



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

**Patrones de la expresión de genotipos de virulencia
de *Escherichia coli* en la línea celular A431**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

PRESENTA:

LECUONA MIRANDA LAURA DANIELA

DIRECTOR DE TESIS:

DR. ERIC MONROY PÉREZ

PROYECTO FINANCIADO POR LA UNAM-DGAPA-PAPIIT IN218614

LOS REYES IZTACALA, ESTADO DE MÉXICO, 2016





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.

DEDICATORIA:

- El presente trabajo está dedicado a mis padres Ana Laura Miranda Moreno y Juan Lecuona Sandoval que me apoyaron, incondicionalmente, y recorrieron este camino conmigo. Gracias a su ejemplo de responsabilidad, perseverancia, trabajo y amor pude concluir esta importante etapa de mi vida. Quiero agradecerles, también, por haberme inculcado con ternura los valores que me han permitido enfrentarme a situaciones adversas para salir adelante. Los amo
- A mi hermana Natalia mi amiga incondicional y la persona que me ha enseñado a ver la vida de forma alegre e interesante, Gracias por ser mi acompañante y cómplice de vida. Te amo
- A mis amigos Carlos, Areli, Alejandra, Marlenne, Sofia, Janet, Danya y Renata por compartir momentos inolvidables, y seguir en esta etapa de mi vida, gracias por sus consejos, risas y por demostrarme su amistad en todo momento. Los quiero mucho.

El cerebro y el resto del universo constituyen un todo coherente, no se pueden separar y estudiar independientemente (sin constituir una dualidad artificial y deformante que oculta su unidad y sus interconexiones fundamentales. La estructura y la función del cerebro son una función de la totalidad y de la interacción cerebro no-cerebro (medio).

Maslow, 1994

AGRADECIMIENTOS

- A la **Universidad Nacional Autónoma de México** y a la **Facultad de Estudios Superiores Iztacala**. Por brindarme las herramientas, teóricas y metodológicas, para poder desarrollar mis habilidades en un ámbito profesional y en mi vida diaria. Por construirme un cimiento de ética y honestidad y encaminar todas mis acciones hacia el bienestar de la sociedad.
- A la **Dra. Gloria Luz Paniagua Contreras**. Por acercarme a la biología molecular y demostrarme, con su profesionalismo, inteligencia, rectitud y compromiso, lo que es ser una mujer científica apasionada. Por transmitirme sus valiosos conocimientos más allá de lo escrito en los libros.
- Al **Dr. Eric Monroy Pérez**. Por la paciencia, el compromiso y la dedicación que depositó en mi proyecto. Por la confianza que me dio para aclarar todas mis dudas y por ser un gran maestro al saber guiar mis ideas. Por demostrarme, con su ejemplo y su trabajo, que todo esfuerzo y perseverancia tiene su retribución.
- Y al comité revisor de este trabajo: **Dr. Sergio Vaga Pacheco, Biol. Susana Esther González Almazán, y M. en C. David Segura Cobos**. Gracias por sus comentarios y aportaciones para que este trabajo fuera posible. Así como a la bióloga **Patrician Sánchez Yañez** por su apoyo en el laboratorio.

➤ **INDICE**

1. RESUMEN.....	8
2. INTRODUCCIÓN.....	9
2.1 Características de <i>Escherichia coli</i>	9
2.2 Patologías causadas por <i>E. coli</i>	10
2.3. Composición antigénica.....	11
2.4 Factores de virulencia.....	12
2.5 Infecciones del tracto urinario por UPEC.....	15
3. ANTECEDENTES.....	17
4. JUSTIFICACIÓN.....	19
5. OBJETIVOS.....	20
5.1 Objetivo General.....	20
5.2 Objetivos Particulares.....	20
6. MATERIALES Y MÉTODO.....	21
6.1 Origen de las cepas.....	21
6.2 Extracción del DNA.....	21
6.3 Identificación de <i>Escherichia coli</i> por PCR en Tiempo Real.....	21
6.4 Modelo de infección <i>in vitro</i> de la línea celular vaginal humana en las cepas de <i>Escherichia coli</i>	22
6.5 Extracción y purificación de RNA total utilizando el QIAcube y el equipo RNAeasy.....	23
6.6 Alimentación del QIAcube para la extracción del ARN.....	23
6.7 Preparación del buffer de lisis celular.....	24
6.8 Colocación de los reactivos en el QIAcube.....	24

6.9 Reversotranscripción.....	25
6.10 Eliminación del ADN genómico	25
6.11 Preparación de la <i>master mix</i> para la reversotranscripción.....	25
6.12 Preparación de la mezcla de reacción para PCR en tiempo real	26
7. RESULTADOS	28
7.1 Identificación de la especie <i>Escherichia coli</i> mediante PCR en Tiempo Real	28
7.2 Expresión de los genes de <i>E. coli</i> por PCR en Tiempo Real utilizando un modelo de infección <i>In vitro</i> de epitelio vaginal de la línea celular HVE A431.	29
7.3 Patrones de expresión de los marcadores de virulencia en las cepas de <i>E. coli</i> .	36
8. DISCUSIÓN.....	38
8.1 Identificación de la especie <i>E. coli</i>	38
8.2 Expresión de los genes que codifican para los sistemas de adquisición de hierro en las cepas de <i>E. coli</i> por PCR en Tiempo Real.	39
8.3 Gen <i>feoB</i> (ferrous iron transport protein B)	39
8.4 Gen <i>ireA</i> (Iron –regulated outer membrane virulence protein)	39
8.5 Gen <i>sitA</i> (periplasmic iron-binding protein)	39
8.6 Expresión de los genes que codifican protectinas en las cepas de <i>E. coli</i> por PCR en Tiempo Real.....	40
8.7 Gen <i>traT</i> (conjugal transfer surface exclusion protein).....	40
8.8 Expresión de los genes de adhesión en las cepas de <i>E. coli</i> por PCR en Tiempo Real.....	41
8.9 Gen <i>papA</i> (fimbrial major pilin protein)	41
8.10 Gen <i>papeF</i> (P-fimbrial adhesin gene)	41
8.11 Gen <i>bmaE</i> (group M-specific adhesion).....	41
8.12 Gen <i>ibeA</i> (invasión of brain epithelium).....	41

8.13 Expresión de los genes de tóxicas en las cepas de <i>E. coli</i> por PCR en Tiempo Real.....	42
8.14 Gen <i>HlyD</i> (chromosomal hemolysin D)	42
8.15 Patrones de expresión de los genes que codifican para sistemas de adquisición de hierro, adhesinas, protectinas y tóxicas en las cepas de <i>E. coli</i>	43
9. CONCLUSIONES.....	44
10 BIBLIOGRAFÍA.....	¡Error! Marcador no definido.

➤ 1. RESUMEN

Las cepas de *E. coli* uropatógenas (UPEC) son la causa principal de las infecciones del tracto urinario, incluyendo cistitis y pielonefritis. Las cepas UPEC poseen diferentes factores de virulencia que favorecen la adhesión, la colonización y la persistencia de la bacteria en el tracto urinario. El objetivo de este trabajo fue establecer los diferentes patrones de expresión de los genes de virulencia en cepas de *Escherichia coli* uropatógenas (UPEC) aisladas de pacientes con infecciones en las vías urinarias de dos hospitales públicos del Edo. de México. Para promover la expresión de los genes se utilizó un modelo *in vitro* de infección en un cultivo de células vaginales de la línea celular A431. La expresión de los marcadores genéticos en las cepas UPEC se determinó por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) en tiempo real. Los genotipos expresados con mayor frecuencia fueron *feoB* con 90.7%, *traT* 68% y *sitA* 58%, mientras que los genes expresados con menor frecuencia fueron *papA* 20.1% (n=39), *ibeA* 2.0% (n=4), *ireA* 13.9% (n=27) y *hlyD* 17% (n=33). Los genes *bmaE* y *papeF* que codifican para adhesinas no fueron identificados en ninguna de las cepas de *E. coli*. Las cepas de UPEC presentaron 31 patrones distintos de asociación, dentro de los cuales el patrón *feoB-traT-sitA* fue el más frecuente con 19.5%. Los resultados demostraron que durante la infección *in vitro* del cultivo vaginal humano fue necesario la expresión colectiva de varios de los genes de adhesión, de sistemas de adquisición de hierro, protectinas y toxinas por las cepas de *E. coli* uropatógenas.

➤ 2. INTRODUCCIÓN

2.1 Características de *Escherichia coli*

Escherichia coli es una de las especies bacterianas más estudiadas, no solamente por sus capacidades patogénicas, sino también como sustrato y modelo de investigaciones metabólicas, genéticas, poblacionales y de diversa índole (Neidhardt, 1999). En un plazo de 40 horas después del nacimiento *Escherichia coli* puede adherirse a la mucosa que recubre el intestino grueso, siendo un miembro importante de la flora normal del intestino de los seres humanos y otros mamíferos (Kaper *et al.*, 2004)

E. coli pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* y al género *Escherichia* (Ewing, 1985). Es un bacilo Gram negativo, no esporulados, con forma cilíndrica. El tamaño promedio de los bacilos es de 0.5 μ de ancho por 3 μ de largo, son móviles con flagelos peritricos, aerobios-anaerobios facultativos. Crecen en el medio de cultivo de Agar MacConkey y Agar Eosina Azul de Metileno (EMB). En Agar MacConkey crecen como colonias aisladas, medianas, circulares, convexas, con bordes redondeados, de coloración rosada debido a que son positivas a la lactosa. En EMB crecen como colonias aisladas, medianas, circulares, convexas, moradas, y con contorno verde-metálico (Paniagua, 2007). Son bacterias de rápido crecimiento y amplia distribución en el suelo, el agua, vegetales y gran variedad de animales. Producen pequeñas cantidades de vitamina B y K, fermentadores y oxidativos en medios con glucosa u otros carbohidratos, catalasa y β -galactosidasa positivos, oxidasa negativa, reductores de nitratos a nitritos, y poseedores de una proporción G+C de 39 a 59% en su DNA.

De acuerdo al manual de Bergey de Bacteriología sistemática Son positivos para la reacción de rojo de metilo, se inhibe su crecimiento por KCN (cianina de potasio) y son incapaces de crecer en medio con citrato como única fuente de carbono y energía, pero sí en caldo acetato. Producen H_2S , ureasa y son negativas a la fenilalanina, indol positivos y decarboxilan la lisina.

2.2 Patologías causadas por *E. coli*

Aunque la mayoría de *E. coli* son comensales inofensivos del intestino humano y animal, determinadas cepas están altamente adaptadas y son capaces de causar una variedad de enfermedades. Pueden ser muy versátiles, y con frecuencia patógenos mortales. Diferentes grupos de *E. coli* causan enfermedades intestinales y extraintestinales utilizando los numerosos factores de virulencia que poseen (Kaper *et al.*, 2004).

Por lo general las cepas de *E. coli* patógenas utilizan múltiples mecanismos para ocasionar enfermedades, como adhesión y colonización de la mucosa, evasión de los mecanismos de defensa, multiplicación y daño tisular (Kaper *et al.*, 2004).

Las cepas patógenas de *E. coli* pueden ser limitadas a la colonización de una superficie mucosa o se pueden difundir por todo el cuerpo y han sido implicadas en la infección del tracto urinario, sepsis / meningitis e infección gastrointestinal (Nataro & Kaper, 1998). El tracto gastrointestinal humano es susceptible de infecciones diarreogénicas por *E. coli*. Varios patotipos de *E. coli* se han implicado en la enfermedad diarreica, un importante problema de salud pública en todo el mundo, con más de dos millones de muertes que se producen cada año (Kosek *et al.*, 2003).

Las cepas patógenas intestinales poseen diversos factores de virulencia que sumados al tipo de enfermedad que producen han permitido agruparlas en patotipos: *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* de adherencia difusa (DAEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) y *E. coli* shigatoxigénica (STEC) (Nataro & Kaper, 1998).

Entre las *E. coli* extraintestinales (ExPEC) se encuentran las cepas de *E. coli* uropatógenas (UPEC), que son las responsables de la mayoría de las infecciones del tracto urinario (UTIS). Aunque solo seis serogrupos causan el 75% de las infecciones urinarias, muchas de las cepas parecen ser clonales, y no existe un único perfil fenotípico responsable de estas infecciones (Kaper *et al.*, 2004).

La diversidad de mecanismos patogénicos de esta bacteria en individuos aparentemente sanos es atribuida a la propiedad de una gran variedad de factores de virulencia específicos (Donnenberg, 2002; Johnson, 2002a; Scheutz *et al.*, 2005).

2.3. Composición antigénica

Las cepas dentro de cada patotipo se caracterizan por rasgos de virulencia compartidos y por lo general se pueden distinguir aún más por el antígeno O (lipopolisacárido) y los antígenos H (flagelar) (Kaper *et al.*, 2004).

Para determinar el grupo patógeno al que pertenecen (Kauffman, 1944) desarrolló un esquema de serotipificación que continuamente varía y que actualmente tiene 176 antígenos somáticos (O), 112 flagelares (H) y 60 capsulares (K). El antígeno "O" es el responsable del serogrupo; la determinación del antígeno somático y flagelar (O: H) indica el serotipo, el cual en ocasiones se asocia con un cuadro clínico en particular.

Existen cepas específicas de *E. coli* con capacidad potencial para invadir el uroepitelio y causar UTIs. Sólo ocho de los más de 170 serotipos de antígeno lipopolisacárido O (O1, O2, O4, O6, O7, O16, O18 y O75) son responsables del 80% de los episodios de pielonefritis aguda comunitaria (Orskov *et al.*, 1982). Estos antígenos somáticos se asocian con los serotipos capsulares K1, K2, K5, K12, K13. (Figura 1)

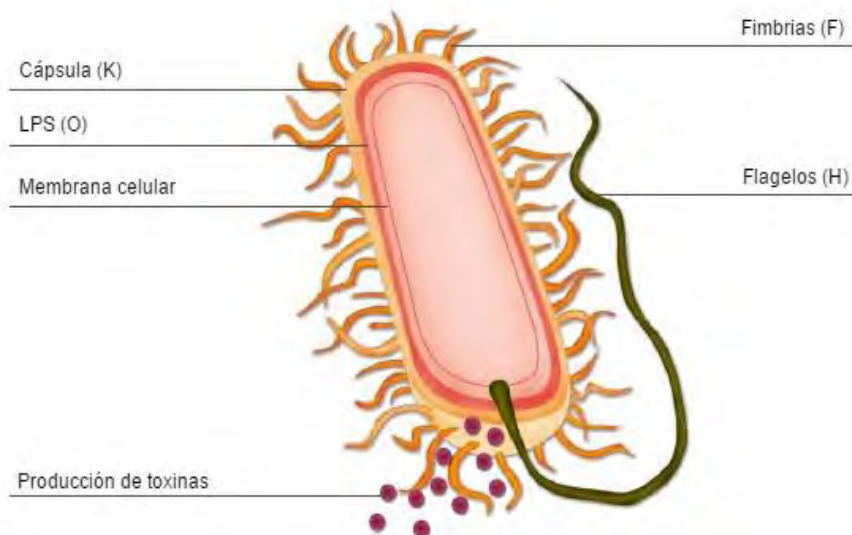


Figura 1. Factores de virulencia y antígenos de superficie de *E. coli* utilizados para la clasificación bacteriana por serogrupo y serotipo (tomada de Fairbrother 2015)

2.4 Factores de virulencia

Los factores de virulencia de *E coli* pertenecen a dos tipos principales; los producidos en la superficie de la célula y los producidos dentro de la célula y luego exportado al sitio de acción. Los de la superficie incluyen diferentes tipos de fimbrias que tienen un papel en la adhesión de la superficie de las células huésped, pero también pueden tener funciones adicionales, tales como la invasión de tejidos, la formación de biopelículas o la inducción de citoquinas. Otros factores de virulencia permiten a las bacterias crecer en un ambiente de restricción de hierro.

