



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PATRONES DE EXPRESIÓN DE MARCADORES DE VIRULENCIA EN CEPAS DE
Escherichia coli UROPATÓGENAS

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

TANIA HERNÁNDEZ JAIMES

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. GLORIA LUZ PANIAGUA CONTRERAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. DRA. MARÍA DOLORES ALCÁNTAR CURIEL

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

DR. ERIC MONROY PÉREZ

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

MÉXICO, CIUDAD DE MÉXICO, OCTUBRE, 2017



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.

L.c. Ivonne Román Wanda
Directora General de Administración Escolar UNAM
Presente

Me permite informar a usted que en la reunión ordinaria de Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas celebrada el día 14 de agosto de 2011, se aprobó el siguiente listado para el examen de grado de MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS de la alumna HERNÁNDEZ JAIMES TANIA, con número de cédula 303114351, con la tesis de grado "Patrones de expresión de marcadores de virulencia en cepas de *Escherichia coli* serotipo O157, aisladas bajo la dirección de la DRA. GLORIA LIZ PÉREZ ALVARADO LÓPEZ:

Presidente	DR. YULIO EMANUEL VELAZQUEZ
Vice	DR. SERGIO WACA RACHICO
Secretario	DR. ERIC MONROY PÉREZ
Suplente	DR. IGNACIO TERRAZAS VALDEZ
Suplente	DR. LUIS ALBERTO ALVARADO LÓPEZ

En respuesta a su correo electrónico anterior agradezco.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cd. Universidad Col. México, 22 de agosto de 2011.

DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA







Atte. Excedente del (a) interesado (a)

AGRADECIMIENTOS

- Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, por darme la oportunidad de cursar mis estudios en un posgrado de calidad con un excelente plan de estudios, lo que me permitió adquirir los conocimientos y las herramientas necesarias para formarme como una Maestra en Ciencias Biológicas a la altura de la institución.
- A UNAM-DGAPA-PAPIIT IN218614 por apoyar con el presupuesto necesario para la realización de este proyecto de investigación. A CONACYT por la beca sin la cual no me hubiera sido posible realizar los estudios de posgrado.
- A la Dra. Gloria Luz Paniagua Contreras, mi tutora principal, por todo el apoyo que me brindó, no solo durante la realización de este proyecto, si no también fuera del laboratorio. Siempre le estaré agradecida por el tiempo que dedicó a escuchar, ayudar, e incluso hacerme reír cuando más lo necesitaba.
- Al Dr. Eric Monroy Pérez por toda la ayuda y el tiempo que me ha dedicado. Muchas gracias por toda la paciencia y los consejos, los voy a atesorar siempre.
- A la Dra. María Dolores Alcantar Curiel por sus acertadas observaciones. Le agradezco que siempre encontró el tiempo para ayudarme cuando lo necesitaba

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

-  A mi familia por todo el apoyo que me han brindado siempre. Sin ustedes no me habría sido posible llegar hasta aquí, por eso y por todo, muchísimas gracias.
-  A los compañeros de laboratorio en los cuales encontré nuevas y valiosas amistades.
-  A los profesores y compañeros que encontré en el camino, y que me dejaron valiosas lecciones que nunca olvidaré.
-  A todas las personas que de un modo u otro me hicieron reír cuando las cosas se ponían difíciles.

DEDICATORIA

“A la humanidad, y a la esperanza que la guerra contra la insensatez pueda ganarse algún día, a pesar de todo.”

-Isaac Asimov.

INDICE

• LISTA DE TABLAS Y FIGURAS	7
• RESUMEN	9
• ABSTRACT	10
• 1. INTRODUCCIÓN	11
○ 1.1 Infecciones en las vías urinarias	11
○ 1.2 Características de <i>E. coli</i>	11
○ 1.3 Patogenia	12
○ 1.4 Factores de virulencia	15
▪ 1.4.1 Islas de patogenicidad	18
○ 1.5 Adhesinas	18
○ 1.6 Toxinas	22
○ 1.7 Sistemas de adquisición de hierro	26
○ 1.8 Protectinas	28
○ 1.9 Biopelícula	29
○ 1.10 Comunidades bacterianas intracelulares	30
○ 1.11 Serogrupos	30
• 2. OBJETIVOS	32
• 3. ANTECEDENTES	33
• 4. METODOLOGÍA	35
○ 4.1 Obtención de las cepas	35
○ 4.2 Identificación primaria de <i>E. coli</i> por pruebas bioquímicas	35
○ 4.3 Extracción de DNA bacteriano	35
○ 4.4 Identificación de <i>E. coli</i> por PCR	35
○ 4.5 Identificación de los serogrupos por PCR	36
○ 4.6 Análisis de las muestras amplificadas por PCR	36
○ 4.7 Infección del cultivo celular A431 con <i>E. coli</i> : Preparación del inóculo bacteriano	36
○ 4.8 Infección del cultivo celular A431 con <i>E. coli</i> : Inoculación	38
○ 4.9 Cosecha de <i>E. coli</i> del cultivo de la línea celular A431	38
○ 4.10 Extracción de RNA de las cepas UPEC	38
○ 4.11 Reversotranscripción	39

○ 4.12 Expresión de los marcadores de virulencia por PCR en tiempo real	41
○ 4.13 Efecto de la temperatura y la concentración de CO ₂ durante la infección <i>in vitro</i> de la línea celular A431 con <i>E. coli</i>	43
○ 4.14 Secuenciación de los amplicones de los genes de virulencia de las cepas UPEC utilizadas como controles positivos en los ensayos de PCR en Tiempo Real	43
○ 4.15 Análisis estadístico	43
• 5. RESULTADOS	44
○ 5.1 Origen de las cepas analizadas	44
○ 5.2 Identificación de <i>E. coli</i> mediante pruebas bioquímicas	45
○ 5.3 Identificación de <i>E. coli</i> por PCR	46
○ 5.4 Expresión de los marcadores de virulencia de cepas UPEC	46
○ 5.5 Patrones de expresión de los genes de virulencia	48
○ 5.6 Serogrupos en las cepas UPEC	50
○ 5.7 Asociación entre patrones de expresión y serogrupos en las cepas UPEC	51
○ 5.8 Asociación entre serogrupos y los marcadores de virulencia expresados en las cepas UPEC	52
○ 5.9 Efecto de la temperatura y la concentración de CO ₂ durante la infección <i>in vitro</i> de la línea celular A431 con <i>E. coli</i>	53
○ 5.10 Genes de virulencia de las cepas de <i>E. coli</i> utilizadas como controles positivos	54
○ 5.11 Análisis estadístico	54
• 6. DISCUSIÓN	55
○ 6.1 Infecciones en el tracto urinario	55
○ 6.2 Expresión de los marcadores de virulencia en las cepas UPEC	55
▪ 6.2.1 Adhesinas	55
▪ 6.2.2 Toxinas	57
▪ 6.2.3 Sistemas de adquisición de hierro	58
▪ 6.2.4 Protectinas	59
○ 6.3 Serogrupos	60
○ 6.4 Patrones de expresión	60
○ 6.5 Cambios en las condiciones de incubación de los cultivos celulares infectados	62

• 7. CONCLUSIONES	63
• 8. ANEXO 1	65
• 9. ANEXO 2	89
• 10. LITERATURA CITADA	92

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Tablas

- **Tabla 1.** Genotipos de virulencia presentes en cepas uropatógenas. 15
- **Tabla 2.** Secuencia de los oligonucleótidos empleados para amplificar el gen 16S rRNA. 36
- **Tabla 3.** Secuencia de los oligonucleótidos empleados en la identificación de los serogrupos. 37
- **Tabla 4.** Componentes de reacción para la eliminación de DNA genómico 40
- **Tabla 5.** Componentes de reacción para la reversotranscripción. 40
- **Tabla 6.** Secuencia de los oligonucleótidos empleados para la detección de expresión de los marcadores de virulencia de las cepas UPEC. 41
- **Tabla 7.** Condiciones de incubación de las cepas UPEC. 43
- **Tabla 8.** Diagnósticos de los pacientes origen de las cepas. 45
- **Tabla 9.** Resultados de las pruebas bioquímicas en *E. coli*. 45
- **Tabla 10.** Frecuencia de detección y expresión de los marcadores de virulencia de las cepas UPEC. 47
- **Tabla 11.** Patrones de expresión de los marcadores de virulencia de las cepas UPEC. 49
- **Tabla 12.** Serogrupos identificados en las cepas UPEC. 50
- **Tabla 13.** Asociación entre patrones de expresión y serogrupos identificados en las cepas UPEC. 51
- **Tabla 14.** Número de cepas con la asociación de los marcadores de virulencia expresados en los distintos serogrupos de las cepas UPEC. 52

- **Tabla 15.** Número de cepas con los genes expresados durante la infección del cultivo de la línea celular A431, incubada a diferentes condiciones de temperatura y CO₂. 53
- **Tabla 16.** Confirmación de identidad de los genes de virulencia de las cepas de *E. coli* utilizadas como controles positivos. 54

Figuras

- **Figura 1.** Dinámica entre UPEC y el hospedero durante infecciones en el tracto urinario. 13
- **Figura 2.** Esquema de opciones en la presentación extracelular y/o liberación de proteínas de adhesión mediante los traslocadores autotransportadores. 19
- **Figura 3.** Marcos de lectura abierta del locus HPI. 27
- **Figura 4.** Mecanismo de regulación de absorción de hierro. 28
- **Figura 5.** Organización del grupo de genes de la cápsula K1. 29
- **Figura 6.** Interior del equipo QIAcube. 39
- **Figura 7.** Distribución de los pacientes por sexo. 44
- **Figura 8.** Distribución de los pacientes analizada por edades. 44
- **Figura 9.** Detección del gen 16S rRNA por PCR. 46
- **Figura 10.** Detección y expresión de los marcadores de virulencia de las cepas UPEC. 48
- **Figura 11-58.** Gráficas de PCR en tiempo real y curvas de fusión (melting point) de los marcadores de virulencia de las cepas UPEC expresados. 65-88
- **Figura 59-64.** Imágenes de geles con los amplificadores de los genes de los serogrupos. 89-91

RESUMEN

Escherichia coli uropatógena (UPEC) es la principal bacteria patógena responsable de las infecciones en el tracto urinario en todo el mundo. En este estudio se utilizó un modelo de infección *in vitro* de la línea celular vaginal A431 con cepas de *E. coli* uropatógena (UPEC) para determinar cuáles son los patrones de expresión de genes más frecuentes que codifican adhesinas, toxinas, sistemas de adquisición de hierro y protectinas. También se determinó la asociación de los diferentes marcadores de virulencia con los serogrupos O presentes en las cepas UPEC. Se estudió un total de 194 cepas de *E. coli* previamente aisladas de urocultivos de pacientes con infecciones en el tracto urinario (IsTU) que acudieron a dos clínicas del IMSS, Estado de México, México. La identificación de *E. coli* se realizó por las pruebas bioquímicas tradicionales y por PCR mediante la amplificación del gen 16S rRNA. Los diferentes serogrupos O fueron identificados mediante PCR y la expresión de los genes de virulencia fue detectada por PCR en tiempo real después de la infección *in vitro* de células A431 derivadas de carcinoma epidermoide vulvar. Los genotipos de virulencia más frecuentemente expresados por las cepas UPEC investigadas fueron: *usp* con el 68% (n=132), *iha* 65% (n=126), *kpsMT* 61.3% (n=119), *fim* 58.2% (n=113), *irp2* 49% (n=95), *set-1* 31.4% (n=61) y *astA* 30.9% (n=60). El serogrupo predominante fue el O25 con el 13.4% (n=26) de las cepas. El patrón de expresión más frecuente entre las cepas UPEC fue el conformado por los genes *fim/iha/usp/irp2/kpsMT* (11.3%), el cual se encontró asociado con los 4 serogrupos O25, O8, O15, O75. Estos resultados demostraron que durante la infección de la línea celular A 431, las cepas UPEC presentaron diferentes combinaciones de expresión de los marcadores de virulencia involucrados en la adherencia e internalización celular, y en la evasión de la respuesta inmune y de la acción de antibióticos, lo que implica que las cepas uropatógenas de *E. coli* tienen una gran capacidad para ocasionar infecciones agudas como cistitis o pielonefritis.

ABSTRACT

Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) is an opportunistic human pathogen that primarily circulate as part of comensal intestinal microbiota, and is the primary cause of urinary tract infections worldwide. In this study, we investigated distinct expression patterns of genes encoding adhesins, toxins, iron-aquisition systems and protectins in human uroepithelial cells infected with 194 uropathogenic *E. coli* (UPEC) strains *in vitro*. We assessed the association of these genes with the O-serogroups in this group of UPEC strains. Strains were isolated from patients with urinary tract infections (UTIs) from Unidad Médica Familiar de Salud Pública located in Estado de México, México. O-serogroups genes were identified by PCR, and the expression of virulence genes was detected by real time PCR after *in vitro* infection of cultured A431 human keratinocytes derived from a vulvar epidermoid carcinoma. The most frequently expressed virulence genotypes among the investigated UPEC strains included *usp* (68%), *iha* (65%), *kpsMT* (61.3%), *fim* (58.2%), *irp2* (49%), *set-1* (31.4%) and *astA* (30.9%). The most frequent serogroup was O25 present in 13.4% of strains. The most abundant pattern of gene expression (*fim/iha/usp/irp2/kpsMT*), associated with 4 O-serogroups (O25/O8/O15/O75), was exhibited by 22 strains (11.3%). Taken together, these results indicate the

collective participation of distinct virulence UPEC genotypes during *in vitro* infection of cultured human epithelial cells, suggesting their potential involvement in UTI pathogenesis.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Infecciones de las vías urinarias

Las infecciones del tracto urinario (IsTU) se consideran uno de los padecimientos más frecuentes en los humanos (Mak y Kuo, 2006). Existen diferentes microorganismos que pueden ocasionar IsTU, de entre los cuales *Escherichia coli* uropatógena (UPEC) es el agente etiológico responsable del 75% a 95% de los casos (Foxman, 2010; Sivick y Mobley, 2010). Una infección en el tracto urinario se diagnostica por los síntomas de inflamación, dolor, ardor y los signos de disuria y hematuria, además de la identificación en el urocultivo de más de 100,000 UFC/ml de microorganismos (Stamm, 1982; Warren *et al.*, 1999). Las bacterias pueden detectarse en altas concentraciones en el tracto urinario durante un examen rutinario de orina. Sin embargo, muchos de estos individuos no presentan síntomas. Esta condición se denomina bacteriuria asintomática (Hancock, *et al.*, 2008). Las infecciones en el tracto urinario usualmente son de naturaleza ascendente, comenzando en las vías urinarias bajas y colonizando la uretra hasta ascender y causar infección e inflamación de la vejiga, conocida como cistitis (Kaper *et al.*, 2004). La cistitis se caracteriza por micción frecuente y dolorosa de volúmenes pequeños de orina y puede estar acompañada por fiebre. En algunos grupos de individuos con cistitis *E. Coli* uropatógena (UPEC) asciende por los ureteros hacia los riñones, ocasionando inflamación del parénquima renal y la pelvis, conocida como pielonefritis. La pielonefritis es usualmente acompañada por fiebre, dolor de costado, y requiere de atención médica inmediata, ya que si no es controlada, en algunos casos, resulta en complicaciones potencialmente fatales, como bacteremia y septicemia (Subashchandrabose y Mobley, 2015b).

1.2 Características de *E. coli*

E. coli es un bacilo Gram negativo anaerobio facultativo, fermentador de glucosa, no posee citocromo oxidasa y reduce los nitratos a nitritos como parte de sus procesos de generación de energía. Tiene la capacidad de colonizar y persistir en numerosos nichos, tanto en el ambiente, como en el tracto gastrointestinal de animales y humanos. *E. coli*, como otras bacterias de la microbiota intestinal frecuentemente forma una relación simbiótica benéfica con su hospedero, proporcionando sustancias nutritivas, señales clave para la regulación y desarrollo de la respuesta inmune y protección contra patógenos (Cash, 2014). Como comensal, *E. coli* permanece inofensiva en el lumen intestinal y raramente provoca enfermedad; sin embargo, algunas cepas pueden divergir de su estado comensal

y tornarse patógenas adquiriendo factores de virulencia específicos que incrementan su habilidad para adaptarse a nuevos nichos y causar enfermedades agudas, tanto en el tubo digestivo como en otras partes del hospedero (Stenutz *et al.*, 2006). Estas cepas patógenas se clasifican como *E. coli* diarreogénicas y *E. coli* extraintestinales patógenas (ExPEC), las cuales tienen la capacidad de diseminarse y colonizar otros lugares del hospedero (Kaper *et al.*, 2004; Russo & Johnson, 2000). Entre las ExPEC se encuentran las cepas UPEC que son la causa principal de infecciones del tracto urinario (Foxman, 2003). Las bacterias contaminan la región periuretral y ascienden por la uretra, donde sus características de adaptación les permiten sobrevivir y crecer en el ambiente del tracto urinario (Kaper *et al.*, 2004). Una vez en el interior del tracto urinario, UPEC coloniza preferentemente la vejiga causando cistitis, pero también puede ascender a través de los ureteros de los riñones y ocasionar pielonefritis con la posibilidad de causar daño irreversible a los riñones e incluso la muerte (Scholes *et al.*, 2005; Eto *et al.*, 2007).

No existe un factor particular que permita la identificación de UPEC entre la biota fecal comensal aparte de su habilidad para colonizar el tracto urinario y causar infección (Lüthje y Brauner, 2014).

1.3 Patogenia

Las infecciones en el tracto urinario ocurren cuando *E. coli* asciende por la uretra y coloniza exitosamente la vejiga (Figura 1) (Lüthje y Brauner, 2014). Dentro del tracto urinario, *E. coli* debe superar varias líneas de defensa, como la fuerza mecánica del flujo de orina, sustancias antimicrobianas producidas y secretadas por las células epiteliales que recubren la vejiga, erradicación por neutrófilos y la excreción con la exfoliación de células superficiales (Chromek y Brauner, 2008). Por lo tanto, el primer paso en el establecimiento de una infección es la adherencia estrecha e irreversible a las células uroteliales, seguido de la invasión dentro de las células y la multiplicación (Justice *et al.*, 2004). Una vez que el hospedero ha entrado en contacto con la bacteria reacciona con una respuesta inflamatoria (Samuelsson *et al.*, 2004).



Figura 1. Dinámica entre UPEC y el hospedero durante infecciones en el tracto urinario. Se muestran los eventos clave que ocurren durante la infección de la vejiga por *E. coli* uropatógena. **1)** Expresión de adhesinas para iniciar la colonización de la vejiga. **2)** Secreción de toxinas y otros factores de virulencia, solos o en asociación con vesículas de membrana. **3)** Liberación de moléculas quelantes llamadas sideróforos (estructuras azules) para la recolección de hierro que compiten con ciertas moléculas del hospedero como lipocalina 2 (discos blancos). **4)** Internalización en las células del hospedero para formar comunidades bacterianas intracelulares. **5)** Las células infectadas con las comunidades intracelulares bacterianas son exfoliadas como parte de la respuesta del hospedero a la infección, sin embargo esto hace que las capas celulares inferiores, de células más jóvenes sean blanco fácil para las bacterias. **6)** Flujo de neutrófilos como parte de la respuesta inmune del hospedero (Tomada de Wiles *et al.*, 2009).

La adherencia a las células del hospedero es considerada el primer paso para una infección exitosa. Los principales receptores para la unión de *E. coli* a las superficies uroteliales en el tracto urinario inferior son las uroplaquinas, expresadas por las células sombrilla expuestas en la superficie luminal de la vejiga y los ureteros (Wu *et al.*, 2009). Estos receptores que contienen manosa son fácilmente reconocidos por la fimbria tipo 1 (Zhou *et al.*, 2001), lo que permite una fuerte adherencia para encarar el estrés mecánico presente en la vejiga (Thomas

et al., 2004). Después de la adherencia, un pequeño número de bacterias entra en las células explotando varios componentes estructurales de las células del hospedero, incluyendo integrinas β 1 (glicoproteínas que participan en la unión de las células a la matriz extracelular), la actina del citoesqueleto, microtúbulos y balsas lipídicas (Martinez *et al.*, 2000; Eto, *et al.*, 2007; Dhakal y Mulvey, 2009). Además de la fimbria tipo 1, con su función de unirse al tracto urinario inferior, el pili P se encuentra entre las adhesinas mejor investigadas en UPEC, y está relacionado con el tracto urinario superior. Adicionalmente, UPEC expresa un gran número de otras adhesinas, las cuales tienen relevancia específica en diferentes regiones del tracto urinario (Lüthje y Brauner, 2014).

Una vez que se ha adherido y ha sido adoptada por las células, *E. coli* entra en el citoplasma y se multiplica rápidamente. Eventualmente, las colonias bacterianas crecen tanto que aparecen como vainas sobresalientes hacia el lumen de la vejiga (Anderson *et al.*, 2003). Estas llamadas comunidades bacterianas intracelulares (CBIs) son el sello distintivo de un estado agudo de infección cuando las bacterias se multiplican excesivamente durante varias generaciones (Justice *et al.*, 2004). Eventualmente las bacterias emergen de las comunidades bacterianas intracelulares para colonizar nuevamente el urotelio e invadir nuevas células. Debido a la pérdida de células superficiales en el proceso de exfoliación, las células menos diferenciadas en las capas inferiores del urotelio quedan expuestas a las bacterias (Lüthje y Brauner, 2014).

La infección causada por UPEC induce una sobre regulación de citocinas y quimiocinas por la unión a los receptores de reconocimiento de patógenos. TLR4 (Toll-like Receptor 4), que reconoce lipopolisacárido (LPS), y TLR5 (Toll-like Receptor 5), que reconoce el flagelo, parecen los receptores más importantes para esta respuesta (Smith *et al.*, 2003; Park y Lee, 2013). Aparte de la bien conocida interacción entre el lipopolisacárido y TLR4, el pili P y la fimbria tipo 1 inducen y modulan la respuesta mediada por TLR4. Mientras que la inducción de una respuesta proinflamatoria por la fimbria tipo 1 requiere lipopolisacárido (Schilling *et al.*, 2001; Schilling *et al.*, 2003) el pili P induce una respuesta TLR4 independientemente de este factor (Freundt *et al.*, 2001). La unión de estas fimbrias a sus receptores induce la liberación de ceramida, la cual actúa como agonista en TLR4 permitiendo la reacción inflamatoria independientemente de LPS mediante la respuesta de CD14 (Cluster of Differentiation 14) (Fischer *et al.*, 2007).

Una vez en la vejiga, las bacterias pueden ascender por los ureteros a los riñones causando pielonefritis aguda; en el peor de los casos, las bacterias pueden incluso entrar al torrente sanguíneo. *E. coli* usa flagelos para nadar contra el flujo de orina por los ureteros hasta los riñones. La motilidad mediada por flagelos también está

involucrada en la diseminación bacteriana al torrente sanguíneo (Lane *et al.*, 2007).

La producción de toxinas ayuda igualmente a las bacterias a propagarse dentro de los tejidos del hospedero interrumpiendo la integridad celular para obtener una mayor cantidad de nutrientes mediante la lisis de las células del hospedero. En contraste, el daño tisular provoca una fuerte reacción inflamatoria, lo cual podría posteriormente ayudar al hospedero a terminar la infección (Lüthje y Brauner, 2014).

Los factores de virulencia que se encuentran en las cepas UPEC respaldan diferentes pasos en la uropatogénesis y podrían por lo tanto vincular factores particulares con ciertas manifestaciones de la enfermedad (Lüthje y Brauner, 2014).

1.4 Factores de virulencia

Los síntomas, y el resultado final de una infección en el tracto urinario causada por *E. coli* son influenciados por la combinación de factores determinados por el hospedero, la respuesta inflamatoria y la fagocitosis, así como las bacterias y si hay, liberación de toxinas (Vejborg *et al.*, 2011). UPEC utiliza un gran número de factores de virulencia que le ayudan a adherirse, provocar daño tisular, penetrar a la célula uroepitelial, adquirir nutrientes esenciales, multiplicarse y diseminarse dentro del tracto urinario (Tabla 1) (Subashchandrabose y Mobley, 2015a).

Tabla 1. Genotipos de virulencia presentes en cepas uropatógenas de *E. coli*.

Gen	Factor de virulencia	Función	Referencias
ADHESINAS			
<i>Pap</i>	Pili asociado a pielonefritis (Pili P)	Adherencia a células uroepiteliales, inducción de citocinas.	Wiles <i>et al.</i> , 2009
<i>papGI</i>	Alelos del pili asociado a pielonefritis	Adherencia a células uroepiteliales, inducción de citocinas.	Wiles <i>et al.</i> , 2009
<i>papGII</i>			
<i>papGIII</i>			

Tabla 1 (continuación).

Gen	Factor de virulencia	Función	Referencias
<i>Fim</i>	Fimbria tipo 1	Adherencia a las células uroepiteliales, formación de biopelículas intracelulares.	Marrs <i>et al.</i> , 2005; Wright <i>et al.</i> , 2007
<i>Afa</i>	Adhesina afimbrial	Adherencia a células uroepiteliales.	Le Bouguenec y Servin, 2006
<i>Sfa</i>	Fimbria S	Codifica adhesinas manosa-resistentes.	Stordeur <i>et al.</i> , 2004
<i>Iha</i>	Adhesina homóloga de IrgA	Adherencia a células de vejiga.	Johnson <i>et al.</i> , 2005a
TOXINAS			
<i>cnf1</i>	Factor citotóxico necrotizante 1	Puede alterar las cascadas de señalización del hospedero, modular la respuesta inflamatoria y estimula la muerte celular del hospedero.	Agarwal <i>et al.</i> , 2012
<i>hlyA</i>	Hemolisina α	Lisa eritrocitos, contribuye a la inflamación.	Hamon <i>et al.</i> , 2007; Ratner <i>et al.</i> , 2006
<i>Pic</i>	Proteína involucrada en la colonización intestinal	Secretagogo de mucosidad.	Navarro-Garcia <i>et al.</i> , 2010
<i>Tsh</i>	Hemaglutinina sensible a temperatura	No actividad de serin proteasa	Heimer <i>et al.</i> , 2004
<i>Vat</i>	Toxina vacuolante autotransportadora	Induce efectos citopáticos en células del hospedero.	Restieri <i>et al.</i> , 2007

Tabla 1 (continuación).

Gen	Factor de virulencia	Función	Referencias
<i>Usp</i>	Proteína uropatógena específica	Actividad DNasa, actividad genotóxica en células de mamíferos	Nipic <i>et al.</i> , 2013
<i>Iss</i>	Resistencia a suero	Confiere resistencia a la eliminación de bacterias por suero.	Agarwal <i>et al.</i> , 2012
<i>Cva</i>	Colicina V	Secreción de bacteriocina.	Agarwal <i>et al.</i> , 2012
<i>set-1</i>	Enterotoxina de <i>Shigella</i> 1	Procesos diarreogénicos	Thong <i>et al.</i> , 2005
<i>astA</i>	Toxina enteroagregativa termos estable 1	Procesos diarreogénicos	Telli <i>et al.</i> , 2010
SISTEMAS DE ADQUISICIÓN DE HIERRO			
<i>luc</i>	Aerobactina	Sideróforo que se une a hierro (aerobactina)	Subashchandrabose y Mobley, 2015a
<i>iroN</i>	Receptor de Salmoquelina	Receptor del sideróforo salmoquelina	Hantke <i>et al.</i> , 2003
<i>irp2</i>	Yersiniabactin	Sideróforo que se une a hierro (Yersiniabactin)	Bobrov <i>et al.</i> , 2014; Rakin <i>et al.</i> , 2012
PROTECTINAS			
<i>kpsMT</i>	Antígeno Capsular	Producción del polisacárido capsular. Evasión del sistema inmune, resistencia a suero.	Marrs <i>et al.</i> , 2005; Agarwal <i>et al.</i> , 2012
<i>ompT</i>	Proteasa de membrana externa	Hidroliza protamina evitando que las bacterias sean destruidas.	Hui <i>et al.</i> , 2010

Las cepas UPEC exhiben un alto grado de diversidad genética, esto se debe, principalmente, a la posesión de genes de virulencia especializados localizados en elementos genéticos móviles llamados islas de patogenicidad (Gal-Mor y Finlay, 2006; Hacker y Kaper, 2000; Lloyd *et al.*, 2007).

La patogénesis de las IsTU por cepas UPEC no puede explicarse por la acción de un único factor de virulencia, es más probable que varios factores de virulencia actúen en combinación durante el proceso infeccioso (Agarwal *et al.*, 2013).

El mejor entendimiento de los mecanismos de virulencia que son necesarios para la patogénesis de las infecciones en el tracto urinario podría facilitar la identificación de nuevas estrategias para prevenir y tratar las infecciones por UPEC (Subashchandrabose y Mobley, 2015a).

1.4.1 Islas de patogenicidad

Los genomas de varias bacterias patógenas, incluyendo UPEC, albergan regiones de DNA que son adquiridas mediante transferencia horizontal. Tales regiones son referidas como islas genómicas y se encuentran dentro de elementos móviles, tales como transposones o fagos. La transferencia horizontal de genes es uno de los mecanismos más rápidos de diseminación de factores de virulencia entre bacterias. Genomas secuenciados de cepas UPEC revelan un mosaico estructural con múltiples islas horizontalmente transferidas (Welch *et al.*, 2002; Brzuszkiewicz *et al.*, 2006). Frecuentemente, dichas islas contienen genes de virulencia y son conocidas como islas de patogenicidad.

1.5 Adhesinas

Los factores de adherencia promueven la colonización, invasión, y replicación dentro de las células uroepiteliales (Mulvey, 2002) y preceden a la expresión de otros factores de virulencia (Blum, *et al.*, 1994). La adherencia a las células del hospedero puede ser mediada tanto por adhesinas fimbriales como afimbriales (Lüthje y Brauner, 2014). Las fimbrias, o pilis, son estructuras complejas de proteínas codificadas por grupos de genes en los cuales se encuentra la secuencia para las subunidades fimbriales y la maquinaria necesaria para el ensamblaje y la secreción. En general, las cepas UPEC acarrean un número significativamente más alto de grupos de genes fimbriales comparado con las cepas comensales y fecales (Spurbeck *et al.*, 2011), de los cuales la mayoría pertenecen a la familia de las chaperonas-usher (Wurpel *et al.*, 2013). Estas fimbrias contienen una varilla, compuesta de varios cientos de miles de subunidades grandes de proteínas; y una punta adhesiva formada por una o algunas subunidades pequeñas de proteínas. Dentro del espacio periplasmático,

las chaperonas (proteínas que ayudan al plegamiento adecuado de otras proteínas recién formadas) facilitan el plegamiento de las subunidades, las cuales son ensambladas y secretadas por el acomodador (usher) en la membrana externa (Waksman y Hultgren, 2009).

Gran parte de las adhesinas no fimbriales pertenecen al grupo de las proteínas autotransportadoras. Una proteína autotransportadora está compuesta por diferentes dominios que le permiten su propio transporte a través de la membrana bacteriana (Lüthje y Brauner, 2014). Una secuencia de señal dirige la secreción de la proteína a través de la membrana interna y es entonces removida de la poliproteína; un dominio de translocación β se inserta en la membrana externa para formar un poro y mediar el transporte del dominio α . En contraste con el dominio β , el dominio α es altamente variable y determina la función de la proteína. Después de la secreción el dominio pasajero puede permanecer en la superficie celular y actuar como adhesina, o bien puede ser liberada como toxina al espacio circundante (Figura 2) (Henderson y Nataro, 2001). Las secuencias que codifican proteínas autotransportadoras se encuentran ampliamente distribuidas entre las cepas comensales, y las pertenecientes a distintos patotipos de *E. coli*, sin embargo, algunas se concentran en cepas UPEC, lo que indica que tienen un papel en la urovirulencia (Restieri *et al.*, 2007).

