



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**DISTRIBUCIÓN DE LOS GENES DE CAPTACIÓN DE
HIERRO EN CEPAS PERIODONTALES DE
*Escherichia coli***

**T E S I S
PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I Ó L O G O**

PRESENTA:

IVÁN ENCISO FALCÓN

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. GLORIA LUZ PANIAGUA CONTRERAS



Los Reyes Iztacala, Estado de México, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

All of these lines across my face, tell you the story of who I am, so many stories of where I've been, and how I got to where I am; but these stories don't mean anything when you've got no one to tell them to.

Sara Ramírez – "The Story"

Dedicatoria

A mi madre Gabriela Falcón, quien siempre ha estado conmigo desde el segundo 1, quien me ha visto en mis mejores y peores momentos, me ha secado lágrimas y sacado carcajadas, ella mi refugio, a quien debo mi vida y ha forjado con amor quien soy;

A mi padre Gabriel García, la parte técnica de mi crianza, que nunca me ha dejado de enseñar lo que más importa en esta vida: los padres; que incluso con las altas y bajas, siempre ha estado para mí;

A mi familia, que siempre me han dado el empujón que a veces necesito para no darme por vencido, con risas y en ocasiones dureza, a ustedes les debo más de lo que creen;

A la Dra. Gloria Luz Paniagua, mi mentora, quien me enseñó dentro y fuera del aula, sembró semillas de conocimiento que el día de hoy se están cosechando, que me brindó un lugar en su laboratorio y yo a ella en mi corazón, infinitas gracias;

Al Dr. Eric Monroy, quien me ha acompañado en este proyecto, quien me instruyó con paciencia y pasión los conocimientos que hoy tengo y que me enseñó que la ciencia es todo, menos aburrida, infinitas gracias;

A Paty y Susi, quienes me apoyaron desde el día 1 que llegué al laboratorio, me mostraron lo divertido que es trabajar en compañía, y que lo más importante es compartir lo que sabemos a otros, ustedes se ganaron mi corazón y confianza, mil y un gracias;

A Don Julio Falcón, este trabajo es en especial para ti, tus enseñanzas, cariño y compañía son el reflejo del hombre en el que hoy me he convertido. Y aunque físicamente ya no estás, tu esencia está siempre presente, en el café de las seis, en canciones viejas, en el mes de abril, pero también en agosto, en tu chamarra que alivia mi frío y calienta el corazón. No me alcanzan las palabras para seguir agradeciéndote hasta donde me has llevado, incluso cuando en mi camino sólo quedan un par de huellas. Un abrazo hasta el cielo, *Julis*.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, que me brindó desde mi educación media superior un espacio para cultivar el conocimiento.

A la FES Iztacala por ser mi segundo hogar, lugar donde desarrolle mis virtudes y aptitudes no sólo académicas, sino de la vida incluso.

A la Dra. Gloria Luz Paniagua, que me brindó un espacio en su laboratorio.

Al Dr, Eric Monroy, por sus enseñanzas.

A mis compañeros de laboratorio, que hicieron del trabajo lo más ameno, entre dificultades técnicas e ímpetu logramos sacar a flote este pequeño barco, mis más sinceras gracias a ustedes, mis niños.

A mis amistades, ustedes quienes siempre estaban ahí cuando las cosas iban no tan bien, cuando salían de maravilla y cuando no sabíamos ni nuestros nombres, siempre disfrutando lo que esta carrera nos ofreció y lo que está por venir.

Y a todas aquellas personas que me han acompañado a lo largo de este viaje llamado vida universitaria, que, aunque pareciera que está culminando, es sólo el comienzo.

Índice	
Resumen	6
Introducción.....	7
Enfermedad periodontal	7
Características de <i>Escherichia coli</i>	9
Factores de virulencia.....	9
Genes que codifican para sistemas de captación de hierro.....	11
Antecedentes.....	17
Objetivos.....	19
Objetivo general.....	19
Objetivos particulares	19
Material y métodos.....	19
Origen de las cepas de <i>E. coli</i>	19
Resiembra de las cepas y extracción de DNA	19
Identificación de <i>E. coli</i> por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).....	20
Análisis de los amplicones por electroforesis en gel de agarosa	20
Detección de genes de virulencia por PCR.....	21
Cultivo de <i>E. coli</i> para la extracción de RNAm	22
Reverso-transcripción.....	24
Expresión de los marcadores de virulencia por PCR en tiempo real.....	24
Resultados.....	25
Origen de las cepas	25
Detección de <i>E. coli</i> por PCR.....	26
Detección de genes de virulencia de <i>E. coli</i> relacionados a la enfermedad periodontal	27
Detección de la expresión de los genes de sistemas de captación de hierro	29
Patrones de expresión de genes de virulencia en las cepas de <i>E. coli</i>	35
Discusión.....	35
Pacientes estudiados.....	35
Detección de los genes de captación de hierro en las cepas	36
Expresión de los genes de captación de hierro en las cepas	37
Conclusiones.....	39
Bibliografía.....	40

Resumen

Introducción: La enfermedad periodontal es un padecimiento inflamatorio crónico ocasionado por la acumulación de biopelículas de microorganismos alrededor de los dientes (encías), que causan la destrucción progresiva de las estructuras de soporte de los dientes (ligamento y hueso alveolar). Sin embargo, *Escherichia coli* ha sido identificado como un colonizador secundario asociado a la periodontitis. La patogenicidad de *E. coli* se debe a los diferentes factores de virulencia que posee, entre los que se encuentran los genes que codifican para los sistemas de captación de hierro.

Objetivo: Caracterizar molecularmente los genes involucrados en la captación de hierro en cepas de *E. coli* aisladas de infecciones periodontales.

Material y métodos: Se analizaron cinco cepas de *E. coli* previamente aisladas de pacientes con enfermedad periodontal de la clínica de Endoperiodontología de la FES Iztacala. La identificación de *E. coli* se realizó mediante la amplificación de la región 16s del gen *rRNA* por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). Las cepas de *E. coli* fueron crecidas en los medios BHI (Infusión Cerebro-Corazón) y de soya tripticaseína (ST) a 37°C por 24 hrs en agitación constante. El RNA fue extraído de la pastilla celular bacteriana utilizando el equipo robotizado QIAcube alimentado con el equipo comercial RNeasy (QIAGEN). La síntesis de la cadena complementaria del DNA se realizó utilizando el equipo comercial Reverse Transcription QuantiTect (QIAGEN). La determinación de la expresión de los genes de virulencia de *E. coli* fue realizada por PCR de tiempo real.

Resultados: El 60% (n=3) de los pacientes fueron mujeres, y el 40% (n=2) hombres. El rango de edad más abundante fue el de 71-80 (60%; n=3). El 100% (n=5) de las cepas crecidas tanto en BHI como el caldo de Soya Tripticaseína expresó los genes de captación de hierro: *iroN*, *feoB* e *irp2*; y 60% (n=3) de las cepas expresó el gen *fyuA*. El patrón de expresión más frecuente (3/5) entre las cepas fue: *feoB / iroN / fyuA / irp2*.

Conclusiones: Los resultados evidenciaron que los porcentajes de expresión de los distintos genes de sistemas de captación de hierro de *E. coli* fueron muy semejantes durante el cultivo en medio BHI y el caldo de Soya Tripticaseína (ST). La expresión de los genes de captación de hierro podría incrementar la agudeza de las infecciones periodontales asociadas por *E. coli*.

Introducción

Enfermedad periodontal

La enfermedad periodontal es un padecimiento inflamatorio crónico ocasionado por la acumulación de biopelículas de microorganismos alrededor de los dientes (encías), que promueven la formación de bolsas periodontales. Las bolsas periodontales, con el tiempo, causan la destrucción progresiva de las estructuras de soporte de los dientes (ligamento y hueso alveolar), lo que puede conducir a la pérdida de piezas dentales (Bascones y Figuero, 2005). En la enfermedad periodontal se han caracterizado más de 200 especies bacterianas, algunas de ellas pueden ocasionar infecciones sistémicas alcanzando a diferentes órganos (Peña *et al.*, 2012).

En el origen del proceso infeccioso y de los mecanismos que conducen al desarrollo de signos y síntomas de la enfermedad, es importante como primer paso el establecimiento y la interacción entre bacterias y hospedero, que va a estar determinado por los diferentes factores de virulencia para causar daño en las células del hospedero, y al mismo tiempo poder evadir los mecanismos de defensa. Entre los diferentes mecanismos de virulencia bacteriana se encuentran: adherencia a las células del hospedero, invasividad, toxigenicidad y capacidad para evadir el sistema inmunitario del hospedero. Si las bacterias o las reacciones inmunológicas lesionan al hospedero lo suficiente, la afección se manifiesta (Peña *et al.*, 2012).

Las enfermedades periodontales causadas por la placa dentobacteriana han sido tradicionalmente divididas en dos categorías: gingivitis y periodontitis. La gingivitis (figura 1) se caracteriza por la presencia de inflamación gingival sin pérdida de inserción del tejido conectivo, mientras que la periodontitis (figura 2) se manifiesta por inflamación gingival en los sitios en los que se ha producido una migración de la inserción epitelial a las superficies radiculares, acompañada de una pérdida de tejido conectivo y hueso alveolar. En la mayoría de los pacientes, el aumento en la profundidad del sondaje o la formación de bolsas periodontales acompaña al desarrollo de la periodontitis. Las gingivitis y las periodontitis inducidas por placa bacteriana son las más frecuentes de todas las formas de enfermedad periodontal.



Figura 1. Paciente con diagnóstico de gingivitis. Tomado de Periocentrum, Especialistas en periodoncia e implantes <https://periocentrum.com/tratamiento-gingivitis/>



Figura 2. Paciente con diagnóstico de periodontitis. Tomado de *Severidad y extensión de periodontitis en ancianos de tres grupos aislados de Pachuca* (Domínguez et al., 2016).

Además, se consideraron siete categorías mayores de enfermedades periodontales destructivas: 1. Periodontitis crónica; 2. Periodontitis agresiva localizada; 3. Periodontitis agresiva generalizada; 4. Periodontitis como manifestación de una enfermedad sistémica; 5. Periodontitis/Gingivitis necrosante ulcerativa; 6. Abscesos del periodonto; 7. Lesiones combinadas endodóncicas y periodontales. La periodontitis puede ser una manifestación de, al menos, 16 enfermedades sistémicas. En la mayoría de estas enfermedades sistémicas hay tanto una disminución en la resistencia del hospedero a las infecciones, como alteraciones del tejido conectivo gingival que aumentan la susceptibilidad a la degradación de la causa inflamatoria (Armitage, 2005).

Diferentes bacterias anaerobias Gram negativas como *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Treponema denticola* y *Tannarella forsythia* causan enfermedad periodontal (Mombelli, 2017) y

también se han identificado otras anaerobias facultativas, como *Escherichia coli*, que es considerada una bacteria colonizadora secundaria relacionada a la periodontitis (Estemalik *et al.*, 2017).

Características de *Escherichia coli*

Escherichia coli es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo de la familia *Enterobacteriaceae*, tribu *Escherichia*. Esta bacteria coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento, por lo que se le considera un microorganismo de la microbiota intestinal, pero existen cepas que pueden ser patógenas y causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos, entre ellos diarrea. Con base en su mecanismo de patogenicidad y cuadro clínico, las cepas de *E. coli* causantes de diarrea se clasifican en seis grupos: enterotoxigénica (ETEC), enterohemorrágica también conocidas como productoras de toxina Vero o toxina semejante a Shiga (EHEC o VTEC o STEC), enteroinvasiva (EIEC), enteropatógena (EPEC), enteroagregativa (EAEC) y adherencia difusa (DAEC) (Rodríguez, 2002).

Las cepas patógenas de *E. coli* han sido reconocidas durante mucho tiempo como agentes de la diarrea transmitida por los alimentos. No siempre se tiene en cuenta que *E. coli* es una causa importante de enfermedades extraintestinales, es decir, enfermedades que se producen en lugares del cuerpo que no son el tracto gastrointestinal. Entre ellas se encuentran el tracto urinario, el sistema nervioso central, el sistema circulatorio y el sistema respiratorio. Las cepas diarreicas de *E. coli* no suelen causar enfermedades extraintestinales, y las que causan enfermedades extraintestinales no suelen inducir diarrea. Las cepas de *E. coli* que inducen enfermedades extraintestinales se denominan *E. coli* patógena extraintestinal (ExPEC). En términos de morbilidad y mortalidad, la ExPEC tiene un gran impacto en la salud pública (Smith *et al.*, 2007).

Factores de virulencia

La patogenicidad de *E. coli* se debe a los múltiples factores de virulencia que posee (tabla 1), que incluye a los genes que codifican para adhesinas (*fim*, *afal*, *sfa*, *iha*,

tsh, *papC*, *papG I*, *II* y *III*), que aparecen como fimbrias (o pili), facilitando la colonización de *E. coli* al adherirse a las células epiteliales del hospedero.

Asimismo, las bacterias y el hospedero compiten por el hierro disponible, que es necesario para el transporte y almacenamiento de oxígeno, la síntesis de DNA, el transporte de electrones y el metabolismo de los peróxidos. Las bacterias patógenas, incluidas las UPEC, han desarrollado formas de acceder al hierro mediante la codificación de genes que producen sistemas de transporte de hierro, denominados sideróforos (*iroN*, *fyuA*, *feoB*, *iucC*, *irp2* e *ireA*).

La mayoría de las cepas hemolíticas de *E. coli* secretan una toxina proteica citolítica termolábil conocida como hemolisina alfa, que está codificada por un operón policistrónico, compuesto por cuatro genes dispuestos en el orden *hly-CADB*. El producto de *hlyC* es importante en la activación de la toxina hemolítica, que es el producto del gen *hlyA*. Los productos génicos de *hlyB* y *hlyD*, junto con *ToiC*, participan en la secreción de la hemolisina a través de la pared celular bacteriana.

