptomatic bacteriuria. *Infect Immun.* 22(2):308-311.
22. Blanco J, Blanco M, Alonso MP, Blanco JE, Gonzalez EA, Garabal JI. 1992. Characteristics of haemolytic *Escherichia coli* with particular reference to production of cytotoxic necrotizing factor type 1 (CNF1). *Res Microbiol.* 143(9):869-878.
23. Blum G, Ott M, Lischewski A, Ritter A, Imrich H, Tschape H, Hacker J. 1994. Excision of large DNA regions termed pathogenicity islands from tRNA-specific loci in the chromosome of an *Escherichia coli* wild-type pathogen. *Infect Immun.* 62(2):606-614.
24. Bradshaw CS, Morton AN, Garland SM, Morris MB, Moss LM, Fairley CK. 2005. Higher-risk behavioral practices associated with bacterial vaginosis compared with vaginal candidiasis. *Obstet Gynecol.* 106(1):105-114.
25. Braun V. 2001. Iron uptake mechanisms and their Regulation in pathogenic bacteria. *Int J Med Microbiol.* 291(2):67-79.
26. Brenner DJ, Noel R, Krieg NR, James T. 2005. Bergey's manual of systematic bacteriology. *Staley Springer.* 2(1): 450-455.
27. Boquet P. 2001. The cytotoxic necrotizing factor 1 (CNF1) from *Escherichia coli*. *Toxicon.* 39(11):1673-80.

28. Bower JM, Eto DS, Mulvey MA. 2005. Covert operations of uropathogenic *Escherichia coli* within the urinary tract. *Traffic*. 6(1):18–31.
29. Buckles EL, Wang X, Lane MC, Lockatell CV, Johnson DE, Rasko DA, Mobley HL, Donnenberg MS. 2009. Role of the K2 capsule in *Escherichia coli* urinary tract infection and serum resistance. *J Infect Dis*. 199(11):1689-1697.
30. Burns SM, Hull SI. 1999. Loss of Resistance to Ingestion and Phagocytic Killing by O- and K- Mutants of a Uropathogenic *Escherichia coli* O75:K5 Strain. *Infect Immun*. 67(8):3757-3762.
31. Chaturvedi KS, Hung CS, Crowley JR, Stapleton AE, Henderson JP. 2012. The siderophore yersiniabactin binds copper to protect pathogens during infection. *Nat Chem Biol*. 8(8):731-736.
32. Chromek M & Brauner A. 2008. Antimicrobial mechanisms of the urinary tract. *J Mol Med*. 86(1): 37-47.
33. Clermont O, Johnson JR, Menard M, Denamur E. 2007. Determination of *Escherichia coli* O types by allele-specific polymerase chain reaction: application to the O types involved in human septicemia. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 57(2):129-136.
34. Corbett D, Roberts IS. 2008. Capsular polysaccharides in *Escherichia coli*. *Adv Appl Microbiol*. 65(1):1-26.
35. Crosa JH, Walsh CT. 2002. Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*. 66(2):223-249.
36. Czczulin JR, Whittam TS, Henderson IR, Navarro-Garcia F, Nataro JP. 1999. Phylogenetic analysis of enteroaggregative and diffusely adherent *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 67(6):2692-2699.
37. De Lorenzo V, Bindereif A, Paw BH, Neilands JB. 1986. Aerobactin biosynthesis and transport genes of plasmid ColV-K30 in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol*. 165(2):570-578.
38. Derakhshandeh A, Firouzi R, Motamedifar M, Motamedi-Borojeni A, 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.
39. 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.
40. Dhakal BK & Mulvey MA. 2009. Uropathogenic *Escherichia coli* invades host cells via an HDAC6-modulated microtubule-dependent pathway. *J Biol Chem*. 284(1):446-454.
41. Dobrindt U, Agerer F, Michaelis K, Janka A, Buchrieser C, Samuelson M, Svanborg C, Gottschalk G, Karch H, Hacker J. 2003. Analysis of genome plasticity in pathogenic and commensal *Escherichia coli* isolates by use of DNA arrays. *J Bacteriol*. 185(6):1831-1840.

42. Dobrindt U, Blum-Oehler G, Nagy G, Schneider G, Johann A, Gottschalk G, Hacker J. 2002. Genetic structure and distribution of four pathogenicity islands (PAI I (536) to PAI IV (536)) of uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. *Infect Immun.* 70(11):6365-6372.
43. Donders G. 2010. Diagnosis and management of bacterial vaginosis and other types of abnormal vaginal bacterial flora: a review. *Obstet Gynecol Surv.* 65(7):462-473.
44. Elmore S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 35(4):495-516.
45. Eto DS, Jones TA, Sundsbak JL, Mulvey MA. 2007. Integrin-Mediated Host Cell Invasion by Type 1-Piliated Uropathogenic *Escherichia coli*. *PLoS Pathog.* 3(7): e100.