Entre los factores de virulencia presentes en la mayoría de las cepas ExPEC, se encuentran factores implicados en la adherencia de las bacterias a las células o adhesinas (p. ej., fimbrias tipo 1 y fimbrias tipo P), factores que permiten evitar o sobrevivir a los sistemas de defensa del huésped (como cápsulas y lipopolisacáridos), mecanismos de adquisición de nutrientes (sideróforos), proteasas, invasinas y toxinas (hemolisina y factor citotóxico necrosante) (Russo & Johnson, 2003) y puede variar entre los diferentes síndromes o tipos de infección (Johnson & Russo, 2005).

Las cepas patogénicas también poseen otros factores de virulencia tales como producción de aerobactina (secuestro de hierro) y hemolisina (Hedges, 1995).

Las proteínas de membrana externa también pueden contribuir a la virulencia, al encontrarse involucrados en la exportación de factores de virulencia, por ejemplo; la proteína TolC participa en la transferencia de la α - hemolisina a través de la membrana externa de las células de *E. coli* (Wandersman & Delepelaire, 1990).

La virulencia bacteriana es un fenómeno multifactorial. Las cepas patógenas de *E. coli* poseen diferentes tipos de factores de virulencia que contribuyen conjuntamente a potenciar su patogenicidad (Blanco *et al.*, 2002). La expresión de factores de virulencia específicos le confiere a la bacteria la creciente capacidad de adaptación a nuevos nichos, generando un amplio número de enfermedades (Kaper *et al.*, 2004).

Hasta el momento, los mecanismos moleculares y las ventajas selectivas que llevan a la evolución de la patogenicidad no están realmente bien comprendidos. Por ejemplo, se

considera que para la mayoría de los patógenos bacterianos la virulencia es un proceso multifactorial que requiere principalmente de dos componentes: 1) un entorno genético propicio: el cual se ha determinado que el serotipo está fuertemente asociado con la patogenicidad (Nataro & Kaper, 1998) un grupo de genes de virulencia que son únicos en los patógenos (Groisman & Ochman, 1996). En varios patógenos estos determinantes se encuentran en plásmidos, mientras que en otros patógenos la mayor parte de los genes responsables de un cuadro clínico se presentan en el cromosoma en uno o más grupos de genes denominados "islas de patogenicidad" (Salyers & Whitt, 1994).

En la tabla 1 se aprecian los principales factores de virulencia de las cepas de *E. coli* involucradas en infecciones de vías urinarias

Factor de virulencia	Función
<p><i>papA</i> (Pap fimbrial major pilin protein) <i>papEF</i> (P-fimbrial adhesin gene) <i>bmaE</i> (group M- specific adhesin) <i>ibeA</i> (invasion of brain epithelium) <i>tshd</i> (Temperature-sensitive haemagglutinin gene) <i>afal</i> (Afimbrial adhesin I) <i>fim</i> (type-1 fimbriae) <i>iha</i> (non hemagglutinating) <i>pap</i> (pillus associated with pyelonephritis) <i>papG</i> (fimbrial adhesin G)</p>	Adhesinas
<p><i>ireA</i> (Iron-regulated outer membrane virulence protein) <i>sitA</i> (periplasmic iron-binding protein) <i>feoB</i> (Ferrous iron transport protein B) <i>iutAD</i> (Ferric aerobactin receptor gene iron transport) <i>irp-2</i> (Iron-repressible gene associated with yersiniabactin synthesis) <i>iuc</i> (aerobactin) <i>iroN</i> (<i>iron</i>)</p>	Sistema de Adquisición de hierro
<p><i>hlyD</i> (chromosomal hemolysin D) <i>cnf1</i> (citotoxic necrotizing factor 1) <i>usp</i> (uropathogenic specific protein) <i>vat</i> (vacuolating autotransporter toxin) <i>cva/cvi</i> (colicin V plasmid operon genes)</p>	Citotoxina
<p><i>traT</i> (conjugal transfer surface exclusion protein) <i>kpsMT II</i> (K-antigen) <i>pic</i> (protein involvedin the intestinal colonization) <i>omp T</i> (The outer memembrane protease T) <i>sap</i> (sensitive to antimicrobial peptide) <i>sigA</i> (factor sigma) <i>iss</i> (increased serum survival protein)</p>	Protectinas
<p><i>set1A</i> y <i>set1B</i> (Shigella enterotoxin 1) <i>sen</i> (sHet-2 toxin) <i>astA</i> (EnteroAggregative heat stable toxin)</p>	Enterotoxinas

Tabla 1: Factores de virulencia de UPEC

2.5 Infecciones del tracto urinario por UPEC

Es probable que la infección urinaria inicie cuando UPEC coloniza la zona periuretral y asciende por la uretra hasta la vejiga (Figura 2). Entre 4 y 24 horas ocurre la expresión de las fimbrias tipo 1 (Gunther *et al.*, 2001), que tienen un papel importante temprano en el desarrollo de las UTIs (Connell *et al.*, 1996). Las Fimbrias tipo 1 de *E. coli* se unen a restos de manosa de los receptores de uroplaquinas de la capa de transición de las células epiteliales (Mulvey *et al.*, 1998). Lo que desencadena la apoptosis y la exfoliación; la invasión del epitelio de la vejiga se acompaña con la formación de protuberancias de la vaina que se extienden sobre la superficie de la vejiga que contienen bacterias encapsuladas en una matriz de polisacárido rodeado por una capa de uroplaquinas (Anderson *et al.*, 2003). Se ha descrito que en el interior de las células epiteliales las bacterias forman una biopelícula que actúa como un reservorio para infecciones recurrentes (Mulvey *et al.*, 1998; Anderson *et al.*, 2003), y de hecho, en algunos casos de infección recurrente, se encontró asociado el mismo serogrupo. La adquisición de hierro y la capacidad de crecer en la orina también son cruciales para la supervivencia. En las cepas UPEC que causan cistitis las fimbrias tipo 1 se expresan continuamente y la infección se limita a la vejiga (Connell *et al.*, 1996). En cepas causantes de pielonefritis, el elemento invertible que controla la expresión de fimbrias tipo 1 se vuelve a la posición "off" y las fimbrias tipo 1 no se expresan (Gunther *et al.*, 2001). Este proceso libera a *E. coli* de los receptores de las células epiteliales de la vejiga y permite al organismo ascender a través de los uréteres hacia los riñones, donde la bacteria puede presentar fimbrias P para los receptores que se expresan en el epitelio renal (Eden & Hansson, 1978; Korhonen *et al.*, 1986). En esta etapa, la hemolisina podría dañar el epitelio renal (Trifillis *et al.*, 1994) y, junto con otros productos bacterianos, incluyendo LPS, inicia una respuesta inflamatoria aguda que recluta a los polimorfos nucleares (PMNs) al sitio de infección. Se ha demostrado que la hemolisina también induce el Ca^{2+} ocasionando oscilaciones en las células epiteliales renales, resultando en aumento de la producción de IL-6 y IL-8 (Uhlen *et al.*, 2000). La secreción de Sat, una citotoxina vacuolizante, causa daños a los glomérulos y es citopático para el epitelio que rodea (Guyer *et al.*, 2000). En

algunos casos, la barrera que proporciona los túbulos proximales de una sola célula de espesor puede ser abierta y las bacterias pueden penetrar las células endoteliales para entrar en el torrente sanguíneo, dando lugar a la bacteremia.

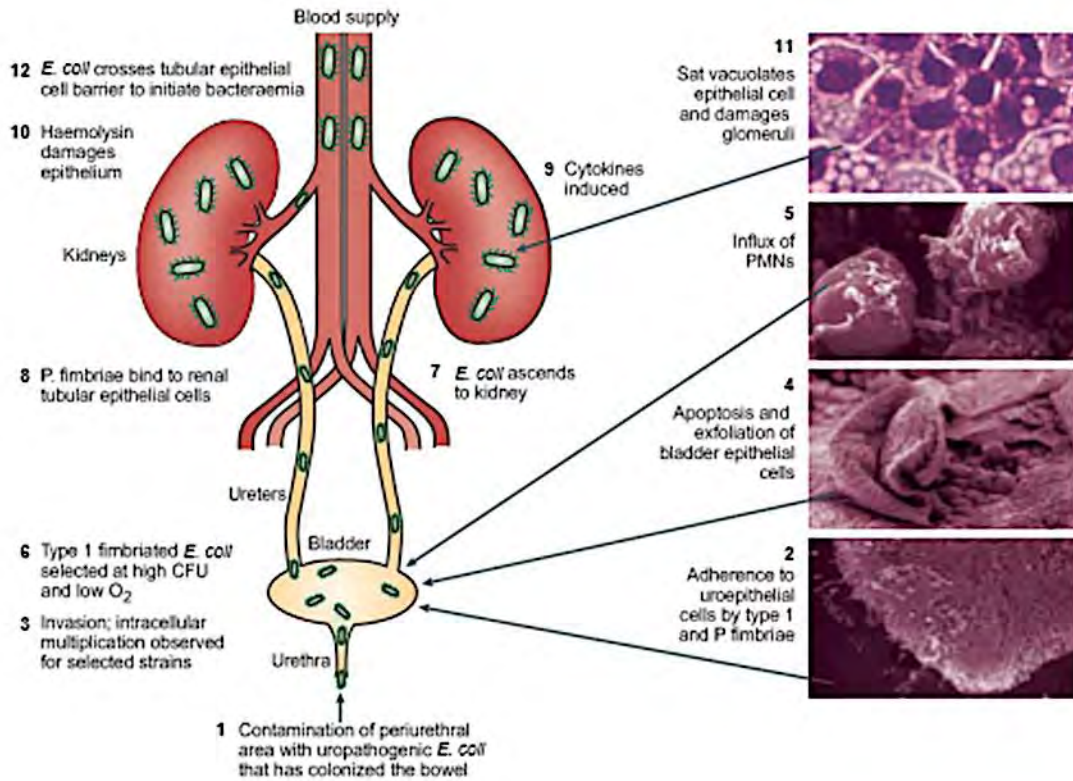


Figura 2 Patogénesis de la infección urinaria causada por *E. coli* uropatógena. La figura muestra las diferentes etapas de una infección del tracto urinario. Paneles 2, 4, 5 y 11 tomadas de (Gunther et al., 2015). CFU= unidades formadoras de colonias; PMN= leucocitos polimorfonucleares

➤ 3. ANTECEDENTES

Farshad *et al.*, (2009) evaluaron la prevalencia de los genes de virulencia en 96 cepas de *E. coli* aisladas de niños con infección del tracto urinario (ITU). El 49.2% de los casos fueron diagnosticados como cistitis, y el 50.8% como pielonefritis aguda. La prevalencia de los genes *pap*, *sfa*, *hly* y *cnf* entre las cepas aisladas fue del 27.1%, 14.6%, 13.5% y 22.9%, respectivamente. Este estudio demostró una mayor prevalencia de pielonefritis en presencia de los genes de virulencia de *E. coli*.

Karimian *et al.*, (2012) estudiaron por PCR los factores de virulencia en 123 cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con (ITU). El gen *fimH* fue detectado en el 79.7% de las cepas seguido de *cnf1*, *hlyA*, *pap*, *iroN*, *afa*, *iuc*, *iha*, *OmpT* e *irp2* con 50.4, 50.4, 50.4, 42.27, 8.13, 10.56, 17.88, 11.38 y 4.87%, respectivamente, mientras que los genes menos frecuentes fueron *tsh* y *usp*, con 0,0% y 1.62%.

Tarchouna *et al.*, (2013) evaluaron 90 cepas de *E. coli* uropatógenas para detectar por PCR la prevalencia de siete genes de virulencia. Estos autores encontraron que el gen *fimH* predominó en el 68% de las cepas, *pap* en 41%, *SFA/FOC* 34%, *afa* en 20% y *hly* y *cnf* se identificaron en 19% y 3% de las cepas, respectivamente. Una prevalencia del 52% fue encontrado para el gen *aer*.

Firoozeh *et al.*, (2014) estudiaron los genes de virulencia en 150 cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con pielonefritis y cistitis, incluyendo los genes *pap*, *hly*, *aer*, *sfa*, *cnf*, *afa*, *traT* y *PAI*. En este estudio se identificaron 19 patrones de virulencia diferentes entre las cepas UPEC, en donde el patrón más prevalente fue *traT-PAI*. Los genes *pap*, *traT*, *aer*, *hly*, y *PAI* fueron más prevalentes entre las cepas de los pacientes con pielonefritis que en los de cistitis, Los genes *sfa*, *afa* y *cnf*, no se detectaron en ninguna de las cepas.

López- Banda *et al.*, (2014) analizaron 108 cepas de *E. coli* de mujeres Mexicanas, con infección del tracto urinario. Estos autores estudiaron la asociación de 16 genes de virulencia (adhesinas, toxinas, sideróforos, lipopolisacárido e invasinas), los grupos filogenéticos, y la resistencia a los antibióticos. La distribución de los grupos filogenéticos

fue la siguiente: B1, 9.3%, A, 30.6%, B2, 55.6% y D 4.6%. La prevalencia de los genes de virulencia fue; *ecp* 98.1%, *fimH* 86.1%, *trat* 77.8%, *sfa/focDE* 74.1%, *papC* 62%, *iutA* 48.1%, *fyuA* 44.4%, *focG* 2.8%, *sfaS* 1.9%, *hlyA* 74%, *cnf-1* 6.5 %, *cdt-B* 0.9%, *cvac* 2.8%, *IbeA* 2.8%, y *rfa* 0.9%. Alrededor del 50% de las bacterias fue resistente a ampicilina/sulbactam, ampicilina, piperacilina, trimetoprim/sulfametoxazol, ciprofloxacina, y levofloxacina.

➤ 4. JUSTIFICACIÓN

Debido a que actualmente se desconoce de manera global la expresión de los marcadores de virulencia de *E. coli* uropatógena, en el presente estudio se determinaran los diferentes patrones de expresión de los genes *bmaE*, *papA*, *papEF*, *sitA*, *traT*, *feoB*, *ireA*, *hlyD* e *ibeA* en cepas de *E. coli* utilizando un modelo *in vitro* de cultivo de células epiteliales vaginales humanas.

➤ 5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

- Determinar la expresión de los genes de virulencia en cepas de *Escherichia coli* uropatógenas (UPEC) aisladas de pacientes con infecciones del tracto urinario.

5.2 Objetivos Particulares

- Determinar la expresión de los genes que codifican para adhesinas, toxinas, hemolisinas, protectinas y sistemas de adquisición de hierro en cepas de *E. coli* por PCR en tiempo real después de la infección *in vitro* de cultivo de células epiteliales vaginales humanas.
- Establecer los diferentes patrones de expresión de los genotipos de virulencia en las cepas de *E. coli*.