También expresan proteínas de la membrana externa, como la *traT* y la *Iss*, que pueden aumentar la resistencia al suero al evitar la activación del complemento. La resistencia de *E. coli* a la muerte por suero es el resultado de los efectos individuales o combinados del polisacárido capsular, las cadenas laterales del polisacárido O y las proteínas de superficie (Kudinha, 2017).

Función	Gen	Descripción
Adhesinas	<i>fimH</i>	Fimbria tipo 1
	<i>papG II</i>	Pili asociado a pielonefritis alelo G II
	<i>papH</i>	Pili asociado a pielonefritis
	<i>sfa</i>	Fimbria S
	<i>iha</i>	Adhesina homóloga superficial receptora de hierro
Sistemas de captación de hierro	<i>iroN</i>	Receptor del sideróforo catecolato
	<i>feoB</i>	Transportador de hierro ferroso B

	<i>irp2</i>	Gen hierro-represor asociado a la síntesis de yersiniabactina
	<i>fyuA</i>	Receptor de sideróforo yersiniabactina
	<i>iucC</i>	Implicado en la síntesis de aerobactina
	<i>ireA</i>	Elemento que responde al hierro
Protectinas	<i>KpsMT II</i>	Antígeno capsular K
	<i>traT</i>	Proteína de la membrana externa
Toxinas	<i>cnf1</i>	Factor necrotizante 1
	<i>hlyA</i>	Hemolisina alfa
	<i>usp</i>	Proteína específica uropatógena

Tabla 1. Genes que codifican para diferentes factores de virulencia de *E. coli*

Genes que codifican para sistemas de captación de hierro

El hierro es un factor importante para el crecimiento de la mayoría de las bacterias, ya que es un elemento fundamental en el metabolismo celular. Sin embargo, a pesar de la concentración requerida para el crecimiento celular, el hierro es un compuesto biológicamente limitante porque la mayor parte está unido a proteínas de almacenamiento como la ferritina, la hemoglobina y la mioglobina, y extracelularmente a la transferrina y la lactoferrina; lo que constituye un factor limitante para el crecimiento y proliferación bacteriano (Skaar, 2010).

Con el fin de obtener hierro libre, algunas bacterias secretan proteínas quelatantes con alta afinidad, denominados sideróforos, los cuales son compuestos de bajo peso molecular (300 – 2,000 Da) (Cárdenas *et al.*, 2014). Estos compuestos son secretados al medio circundante dónde quelan muy eficazmente al hierro férrico (Fe^{3+}). Los microorganismos adquieren luego el complejo Fe^{3+} - sideróforo mediante un transporte activo específico a través de receptores de la pared, situados en la membrana externa en las bacterias Gram negativas (Lemos, 2016).

La detección del hierro en el medio extracelular por parte de la bacteria involucra un control transcripcional mediado por el regulador de la expresión de genes involucrados en la captación de Fe (FUR, por sus siglas en inglés, Ferric Uptake Regulator) el cual, en presencia del metal se une a secuencias específicas en la región promotora de los genes regulados por este ion con el fin de inhibir su expresión. En ausencia de hierro, FUR pierde la capacidad de unirse y los genes pueden transcribirse. En *E. coli* la expresión de diversos genes que codifican para proteínas involucradas en la captación, proceso y almacenamiento de Fe, son reguladas por el sistema FUR (Skaar 2010).

En bacterias Gram negativas, el hierro biodisponible debe atravesar la membrana externa hasta el periplasma y de ahí ser internalizado al citoplasma a través de la membrana celular (figura 3). Para ello, la célula posee receptores de membrana externa y un complejo que le suministra la energía necesaria para el transporte del hierro al periplasma (Garrido, 2005). Además, generalmente poseen múltiples receptores específicos de sideróforos, se sabe que *Escherichia coli* K-12 posee al menos seis tipos de receptores diferentes, los cuales son capaces de adquirir hasta ocho complejos distintos hierro-sideróforo (Pérez y Fernández, 2010). Está demostrado que la producción de sideróforos es un factor de virulencia clave para que una bacteria potencialmente patógena pueda desarrollar el proceso infeccioso (Lemos, 2016).

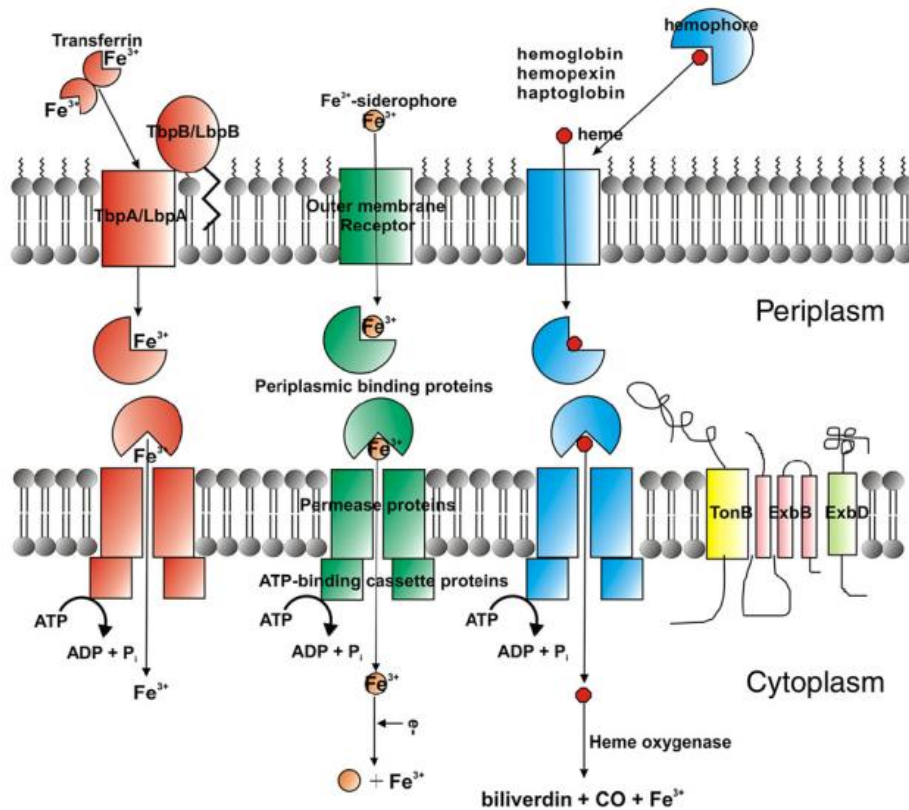


Figura 3. Captura de hierro en bacterias Gram negativas. Tomado de *Biología estructural de la captación bacteriana de hierro* (Krewulak y Vogel, 2008).

El hierro férrico es transportado en *E. coli* por una serie de compuestos quelantes. Casi todos los sideróforos que se han identificado contienen como grupo ligando al ácido hidroxámico, catecol o al ácido hidroxicarboxílico. De acuerdo con el grupo funcional quelador del hierro, los sideróforos pueden clasificarse en: catecolatos, fenolatos, hidroximatos e hidroxicarboxilatos, que forman complejos octaédricos hexadentados con el metal. Algunos sideróforos son más eficaces que otros para quelar el hierro (Aguado *et al.*, 2012).

Dado que el hierro férrico (Fe^{3+}) es prácticamente insoluble a pH neutro, muchos microorganismos aeróbicos secretan sideróforos para su suministro de hierro. Se han secuenciado y analizado seis sistemas diferentes de transporte de hierro (Fe^{3+}) por sideróforos en *E. coli*, y se han caracterizado muchos más en otras bacterias Gram negativas (Kammler *et al.*, 1993).

El transporte de hierro a través de la membrana externa mediante citrato, ferricromo, enterobactina, aerobactina, yersiniabactina y hemo es catalizado por proteínas altamente específicas y a través de la membrana citoplasmática por sistemas de transporte ABC con menor especificidad (Braun, 2003).

Los sideróforos bacterianos pueden dividirse en tres grandes familias en función de los grupos químicos que intervienen en la fijación del hierro: catecolato, hidroxamato y carboxilato. Todas las familias utilizan átomos de oxígeno con carga negativa para coordinar el hierro férrico, pero cada una de ellas tiene características distintas que afectan a su afinidad por el hierro. Además de estas tres familias, se han caracterizado muchos sideróforos de tipo mixto (figura 4), lo que complica la simple visión de "tres familias" de los sideróforos. Una familia de sideróforos bien estudiada es la de los catecolatos. Los sideróforos basados en catecolatos forman anillos de quelatos de 5 miembros y tienen la mayor afinidad por el hierro férrico de cualquier familia. La familia de los sideróforos hidroxamatos también forman anillos de quelato de cinco miembros, pero tienen menor afinidad por el hierro que los sideróforos de catecolato. En general, a pH fisiológico, los sideróforos de carboxilato tienen menos éxito en la quelación del hierro que las familias de catecolato e hidroxamato. En cambio, los sideróforos de carboxilato son más eficientes en la quelación del hierro férrico a pH ácido, donde los sideróforos de catecolato e hidroxamato permanecen protonados. Por lo tanto, los sideróforos de carboxilato pueden ser útiles para entornos ácidos, pero se prevé que los sideróforos basados en catecol sean superados en la eliminación del hierro en el suero y la sangre de humanos (pH 7.4) (Holden y Bachman, 2015).

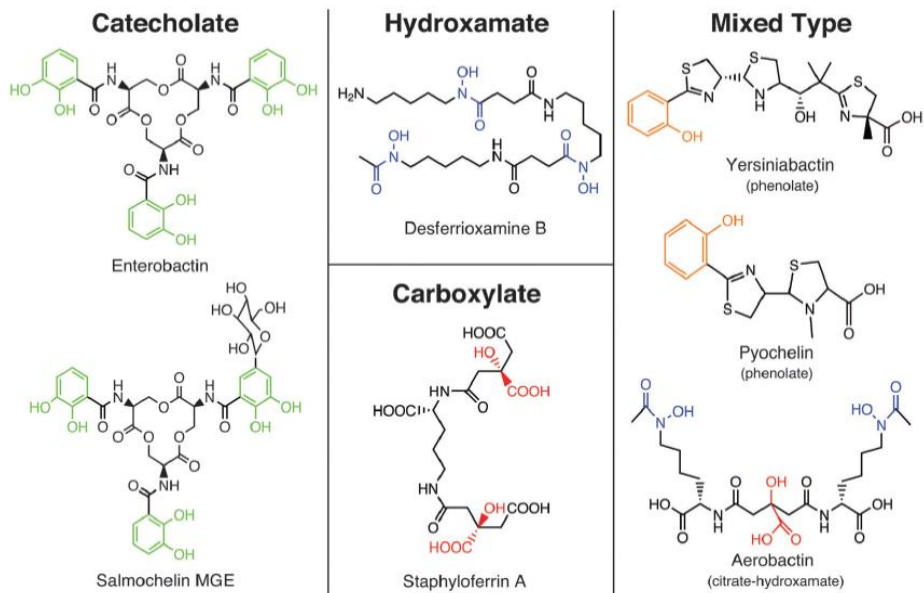


Figura 4. Familias de sideróforos. Tomado de *Funciones divergentes de los sideróforos bacterianos durante la infección* (Holden y Bachman, 2015).

La mayoría de los sideróforos descritos son de naturaleza peptídica. Muchos de ellos son sintetizados por proteínas multifuncionales denominadas sintetetas de péptidos no ribosómicos (non-ribosomal peptide synthetase, NRPS). Las NRPSs son complejos enzimáticos multimodulares encargados de sintetizar péptidos que contienen aminoácidos tanto proteicos como no proteicos. En algunos casos, estas enzimas actúan conjuntamente con las enzimas policétido sintetetas (Polyketide synthases, PKS), biosintetizando productos híbridos. Las NRPSs están organizadas en grupos coordinados de centros activos denominados módulos. En función del número, el orden y tipo de dominios presentes en cada módulo, se obtendrán diferentes tipos de compuestos con distintas características estructurales (Kadi y Challis, 2009).

El gen *irp2* (Iron-repressible) se encuentra en cepas de enterobacterias altamente patógenas y codifica la síntesis del sideróforo yersiniabactina. El gen *iuc C* (involved in aerobactin synthesis) está vinculado al último paso de la síntesis del sideróforo conocido como aerobactina, el cual está relacionado a la captación y transporte de hierro. Ambos forman parte vital de la supervivencia de la bacteria y se les considera importantes marcadores de virulencia debido a su capacidad de lograr la permanencia del patógeno en ambientes agrestes del hospedero, como los carentes de hierro de libre disponibilidad (Carranza *et al.*, 2012).

Asimismo, algunas enterobacterias contienen un grupo de genes asociados a islas de alta patogenicidad (HPI) que codifican proteínas responsables para la síntesis del sideróforo yersiniabactina (Ybt). Uno de los genes importantes que residen en la isla de alta patogenicidad (HPI) es *fyuA* (siderophore yersiniabactin receptor), que codifica la proteína de membrana externa *FyuA*, que actúa como receptor para la captación del sideróforo Fe-Ybt. El gen *fyuA* se ha asociado a la virulencia en muchos miembros de la familia Enterobacteriaceae (Hancock *et al.*, 2008).

Se ha demostrado que la expresión de *iroN* (catecholate siderophore receptor) está regulada por el Fe, y una búsqueda de homología basada en la secuencia del péptido putativo sugirió que *iroN* era un receptor de sideróforos. Las pruebas epidemiológicas moleculares de varios estudios han demostrado una mayor prevalencia de *iroN* entre las cepas de *E. coli* causantes de infecciones del tracto urinario en relación con las cepas fecales. En conjunto, estas pruebas sugieren que *iroN* funciona como receptor de sideróforos y es un factor de virulencia, al menos para la infección del tracto urinario (Russo *et al.*, 2002).