46. Ewers C, Li G, Wilking H, Kiessling S, Alt K, Antao EM, Laturnus C, Diehl I, Glodde S, Homeier T, Bohnke U, Steinruck 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.
47. Ewers C, Janssen T, Kiessling S, Philipp HC, Wieler LH. 2005. Rapid detection of virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *Avian Dis.* 49(2): 269-273.
48. Fasano A, Noriega FR, Liao FM, Wang W, Levine MM. 1997. Effect of Shigella enterotoxin 1 (ShET1) on rabbit intestine *in vitro* and *in vivo*. *Gut* 40(4):505-511.
49. Fasano A, Noriega FR, Maneval DR, Chanasongcram S, Russell R, Guandalini S, Levine MM. 1995. Shigella enterotoxin 1: an enterotoxin of *Shigella flexneri* 2a active in rabbit small intestine *in vivo* and *in vitro*. *J Clin Invest.* 95(6):2853-2861.
50. Feldgarden M, Riley MA. 1999. The phenotypic and fitness effects of colicin resistance in *Escherichia coli* K-12. *Evolution.* 53(4):1019-1027.
51. Fey A, Eichler S, Flavier S, Christen R, Hofle MG, Guzmán CA. 2004. Establishment of a real-time PCR-based approach for accurate quantification of bacterial RNA targets in water, using *Salmonella* as a model organism. *Appl Environ Microbiol.* 70(6):3618-3623.
52. Flores-Paz R, Rivera-Sánchez R, García-Jiménez E, Arriaga-Alba M. 2003. Etiología de la infección cérvico vaginal en pacientes del Hospital Juárez de México. *Salud Pública de México.* 45(5):694-697.
53. Gal-Mor O, Finlay BB. 2006. Pathogenicity islands: a molecular toolbox for bacterial virulence. *Cell Microbiol.* 8(11):1707-1719.
54. Garenaux A, Caza M, Dozois CM, 2011. The ins and outs of siderophore mediated iron uptake by extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Vet Microbiol.* 153(1-2):89-98.
55. González-Pedraza AA, Ortiz ZC, Dávila MR, Valencia GC. 2007. Infecciones Cervicovaginales más frecuentes; prevalencia y factores de riesgo. *Rev Cub Obstet Ginecol.* 33(2):1-12.

56. Green CB, Cheng G, Chandra J, Mukherjee P, Ghannoum MA, Hoyer LL. 2004. RT-PCR detection of *Candida albicans* ALS gene expression in the reconstituted human epithelium (RHE) model of oral candidiasis and in model biofilms. *Microbiology*. 150(2):267-275.
57. Gupta K, Stapleton AE, Hooton TM, Roberts PI, Fennell CL, Stamm WE. 1998. Inverse association of H₂O₂-producing lactobacilli and vaginal *Escherichia coli* colonization in women with recurrent urinary tract infections. *J Infect Dis*. 178(2):446-450.
58. Hacker J, Blum-Oehler G, Muhldorfer I, Tschape H. 1997. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol Microbiol*. 23(6):1089-1097.
59. Hacker J, Hughes C. 1985. Genetics of *Escherichia coli* hemolysin. *Curr Top Microbiol Immunol*. 118(1):139-162.
60. Hagan EC, Lloyd AL, Rasko DA, Faerber GJ & Mobley HL. 2010. *Escherichia coli* global gene expression in urine from women with urinary tract infection. *PLoS Pathog*. 6(11):e1001187.
61. Haley KP & Skaar EP. 2012. A battle for iron: host sequestration and *Staphylococcus aureus* acquisition. *Microbes Infect*. 14(3):217-227.
62. Hantke K, Nicholson G, Rabsch W, Winkelmann G. 2003. Salmochelins, siderophores of *Salmonella enterica* and uropathogenic *Escherichia coli* strains, are recognized by the outer membrane receptor IroN. *Proc Natl Acad Sci USA*. 100(7):3677-3682.
63. He XL, Wang Q, Peng L, Qu YR, Puthiyakunnon S, Liu XL, Hui CY, Boddu S, Cao H, Huang SH. 2015. Role of uropathogenic *Escherichia coli* outer membrane protein T in pathogenesis of urinary tract infection. *Pathog Dis*. 73(3):pii:ftv006.
64. Heimer SR, Rasko DA, Lockatell CV, Johnson DE, Mobley HL. 2004. Autotransporter genes *pic* and *ths* are associated with *Escherichia coli* strains that cause acute pyelonephritis and are expressed during urinary tract infection. *Infect Immun*. 72(1):593-597.
65. Henderson IR & Nataro JP. 2001. Virulence Functions of Autotransporter Proteins. *Infect Immun*. 69(3):1231-1243.
66. Henderson IR, Czeczulin J, Eslava C, Noriega F, Nataro JP. Characterization of *pic*, a secreted protease of *Shigella flexneri* and enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 67(11):5587-5596.