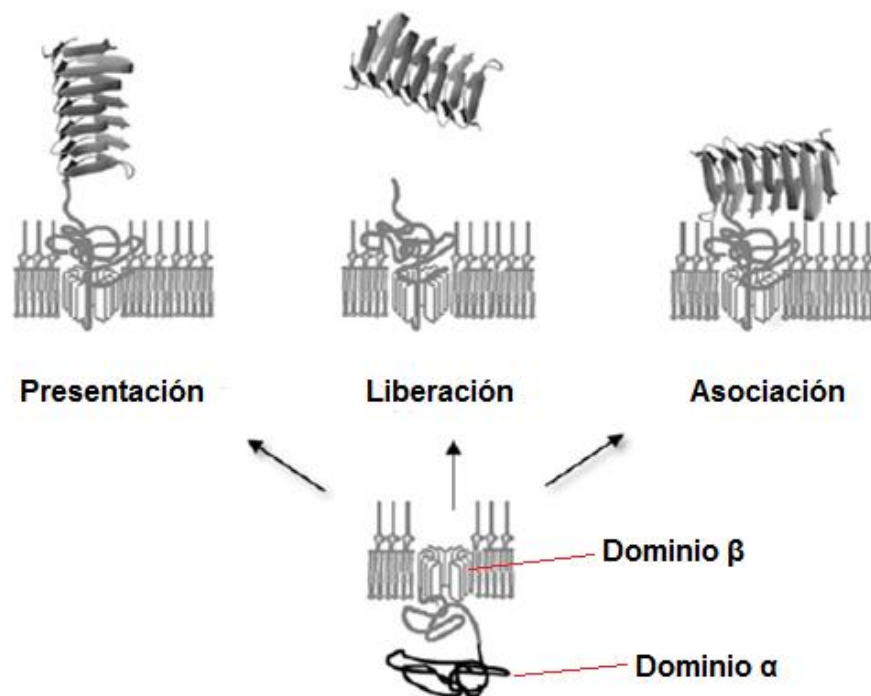


Figura 2. Esquema de opciones en la presentación extracelular y/o liberación de proteínas de adhesión mediante los traslocadores autotransportadores (Tomada de Benz y Schmidt, 2011).

La comunicación (cross-talk) entre los operones de fimbrias dentro de la célula bacteriana, probablemente desencadenada por señales ambientales, puede resultar en el cambio en la expresión de una fimbria por otra, este proceso es conocido como variación de fase (Holden *et al.*, 2006; Lindberg *et al.*, 2007). La expresión en variación de fase de los genes de fimbrias en una sola cepa UPEC puede dar origen a subpoblaciones expresando diferentes fimbrias funcionales, incrementando la probabilidad de adherencia e invasión a los tejidos del hospedero (Holden y Gally, 2004).

Dos de los organelos adhesivos mejor estudiados son la fimbria tipo 1 y el pili P, los cuales son codificados por muchas de las cepas UPEC, y ambos son ensamblados por la ruta de chaperonas-usher.

1.5.1 Pili P, asociado a pielonefritis (*pap*)

La expresión del pili P está frecuentemente asociada con cepas de UPEC causantes de pielonefritis (Lane y Mobley, 2007). Una proteína específica de la adhesina, llamada PapG, la cual está localizada en la punta distal del pili P, media la adherencia bacteriana a las células del hospedero. Se han identificado tres tipos de adhesina PapG (designados PapGI, II y III) que reconocen variantes de globotriacilceramida en la superficie de las células blanco, particularmente en los riñones (Wiles *et al.*, 2009).

La expresión de los genes del pili P está regulada por un cambio epigenético dependiente de metilación (Hernday *et al.*, 2002). La competencia entre Lrp (proteínas relacionadas al receptor de lipoproteína) y Dam (deoxyadenosil metilasa) por unirse a los sitios en el promotor *papBA* determina el estatus de encendido o apagado del operón. La metilación del sitio GATC cercano al gen *papB* permite la expresión de los genes del pili P; en contraste, la unión de Lrp a este sitio excluye la metilación resultando en represión transcripcional. Una vez que el interruptor es encendido, hay un mecanismo innato que se esfuerza por mantenerlo en esa fase. PapB activa la transcripción de *papI* y PapI promueve la unión de Lrp al sitio GATC distal, facilitando la expresión de los genes del pili P (Subashchandrabose y Mobley, 2015a).

1.5.2 Fimbria tipo 1 (*fim*)

La fimbria tipo 1 está altamente conservada y es extremadamente común tanto entre las cepas UPEC como en las comensales (Norinder *et al.*, 2011; Vejborg *et al.*, 2011), y ha sido considerada uno de los factores de virulencia más importantes involucrados en el establecimiento de las infecciones en el tracto urinario, ya que contribuye a la formación de las biopelículas intracelulares bacterianas (Wright *et*

al., 2007). La punta adhesiva de esta fimbria, FimH, se une a las uroplaquinas, proteínas altamente manosiladas encontradas en las células uroepiteliales (Subashchandrabose y Mobley, 2015a).

La expresión de la fimbria tipo 1 es de fase variable, y está regulada por un elemento invertible de DNA que contiene el promotor del gen que codifica la subunidad estructural principal, *fimA* (Abraham *et al.*, 1985), el elemento invertible de DNA está flaqueado por repetidos invertidos, FimB y FimE, que son recombinasas sitio específicas que cambian la orientación del promotor de encendido a apagado o apagado a encendido. Varias proteínas reguladoras globales, tales como proteína relacionada al receptor de lipoproteína (Lrp), proteínas estructurantes de nucleótidos tipo histona (H-NS), factor de integración al hospedero (IHF), y proteínas receptora de cAMP (CRP/cAMP), regulan la expresión de los genes de la fimbria tipo 1 controlando la orientación de la región promotora (Müller *et al.* 2009). Por ejemplo, la proteína receptora de cAMP (CRP) actúa como represor de la expresión de los genes de la fimbria tipo 1 por regulación negativa del gen que codifica la proteína relacionada al receptor de lipoproteína (*lrp*) resultando en la reducción en la recombinación mediada por FimB que cambia la posición del promotor de la orientación de apagado a encendido. Adicionalmente, CRP mejora la actividad de la DNA girasa llevando a apagado la orientación del promotor. Así, la expresión de los genes de la fimbria tipo 1 está regulada coordinadamente por múltiples entradas regulatorias que convergen en recombinasas que controlan la orientación del promotor (Subashchandrabose y Mobley, 2015a).

1.5.3 Adhesina afimbrial (*afa*)

Las cepas de *E. coli* que albergan operones que codifican adhesinas Afa son referidas como difusamente adherentes, y pueden considerarse como un grupo separado de *E. coli* diarreogénica, ya que están típicamente asociadas a infecciones intestinales, sin embargo las cepas de *E. coli* que expresan estas adhesinas se encuentran frecuentemente entre cepas que provocan infecciones extra-intestinales, incluyendo cepas que provocan ISTU (Le Bouguenec y Servin, 2006).

1.5.4 Fimbria S (*sfa*)

La fimbria S está codificada por el operón *sfa* de *E. coli* uropatógena, y codifica las adhesinas manosa-resistentes (Stordeur *et al.*, 2004). La presencia de la fimbria S está relacionada con meningitis y septicemia ocasionada por *E. coli* uropatógena en humanos (Antao *et al.*, 2009).

1.5.5 Adhesina homóloga de IrgA (*iha*)

El gen *iha* codifica la adhesina homóloga de IrgA, una proteína de membrana externa, que confiere adherencia a las cepas de laboratorio no adherentes (Tarr *et al.*, 2000). Su designación está derivada de su similitud con la proteína IrgA, la cual se sugiere que tiene un papel importante en la colonización de ratón experimentalmente infectado con *Vibrio cholerae* (Goldberg *et al.*, 1990).

1.6 Toxinas

La secreción de toxinas por bacterias patógenas es bien conocida (Wiles, *et al.*, 2009). Las toxinas ayudan al esparcimiento del patógeno en tejidos más profundos después de interrumpir la integridad celular; para tener acceso a nutrientes dentro de la célula del hospedero, o para destruir células efectoras del sistema inmune y así evadir su actividad antibacteriana (Lüthje y Brauner, 2014). Las toxinas producidas por UPEC no solo provocan daño tisular, sino que también están involucradas en la comunicación celular entre el patógeno y el hospedero (Subashchandrabose y Mobley, 2015a). Las cepas UPEC secretan un gran número de toxinas, sin embargo no existen reportes de que ciertos genes que codifican toxinas estén presentes en todas las cepas UPEC (Welch, 2016).

ExPEC codifica varias toxinas secretadas mediante el sistema tipo V, conocidas colectivamente como autotransportadoras (Henderson *et al.*, 2004), por ejemplo Pic (Proteína involucrada en la colonización), Tsh (Hemaglutinina sensible a temperatura) y Vat (Proteína vacuolante autotransportadora).

Las toxinas expresadas por UPEC no necesariamente son secretadas como proteínas desnudas, pueden estar asociadas a vesículas de membrana externa, las cuales son utilizadas por muchas especies de bacterias para facilitar la comunicación inter e intra-especie, intercambio de material genético, adherencia bacteriana e invasión a la células del hospedero y reparto de toxinas (Kuehn y Kesty, 2005; Mashburn-Warren y Whiteley, 2006). Hemolisina α (HlyA) y el factor citotóxico necrotizante 1 (CNF1) son dos toxinas de UPEC asociadas a vesículas (Basalobre *et al.*, 2006; Davis *et al.*, 2006).

1.6.1 Factor citotóxico necrotizante 1 (*cnf1*)

Aproximadamente un tercio de las cepas UPEC codifican CNF1, que es una proteína de 113 kDa, cuya toxicidad es atribuida a su habilidad para activar a la familia de Rho GTPasas, RhoA, Rac, y/o Cdc42 (Lemonnier *et al.*, 2007). La activación de las Rho GTPasas afecta varias funciones celulares eucarióticas,

incluyendo la formación de fibras de actina, lamelapodia, filopodia, la inducción del ondulamiento de membrana y la modulación de vías de señalización inflamatoria (Etienne-Manneville y Hall, 2002). Para ejercer sus efectos, el factor citotóxico necrotizante (CNF1) debe tener acceso al citosol del hospedero mediante la unión al precursor del receptor de laminina en la superficie de las células diana, desencadenando la aceptación y subsecuente tráfico de la toxina en el compartimento endosomal tardío. Las condiciones ácidas dentro de este compartimento indican la traslocación del dominio catalítico del factor citotóxico necrotizante (CNF1) a través de la membrana vesicular y dentro del citosol del hospedero, donde estimula la familia de GTPasas Rho (Lemonnier *et al.*, 2007).

1.6.2 Hemolisina α (*hlyA*)

La toxina hemolisina α (HlyA) es codificada por aproximadamente 50% de las cepas UPEC y su expresión está asociada con el aumento en la severidad de la infección (Marrs *et al.*, 2005). La hemolisina α (HlyA) es una toxina dependiente de calcio de 110 kDa que forma poros de 2 nm de ancho en las células del hospedero, provocando lisis celular cuando se alcanzan altas concentraciones de ella (Wiles *et al.*, 2009). Esta toxina contiene la repetición característica de nonapéptidos ricos en glicina en el dominio C-terminal. El operón *hlyCABD* codifica las proteínas involucradas en la producción, activación y exportación de la hemolisina α . La toxina está codificada por el gen *hlyA*, y el gen *hlyC* que codifica una aciltransferasa que es necesaria para la activación de la toxina. HlyB y HlyD actúan en conjunto con TolC, una proteína de membrana externa, para la secreción dependiente de energía de la hemolisina α (Subashchandrabose y Mobley, 2015a). Ya que los ambientes encontrados en el hospedero por las cepas ExPEC son extremadamente pobres en nutrientes se ha pensado que la función principal de la hemolisina α es la destrucción de las células del hospedero, facilitando así la obtención de nutrientes y otros factores necesarios para el crecimiento bacteriano. Sin embargo, no está claro en qué condiciones alcanza niveles lo suficientemente altos para lisar las células del hospedero durante una verdadera infección. En cambio las concentraciones sublépticas de esta toxina pueden ser más relevantes fisiológicamente. De hecho, se ha demostrado que concentraciones sublépticas de un número de toxinas formadoras de poros pueden modular una gran variedad de rutas de señalización del hospedero, incluyendo estimulación pasajera de oscilaciones de calcio, la activación de la señalización MAPcinasa, y la alteración de los patrones de fosforilación y acetilación de las histonas (Hamon *et al.*, 2007; Ratner *et al.*, 2006). Adicionalmente, se ha encontrado que las concentraciones sublépticas de la hemolisina α potencialmente estimulan la inactivación de la serina/treonina cinasa Akt, que juega un papel

central en la progresión del ciclo celular del hospedero, metabolismo, tráfico vesicular, sobrevivencia, y vías de señalización inflamatoria (Wiles *et al.*, 2008). Adicionalmente a su actividad citolítica, La hemolisina α también está involucrada en la comunicación entre el hospedero y el patógeno. Esta toxina degrada paxilina, una proteína andamio del citoesqueleto, y otras proteínas involucradas en la cascada de señalización de NF- κ B (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas), interfiriendo con la señal proinflamatoria mediada por este complejo proteico, amortiguando así la respuesta inmune del hospedero a la infección (Dhakal y Mulvey, 2012).

1.6.3 Proteína involucrada en la colonización intestinal (*pic*)

La proteína Pic fue originalmente descrita en *Shigella flexneri* y *E. coli* enteroagregativa (Henderson *et al.*, 1999). Los genes involucrados en la síntesis de esta proteína se encuentran en la isla de patogenicidad *aspV* (Welch, 2016). La proteína Pic posee actividad de mucinasa hacia glicoproteínas unidas a O, como CD43, CD45 y fractalcina, comúnmente encontrada en la superficie de neutrófilos (Parreira y Gyles, 2003). El tratamiento *in vitro* de neutrófilos con esta proteína resulta en defectos en la quimiotaxis y transmigración, y estimula la producción de explosión oxidativa (Parreira y Gyles, 2003). Se ha demostrado que las cepas UPEC mutantes de *pic* colonizan la vejiga de ratones aproximadamente 50% menos que las cepas que contienen este gen (Ruiz-Perez *et al.*, 2011).

1.6.4 Hemaglutinina sensible a temperatura (*tsh*)

La hemaglutinina sensible a temperatura no muestra actividad serin proteasa (Heimer *et al.*, 2004), y parece estar más estrechamente relacionada con la toxina vacuolante autotransportadora (Subashchandrabose y Mobley, 2015a).

1.6.5 Toxina vacuolante autotransportadora (*vat*)

La toxina vacuolante autotransportadora fue descrita por primera vez en cepas patogénicas aviares de *E. coli* (Parreira y Gyles, 2003). Los genes involucrados en la síntesis de esta toxina se encuentran en la isla de patogenicidad *thrW* (Welch, 2016). Esta toxina se encuentra en más de la mitad de las cepas de *E. coli* aisladas de cistitis y pielonefritis (Parham *et al.*, 2005). Aunque fue inicialmente caracterizada por su habilidad para inducir una variedad de efectos tóxicos en células diana del hospedero, incluyendo vacuolación e hinchazón (Restieri *et al.*, 2007), hasta el momento no existen reportes de la importancia de esta toxina en modelos *in vitro* o *in vivo* de infecciones por UPEC.

1.6.6 Proteína uropatógena específica (*usp*)

La proteína uropatógena específica, codificada por el gen *usp*, está asociada a cepas aisladas de pielonefritis, prostatitis e infecciones en el tracto urinario (Yamamoto *et al.*, 2001; Rijavec *et al.*, 2008). El gen *usp* (1.8 kb) está codificado en una pequeña isla de patogenicidad junto con tres marcos de lectura abierta que se encuentran río abajo, *imu1-3* (300 pb cada uno). La proteína uropatógena específica presenta actividad DNasa y, particularmente cuando se expresa a la par de *Imu2*, muestra actividad genotóxica en células de mamíferos (Nipic *et al.*, 2013). El daño al DNA provocado por genotoxinas lleva a la activación del mecanismo de respuesta a daño del DNA y al subsecuente arresto del ciclo celular. El daño irreversible en el DNA resulta en apoptosis o senescencia (Elmore, 2007). La infección con *E. coli usp⁺ imu1-3⁺* induce que la actividad de las caspasas 3/7 aumente y perturba la estructura del citoesqueleto (Nipic *et al.*, 2013), respuestas propias de la apoptosis (Elmore, 2007).

1.6.7 Enterotoxina de *Shigella* 1 (*set-1*)

La enterotoxina de *Shigella* 1 (ShEt1) es un factor de virulencia de las cepas enteroagregativas de *E. coli* (EAEC), y fue detectada por primera vez en *Shigella flexneri* (Telli *et al.*, 2010; Vila *et al.*, 2000). Esta enterotoxina está codificada por los genes cromosómicos *set*, los cuales contienen dos marcos de lectura abierta continuos, *set1A* y *set1B* (Fasano *et al.*, 1997). Estos genes están localizados en la isla de patogenicidad *She*, un elemento cromosómico de 46kb que contiene algunos genes que tienen funciones potenciales en la virulencia bacteriana. La fase acuosa en la diarrea por shigelosis es causada por esta toxina (Thong *et al.*, 2005).

1.6.8 Toxina enteroagregativa termoestable 1 (*astA*)

La toxina enteroagregativa termo estable 1 (EAST-1: Enteroaggregative Heat Stable Toxin 1), es un péptido de 38 aminoácidos, codificado por el gen *astA* localizado en el plásmido pAA, el cual es común en la mayoría de las cepas enteroagregativas de *E. coli* (EAEC), incluso en las cepas comensales y no comensales (Mendez-Arancibia *et al.*, 2008; Telli *et al.*, 2010; Vila *et al.*, 2000). La toxina codificada por este gen estimula la producción de altos niveles de Guanosin monofosfato cíclico (cGMP) en la célula, por lo que el sistema de co-transporte de iones de Na/Cl es inhibido, y la absorción de agua y electrolitos del intestino a las vellosidades es reducida, resultando en una elevación en la secreción de Cl⁻ y agua en las cavidades celulares (Telli *et al.*, 2010).

1.7 Sistemas de adquisición de hierro

En los hospederos mamíferos las concentraciones de hierro libre son muy bajas, por lo que para sobrevivir en el tracto urinario humano UPEC ha desarrollado múltiples estrategias para obtenerlo del hospedero, incluyendo la expresión de sideróforos para recoger el hierro del ambiente y posteriormente concentrarlo en el citosol de la bacteria. Los sideróforos son moléculas de bajo peso molecular secretadas por las bacterias que tienen una alta afinidad por Fe^{3+} para posteriormente recuperarlos a través de receptores que facilitan el transporte de los complejos hierro-sideróforo a través de la membrana bacteriana hasta el citosol, donde el hierro es liberado (Wiles *et al.*, 2009).

Limitar el hierro disponible es una de las defensas del hospedero contra los patógenos bacterianos invasores, esto se conoce como inmunidad nutricional (Cassat y Skaar, 2013). Ya que las bacterias hacen uso de sideróforos para secuestrar hierro, los eucariontes usan proteínas quelantes de hierro para lanzarlo dentro y fuera de las células del hospedero, por ejemplo transferrina, una proteína acarreadora de hierro que está conservada entre mamíferos, aves, peces y anfibios (Fischbach *et al.*, 2006a). Sin embargo, un sideróforo común conocido como enterobactina tiene una afinidad mayor por el hierro, incluso a bajas concentraciones, lo que le permite competir con transferrina por la unión a éste. El empleo de enterobactina puede permitirle a los patógenos como UPEC la habilidad de colonizar nichos pobres en hierro, tales como el tracto urinario. El hospedero, sin embargo, no está indefenso contra este tipo de sideróforos. Por ejemplo, la proteína lipocalina 2 es una eficiente contramedida para combatir la captura de hierro mediada por enterobactina, mediante la unión y secuestro de este sideróforo (Goetz *et al.*, 2002). Lipocalina 2 es constitutivamente expresada y liberada por los neutrófilos activados, las principales células efectoras del sistema inmune reclutadas a los sitios de infección en el tracto urinario. La expresión de Lipocalina 2 también está sobre-regulada *in vivo* en las células uroteliales que albergan comunidades bacterianas intracelulares (Reigstad *et al.*, 2007).

UPEC expresa una numerosa, y en apariencia redundante, cantidad de sistemas de adquisición de hierro, incluyendo los sideróforos yersiniabactina, salmoquelina y aerobactina. Curiosamente, las salmoquelinas son variantes de las enterobactinas que han sido modificadas mediante una glucosilación mediada por una glucosiltransferasa codificada dentro del grupo de genes *iroA* (Bister *et al.*, 2004; Smith, 2007). Esta modificación a aerobactina previene el reconocimiento y secuestro por lipocalina 2, lo cual le brinda a las cepas *iroA* positivas una ventaja dentro del hospedero (Fischbach *et al.*, 2006b). Muchas cepas UPEC portan este grupo de genes en islas de patogenicidad. Es importante aclarar que el complejo salmoquelina-hierro no es reconocido por el receptor normal de enterobactina,

FepA. Sin embargo, el grupo de genes *iroA* codifica otro receptor, *iroN*, el cual reconoce a salmoquelina unida a hierro y la transporta dentro del citosol (Hantke *et al.*, 2003).

HPI (High Pathogenicity Island) es una isla de alta patogenicidad de 36 a 43 kb, que codifica uno de los principales sistemas de adquisición de hierro en bacterias (García *et al.*, 2011; Garenaux *et al.*, 2011). La estructura de HPI ha sido ampliamente estudiada y varios genes de interés han sido descritos (Figura 3): un gen integrasa (*int*), los genes *irp1*, *irp2* (proteína represible de hierro) que codifican el sideróforo Yersiniabactina, el gen *fyuA* que codifica el receptor de Yersiniabactina involucrado en la toma de hierro y el gen regulador *ybtA* (Bobrov *et al.*, 2014; Rakin *et al.*, 2012).

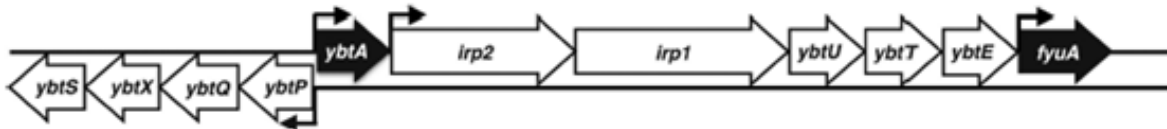


Figura 3. Marcos de lectura abierta del locus HPI, se muestran las regiones promotoras identificadas hasta el momento. Los genes *ybtA* y *fyuA* (marcados en negro) codifican un activador transcripcional parecido a AraC de *fyuA* y al receptor de Yersiniabactin FyuA. Los genes *irp2*, *irp1*, *ybtU*, *ybtT*, *ybtE* y *ybtS* codifican proteínas involucradas en la síntesis del sideróforo Yersiniabactina, *ybtP* y *ybtQ* codifican proteínas que facilitan el transporte de Yersiniabactina a través de la membrana interna, y *ybtX* codifica una proteína que contribuye a la adquisición de zinc mediada por Yersiniabactin (Tomada de Brumbaugh *et al.*, 2015; Bobrov *et al.*, 2014; Rakin *et al.*, 2012).

HPI se encuentra ampliamente distribuida entre la familia *Enterobacteriaceae* (Bach *et al.*, 2000). En *E. coli* se encuentra en 70% de las cepas causantes de infecciones del tracto urinario (Schubert *et al.*, 1998).

Las altas concentraciones intracelulares de hierro son perjudiciales para las bacterias, por lo que el mantenimiento de la homeostasis de este metal está sometido a una rigurosa regulación. El regulador de consumo férrico (Fur) regula la expresión de los genes involucrados en la absorción de hierro y el metabolismo a nivel transcripcional (Figura 4). El homodímero Fur-hierro se une a las “cajas Fur” en la región promotora de los genes regulados por Fur, reprimiendo su transcripción. Cuando los niveles intracelulares de hierro son bajos, la represión mediada por Fur es aliviada debido a la baja afinidad de Fur libre por las cajas Fur,

por lo que la des-represión de los sistemas de absorción de hierro facilita la adquisición de este metal (Lee y Helmann, 2007).

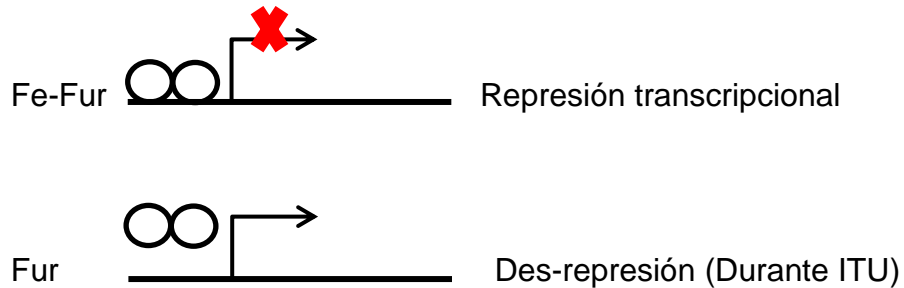


Figura 4. Mecanismo de regulación de absorción de hierro. En presencia de hierro Fur reprime (X) la transcripción de los genes involucrados en el consumo de hierro. La limitación de hierro dentro del tracto urinario del hospedero resulta en la des-represión de los genes regulados por Fur, incluyendo a los genes para la biosíntesis de sideróforos (Tomado de Subashchandrabose y Mobley, 2015a).

1.8 Protectinas

Un factor de virulencia clave asociado a UPEC es la cápsula de polisacárido, o antígeno K, en la superficie de la célula bacteriana (Corbett y Roberts, 2008). Las cápsulas de *E. coli* han sido clasificadas dentro de cuatro grupos con base en criterios bioquímicos y genéticos (Whitfield y Roberts, 1999). La expresión de las cápsulas del grupo 2 (tipificadas por K1) está asociada a cepas invasivas de *E. coli*, incluyendo UPEC. El cluster genético de grupo 2 capsular está compuesto por tres regiones (Figura 5) y está principalmente regulado a nivel transcripcional, lo cual involucra la acción de varios reguladores globales, como proteínas estructurantes de nucleótidos tipo histona (H-NS), actuando en dos promotores convergentes regulados por temperatura (King *et al.*, 2015).

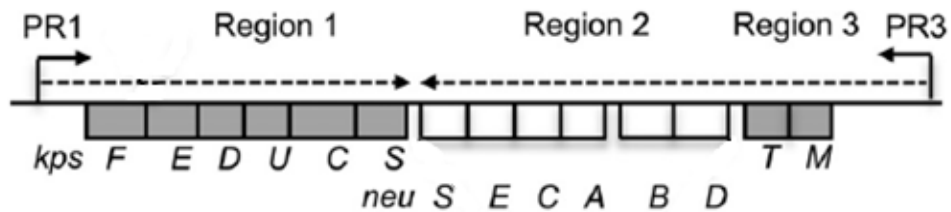


Figura 5. Organización del grupo de genes de la capsula K1. El grupo de genes está compuesto por tres regiones. La región 1 (*kpsFEDUCS*) y la región 3 (*kpsMT*) están conservadas en todo el grupo 2 y codifican proteínas involucradas en el transporte de los polisacáridos a la superficie celular. La región 2 es específica de cada serotipo, en este caso contiene genes responsables de la síntesis del polisacárido K1. Las flechas punteadas indican los principales transcritos de los promotores PR1 y PR3 (Tomado de King *et al.*, 2015).

Se sabe que la expresión del antígeno K es importante para los patógenos bacterianos invasivos, ya que les permite combatir las defensas innatas del hospedero como la fagocitosis (Weiss *et al.*, 1982)

La proteasa de membrana externa (OmpT), una aspartil proteasa que se encuentra en la membrana externa de *E. coli*, es miembro de la familia de omptin proteasas que están presentes en algunas bacterias Gram negativas (Kramer *et al.*, 2000). Experimentos enzimáticos *in vitro* han mostrado que esta proteasa de membrana externa puede hidrolizar protamina en poco tiempo evitando que las bacterias sean asesinadas por protamina (Hui *et al.*, 2010). Análisis epidemiológicos han mostrado que la proteasa de membrana externa puede estar funcionalmente asociada con la capsula (*kpsMT*), el factor citotóxico necrotizante (*cnf1*) y la fimbria S (*sfa*), aunque no está unido genéticamente a estos factores de virulencia puede contribuir al daño patológico y la respuesta inflamatoria en la vejiga y los riñones (He *et al.*, 2015).

1.9 Biopelícula

Las biopelículas son comunidades bacterianas complejas y hasta de crecimiento mixto, que pueden estar pobladas por una o varias especies. Una característica importante que distingue a las biopelículas de las células planctónicas es la presencia de una matriz extracelular que puede estar compuesta por proteínas, polisacáridos y/o DNA. La composición de la matriz de la biopelícula difiere entre varias especies de bacterias; proteínas (curli y fimbrias) y polisacáridos (celulosa,

y poli-N-acetil glucosamina) se encuentran en la matriz de las biopelículas formadas por *E. coli*. Las células en una biopelícula exhiben un grado más alto de resistencia a antibióticos comparadas con las células planctónicas (Subashchandrabose y Mobley, 2015a). Los genes involucrados en la biogénesis de las fimbrias tipo 1 y S, y el pili P están regulados a la baja en las biopelículas, lo que indica que estas no son necesarias para la formación de la biopelícula (Hancock *et al.*, 2010).

1.10 Comunidades bacterianas intracelulares

Cuando las cepas UPEC que expresan la fimbria tipo 1 se internalizan en las células del hospedero, proliferan y se diferencian en comunidades bacterianas intracelulares (CBIs), agregados compactos intracelulares de bacterias con propiedades parecidas a las de la biopelículas han sido caracterizadas en modelos murinos (Anderson *et al.*, 2003; Justice *et al.*, 2004; Wright *et al.*, 2007). Las CBIs tienen forma globular, están estrechamente empaquetadas con bacterias cocoides y comúnmente ocupan la mayor parte del citosol de la célula del hospedero, provocando la deformación de las células uroteliales. La formación ocurre de 6 a 24 horas después de la infección, y las CBIs expresan antígeno 43, fimbria tipo 1 y secretan una matriz de polisacárido (Anderson *et al.*, 2003; Justice *et al.*, 2004). El gen *fimH* (fimbria tipo 1) es uno de los genes necesarios para la formación de estas comunidades y varios sistemas de adquisición de hierro están sobre expresados en estas formaciones (Hannan *et al.*, 2008; Justice *et al.*, 2004; Reigstad *et al.*, 2007; Wright *et al.*, 2007). Similar a los modelos murinos, estructuras parecidas a CBIs han sido identificadas durante IstU en humanos. Se han encontrado en muestras de orina de pacientes células exfoliadas que presentan características semejantes a las de CBIs, y aislados de UPEC originarios de pacientes con bacteriuria asintomática, pielonefritis y cistitis forman CBIs en modelos murinos de infecciones en el tracto urinario (Garofalo *et al.*, 2007; Rosen *et al.*, 2007).