Se han descrito varios sistemas bacterianos de transporte de hierro ferroso (Fe^{2+}); sin embargo, sólo el sistema *Feo* (transportador de hierro) parece estar ampliamente distribuido y se dedica exclusivamente al transporte de hierro. En los últimos años, muchos estudios han explorado el papel de las proteínas FeoB y FeoA en el transporte de hierro ferroso y su contribución a la virulencia bacteriana (Lau *et al.*, 2016). La proteína FeoB codificada por el gen *feoB* (ferrous iron transporter B), es esencial para la captación de hierro ferroso en bacterias, contiene un sitio de unión a un nucleótido específico del guaninucleótido. Además, la unión de la proteína transportadora G (GTP, por sus siglas en inglés: Transport Protein G) es necesaria para la captación eficiente de hierro ferroso a través del sistema dependiente de la proteína transportadora de hierro ferroso (FeoB). Cabe destacar que, incluso en las bacterias, esta unión covalente entre una proteína G y una proteína de membrana politópica parece ser única (Marlovits *et al.*, 2002).

El gen *ireA* (iron-responsive element) presenta similitudes peptídicas (entre el 48% y el 56%) con proteínas previamente identificadas que funcionan como receptores de sideróforos, lo que sugiere que participa en la adquisición de hierro (Russo *et al.*, 2001). *IreA* se ha utilizado con éxito como agente inmunizante en las infecciones del tracto urinario y en la bacteriemia (Lefort *et al.*, 2011).

Debido a que en nuestro país existe poca información sobre las cepas de *E. coli* asociadas a la enfermedad periodontal, el objetivo de este estudio fue determinar la expresión de los genes involucrados en la captación de hierro en cepas de *E. coli* aisladas de infecciones periodontales.

Antecedentes

Zhao y colaboradores en 2009 en la Provincia de Jiangsu, China, caracterizaron un total de 202 cepas de *E. coli* uropatógenas para los serogrupos O, los genes de virulencia, la susceptibilidad antimicrobiana y los grupos filogenéticos. De los 33 genes de virulencia analizados, *feoB* y *fimH* fueron los más prevalentes. Todas las cepas fueron multirresistentes a los antimicrobianos, y el 73% fue resistente al trimetoprim con sulfametoxazol. Las cepas resistentes a la cefotaxima, cefoxitina, cloranfenicol y nitrofurantoína presentaron una menor frecuencia de genes virulencia en comparación con las cepas susceptibles.

Pereyra y colaboradores en 2010 en León, Guanajuato, estudiaron la prevalencia de sobreinfecciones de enfermedad periodontal en pacientes con infección por VIH. Tomaron muestras de las bolsas periodontales y biopsias de las encías para análisis microbiológico de microorganismos diferentes a los causantes habituales de periodontitis. Se estudiaron 97 pacientes, 73 hombres y 24 mujeres. Cincuenta y ocho presentaron enfermedades periodontales (59.7%) y 18 (31%) tenían enfermedad gingival. En 7 pacientes se presentó eritema lineal gingival (38.8%). Los aislamientos bacterianos fueron en 16 pacientes (27.5%). *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y microbiota polimicrobiana (*E. coli*, *K. pneumoniae* y *E. cloacae*). La

periodontitis crónica fue más frecuente que la gingivitis. De los aislamientos bacterianos predominó *E. coli*.

Karimian y colaboradores en Irán en el 2012 realizaron un estudio con un total de 123 cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con infecciones del tracto urinario. Se utilizó el método de PCR para detectar los factores de virulencia de *E. coli*. Los resultados mostraron que los genes más frecuentes fueron: *fimH*, (79.6%), *cnf1* (50.4%), *hlyA* (50.4%), *pap* (50.4%) e *iroN* (42.2%).

Abdulhadi y colaboradores en 2019 en Iraq estudiaron el efecto bacteriostático del ácido cítrico en aislados de cepas bacterianas halladas en pacientes con enfermedad periodontal que acudieron al departamento de odontología del hospital general de Al-Furat. Tomaron 40 muestras con hisopo de pacientes con periodontitis. Las muestras fueron sembradas en placas de agar sangre y McConkey. Se aislaron cuatro tipos de bacterias del paciente en la zona de la periodontitis: *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y bacterias anaerobias.

Paniagua y colaboradores en 2019 en el Estado de México, aislaron 200 cepas de *E. coli* cérvico-vaginales (CVEC) multirresistentes a antibióticos en mujeres que acudieron a dos clínicas del Instituto Mexicano del Seguro Social. Se identificaron los serogrupos O de *E. coli* y los marcadores de virulencia mediante PCR. Los genes de virulencia más frecuentes encontrados fueron: *feoB* (91.5%), *fimH* (89.5%), *kpsMT11* (75%), *iutA* (66%) e *iroN* (59%). Sumado a esto, identificaron ciento cuatro patrones distintos de marcadores de virulencia con genes de resistencia a los antibióticos asociados a los serogrupos O entre las cepas de *E. coli* cervicovaginales (CVEC). La mayoría de las cepas de CVEC aisladas poseían una gran cantidad de factores de virulencia.

Objetivos

Objetivo general

Analizar los genes involucrados en la captación de hierro en cepas de *E. coli* aisladas de infecciones periodontales.

Objetivos particulares

1. Determinar por el método de PCR la frecuencia de los genes que codifican para los sistemas de captación de hierro: *fyuA*, *feoB*, *irp2*, *iroN*, *iucC* e *ireA* en cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con infecciones periodontales.
2. Caracterizar y comparar por PCR en tiempo real la expresión de los genes *fyuA*, *feoB*, *irp2*, *iroN*, *iucC* e *ireA* en las cepas de *E. coli* bajo crecimiento bacteriano en medio Infusión Cerebro-Corazón (BHI) y Caldo de Soya-Trypticaseína (ST).

Material y métodos

Origen de las cepas de *E. coli*

Para la realización de este estudio, se emplearon 5 cepas de *E. coli* aisladas previamente de pacientes con infecciones periodontales de la clínica de Endoperiodontología de la Facultad de Estudios Superiores (FES) Iztacala. Tanto las cepas aisladas como la cepa control (*E. coli* ATCC 11775) se conservaron en medio Infusión Cerebro-Corazón (BHI) más glicerol, en el Laboratorio de Análisis Clínicos de la Clínica Universitaria de Salud Integral, dentro de la FES Iztacala, UNAM.

Resiembra de las cepas y extracción de DNA

A partir del cultivo de BHI más glicerol, se tomó un inóculo de las cepas y el grupo control (por separado) con ayuda de un asa estéril, se sembraron en 2 mL de BHI y

se incubaron a 37° C por 24 horas. Concluido este periodo, se tomó un inóculo de las muestras con ayuda de un asa estéril y fueron sembradas por el método de estría cruzada en agar Mueller-Hinton (MH) y se incubaron a 37° C por 24 horas. A partir del crecimiento bacteriano, se tomaron varias colonias con un asa estéril y se transfirieron a tubos con tapón de rosca (16x150 mm) con 2 mL de agua desionizada estéril. El inóculo se agitó con ayuda de un vortex por 30 segundos y se llevó a ebullición durante 20 minutos. Al término, los tubos fueron colocados en hielo por 10 minutos, posteriormente, se centrifugaron a 14,000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante resultante, que contenía el DNA, fue transferido a tubos Eppendorf estériles y se almacenaron a -20° C hasta su utilización.

Identificación de *E. coli* por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

La identificación molecular de *E. coli* por PCR de punto final se realizó mediante la amplificación del gen 16s rRNA, empleando los oligonucleótidos (primers) wl-3110 (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) y wl-3111 (CCGTCAATTCATTGAGTT) (Dormanesh *et al.*, 2014). Las condiciones de PCR se observan en la tabla 2. En cada ensayo de PCR se usó como control positivo la cepa de *E. coli* ATCC 11775.

Desnaturalización inicial	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	Extensión final
	30 ciclos			
95° C por 5 min	95° C por 30 s	55° C por 1 min	72° C por 1 min	72° C por 5 min

Tabla 2. Condiciones de PCR de punto final para la detección de *E. coli*

Análisis de los amplicones por electroforesis en gel de agarosa

Se preparó una solución stock concentrada 10X de Tris-borato (TBE): 108 g de Tris base, 40 mL de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0.5 M (pH 8.0), 55 g de ácido bórico y se aforó a 1 L con agua destilada. Para llevar a cabo la electroforesis se necesitó de TBE 1X por lo que la solución stock se diluyó en una proporción 1:10 hasta tener una concentración 10X. Posteriormente se preparó el gel de agarosa al

2%, para ello se pesaron 2 g de agarosa y se depositó en 100 mL de TBE 10X para ser fundida hasta quedar una solución transparente. Después se agregó 0.7 µL de Midori Green (como fluoróforo) por cada 100 mL de agarosa. La agarosa se depositó en un contenedor que posee un peine para que se formen los pozos. Una vez gelificada la agarosa se retiró el peine y el gel se introdujo a la cámara de electroforesis junto con el TBE 1X hasta cubrir el gel. Se colocaron 5 µL de los amplicones de PCR en los pozos y 1 µL del marcador de peso molecular (100 pb). Las condiciones para correr el gel fueron: 120 volts, 94 mA durante 30 minutos.

Detección de genes de virulencia por PCR

Los genes de los sistemas de captación de hierro; *fyuA*, *feoB*, *irp2*, *iroN*, *iucC* e *ireA* en las cepas de *E. coli* fueron identificados por PCR, de acuerdo a lo descrito por Momtaz *et al.*, (2013). El volumen final por mezcla de reacción uniplex fue de 20 µL; 1 µL de cada oligonucleótido (Forward y Reverse, 10 pmol: Tabla 3), 12 µL de Taq DNA Polimerase 2x Master Mix Red (AMPLIQON), 3 µL de agua libre de nucleasas y 3 µL de DNA templado. En la tabla 4 se observan las condiciones de PCR para la detección de los genes de sistemas de captación de hierro.

Gen	Tamaño del amplicón (pb)	Secuencia del oligonucleótido (5' – 3')
<i>fyuA</i>	787	F TGATTAACCCCGCGACGGGAA
		R CGCAGTAGGCACGATGTTGTA
<i>feoB</i>	470	F AATTGGCGTGCATGAAGATAACTG
		R AGCTGGCGACCTGATAGAACAATG
<i>irp2</i>	413	F AAGGATTGCTGTTACCGGAC
		R TCGTCGGGCAGCGTTTCTTCT
<i>iroN</i>	667	F AAGTCAAAGCAGGGGTTGCCCG
		R GACGCCGACATTAAGACGCAG
<i>iucC</i>	541	F CGCCGTGGCTGGGGTAAG
		R CAGCCGGTTCACCAAGTACTACTG
<i>ireA</i>	254	F GATGACTCAGCCACGGGTAA
		R CCAGGACTCACCTCACGAAT

Tabla 3. Secuencias de los oligonucleótidos (primers) empleados para la mezcla de reacción de la PCR

Gen	Desnaturalización inicial	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	Ciclo Final	Enfriamiento
<i>iroN</i> ; <i>fyuA</i> ; <i>ireA</i>	95° C por 12 min	25 Ciclos			72° C por 10 min	4° C por 2 min
		94° C por 30 s	63° C por 30 s	68° C por 3 min		
<i>feoB</i> ; <i>irp2</i>	94° C por 5 min	30 Ciclos			72° C por 10 min	4° C por 2 min
		94° C por 30 s	59° C por 30 s	72° C por 30 s		
<i>iuc</i>	95° C por 5 min	25 Ciclos			72° C por 7 min	4° C por 2 min
		95° C por 1 min	55° C por 30 s	72° C por 30 s		

Tabla 4. Condiciones de PCR de punto final para la detección de los diferentes genes de sistemas de captación de hierro en *E. coli*.

Cultivo de *E. coli* para la extracción de RNAm

Para la extracción del RNAm, se debe promover la expresión de los genes de virulencia de los sistemas de captación de hierro, por lo que las cepas de *E. coli* fueron sembradas para su crecimiento en dos diferentes medios: Infusión Cerebro-Corazón (BHI) y caldo de soya-tripticaseína (ST), a 37° C por 24 horas en agitación constante. Al término, se realizaron diluciones 1:10 en medio BHI estéril hasta obtener una $DO_{600\text{ nm}} = 0.4$, lo que indicó una concentración de 1×10^9 células. Las células bacterianas fueron recuperadas por centrifugación a 2,000 rpm por 3 minutos, al término, la pastilla fue resuspendida en 2 mL de buffer fosfato salino (PBS), posteriormente se agitaron en un vortex por 10 segundos y se centrifugaron a 2,000 rpm durante 3 minutos. Se decantó el sobrenadante y la pastilla se utilizó para la extracción del RNA.

La extracción total de RNA se realizó con el equipo comercial MiniKit RNeasy (Qiagen, Hilden, Germany) siguiendo las instrucciones del fabricante y utilizando el equipo robotizado QIAcube, el cual se programó según el protocolo del fabricante: Después de alimentar el equipo QIAcube con los diferentes reactivos del RNeasy, se llenó el contenedor con puntas de 1 mL y se depositaron los tubos de columna y elución en el carrusel (centrifuga) del equipo. Finalmente, el QIAcube se programó para la extracción de RNA con lisis celular siguiendo el protocolo del fabricante (RNeasy Protect Bacteria® Qiagen, Hilden, Germany) y se inició la corrida. El equipo robotizado adicionó 100 µL de buffer TE (solución preparada a pH de 8 con

10 Mm Tris-Cl, 1 Mm de EDTA y 1 mg/mL de lisozima) a cada tubo con la pastilla celular de la bacteria cosechadas después del cultivo en los dos distintos medios. Los tubos fueron agitados para lisar las paredes celulares. Posteriormente el robot QIAcube adicionó volúmenes de los distintos buffers del equipo comercial RNeasy y realizó repetidos pasos de centrifugación y agitación para los diferentes procedimientos: Adicionó 350 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. La concentración total del RNA se midió utilizando el espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). Debido a la inestabilidad del RNA, se procedió inmediatamente a realizar la reverso-transcripción a cDNA.