➤ 6. MATERIALES Y MÉTODO

6.1 Origen de las cepas

Para la realización del presente trabajo, se utilizaron 194 cepas de (*Escherichia coli*, 1885) previamente aisladas de pacientes con infecciones del tracto urinario de dos hospitales públicos: Hospital General Regional No. 72 “Lic. Vicente Santos Guajardo” y de la Unidad de medicina familiar No. 64 del IMSS, Unidad Tequesquihuac, ubicadas en el municipio de Tlalnepantla de Baz, Edo. de México.

6.2 Extracción del DNA

Cada una de las cepas de *E. coli* fue sembrada en agar EMB (Eosina Azul de Metileno) por el método de estría cruzada e incubada a 37°C durante 24h. Después de obtener el crecimiento óptimo bacteriano se tomaron varias colonias por medio de una asa estéril y se depositaron en un tubo estéril de 16x150 mm, que contenía 2 mL de agua desionizada estéril. El inóculo fue agitado por medio de un Vortex Mixer® por 30 segundos y posteriormente se colocaron en baño maría durante 20 minutos. Al término las muestras se colocaron en hielo (0°C) por 10 minutos. Finalmente las muestras fueron centrifugadas en una microcentrifuga Beckman Coulter™ a 14,000rpm durante 10 minutos. El sobrenadante que contenía el DNA fue transferido a un tubo eppendorf de 200 µL estéril y se guardó a -20°C hasta su posterior utilización (Paniagua *et al.*, 2007).

6.3 Identificación de *Escherichia coli* por PCR en Tiempo Real

La identificación de la especie *E. coli* se realizó por PCR en tiempo real mediante la detección del marcador cromosómico 16SrRNA (Lane *et al.*, 1985). Los oligonucleótidos que se utilizaron fueron wl-3110 (AGAGTTTGATCGTGGCTACG) y wl-3111 (CCGTCAATTCATTTGAGTTT) integrated DNA Technologies™. Para el ensayo de PCR en Tiempo Real se utilizó el kit Rotor Gene SYBR Green PCR (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. El volumen final de la mezcla de reacción fue de 25 microlitros; 12.5 microlitros Master Mix SYBR Green, 1 microlitro del primer Forward (1 µm), 1 microlitro del primer Reverse (1 µm), 2 microlitros de ADN genómico (20 ng) y 8.5 microlitros de RNasa-Free-Water. Las condiciones de amplificación fueron: 95°C durante 5 minutos (activación de la HotStart), 40 ciclos de desnaturalización a 95°C

durante 5 segundos y la combinación de alineación/extensión de 60°C por 10 segundos. La cepa de *E. coli* ATCC 11775 fue utilizada como control positivo.

6.4 Modelo de infección *in vitro* de la línea celular vaginal humana en las cepas de *Escherichia coli*.

Para promover la expresión de los genes de virulencia de *E. coli* (adhesinas, toxinas, protectinas y de hierro), las cepas fueron crecidas en agar Eosina Azul de Metilo (Bloxon) e incubadas a 37 °C por 24 horas. Al término una colonia de cada cepa de *E. coli* fue depositada en el medio líquido BHI (infusión-cerebro-corazón; Bloxon) e incubada a 37 °C por 24 horas. Posteriormente los cultivos fueron diluidos 1:100 e incubados a 37 °C por 2 horas hasta obtener una $DO_{600} = 0.4$ que correspondió a 1×10^9 células por mL. La dilución bacteriana fue centrifugada a 2000 rpm por 3 minutos y lavada tres veces con PBS (Sodium Phosphate Buffer) (Green *et al.*, 2004). Finalmente la pastilla se resuspendió en 1mL de PBS, y a partir de ésta se tomaron 50 μ L (1×10^9 células por mL) y se depositaron sobre la superficie de un cultivo de la línea celular vaginal A431 derivada de un carcinoma epidermoidal vulval (ATCC, Manassas, VA, USA), (Figura 3). Las placas con los cultivos fueron incubadas a 37 °C por 48 horas en 5% de CO₂ y humedad saturada. Después de esto las células bacterinas fueron recolectadas de la superficie de cada uno de los cultivos celulares por medio de asas estériles y se resuspendieron en tubos eppendorf con 500 μ L de PBS. A partir de esto, se preparó una dilución en PBS con 5×10^7 células y se centrifugaron a 10000 rpm durante 5 minutos. Los sobrenadantes fueron decantados y las pastillas celulares fueron utilizadas para la extracción del RNA.

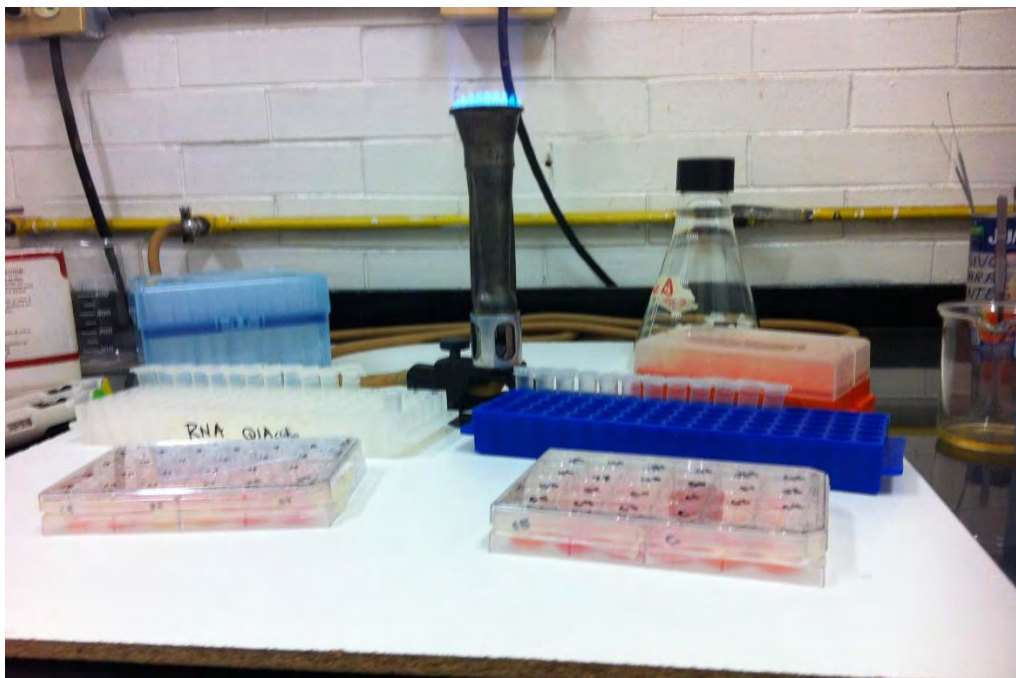


Figura 3. Placa del cultivo de la línea celular vaginal A431 derivada de un carcinoma epidermoidal vulval

6.5 Extracción y purificación de RNA total utilizando el QIAcube y el equipo RNeasy.

Para la extracción y purificación total del RNA de bacterias y levaduras, el Qiacube fue alimentado con los reactivos incluidos en el equipo comercial RNeasy mini Kit (Qiagen; No. de catalogo 74104). El RNeasy incluyó los siguientes solventes:

- A) Botella con 220 ml de RLT (buffer de lisis que contiene guanidine thiocyanate).
- B) Botella con 220 ml de RW1 (buffer de lavado conformado por etanol y una pequeña cantidad de guanidine thiocyanate).
- C) Botella con 55 ml de RPE concentrado (buffer de lavado, antes de usar adicionar 4 volúmenes de etanol al 96%).
- D) Botella con 50 ml de agua libre de RNasas.

6.6 Alimentación del QIAcube para la extracción del ARN

Los tubos eppendorf con las pastillas celulares bacterianas obtenidas después de la infección del cultivo de la línea celular vaginal A431 fueron depositados en los pozos del agitador del QIAcube (Figura 4).



Figura 4 Colocación de los tubos eppendorf con las pastillas celulares bacterianas, en los pozos dell agitador QIAcube

6.7 Preparación del buffer de lisis celular

Buffer TE para bacterias

El buffer de lisis celular TE se elaboró de la manera siguiente:

Se preparó una solución con 10 mM Tris-Cl y 1 mM de EDTA, el pH se ajustó a 8.0. Antes de usarse se adicionó 1 mg/mL de lisozima (Sigma Catálogo L7651).

6.8 Colocación de los reactivos en el QIAcube

El tubo eppendorf con un volumen de 1.5 mL de TE, se colocó en el pozo A del QIAcube. Las diferentes botellitas con volúmenes de 25 mL de buffer RLT, Ethanol (ETOH) al 100%, RW1, RPE y H₂O libre de RNasas, en cada caso, se colocaron en la sección de reactivos. Es importante mencionar que el buffer RLT utilizado en esta etapa contenía 10 µL de mercaptoethanol (β -ME) por cada mililitro de buffer, de tal manera que para un volumen final de 25 mL de buffer de RLT se le adicionaron 250 µL de β -ME.

Posteriormente se colocaron las puntas para pipeta dentro del contenedor. Al término se colocaron los tubos de columna y de elución dentro de los contenedores de plástico y se depositaron en el interior de la centrifuga del equipo. Finalmente se seleccionó el programa y se inició la corrida de extracción del RNA. La concentración deseada de ARN fue ≤ 30 ng.

6.9 Reversotranscripción

Para la reversotranscripción de RNA a ADNc se utilizó el equipo Quantitec® Reverse Transcription (Quiagen®; N°de catálogo 205311) siguiendo las instrucciones del fabricante.

6.10 Eliminación del ADN genómico

Se descongeló el ARN y los componentes del Kit a temperatura ambiente (15°-25°C) Para un volumen final de reacción de 24 µL se depositó en un tubo eppendorf de 0.2 mL cada uno de los siguientes componentes como se muestra en el cuadro 1

Componente/ Reactivo	Volumen
gDna Wipeout buffer, 7X	1.5µL
ARN templado	10µL
Agua libre de RNasa	11.5µL

Cuadro 1 Componentes de reacción para la eliminación del ADN genómico.

Posteriormente se incubó cada tubo a 42°C por 2 minutos, e inmediatamente se colocó en hielo.

6.11 Preparación de la *master mix* para la reversotranscripción

La Master mix contenía todos los compontes necesarios para la síntesis de la primera cadena de ADNc. Para un volumen final por mezcla de reacción de 20 microlitros se depositó en un tubo eppendorf de 0.2 mL cada uno de los siguientes componentes que aparecen en el cuadro 2:

Componentes/ Reactivos	Volumen
Master mix para reversotranscripción Quantiscript Reverse Transcriptasa (Contiene inhibidor de RNasa)	1 μ L
Quantiscript Rt buffer, 5X (Incluye Mg ⁺² y Dntps)	4 μ L
Rt Primer Mix	1 μ L
ARN Templado	14 μ L

Cuadro 2 Componentes de reacción para la reversotranscripción.

Al término, se mezclaron los componentes y se mantuvieron en hielo hasta incubarlo a 42° C por 15 min. Más tarde se incubó a 95°C por 3 min para inactivar la transcriptasa reversa. Finalmente, la reacción (ADNc) se guardó a -20°C hasta su utilización en PCR en tiempo real.

6.12 Preparación de la mezcla de reacción para PCR en tiempo real

Para el ensayo de PCR en tiempo real se utilizó el equipo de PCR Rotor-Gene™ SYBR Green I (Qiagen). Para un volumen final de reacción de 20 μ L, se depositó en un tubo de 0.1 mL las cantidades que se muestran en el cuadro 3. Durante el desarrollo de la PCR los tubos con las mezclas de reacción se mantuvieron en hielo.

Componente/ Reactivo	Volumen
Primer FW	1µL
Primer RV	1µL
Master mix SYBR Green	10µL
DNAc	1µL
Agua libre de nucleasa	7µL

Cuadro 3. Preparación de la mezcla de reacción para la PCR en tiempo real.

Al término los tubos se colocaron en el equipo de PCR en Tiempo Real Rotor Gene™, se ingresó al software y se programará el equipo en el canal verde bajo las condiciones del ciclaje que se muestran en el cuadro 4:

Pasos	Tiempo	Temperatura	Nº. ciclos	Procedimiento
Activación inicial de PCR	3 min.	95° C	1	Activación de la Hot Star Taq Plus ADNpolimerasa
Desnaturalización	30s	95° C	40	Detección de fluorescencia y colección de datos.
Combinación alineación/ extensión	30s	57° C		

Cuadro 4. Condiciones de ciclaje para la Identificación de *E. coli* por PCR en tiempo real

➤ 7. RESULTADOS

7.1 Identificación de la especie *Escherichia coli* mediante PCR en Tiempo Real

Para el desarrollo de este estudio se analizaron 194 cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con infecciones en las vías urinarias de la Clínica N° 64 del IMSS y del Hospital N° 72 del IMSS, ubicados en el municipio de Tlalnepantla de Baz, Edo. de México. El 100% de las cepas fue identificada como *E. coli* debido a la amplificación del gen 16 SrRNA mediante PCR en Tiempo Real (Figura 5 Y 6)

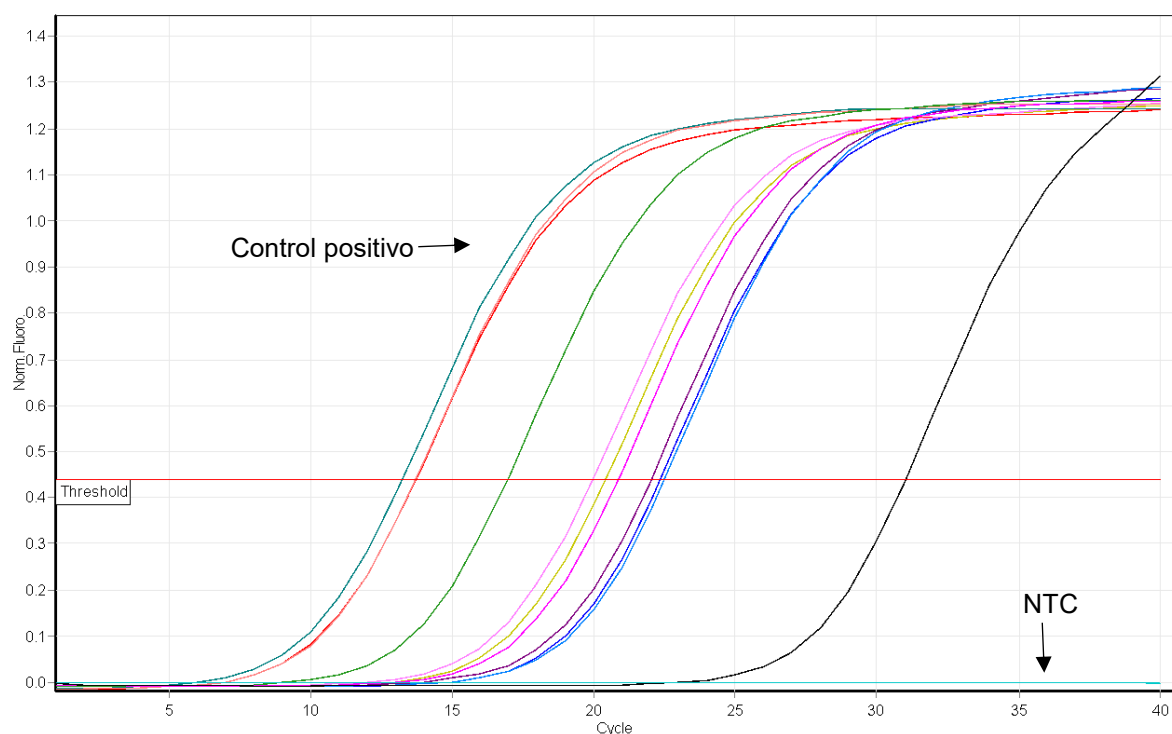


Figura 5. Detección de *Escherichia coli* mediante la amplificación del gen 16 SrRNA por PCR en tiempo real utilizando SYBR® Green. La lectura se realizó en el canal verde. Control positivo = *E. coli* ATCC 25922, Control negativo = NTC (No Control Templado).