1.11 Serogrupos

Las cepas de *E. coli* son identificadas serológicamente por los antígenos de superficie O (somático), K (capsular) y H (flagelar). El antígeno O, del cual se han descrito más de 174 serogrupos (Liu *et al.*, 2008), es un polisacárido que consiste en aproximadamente de 10 a 25 subunidades repetidas de azúcares ancladas en el núcleo externo del lipopolisacárido que compone la membrana bacteriana (Stenutz, *et al.*, 2006). Estudios previos han reportado que los serogrupos O1, O2, O4, O6, O7, O8, O15, O16, O18, O21, O22, O25, O75 y O83 están

preferencialmente asociados con cepas UPEC (Ananias y Yano 2008; Bidet *et al.*, 2007;). Estas variaciones se deben a las diferencias en los genes que codifican la enzima glicosiltransferasa que modifica la estructura del antígeno O (Sarkar *et al.*, 2014).

Los serogrupos O de las cepas UPEC están relacionados con ciertos patrones de genes de virulencia.

Recientemente se ha estudiado la relación de los genes de virulencia de cepas UPEC con la formación de la biopelícula en mujeres con cistitis (Agarwal *et al.*, 2013) y la distribución de marcadores de virulencia en cepas UPEC aisladas de IsTU (Tarchouna *et al.*, 2013). Sin embargo, aunque se han realizado estudios sobre la expresión de algunos marcadores de virulencia de UPEC durante la proliferación intracelular en un modelo *in vitro* de cultivo celular (Berry *et al.*, 2009) y en un modelo de IsTU en ratones (Wright *et al.*, 2007), actualmente no se conocen los diferentes patrones de expresión de los genotipos de virulencia de cepas UPEC relacionados con las infecciones del tracto urinario y su asociación con los distintos serogrupos.

En los últimos años se ha estudiado en varias partes del mundo la frecuencia y asociación de los distintos marcadores de virulencia con serogrupos en cepas de *E. coli* uropatógenas, sin embargo, no se ha estudiado de manera global la expresión de estos marcadores genéticos, y su participación durante la patogénesis de las infecciones del tracto urinario, por lo que este proyecto contribuirá a establecer los diferentes patrones de expresión de los genotipos de virulencia y su asociación con los distintos serogrupos en cepas UPEC, mediante la implementación de un modelo *in vitro* de infección de la línea celular vaginal humana A431.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar los distintos patrones de expresión de los marcadores de virulencia en cepas de *E. coli* uropatógenas utilizando un modelo *in vitro* de infección de un cultivo celular.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Determinar por PCR en Tiempo Real la expresión de los genes de adherencia (*pap*, *papGI*, *papGII*, *papGIII*, *sfa*, *afa*, *fim*, *iha*), de sistemas de adquisición de hierro (*iuc*, *iroN*, *irp2*), toxinas (*tsh*, *cnf1*, *usp*, *hlyA*, *vat*, *iss*, *cva*, *set-1*, *astA*, *pic*) y de protectinas (*kpsMT*, *ompT*) en las cepas UPEC.
- b) Identificar los diferentes serogrupos en las cepas UPEC.
- c) Establecer los diferentes patrones de expresión de los marcadores de virulencia y su asociación con los diferentes serogrupos en las cepas UPEC.

3. ANTECEDENTES

- Hagan *et al.*, 2010 (Estados Unidos). Analizaron la expresión global de 8 cepas de *E. coli* aisladas de la orina de mujeres que presentaron bacteriuria clínica mediante microarreglos para cDNA, encontrando que los sistemas de adquisición de hierro y los sistemas de transporte de péptidos fueron altamente expresados durante la infección en el tracto urinario.
- Molina-López *et al.*, 2011 (México). Estudiaron 119 cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con diagnóstico de infección en el tracto urinario para la detección de resistencia a antibióticos y la determinación de serotipos y grupos filogenéticos, encontrando que el serotipo predominante fue O25:H4 (21.2%) y el 30.2% de las cepas presentaron multi resistencia a antibióticos.
- Momtaz *et al.*, 2013b (Irán). Identificaron en 123 cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con infecciones en el tracto urinario 26 genes de virulencia, serogrupos y resistencia a antibióticos. El gen detectado con mayor frecuencia fue *fim* (86.1%) y *set1* (79.6%), mientras que *usp* y *kpsMT* presentaron menos frecuencia con el 1.6% y 4% respectivamente. El serogrupo predominante fue el O25 (26%), y el 100% de las cepas fue resistente a la penicilina.
- Vollmerhausen y Katouli, 2014 (Australia). Detectaron la expresión de 21 genes de virulencia en cepas de *E. coli* aisladas pacientes con infecciones en el tracto urinario, 102 de niños y 45 obtenidas de adultos, encontrando que los genes más frecuentes para ambos grupos fueron *fimH* (97% y 100% respectivamente) y *fyuA* (83% y 91% respectivamente), mientras que el menos frecuentes fue *afa* (8% y 4% respectivamente).
- Harwalkar *et al.*, 2015 (India) Determinaron la prevalencia de genes de virulencia en un total de 280 cepas de *E. coli* uropatógena aisladas de pacientes con y sin diabetes mellitus, encontrando que el gen *papC* fue el de mayor prevalencia, presente en 51.6% de las cepas de pacientes con diabetes mellitus y en 57.1% de las cepas de pacientes sin diabetes mellitus. El gen *cnf-1* fue el de menor prevalencia con 11.9% y 22.7% respectivamente.

- Paniagua-Contreras *et al.*, 2015 (México). Analizaron 194 cepas de *E. coli* uropatógenas obtenidas de pacientes con infecciones en el tracto urinario. Estos autores establecieron la frecuencia de genes de virulencia mediante PCR y analizaron la asociación con fenotipos de resistencia a antibióticos. Los genes detectados con mayor frecuencia fueron *kpsMT* (92.2%), *usp* (87.1%), *irp2* (79.3%), *iha* (64.9%) y *fim* (61.3%), y el 97% de las cepas presentó multi resistencia a los antibióticos.
- Morales-Espinosa *et al.*, 2016 (México). Caracterizaron los serotipos, 13 genes de virulencia y resistencia a antibióticos de 23 cepas de *E. coli* aisladas de mujeres con cistitis y 25 de hombres con prostatitis. Las cepas aisladas de cistitis presentaron una mayor frecuencia de detección de genes de virulencia, con los genes *fimH*, *papD*, *sfa* y *uspA* presentes en el 100% de las cepas. El serotipo O25:H4-ST131 se detectó en 87.5% de las cepas aisladas de cistitis, y ambos grupos presentaron multiresistencia a antibióticos.

4. METODOLOGÍA

4.1 Obtención de las cepas

Para el desarrollo de este estudio se obtuvo el consentimiento informado de 321 pacientes que acudieron a la clínica oficial No. 64 del IMSS, Unidad Tequesquihuac y al hospital No. 72 del IMSS, Unidad Tlalnepantla, Estado de México por presentar signos y síntomas de ISTU, como enrojecimiento, ardor, disuria, etc, durante el periodo de septiembre del 2014 a enero del 2015. Las muestras de orina se sembraron en agar sangre (Bioxon, México), Eosina Azul de Metileno (EMB, Bioxon, México) y S-110 (Bioxon, México), y se incubaron a 37°C por 24 horas.

4.2 Identificación primaria de *E. coli* por pruebas bioquímicas

A partir de los cultivos puros las cepas fueron identificadas como *E. coli* mediante las pruebas bioquímicas de indol, Kligler, manitol, citrato y urea.

4.3 Extracción de DNA bacteriano

Se realizó la extracción del DNA genómico de las cepas de *E. coli* mediante el método de ebullición descrito por Ooka *et al.*, en el 2009. De cada cepa se tomó una colonia con un asa de siembra estéril y se depositó en un tubo de rosca de 16x150 con 2 ml de agua desionizada estéril. La muestra se mezcló vigorosamente en vortex durante 20 seg y se llevó a ebullición durante 20 min, posteriormente se colocó en hielo durante 10 min y se centrifugó en un tubo eppendorf de 1.5 ml a 14 000 rpm durante 10 min. Al terminar se desechó la pastilla y se rescató el sobrenadante, que contenía el DNA genómico y se almacenó a -20°C.

4.4 Identificación de *E. coli* por PCR

La identificación de las cepas de *E. coli* se realizó mediante PCR de punto final utilizando el kit KAPA Taq ReadyMix PCR y un par de oligonucleótidos para amplificar el gen 16S rRNA descritos por Li *et al.*, 2010 (Tabla 2). Para un volumen final por mezcla de reacción de 20 µl se agregaron los siguientes componentes; 1µl de cada oligonucleótido wl-3110 y wl-3111 (5 pmol), 10 µl de KAPA Taq, 5 µl de agua libre de nucleasas y 3 µl (20 ng) de DNA genómico. La amplificación se realizó bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95°C por 5 min,

seguida de 30 ciclos de amplificación (desnaturalización a 95°C por 5 min, alineación a 55°C por 1 min y extensión a 72°C por 1 min). Finalmente se realizó una extensión final a 72°C por 5 min. La cepa ATCC 11775 de *E. coli* fue utilizada como control positivo.

Tabla 2. Secuencia de los oligonucleótidos empleados para amplificar el gen 16S rRNA (Li, *et al.*, 2010).

Gen blanco	Nombre	Secuencia (5'-3')	Tamaño del producto (pb)
16S rRNA	wl-3110	AGAGTTTGATCMTGGCTAG	919
	wl-3111	GGCTCAATTTGAGTTT	

4.5 Identificación de los serogrupos por PCR

La identificación de los serogrupos en las cepas de *E. coli* se realizó mediante dos grupos de PCR multiplex utilizando el kit KAPA Taq ReadyMix PCR y los oligonucleótidos descritos por Li *et al.*, 2010 (Tabla 3). El primer ensayo de PCR multiplex (grupo 1) fue diseñado para identificar los serogrupos O1, O6, O7, O8, O16, O21 y O75 y el segundo ensayo para los serogrupos O2, O4, O15, O18, O22, O25 y O83. El volumen final de la mezcla de reacción de cada grupo fue de 27 µl: 1 µl de cada grupo de oligonucleótidos (5 pmol), 10 µl de KAPA Taq y 3 µl (20 ng) de DNA genómico. La amplificación se realizó bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95°C por 5 min, seguida de 30 ciclos de amplificación (desnaturalización a 95°C por 30 segundos, alineación a 55°C por 1 min y extensión a 72°C por 1 min). Finalmente una extensión final a 72°C por 5 min.

4.6 Análisis de las muestras amplificadas por PCR

Después de la amplificación del DNA, 5 µl de cada muestra fueron analizados en geles de agarosa al 2% teñidos con Midori Green, bajo las siguientes condiciones: 120 volts, 94 miliAmp por 120 min. Los geles fueron fotografiados bajo luz UV utilizando el sistema de fotodocumentación modelo GEL LOGIC 100 (KODAK).

4.7 Infección del cultivo celular A431 con *E. coli*: Preparación del inóculo bacteriano

Para la infección de la línea celular A431 se prepararon diluciones de las cepas de *E. coli*. Para lo cual las cepas fueron sembradas en tubos con 2 ml de agar BHI

(infusión cerebro corazón, Bioxon) y se incubaron por 24 h a 37°C en agitación constante. Posteriormente se realizaron diluciones 1:5 de los cultivos hasta alcanzar una absorbancia de 0.4 a 600 nm, lo que correspondió a una concentración de 1×10^9 células.

Tabla 3. Secuencia de los oligonucleótidos empleados en la identificación de los serogrupos (Li, *et al.*, 2010).

Serogrupo	Gen blanco	Nombre	Secuencia (5'-3')	Tamaño del producto (pb)
GRUPO 1				
O1	wzx	wl-14632	GTGGCAAAGTGAAATAAGGAACG	1098
		wl-14633	CGCTGATACGAATACCATCCTAC	
O6	wzy	wl-14646	GGATGACGATGTTTTGGCTAAC	783
		wl-14647	TCTGGGTTTGTGTGTATGAGGC	
O7	wzx	wl-14648	CTATCAAAATACCTCTGCTGGAATC	610
		wl-14649	TGGCTTCGAGATTAAACCTATTCT	
O8	orf469	wl-14652	CCAGAGGCATAATCAGAAATAACAG	448
		wl-14653	GCAGAGTTAGTCAACAAAAGGTCAG	
O16	wzx	wl-14654	GGTTTCAATCTCACAGCAACTCAG	302
		wl-14655	GTTAGAGGGATAATAGCCAAGCGG	
O21	wzx	wl-14676	CTGCTGATGTCGCTATTATTGCTG	209
		wl-14677	TGAAAAAAGGGAAACAGAAGAGCC	
O75	wzy	wl-14413	GAGATATACATGGGGAGGTAGGCT	511
		wl14414	ACCCGATAATCATATTCTTCCAAC	
GRUPO 2				
O2	wzy	wl-14636	AGTGAGTTACTTTTTAGCGATGGAC	770
		wl-14637	AGTTTAGTATGCCCTGACTTTGAA	
O4	wzx	wl-14642	TTGTTGCGATAATGTGCATGTTCC	664
		wl-14643	AATAATTTGCTATACCCACACCCTC	
O15	wzy	wl-14672	TCTTGTTAGAGTCATTGGTGTATCG	183
		wl-14673	ATAAACGAGCAAGCACCACACC	
O18	wzx	wl-14656	GTTCCGGTGGTTGGATTACAGTTAG	551
		wl-14657	CTACTATCATCCTCACTGACCACG	
O22	wzx	wl-14660	TTCATTGTCGCCACTACTTTCCG	468
		wl-14661	GAAACAGCCCATGACATTACTACG	
O25	wzy	wl-14666	AGAGATCCGTCTTTATTTGTTTCGC	230
		wl-14667	GTTCTGGATACCTAACGCAATACCC	
O83	wzx	wl-14668	GTACACCAGGCAAACCTCGAAAG	362
		wl-14669	TTCTGTAAGCTAATGAATAGGCACC	

4.8 Infección del cultivo celular A431 con *E. coli*: Inoculación

Para promover la expresión de los marcadores de virulencia un inóculo de 50 μ l del cultivo bacteriano se depositó sobre la superficie del cultivo celular (línea *HVE A431*). Las placas con la línea celular infectada fueron incubadas a 37°C por 48 h con 5% CO₂ y saturación de humedad.

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

Las bacterias fueron recolectadas de la superficie del cultivo de la línea celular tomando 300 μ l de cada pozo y depositándola en tubos eppendorf de 1.5 ml. Los tubos se centrifugaron a 8000 rpm durante 5 min, posteriormente se decantó totalmente el sobrenadante y se agregaron 500 μ l de buffer PBS para lavar las células. Los tubos se agitaron en un vortex vigorosamente para resuspender la pastilla y se centrifugaron nuevamente a 8000 rpm durante 5 min. El sobrenadante se decantó conservando solo la pastilla para la extracción de RNA.

4.10 Extracción de RNA de las cepas UPEC

La extracción total de RNA se realizó con el MiniKit RNeasy (Qiagen, Hilden, Germany) utilizando el equipo robotizado QIAcube (Figura 6). Después de alimentar el QIAcube con los diferentes reactivos del kit RNeasy, el equipo robotizado adicionó 100 μ l de buffer TE a cada tubo con la pastilla celular bacteriana. Los tubos fueron agitados para lisar las paredes celulares. El TE se preparó mediante una solución de 10 Mm Tris-Cl y 1 Mm de EDTA con pH de 8 y 1.5 mg/ml de lisozima. Posteriormente el robot QIAcube adicionó 350 μ l de buffer RLT que contenía 100 μ l/ml de β -mercaptoetanol, para la inactivación de RNAsas y ayudar a la unión del RNA a la membrana de sílica. Al término el equipo adicionó 350 μ l de etanol al 70% para homogeneizar el lisado, mezcló suavemente los tubos y se transfirió 700 μ l de la mezcla a una columna contenida en un tubo de 2 ml, centrifugó los tubos a 10 000 rpm durante 15 seg y el líquido de flujo fue desechado. Después adicionó 700 μ l del buffer de lavado RW1 a la columna, para la eliminación de biomoléculas no deseadas como carbohidratos, proteínas, ácidos grasos, etc., y centrifugó a 10 000 rpm durante 15 seg y el líquido de flujo fue desechado. Al término el robot adicionó 500 μ l de buffer RPE a la columna y centrifugó a 10 000 rpm durante 15 seg para lavar la membrana, el líquido de flujo fue desechado. Nuevamente, adicionó 500 μ l de buffer RPE a la columna y centrifugó a 10 000 rpm durante 2 min para lavar la membrana y remover restos de sales, el líquido de flujo se descartó. Al término el robot movió y depositó la columna en un tubo colector nuevo de 2 ml y centrifugó a máxima velocidad durante 1 min. Volvió a colocar la columna en un tubo colector nuevo de 1.5 ml y

adicionó 30 μ l de agua libre de RNAsas directamente sobre la membrana de la columna y centrifugó a 10 000 rpm durante 1 min para obtener el RNA. La concentración total del RNA se midió utilizando el espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). El RNA es muy inestable, por lo que inmediatamente se realizó la reversotranscripción a cDNA.

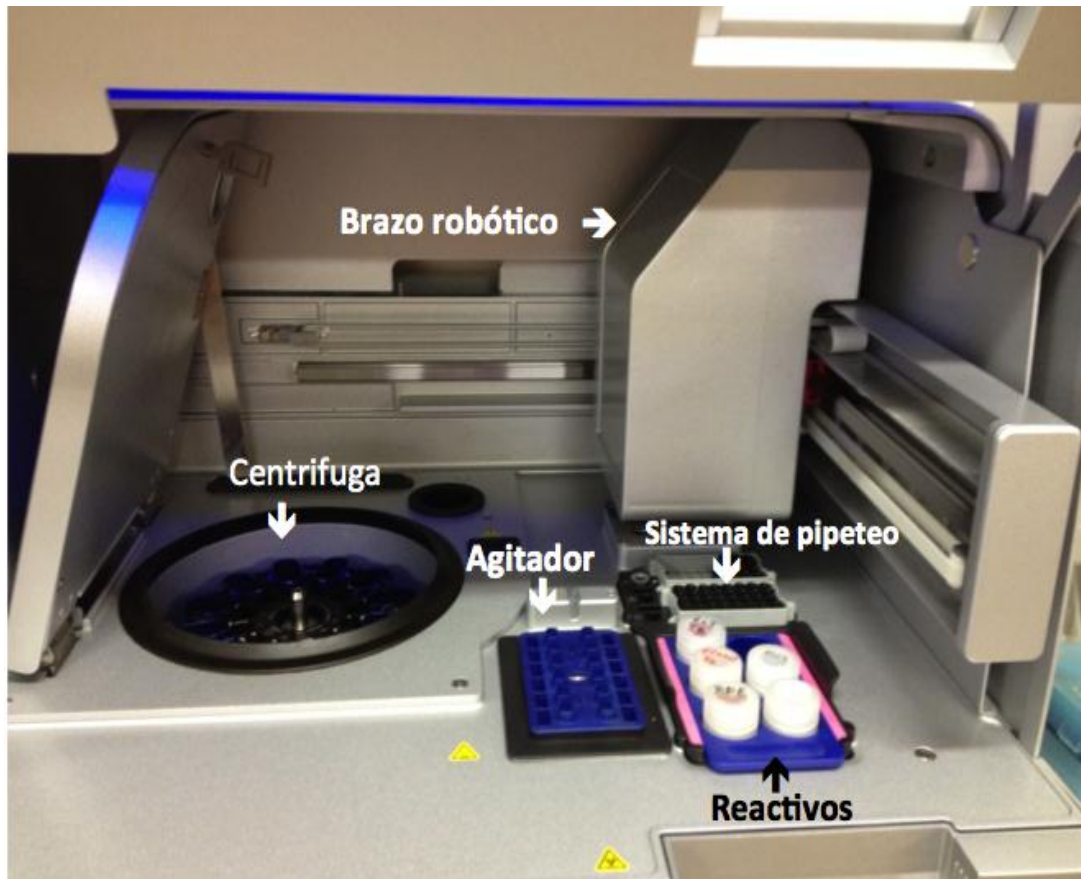


Figura 6. Interior del equipo QIAcube. Esta tecnología combina las propiedades selectivas de unión a una membrana a base de sílica con la velocidad del microspin. Un sistema de buffer alto en sal permite a más de 100 μ g de RNA mayor a 200 bases unirse a la membrana, por lo que el proceso proporciona enriquecimiento para mRNA, ya que los RNA de menor tamaño, como rRNA o tRNA, son selectivamente excluidos.

4.11 Reversotranscripción

Para el proceso de la reversotranscripción del RNA a cDNA se utilizó el kit comercial QuantiTec Reverse transcription (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante de la siguiente manera:

Eliminación de DNA genómico: Con el fin de asegurar que el RNA se encontraba libre de DNA se realizó la eliminación de DNA genómico para lo cual se depositó en un tubo eppendorf de 0.2 ml cada uno de los siguientes componentes (Tabla 4) para un volumen final por reacción de 19 μ l.

Tabla 4. Componentes de reacción para la eliminación del DNA genómico.

Componente	Volumen/reacción	Concentración final
gDNA Wipeout buffer 7x	2 μ l	1x
RNA templado	10 μ l	-
Agua libre de RNAsa	7 μ l	-
Volumen total	19 μ l	-

Posteriormente se incubó a 42°C durante 2 min, e inmediatamente se colocó en hielo.

Reversotranscripción: Se preparó la mezcla de reacción en un tubo eppendorf de 0.2 ml con todos los componentes necesarios para la síntesis de la primera cadena de cDNA (Tabla 5) para un volumen final de reacción de 20 μ l.

Tabla 5. Componentes de reacción para la reversotranscripción.

Componente	Volumen/reacción	Concentración final
Quantiscript Reverse Transcriptasa (contiene inhibidor de RNAsa)	1 μ l	-
Quantiscript RT buffer 5x (incluye Mg^{2+} y dNTPs)	4 μ l	1x
RT Primer mix	1 μ l	-
RNA templado (obtenido de la reacción anterior)	14 μ l	-
Volumen total	20 μ l	-

Posteriormente se mezcló suavemente el tubo, se mantuvo en hielo por 5 min y se incubó a 42°C por 15 min. Para inactivar la transcriptasa reversa el tubo se incubó a 95°C durante 3 min. La concentración total del cDNA se midió utilizando un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). Finalmente el cDNA obtenido se almacenó a -20°C hasta su utilización para PCR en tiempo real.

4.12 Expresión de los marcadores de virulencia por PCR en Tiempo Real

Para determinar la expresión de los genes de adherencia (*pap*, *papGI*, *papGII*, *papGIII*, *sfa*, *afa*, *fim*, *iha*), de sistemas de adquisición de hierro (*iuc*, *iroN*, *irp2*), de toxinas (*tsh*, *cnf1*, *usp*, *hlyA*, *vat*, *iss*, *cva*, *set-1*, *astA*, *pic*) y de protectinas (*kpsMT*, *ompT*) (Tabla 6) se utilizó el aparato de PCR en Tiempo Real Corbette (Rotor Gene). El volumen final por mezcla de reacción fue de 20 µl; 10 µl KAPPA SYBR FAST qPCR, 1 µl de oligonucleótido Forward, 1 µl de oligonucleótido Reverse, 7 µl de agua libre de nucleasas y 1 µl de cDNA. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: activación inicial a 95°C por 3 min, seguida de 40 ciclos de amplificación (desnaturalización a 95°C por 30 seg, alineación a 57°C por 30 seg y extensión a 72°C por 20 seg). El control interno para cada ensayo fue el gen 16SrRNA. La melting point se realizó en cada corrida de PCR en Tiempo Real.

Tabla 6. Secuencia de los oligonucleótidos empleados para la detección de expresión de los marcadores de virulencia en las cepas UPEC.

Gen	Nombre	Secuencia 5'-3'	Referencia
ADHESINAS			
<i>pap</i>	pap3	GCAACAGCAACGCTGGTTGCATCAT	Yamamoto <i>et al.</i> , 1995
	pap4	AGAGAGAGCCACTCTTATACGGACA	
<i>sfa</i>	sfa1	CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC	Le Bouguenec <i>et al.</i> , 1992
	sfa2	CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA	
<i>afa</i>	afa1	GCTGGGCAGCAAACCTGATAACTCTC	Le Bouguenec <i>et al.</i> , 1992
	afa2	CATCAAGCTGTTTGTTCCGTCGCGCCG	
<i>fim</i>	fim1	GAGAAGAGGTTTGATTTAACTTATTG	Struve, Krogfelt, 1999
	fim2	AGAGCCGCTGTAGAACTGAGG	
<i>papGI</i>	papGJ96-F	TCGTGCTGAGGTCCGGAATTT	Johnson, Brown, 1996
	papGJ96-R	TGGCATCCCCAACATTATCG	
<i>papGII</i>	papGIA2-F	GGGATGAGCGGGCCTTTGAT	Johnson, Brown, 1996
	papGIA2-R	CGGGCCCCAAGTAACTCG	
<i>papGIII</i>	prsJ96-F	GGCCTGCAATGGATTTACCTGG	Johnson, Brown, 1996
	prsJ96-R	CCACCAAATGACCATGCCAGAC	
<i>iha</i>	IHA-F	CTGGCGGAGGCTCTGAGATCA	Johnson <i>et al.</i> , 2000
	IHA-R	TCCTTAAGCTCCCGCGGCTGA	

Tabla 6 (continuación).

Gen	Nombre	Secuencia 5'-3'	Referencia
TOXINAS			
tsh	Tsh-F	ACTATTCTCTGCAGGAAGTC	Ewers <i>et al.</i> , 2005
	Tsh-R	CTTCCGATGTTCTGAACGT	
cnf1	cnf1	AAGATGGAGTTTCCTATGCAGGAG	Yamamoto <i>et al.</i> , 1995
	cnf2	TGGAGTTTCCTATGCAGGAG	
hlyA	hly1	AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT	Yamamoto <i>et al.</i> , 1995
	hly2	ACCATATAAGCGGTCATTCCCCTCA	
usp	usp-F	ACATTCACGGCAAGCCTCAG	Bauer <i>et al.</i> , 2002
	usp-R	AGCGAGTTCCTGGTGAAAGC	
iss	Iss-F	ATCACATAGGATTCTGCCG	Ewers <i>et al.</i> , 2005
	Iss-R	CAGCGGAGTATAGATGCCA	
vat	Vat-F	TCCTGGGACATAATGGTCAG	Ewers <i>et al.</i> , 2005
	Vat-R	GTGTCAGAACGGAATTGT	
cva	Cva-F	TGGTAGAATGTGCCAGAGCAAG	Ewers <i>et al.</i> , 2005
	Cva-R	GAGCTGTTTGTAGCGAAGCC	
set-1	set-1-F	GTGAACCTGCTGCCGATATC	Soto <i>et al.</i> , 2009
	set-1-R	ATTTGTGGATAAAAATGACG	
astA	astA-F	ATGCCATCAACACAGTATAT	Soto <i>et al.</i> , 2009
	astA-R	GCGAGTGACGGCTTTGTAGT	
pic	Pic-F	ACTGGATCTTAAGGCTCAGGAT	Soto <i>et al.</i> , 2009
	Pic-R	GACTTAATGTCACTGTTTCAGCG	
SISTEMAS DE ADQUISICIÓN DE Fe			
iuc	iuc1	ATGAGAATCATTATTGACATAATTG	Tivendale, 2000
	iuc2	CTCACGGGTGAAAATATTTT	
iroN	IRONEC-R	AAGTCAAAGCAGGGGTTGCCCG	Johnson <i>et al.</i> , 2000
	IRONEC-R	GACGCCGACATTAAGACGCAG	
irp2	Irp2-F	AAGGATTCGCTGTTACCGGAC	Ewers <i>et al.</i> , 2005
	Irp2-R	AACTCCTGATACAGGTGGC	
PROTECTINAS			
kpsMT	kpsM481F	CCATCGATACGATCATTGCACG	Kanamaru <i>et al.</i> , 2003
	kpsM481R	ATTGCAAGGTAGTTCAGACTCA	
ompT	ompT-F	ATCTAGCCGAAGAAGGAGGC	Johnson <i>et al.</i> , 2000
	ompT-R	CCCGGGTCATAGTGTTTCATC	

4.13 Efecto de la temperatura y la concentración de CO₂ durante la infección *in vitro* de la línea celular A431 con *E. coli*

Con el propósito de establecer si las condiciones ambientales afectaban la expresión de los marcadores de virulencia de las cepas UPEC durante la infección *in vitro* de la línea A431, la temperatura y la concentración de CO₂ fueron modificadas (Tabla 7).

Tabla 7. Condiciones de incubación de las cepas de UPEC.

Factor	Grupo 1	Grupo 2
Temperatura	36°C	38°C
CO₂	3%	6%

4.14 Secuenciación de los amplicones de los genes de virulencia de las cepas de *E. coli* utilizadas como controles positivos en los ensayos de PCR en Tiempo Real

La secuenciación de los amplicones de cada uno de los genes en las cepas control de *E. coli* fue realizada en un secuenciador modelo 3130x1, ubicado en el laboratorio de Bioquímica Molecular, UBIPRO, FES Iztacala. Las secuencias de los nucleótidos fueron analizadas usando el programa Chromaspro 1.5 (Technelysium Pty Ltd). La identificación de los genes se realizó utilizando el BLAST en el NCBI (USA). El alineamiento de la secuencias se realizó por el Editor de alineamiento de secuencia BioEdit 7.0.5.2.

4.15 Análisis estadístico

Las frecuencias de expresión de los grupos de marcadores de virulencia entre los distintos serogrupos de cepas UPEC fueron analizadas por la prueba de χ^2 con $P < 0.005$.

5. RESULTADOS

5.1 Origen de las cepas analizadas

En este estudio se analizaron las cepas UPEC (n=194) previamente aisladas de pacientes que acudieron a la clínica oficial No. 64 del IMSS, Unidad Tequesquihuac y al hospital No.72 del IMSS, Unidad Tlalnepantla por presentar signos y síntomas de infección en las vías urinarias durante el periodo de septiembre de 2014 a enero de 2015. El 80.9% (n=157) de los pacientes correspondió a mujeres y el 19.1% (n=37) a hombres (Figura 7).

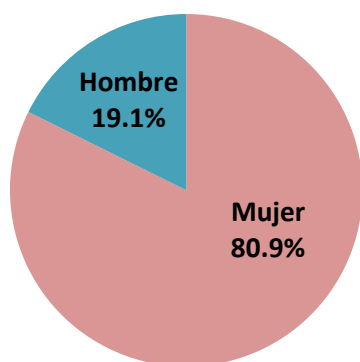


Figura 7. Distribución de los pacientes analizada por sexo.

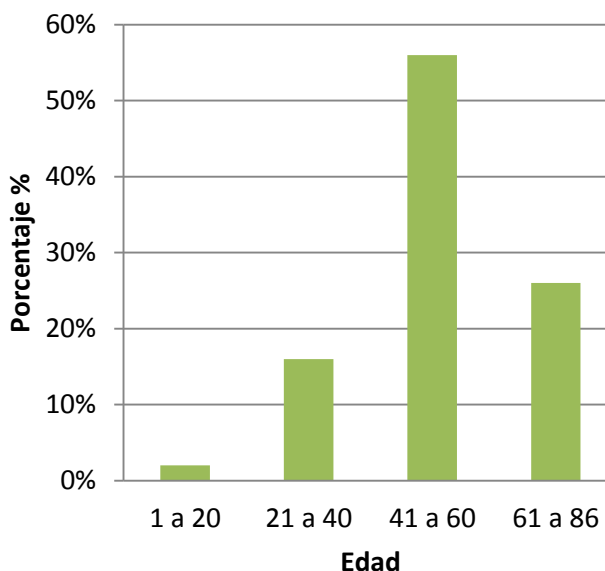


Figura 8. Distribución de los pacientes por edad.