Reverso-transcripción

Para el proceso de la reverso-transcripción de RNA a cDNA se utilizó el equipo comercial QuantiTec Reverse transcription (QIAGEN®) siguiendo las instrucciones del fabricante. Primero se realizó la eliminación de DNA genómico. Para un volumen final por mezcla de reacción de 14 μ L se agregaron cada uno de los siguientes componentes: Para cada muestra se depositó en un tubo Eppendorf: 2 μ L de gDNA Wipeout buffer7x®, 7 μ L de agua libre de RNAsas y 5 μ L de RNA molde. Posteriormente se incubó a 42°C durante 2 minutos, e inmediatamente se colocó en hielo. Para la reverso-transcripción se preparó la mezcla de reacción en un tubo Eppendorf con todos los componentes necesarios para la síntesis de la primera cadena de cDNA: 1 μ L de Quantiscript Reverse Transcriptasa®, 4 μ L Quantiscript RT buffer 5x®, 1 μ L RT Primer mix® y 14 μ L de RNA templado (obtenido de la reacción anterior) para un volumen final de reacción de 20 μ L. 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 DNA complementario se midió utilizando un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). Finalmente, el DNA complementario obtenido se almacenó a -20°C hasta su utilización para PCR en tiempo real.

Expresión de los marcadores de virulencia por PCR en tiempo real

Los oligonucleótidos (primers) utilizados para la expresión de los genes de virulencia fueron los mismos que se utilizaron para la identificación de los genes de virulencia por PCR convencional. Para determinar la expresión de los diferentes genes de virulencia se empleó el aparato de PCR en Tiempo Real Corbette® (Rotor Gene). El volumen final por mezcla de reacción fue de 24 μ L: 12.5 μ L de RealQ Plus 2x Master Mix® (AMPLIQON), 1 μ L del oligonucleótido Forward (10 pmol), 1 μ L del oligonucleótido Reverse (10 pmol), 8.5 μ L de agua libre de nucleasas y 1 μ L de cDNA templado (500 ng/ μ L). Las condiciones de amplificación se muestran en la tabla 5. El control interno para cada ensayo fueron los genes *arcA* (aerobic respiration control protein) y *rpo* (RNA polymerase sigma). La curva del punto de

fusión (melting point) se realizó en cada corrida de PCR en tiempo real. La cepa de *E. coli* ATCC 11775 fue utilizada como control positivo en cada ensayo.

Desnaturalización inicial	Desnaturalización	Alineamiento y extensión
95° C por 3 min	95° C por 5 seg	60° C por 30 seg

Tabla 5. Condiciones de PCR en tiempo real para la detección de la expresión de los genes de sistemas de captación de hierro de cepas de *E. coli*.

Resultados

Origen de las cepas

Se analizaron 5 cepas de *E. coli* aisladas previamente de pacientes con infecciones periodontales que fueron atendidos en la clínica de Endoperiodontología de la Facultad de Estudios Superiores (FES) Iztacala. Se encontró que el 60% (n=3) de los pacientes fueron mujeres, y el 40% (n=2) hombres (figura 5). El rango de edad más abundante fue el de 71-80 (60%; n=3) seguido por el de 60-70 (40%; n=2). La figura 6 presenta la distribución de los pacientes por rango de edad. El grupo de edad más frecuente fue el de 71 a 80 años.

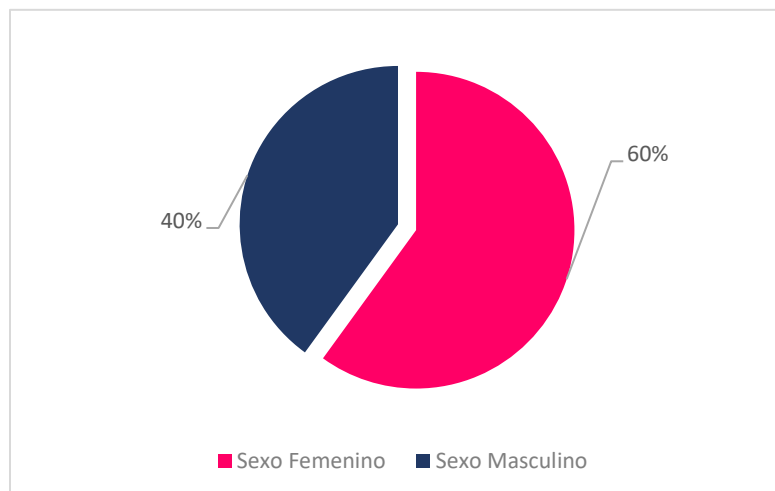


Figura 5. Distribución por sexo de los pacientes analizados

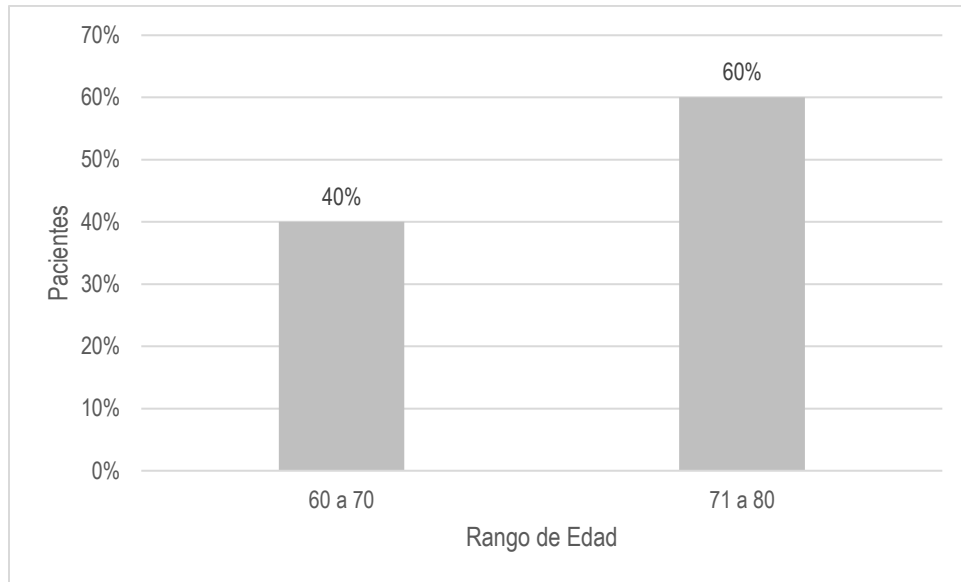


Figura 6. Distribución de los pacientes por rango de edad

Detección de *E. coli* por PCR

Las cepas fueron identificadas molecularmente por PCR mediante la amplificación de la región 16sRNA (figura 7).

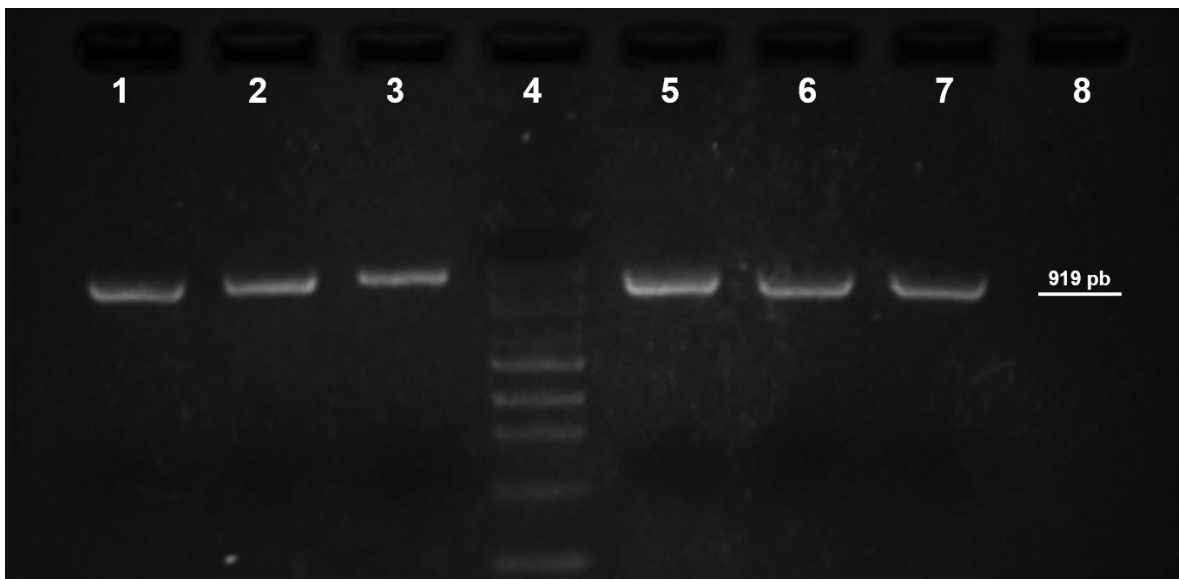


Figura 7. Detección de *E. coli* mediante la amplificación del gen 16sRNA (919 pb) por PCR. Carril 7, control positivo (ATCC 11775). Carriles 1-3 y 5-6 cepas *E. coli* de pacientes; Carril 4, marcador de peso molecular (100 pb); Carril 8, control negativo (sin DNA molde).

Detección de genes de virulencia de *E. coli* relacionados a la enfermedad periodontal

En la tabla 6, se observan los porcentajes de los genes de captación de hierro relacionados con el diagnóstico de los pacientes infectados por *E. coli*. Los genes identificados con mayor frecuencia en los pacientes con periodontitis moderada y crónica fueron *iroN* (figura 8), *feoB* (figura 9) e *irp2* (figura 10). El gen con menor frecuencia fue *fyuA* (figura 11), el cual se detectó en el 60% del total de los pacientes. Finalmente, los genes *iucC* e *ireA* no se detectaron en ninguna cepa.

Función del gen	Gen	Patología		Total No. (%)
		Periodontitis moderada	Periodontitis crónica	
		No. (%)	No. (%)	
Sistemas de captación de hierro	<i>iroN</i>	3 (60)	2 (40)	5 (100)
	<i>feoB</i>	3 (60)	2 (40)	5 (100)
	<i>irp2</i>	3 (60)	2 (40)	5 (100)
	<i>fyuA</i>	2 (40)	1 (20)	3 (60)
	<i>iucC</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	<i>ireA</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)

Tabla 6. Frecuencia de los genes de sistema de captación de hierro de *E. coli* según el diagnóstico clínico.

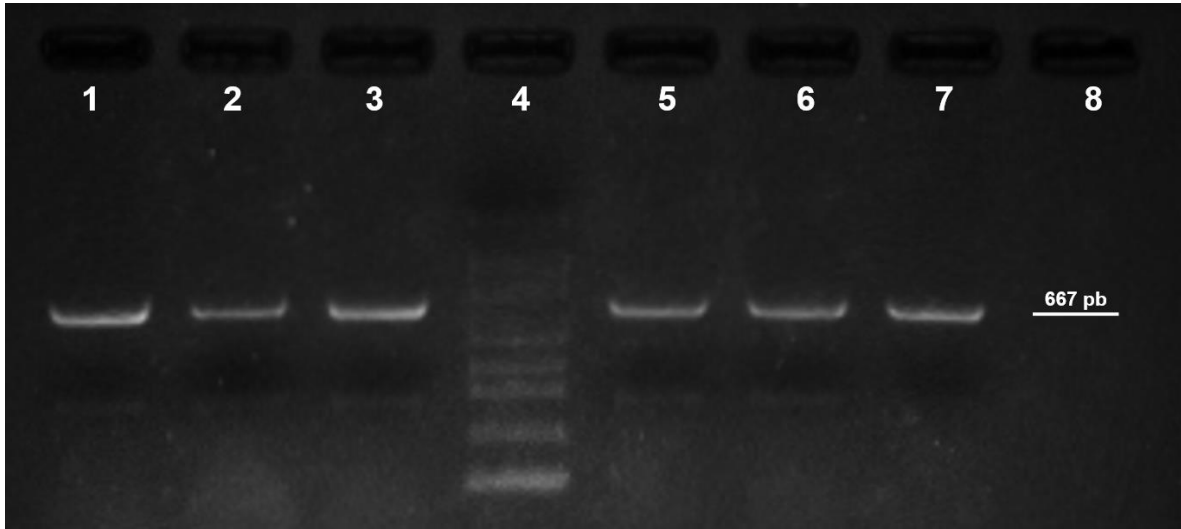


Figura 8. Detección de *iroN* por PCR (667 pb). Carril 7, control positivo (ATCC 11775). Carriles 1-3 y 5-6 cepas *E. coli* de pacientes; Carril 4, marcador de peso molecular (100 pb); Carril 8, control negativo (sin DNA molde).