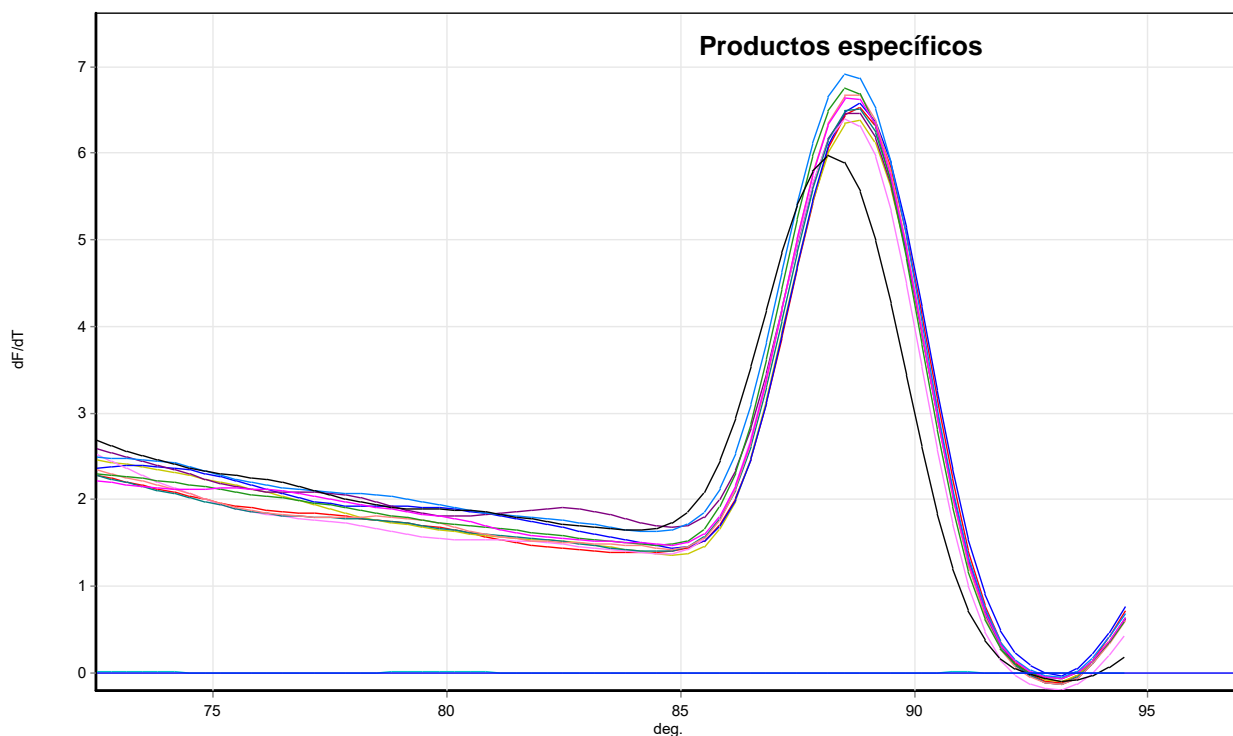


Figura 6. Curva de fusión (Melting point) del gen 16SrRNA de las cepas de *Escherichia coli*. Los productos específicos muestran una temperatura de disociación más elevada que los productos inespecíficos.

7.2 Expresión de los genes de *E. coli* por PCR en Tiempo Real utilizando un modelo de infección *In vitro* de epitelio vaginal de la línea celular HVE A431.

Durante la infección *In vitro* del cultivo celular A431 con las cepas de *E. coli* (n=194), el gen que se expresó con más frecuencia fue *feob* (hierro) con el 90.7% (n=176) de las cepas (Tabla 2, Figuras 7 y 8), seguido por *traT* (Figura 9 y 10) y *sitA* (Figura 11 y 12; protectinas) con el 68% (n=133) y 58% (n=114), respectivamente, *papA* (adhesión) con el 20.1% (n=39; Figuras 13 y 14), y *hlyD* (toxina) con el 17% (n=33; Figuras 15 y 16), mientras que los genes expresados con menor frecuencia fueron *ireA* (hierro) 13.9% (n=27; Figuras 17 y 18), e *ibeA* con el 2.0% (n=4; Tabla 2). Los genes *bmaE* y *papeF* que codifican para adhesinas, no fueron identificados en ninguna de las cepas de *E. coli*.

Gen	% de expresión (No. de cepas) n=194
<i>feoB</i>	90.7 (176)
<i>traT</i>	68 (133)
<i>sitA</i>	58 (114)
<i>papA</i>	20.1 (39)
<i>hlyD</i>	17 (33)
<i>ireA</i>	13.9 (27)
<i>ibeA</i>	2.0 (4)
<i>bmaE</i>	0
<i>papeF</i>	0

Tabla 2. Porcentaje de expresión de los genes de virulencia en las cepas UPEC.

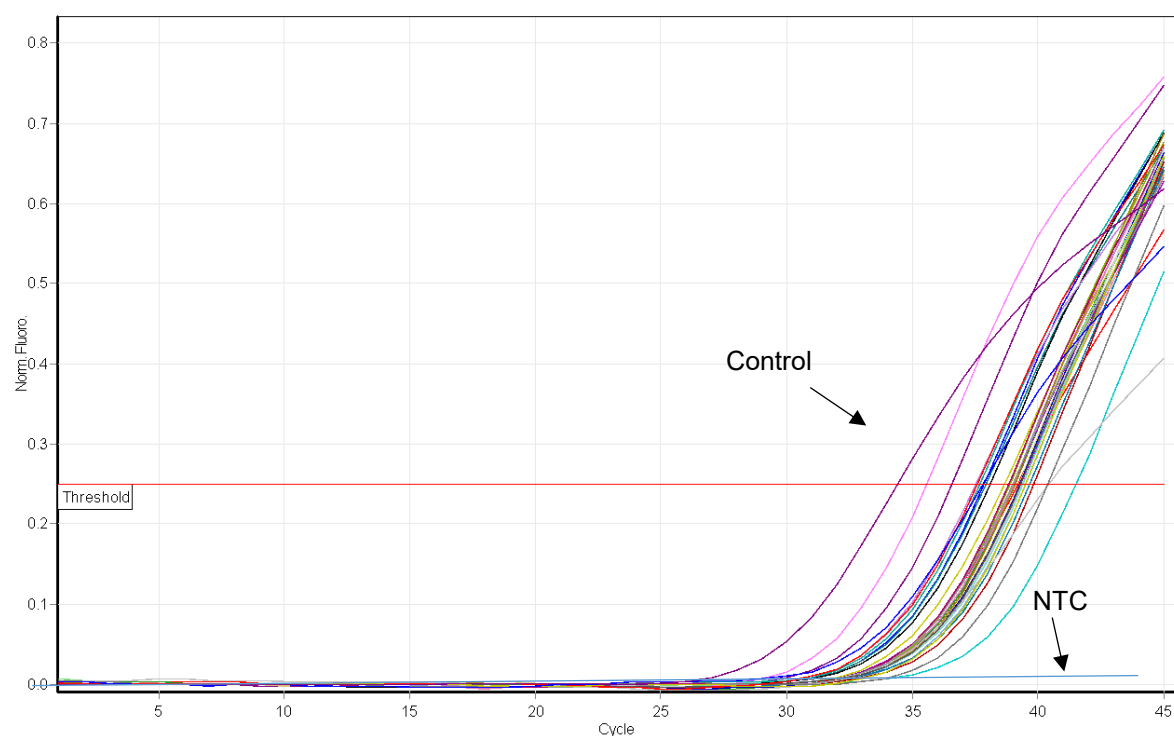


Figura 7. Expresión del gen *feoB* en las cepas de *E. coli* por PCR en Tiempo Real utilizando SYBR® Green. La lectura se realizó en el canal verde. Control positivo = *E. coli* ATCC 25922, Control negativo = NTC (No Control Templado).

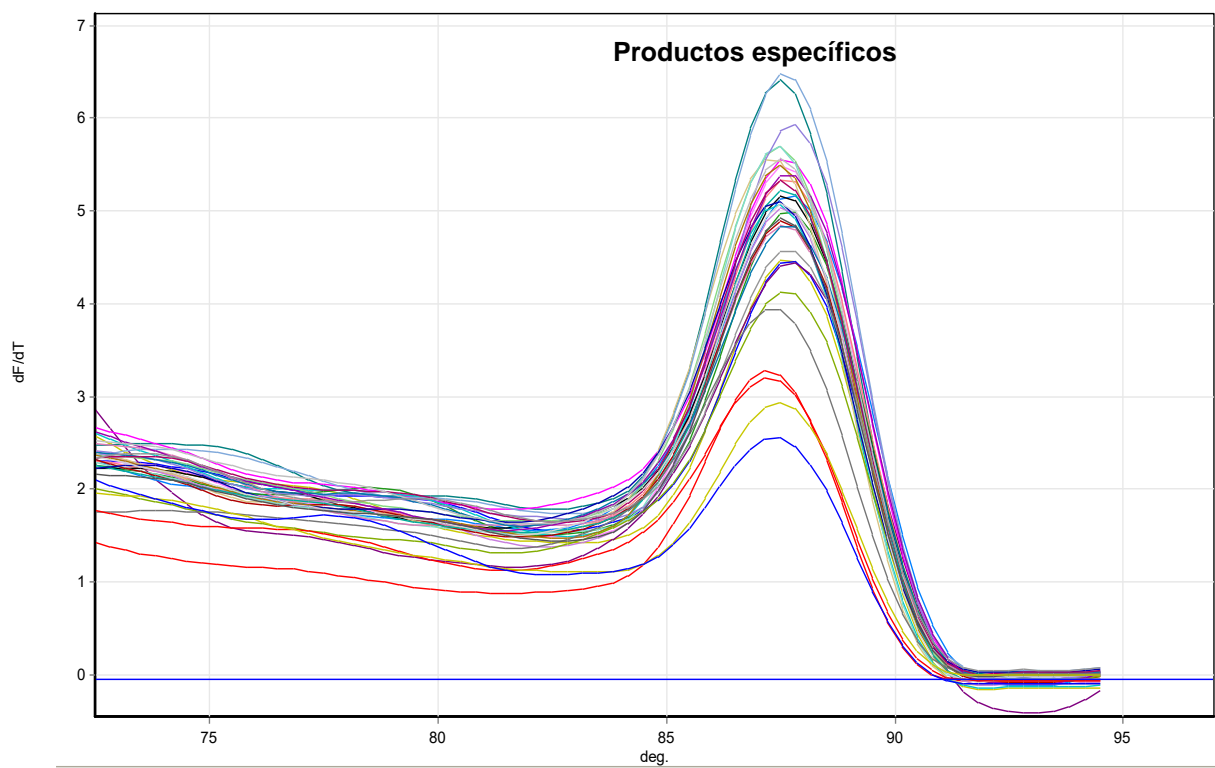


Figura 8. Curva de fusión (Melting point) de la expresión del gen *feoB*. Los productos específicos muestran una temperatura más alta de disociación a comparación con los productos inespecíficos.

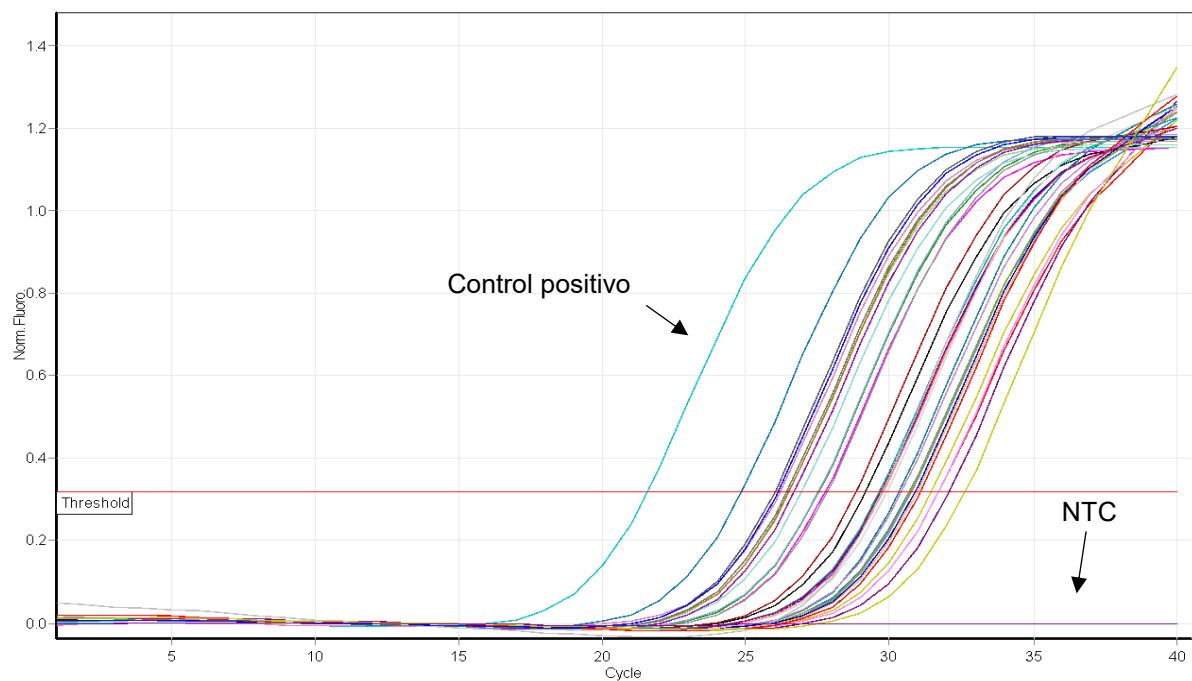


Figura 9. Expresión del gen *traT* en las cepas de *E. coli* por PCR en Tiempo Real utilizando SYBR® Green. La lectura se realizó en el canal verde. Control positivo = *E. coli* ATCC 25922, Control negativo = NTC (No Control Templado).