67. Henderson IR, Navarro-Garcia F, Nataro JP. 1998. The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. *Trends Microbiol*. 6(9):370-378.
68. Hertting O, Chromek M, Slamova Z, Kadas L, Soderkvist M, Vainumae I, Tallvik T, Jacobson SH, Brauner A. 2008. Cytotoxic necrotizing factor 1 (CNF1) induces an inflammatory response in the urinary tract *in vitro* but not *in vivo*. *Toxicon*. 51(1):1544-1547.
69. Heesemann J, Hantke K, Vocke T, Saken E, Rakin A, Stojilkovic I, Berner R. 1993. Virulence of *Yersinia enterocolitica* is closely associated with siderophore production,

- expression of an iron-repressible outer membrane polypeptide of 65,000 Da and pesticin sensitivity. *Mol Microbiol.* 8(2):397-408.
70. Hilbert DW, Paulish TE, 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.
 71. Hoffmann JN, You HM, Hedberg EC, Jordan JA, McClintock MK. 2014. Prevalence of bacterial vaginosis and *Candida* among postmenopausal women in the United States. *J Gerontol B Psychol Sci Soc Sci.* Suppl 2:S205-214.
 72. Hui CY, Guo Y, He QS, Peng L, Wu SC, Cao H, Huang SH. 2010. *Escherichia coli* outer membrane p-protease OmpT confers resistance to urinary cationic peptides. *Microbiol Immunol.* 54(8):452-459.
 73. Island MD, Cui X, Foxman B, Marrs CF, Stamm WE, Stapleton AE, Warren JW. 1998. Cytotoxicity of Hemolytic, Cytotoxic Necrotizing Factor 1-Positive and -Negative *Escherichia coli* to Human T24 Bladder Cells. *Infect. Immun.* 66(7):3384-3389.
 74. Jadhav S, Hussain A, Devi S, Kumar A, Parveen S, Gandham N, Wieler LH, Ewers C, Ahmed N. 2011. Virulence characteristics and genetic affinities of multiple drug resistant uropathogenic *Escherichia coli* from a semi urban locality in India. *PLoS One.* 6(3):e18063.
 75. Johnson JR, Johnston B, Kuskowski M, Nougayrede JP, Oswald E. 2008. Molecular epidemiology and phylogenetic distribution of the *Escherichia coli* *pks* genomic island. *J Clin Microbiol.* 46(12):3906-3911.
 76. 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.
 77. Johnson JR. 2002. Evolution of pathogenic *Escherichia coli* Virulence mechanisms of a versatile pathogen. *Ed. Elsevier Science Inc.* 1(1): 55-77.
 78. 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.
 79. Johnson JR. 1991. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clin Microbiol Rev.* 4(1):80-128.
 80. 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. *Proct Natl Acad Sci USA.* 101(5): 1333-1338.
 81. Kammler M, Schon C, Hantke K. 1993. Characterization of the ferrous iron uptake system of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 175(1):6212-6219.
 82. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol.* 2(2):123-140.

83. Khasheii B, Anvari S, Jamalli A. 2016. Frequency evaluation of genes encoding siderophores and the effects of different concentrations of Fe ions on growth rate of uropathogenic *Escherichia coli*. *Iran J Microbiol.* 8(6):359-365.
84. King JE, Owaif HA, Jia J, Roberts IS. 2015. Phenotypic heterogeneity in expression of the K1 polysaccharide capsule of uropathogenic *Escherichia coli* and downregulation of the capsule genes during growth in urine. *Infect Immun.* 83(7):2605-2612.
85. Koh EI, Hung CS, Parker KS, Crowley JR, Giblin DE, Henderson JP. 2015. Metal selectivity by the virulence-associated yersiniabactin metallophore system. *Metallomics.* 7(6):1011-1022.
86. Koumans EH, Sternberg M, Bruce C, McQuillan G, Kendrick J, Sutton M, Markowitz LE. 2007. The prevalence of bacterial vaginosis in the United States, 2001-2004; associations with symptoms, sexual behaviors, and reproductive health. *Sex Transm Dis.* 34(11):864-869.
87. Kramer RA, Zandwijken D, Egmond MR, Dekker N. 2000. *In vitro* folding, purification and characterization of *Escherichia coli* outer membrane protease *ompT*. *Eur J Biochem.* 267(3):885-893.
88. Kuehn MJ, Kesty NC. 2005. Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. *Genes Dev.* (22):2645-2655.
89. Kunin CM, Polyak F, Postel E. 1980. Periurethral bacterial flora in women. Prolonged intermittent colonization with *Escherichia coli*. *JAMA.* 243(2):134-139.