La distribución de los pacientes según el rango de edad fue la siguiente: el 56% (n=86) presentó una edad comprendida en el intervalo de 41 a 60 años, el 26% (n=40) entre los 61 a 86 años, el 16% (n=24) entre los 21 a 40 años y 2% (n=4) entre 1 a 20 años. El 20% (n=40) de los pacientes no reportó su edad (Figura 8).

El diagnóstico más frecuente en los pacientes analizados fue infección en las vías urinarias (IsTU) con el 98% (n=190), seguido de pielonefritis con el 1% (n=2), mientras que el lupus eritematoso y litiasis renal tuvieron el 0.5% (n=1) para cada caso (Tabla 8).

Tabla 8. Diagnósticos de los pacientes origen de las cepas.

Diagnóstico	No.	%
Infección en vías urinarias	190	98
Pielonefritis	2	1
Lupus eritematoso	1	0.5
Litiasis renal	1	0.5

5.2 Identificación primaria de *E. coli* mediante pruebas bioquímicas

Las 194 cepas analizadas mediante pruebas bioquímicas arrojaron los resultados típicos de *E. coli* (Tabla 9).

Tabla 9. Resultados de las pruebas bioquímicas en *E. coli*.

Prueba	<i>E. coli</i>
Indol	Positivo (+)
Kligler	Positivo (+)
Manitol	Negativo (-)
Citrato	Negativo (-)
Urea	Negativo (-)

5.3 Identificación de *E. coli* por PCR

Las 194 cepas de *E. coli* se identificaron molecularmente por la presencia del gen *16S rRNA* (Figura 9).

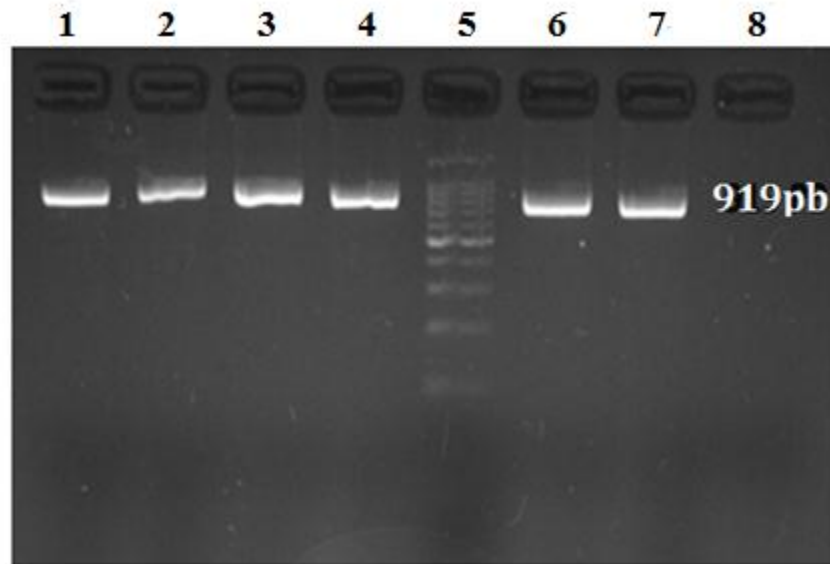


Figura 9. Detección del gen *16S rRNA* por PCR. Carriles 1-4 y 6, gen *16S rRNA* (amplicón de 919pb) en cepas clínicas identificadas como *E. coli* por pruebas bioquímicas; carril 5, MPM (100 pb); carril 7, control positivo (*E. coli* ATCC 11775); carril 8, control negativo (sin DNA molde).

5.4 Expresión de los marcadores de virulencia de cepas UPEC

Se analizó la expresión de 23 genes de virulencia en las cepas de *E. coli*, de los cuales 23 fueron expresados de manera global después de la infección del cultivo de la línea celular A 431 (Tabla 10, figura 10). El gen expresado con mayor frecuencia fue *usp* con un 68% (n=106), seguido de los genes *iha* con un 65% (n=126) y *kpsMT* con un 61.3% (n=119); mientras que los de menor frecuencia fueron *pap* con 0.5% (n=1), *cva* (1.5%) y *pic* (2.1%) (ver Figuras 11-58 de PCR en Tiempo Real en el Anexo 1). El gen *cnf1* no fue expresado por ninguna de las cepas.

Tabla 10. Frecuencia de detección y expresión de los marcadores de virulencia de las cepas UPEC. La detección de los marcadores de virulencia de las cepas UPEC fue reportada recientemente por Paniagua *et al.*, (2015).

Gen	Frecuencia de detección		Frecuencia de expresión	
	No.	%	No.	%
ADHESINAS				
<i>iha</i>	127	65.5	126	65
<i>fim</i>	119	61.3	113	58.2
<i>pap</i>	48	24.7	1	0.5
<i>papGI</i>	24	12.4	8	4.1
<i>papGII</i>	42	21.6	30	15.5
<i>papGIII</i>	12	6.2	11	5.7
<i>afa</i>	25	12.9	24	12.4
<i>sfa</i>	24	12.4	5	2.6
TOXINAS				
<i>usp</i>	169	87.1	132	68
<i>set-1</i>	70	36.1	61	31.4
<i>astA</i>	65	33.5	60	31
<i>hlyA</i>	30	15.5	23	11.9
<i>cnf1</i>	15	7.7	0	0
<i>pic</i>	5	2.6	4	2.1
<i>tsh</i>	10	5.1	5	2.6
<i>iss</i>	8	4.1	8	4.1
<i>vat</i>	11	5.7	11	5.7
<i>cva</i>	9	4.6	3	1.5
SISTEMAS DE ADQUISICIÓN DE Fe				
<i>iuc</i>	32	16.5	6	3.1
<i>iroN</i>	23	11.9	20	10.3
<i>irp2</i>	154	79.4	95	49
PROTECTINAS				
<i>kpsMT</i>	179	92.3	119	61.3
<i>ompT</i>	20	10.3	19	9.8

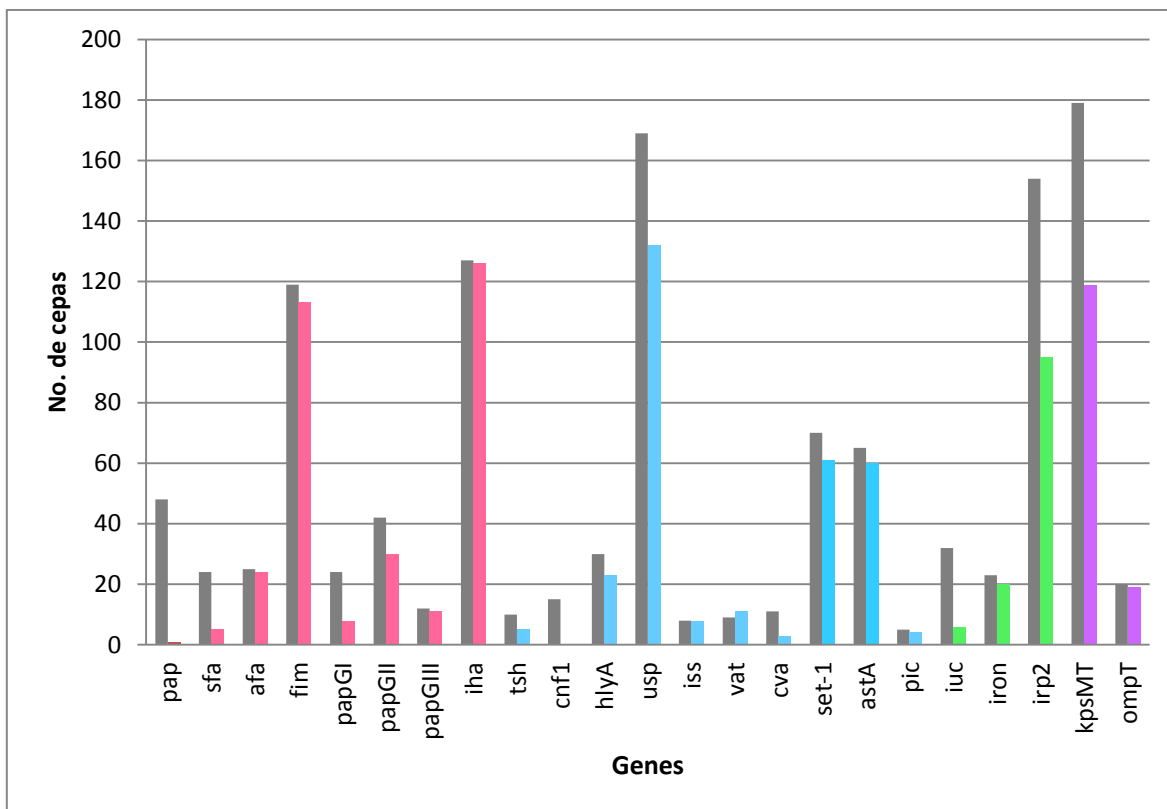


Figura 10. Detección (gris) y expresión (rosa: adhesinas; azul: toxinas; verde: sistemas de adquisición de hierro; morado: protectinas) de los marcadores de virulencia en las cepas UPEC.

5.5 Patrones de expresión de los genes de virulencia

Se identificaron 54 diferentes patrones de expresión de los marcadores de virulencia en las cepas UPEC, dentro de los cuales el patrón no. 1 se encontró representado por 22 cepas (11.3%), seguido por el patrón no. 2 con 11 cepas (5.6%) (Tabla 11). También se encontró que 8 cepas expresaron un solo gen y 2 cepas no expresaron ninguno.

Tabla 11. Patrones de expresión de los marcadores de virulencia de las cepas UPEC (n=194).

No	Patrones de expresión	Frecuencia		No	Patrones de expresión	Frecuencia	
		No.	%			No.	%
1	<i>fim/iha/usp/irp2/kpsMT</i>	22	11.3	28	<i>iha/set-1/kpsMT</i>	2	1
2	<i>iha/usp/kpsMT</i>	11	5.6	29	<i>fim/iha/irp2</i>	2	1
3	<i>iha/usp/irp2/kpsMT</i>	10	5.1	30	<i>fim/usp/kpsMT</i>	2	1
4	<i>fim/usp/irp2/kpsMT</i>	10	5.1	31	<i>fim/astA/kpsMT</i>	2	1
5	<i>fim/iha/usp/set-1/irp2/kpsMT</i>	9	4.6	32	<i>fim/iha/kpsMT</i>	2	1
6	<i>fim/iha/usp/kpsMT</i>	9	4.6	33	<i>usp/set-1</i>	2	1
7	<i>iha/usp/set-1</i>	8	4.1	34	<i>iha/usp</i>	2	1
8	<i>iha/usp/set-1/kpsMT</i>	8	4.1	35	<i>fim/hlyA/astA</i>	1	0.5
9	<i>usp/irp2/kpsMT</i>	6	3.1	36	<i>fim/iha/set-1</i>	1	0.5
10	<i>fim/irp2/kpsMT</i>	4	2.1	37	<i>iha/set-1/irp2</i>	1	0.5
11	<i>fim/iha/usp/set-1</i>	4	2.1	38	<i>iha/irp2/kpsMT</i>	1	0.5
12	<i>fim/iha/usp</i>	4	2.1	39	<i>fim/usp/astA</i>	1	0.5
13	<i>fim/iha/irp2/kpsMT</i>	4	2.1	40	<i>fim/iha/hlyA</i>	1	0.5
14	<i>fim/iha/astA</i>	4	2.1	41	<i>fim/iss/ompT</i>	1	0.5
15	<i>fim/iha</i>	4	2.1	42	<i>set-1/kpsMT</i>	1	0.5
16	<i>fim/papGIII/set-1/irp2</i>	3	1.5	43	<i>set-1/irp2</i>	1	0.5
17	<i>usp/astA/kpsMT</i>	3	1.5	44	<i>kpsMT/ompT</i>	1	0.5
18	<i>fim/usp/irp2</i>	3	1.5	45	<i>set-1/iroN</i>	1	0.5
19	<i>afa/iha/usp</i>	3	1.5	46	<i>papGII/iha</i>	1	0.5
20	<i>iha/usp/astA</i>	3	1.5	47	<i>kpsMT/pc</i>	1	0.5
21	<i>iha/set-1/irp2/kpsMT</i>	3	1.5	48	<i>iha/irp2</i>	1	0.5
22	<i>usp/kpsMT</i>	3	1.5	49	<i>fim/set-1</i>	1	0.5
23	<i>fim/usp</i>	3	1.5	50	<i>irp2/kpsMT</i>	1	0.5
24	<i>fim/set-1/irp2</i>	3	1.5	51	<i>astA/irp2</i>	1	0.5
25	<i>fim/papGIII/irp2/kpsMT</i>	2	1	52	<i>iss/vat</i>	1	0.5
26	<i>hlyA/set-1/astA</i>	2	1	53	<i>iha/ompT</i>	1	0.5
27	<i>iha/usp/irp2</i>	2	1	54	<i>usp/astA</i>	1	0.5

5.6 Serogrupos en las cepas UPEC

Se detectaron 7 serogrupos distribuidos en 57 de las 194 cepas de *E. coli* analizadas, siendo O25 el más frecuente con 26 cepas (13.4%) (Tabla 12; ver Figuras 59-64 en el Anexo 2).

Tabla 12. Serogrupos identificados en las cepas UPEC.

Serogrupo	Frecuencia	
	No.	(%)
O25	26	13.4
O8	12	6.2
O15	7	3.6
O75	7	3.6
O6	2	1
O21	2	1
O7	1	0.5

5.7 Asociación entre patrones de expresión y serogrupos en las cepas UPEC

Se demostró que 23 de los 54 patrones de expresión identificados en las cepas UPEC se encontraron relacionados con al menos uno de los serogrupos identificados (Tabla 13). El patrón No. 1 (*fim/iha/usp/irp2/kpsMT*) fue representado por diez cepas asociadas a los serogrupos O25 (n=5), O8 (n=1), O15 (n=1) y O75 (n=3), mientras que el patrón No. 7 (*iha/usp/set-1*) fue representado por 5 cepas asociadas a los serogrupos O25 (n=2), O8 (n=1), O15 (n=1) y O21 (n=1).

Tabla 13. Asociación entre patrones de expresión y serogrupos identificados en las 194 cepas UPEC.

No.	Patrón	Serogrupos
1	<i>fim/iha/usp/irp2/kpsMT</i>	O25/O8/O15/O75
2	<i>iha/usp/kpsMT</i>	O8
4	<i>fim/usp/irp2/kpsMT</i>	O25/O75
5	<i>fim/iha/usp/set-1/irp2/ kpsMT</i>	O25/O75
6	<i>fim/iha/usp/kpsMT</i>	O25/O15
7	<i>iha/usp/set-1</i>	O25/O8/O15/O21
8	<i>iha/usp/set-1/kpsMT</i>	O25
9	<i>usp/irp2/kpsMT</i>	O8
11	<i>fim/iha/usp/set-1</i>	O25/O75
13	<i>fim/iha/irp2/kpsMT</i>	O8/O15
15	<i>fim/iha</i>	O8
17	<i>usp/astA/kpsMT</i>	O6
18	<i>fim/usp/irp2</i>	O7
19	<i>afa/iha/usp</i>	O25
21	<i>iha/set-1/irp2/kpsMT</i>	O75/O8
25	<i>fim/papGIII/irp2/kpsMT</i>	O25
29	<i>fim/iha/irp2</i>	O25
30	<i>fim/usp/kpsMT</i>	O15/O21
34	<i>iha/usp</i>	O25/O8
otros		O25/O8/O15/O6

5.8 Asociación entre serogrupos y los marcadores de virulencia expresados en las cepas UPEC

Se encontró de manera global que la mayoría de los serogrupos presentaron mayor frecuencia de expresión de los genes de adherencia *fim* e *iha*, seguido por los de hierro *irp2*, capsular *kpsMT* y toxinas *usp* y *set-1* (Tabla 14). El serogrupo O25 fue el que presentó mayor frecuencia de expresión de los marcadores de virulencia, seguido por el O8, O15 y O75.

Tabla 14. Número de cepas con la asociación de los marcadores de virulencia expresados en los distintos serogrupos de las cepas UPEC.

Serog.	O25	O8	O15	O75	O6	O21	O7
FV							
<i>pap</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>sfa</i>	1	-	-	-	1	-	-
<i>afa</i>	6	2	-	-	-	1	-
<i>fim</i>	20	5	6	6	-	1	1
<i>papGI</i>	2	-	-	-	-	-	-
<i>papGII</i>	7	1	4	-	-	-	-
<i>papGIII</i>	1	-	-	-	-	-	-
<i>iha</i>	23	7	7	6	-	1	-
<i>tsh</i>	1	1	-	-	-	-	-
<i>cnf1</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>hlyA</i>	7	1	1	-	-	-	-
<i>usp</i>	22	7	4	6	2	2	1
<i>iss</i>	-	1	-	-	-	-	-
<i>vat</i>	1	-	-	1	-	-	-
<i>cva</i>	-	-	-	1	-	-	-
<i>set-1</i>	13	2	2	3	1	1	-
<i>astA</i>	7	5	1	2	1	1	-
<i>pic</i>	-	-	-	-	1	-	-
<i>iuc</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>iroN</i>	-	2	-	1	2	-	-
<i>irp2</i>	18	6	2	6	-	-	1
<i>kpsMT</i>	18	7	4	6	1	1	-
<i>ompT</i>	-	-	1	-	1	-	1

5.9 Efecto de la temperatura y la concentración de CO₂ durante la infección *in vitro* de la línea celular A431 con *E. coli*

El incremento y disminución de la temperatura y concentración de CO₂ durante la incubación de la línea celular infectada por *E. coli* no modificó la expresión de los marcadores de virulencia (Tabla 15).

Tabla 15. Número de cepas con los genes expresados durante la infección del cultivo de la línea celular A431, incubada a diferentes condiciones de temperatura y CO₂.

No.	Diagnóstico	Genes detectados	Genes expresados		
			CO ₂ = 5% Temp= 37°C	CO ₂ = 3% Temp= 36°C	CO ₂ = 6% Temp= 38°C
1	Infección en las vías urinarias	1	1 (<i>set-1</i>)	1 (<i>set-1</i>)	1 (<i>set-1</i>)
2		15	9 (<i>papGII</i> , <i>papGIII</i> , <i>iha</i> , <i>hlyA</i> , <i>vat</i> , <i>iroN</i> , <i>irp2</i> , <i>kpsMT</i> , <i>ompT</i>)	9 (<i>papGII</i> , <i>papGIII</i> , <i>iha</i> , <i>hlyA</i> , <i>vat</i> , <i>iroN</i> , <i>irp2</i> , <i>kpsMT</i> , <i>ompT</i>)	9 (<i>papGII</i> , <i>papGIII</i> , <i>iha</i> , <i>hlyA</i> , <i>vat</i> , <i>iroN</i> , <i>irp2</i> , <i>kpsMT</i> , <i>ompT</i>)
3	Pielonefritis	7	5 (<i>afa</i> , <i>papGIII</i> , <i>iha</i> , <i>usp</i> , <i>astA</i>)	5 (<i>afa</i> , <i>papGIII</i> , <i>iha</i> , <i>usp</i> , <i>astA</i>)	5 (<i>afa</i> , <i>papGIII</i> , <i>iha</i> , <i>usp</i> , <i>astA</i>)
4		6	5 (<i>iha</i> , <i>hlyA</i> , <i>usp</i> , <i>irp2</i> , <i>kpsMT</i>)	5 (<i>iha</i> , <i>hlyA</i> , <i>usp</i> , <i>irp2</i> , <i>kpsMT</i>)	5 (<i>iha</i> , <i>hlyA</i> , <i>usp</i> , <i>irp2</i> , <i>kpsMT</i>)

5.10 Genes de virulencia de las cepas de *E. coli* utilizadas como controles positivos.

En la Tabla 16 se observan los porcentajes de identidad de los diferentes genes de virulencia en las cepas de *E. coli* utilizadas como controles positivos en los ensayos de PCR en tiempo real. Los porcentajes de identidad de manera global para los marcadores genéticos fueron satisfactorios.

Tabla 16. Confirmación de identidad de los genes de virulencia de las cepas de *E. coli* utilizadas como controles positivos.

No.	Gen	Función	Identidad (%)	ID secuencia
1	<i>iron</i>	Receptor de sideróforo de hierro salmoquelina	99	AF185597.1
2	<i>iuc</i>	Sintasa de aerobactina	85	CP018957.1
3	<i>vat</i>	Toxina vacuolante autotransportadora	95	KR094950.1
4	<i>hlyA</i>	Hemolisina α	99	M10133.1
5	<i>pic</i>	Proteína involucrada en la colonización intestinal	95	KT362219.1
6	<i>tsh</i>	Hemaglutinina sensible a la temperatura	94	KU749303.1
7	<i>papA</i>	Pili asociado a la pielonefritis	96	AF051813.1
8	<i>iha</i>	Adhesina homóloga de IrgA	98	DQ211582.1L
9	<i>afa</i>	Fimbria S	97	KR338832.1
10	<i>fim</i>	Fimbria tipo 1	99	948838
11	<i>usp</i>	Proteína uropatógena específica	98	12667877
12	<i>set-1</i>	Enterotoxina 1 de <i>Shigella</i>	96	12885518
13	<i>astA</i>	Arginina succinil transferasa	98	946261
14	<i>irp2</i>	Yersiniabactin	99	L18881
15	<i>kpsMT</i>	Capsular	97	7155335

5.11 Análisis estadístico

La frecuencia de expresión de los distintos grupos de genes de virulencia (adhesinas, toxinas, sistemas de adquisición de hierro y protectinas) expresados en las cepas UPEC fue igual en todos los serogrupos ($p < 0.05$).

6. DISCUSIÓN

6.1 Infecciones en el tracto urinario

E. coli es uno de los microorganismos más frecuentemente involucrados en las infecciones del tracto urinario (IsTU), se estima que la frecuencia ocurre en el 50-80% (Tarchouna *et al.*, 2013), lo que representa un problema de salud pública importante (Zhanet *et al.*, 2006). La severidad de las infecciones en el tracto urinario depende en gran medida de los múltiples factores de virulencia que presentan las cepas de *E. coli* uropatógena (UPEC), así como de la susceptibilidad del hospedero (Paniagua-Contreras *et al.*, 2017). En este estudio se analizaron 194 cepas bacterianas previamente aisladas de pacientes con infecciones del tracto urinario identificadas como *E. coli* (Figura 9). La mayoría de las cepas de *E. coli* fueron aisladas de mujeres (80.9%; Figura 7). Se ha demostrado que la incidencia de las IsTU es cerca de cuatro veces mayor en mujeres que en hombres, esto se atribuye principalmente a la menor longitud de la uretra en mujeres, lo que hace posible que los colonizadores bacterianos alcancen la vejiga más fácilmente antes de ser removidos por el flujo de orina (Foxman, 2010).

6.2 Expresión de los marcadores de virulencia de las cepas UPEC

6.2.1 Adhesinas

La presencia de adhesinas en cepas UPEC es considerada el factor de patogenicidad más importante, ya que pueden contribuir a la virulencia en diferentes formas, ya sea desencadenando directamente las vías de señalización del hospedero, facilitando la distribución de otros productos bacterianos a los tejidos del hospedero y promoviendo la invasión bacteriana (Mulvey, 2002). En este estudio después de la infección del cultivo de la línea celular A431, el gen *iha* (adhesina homóloga de IrgA) se expresó en el 65% (n=126) de las cepas UPEC estudiadas (Tabla 10, Figuras 10, 13-14). La adhesina homóloga de IrgA (*iha*), en cultivo celular, confiere la habilidad de unirse a las células T-24 (originadas de vejiga humana) (Johnson *et al.*, 2005a), y se ha reportado que la adherencia a estas células es independiente de las adhesinas asociadas a infecciones del tracto urinario conocidas, como son la fimbria tipo 1 (*fim*), el pili P (*pap*), la fimbria S (*sfa*), o la adhesina afimbrial (*afa*) (Miyazaki *et al.*, 2002), además de que la mutación de este gen atenúa significativamente la urovirulencia en la cepa CFT073 (Torres *et al.*, 2001), lo que sugiere que esta proteína de adhesión juega un papel importante durante el desarrollo de las infecciones de tracto urinario por

UPEC. Por otra parte, en un estudio de expresión global realizado en cepas obtenidas de pacientes con bacteriuria asintomática se encontró que los genes que codifican adhesinas fueron poco expresados, a excepción del gen *iha*, el cual fue significativamente sobre expresado (Roos y Klemm, 2006), lo que indica que es probable que esta proteína de adhesión no desencadene la respuesta del sistema inmune del hospedero, lo que permite a las cepas de *E. coli* causantes de bacteriuria asintomática residir en el tracto urinario en este estado parecido al comensalismo.

La fimbria tipo 1 es uno de los principales factores de colonización del tracto urinario, ya que es responsable de regular las condiciones de osmolaridad y pH durante el crecimiento de UPEC (Schwan *et al.*, 2002), es indispensable para el desarrollo de comunidades bacterianas intracelulares (Martinez *et al.*, 2000; Mysorekar y Hultgren, 2006) y durante los primeros pasos del desarrollo de la biopelícula (Ulett *et al.*, 2007). En este estudio se encontró que el gen *fim* (fimbria tipo 1) se expresó en el 58.2% de las cepas de *E. coli* (Tabla 10, Figuras 10, 15-16), lo que hace evidente la gran capacidad que tienen estas cepas para formar reservorios dentro de las células del hospedero y evadir la respuesta inmune mediante la formación de biopelícula. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Snyder *et al.*, en el 2004 durante el modelo experimental *in vivo* de infección en el tracto urinario en ratón, donde *fimA* (que pertenece al locus de genes que codifican la fimbria tipo 1) fue sobre expresado, igual que los otros genes pertenecientes al operón *fim* (Snyder *et al.*, 2004). Del mismo modo se sabe que la alta expresión de los genes que codifican para la fimbria tipo 1, dado su papel en la formación de biopelículas, está principalmente relacionada a cepas que ocasionan cistitis sobre las que provocan pielonefritis (Tabasi *et al.*, 2015).

En este estudio se encontró que el alelo *papGII* se expresó en el 15.5% (n=30; Tabla 10, Figuras 10, 21-22) de las cepas UPEC, mientras que la expresión de los alelos *papGIII* (5.7%) y *papGI* (4.1%) fue más baja (Tabla 10. Figuras 10, 23-24, 17-18). La expresión de estos alelos de *pap* no había sido estudiada en modelos *in vivo* o *in vitro*; sin embargo se han descrito porcentajes de detección para cepas UPEC del 8.1% (n=10) para *papGI* y del 50.4% (n=62) para *papGIII* (Momtaz, 2013). *papGII* ha sido asociado con pielonefritis y bacteriemia, mientras que *papGIII* con cistitis, aunque se ha encontrado en pielonefritis y bacteriemia (Féria *et al.*, 2001; Johnson *et al.*, 1998). Existe evidencia de interlocución regulatoria entre las fimbrias tipo 1 (*fim*) y el pili P (*pap*); la expresión constitutiva de la fimbria tipo 1 permite la regulación a la baja de la expresión de los genes del pili P (Snyder *et al.*, 2005), lo que explicaría la gran diferencia en la expresión de los genes *pap* (0.5%) y *fim* (58.2%) en las cepas reportadas en este estudio (Tabla 10, Figuras 10, 13-14 y 19-20).

Las cepas UPEC que expresan adhesinas de la familia Afa (adhesina afimbrial) muestran una fuerte afinidad por el tejido renal (Lalioui y Le Bouguénec, 2002), y en este estudio la frecuencia de expresión del gen *afa* fue solo de 12.4% (Tabla 10, Figuras 10, 25-26), lo cual se podría atribuir al origen vaginal de la línea celular A431.

El porcentaje del gen *sfa* (fimbria S) identificado previamente en estas cepas UPEC fue del 12.4% (Paniagua-Contreras *et al.*, 2015), mientras que la expresión de *sfa* en este estudio fue del 2.6% (Tabla 10, Figuras 10, 27-28). La expresión de *sfa* no se ha estudiado en cepas UPEC; sin embargo, el porcentaje de detección descrito de este gen ha sido del 15.6% (n=10) en cepas UPEC aisladas de niños con infecciones del tracto urinario (Yun *et al.*, 2014).

6.2.2 Toxinas

Los patógenos bacterianos producen toxinas que provocan daños celulares en los tejidos del hospedero. El gen *usp*, que forma parte del operón que codifica la proteína uropatógena específica, se expresó en 68% (n=132) (Tabla 10, Figuras 10, 29-30) de las cepas analizadas y está presente en 23 de los 54 patrones de expresión identificados (Tabla 11). Además de su actividad como genotoxina se ha encontrado que la proteína uropatógena específica (*usp*) promueve la infectividad en un modelo murino de infección en el tracto urinario superior (Yamamoto *et al.*, 2001) y está asociada con cepas de *E. coli* que provocan pielonefritis, prostatitis y bacteremia (Rijavec *et al.*, 2008). En un estudio realizado en la ciudad de México en el que se analizaron cepas obtenidas de prostatitis y cistitis, se encontró una frecuencia de *uspA*, del 100% y del 64%, respectivamente (Morales-Espinosa *et al.*, 2016). La importante prevalencia del gen de la proteína uropatógena específica (*usp*) identificada en las cepas de *E. coli*, sugiere que este factor de virulencia tiene un papel fundamental en la patogenicidad durante las infecciones en el tracto urinario.

En este estudio se encontró que los genes de enterotoxinas *set-1* (enterotoxina de *Shigella-1*) y *astA* (toxina enteroagregativa termo estable 1) se expresaron en un gran número de cepas, 31.4% (n=61) y 31% (n=60), respectivamente (Tabla 10, Figuras 10, 31-32, 33-34), del mismo modo se encontró que están muy relacionados con los serogrupos identificados para *E. coli* uropatógena (Tabla 14). Se han realizado diferentes estudios de detección de estos genes de enterotoxinas en cepas UPEC, sin embargo las frecuencias son variadas, por ejemplo Momtaz *et al.* (2013b) en un estudio amplio de caracterización molecular de cepas UPEC, encontraron que el gen *set-1* se identificó en el 80% de las

cepas, mientras que el gen *astA* fue detectado en el 21%, por el contrario Mirzarazi *et al.*, (2015) encontraron porcentajes bajos para el gen *set-1* (1.3%) y para el gen *astA* (9.4%). Hasta el momento se desconoce cuál podría ser la acción de estas enterotoxinas durante las infecciones en el tracto urinario.

En este estudio se encontró una baja expresión del gen *hlyA*, que codifica la hemolisina α , (11.3%, Tabla 10, Figuras 10, 35-36) en las cepas de *E. coli*, mientras que el gen *cnf1*, que codifica el factor citotóxico necrotizante, no se expresó en ninguna de las cepas (Tabla 10). Se ha observado que la producción de hemolisina es más frecuente en las cepas UPEC aisladas de pacientes con pielonefritis que de otras infecciones de vías urinarias bajas (Tabasi *et al.*, 2015), lo que demostraría que la hemolisina podría contribuir a la severidad en las infecciones urinarias.