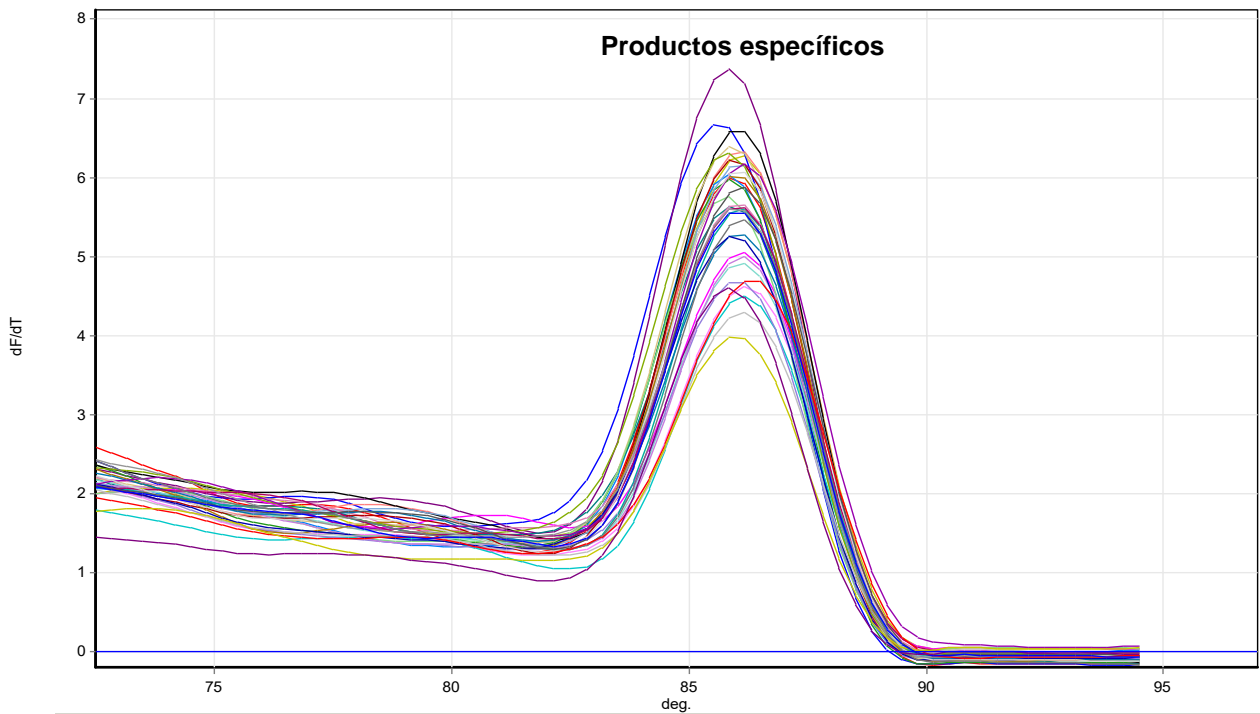


Figura 10. Curva de fusión (Melting point) de la expresión del gen *traT*. Los productos específicos muestran una temperatura más alta de disociación a comparación con los productos inespecíficos.

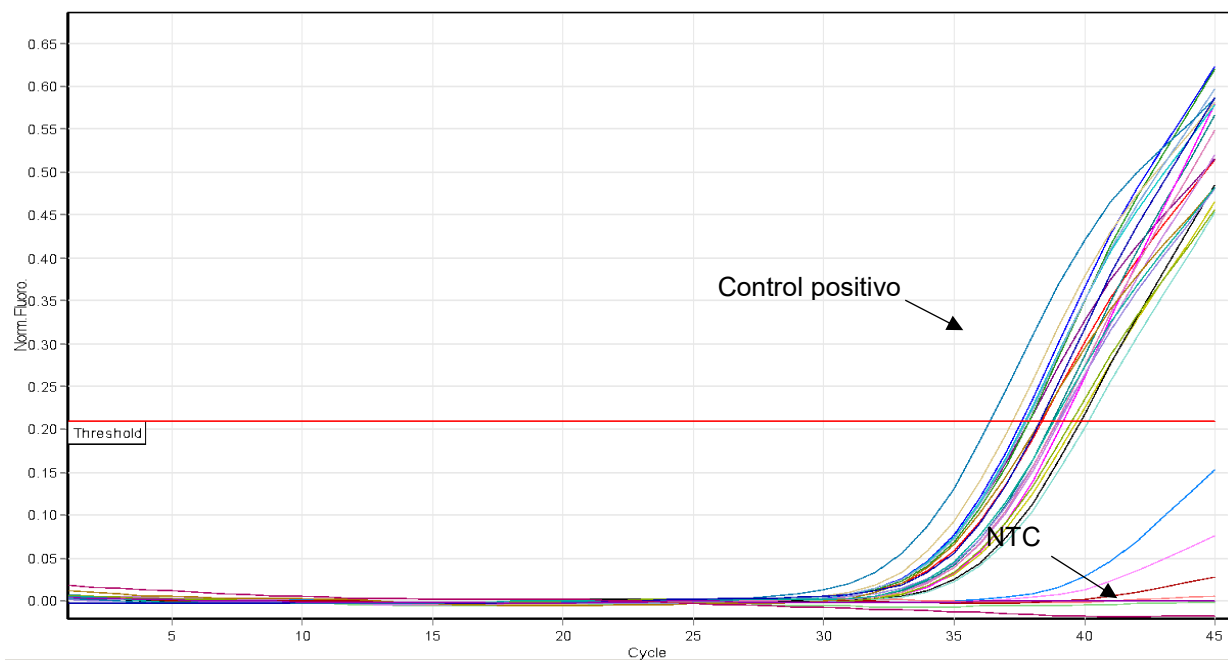


Figura 11. Expresión del gen *sitA* en las cepas de *E. coli* por PCR en Tiempo Real. Control positivo = *E. coli* ATCC 25922, Control negativo = NTC (No Control Templado).

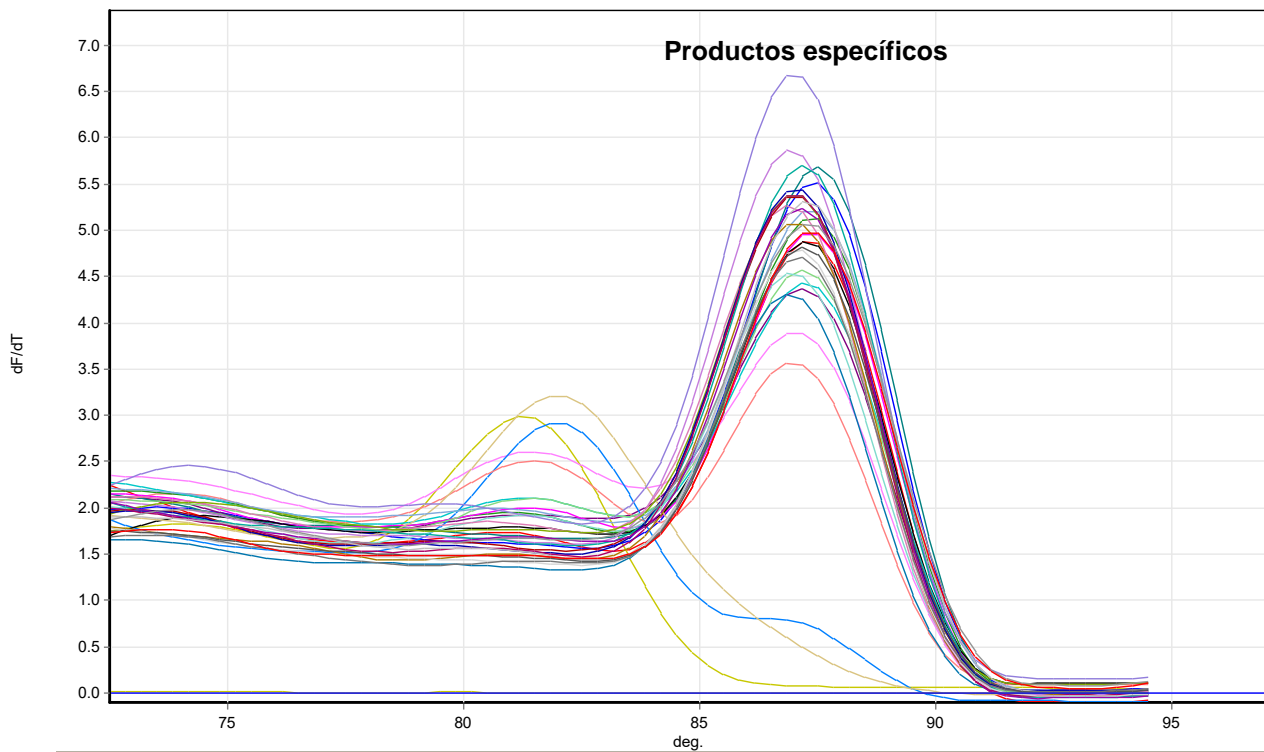


Figura 12. Curva de fusión (Melting point) de la expresión del gen *sitA*.

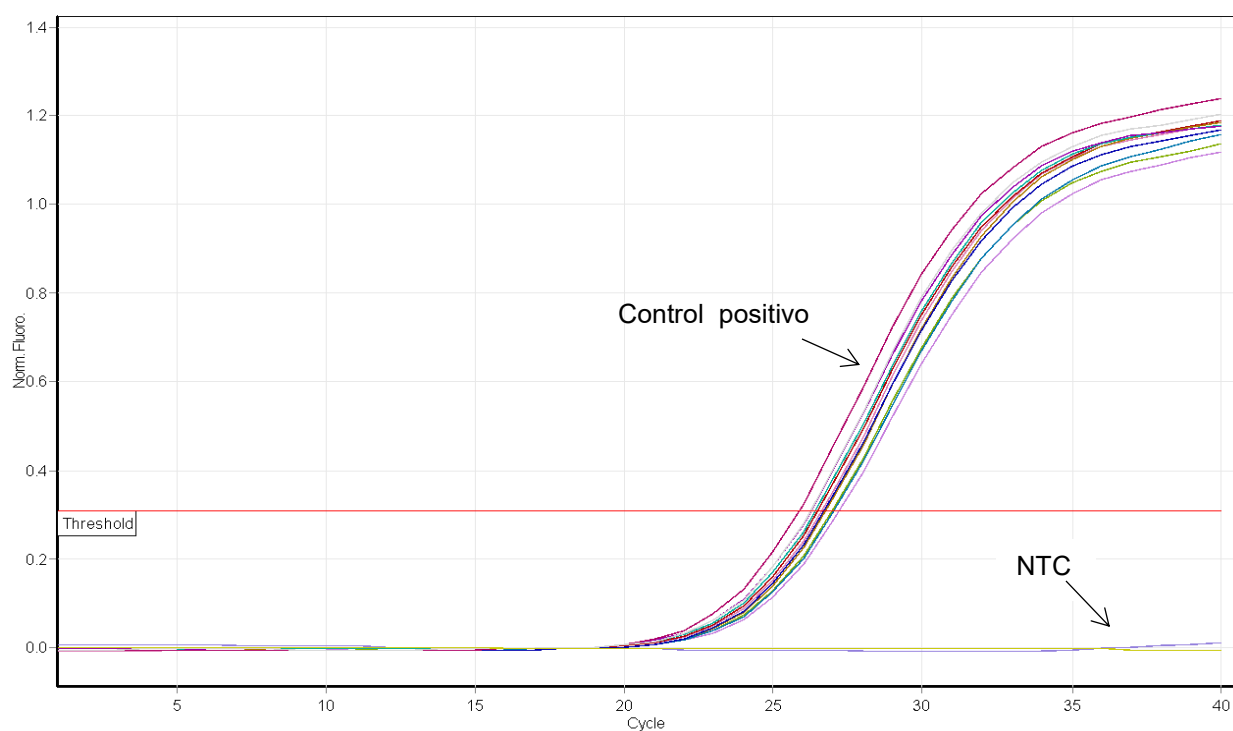


Figura 13. Expresión del gen *papA* en las cepas de *E. coli* por PCR en Tiempo Real. Control positivo = *E. coli* ATCC 25922. Control negativo = NTC (No Control Templado).

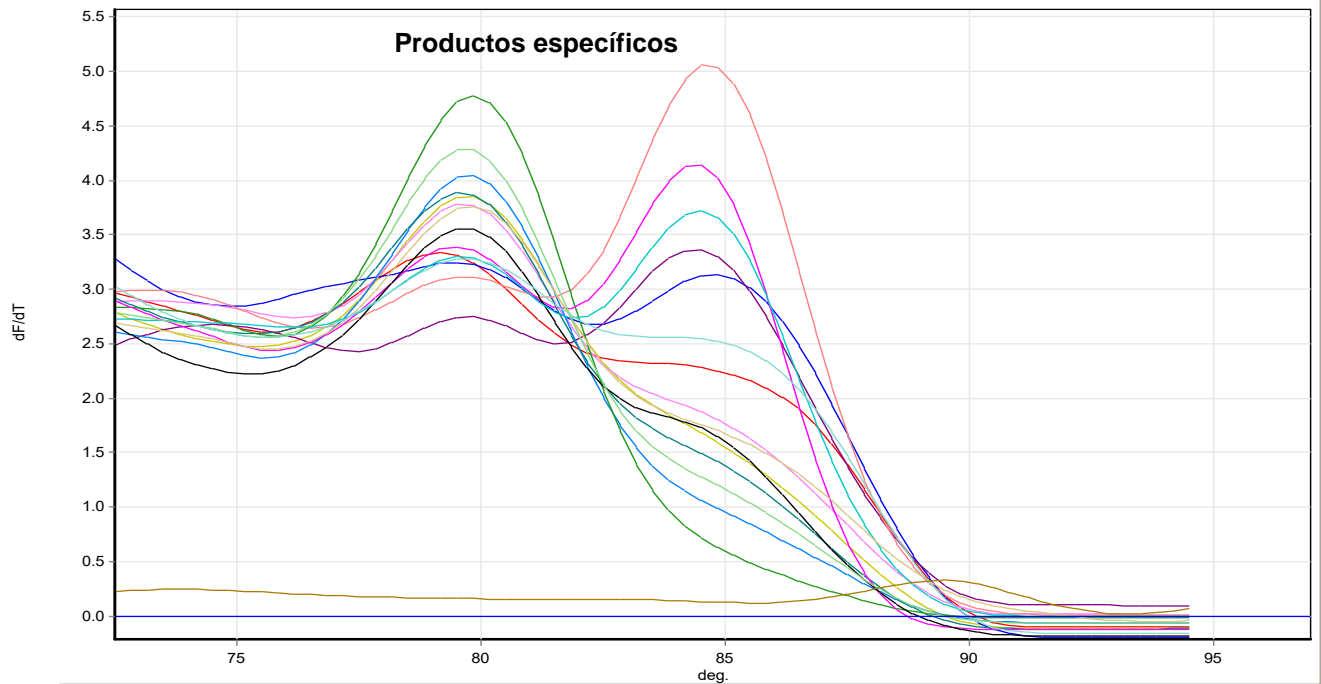


Figura 14. Curva de fusión (Melting point) de la expresión del gen *papA*.