90. Landgraf TN, Berlese A, Freitas F, Mlanezi M, Martinez R, Panunto-Castelo A. 2012. The ferric aerobactin receptor *lutA*, a protein isolated on agarose column, is not essential for uropathogenic *Escherichia coli* infection. *Rev Latino-Am Enfermagem.* 20(2):340-345.
91. Landraud L, Gilbert M, Popoff MR, Boquet P, Gauthier M. 2003. Expression of *cnf1* by *Escherichia coli* J96 involves a large upstream DNA region including the *hlyCABD* operon, and is regulated by the RfaH protein. *Mol Microbiol.* 47(6):1653-1667.
92. Landraud L, Gauthier M, Fosse T, Boquet P. 2000. Frequency of *Escherichia coli* strains producing the cytotoxic necrotizing factor (CNF1) in nosocomial urinary tract infections. *Letf Appl Microbiol.* 30(3):213-216.
93. Lane DJ, Pace B, Olsen GJ, Stahl DA, Sogin ML, Pace NR. 1985. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proc Natl Acad Sci USA.* 82(20):6955-6959.
94. Lawrence JG. 1999. Gene transfer, speciation, and the evolution of bacterial genomes. *Curr Opin Microbiol.* 2(5):519-523.
95. LeBouquenec C & Servin AL. 2006. Diffusely adherent *Escherichia coli* strains expressing Afa/Dr adhesins (Afa/Dr DAEC): hitherto unrecognized pathogens. *FEMS Microbiol Lett.* 256(2):184-194.

96. Lee JH, Subhadra B, Son YJ, Kim DH, Park HS, Kim JM, Koo SH, Oh MH, Kim HJ, Choi CH. 2015. Phylogenetic group distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties of uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from patients with urinary tract infections in South Korea. *Letf Appl Microbiol.* 62(1):84-90.
97. Lemonnier M, Landraud L, Lemichez E. 2007. Rho GTPase-activating bacterial toxins: from bacterial virulence regulation to eukaryotic cell biology. *FEMS Microbiol Rev.* 31(5):515-534.
98. Levine, MN. 1987. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J Infect Dis.* 155(3): 377-389.
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. Ling J, Pan H, Gao Q, Xiong L, Zhou Y, Zhang D, Gao S, Liu X. 2013. Aerobactin synthesis genes *iucA* and *iucC* contribute to the pathogenicity of avian pathogenic *Escherichia coli* O2 strain E058. *PLoS One.* 8(2):e57794.
101. Lipsky MS, Waters T, Sharp LK. 2000. Impact of vaginal antifungal products on utilization of health care services: evidence from physician visits. *J Am Board Fam Pract.* 13(3): 178-182.
102. Liu B, Knirel YA, Feng L, Perepelov AV, Senchenkova SN, Wang Q, Reeves PR, Wang L. 2008. Structure and genetics of *Shigella* O antigens. *FEMS Microbiol. Rev.* 32(4):627–653.
103. Lloyd AL, Rasko DA, Mobley HL. 2007. Defining genomic islands and uropathogen-specific genes in uropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 189(9): 3532–3546.
104. López-Banda DA, Carrillo-Casas EM, Leyva-Leyva M, Orozco-Hoyuela G, Manjarrez-Hernández AH, Arroyo-Escalante S, Moncada-Barrón D, Villanueva-Rencillas S, Xicohtencatl-Cortes J, Hernández-Castro R. 2014. Identification of virulence factors genes in *Escherichia coli* isolates from women with urinary tract infection in Mexico. *Biomed Res Int.* 2014:959206.
105. Luo Y, Ma Y, Zhao Q, Wang L, Guo L, Ye L, Zhang Y, Yang J. 2012. Similarity and divergence of phylogenies, antimicrobial susceptibilities, and virulence factor profiles of *Escherichia coli* isolates causing recurrent urinary tract infections that persist or result from reinfection. *J Clin Microbiol.* 50(12): 4002-4007.
106. Lüthje P & Brauner A. 2014. Virulence factors of Uropathogenic *E. coli* and their interaction with the host. *Adv Microb Physiol.* 65(1): 338-357.
107. Maluta RP, Logue CM, Casas MR, Meng T, Guastalli EA, Rojas TC, Montelli AC, Sadatsune T, de Carvalho Ramos M, Nolan LK, da Silveira WD. 2014. Overlapped sequence types (STs) and serogroups of avian pathogenic (APEC) and human extra intestinal pathogenic (ExPEC) *Escherichia coli* isolated in Brazil. *PLoS One.* 9(8):e105016.

108. Marrs CF, Zhang L, Foxman B. 2005. *Escherichia coli* mediated urinary tract infections: are there distinct uropathogenic *E. coli* (UPEC) pathotypes? *FEMS Microbiol Lett.* 252(2):183–190.