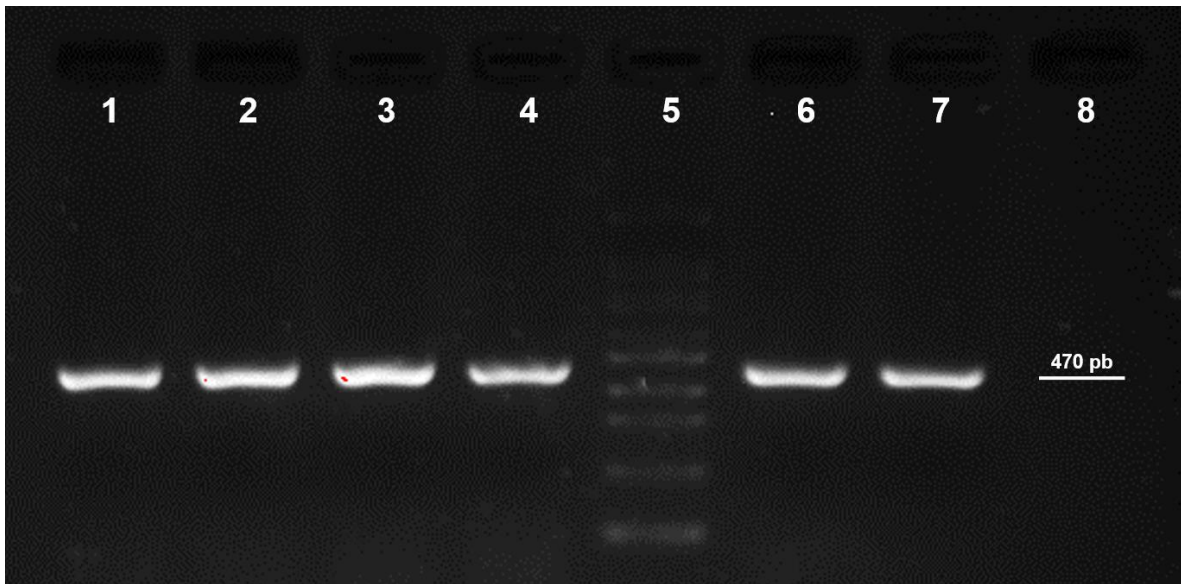


Figura 9. Detección de *feoB* por PCR (470 pb). Carril 7, control positivo (ATCC 11775). Carriles 1-4 y 6 cepas *E. coli* de pacientes; Carril 5, marcador de peso molecular (100 pb); Carril 8, control negativo (sin DNA molde).

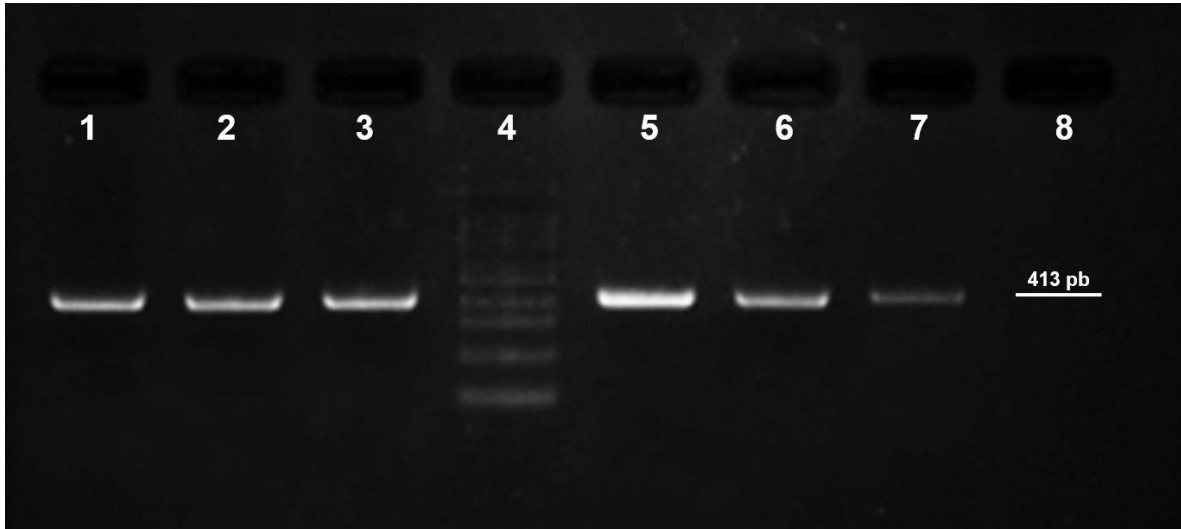


Figura 10. Detección de *irp2* por PCR (413 pb). Carril 7, control positivo (ATCC 11775). Carriles 1-3 y 5-6 cepas *E. coli* de pacientes; Carril 4, marcador de peso molecular (100 pb); Carril 8, control negativo (sin DNA molde).

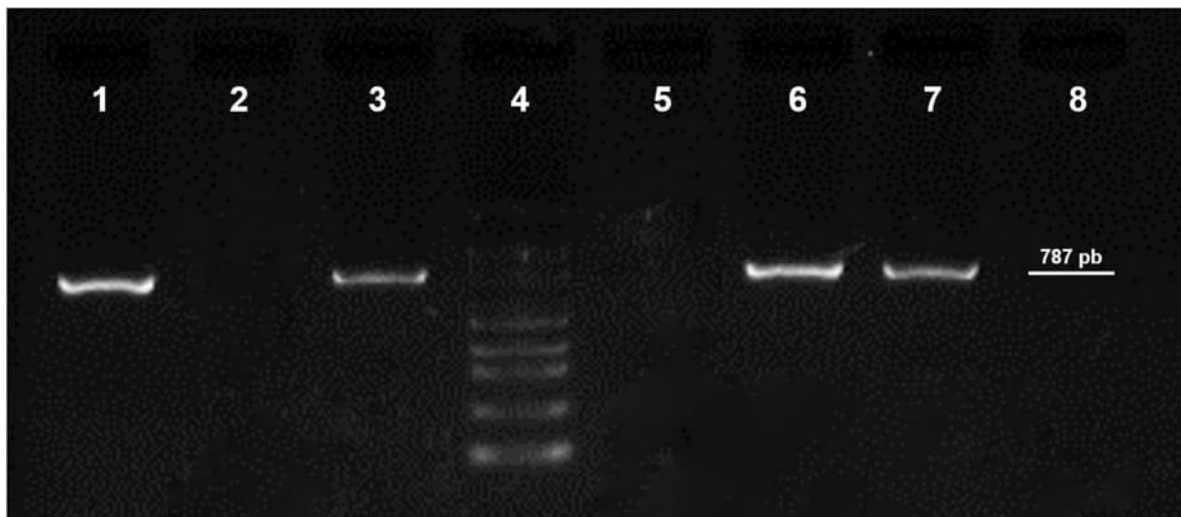


Figura 11. Detección de *fyuA* por PCR (787 pb). Carril 7, control positivo (ATCC 11775). Carriles 1-3 y 5-6 cepas *E. coli* de pacientes; Carril 4, marcador de peso molecular (100 pb); Carril 8, control negativo (sin DNA molde).

Detección de la expresión de los genes de sistemas de captación de hierro

En la tabla 7 se observan las frecuencias de expresión de los genes de sistemas de captación de hierro en las cepas de *E. coli*, según el diagnóstico clínico y el caldo nutritivo. El 100% de las cepas asociadas tanto a periodontitis moderada como a

periodontitis crónica expresó el gen *feoB* (figuras 12.1 y 12.2), *iroN* (figuras 13.1 y 13.2) e *irp2* (figuras 14.1 y 14.2) indistintamente del crecimiento en BHI y ST, mientras que el gen *fyuA* (figuras 15.1 y 15.2) se expresó en el 66.6% (BHI y ST) de las cepas de periodontitis moderada y en el 50% (BHI y ST) de las cepas de periodontitis crónica.

		Expresión del gen				Total No. (%)
Función del gen	Gen	Periodontitis moderada (n=3)		Periodontitis crónica (n=2)		
		No. (%)		No. (%)		
		BHI	ST	BHI	ST	
Sistemas de captación de hierro	<i>iroN</i>	3 (100)	3 (100)	2 (100)	2 (100)	5 (100)
	<i>feoB</i>	3 (100)	3 (100)	2 (100)	2 (100)	5 (100)
	<i>irp2</i>	3 (100)	3 (100)	2 (100)	2 (100)	5 (100)
	<i>fyuA</i>	2 (66.6)	2 (66.6)	1 (50)	1 (50)	3 (60)
	<i>iucC</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	<i>ireA</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

Tabla 7. Expresión de los genes de sistemas de captación de hierro detectadas por PCR en tiempo real.

Todas las corridas de PCR Tiempo Real se realizaron en el equipo Rotor-Gene 6000 (Corbette).

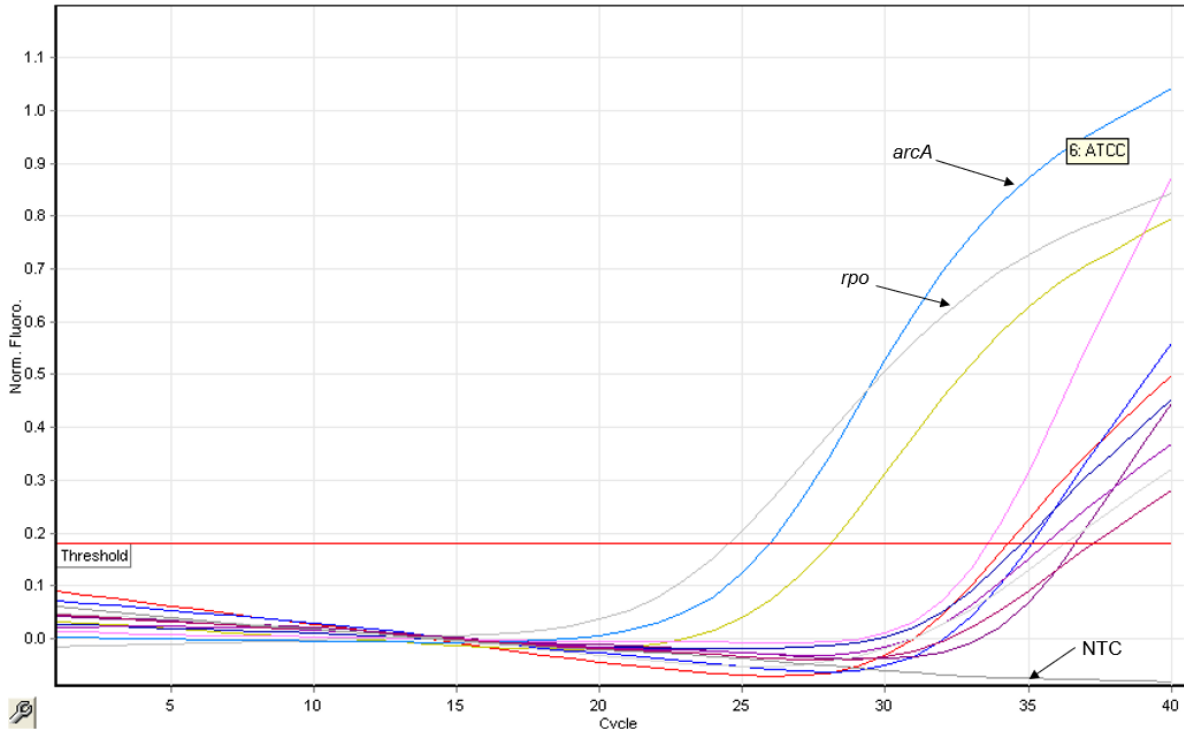


Figura 12.1 Detección de la expresión del gen *feoB* de *E. coli* por PCR en tiempo real en BHI (Infusión Cerebro-Corazón). La fluorescencia se leyó a 60° C en el canal verde. Control positivo (*E. coli* ATCC 25922). NTC (No Template Control). Controles internos (*arcA* y *rpo*).

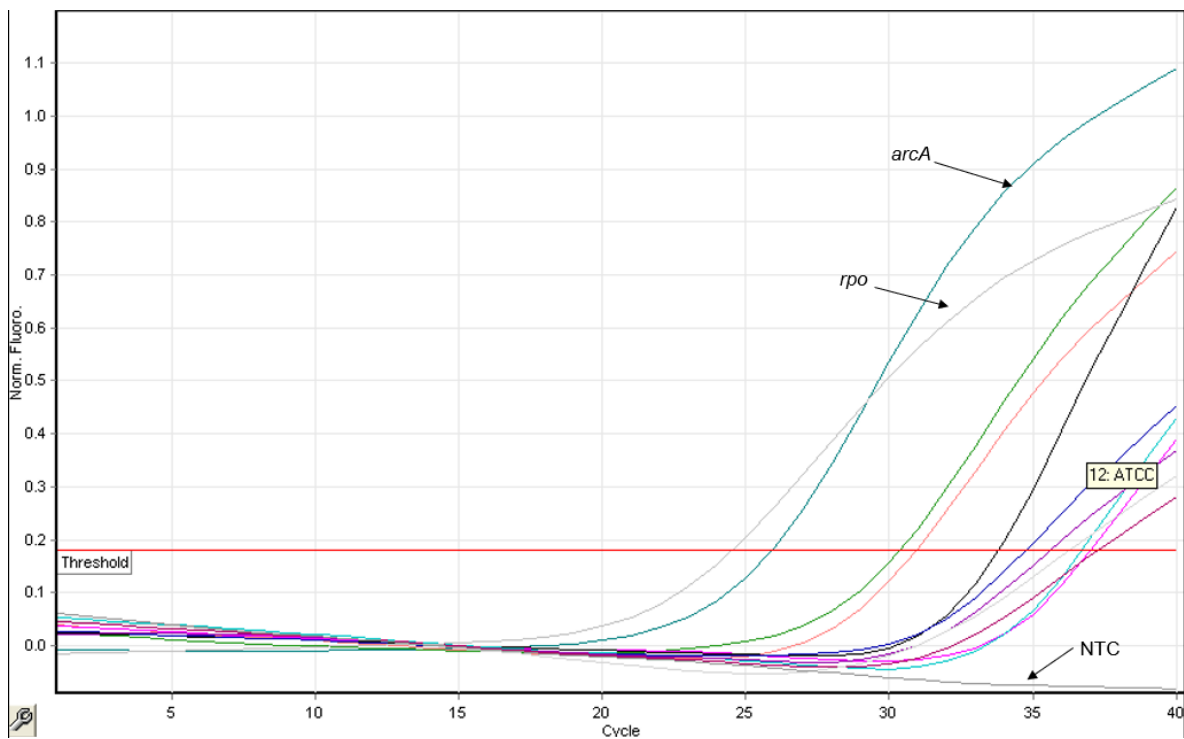


Figura 12.2 Detección de la expresión del gen *feoB* de *E. coli* por PCR en tiempo real en caldo de soya-tripticaseína (ST). La fluorescencia se leyó a 60° C en el canal verde. Control positivo (*E. coli* ATCC 25922). NTC (No Template Control). Controles internos (*arcA* y *rpo*).