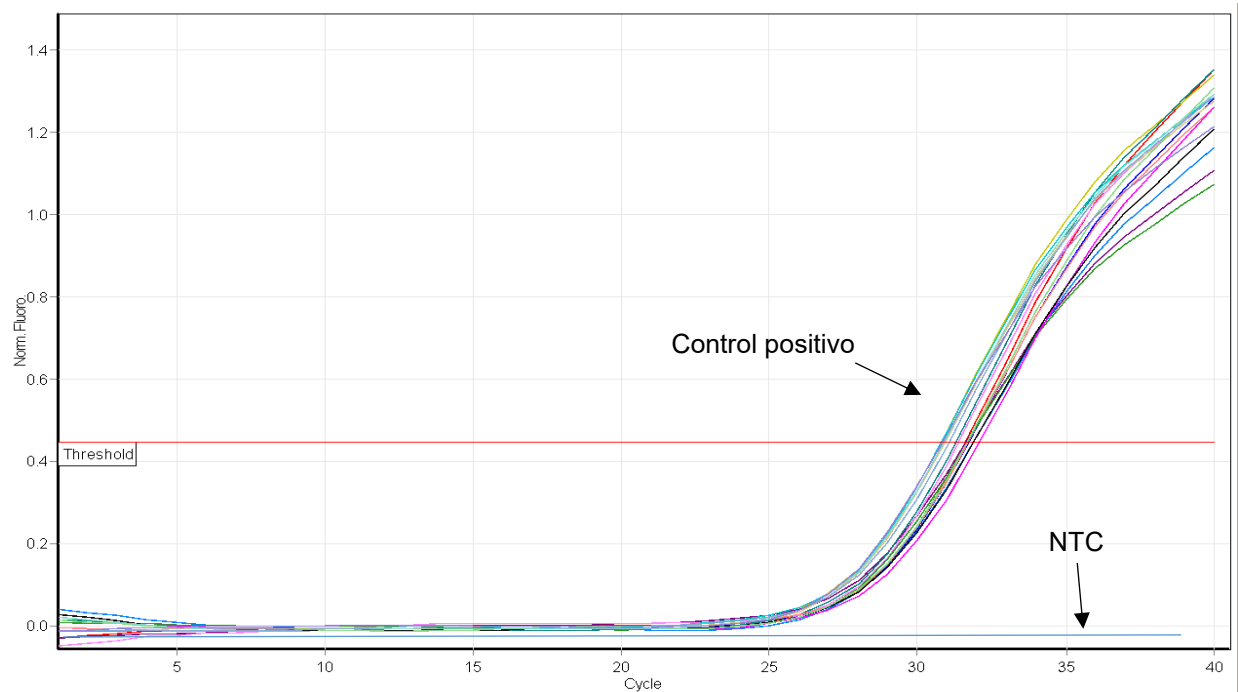


Figura 15. Expresión del gen *hlyD* en las cepas de *E. coli* por PCR en Tiempo Real. Control positivo = *E. coli* ATCC 25922, Control negativo = NTC (No Control Templado).

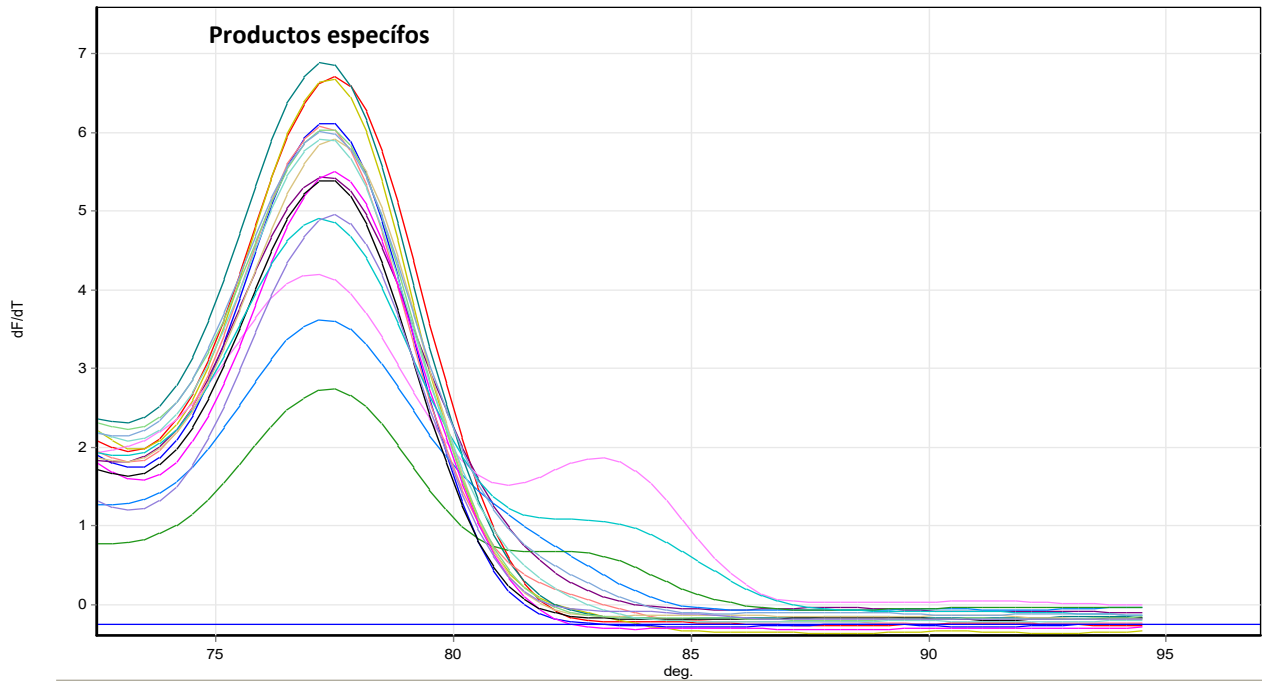


Figura 16. Curva de fusión (Melting point) de la expresión del gen *hlyD*.

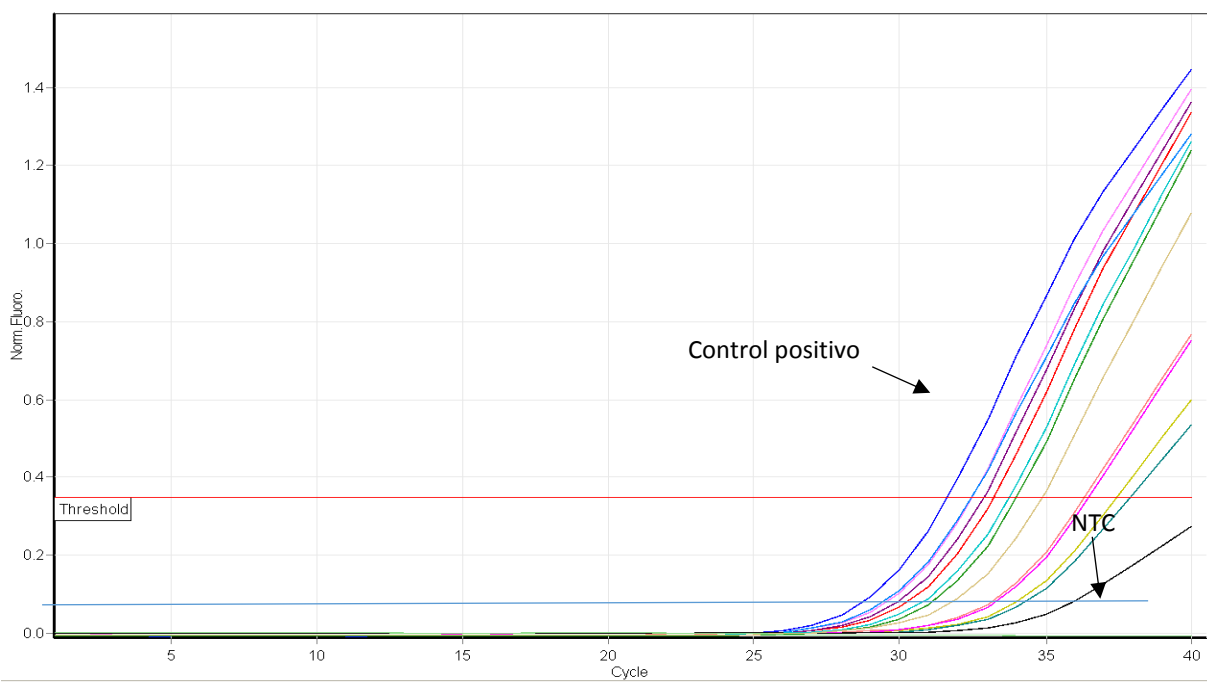


Figura 17. Expresión del gen *ireA* en las cepas de *E. coli* por PCR en Tiempo Real. Control positivo = *E. coli* ATCC 25922. Control negativo = NTC (No Control Templado).

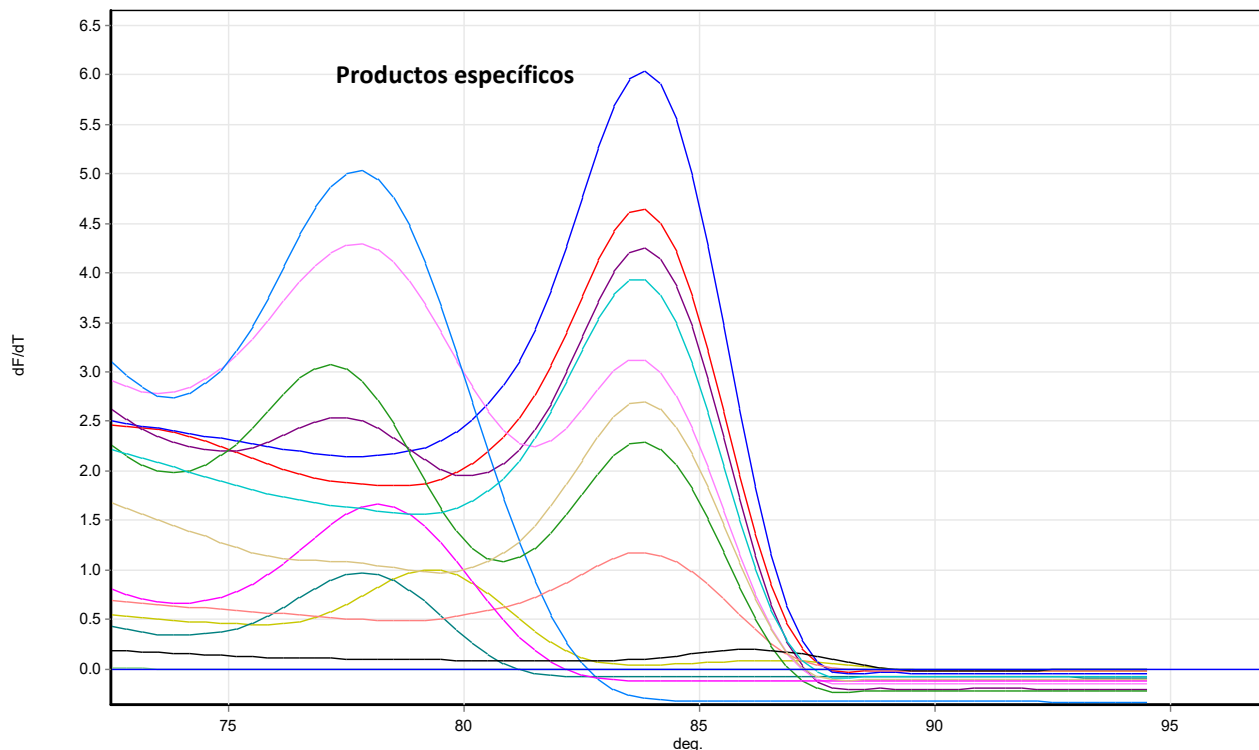


Figura 18. Curva de fusión (Melting point) de la expresión del gen *ireA*.

7.3 Patrones de expresión de los marcadores de virulencia en las cepas de *E. coli*.

En este estudio se identificaron 31 patrones distintos de expresión de los genotipos en las 194 cepas de *E. coli* (Tabla 3), dentro de los cuales el patrón más frecuente (no. 1; *feoB-traT-sitA*) se detectó en el 19.5% (n=38) de las cepas, el patrón no. 2 (*feoB- traT*) fue encontrado en el 15.9% (n=, 31) de las cepas, el patrón no. 3 (*feoB-sitA*) en el 11.34% (n=22) y el patrón no. 4 (*ireA-feoB-traT*) en el 4.12% (n=8). Los patrones 5-31 se encontraron representados por una cepa, en cada caso.

N° de patrón	patrón	Número de cepas	%
1	<i>feoB-traT-sitA</i>	38	19.5
2	<i>feoB-traT</i>	31	15.9
3	<i>feoB-sitA</i>	22	11.3
4	<i>ireA-feoB-traT</i>	8	4.1
5	<i>papA-feoB-traT-sitA</i>	7	3.6
6	<i>ireA-feoB-traT-sitA</i>	6	3.0
7	<i>feoB-hlyD-traT-sitA</i>	5	2.5
8	<i>papa-feoB-hlyD-traT-sitA</i>	5	2.5
9	<i>feoB-hlyD-sitA</i>	5	2.5
10	<i>papA-feoB-hlyD-sitA</i>	5	2.5
11	<i>papA-feoB-traT1</i>	4	2.0
12	<i>traT-sitA</i>	4	2.0
13	<i>papA-feoB</i>	3	1.5
14	<i>papA-ireA-feoB-traT-sitA</i>	3	1.5
15	<i>papA-feoB-hlyD-traT</i>	3	1.5
16	<i>feoB-traT-ibeA-sitA</i>	2	1.0
17	<i>feoB-hlyD-traT</i>	2	1.0
18	<i>feoB-hlyD</i>	2	1.0
19	<i>papA-feoB-sitA</i>	2	1.0
20	<i>ireA-feoB-hlyD-traT-sitA</i>	2	1.0
21	<i>ireA-traT</i>	2	1.0
22	<i>feoB-ibeA</i>	1	0.5
23	<i>ireA-feoB-hlyD-traT</i>	1	0.5
24	<i>ireA-feoB-sitA</i>	1	0.5
25	<i>papA-sitA</i>	1	0.5
26	<i>papA-ireA-feoB-hlyD-sitA</i>	1	0.5
27	<i>papA-ireA-hlyD-traT</i>	1	0.5
28	<i>papA-traT</i>	1	0.5
29	<i>IreA-traT-sitA</i>	1	0.5
30	<i>papA-ireA-feoB-traT</i>	1	0.5
31	<i>papA-hlyD-traT-sitA</i>	1	0.5

Tabla 3. Patrones de expresión de los genotipos de *E. coli*

➤ 8. DISCUSIÓN

8.1 Identificación de la especie *E. coli*

En este trabajo se analizaron 194 cepas de *Escherichia coli* aisladas de pacientes con infecciones de las vías urinarias. El 100% (n=194) de las cepas se identificó como *E. coli* mediante la amplificación por PCR en tiempo real del gen 16SrRNA (Figura 5 y 6). Se ha descrito que *E.coli* es responsable del 80 % de las infecciones del tracto urinario, siendo la vejiga el sitio primario de infección en aproximadamente el 95% de todas las UTIs (Mulvey, 2002).

La exitosa invasión del tracto urinario por UPEC depende del número de factores de virulencia que poseen, del tamaño del inóculo, y de los mecanismos de defensa del hospedero (Moreno, 2006). Sin embargo, se ha encontrado una mayor prevalencia e incidencia en las mujeres, debido principalmente a las características anatómicas, tales como la proximidad entre el ano y la abertura uretral, a cambios hormonales y de la microbiota genital (Moura *et al.*, 2009; Lloyd *et al.*, 2007).

En México se ha descrito que desde el año 2003 y hasta el 2008 las UTIs ocuparon el tercer lugar dentro de las 20 principales causas de morbilidad, observándose una prevalencia más alta en los grupos de edad de los 25-44 años y en los adultos mayores de 65 años, siendo *Escherichia coli* uropatógena (UPEC) el principal agente etiológico (Welch *et al.*, 2002; Kaper *et al.*, 2004; Bower *et al.*, 2005; Brzuszkiewicz *et al.*, 2006; Lloyd *et al.*, 2007).