109. McCabe WR, Kaijser B, Olling S, Uwaydah M, Hanson LA. 1978. *Escherichia coli* in bacteremia: K and O antigens and serum sensitivity of strains from adults and neonates. *J Infect Dis.* 138(1):33-41.
110. Miranda-Estrada LI, Ruíz-Rosas M, Molina-López J, Parra-Rojas I, Gonzalez-Villalobos E, Castro-Alarcon N. 2016. Relationship between virulence factors, resistance to antibiotics and phylogenetic groups of uropathogenic *Escherichia coli* in two locations in Mexico. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 35(7):426-433.
111. Molina-Lopez J, Aparicio-Ozores G, Ribas-Aparicio RM, Gavilanes-Parra S, Chavez-Berrocal ME, Hernandez-Castro R, Manjarrez-Hernandez HA. 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.
112. Moll A, Manning PA, Timmins KN. 1980. Plasmid-determined resistance to serum bactericidal activity: a major outer membrane protein, the *traT* gene product, is responsible for plasmid-specified serum resistance in *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 28(2):359-367.
113. Momtaz H, Karimian A, Madani M, Safarpour F, Ranjbar R, Sarshar M, Souod N. 2013. Uropathogenic *Escherichia coli* in Iran: serogroup distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties. *Ann ClinMicrobiol Antimicrob.* 12(8):1-12.
114. Montenegro MA, Bitter-Suermann D, Timmis JK, Agüero ME, Cabello FC, Sanyal SC, Timmis KN. 1985. *traT* gene sequences, serum resistance and pathogenicity-related factors in clinical isolates of *Escherichia coli* and other gram-negative bacteria. *J Gen Microbiol.* 131(6):1511-1521.
115. Morales-Espinosa R, Hernandez-Castro R, Delgado G, Mendez JL, Navarro A, Manjarrez A, Cravioto A. 2016. UPEC strain characterization isolated from Mexican patients with recurrent urinary infections. *J Infect Dev Ctries.* 10(4):317-328.
116. Mulvey MA. 2002. Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol.* 4(5):257-271.
117. 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.
118. Munkhdelger Y, Gunregiav N, Doripurev A, Juniichiro N, Sarantuya J. 2017. Detection of virulence genes, phylogenetic group and antibiotic resistance of uropathogenic *Escherichia coli* in Mongolia. *J Infect Dev Ctries.* 11(1):51-57.
119. Nakra NA, Madan RP, Buckley N, Huber AM, Freiermuth JL, Espinoza L, Walsh J, Parikh UM, Penrose KJ, Keller MJ, Herold BC. 2016. Loss of Innate Host Defense Following Unprotected Vaginal Sex. *J Infect Dis.* 213(5):840-847.

120. Nataro JP, Seriwatana J, Fasano A, Maneval DR, Guers LD, Noriega F, Dubovsky F, Levine MM, Morris LG. 1995. Identification and cloning of a novel plasmid-encoded enterotoxin of enteroinvasive *Escherichia coli* and *shigella* strains. *Infect Immun.* 63(12):4721-4728.
121. Neilands JB & Nakamura K. 1985. Regulation of iron assimilation in microorganisms. *Nutr Rev.* 43(7):193-197.
122. Nipic D, Podlesek Z, Budic M, Crnigoj M, Zgur-Bertok D. 2013. *Escherichia coli* uropathogenic-specific protein, *Usp*, is a bacteriocin-like genotoxin. *J Infect Dis.* 208(10):1545-1552.
123. 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(9):2745-2752.
124. Ochman H, Lawrence JG, Groisman EA. 2000. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature.* 405(6784):299-304.
125. Ooka T, Terajima J, Kusumoto M, Iguchi A, Kurokawa K, Ogura Y, Asadulghani M, Nakayama K, Murase K, Ohnishi M, Iyoda S, Watanabe H, Hayashi T. 2009. Development of a multiplex PCR-based rapid typing method for enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains. *J Clin Microbiol* 47(9):2888-2894.
126. Ostblom A, Adlerberth I, Wold AE, Nowrouzian FL. 2011. Pathogenicity island markers, virulence determinants *malX* and *usp*, and the capacity of *Escherichia coli* to persist in infants' commensal microbiotas. *Appl Environ Microbiol.* 77(7):2303-2308.
127. Otto BR, Van-Dooren JM, Nuijens JH, Luirink J, Oudega B. 1998. Characterization of a hemoglobin protease secreted by the pathogenic *Escherichia coli* strain EB1. *J Exp. Med.* 188(6):1091-1103.
128. Padilla C, Padilla A, Lobos O. 2014. Virulence genes and antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* taken from women with vaginitis in Talca, Chile. *J Infect Dev Ctries.* 8(3):265-270.
129. 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):1-7.