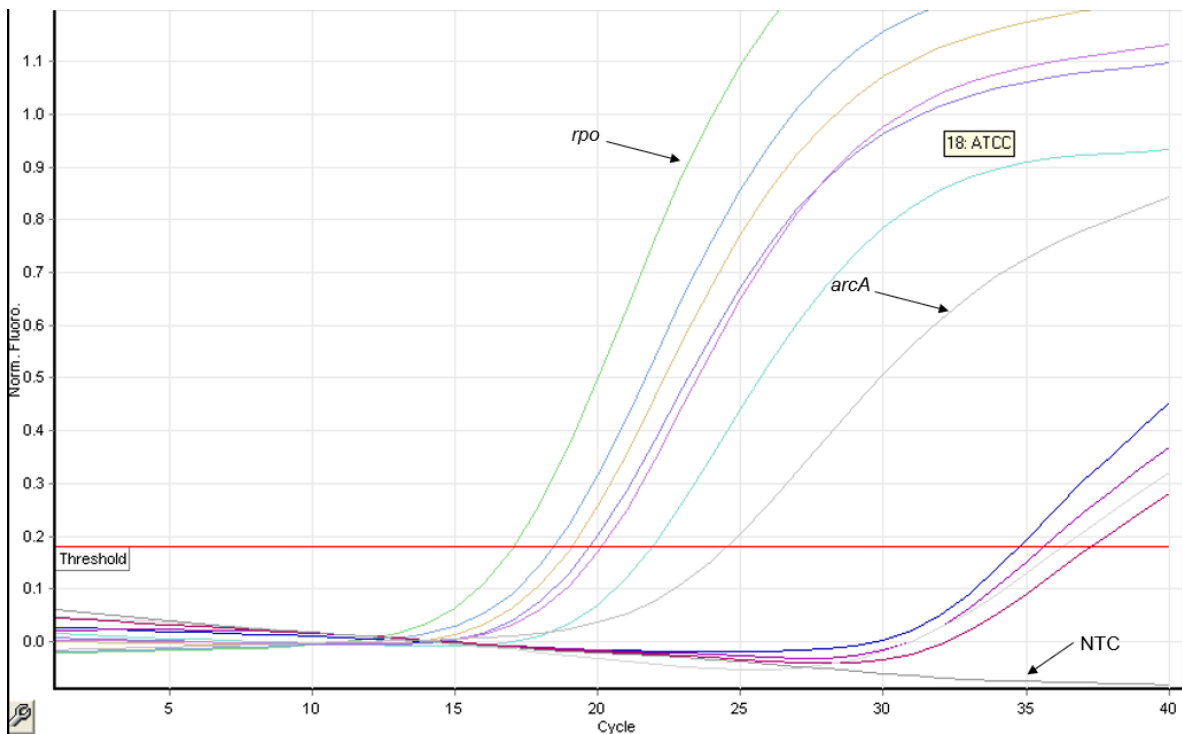


Figura 13.1 Detección de la expresión del gen *iroN* de *E. coli* por PCR en tiempo real en BHI (Infusión Cerebro-Corazón). La fluorescencia se leyó a 60° C en el canal verde. Control positivo (*E. coli* ATCC 25922). NTC (No Template Control). Controles internos (*arcA* y *rpo*).

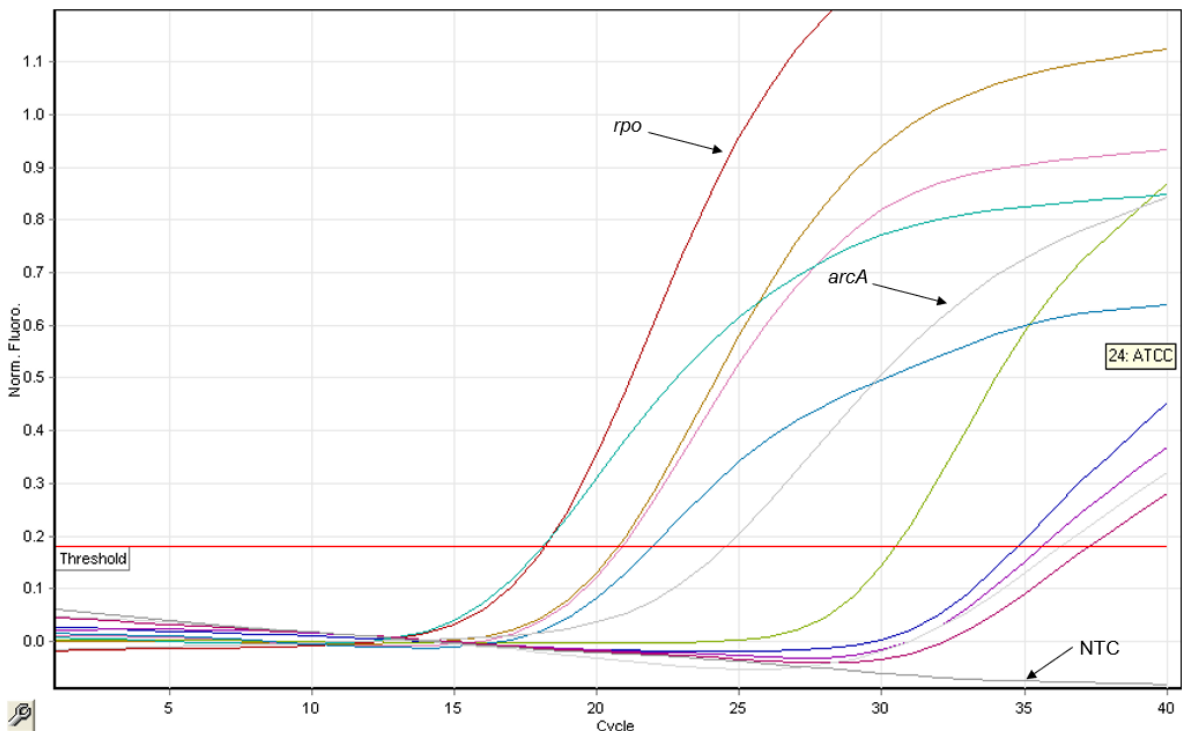


Figura 13.2 Detección de la expresión del gen *iroN* de *E. coli* por PCR en tiempo real en caldo de soya-tripticaseína (ST). La fluorescencia se leyó a 60° C en el canal verde. Control positivo (*E. coli* ATCC 25922). NTC (No Template Control). Controles internos (*arcA* y *rpo*).

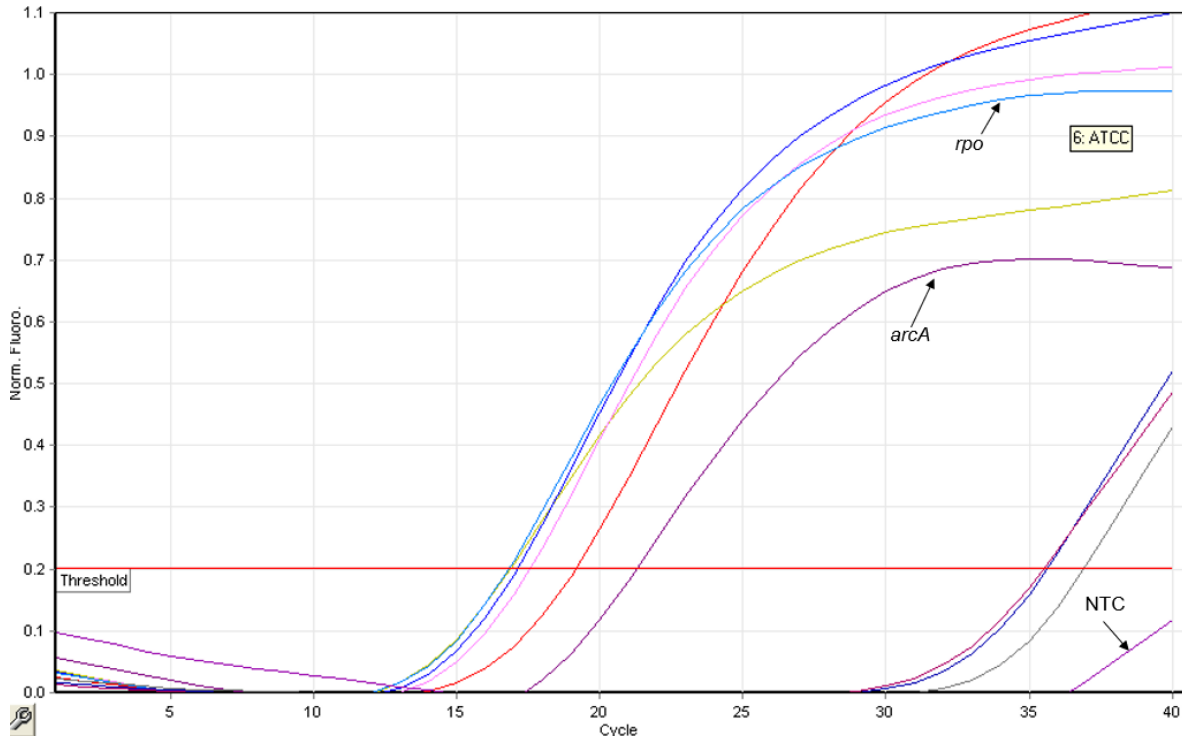


Figura 14.1 Detección de la expresión del gen *irp2* de *E. coli* por PCR en tiempo real en BHI (Infusión Cerebro-Corazón). La fluorescencia se leyó a 60° C en el canal verde. Control positivo (*E. coli* ATCC 25922). NTC (No Template Control). Controles internos (*arcA* y *rpo*).

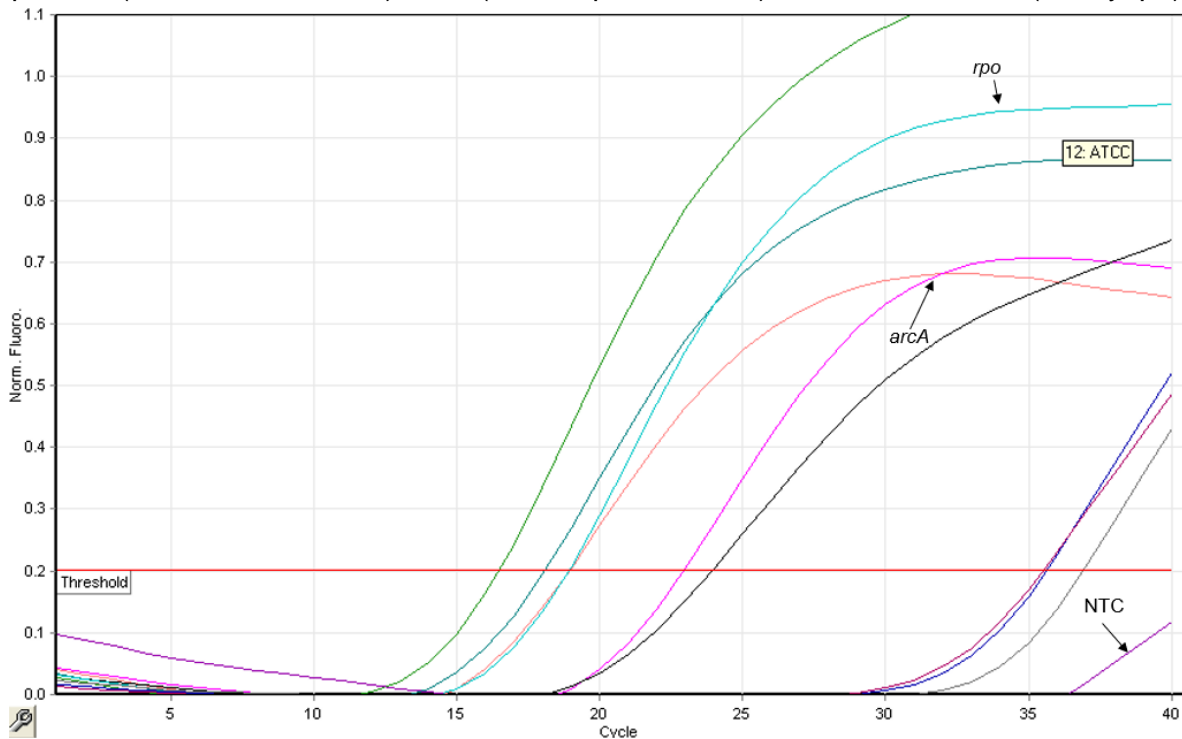


Figura 14.2 Detección de la expresión del gen *irp2* de *E. coli* por PCR en tiempo real en caldo de soya-tripticaseína (ST). La fluorescencia se leyó a 60° C en el canal verde. Control positivo (*E. coli* ATCC 25922). NTC (No Template Control). Controles internos (*arcA* y *rpo*).