A nivel mundial se estima que alrededor de 150 millones de infecciones urinarias ocurren cada año (Raz, 2000). Se estima que el 11% de las mujeres experimentan al menos un diagnóstico de infección del tracto urinario (ITU) por año, y el 60% de las mujeres tienen o han tenido una infección del tracto urinario o más durante su vida (Mulvey, 2002). En el Edo. de México existe poca información sobre las UTIs ocasionadas por *E.coli*, sin embargo, se ha reconocido a las UTIs como un serio problema económico para el sector salud (Mulvey, 2002; Fronzes, 2008). En el 2008 se notificaron 3, 244,994 casos de UTIs, lo que representa una incidencia de 3,041.7 / 100,000 habitantes, de los cuales el 75.6

% (2, 453,608/ 100,000 habitantes) fueron mujeres, con una incidencia de 4,508.6 /100,000.

8.2 Expresión de los genes que codifican para los sistemas de adquisición de hierro en las cepas de *E. coli* por PCR en Tiempo Real.

En este estudio se utilizó un modelo de infección *in vitro* en cultivo de células epiteliales vaginales humanas de la línea celular A431 para determinar la expresión de los genes que codifican para sistemas de captación de hierro, adhesinas, toxinas y protectinas en las cepas de *E. coli*. El hierro es un elemento esencial para la sobrevivencia de *E. coli*, que facilita la reducción del peróxido, el transporte de electrones en la respiración celular, la biosíntesis de nucleótidos (Braun, 2001), el ciclo de los ácidos tricarbóxicos, la síntesis de metabolitos, fosforilación oxidativa, y estrés oxidativo (Andrews *et al.*, 2003). Debido a esto, las bacterias han desarrollado múltiples estrategias para la obtención de hierro durante los procesos infecciosos, que incluyen la expresión de los sistemas de adquisición de hierro mediante sideróforos que generalmente son formados por un compuesto quelante del hierro que la bacteria excreta y puede volver a captar (Blanco *et al.*, 2002). En este estudio se encontró que los genes de hierro expresados más frecuentemente por las cepas UPEC durante el modelo de infección de la línea celular A431, fueron *feoB* con el 90.7% (n=176) de las cepas (Tabla 2, Figuras 7 y 8), *ireA* con el 13.9% (n=27; Figuras 17 y 18) y *sitA* con el 58% (n= 114; Tabla 2; Figura 11 y 12). La expresión de los marcadores de virulencia, incluyendo los genes de hierro en cepas UPEC han sido muy poco estudiados en modelos de infección en animales o *in vitro*, sin embargo se han descrito porcentajes de detección para *feoB* del 95% (n=192) en cepas UPEC (n=202) aisladas de pacientes con UTIs en China (Zhao *et al.*, 2009), del 99% (n=198) en cepas UPEC (n=200) de pacientes con infecciones del tracto urinario en Dakota del Norte (Rodríguez-Siek *et al.*, 2005) y del 67.2% (n=43) en cepas de *E. coli* (n=64) aisladas de pacientes con UTIS al sur de Corea (Yun *et al.*, 2014).

Para *ireA* se han descrito porcentajes de identificación del 18% (n=37) en cepas de *E. coli* (n=202) aisladas de pacientes con UTIs en China (Zhao *et al.*, 2009), del 5% (n= 22) en cepas UPEC (n=330) (Park HK *et al.*, 2009), y del 32.9% (n=46) en cepas de *E. coli*

(n=140) (Li *et al.*, 2016), mientras que para *sitA* se han reportado prevalencias del 59% (n=119) (Zhao *et al.*, 2009), del 77% (n=66) (Luo *et al.*, 2012) y del 15.3% en cepas UPEC (Derakhshandeh *et al.*, 2015).

La elevada expresión de *feoB* durante el modelo *in vitro* de infección con cepas UPEC empleado en este estudio, demuestra que la expresión de este genotipo juega un rol importante durante la patogénesis de las infecciones de las vías urinarias. Se ha observado que los compuestos de hierro incrementan la virulencia de *E. coli* (Bullen *et al.*, 1968; Bornside *et al.*, 1970; Bornside *et al.*, 1968). La importancia del gen *feoB* radica en que las cepas UPEC utilizan la proteína FeoB en condiciones anaerobias-microaerofilicas (Cao *et al.*, 2007), que es producida por la mayoría de las bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* (Grim *et al.*, 2012; Hood & Skaar, 2012).

8.6 Expresión de los genes que codifican protectinas en las cepas de *E. coli* por PCR en Tiempo Real

Las cepas de *E. coli* uropatógenas poseen numerosos genes de virulencia que le permite a las bacterias protegerse contra la respuesta inmune del hospedero durante los procesos infecciosos. Entre estos genes se encuentran *traT* (conjugal transfer surface exclusion protein), *ompT* (The outer membrane protease T), *iss* (increased serum survival protein y *kpsMT II* (K-antigen) (Rodríguez-Siek *et al.*, 2005). En éste estudio durante el modelo de infección de la línea celular A431 con las cepas UPEC, *traT* fue expresado en el 68% (n=133) (Tabla 2, Figura 9 y 10). Se ha reportado una prevalencia de este gen del 75% (n=151) en cepas UPEC (n=202) aisladas de pacientes con UTIs en China (Zhao *et al.*, 2009), del 77% (n=139) en cepas de *E. coli* (n=180) aisladas de Nueva Gales del Sur de Australia (Kudinha *et al.*, 2011), del 80.6% (n=58) en un grupo (n= 72) de cepas UPEC aisladas de pielonefritis y del 67.9% (n=53) en cepas aisladas de pacientes con cistitis (n=78) (Firoozeh *et al.*, 2014).

Aunque el mecanismo de acción de la proteína traT y su papel exacto en la virulencia aún no se ha estudiado, la evidencia actual sugiere que traT aumenta la resistencia de las bacterias a la acción lítica del complemento (respuesta inmunitaria) (Moll *et al.*, 1980;

Ogata & Levin 1980; Rhen *et al.*, 1988). Este tipo de resistencia es uno de los principales factores en la virulencia de las bacterias invasoras que causan infecciones generalizadas (Joiner, 1986; Joiner, 1988; Timmis *et al.*, 1985), así como también reduce la susceptibilidad de las bacterias a la fagocitosis por los macrófagos peritoneales (Agüero *et al.*, 1984)

8.8 Expresión de los genes de adhesión en las cepas de *E. coli* por PCR en Tiempo Real

La adherencia es un paso esencial en la patogénesis bacteriana y la infección, necesaria para colonizar un nuevo huésped (Coutte *et al.*, 2003) Las adhesinas normalmente permanecen asociadas con la superficie bacteriana, permitiendo que los microorganismos se adhieren los determinantes de superficie, tales como glicolípidos, proteoglicanos, y proteínas de la matriz (Beachey, 1981; Menozzi *et al.*, 2002). En el presente trabajo el gen de adhesión expresado con más frecuencia durante el modelo de infección de la línea celular A431 por las cepas UPEC fue *papA* con el 20.1% (n=39) de las cepas (Figura 13 y 14). La expresión de *ibeA* fue muy baja, con tan solo el 2% (n=4) (Tabla 2). Se han reportado prevalencias para *papA* del 45.3% (n=29) en cepas UPEC (n=64) aisladas de pacientes de un hospital al sur de Corea (Yun *et al.*, 2014), del 39.6% (n=23) en cepas aisladas de pacientes con infección de las vías urinarias (n=58) en Corea del Sur (Lee *et al.*, 2015), del 54% (n=110) en cepas aisladas de personas con UTIs (n= 202) de la provincia de Jiangsu y la provincia de Anhui al este de China (Zhao *et al.*, 2009), y del 53% (n=161) en cepas (n=303) aisladas de pacientes con sepsis en Francia (Cooke *et al.*, 2010). Los genes *papeF* y *bmaE* no se expresaron en ninguna de las cepas de *E. coli* (Tabla 2). La expresión de estos marcadores de virulencia en modelos *in vitro* de infección no ha sido estudiada todavía, sin embargo se han descrito prevalencias para *papeEF* de 17.2% (n=11) en cepas UPEC (n= 64) aisladas de pacientes del Hospital Youngsan Chung-Ang al sur de Corea (Yun *et al.*, 2014), del 59% (n=120) en cepas aisladas (n=202) de pacientes con UPEC de la provincia de Jiangsu y la provincia de Anhui al este de China (Zhao *et al.*, 2009), del 32.7% (n=53) en cepas aisladas (n=62) de pacientes de Campinas, Sao Paulo (Tibal *et al.*, 2008) y del 77%

(n=139) en cepas (n=180) aisladas de Nueva Gales del Sur Australia (Kudinha *et al.*, 2011), mientras que para *bmaE* se han descrito frecuencias del 1.6% (n=1) en cepas (n=64) UPEC aisladas de pacientes del Hospital Youngsan Chung-Ang al sur de Corea (Yun *et al.*, 2014), del 9 % (n=19) en cepas UPEC (n=202) aisladas de UTIs de pacientes de la provincia de Jiangsu y la provincia de Anhui al este de China (Zhao *et al.*, 2009) y del 1% (n=2) en cepas aisladas (n=180) de pacientes del Sur Nueva Gales, Australia (Kudinha *et al.*, 2011).

Por otro lado para *ibeA* se han reportado prevalencias del 67% en cepas (n=100) aisladas de pacientes hospitalizados en Zabol, Irán (Shookohi y Rashki 2016), del 10% (n=21) en cepas UPEC (n=202) aisladas de personas con UTIs de la provincia de Jiangsu y la provincia de Anhui al este de China (Zhao *et al.*, 2009) y del 8% (n=24) en cepas UPEC (n=303) aisladas de pacientes con sepsis en Francia (Cooke *et al.*, 2010)

8.13 Expresión de los genes de toxinas en las cepas de *E. coli* por PCR en Tiempo Real

UPEC secreta una gran cantidad de proteínas que son tóxicas para las células eucarióticas, incluyendo alfa-hemolisina (Moblely *et al.*, 1990; Welch & Falkow, 1983) y el factor-1 citotóxico necrosante (CNF-1) (Rippere-Lampe *et al.*, 2001).

Las toxinas contribuyen a que UPEC pueda penetrar a los tejidos y posteriormente al interior de las células uroepiteliales del hospedero para acceder a los nutrientes o para destruir las células afectoras del sistema inmune. La actividad tóxica sobre el hospedero ocasiona una fuerte reacción inflamatoria, provocando generalmente necrosis en las células tisulares (Lüthje & Brauner, 2014). En este estudio el gen de toxinas expresado con más frecuencia durante el modelo de infección de la línea celular A431 por las cepas UPEC fue *hlyD* con el 17% (n=33; Tabla 2; Figura 15 y 16). Se han reportado prevalencias de éste gen del 11% (n=23) en cepas UPEC (n=202) aisladas de personas con UTIs de la provincia de Jiangsu y la provincia de Anhui al este de China (Zhao *et al.*, 2009), del 21.2% (n=85) en cepas aisladas de pacientes de diferentes regiones al sur de Iran (Derakhshandeh *et al.*, 2015) y del 33.8% (n=52) en cepas UPEC de pacientes no diabéticos (n=154), y del 28.6% (n=36) de cepas de *E. coli* de pacientes diabéticos (n=126) (Harwalkar *et al.*, 2015)

La hemolisina es tóxica para una amplia gama de células huésped, participando en la inflamación, la lesión tisular, y contra las defensas del huésped. En algunas cepas, la producción de la hemolisina se suprime en condiciones de alto hierro y mejora en condiciones de poco hierro (Lebek & Gruenig 1985; Mackman *et al.*, 1985; Waalwijk *et al.*, 1983).

8.15 Patrones de expresión de los genes que codifican para sistemas de adquisición de hierro, adhesinas, protectinas y toxinas en las cepas de *E. coli*

En éste trabajo se identificaron 31 patrones diferentes de expresión de los genes de virulencia en las cepas UPEC (tabla 3), dentro de los cuales el patrón N°1 conformado por los genes *feoB-traT-sitA* se identificó en el 19.5% de las cepas (n=38). Estos resultados coinciden con lo reportado por Zhao *et al.*, (2009), quienes obtuvieron una alta prevalencia de los genes *sita/trat/feoB* en cepas UPEC, mientras que Johnson (*et al.*, 2008) encontraron que la sociación *traT/sitA* fue muy frecuente en cepas aisladas de UTIs.

En este estudio se demostró que las cepas UPEC estudiadas fueron capaces de expresar al mismo tiempo diferentes genes de adhesión, adquisición de hierro y protectinas durante la patógenesis de la infección del cultivo de las células epiteliales vaginales A431, lo que demuestra la virulencia de las cepas para ocasionar infecciones más severas como cistitis o pielonefritis.

➤ 9. CONCLUSIONES

- 1) *Escherichia coli* fue responsable de la mayoría de las infecciones del tracto urinario de los pacientes estudiados.
- 2) Los genotipos expresados más frecuentemente después de la infección del cultivo celular A431 fueron *feoB*, *traT* y *sitA*, mientras que los genes menos frecuentes fueron de *papA*, *hly-D* *ireA* e *lbeA*. Los genes *papeF* y *bmaE* no se expresaron en ninguna de las cepas de *E. coli*.
- 3) En este estudio se encontraron diferentes combinaciones de expresión de los genes que codifican para sistemas de adquisición de hierro, adhesinas, toxinas y protectinas en las cepas estudiadas.
- 4) Los resultados demostraron la participación colectiva de los diferentes genotipos de virulencia en las cepas UPEC durante la patogénesis de la infección del cultivo celular, evidenciando la virulencia de las cepas para ocasionar infecciones más severas como cistitis o pielonefritis.

➤ 10. BIBLIOGRAFÍA

- 1) 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. *Infection and Immunity* 46:740-746.
- 2) Anderson GG, Palermo JJ, Schilling JD, Roth R, Heuser J, Hultgren SJ. (2003). Intracellular bacterial biofilm-like pods in urinary tract infections. *Science* 301:105–107.
- 3) Andrews SC, Robinson AK, Rodríguez-Quiñones F. (2003). Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev* 27:215-37.
- 4) Beachey EH. (1981). Bacterial adherence: adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. *J Infect Dis* 143:325–345.
- 5) Blanco J, Blanco M, Blanco JE, Mora A, Alonso MP, González EA, Bernádez MI. (2002). Enterobacterias: características generales Género *Escherichia* In: *Manual de Microbiología Veterinaria*, Vadillo S, McGraw-hill, Interamericana, España, 301-325.
- 6) Braun V. (2001). Iron uptake mechanisms and their regulation in pathogenic bacteria. *Int J Med Microbiol* 291: 67–79.
- 7) Brzuszkiewicz E, Brüggemann H, Liesegang H, Emmerth M, Olschläger T, Nagy G, Albermann K, Wagner C, Buchrieser C, Emody L, Gottschalk G, Hacker J, Dobrindt U. (2006). How to become a uropathogen: Comparative genomic analysis of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103:12879-12884.
- 8) Bornside GH, Bouis PJ, Cohn I. (1968). Hemoglobin and *Escherichia coli* a lethal intraperitoneal combination. *J Bacteriol* 95:1567-1571.