130. Paniagua-Contreras GL, Monroy-Pérez E, Rodríguez-Moctezuma JR, Domínguez-Trejo P, Vaca-Paniagua F, Vaca S. 2015. Virulence factors, antibiotic resistance phenotypes and O-serogroups of *Escherichia coli* strains isolated from community-acquired urinary tract infection patients in Mexico. *J Microbiol Immunol Infect.* 50(4):478-485.
131. Paniagua-Contreras 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 FESI.* 1(1):43-70.

132. Parham NJ, Pollard SJ, Desvaux M, Scott-Tucker A, Liu C, Fivian A, Henderon IR. 2005. Distribution of the serine protease autotransporters of the Enterobacteriaceae among extraintestinal clinical isolates of *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 43(8):4076-4082.
133. Parreira VR, Gyles CL. 2003. A novel pathogenicity island integrated adjacent to the *thrW* tRNA gene of avian pathogenic *Escherichia coli* encodes a vacuolating autotransporter protein. *Infect Immun*. 71(9):5087-5096.
134. Poey ME, Albini M, Saona G, Lavina M. 2012. Virulence profiles in uropathogenic *Escherichia coli* isolated from pregnant women and children with urinary tract abnormalities. *Microb Pathog*. 52(5):292-301.
135. Provence DL & Curtiss R. 1994. Isolation and characterization of a gene involved in hemagglutination by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Infect Immun*. 62(4):1369-1380.
136. Pattus F, Massotte D, Wilmsen HU, Lakey J, Tsernoglou D, Tucker A, Parker MW. 1990. Colicins: prokaryotic killer-pores. *Experientia*. 46(2):180-192.
137. Rakin A, Noelting C, Schubert S, Heesemann J. 1999. Common and Specific Characteristics of the High-Pathogenicity Island of *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun*. 67(10):5265-5274.
138. Rashki A. 2014. Cervico-vaginopathogenic *Escherichia coli* in iran: Serogroup distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties. *Microb Pathog*. 75(1): 29-34.
139. Rasko DA, Phillips JA, Li X, Mobley HL. 2001. Identification of DNA sequences from a second pathogenicity island of uropathogenic *Escherichia coli* CFT073: probes specific for uropathogenic populations. *J Infect Dis*. 184(8):1041-1049.
140. Reeves PP, Wang L. 2002. Genomic organization of LPS-specific loci. *Curr Top Microbiol Immunol*. 264(1):109–135.
141. Reeves P. 1995. Role of O-antigen variation in the immune response. *Trends Microbiol*. 3(10):381–386.
142. Reidl J, Boos W. 1991. The *malX malY* operon of *Escherichia coli* encodes a novel enzyme II of the phosphotransferase system recognizing glucose and maltose and an enzyme abolishing the endogenous induction of the maltose system. *J Bacteriol*. 173(15):4862-4876.
143. Ren Y, Liu B, Cheng J, Liu F, Feng L, Wang L. 2008. Characterization of *Escherichia coli* O3 and O21 O antigen gene clusters and development of serogroup-specific PCR assays. *J Microbiol Methods*. 75(2):329–334.
144. Restieri C, Garriss G, Locas MC, Dozois CM. 2007. Autotransporter-encoding sequences are phylogenetically distributed among *Escherichia coli* clinical isolates and reference strains. *Appl Environ Microbiol*. 73(5):1553-1562.

145. Rijavec M, Müller-Premru M, Zakotnik B, Zgur-Bertok D. 2008. Virulence factors and biofilm production among *Escherichia coli* strains causing bacteraemia of urinary tract origin. *J Med Microbiol.* 57(Pt 11):1329-1334.
146. Roberts IS. 1996. The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 50(1):285-315.
147. Rodriguez-Siek 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. *Microbiology.* 151(6):2097-2110.
148. Roos V, Ulett GC, Schembri MA, Klemm P. 2006. The asymptomatic bacteriuria *Escherichia coli* strain 83972 outcompetes uropathogenic *E. coli* strains in human urine. *Infect Immun.* 74(1): 615-624.
149. 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):e329.
150. Runyen-Janecky LJ, Reeves SA, Gonzales EG, Payne SM. 2003. Contribution of the *Shigella flexneri* Sit, Iuc, and Feo Iron Acquisition Systems to Iron Acquisition In Vitro and in Cultured Cells. *Infect Immun.* 71(4):1919-1928.
151. Russo TA & Johnson JR. 2003. Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes Infect.* 5(5):449-456.
152. Russo TA, Carlino UB, Johnson JR. 2001. Identification of a New Iron-Regulated Virulence Gene, *ireA*, in an Extraintestinal Pathogenic Isolate of *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 69(10):6209-6216.
153. Sabitha B, Vimal K, Geetha RK. 2014. Determination of phenotypic expression of the fimbriae and hemolysin of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC). *Int J Adv Med.* 1(1):13-18.