Los genes *pic* (proteína involucrada en la colonización intestinal) y *tsh* (hemaglutinina sensible a temperatura) se expresaron el 2.1% (n=4) y 2.6% (n=5) respectivamente (Tabla 10, Figuras 10, 41-42), contrastando con lo reportado por Heimer *et al.*, (2004), quienes describieron que el gen *tsh* se expresó en el 63% de las cepas y *pic* en el 31% de las cepas de *E. coli* uropatógena aisladas de pacientes con pielonefritis. Estos datos sugieren que probablemente la acción de estas toxinas es importante para el desarrollo de las infecciones en el tracto urinario.

6.2.3 Sistemas de adquisición de Fe

A pesar de que el hierro es uno de los metales más abundantes en la corteza terrestre, los patógenos se encuentran frecuentemente con limitaciones de este metal dentro del hospedero. De hecho, la limitación de hierro es una de las defensas innatas del hospedero contra la supervivencia de las bacterias (Haley y Skaar, 2012). Para asegurar niveles adecuados de hierro intracelular, UPEC expresa genes involucrados en la adquisición de hierro en respuesta a las limitaciones de este metal (Snyder *et al.*, 2004; Alteri y Mobley, 2007; Hagan *et al.*, 2010). Se ha demostrado que los genes que codifican sistemas bacterianos para la adquisición de hierro están expresados en mayor cantidad en mujeres con cistitis (Brumbaugh *et al.*, 2015). El repertorio de sideróforos expresados por UPEC puede influir la habilidad de la bacteria para crecer y persistir en la orina humana (Roos *et al.*, 2006). En un estudio previo realizado en cepas UPEC y en cepas de *E. coli* de origen rectal, se demostró que la producción de enterobactina (codificada por el operón del cual forma parte el gen *iuc*) fue idéntica en las cepas aisladas tanto del tracto urinario como del recto, indicando que estos sistemas no

responden a señales específicas detectadas por UPEC en el tracto urinario. Sin embargo, tanto la expresión de los sideróforos salmoquelina (codificada por el operón del cual forma parte el gen *iron*) como la de yersiniabactina (codificada por el operón del cual forma parte el gen *irp2*) fueron significativamente mayores en las UPEC que en las cepas rectales, por lo que se sugirió que la co-expresión de estos sideróforos podría jugar un papel más importante en la patogénesis, en comparación con la enterobactina, durante el proceso de la adquisición de hierro dentro del tracto urinario (Henderson *et al.*, 2009).

En este estudio se encontró que a partir de los tres genes analizados que codifican para distintos sistemas de sideróforos asociados a patogenicidad en *E. coli* (salmoquelina, aerobactina y yersiniabactina), *irp2*, que pertenece a la isla de patogenicidad HPI (High Pathogenicity Island), y que codifica yersiniabactina, fue el que se expresó más frecuentemente en las cepas UPEC (49%, n=95) (Tabla 10, Figuras 10, 53-54). Este porcentaje coincide con lo descrito por Brumbaugh *et al.*, (2015), quienes encontraron que los genes del operón yersiniabactina fueron expresados más frecuentemente en cepas aisladas de mujeres con cistitis. El gen *irp2* es esencial para la adquisición de hierro, ya que las mutantes que carecen de este gen son incapaces de crecer en medios con bajas concentraciones de hierro, dado que se anula la producción del sideróforo yersiniabactina (Smati *et al.*, 2016). Se ha demostrado que durante la formación de comunidades bacterianas intracelulares los genes de sistemas de adquisición de hierro están sobre expresados (Berry *et al.*, 2009; Reigstad *et al.*, 2007), al igual que los genes que codifican yersiniabactina durante la formación de las comunidades bacterianas parecidas a biopelículas (Smati *et al.*, 2016). Se ha descrito que yersiniabactina presenta características bioquímicas especiales por lo cual ha sido considerado un metalóforo universal capaz de formar complejos estables con varios iones metálicos, como cobre y zinc, además de ser esencial para la patogenicidad en diferentes modelos (Bobrov *et al.*, 2014; Chaturvedi *et al.*, 2012; Koh *et al.*, 2015).

6.2.4 Protectinas

El gen *kpsMT* (capsular) se expresó en el 61.3% (n=119) de las cepas analizadas en este estudio (Tabla 10, Figuras 10, 55-56). Este gen está relacionado con la persistencia de las infecciones del tracto urinario causadas por UPEC (Ejrnaes *et al.*, 2011), y tiene una alta frecuencia de detección, por ejemplo, Yun *et al.*, en el 2014, lo detectaron el 84.4% de las 64 cepas que analizaron, obtenidas de niños con bacteriuria asintomática e infecciones en el tracto urinario.

El gen *ompT*, que codifica para la proteasa de membrana externa, fue expresado por el 9.8% (n=19) de las cepas analizadas (Tabla 10, Figuras 10, 57-58), coincidiendo con lo reportado por Momtaz *et al.*, (2013b), quienes lo detectaron en el 4.8% de las cepas UPEC. Estudios recientes demuestran que *ompT* (proteasa de membrana externa) juega un papel multifacético en la patogénesis de las infecciones del tracto urinario por UPEC (He *et al.*, 2015), por lo que se sugiere que es uno de los genes de virulencia más importantes durante las IsTU (Johnson *et al.*, 2003).

6.3 Serogrupos

Varios grupos de antígenos O han sido asociados con patotipos específicos de *E. coli* (Stenutz *et al.*, 2006). En este estudio se lograron identificar siete serogrupos, siendo O25 el más frecuente (Tabla 12), el cual está asociado principalmente con cepas obtenidas de pacientes con cistitis (Morales-Espinosa *et al.*, 2016), y ha sido previamente reportado como el serogrupo más frecuentemente encontrado en *E. coli* uropatogénica en la Ciudad de México (Molina-López *et al.*, 2011). Se ha reportado que los serogrupos O1, O2, O4, O6, O25 y O18 poseen factores de virulencia específicos, lo cual les confiere mayor capacidad de adhesión e invasión (Jadhav *et al.*, 2011; Momtaz *et al.*, 2013a). En este estudio se encontró que los serogrupos O25 y O8 presentaron mayor frecuencia de adhesinas, principalmente la adhesina homóloga de IrgA (*iha*) y fimbria tipo 1 (*fim*); toxinas, especialmente la proteína uropatógena específica (*usp*); sistemas de adquisición de hierro, primordialmente yersiniabactina (*irp2*); y el gen capsular (*kpsMT*) (Tabla 14).

6.4 Patrones de expresión

En este estudio se identificaron cincuenta y cuatro patrones diferentes de expresión de los genes que codifican para adhesinas, sistemas de adquisición de hierro, toxinas y protectinas en las cepas UPEC (Tabla 11). Estos hallazgos muestran que durante la patogénesis de la infección de la línea celular A431, las cepas fueron capaces de expresar simultáneamente varios genes, que les permitieron adherirse a las células epiteliales, internalizarse, multiplicarse y codificar para la cápsula. Se ha descrito que la expresión individual de los genes no es suficiente para que la bacteria cause enfermedad, sino que se requiere la expresión colectiva de los genes para causar patología en el hospedero (Marrs *et al.*, 2005). Existen reportes que demuestran la asociación de genes de virulencia en cepas de *E. coli* involucrados en el desarrollo de cistitis, pielonefritis y

urosepsis (Johnson *et al.*, 2005b; Johnson y Stell, 2000; Ruiz *et al.*, 2002; Schubert *et al.*, 2009).

Como ya se ha mencionado, la fimbria tipo 1 (*fim*) está asociada con la formación de comunidades bacterianas intracelulares parecidas a biopelículas (Wright *et al.*, 2007), dentro de las cuales se establecen reservorios que pueden dar origen a infecciones recurrentes (Anderson *et al.*, 2003; Garofalo *et al.*, 2007; Kernn *et al.*, 2005; Mulvey *et al.*, 2001; Mysorekar y Hultgren, 2006), sin embargo, no solo el gen *fim* (fimbria tipo 1) está relacionado con infecciones recurrentes, por ejemplo; Ejrnaes *et al.*, (2011) encontraron que los genes *sfa* (fimbria S), *iroN* (receptor de salmoquelina), *usp* (proteína uropatógena específica), y el gen *hlyD*, que pertenece a la isla de patogenicidad que codifica α -hemolisina, están relacionados con infecciones recurrentes en el tracto urinario causadas por UPEC. En este estudio los genes *fim* y *usp* se expresaron frecuentemente en las cepas (Tabla 10) y su asociación está presente en 10 de los 54 patrones de expresión encontrados (67 cepas) (Tabla 11), lo que sugiere que estas bacterias tienen la capacidad de provocar infecciones recurrentes debido a que una gran cantidad de genes asociados a este tipo de infecciones se expresaron en las cepas estudiadas.

Se ha descrito que los genes del locus Yersiniabactin son regulados positivamente durante la formación de las comunidades bacterianas intracelulares (Smati *et al.*, 2016), y en este estudio la combinación de los genes *irp2* y *fim* está presente en 10 de los 54 patrones de expresión (63 cepas) (Tabla 11), lo que sugiere que probablemente las cepas poseen la capacidad de formar estas comunidades parecidas a biopelículas, evadiendo así la respuesta inmune del hospedero y ocasionando complicaciones en el tratamiento de las infecciones. Se ha demostrado que la falta de la cápsula disminuye el desarrollo y progresión de la formación de comunidades bacterianas intracelulares durante cistitis (Anderson *et al.*, 2010). La asociación de los genes *fimA* (fimbria A) y *kpsMT* (gen capsular) fue identificada en cepas provenientes de niños con bacteriuria asintomática (Yun *et al.*, 2014). En este estudio la asociación de *fimA* y *kpsMT* se encontró en 10 de los 54 patrones de expresión (66 cepas) de las cepas UPEC (Tabla 11). La expresión simultánea de *fimA* y *kpsMT* podría acentuar la patogénesis de *E. coli* incrementando la capacidad de adherencia de las bacterias mediante las fimbrias codificadas por *fim* y la evasión de la fagocitosis por la expresión de la cápsula codificada por *kpsMT* (Paniagua-Contreras *et al.*, 2015).

La combinación de los genes *fim*, *irp2* y *kpsMT*, fue encontrada en 6 patrones de expresión (n= 51 cepas) (Tabla 11). Estos resultados demuestran que las cepas que expresaron simultáneamente *fim/irp2/kpsMT* poseen la habilidad de adherirse fuertemente a las células epiteliales, para iniciar la colonización, multiplicarse mediante la adquisición del hierro que les permitiría sobrevivir, además de evadir

la respuesta inmune y la acción de los antibióticos mediante la expresión del gen que codifica para la cápsula.

6.5 Cambios en las condiciones de incubación de los cultivos celulares infectados

En este estudio no se observaron cambios en la expresión de los genes en las cepas UPEC al cambiar las condiciones de temperatura y CO_2 durante la incubación del cultivo celular (Tabla 15).

Se sabe que existen algunos factores de virulencia cuya expresión se ve afectada por diversas condiciones ambientales, como la temperatura. Por ejemplo, se ha demostrado que la transcripción de los genes que codifican para la cápsula ocurre a 37°C en el hospedero, pero no a temperaturas menores de 25°C, y fuera de éste (Orskov *et al.*, 1984), sin embargo, al alterar las condiciones de incubación en el cultivo de la línea celular A431 no se observaron cambios en la expresión de los genes.

7. CONCLUSIONES

1. La elevada frecuencia de expresión de los genes que codifican para adhesinas (*fim*, *iha*) en las cepas uropatógenas de *E. coli* después de la infección *in vitro* de la línea celular vaginal A431, demostró la importancia de estos genotipos para la colonización y posterior internalización de las bacterias.
2. La elevada expresión del gen de hierro *irp2* por las cepas UPEC durante el modelo de infección *in vitro* demostró la capacidad de las cepas para sobrevivir y multiplicarse en las células epiteliales vaginales.
3. Se demostró que durante el proceso infeccioso *in vitro* las cepas UPEC fueron capaces de expresar diferentes genes de toxinas (*usp*), incluso de toxinas involucradas en procesos diarreogénicos (*astA*, *set-1*), con lo que se demuestra que cepas portadoras de toxinas diarreogénicas son capaces de infectar el tracto urinario.
4. La frecuente expresión del gen capsular *kpsMT* por las cepas durante el modelo de infección, evidenció su capacidad para desarrollar una forma de protección para evadir la respuesta inmune y la acción de los antibióticos.
5. La expresión simultánea del genotipo de adhesión *fim*, y el antígeno capsular *kpsMT*, demostró la capacidad de las cepas estudiadas para ocasionar infecciones agudas, como cistitis y pielonefritis.
6. La prevalencia de los serogrupos O25, O8, O15 y O75 en las cepas UPEC demostró que estos continúan siendo los grupos más frecuentes asociados a las infecciones del tracto urinario en México, sin embargo la gran cantidad de cepas sin identificar sugiere un probable incremento en otros serogrupos asociados a las ISTU.

7. Durante el modelo de infección *in vitro* de la línea celular vaginal A431 se encontró que las cepas de *E. coli* presentaron diferentes patrones de expresión, principalmente de genes necesarios para la adhesión, colonización, internalización y formación de la biopelícula, evidenciando la patogenicidad de las cepas para provocar infecciones crónicas.

8. La modificación de las condiciones de temperatura y CO_2 durante el modelo de infección no afectó la expresión de los factores de virulencia en las cepas de *E. coli*.

9. Este es el primer estudio realizado en México para promover en un modelo *in vitro* de infección, la expresión global de los distintos marcadores de virulencia en los principales serogrupos de cepas uropatógenas de *E. coli*, que contribuye a ampliar el conocimiento de la patogénesis de las cepas uropatógenas de *E. coli* mexicanas durante las infecciones del tracto urinario.

8. ANEXO 1

Gráficas de PCR en tiempo real y melting point

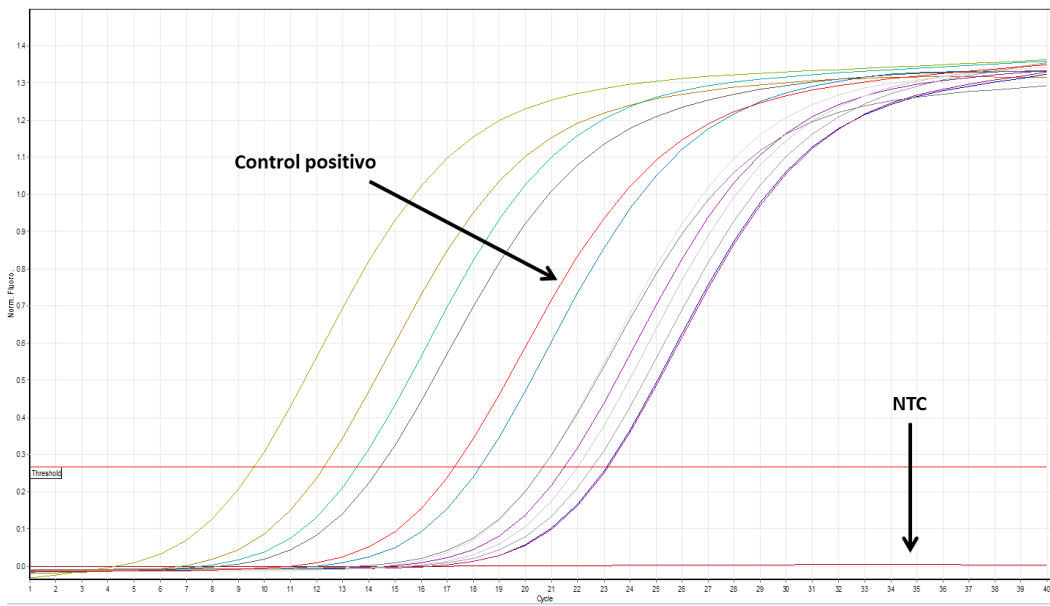


Figura 11. Expresión del gen 16S rRNA en las cepas uropatógenas de *E. coli*. La lectura se realizó en el canal verde. Control positivo *E. coli* ATCC 11775; NTC: Control sin templado.

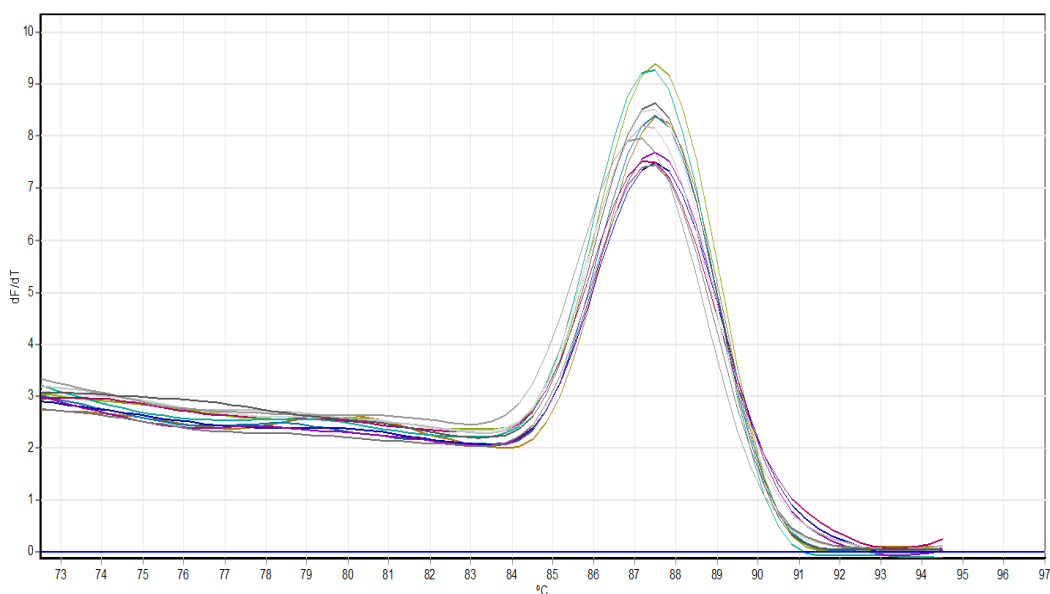


Figura 12. Curva de fusión (Melting point) de la expresión del gen 16S rRNA, Los productos específicos muestran una temperatura de fusión más alta que los productos inespecíficos.

Adhesinas

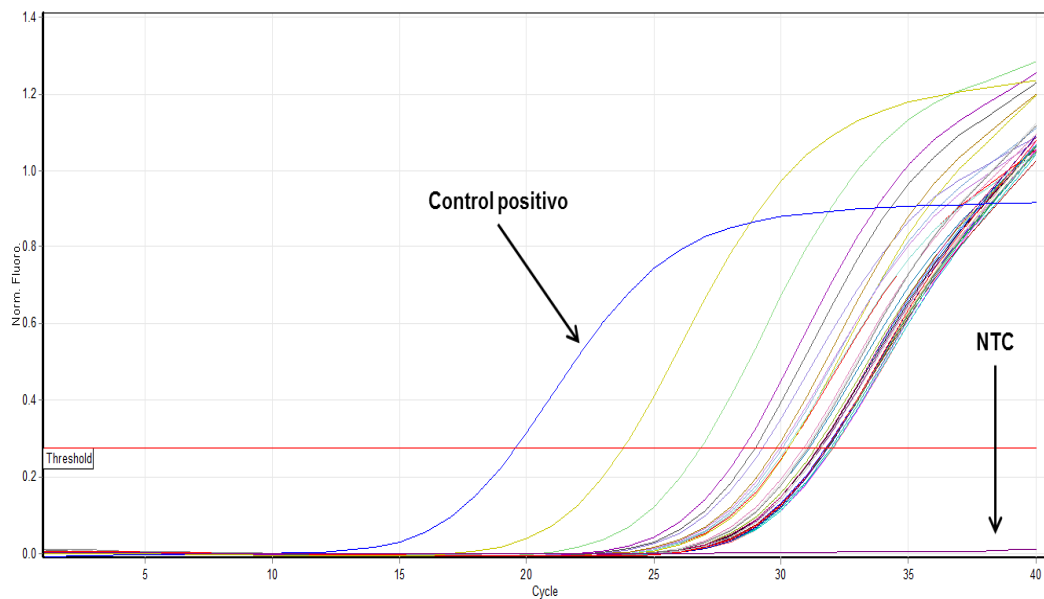


Figura 13. Expresión del gen *iha* en cepas UPEC por PCR en tiempo real. Control positivo: cepa de *E. coli* portadora del gen *iha* confirmado mediante secuenciación; NTC: Control sin templado.

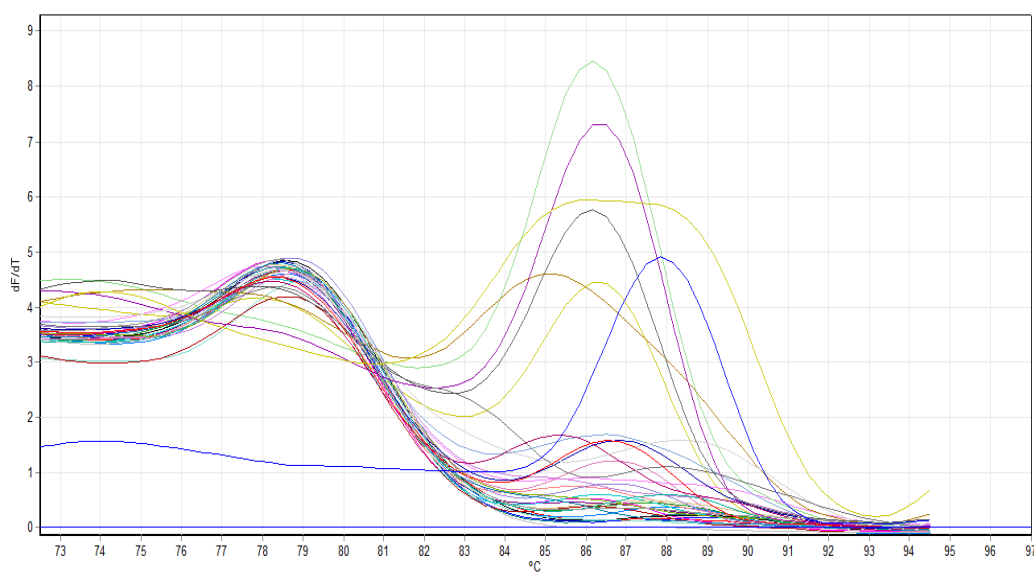


Figura 14. Curva de fusión (Melting point) de la expresión de *iha*.

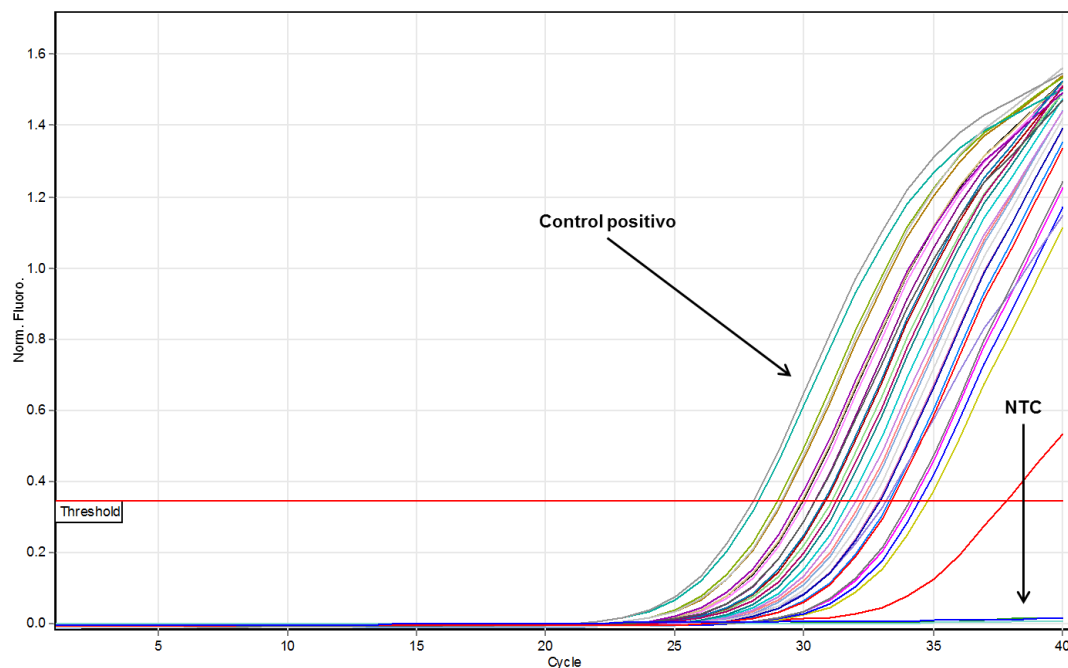


Figura 15. Expresión del gen *fim* en cepas UPEC por PCR en tiempo real. Control positivo: cepa de *E. coli* portadora del gen *fim* confirmado mediante secuenciación; NTC: Control sin templado.

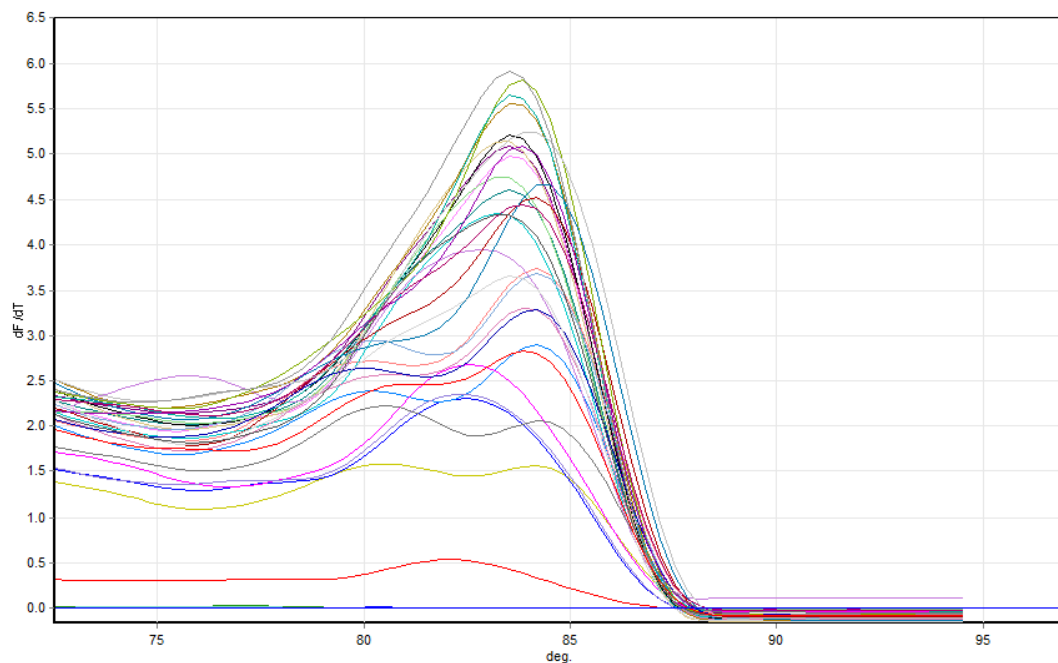


Figura 16. Curva de fusión (Melting point) de la expresión de *fim*.

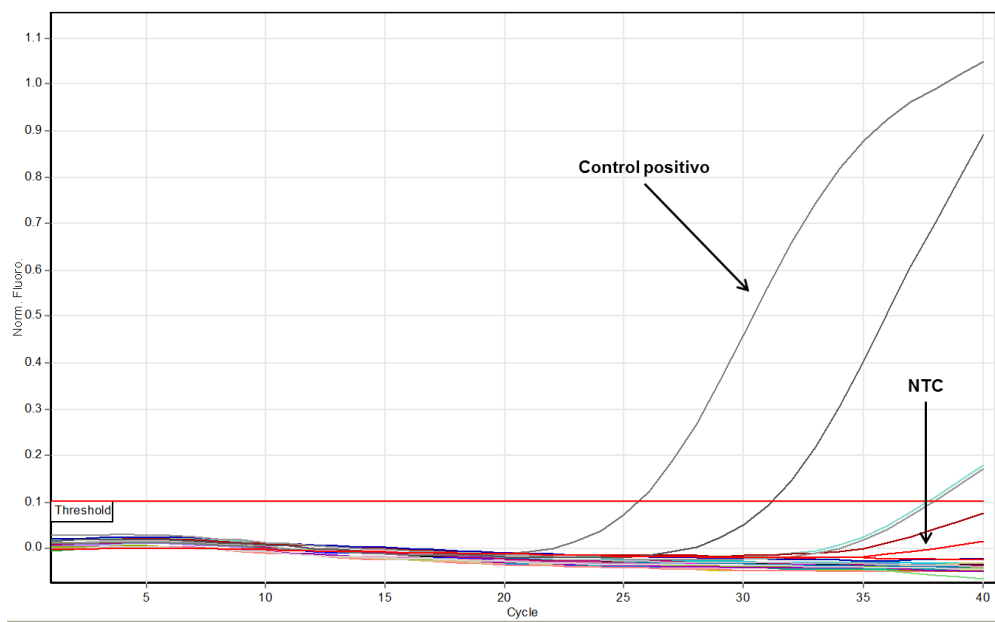


Figura 17. Expresión del gen *pap* en cepas UPEC por PCR en tiempo real. Control positivo: cepa de *E. coli* portadora del gen *pap* confirmado mediante secuenciación; NTC: Control sin templado.

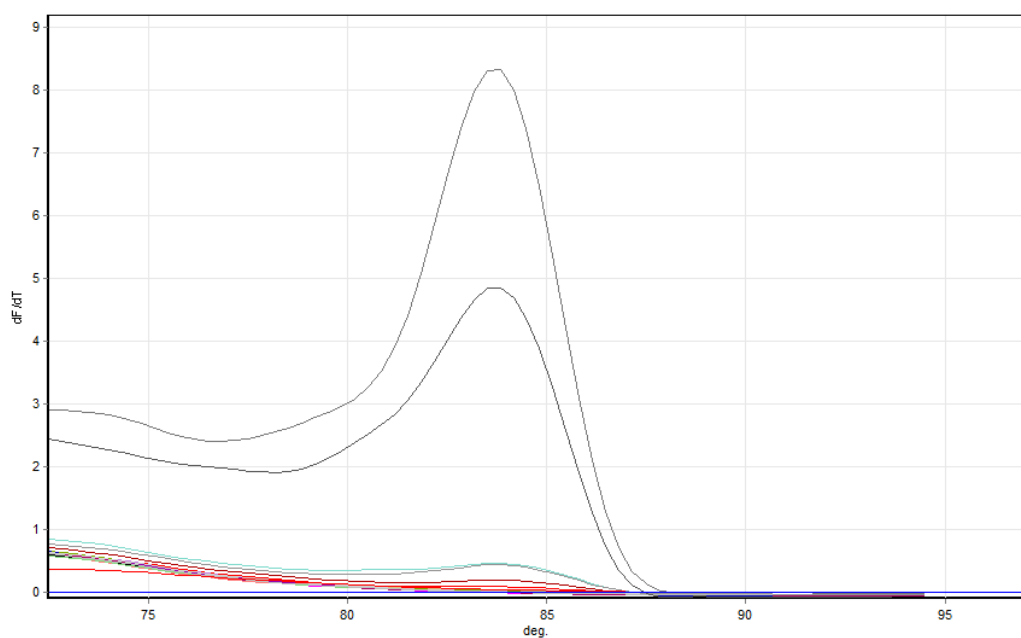


Figura 18. Curva de fusión (Melting point) de la expresión de *pap*.