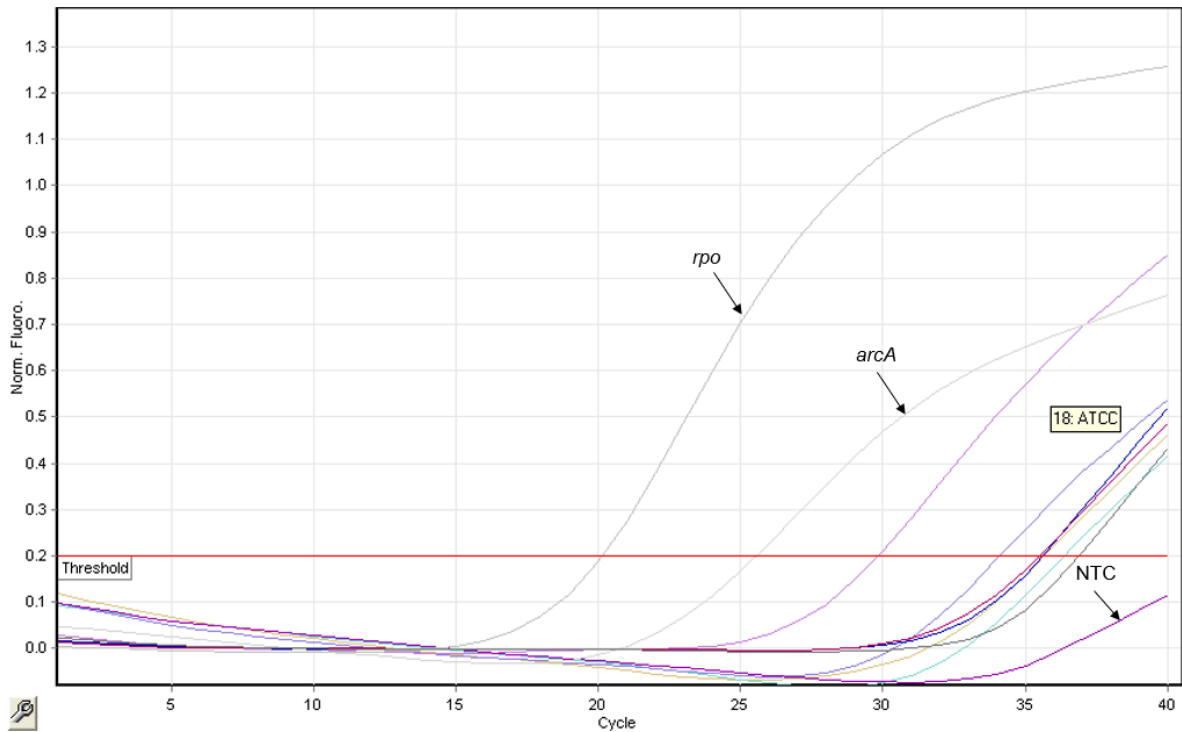


Figura 15.1 Detección de la expresión del gen *fyuA* de *E. coli* por PCR en tiempo real en BHI (Infusión Cerebro-Corazón). La fluorescencia se leyó a 60° C en el canal verde. Control positivo (*E. coli* ATCC 25922). NTC (No Template Control). Controles internos (*arcA* y *rpo*).

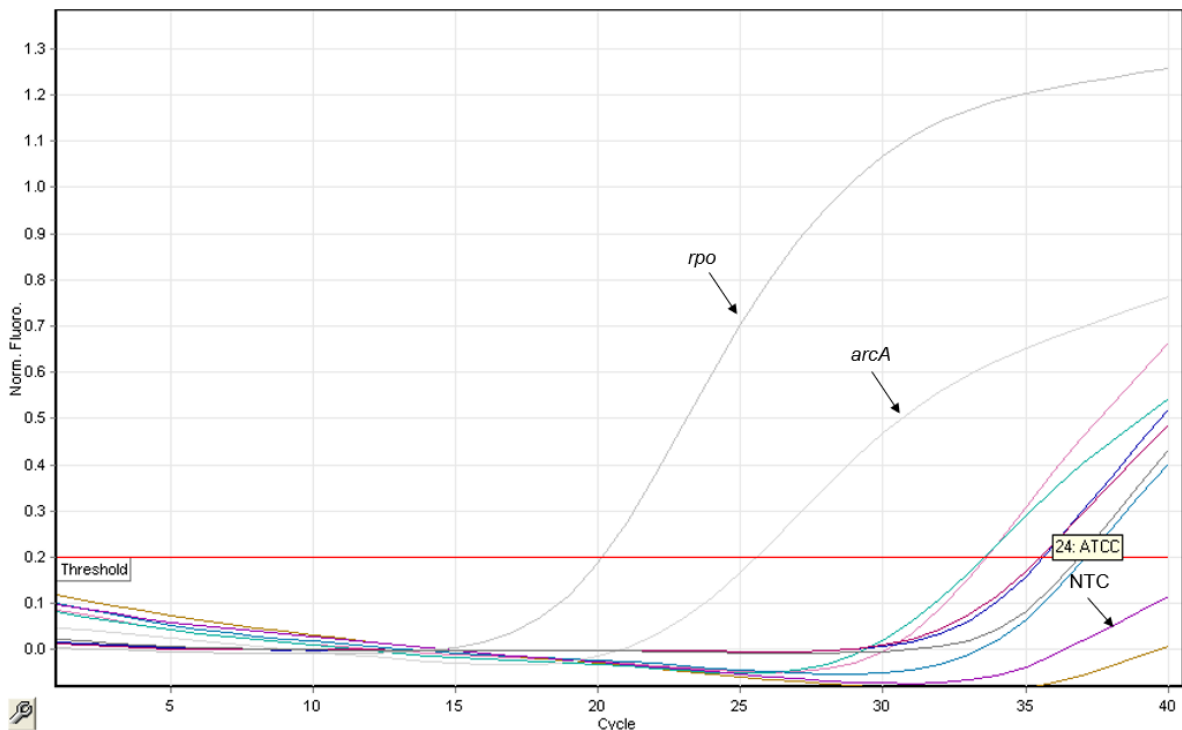


Figura 15.2 Detección de la expresión del gen *fyuA* de *E. coli* por PCR en tiempo real en caldo de soya-tripticaseína (ST). La fluorescencia se leyó a 60° C en el canal verde. Control positivo (*E. coli* ATCC 25922). NTC (No Template Control). Controles internos (*arcA* y *rpo*).

Patrones de expresión de genes de virulencia en las cepas de *E. coli*

En la tabla 8 se aprecian las combinaciones de expresión de los genes de sistemas de captación de hierro de las cepas de *E. coli* estudiadas. El patrón más frecuente (3/5) entre las cepas fue: *feoB / iroN / fyuA / irp2*

No. de Patrón	Patrones de genes de sistemas de captación de hierro	No. de cepas	%
1	<i>feoB / iroN / fyuA / irp2</i>	3	60
2	<i>feoB / iroN / irp2</i>	2	40

Tabla 8. Patrones de expresión de los genes de sistemas de captación de hierro en cepas de *E. coli* aislada de infecciones periodontales

Discusión

Pacientes estudiados

En este estudio se analizaron 5 cepas de *E. coli* aisladas previamente de pacientes con infecciones periodontales que fueron atendidos en la clínica de Endoperiodontología de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, de las cuales el 60% correspondió al sexo femenino y el 40% al masculino (figura 5). Estos porcentajes son semejantes a los descritos por Botero y colaboradores (2008), en un estudio en 69 pacientes (63.7% mujeres y 36.2% hombres) con enfermedad periodontal localizada o generalizada; incipiente, moderada o avanzada; con evidencia radiográfica de destrucción periodontal.

La distribución de los pacientes por rango de edad, mostró que el 40% se encontró entre los 60 y 70 años de edad, mientras que el 60% restante ocurrió en el rango de 71 y 80 años (figura 6). Se ha descrito que las enfermedades periodontales pueden afectar al 48% de la población adulta, prevalencia que varía según condiciones culturales, sociales, económicas, etc. Dentro del grupo de las enfermedades periodontales se encuentra la periodontitis crónica, la cual es una patología infecciosa caracterizada por la formación de bolsas, que contienen bacterias y pueden afectar un número variable de dientes, además de ocasionar inflamación de

los tejidos de soporte dental, pérdida ósea y de inserción. Las lesiones pueden ser tan graves que pueden ocasionar pérdida de los dientes y alteración de la función masticatoria y estética (Medina, 2010). En este estudio, el diagnóstico más frecuente de enfermedad periodontal fue la periodontitis moderada, seguida de la periodontitis crónica.

Desde la epidemiología convencional, uno de los modelos más populares en la explicación de la periodontitis se destaca a la placa bacteriana como causa primaria de la enfermedad, el modelo representa una forma lineal causal de como los microorganismos y sus toxinas generan una respuesta inflamatoria en un hospedero susceptible, además de la combinación de factores de riesgo genéticos, ambientales y adquiridos predisponentes; lo cual conduce a una pérdida en el equilibrio entre producción y degradación de colágeno en los tejidos con el consecuente daño en el tejido conectivo; lo cual se reconoce mediante los denominados signos clínicos del inicio y progresión de la enfermedad. Desde este enfoque se soportan clasificaciones como: "Enfermedades gingivales inducidas por biopelícula dental"; "Periodontitis"; "absceso periodontal"; "peri-implantitis", etc. (Romero y Hernández, 2018).

Detección de los genes de captación de hierro en las cepas

En este estudio, los genes *iroN*, *feoB* e *irp2* fueron detectados en todas las cepas (n=5; 100%) de *E. coli* (figuras 8, 9 y 10) aisladas de los pacientes con periodontitis moderada y crónica (tabla 6). La frecuencia de los genes de virulencia en cepas de *E. coli* asociadas a la enfermedad periodontal no ha sido estudiada, sin embargo, porcentajes similares fueron descritos por Lee y colaboradores (2016) en cepas uropatógenas de *E. coli*, donde *feoB*, *irp2* e *iroN* fueron detectados en el 98.2% (n=57), 94.8% (n=55) y 39.6% (n=23), respectivamente.

Este resultado también es similar al estudio realizado por Paniagua y colaboradores (2018), donde estudiaron las propiedades de virulencia y de resistencia a los antibióticos relacionadas con diferentes grupos filogenéticos en un grupo de cepas de *E. coli* (n=194) de pacientes con infecciones del tracto urinario (ITU), que

acudieron a unidades del sector público de salud en el Estado de México. Se identificó a *E. coli* en el 60.4% (n = 194) de los pacientes con ITU. Los filogrupos B2 (n = 99; 51%), A (n = 26; 13.4%) y B1 (n = 20; 10.3%) fueron los más frecuentes. Los genes *feoB* (92.3%), *iutA* (n = 91.7%), *sitA* (62.4%), *fyuA* (51%) e *ireA* (24.2%) se detectaron principalmente en cepas de los filogrupos B2, A, B1, C y D. En contraste, Khasheii y colaboradores (2016) reportaron en cepas de *E. coli* uropatógenas (UPEC) (n = 170) que la frecuencia de los genes *iucA*, *iroN* e *irp2* fue de 17.1%, 30.6% y 68.2%, respectivamente.

La frecuencia del gen *feoB* identificado en las cepas periodontales de *E. coli* (n = 5) también coincide con lo descrito por Yun y colaboradores (2014) en un estudio en el que se determinó la frecuencia de 18 genes de virulencia en cepas uropatógenas de *E. coli*, donde *feoB* fue uno de los genes con mayor presencia, con una incidencia del 67.2%.

Expresión de los genes de captación de hierro en las cepas

En este estudio los genes *feoB* (figuras 12.1 y 2), *iroN* (figuras 13.1 y 2) e *irp2* (figuras 14.1 y 2) se expresaron en todas las cepas (100%; n=5), provenientes de pacientes con Periodontitis Moderada y Periodontitis Crónica después del crecimiento en BHI y ST (tabla 7). Estos porcentajes contrastan con los descritos en un amplio estudio realizado en cepas uropatógenas de *E. coli* (n=194), donde la expresión de los genes de captación de hierro después de la infección en un modelo *in vitro* utilizando la línea celular vaginal A431 fue para *iroN* del 10.3% (n=20), y para *irp2* del 48.4% (n=94) (Paniagua *et al.*, 2017), y también contrastan con los reportados en un estudio realizado en cepas de *E. coli* (n=200) aisladas de mujeres con infecciones cervico-vaginales ocasionales (n=149), recurrentes (n=20) y crónicas (n=31), donde la frecuencia de expresión después de la infección *in vitro* de la línea celular vaginal A431 fue para *irp2* del 58.5% (n=117) y para *iroN* del 32.5% (n=65) (Monroy *et al.*, 2020).

La elevada expresión de los genes de captación de hierro en las cepas periodontales demuestra la virulencia de las cepas para ocasionar no sólo

infecciones periodontales más agudas, sino también otro tipo de infecciones, sobre todo considerando que el hierro es un elemento esencial para la supervivencia de *E. coli* y facilita numerosas actividades celulares como la reducción de peróxido, el transporte de electrones y la biosíntesis de nucleótidos (Braun, 2001).

El gen *fyuA* se expresó en el 66% de las cepas (n=2; tabla 7; figuras 15.1 y 2) de pacientes con periodontitis moderada, indistintamente del crecimiento en BHI o ST, mientras que las cepas de los pacientes con periodontitis crónica *fyuA* se expresó en el 50% (n=1). La expresión de *fyuA* no ha sido descrita en cepas periodontales de *E. coli*, sin embargo, la frecuencia de detección en cepas uropatógenas de *E. coli* (n=194) ha sido reportada en un 51% (n=99) por Paniagua y colaboradores en 2018, y en otro estudio realizado en cepas UPEC, el marcador *fyuA* fue detectado en 72.2% de las cepas (Spurbeck *et al.*, 2012).