154. Sáenz-López E, Cossa A, Benmessaoud R, Madrid L, Moraleta C, Villanueva S, Tligui H, Moiane B, Alami H, Massora S, Bezaad R, Mandomado I, Bosch J, Vila J, Bassat Q, Soto SM. 2016. Characterization of vaginal *Escherichia coli* isolated from pregnant women in two different African sites. *PLoS One.* 11(7):e0158695.
155. Salehzadeh A, Zamani H. 2017. Characterization of (Uropathogenic) *E. coli* isolated from urinary tract infections: phylogenetic typing and distribution of virulence-associated traits. *Br J Biomed Sci.* 75(1):40-42.
156. Samuelsson P, Hang L, Wullt B, Irjala H, Svanborg C. 2004. Toll-like receptor 4 expression and cytokine responses in the human urinary tract mucosa. *Infect Immun.* 72(6):3179-3186.
157. Sannes MR, Kuskowski MA, Owens K, Gajewski A, Johnson JR. 2004. Virulence factor profiles and phylogenetic background of *Escherichia coli* isolates from veterans with bacteremia and uninfected control subjects. *J Infect Dis.* 190(12):2121-2128.

158. Saunders NJ, Hood DW, Moxon ER. 1999. Bacterial evolution: bacteria play pass the gene. *Curr Biol.* 9(1):180-183.
159. Savarino SJ, McVeigh A, Watson J, Cravioto A, Molina J, Echeverria P, Bhan MK, Levine MM, Fasano A. 1996. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin is not restricted to enteroaggregative *E. coli*. *J Infect Dis.* 173(4):1019-1022.
160. 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 reconstituted human vaginal epithelium. *Infect Immun.* 71(6): 3227-3234.
161. Scheutz F, Strockbine NA. 2005. Genus I *Escherichia* Castellani and Chalmers. Bergey's Manual of systematic bacteriology. 2nd edition, volume two. Garrity GM, Ed., *Bergey's Manual Trust USA*, 607-624.
162. Schmidt H, Hensel M. 2004. Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clin Microbiol Rev.* 17(1):14-56.
163. Schubert S, Rakin A, Heesemann J. 2004. The Yersinia high-pathogenicity island (HPI): evolutionary and functional aspects. *Int J Med Microbiol.* 294(2):83-94.
164. Schubert S, Picard B, Gouriou S, Heesemann J, Denamur E. 2002. Yersinia high-pathogenicity island contributes to virulence in *Escherichia coli* causing extraintestinal infections. *Infect Immun.* 70(9):5335-5337.
165. Schubert S, Rakin A, Karch H, Carniel E, Heesemann J. 1998. Prevalence of the "high-pathogenicity island" of Yersinia species among *Escherichia coli* strains that are pathogenic to humans. *Infect Immun.* 66(2):480-485.
166. Smith YC, Rasmussen SB, Grande KK, Conran RM, O'Brien AD. 2008. Hemolysin of uropathogenic *Escherichia coli* evokes extensive shedding of the uroepithelium and hemorrhage in bladder tissue within the first 24 hours after intraurethral inoculation of mice. *Infect Immun.* 76(7):2978-2990.
167. Smart S, Singal A, Mindel A. 2004. Social and sexual risk factors for bacterial vaginosis. *Sex Transm Infect.* 80(1):58-62.
168. Snyder JA, Haugen BJ, Buckles EL, Lockatell 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.
169. Soto SM, Guiral E, Bosch J, Vila J. 2009. Prevalence of the *set-1B* and *astA* genes encoding enterotoxins in uropathogenic *Escherichia coli* clinical isolates. *Microb Pathog.* 47(6):305-307.
170. Sousa CP. 2006. The versatile strategies of *Escherichia coli* pathotypes: a mini review. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis.* 12(3):363-373.

171. Spurbeck RR, Dinh PC, Walk ST, Stapleton AE, Hooton TM, Nolan LK, Kim KS, Johnson JR, Mobley HL. 2012. *Escherichia coli* Isolates That Carry *vat*, *fyuA*, *chuA*, and *yfcV* efficiently colonize the Urinary Tract. *Infect Immun.* 80(12):4115-4122.
172. Spurbeck RR, Stapleton AE, Johnson JR, Walk ST, Hooton TM, Mobley HL. 2011. Fimbrial profiles predict virulence of uropathogenic *Escherichia coli* strains: contribution of *ygi* and *yad* fimbriae. *Infect Immun.* 79(12):4753-4763.
173. Subashchandrabose S, Mobley HL. 2015. Virulence and Fitness Determinants of Uropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr.* 3(4):1-32.
174. Takle GW, Toth IK, Brurberg MB. 2007. Evaluation of reference genes for real-time RT-PCR expression studies in the plant pathogen *Pectobacterium atrosepticum*. *BMC Plant Biol.* 7:50.