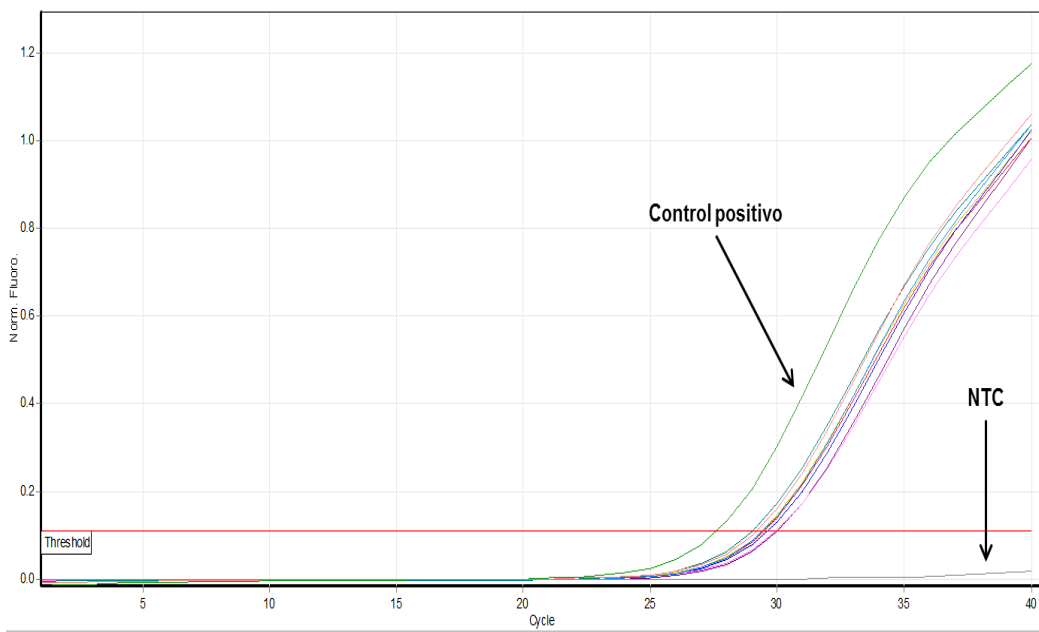


Figura 19. Expresión del gen *papGI* en cepas UPEC por PCR en tiempo real. Control positivo: cepa de *E. coli* portadora del gen *papGI* confirmado mediante secuenciación; NTC: Control sin templado.

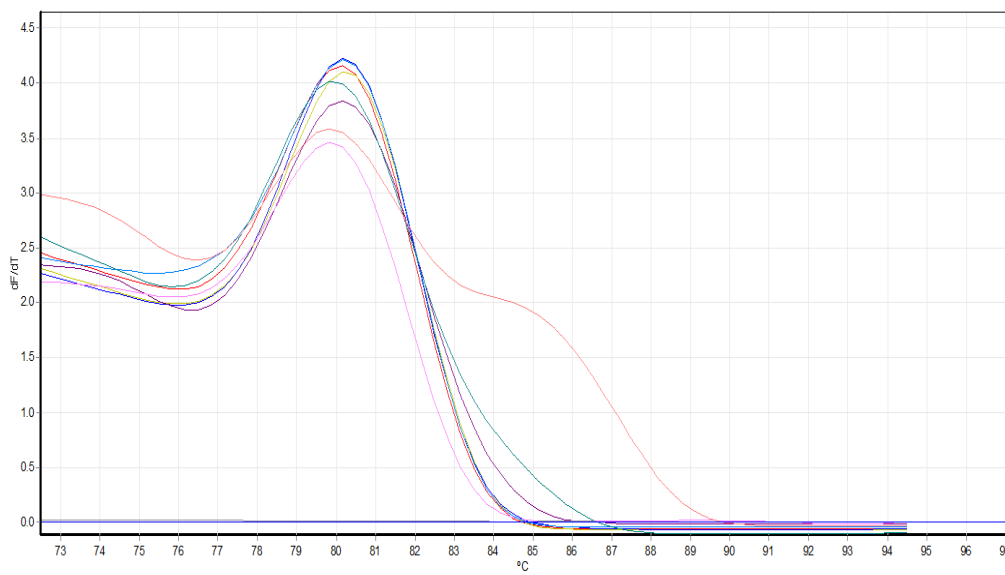


Figura 20. Curva de fusión (Melting point) de la expresión de *papGI*.

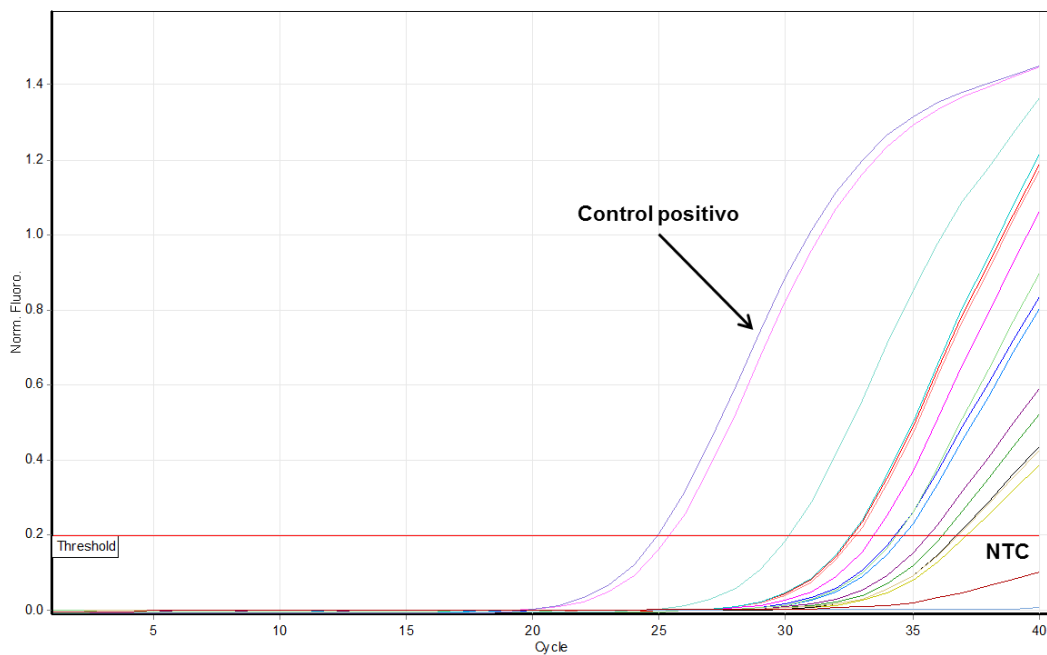


Figura 21. Expresión del gen *papGII* en cepas UPEC por PCR en tiempo real. Control positivo: cepa de *E. coli* portadora del gen *papGII* confirmado mediante secuenciación; NTC: Control sin templado.

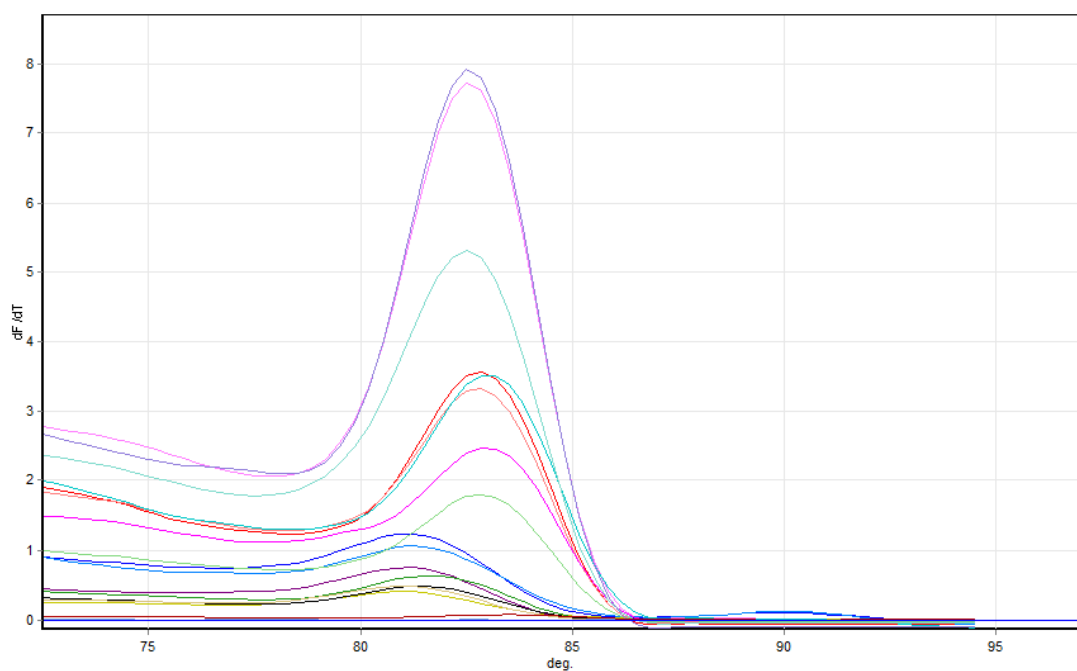


Figura 22. Curva de fusión (Melting point) de la expresión de *papGII*.

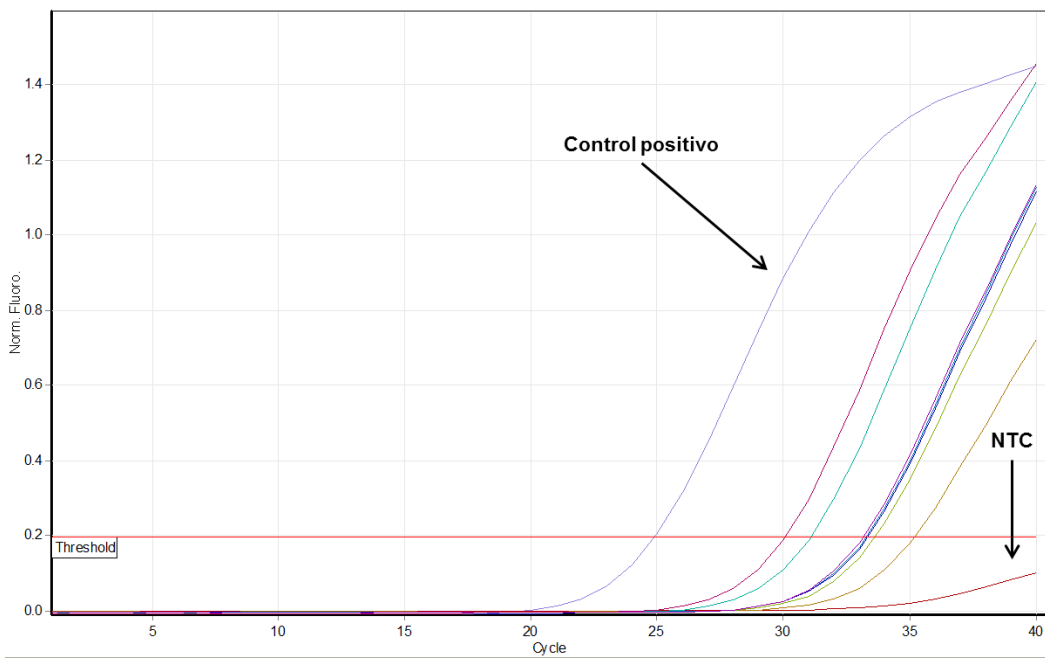


Figura 23. Expresión del gen *papGIII* en cepas UPEC por PCR en tiempo real. Control positivo: cepa de *E. coli* portadora del gen *papGIII* confirmado mediante secuenciación; NTC: Control sin templado.

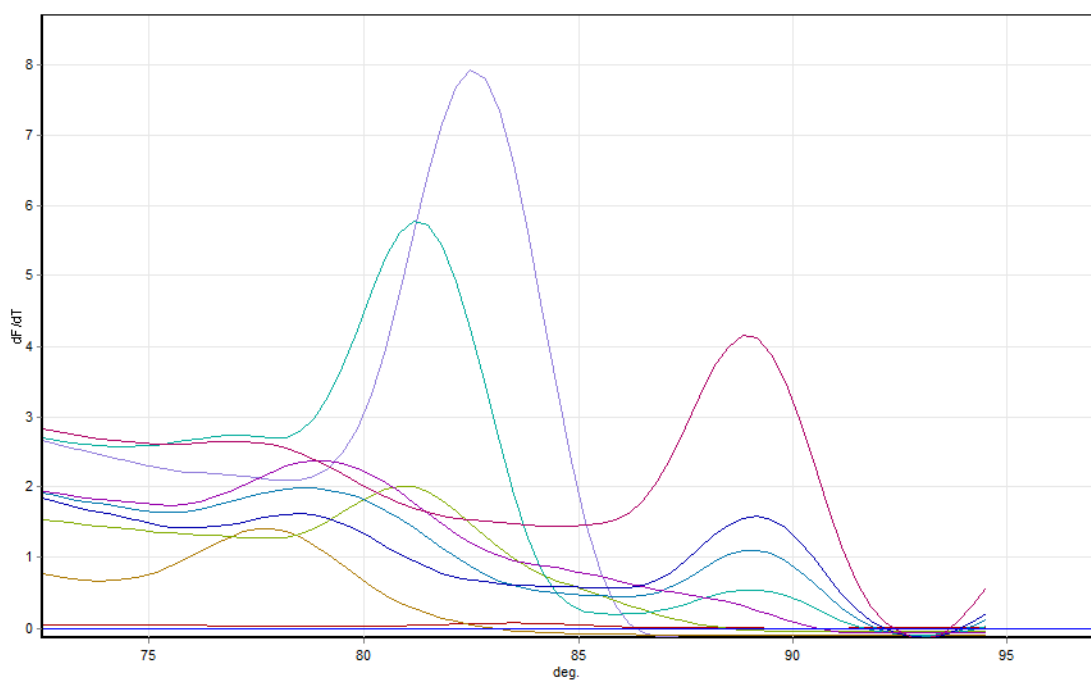


Figura 24. Curva de fusión (Melting point) de la expresión de *papGIII*.

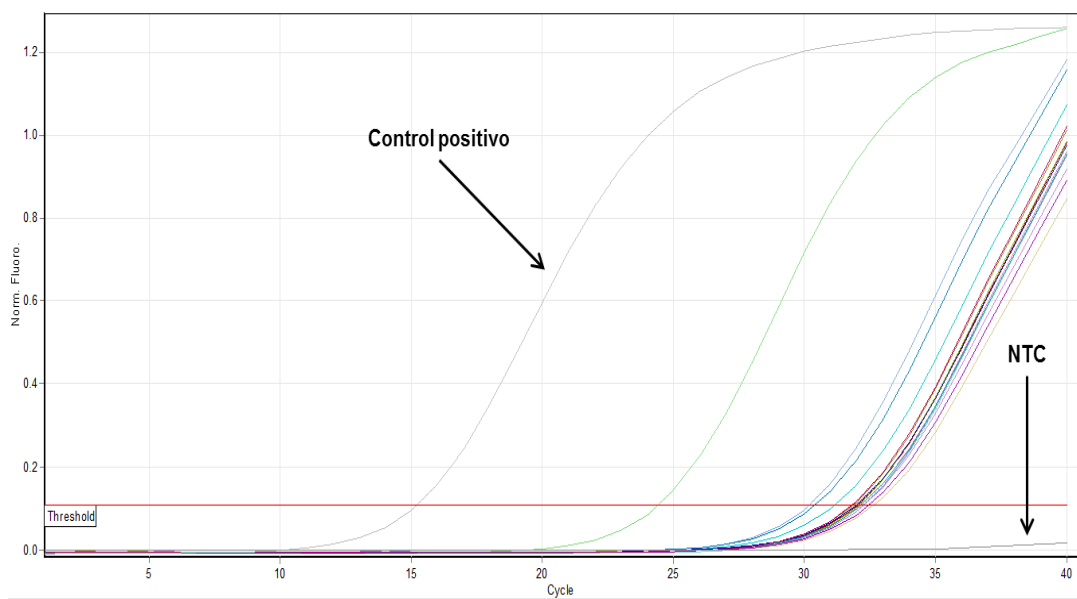


Figura 25. Expresión del gen *afa* en cepas UPEC por PCR en tiempo real. Control positivo: cepa de *E. coli* portadora del gen *afa* confirmado mediante secuenciación; NTC: Control sin templado.

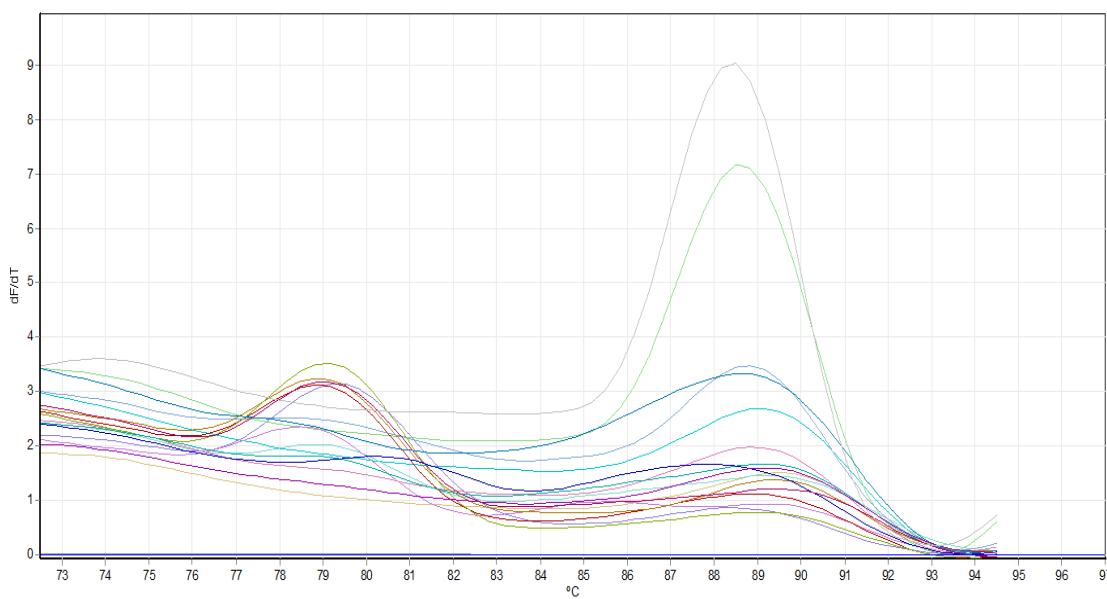


Figura 26. Curva de fusión (Melting point) de la expresión de *afa*.

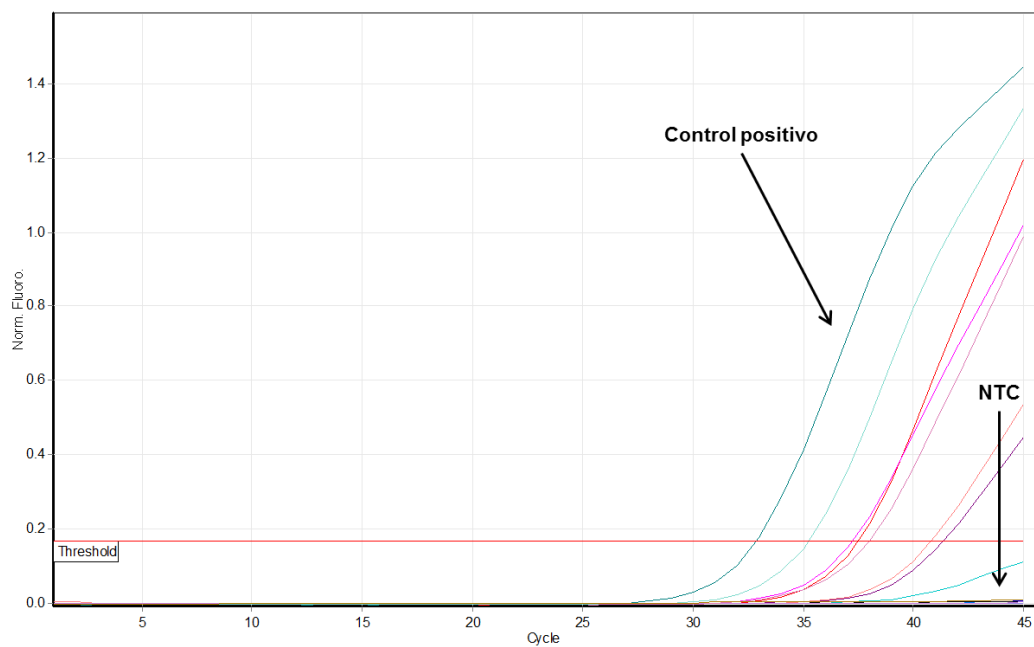


Figura 27. Expresión del gen *sfa* en cepas UPEC por PCR en tiempo real. Control positivo: cepa de *E. coli* portadora del gen *sfa* confirmado mediante secuenciación; NTC: Control sin templado.

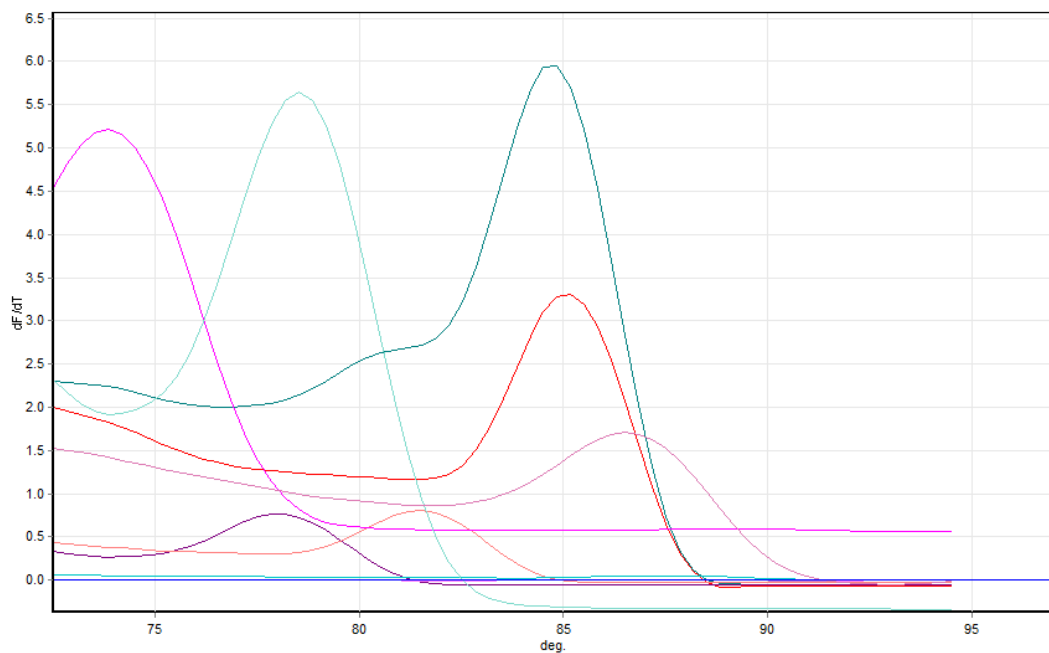


Figura 28. Curva de fusión (Melting point) de la expresión de *sfa*.

Toxinas

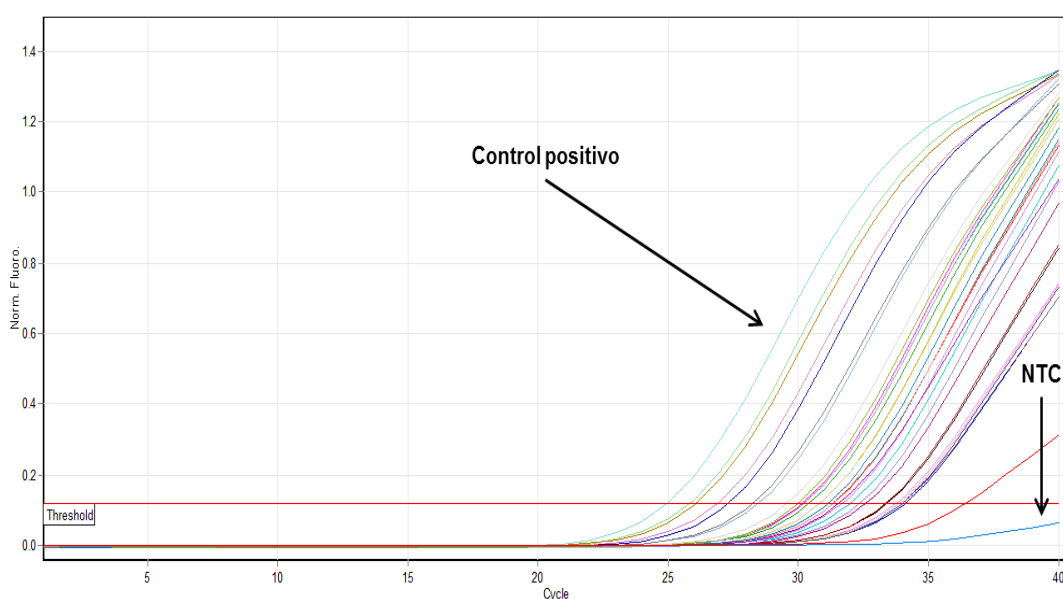


Figura 29. Expresión del gen *usp* en cepas UPEC por PCR en tiempo real. Control positivo: cepa de *E. coli* portadora del gen *usp* confirmado mediante secuenciación; NTC: Control sin templado.

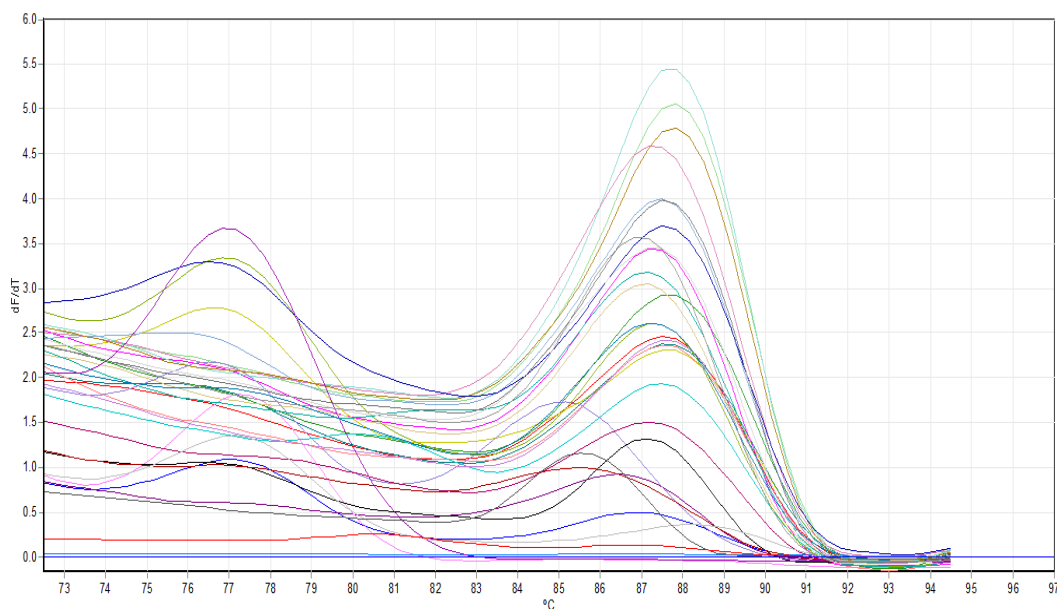


Figura 30. Curva de fusión (Melting point) de la expresión de *usp*.

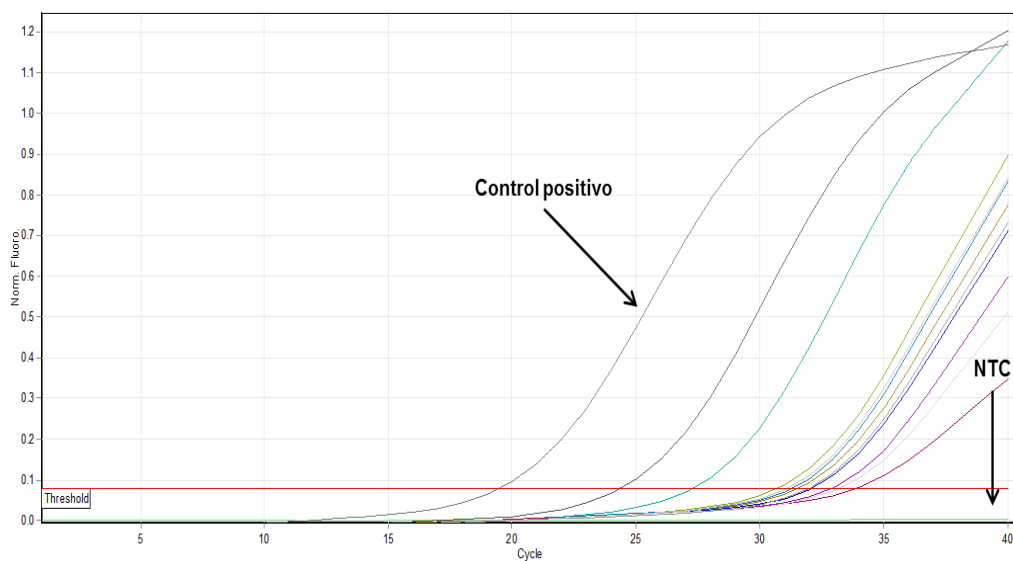


Figura 31. Expresión del gen *set-1* en cepas UPEC por PCR en tiempo real. Control positivo: cepa de *E. coli* portadora del gen *set-1* confirmado mediante secuenciación; NTC: Control sin templado.

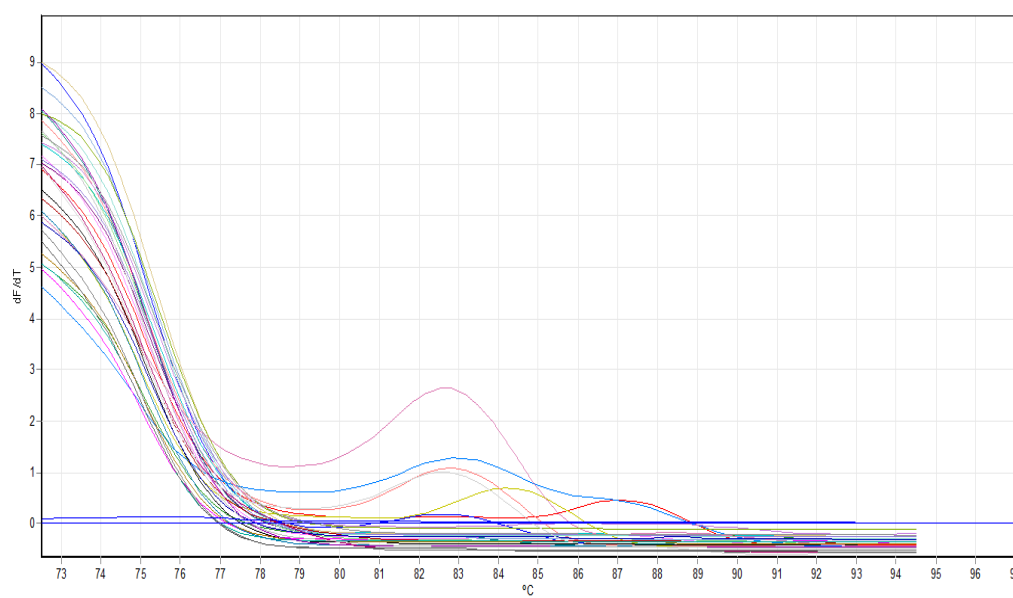


Figura 32. Curva de fusión (Melting point) de la expresión de *set-1*.