- 9) Bornside GH, Bouis PJ, Cohn I. (1970). Enhancement of *Escherichia coli* infection and endotoxic activity by hemoglobin and ammonium citrate Surgery 68:350-355.
- 10) Bower JM, Eto DS, Mulvey MA. (2005). Covert operations of uropathogenic *Escherichia coli* within the urinary tract. Traffic 6:18-31
- 11) Bullen JJ, Leigh LC, Rogers HJ. (1968). The effect of iron compounds on the virulence of *Escherichia coli* for guinea pigs. Immunol 15:581-588.
- 12) Cao J, Woodhall MR, Alvarez J, Cartron ML, Andrews SC. (2007). EfeUOB (YcdNOB) is a tripartite, acid-induced and CpxAR-regulated, low-pH Fe²⁺ transporter that is cryptic in *Escherichia coli* K-12 but functional in *E. coli* O157:H7. Mol Microbiol 65:857-875.
- 13) Connell I, Agace W, Klemm P, Schembri M, Märdil S, Svanborg C. (1996). Type 1 fimbrial expression enhances *Escherichia coli* virulence for the urinary tract. Proc Natl Acad Sci U S A 93:9827-32.
- 14) Cooke NM, Smith SG, Kelleher M, Rogers TR. (2010). Major differences exist in frequencies of virulence factors and multidrug resistance between community and nosocomial *Escherichia coli* bloodstream isolates. J Clin Microbiol 48:1099-104.
- 15) Coutte L, Alonso S, Reveneau N, Willery E, Quatannens B, Loch C, Jacob-Dubuisson F. (2003). Role of adhesin release for mucosal colonization by a bacterial pathogen. J Exp Med 197:735–742.
- 16) Derakhshandeh A, Firouzi R, Motamedifar M, Arabshahi S, Novinrooz A, Boroojeni AM, Bahadori M, Heidari S. (2015). Virulence Characteristics and Antibiotic Resistance Patterns among Various Phylogenetic Groups of Uropathogenic *Escherichia coli* Isolates. Jpn J Infect 68:428-431.
- 17) Donnenberg MS. (2002). Introduction. In: *Escherichia coli: Virulence Mechanisms of a Versatile Pathogen*. Elsevier Science Inc. USA, 21-25.
- 18) Edén CS, Hansson HA. (1978). *Escherichia coli* pili as possible mediators of attachment to human urinary tract epithelial cells. Infect Immun 1: 229–237.

- 19) Ewing WH. (1985). Edwards and Ewing's Identification of *Enterobacteriaceae*. 4. Edition, Elsevier, New York, pp 536.
- 20) Fairbrother JM. (2015). *E. coli* asociada a diarrea post-destete. Etiología, signos clínicos y factores de riesgo 1-4.
- 21) Farshad S, Emamghorashi F. (2009). The prevalence of virulence genes of *E. coli* strains isolated from children with urinary tract infection. Saudi J Kidney 20:613-617.
- 22) Firoozeh F, Saffari M, Neamati F, Zibaei M. (2014). Detection of virulence genes in *Escherichia coli* isolated from patients with cystitis and pyelonephritis. Int J Infect 29:219-22.
- 23) Fronzes RH, Remaut, and Waksman G, (2008). Architectures and biogenesis of non-flagellar protein appendages in Gram-negative bacteria. EMBO J 27: 2271–2280.
- 24) Green BT, Lyte M, Chen C, Xie Y, Casey MA, Kulkarni-Narla A, Vulchanova L, Brown DR. (2004). Adrenergic modulation of *Escherichia coli* O157:H7 adherence to the colonic mucosa. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 287:1238-1246.
- 25) Grim CJ, Kothary MH, Gopinath G, Jarvis KG, Beaubrun JJ, McClelland M, Tall BD, Franco AA. (2012). Identification and characterization of *Cronobacter* iron acquisition systems. Appl Environ Microbiol 78:6035–6050.
- 26) Groisman EA, Ochman H. (1996). Pathogenic Islands: Bacterial Evolution in Quantum leaps. Cell 87:791-794.
- 27) Gunther N, Jansen A, Li X, Auyer D. (2015).
- 28) Gunther NW, Lockett V, Johnson DE, Mobley HL. (2001). In vivo dynamics of type 1 fimbria regulation in uropathogenic *Escherichia coli* during experimental urinary tract infection. Infect Immun 69:2838-2846.
- 29) Guyer DM, Henderson IR, Nataro JP, Mobley HL. (2000). Identification of Sat, an autotransporter toxin produced by uropathogenic *Escherichia coli*. Mol Microbiol 38:53-66.

- 30) Harwalkar A, Gupta S, Rao A, Srinivasa H. (2015). Prevalence of virulence factors and phylogenetic characterization of uropathogenic *Escherichia coli* causing urinary tract infection in patients with and without diabetes mellitus. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 109:769-74.
- 31) Hedges SR, Svanborg C. (1995). Urinary infection: microbiology, pathogenesis and host response. *Current Opinion in Infectious Disease* 8: 39-42.
- 32) Hood MI, Skaar EP. (2012). Nutritional immunity: transition metals at the pathogen-host interface. *Nat Rev Microbiol* 10:525–537.
- 33) Johnson JR. (2002a) Evolution of pathogenic *Escherichia coli*. In: *Escherichia coli: Virulence mechanisms of a versatile pathogen*. Donnenberg MS, Ed. Elsevier Science Inc. USA pp.55-77.
- 34) Johnson JR, Russo TA (2005). Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol* 295:383-404.
- 35) Johnson TJ, Wannemuehler Y, Johnson SJ, Stell AL, Doetkott C, Johnson JR, Kim KS, Spanjaard L, Nolan LK. (2008). Comparison of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains from human and avian sources reveals a mixed subset representing potential zoonotic pathogens. *Appl Environ Microbiol* 74:7043-7050.
- 36) Joiner KA. (1986). Studies on the mechanism of bacterial resistance to complement-mediated killing and on the mechanism of action of bactericidal antibody. *Curr Top Microbiol Immunol* 121:99-133.
- 37) Joiner KA. (1988). Complement evasion by bacteria and parasites. *Annu Rev Microbiol* 42:201-230.
- 38) Kaper JB, Nataro JP, Mobley HI. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2:123-140.
- 39) Karimian A, Momtaz H, Madani M. (2012) Detection of uropathogenic *Escherichia coli* virulence factors in patients with urinary tract infections in Iran. *African J Microbiol Res* 6:6811-6816.

- 40)Kauffman F. (1944). Zur Serologic der- Gruppe. Acta Pathol Microbiol Scand 21: 20-45
- 41)Korhonen TK, Virkol R, Holthofer, H. (1986) Localization of binding sites for purified *Escherichia coli* P fimbriae in the human kidney. Infect Immun 54: 328–332.
- 42)Kosek M, Berne C, Guerrant RL. (2003). The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. Bull World Health Organ 81:197-204.
- 43)Kudinha T, Kong F, Johnson JR, Andrew SD, Anderson P, Gilbert GL. (2011). Multiplex PCR-Based Reverse Line Blot Assay for Simultaneous Detection of 22 Virulence Genes in Uropathogenic *Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol 78:1198-1202.
- 44)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 U S A. 82:6955-6959.
- 45)Lebek G, and Gruenig HM. (1985). Relation between the hemolytic property and iron metabolism in *Escherichia coli*. Infect Immun 50:682-686.
- 46)Lee JH, Subhadra B, Son YJ, Kim DH, Park HS, Kim JM, Koo SH, Oh MH, Kim HJ, Choi CH. (2016). Phylogenetic group distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties of uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from patients with urinary tract infections in South Korea. Lett Appl Microbiol 62:84-90.
- 47)Li Y, Dai J, Zhuge X, Wang H, Hu L, Ren J, Chen L, Li D, Tang F. (2016) Iron-regulated gene *ireA* in avian pathogenic *Escherichia coli* participates in adhesion and stress-resistance. BMC Vet Res. 12:167.
- 48)López-Banda DA, Carrillo-Casas EM, Leyva-Leyva M, Orozco-Hoyuela G, Manjarrez-Hernández ÁH, Arroyo-Escalante S, Moncada-Barrón D, Villanueva-Recillas 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. doi: 10.1155/2014/959206.
- 49) Lloyd AL, Rasko DA, Mobley HL. (2007). Defining genomic islands and uropathogen-specific genes in uropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 189: 3532–3546.
- 50) 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.* 50:4002-4007.
- 51) Lüthje P, and Brauner A. (2014). Virulence factors of Uropathogenic *E. coli* and their interaction with the host. *Eur J. Clin Microbiol Infect Dis* 65:338-357.
- 52) Mackman N, Nicaud JM, Gray L, Holland IB. (1985). Identification of polypeptides required for the export of haemolysin 2001 from *E. coli*. *Mol Gen Genet* 201: 529-536.
- 53) Menozzi FD, Pethe K, Bifani P, Soncin F, Brennan MJ, Loch C. (2002). Enhanced bacterial virulence through exploitation of host glycosaminoglycans. *Mol Microbiol* 43:1379–1386.
- 54) Mobley HL, Green DM, Trifillis AL, Johnson DE, Chippendale GR, Lockett CV, Jones BD, Warren JW. (1990). Pyelonephritogenic *Escherichia coli* and killing of cultured human renal proximal tubular epithelial cells: role of hemolysin in some strains. *Infect Immun* 58:1281-1289.
- 55) Moll A, Manning PA, Timmis 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* 28:359-367.
- 56) Moreno E, Andreu A, Perez T, Sabatem M, Johnson JR, Prats G. (2006) Relationship between *Escherichia coli* strains causing urinary tract infection in women and the dominant faecal flora of the same hosts. *Epidemiol Infect.* 134:1015–1023

- 57) Moura A, Nicolau A, Hooton T, Azeredo J. (2009). Antibiotherapy and pathogenesis of uncomplicated UTI: difficult relationships. *J Appl Microbiol*, 106: 1779–1791.
- 58) Mulvey MA. (2002). Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol* 4:257–271.
- 59) Mulvey MA, Lopez-Boado YS, Wilson CL, Roth R, Parks WC, Heuser J, Hultgren SJ. (1998). Induction and evasion of host defenses by type 1-piliated uropathogenic *Escherichia coli*. *Science* 282:1494–1497.
- 60) Nataro JP, Kaper J. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 11:142-201.
- 61) Neidhardt FC. (1999). Bacterial growth: constant obsession with dN/dt. *J. Bacteriol* 181:7405-7408.
- 62) Ogata RT, and Levine RP. (1980). Characterization of complement resistance in *Escherichia coli* conferred by antibiotic resistance plasmid R100. *J Immunol* 125:1494-1498.
- 63) Orskov I, Orskov F, Birch-Andersen A, Kanamori M, Svanborg-Edén C. (1982) O, K, H, and fimbrial antigens in *Escherichia coli* serotypes associated with pyelonephritis and cystitis. *Scand J Infect Dis Suppl.* 33:18-25.
- 64) Paniagua GL, Monroy-Pérez E, Vaca S. (2007). PCR Manual de identificación de *Escherichia coli* y *Salmonella spp* en material fecal. Universidad Nacional Autónoma de México. 43-70.
- 65) Park HK, Jung YJ, Chae HC, Shin YJ, Woo SY, Park HS, Lee SJ (2009). Comparison of *Escherichia coli* uropathogenic genes (*kps*, *usp* and *ireA*) and enteroaggregative genes (*aggR* and *aap*) via multiplex polymerase chain reaction from suprapubic urine specimens of young children with fever. *Scand J Urol Nephro.* 43:51– 55.
- 66) Raz R, Gennesin Y, Wasser J, Stoler Z, Rosenfeld S, Rottensterich E, Stamm WE. (2000) Recurrent urinary tract infections in postmenopausal women. *Clin Infect Dis* 30:152–156.

- 67) Rhen M, O'Connor CD, Sukupolvi S. (1988). The outer membrane permeability mutation of the virulence-associated plasmid of *Salmonella typhimurium* is located in a traT-like gene. FEMS Microbiol Lett 52:145-154.
- 68) Rippere-Lampe KE, O'Brien AD, Conran R, Lockman HA. (2001). Mutation of the gene encoding cytotoxic necrotizing factor type 1 (cnf1) attenuates the virulence of uropathogenic *Escherichia coli*. Infect Immun 69:3954-3964.
- 69) 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. Microbiol 151:2097–2110.
- 70) Russo TA, Johnson JR. (2003). Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. Microb Infect 5:449-56.
- 71) Salyers AA y Whitt DD. (1994). Bacterial pathogenesis a molecular approach. ASM press. Washington USA. pp. 560.
- 72) Scheutz F, Strockbine NA, Genus I. (2005). *Escherichia Castellani* and Chalmers 1919, 941TAL In: Bergey's Manual of systematic bacteriology. Second edition, volume two. Garrity GM, Ed., Bergey's Manual Trust USA, 607-624.
- 73) Shookohi M and Rashki A. (2016). Prevalence of Toxigenic Genes in *Escherichia Coli* Isolates From Hospitalized Patients in Zabol, Iran. Enteric pathog 4: e29222.
- 74) 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 6:e450-453.
- 75) Tibal M, Tomomasa Y, Domingos SL. (2008). Genotypic characterization of virulence factors in *Escherichia coli* strains from patients with cystitis. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 50:255-60.

- 76) Timmis KN, Boulnois GJ, Bitter-Suermann D, Cabello FC. (1985). Surface components of *Escherichia coli* that mediate resistance to the bactericidal activities of serum and phagocytes. *Curr Top Microbiol Immunol* 118:197-218.
- 77) Trifillis AL, Sonnenberg MS, Cui X, Russell RG, Utsalo SJ, Mobley HL, Warren JW (1994). Binding to and killing of human renal epithelial cells by hemolytic P-fimbriated *E. coli*. *Kidney Int* 46:1083–1091.
- 78) Uhlén P, Laestadius A, Jahnukainen T, Söderblom T, Bäckhed F, Celsi G, Brismar H, Normark S, Aperia A, Richter-Dahlfors A (2000). α -haemolysin of uropathogenic *E. coli* induces Ca^{2+} oscillations in renal epithelial cells. *Nature* 405:694-697.
- 79) Waalwijk C, MacLaren DM, de Graaff J. (1983). In vivo function of hemolysin in the nephropathogenicity of *Escherichia coli*. *Infect Immun* 42:245-249.
- 80) Wandersman C, Delepelaire P (1990). TolC, an *Escherichia coli* outer membrane protein required for hemolysin secretion. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:4776-4780.
- 81) Welch RA, Burland V, Plunkett G 3rd, Redford P, Roesch P, Rasko D, Buckles EL, Liou SR, Boutin A, Hackett J, Stroud D, Mayhew GF, Rose DJ, Zhou S, Schwartz DC, Perna NT, Mobley HL, Sonnenberg MS, Blattner FR.. (2002). Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:17020-17024.
- 82) Welch RA, Hull R, and Falkow S. (1983). Molecular cloning and physical characterization of a chromosomal hemolysin from *Escherichia coli*. *Infect Immun* 42:178-186.
- 83) Yun KW, Kim HY, Park HK, Kim W, Lim IS. (2014). Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* of urinary tract infections and asymptomatic bacteriuria in children. *J Microbiol Immunol Infect* 47: 455–461.
- 84) Zhao L, Gao S, Huan H, Xu X, Zhu X, Yang W, Gao Q, Liu X. (2009). Comparison of virulence factors and expression of specific genes between uropathogenic *Escherichia coli* and avian pathogenic *E. coli* in a murine urinary

tract infection model and a chicken challenge model. Microbiol 155:1634–1644.