175. Tarchouna M, Ferjani A, Ben-Selma W, Boukadida J. 2013. Distribution of uropathogenic virulence genes in *Escherichia coli* isolated from patients with urinary tract infection. *Int J Infect Dis.* 17(6):450-453.
176. Tchoudomirova K, Mardh PA, Hellberg D. 2001. Vaginal microbiological flora, and behavioural and clinical findings in women with vulvar pain. *BJOG.* 108(5):451-455.
177. Telli M, Guiral E, Martínez JA, Almela M, Bosch J, Vila J, Soto SM. 2010. Prevalence of enterotoxins among *Escherichia coli* isolates causing bacteraemia. *FEMS Microbiol Lett.* 306(2):117-121.
178. Valle J, Da Re S, Henry N, Fontaine T, Balestrino D, Latour-Lambert P, Ghigo JM. 2006. Broad-spectrum biofilm inhibition by a secreted bacterial polysaccharide. *Proc Natl Acad Sci USA.* 103(33):12558-12563.
179. Vargas M, Gascon J, Jimenez De Anta MT, Vila J. 1999. Prevalence of Shigella enterotoxins 1 and 2 among *shigella* strains isolated from patients with traveler's diarrhea. *J Clin Microbiol.* 37(11):3608-3611.
180. Vejborg RM, Hancock V, Schembri MA, Klemm P. 2011. Comparative Genomics of *Escherichia coli* Strains Causing Urinary Tract Infections. *Appl Environ Microbiol.* 77(10):3268-3278.
181. Waksman G & Hultgren SJ. 2009. Structural biology of the chaperone-usher pathway of pilus biogenesis. *Nat Rev Microbiol.* 7(11):765-774.
182. Wang S, Deng K, Zaremba S, Deng X, Lin C, Wang Q, Lou-Tortorello M, Zhang W. 2009. Transcriptomic response of *Escherichia coli* O157:H7 to oxidative stress. *Appl Environ Microbiol.* 75(19):6110-6123.
183. Wang MC, Tseng CC, Wu AB, Lin WH, Teng CH, Yan JJ, Wu JJ. 2013. Bacterial characteristics and glycemic control in diabetic patients with *Escherichia coli* urinary tract infection. *J Microbiol Immunol Infect.* 46(1):24-29.
184. Waters VL & Crosa JH. 1991. Colicin V virulence plasmids. *Microbiol Rev.* 55(3):437-450.

185. Weiss J, Victor M, Cross AS, Elsbach P, 1982. Sensivity of K-1 encapsulated *Escherichia coli* to killing by the bactericidal permeability-increasing protein of rabbit and human-neutrophils. *Infect Immun.* 38(3):1149-1153.
186. Whitfield C. 2006. Biosynthesis and assembly of capsular polysaccharides in *Escherichia coli*. *Annu Rev Biochem.* 75(1):39-68.
187. Wiles TJ, Kulesus RR, Mulvey MA. 2008. Origins and Virulence Mechanisms of Uropatogenic *Escherichia coli*. *Exp Mol Pathol.* 85(1):11-19.
188. Williams PH. 1979. Novel iron uptake system specified by *CoIV* plasmids: an important component in the virulence of invasive strains of *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 26(3):925-932.
189. Yamamoto S, Nakano M, Terai A, Yuri k, Nakata k, Nair GB, Kurazono H, Ogawa O. 2001. The presence of the virulence island containing the *USP* gene in uropathogenic *Escherichia coli* is associated with urinary tract infection in an experimental mouse model. *J Urol.* 165(4):1347-1351.
190. Yamamoto S, Terai A, Yuri K, Kurazono H, Takeda Y, Yoshida O. 1995. Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 12(2):85–90.
191. Yan F, Polk DB. 2004. Commensal bacteria in the gut: learning who our friends are. *Curr Opin Gastroenterol.* 20(6):565–571.
192. Young IG & Gibson F. 1979. Isolation of enterochelin from *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* 56(1):394-398.
193. Yun KW, Kim HY, Park HK, Lim IS. 2014. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* of urinary tract infections and asymptomatic bacteriuria in children. *J Microbiol Immunol Infect.* 47(6):455-461.
194. Zhao L, Chen X, Zhu X, Yang W, Dong L, Xu X, Gao S, Liu X. 2009. Prevalence of virulence factors and antimicrobial resistance of uropathogenic *Escherichia coli* in Jiangsu province (China). *Urology.* 74(3):702-707.
195. Zinnah MA, Bari MR, Islam MT, Hossain MT, Rahman MT, Haque MH, Babu SAM, Ruma RP, Islam MA. 2007. Characterization of *Escherichia coli* isolated from samples of different biological and environmental sources. *Bangl J Vet Med.* 5(1):25-32.
196. Zipfel PF, Wurznner R, Skerk C. 2007. Complement evasion of pathogens: Common strategies are shared by diverse organisms. *Mol Immun.* 44(16):3850-3857.