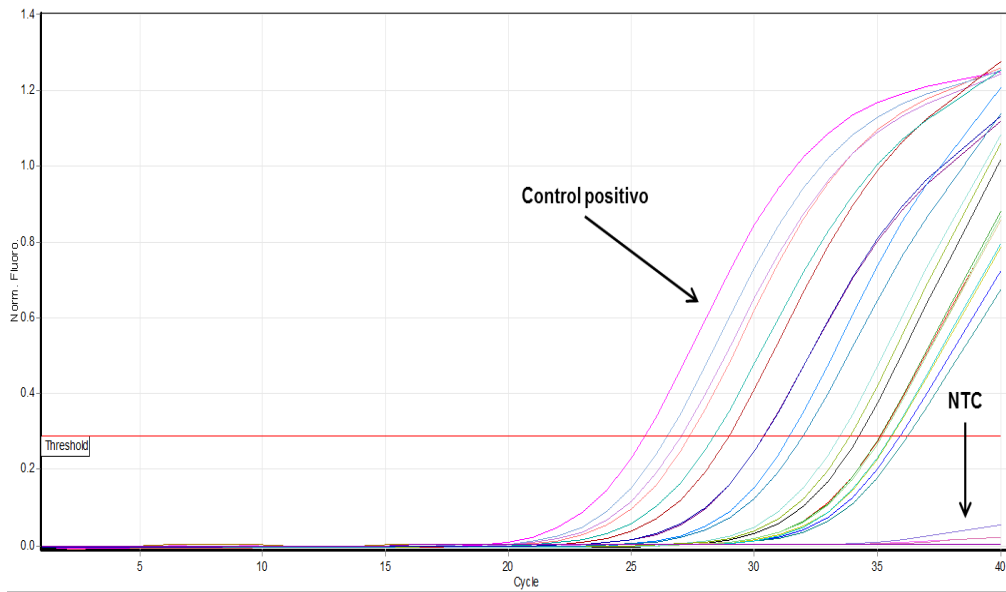


Figura 33. Expresión del gen *astA* en cepas UPEC por PCR en tiempo real. Control positivo: cepa de *E. coli* portadora del gen *astA* confirmado mediante secuenciación; NTC: Control sin templado.

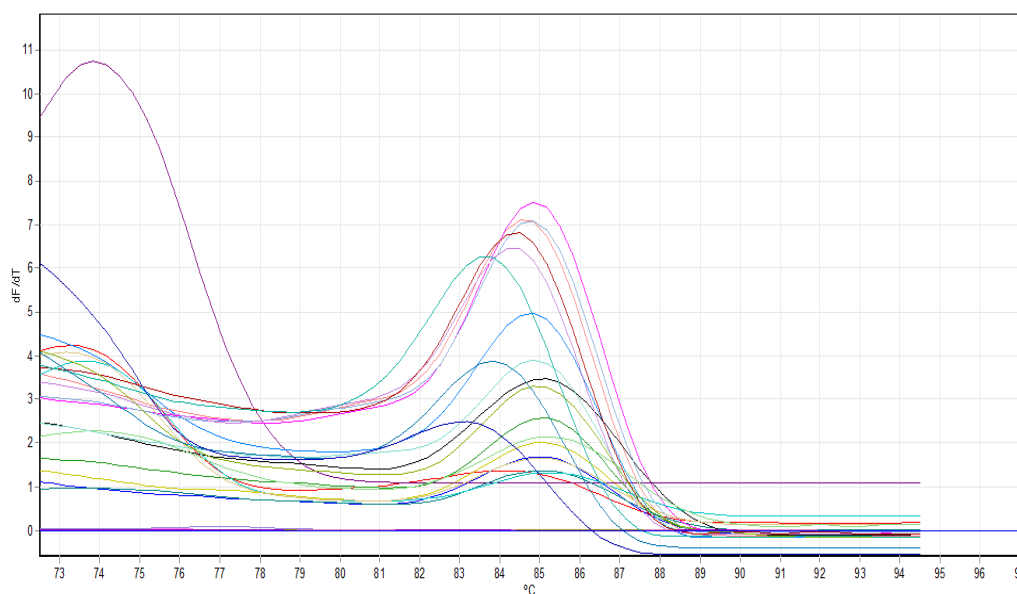


Figura 34. Curva de fusión (Melting point) de la expresión de *astA*.

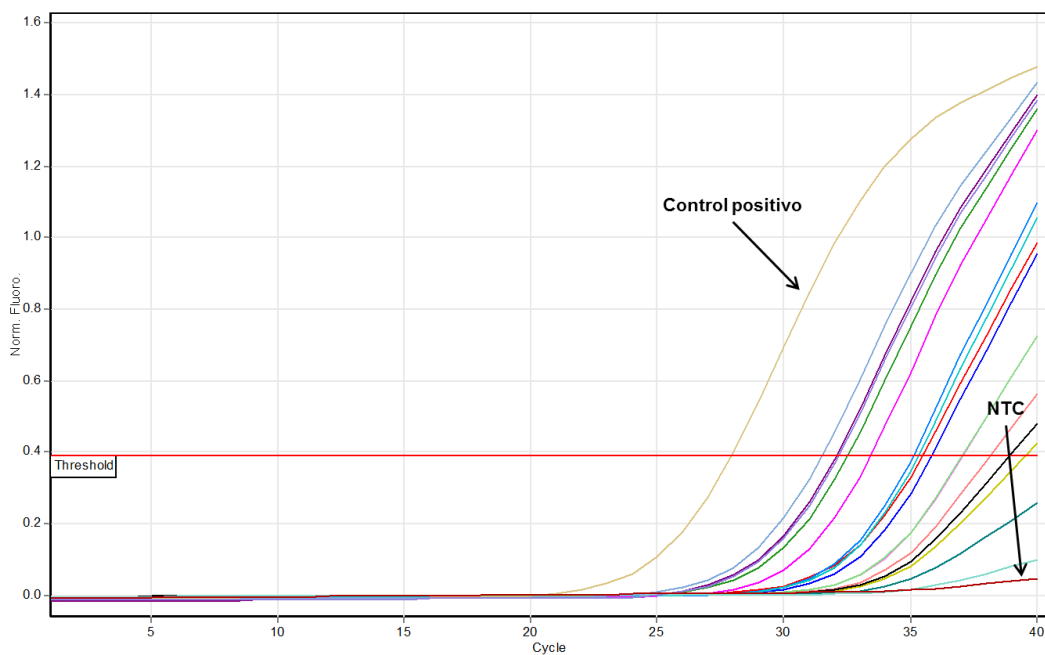


Figura 35. Expresión del gen *hlyA* en cepas UPEC por PCR en tiempo real. Control positivo: cepa de *E. coli* portadora del gen *hlyA* confirmado mediante secuenciación; NTC: Control sin templado.

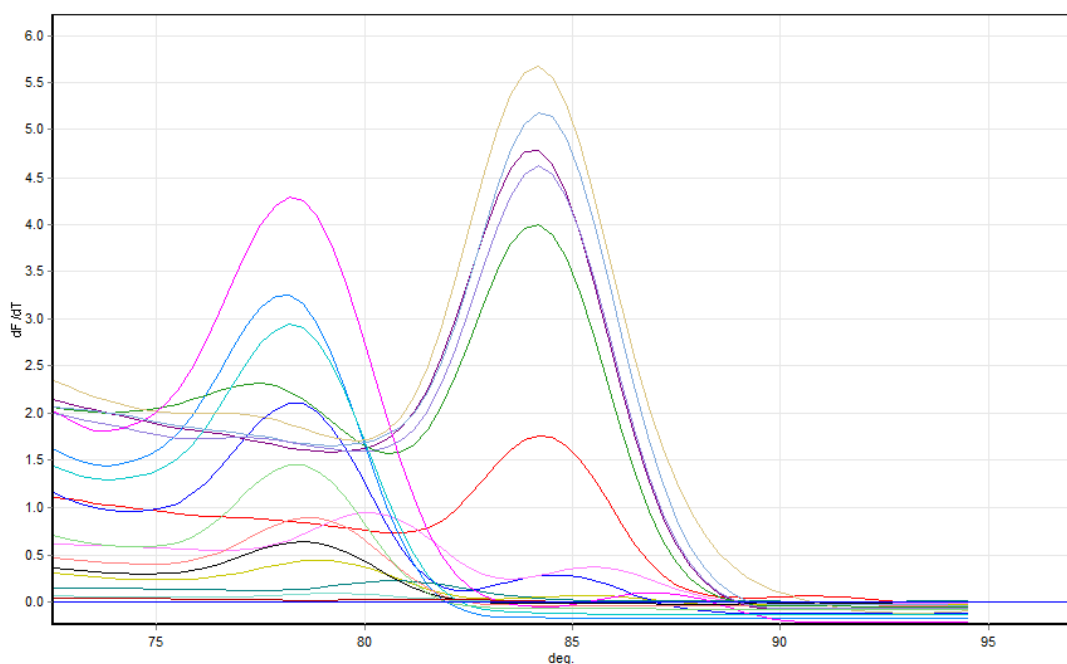


Figura 36. Curva de fusión (Melting point) de la expresión de *hlyA*.

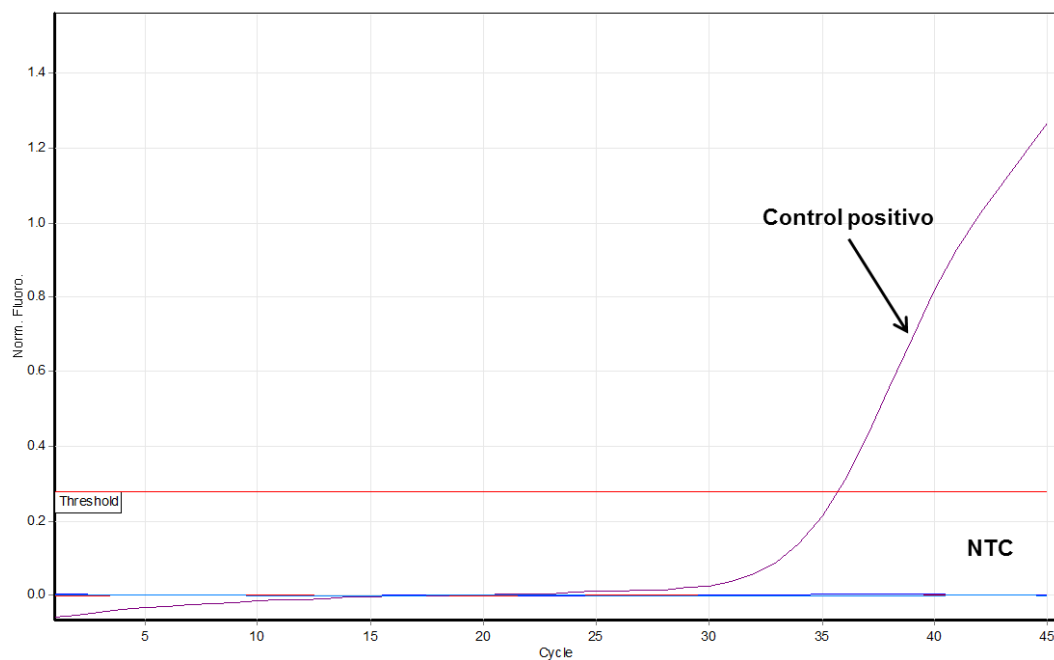


Figura 37. Expresión del gen *cnf1* en cepas UPEC por PCR en tiempo real. Control positivo: cepa de *E. coli* portadora del gen *cnf1* confirmado mediante secuenciación; NTC: Control sin templado.

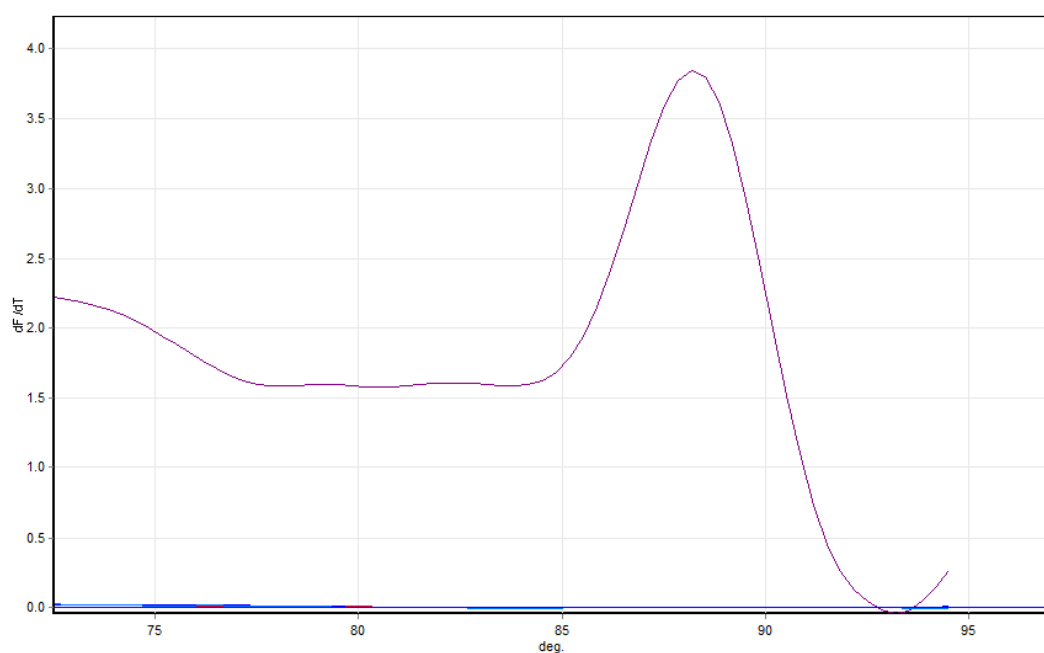


Figura 38. Curva de fusión (Melting point) de la expresión de *cnf1*.

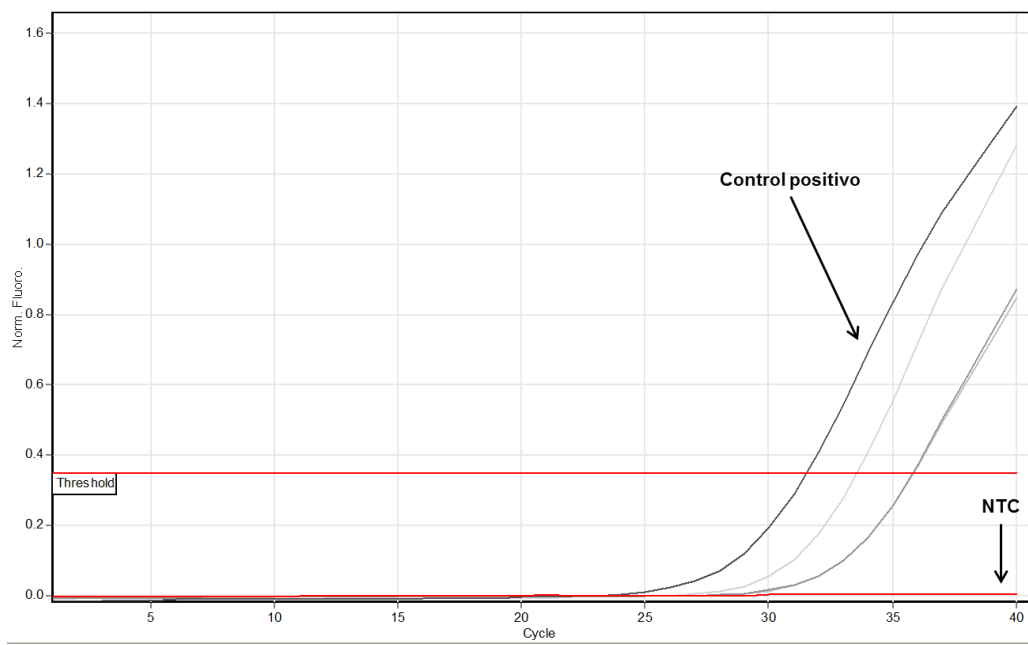


Figura 39. Expresión del gen *pic* en cepas UPEC por PCR en tiempo real. Control positivo: cepa de *E. coli* portadora del gen *pic* confirmado mediante secuenciación; NTC: Control sin templado.

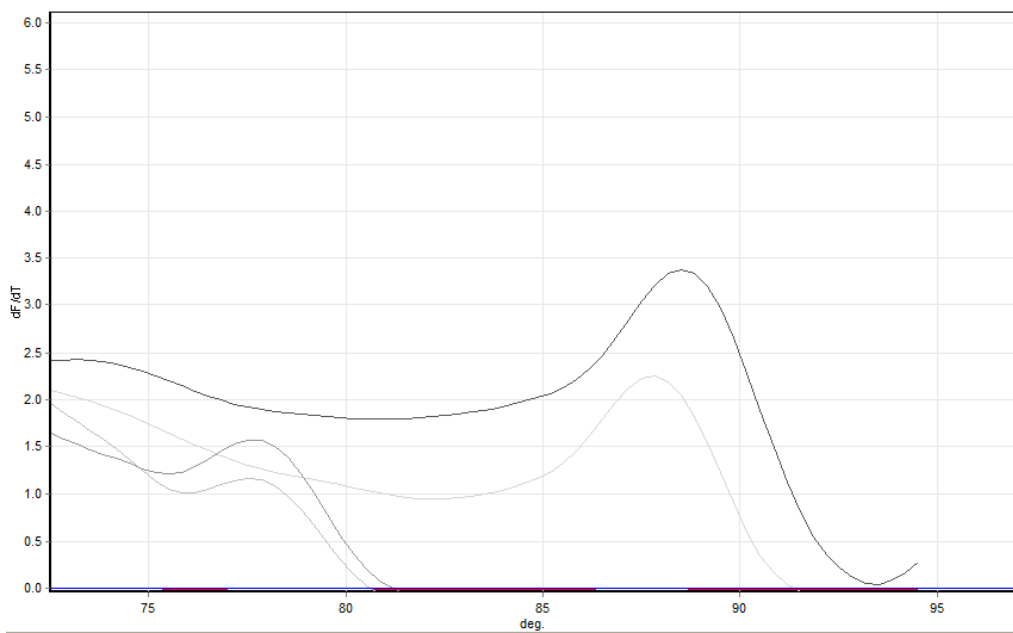


Figura 40. Curva de fusión (Melting point) de la expresión de *pic*.

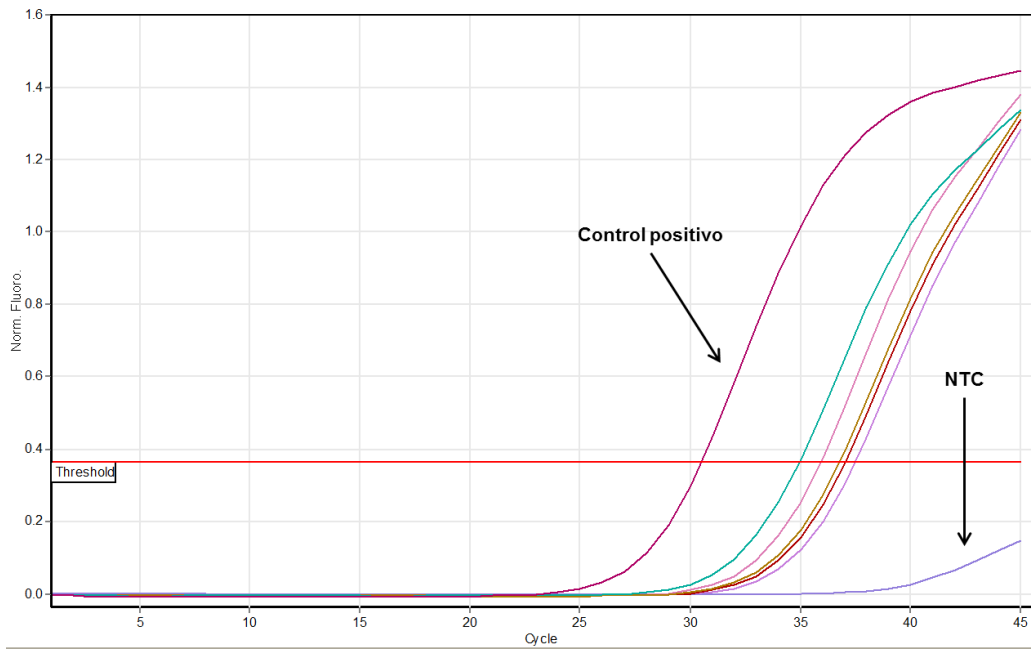


Figura 41. Expresión del gen *tsh* en cepas UPEC por PCR en tiempo real. Control positivo: cepa de *E. coli* portadora del gen *tsh* confirmado mediante secuenciación; NTC: Control sin templado.

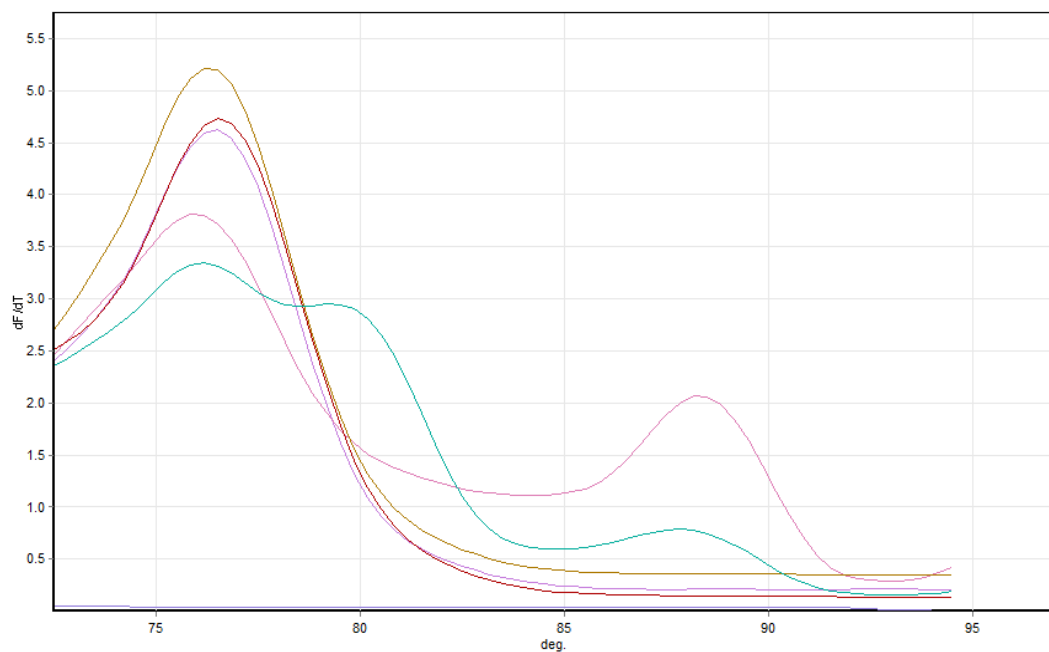


Figura 42. Curva de fusión (Melting point) de la expresión de *tsh*.

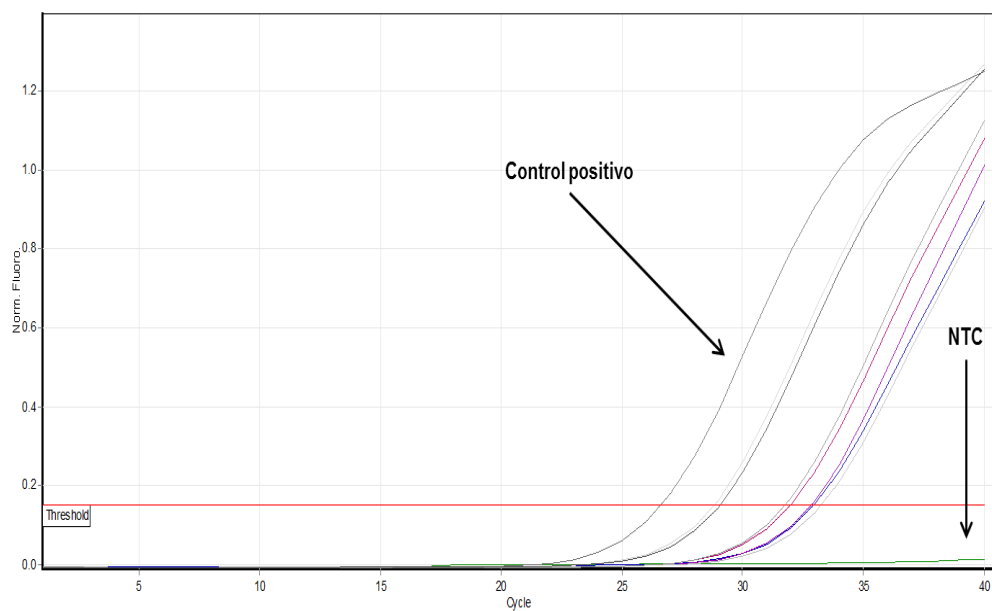


Figura 43. Expresión del gen *iss* en cepas UPEC por PCR en tiempo real. Control positivo: cepa de *E. coli* portadora del gen *iss* confirmado mediante secuenciación; NTC: Control sin templado.

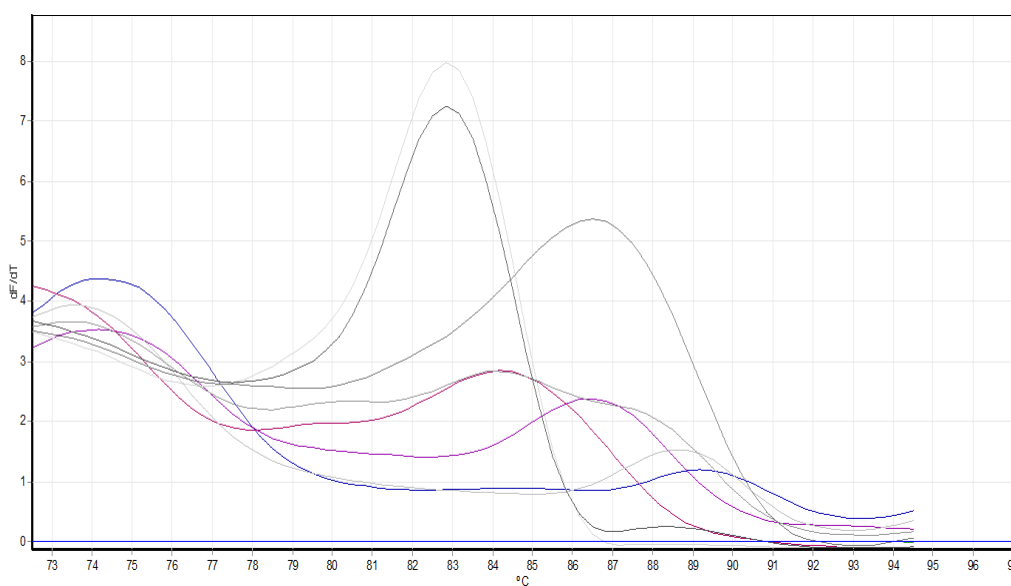


Figura 44. Curva de fusión (Melting point) de la expresión de *iss*.

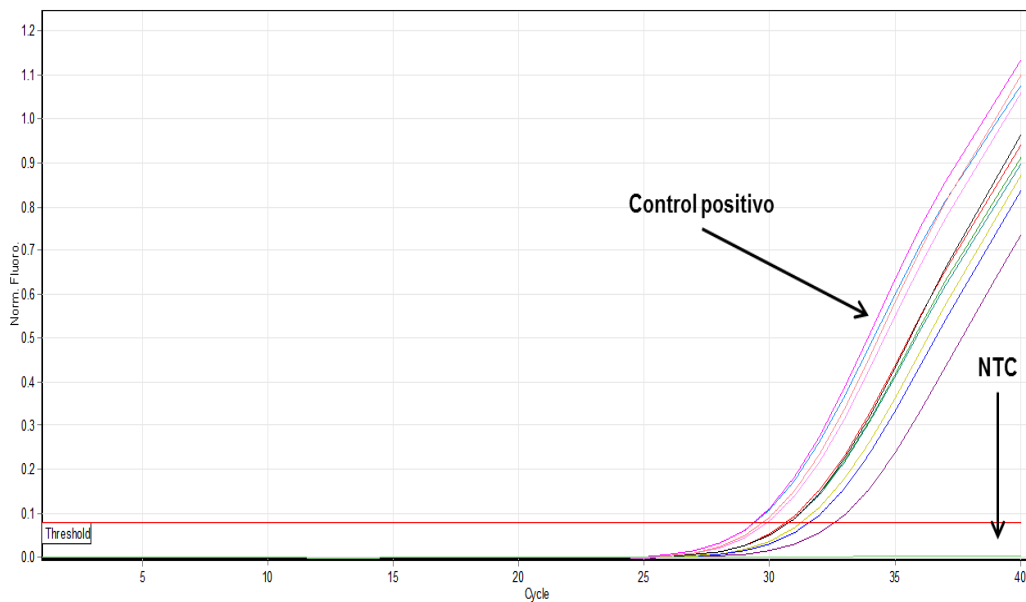


Figura 45. Expresión del gen *vat* en cepas UPEC por PCR en tiempo real. Control positivo: cepa de *E. coli* portadora del gen *vat* confirmado mediante secuenciación; NTC: Control sin templado.

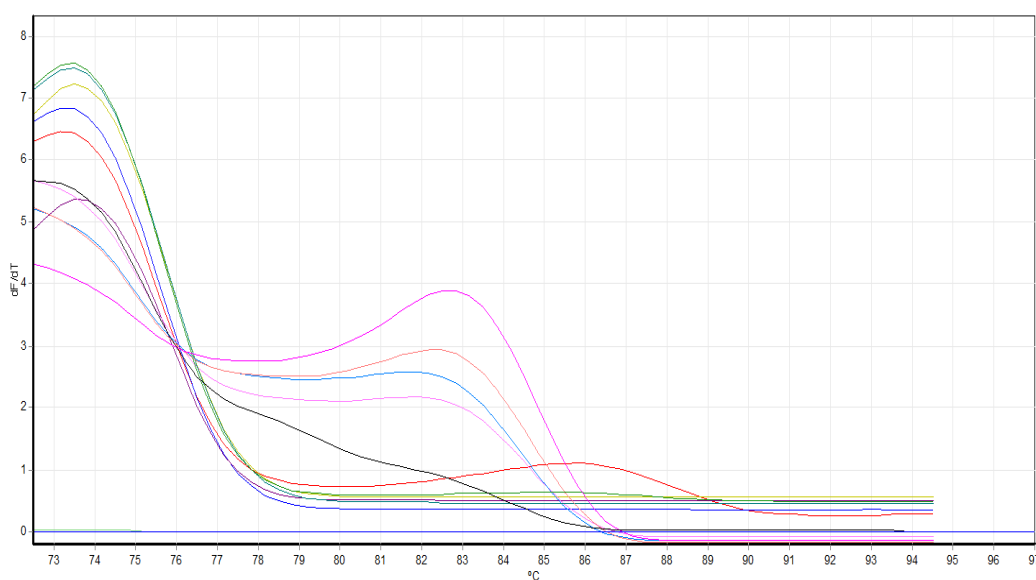


Figura 46. Curva de fusión (Melting point) de la expresión de *vat*.