Por otro lado, los genes *iucC* e *ireA* no fueron detectados, y por ende no se expresaron en ninguna de las cepas estudiadas (tabla 6 y 7). Sin embargo, en el estudio de Paniagua y colaboradores (2017) se reportó un porcentaje de expresión de *iucC* del 3% (n=6). En otro estudio realizado en cepas de *E. coli* uropatógenas (n=35; UPEC) productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE; 57.1%; n=20) provenientes de seis asilos en Perú, se encontró una elevada presencia del gen *iucC* 63% (n=22) (González *et al.*, 2022). De la misma manera, la ausencia del gen *ireA* (tabla 6) no coincide con el trabajo de Li *et al.* (2016) quienes estudiaron la función de una proteína de membrana externa codificada por el gen *ireA* de la cepa DE205B de *E. coli* patógena aviar (APEC). El gen estuvo distribuido en el 32.9% (n=46) de las cepas de *E. coli* analizadas (n=140), con altos porcentajes en los grupos filogenéticos B2 (58.8%) y D (55.9%). El nivel de expresión génica de *ireA* de la cepa APEC DE205B en medios M9 con alto contenido en hierro fue 1.8 veces mayor ($P < 0.05$) que en medios M9 con bajo contenido en hierro.

En este estudio se identificaron dos diferentes patrones de expresión de los genes de sistemas de captación de hierro en las cepas periodontales de *E. coli* (tabla 8), dentro de los cuales el más frecuente fue *feoB / iroN / fyuA / irp2* con el 60% (n=3). Los porcentajes de los patrones de expresión de genes de sistemas de captación

de hierro con otros marcadores de virulencia han sido descritos por otros autores, por ejemplo, en un estudio realizado en un grupo de cepas cérvico-vaginales de *E. coli* (n=200) se encontró que los patrones *irp2/fim/iha/kpsMT/usp* e *irp2/fim/iset* fueron identificados en el 14.4% (n=7) y en el 2.6 (n=5) de las cepas (Paniagua *et al.*, 2017).

La elevada frecuencia de detección y de expresión en las cepas de los genes que codifican para los sistemas de captación de hierro *iroN*, *feoB*, *irp2* y *fyuA*, que son necesarios para la nutrición y multiplicación bacteriana, evidencia la virulencia de las cepas para ocasionar infecciones agudas o crónicas en los pacientes con enfermedad periodontal.

Conclusiones

1. La mayoría de los pacientes infectados por *E. coli* fueron mujeres, pertenecientes a la tercera edad.
2. Los diagnósticos clínicos más importantes de los pacientes infectados fueron infecciones periodontales moderadas a crónicas.
3. El método de PCR fue una herramienta útil para la identificación de *E. coli*.
4. Los genes *iroN* (receptor del sideróforo catecolato), *feoB* (transportador de hierro ferroso) e *irp2* (hierro represible) se detectaron y expresaron en todas las cepas de *E. coli* aisladas de las infecciones periodontales de los pacientes.
5. El gen *fyuA* (receptor de sideróforo yersiniabactina) de *E. coli* se detectó y expresó únicamente en tres de las cinco cepas de *E. coli* aisladas de los pacientes con periodontitis.
6. Los genes *iucC* (implicado en la síntesis de aerobactina) e *ireA* (elemento que responde al hierro) no fueron detectados en ninguna de las cepas de *E. coli*.

7. Los medios BHI y Soya–Trypticaseína no mostraron diferencia en cuanto al crecimiento bacteriano de *E. coli* y la expresión de los genes de sistemas de captación de hierro.

Bibliografía

1. Abdulhadi E, Alkaisy N, Abed A. Efficacy of citric acid on periodontal disease. Biomedical Research. 2019; 30 (3): 406 - 409.
2. Aguado G, Moreno B, Jiménez B, García E, Preciado R. Impacto de los sideróforos microbianos y fitosideróforos en la asimilación de hierro por las plantas: una síntesis. Revista Fitotecnia Mexicana. 2012; 35: 9 - 21.
3. Armitage G. Diagnóstico y clasificación de las enfermedades periodontales. Periodontology 2000. 2005; 9: 9 – 21.
4. Bascones A, Figuero E. Las enfermedades periodontales como infecciones bacterianas. Revista Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal. 2005; 17: 147-156.
5. Botero A, Alvear F, Vélez M, Botero L, Velásquez H. Evaluación de los enfoques terapéuticos para las varias formas de enfermedad periodontal. Parte III. Prevalencia de bacilos entéricos y levaduras. 2008; 20: 72 - 86.
6. Braun V. Iron uptake by *Escherichia coli*. Front Biosci. 2003; 8; 1409 - 1421.
7. Braun V. Iron uptake mechanisms and their regulation in pathogenic bacteria. Intl J Med Microbiol 2001; 291: 67-79.
8. Cárdenas M, Cruz O, Gándara J, Pérez M. Factores de virulencia bacteriana: la “inteligencia” de las bacterias. Elementos. 2014; 21: 35 - 43.
9. Carranza C, León R, Falcón N, Neumann A, Kromm C. Caracterización y distribución de cepas de *Escherichia coli* potencialmente patógenas aisladas de pollos broiler de explotaciones avícolas en el Perú. Rev Inv Vet Perú. 2012; 23; 209 - 219.
10. Domínguez D, Islas H, Medina C. Severidad y extensión de periodontitis en ancianos de tres grupos aislados de Pachuca. Educación y Salud Boletín Científico de Ciencias de la Salud del ICSa. 2016; 5 (9).

11. Dormanesh B, Safarpour F, Hosseini S, Momtaz H, Mirnejad R, Javad M, Yahaghi E, Tarhriz V, Khodaverdi E. Virulence Factors and O-Serogroups Profiles of Uropathogenic *Escherichia coli* Isolated from Iranian Pediatric Patients. Iran Red Crescent Med J. 2014; 16: e14627.
12. Estemalik J., Demko C., Bissada N., Joshi N., Bodner D., Shankar E., Gupta S. Simultaneous Detection of Oral Pathogens in Subgingival Plaque and Prostatic Fluid of Men With Periodontal and Prostatic Diseases. Journal of Periodontology. 2017; 88 (9); 823 - 829.
13. Garrido M. Caracterización de los sistemas de captación de hierro y zinc del patógeno animal *Pasteurella multocida*. 2005. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Barcelona.
14. Gonzales A, Infante S, Reyes C, Ladines C, Gonzales E. β -Lactamasas de espectro extendido y factores de virulencia en *Escherichia coli* uropatógenas en asilos de ancianos en Lima, Perú. Rev Peru Med Exp Salud Publica. 2022; 39(1): 98 - 103.
15. Hancock V, Ferrieres L, Klemm P. The ferric yersiniabactin uptake receptor FyuA is required for efficient biofilm formation by urinary tract infectious *Escherichia coli* in human urine. Microbiol. 2008; 154: 167 - 175.
16. Holden V, Bachman M. Diverging roles of bacterial siderophores during infection. Metallomics. 2015; 7: 986 - 995.
17. Kadi N, Challis G. Chapter 17. Siderophore biosynthesis a substrate specificity assay for nonribosomal peptide synthetase-independent siderophore synthetases involving trapping of acyl-adenylate intermediates with hydroxylamine. Methods in Enzymology. 2009; 458: 431 - 457.
18. Kammler M, Schon C, Hantke K. Characterization of the Ferrous Iron Uptake System *Escherichia coli*. J Bacteriol. 1993; 175: 6212 - 6219.
19. Karimian A, Momtaz H, Madani M. Detection of uropathogenic *Escherichia coli* virulence factors in patients with urinary tract infections in Iran. African Journal of Microbiology Research. 2012; 6: 6811 - 6816.
20. Khasheii B, Anvari S, Jamalli A. Frequency evaluation of genes encoding siderophores and the effects of different concentrations of Fe ions on growth

- rate of uropathogenic *Escherichia coli*. Iranian Journal of Microbiology. 2016; 8: 359 - 365.
21. Krewulak K., Vogel H. Structural biology of bacterial iron uptake. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2008; 9: 1781 - 1804.
 22. Kudinha T. The Pathogenesis of *Escherichia coli* Urinary Tract Infections. Recent Advances on Physiology, Pathogenesis and Biotechnological Applications. IntechOpen 2017; <https://doi.org/10.5772/intechopen.69030>
 23. Lau C, Krewulak K, Vogel H. Bacterial ferrous iron transport: the Feo system. *FEMS Microbiology Reviews*. 2016; 40 (2): 273 - 298.
 24. Lee J, Subhadra B, Son Y, Kim D, Park H, Kim J, Koo S, Oh M, Kim H, Choi C. Phylogenetic group distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties of uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from patients with urinary tract infections in South Korea. *Lett Appl Microbiol*. 2016; 62 (1): 84 – 90.
 25. Lefort A, Panhard X, Clermont O, Woerther P, Branger C, Mentré F, Fantin B, Wolff M, Denamur E. Host Factors and Portal of Entry Outweigh Bacterial Determinants To Predict the Severity of *Escherichia coli* Bacteremia. *Journal of Clinical Microbiology*, 2011; 49: 777 – 783.
 26. Lemos M. Asimilación de hierro mediante sideróforos en patógenos bacterianos de peces. *Especial Microbiología del Medio Acuático*. 2016; 61: 40 - 42.
 27. Li Y, Dai J, Zhuge X, Wang H, Hu L, Ren J, Chen L, Li D, Tang F. Iron-regulated gene *ireA* in avian pathogenic *Escherichia coli* participates in adhesion and stress-resistance. *BMC Veterinary Research*. 2016; 12 (167): 1 - 10.
 28. Marlovits T, Haase W, Herrmann C, Aller S, Unger V. The membrane protein FeoB contains an intramolecular G protein essential for Fe(II) uptake in bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002; 99: 16243 – 16248.
 29. Medina A. Efecto de las enterobacterias en pacientes con periodontitis crónica. *Av Periodon Implantol*. 2010; 22 (1): 27 - 35.

30. Mombelli A. Microbial colonization of the periodontal pocket and its significance for periodontal therapy. *Periodontology* 2000. 2017; 76 (1): 85 - 96.
31. Momtaz H, Karimian A, Madani M, Safarpour F, Ranjbar R, Sarshar M, Souod N. Uropathogenic *Escherichia coli* in Iran: Serogroup distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2013; 12; 8.
32. Monroy E, Cerón A, García L, Alonso N, Domínguez P, Hernández T, Bustos J, Hamdan A, Rojas E, Vaca S, Vaca F, Paniagua G. Virulence gene transcription, phylogroups, and antibiotic resistance of cervico-vaginal pathogenic *E. coli* in Mexico. *PLoS One*. 2020; 15 (6): e0234730.
33. Paniagua G, Monroy E, Bautista A, Reyes R, Vicente A, Vaca F, Díaz C, Martínez S, Domínguez P, García L, Uribe A, Vaca S. Multiple antibiotic resistances and virulence markers of uropathogenic *Escherichia coli* from Mexico. *Pathogens and Global Health*. 2018; 112 (8): 415 - 420.
34. Paniagua G, Hernández T, Monroy E, Vaca F, Díaz C, Uribe A, Vaca S. Comprehensive expression analysis of pathogenicity genes in uropathogenic *Escherichia coli* strains. *Microbial Pathogenesis* 103. 2017; 1-7
35. Paniagua G, Monroy E, Reyes R, Bautista A, García L, Nolasco N, Hernández D, Santillán L, Domínguez P, Díaz C, Vaca F, Uribe A, Vaca S. O-serogroups of multi-drug resistant cervicovaginal *Escherichia coli* harboring a battery of virulence genes. *Journal of Infection and Chemother*. 2019; 25; 494 - 497.
36. Paniagua G, Monroy E, Rodríguez J, Domínguez P, Vaca F, Vaca S. Virulence factors, antibiotic resistance phenotypes and O-serogroups of *Escherichia coli* strains isolated from community-acquired urinary tract infection patients in Mexico. *Microbiol Immunol Infect*. 2017; 50 (4): 478 – 485.
37. Peña M, Calzado M, González M, Cordero S, Azahares H. Patógenos periodontales y sus relaciones con enfermedades sistémicas. *MEDISAN*. 2012; 16: 1137-1148.

38. Pereyra T, Yáñez I, Reyes L. Prevalencia de periodontitis causada por sobreinfecciones en pacientes con infección por virus de la inmunodeficiencia humana. *Revista Mexicana de Periodontología*. 2010; 1 (1): 13 - 18.
39. Pérez S, Fernández F. La lucha por el hierro: patógenos vs hospedero. CINVESTAV. 2010.
40. Rodríguez G. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pública de México*. 2002; 44: 464 - 475.
41. Romero F, Hernández L. Enfermedad periodontal: enfoques epidemiológicos para su análisis como problema de salud pública. *Rev. Salud Pública*. 2018; 20 (2): 258 - 264.
42. Russo T, Carlino U, Johnson J. Identification of a New Iron-Regulated Virulence Gene, *ireA*, in an Extraintestinal Pathogenic Isolate of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 2001; 69: 6209 – 6216.
43. Russo T, McFadden C, Carlino U, Beanan J, Barnard T, Johnson J. *IroN* Functions as a Siderophore Receptor and Is a Urovirulence Factor in an Extraintestinal Pathogenic Isolate of *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 2002; 70: 7156 - 7160.
44. Skaar E. The Battle for Iron between Bacterial Pathogens and Their Vertebrate Hosts. *Plos Pathogens*. 2010; 6: 1 - 4.
45. Spurbeck R, Dinh P, Walk S, Stapleton A, Hooton T, Nolan L, Kim K, Johnson J, Mobley H. *Escherichia coli* Isolates That Carry *vat*, *fyuA*, *chuA* and *yfcV*: Efficiently Colonize the Urinary Tract. *Infection and Immunity*. 2012; 80 (12): 4115 - 4122.
46. Smith J, Fratamico P, Gunther N. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Foodborne Pathogens and Disease*. 2007; 4: 134 - 163.
47. Yun K, Kim H, Park H, Kim W, Lim I. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* of urinary tract infections and asymptomatic bacteriuria in children. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 2014; 47: 455 - 461.

48. Zhao L, Chen X, Zhu X, Yang W, Dong L, Xu X, Gao S, Liu X. Prevalence of Virulence Factors and Antimicrobial Resistance of Uropathogenic *Escherichia coli* in Jiangsu Province (China). *Urology*. 2009; 74: 702-707.