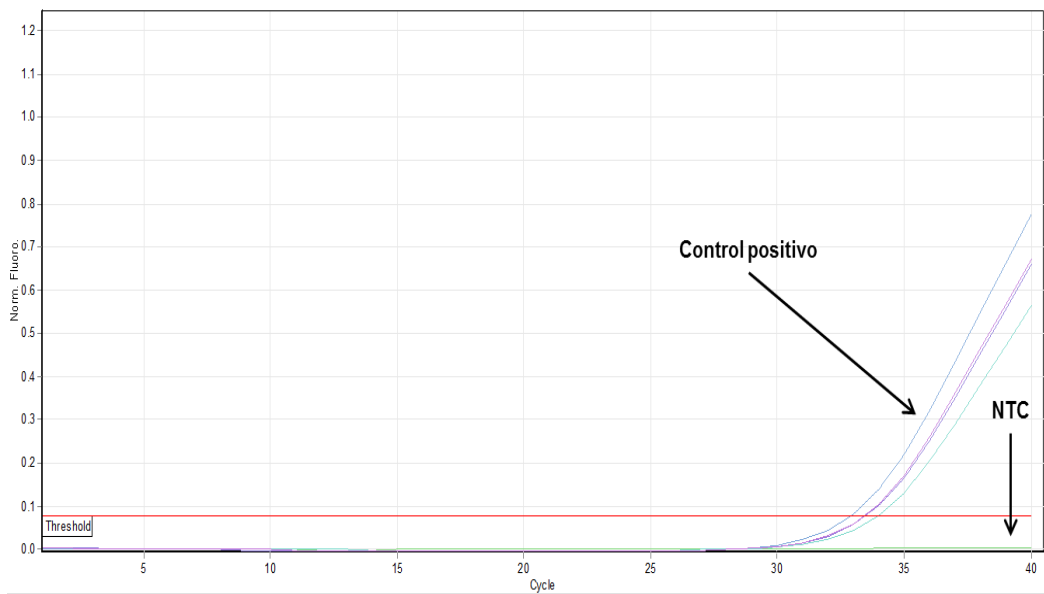


Figura 47. Expresión del gen *cva* en cepas UPEC por PCR en tiempo real. Control positivo: cepa de *E. coli* portadora del gen *cva* confirmado mediante secuenciación; NTC: Control sin templado.

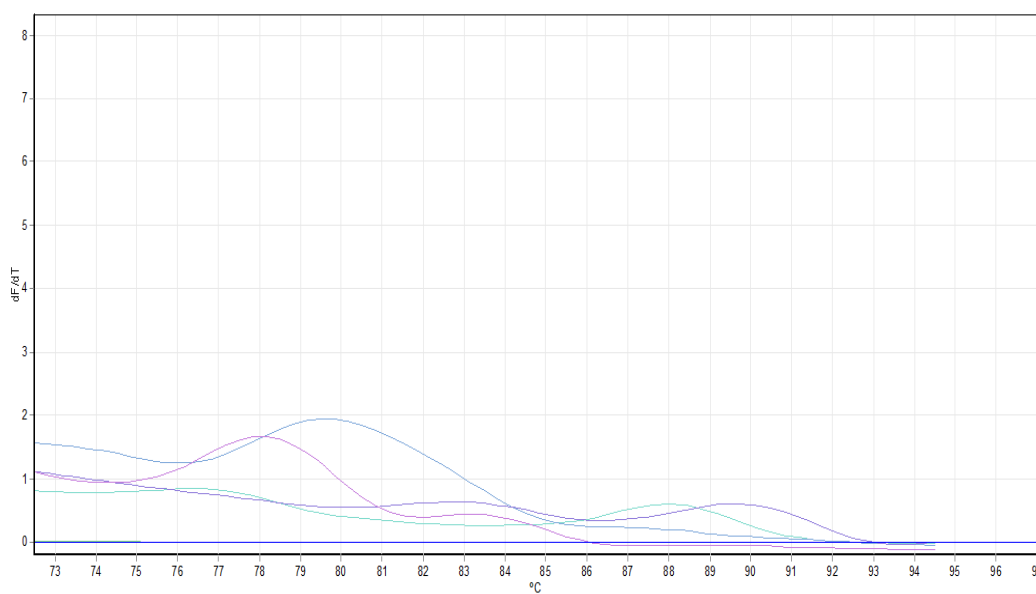


Figura 48. Curva de fusión (Melting point) de la expresión de *cva*.

Sistemas de adquisición de hierro

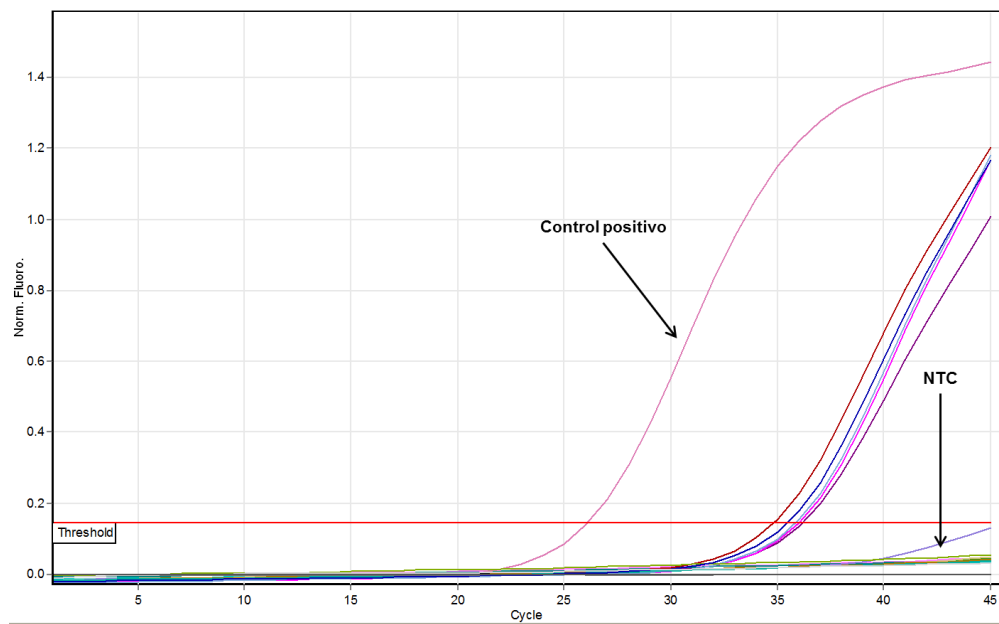


Figura 49. Expresión del gen *iuc* en cepas UPEC por PCR en tiempo real. Control positivo: cepa de *E. coli* portadora del gen *iuc* confirmado mediante secuenciación; NTC: Control sin templado.

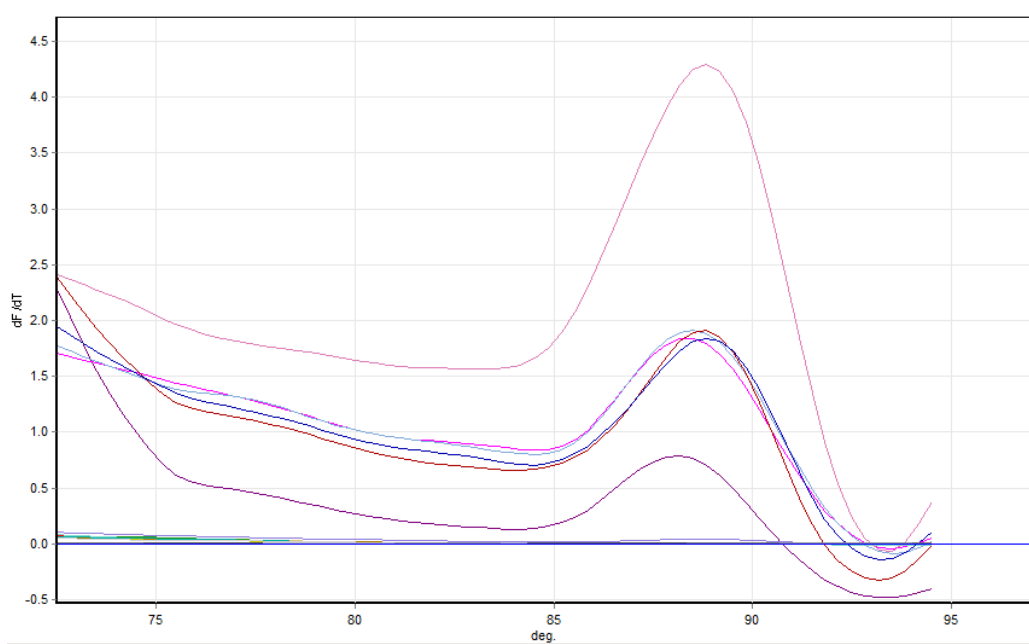


Figura 50. Curva de fusión (Melting point) de la expresión de *iuc*.

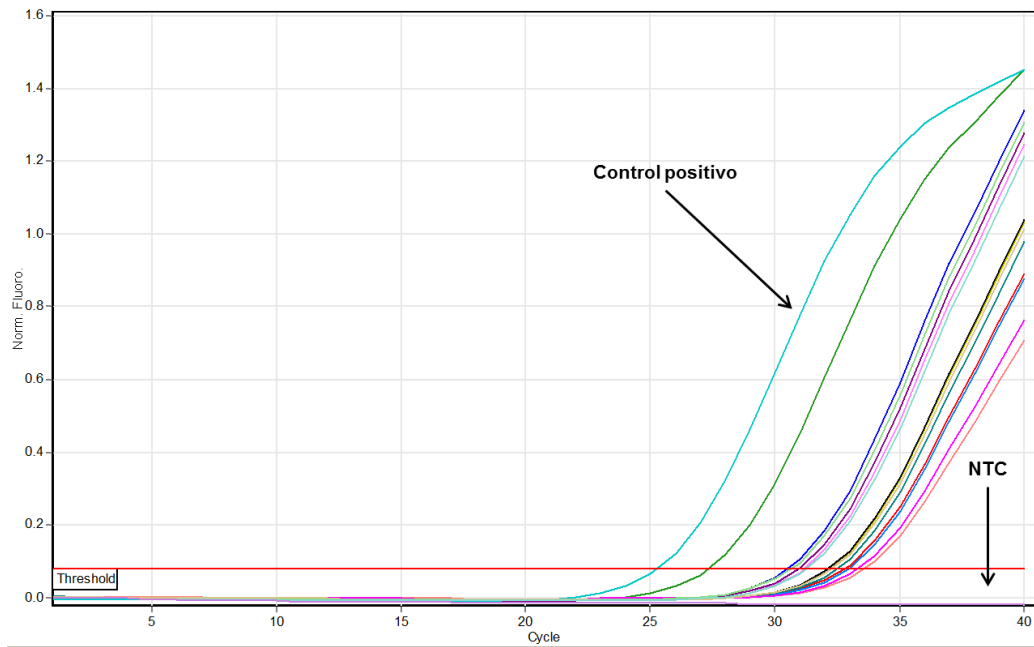


Figura 51. Expresión del gen *iroN* en cepas UPEC por PCR en tiempo real. Control positivo: cepa de *E. coli* portadora del gen *iroN* confirmado mediante secuenciación; NTC: Control sin templado.

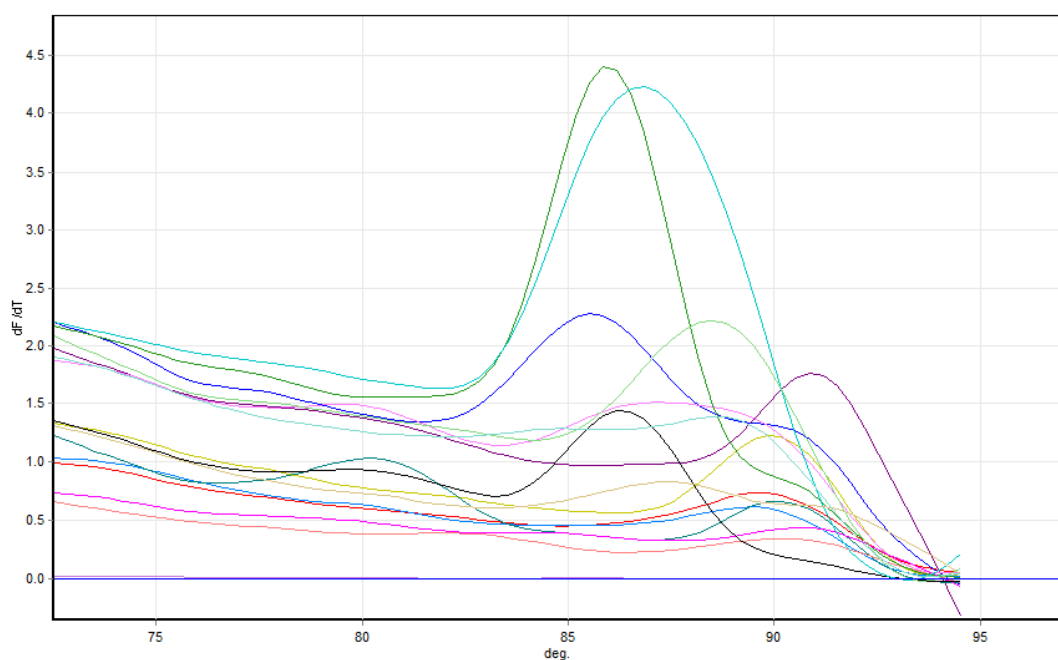


Figura 52. Curva de fusión (Melting point) de la expresión de *iroN*.

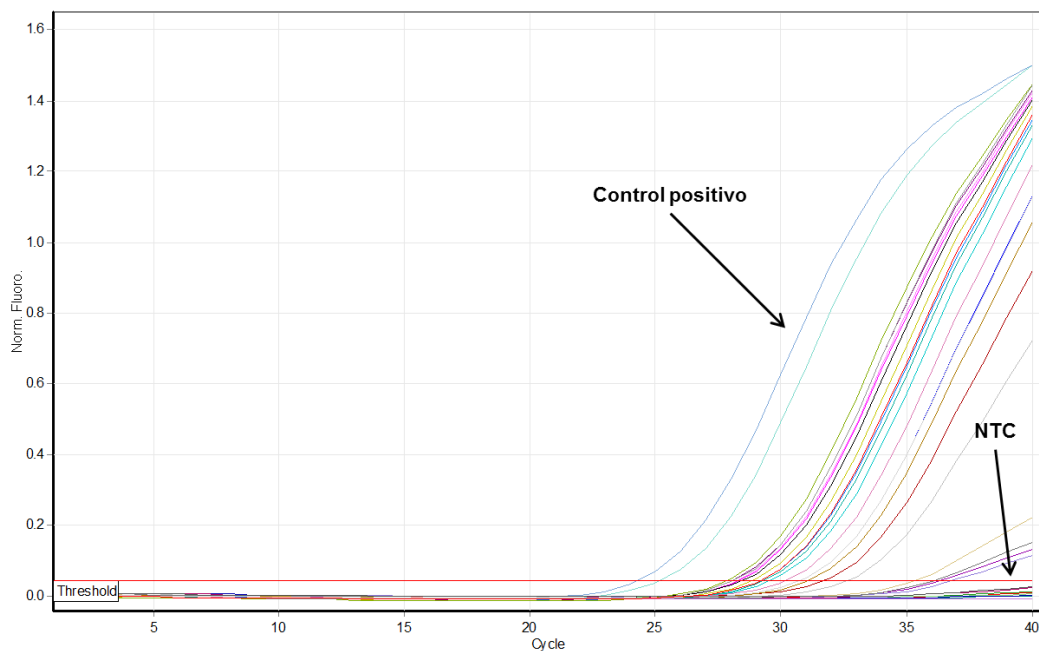


Figura 53. Expresión del gen *irp2* en cepas UPEC por PCR en tiempo real. Control positivo: cepa de *E. coli* portadora del gen *irp2* confirmado mediante secuenciación; NTC: Control sin templado.

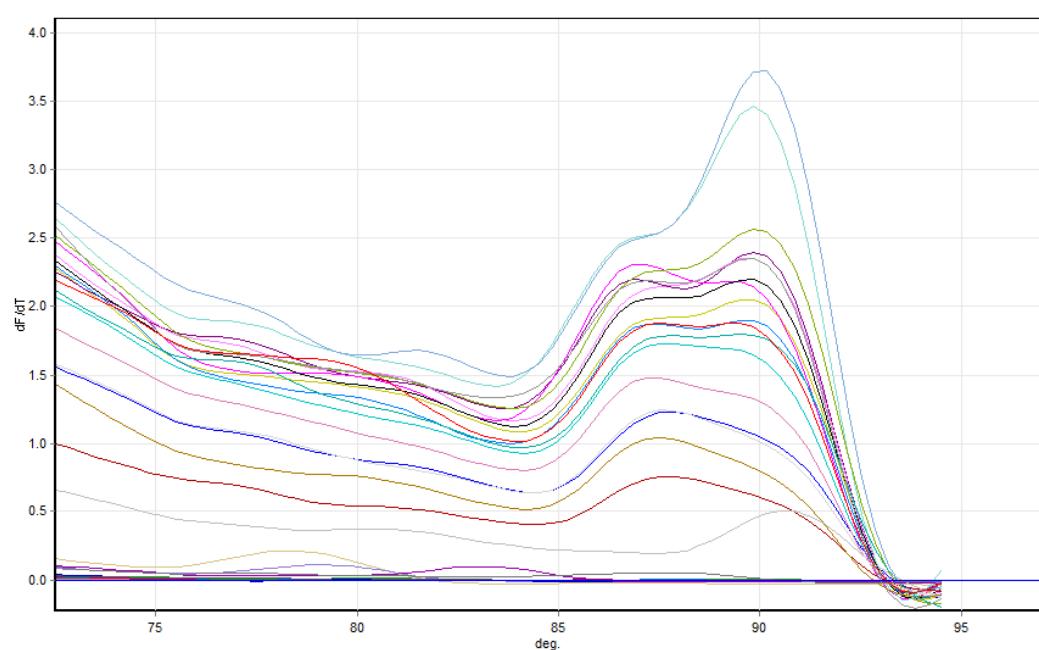


Figura 54. Curva de fusión (Melting point) de la expresión de *irp2*.

Protectinas

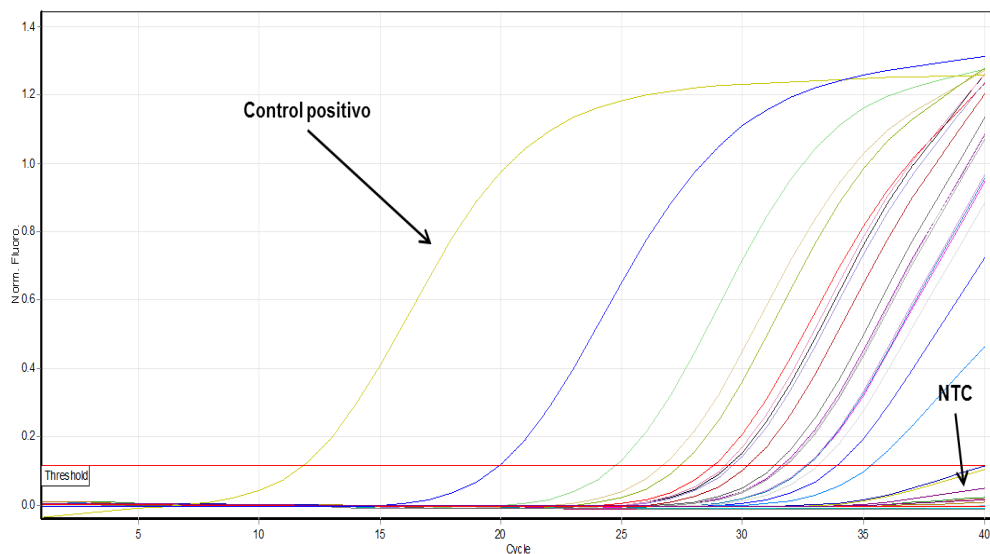


Figura 55. Expresión del gen *kpsMT* en cepas UPEC por PCR en tiempo real. Control positivo: cepa de *E. coli* portadora del gen *kpsMT* confirmado mediante secuenciación; NTC: Control sin templado.

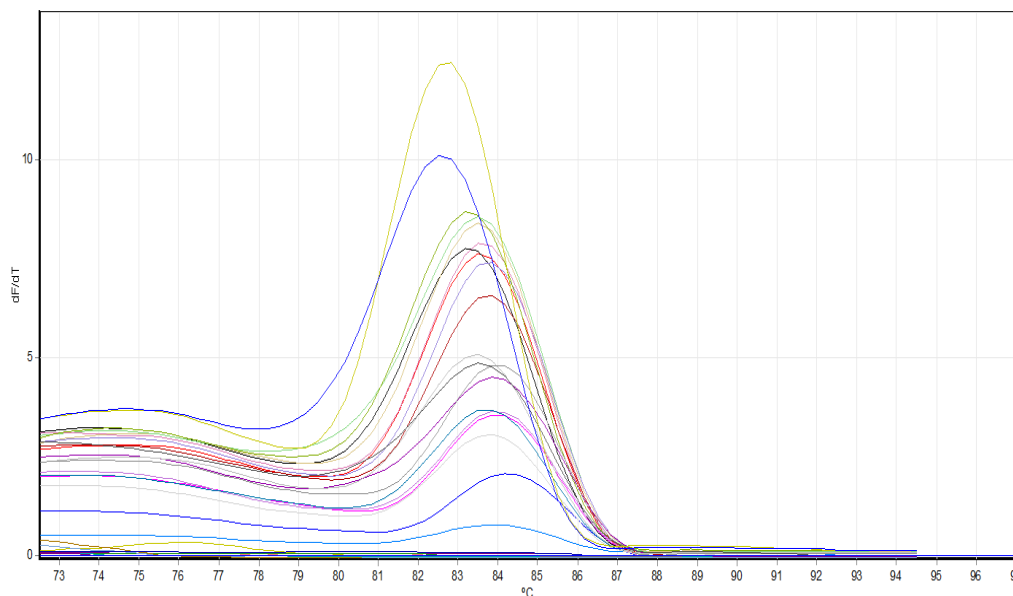


Figura 56. Curva de fusión (Melting point) de la expresión de *kpsMT*.

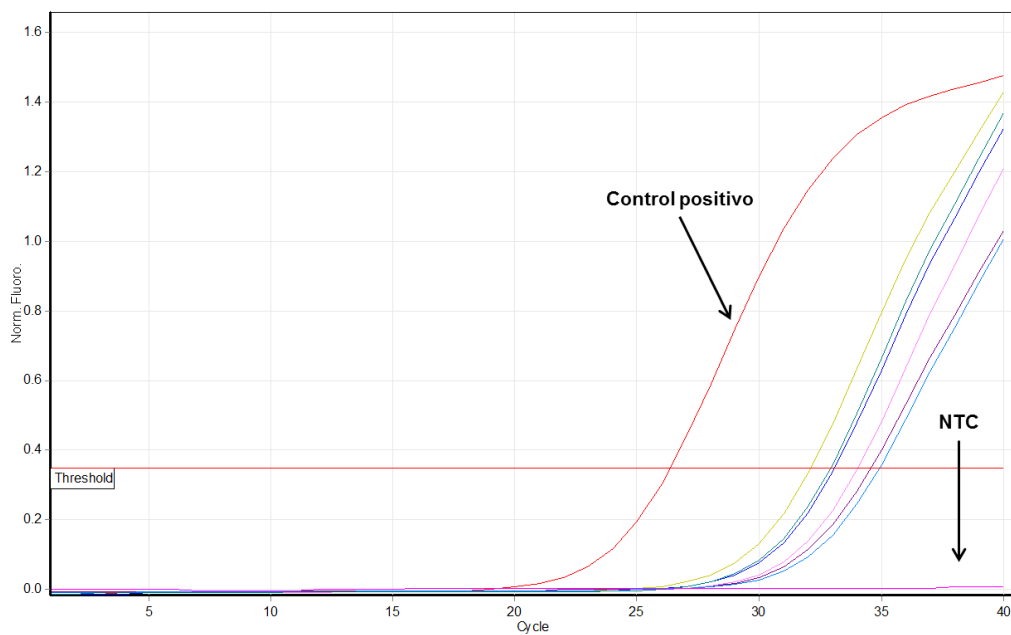


Figura 57. Expresión del gen *ompT* en cepas UPEC por PCR en tiempo real. Control positivo: cepa de *E. coli* portadora del gen *ompT* confirmado mediante secuenciación; NTC: Control sin templado.

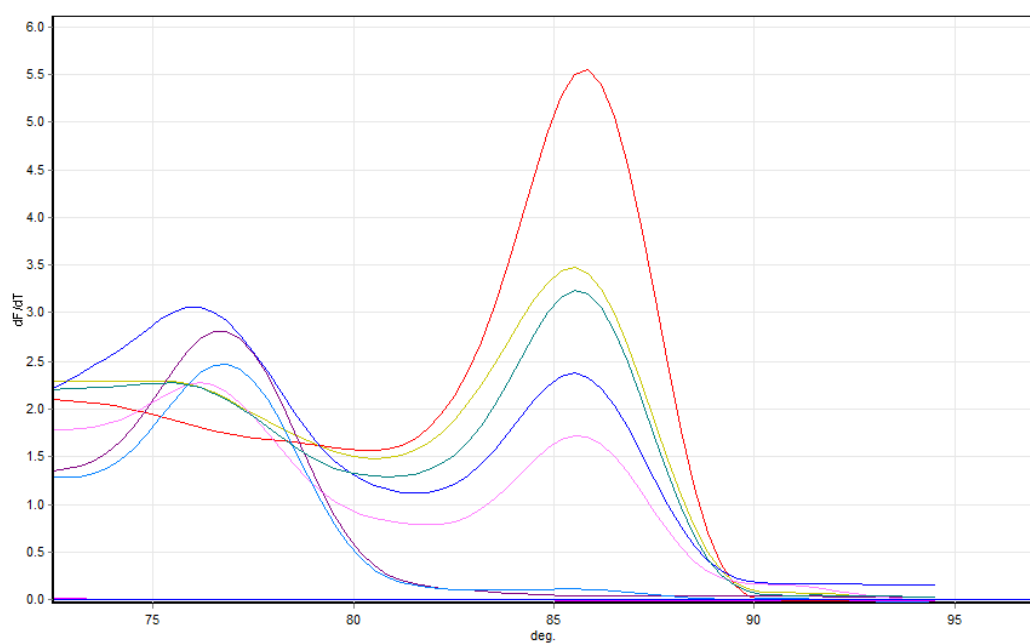


Figura 58. Curva de fusión (Melting point) de la expresión de *ompT*.

9. ANEXO 2

Fotografías de geles de agarosa

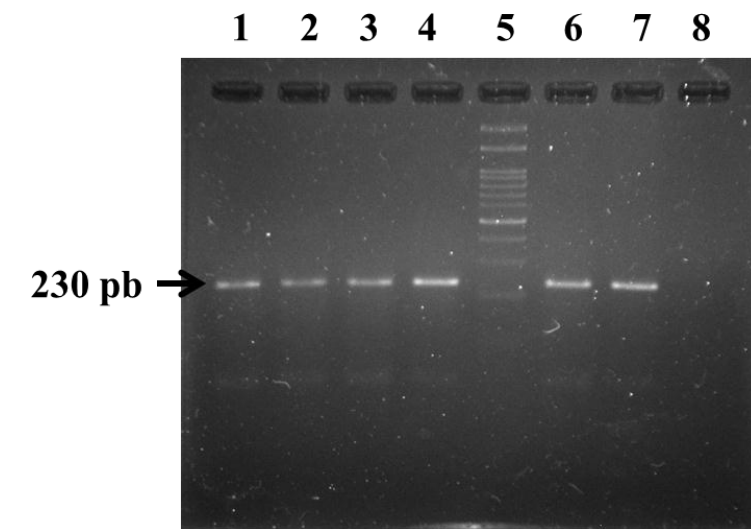


Figura 59. Identificación del serogrupo O25 en las cepas de *E. coli* uropatógenas por PCR convencional. Carriles 1-4 y 6: serogrupo O25 (amplicón de 230 pb); carril 5 MPM (100 pb); carril 7: control positivo, cepa de *E. coli* perteneciente al serogrupo O25; carril 8: control negativo (sin DNA).

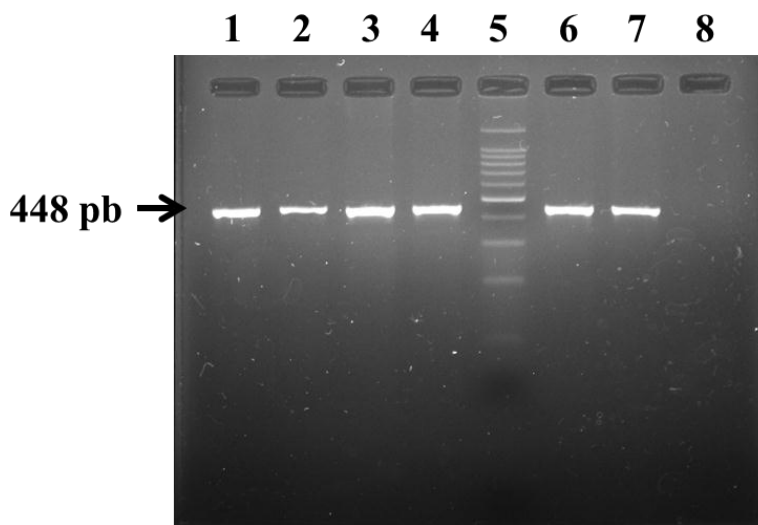


Figura 60. Identificación del serogrupo O8 en las cepas de *E. coli* uropatógenas por PCR convencional. Carriles 1-4 y 6: serogrupo O8 (amplicón de 448 pb); carril 5 MPM (100 pb); carril 7: control positivo, cepa de *E. coli* perteneciente al serogrupo O8; carril 8: control negativo (sin DNA).

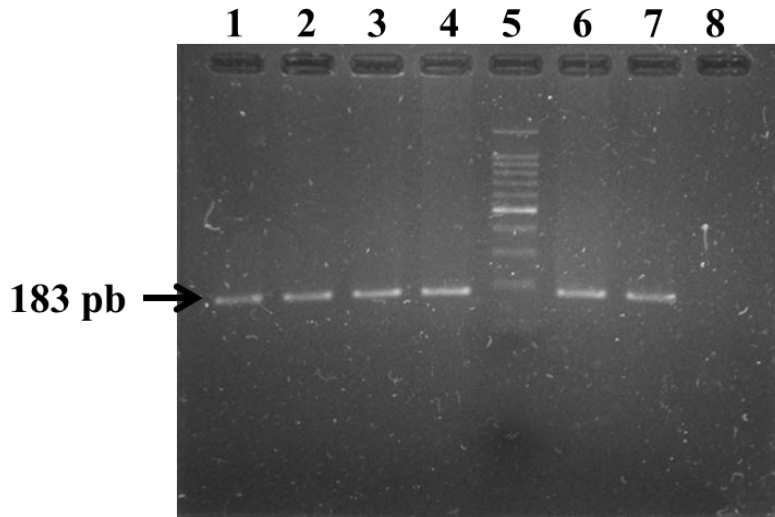


Figura 61. Identificación del serogrupo O15 en las cepas de *E. coli* uropatógenas por PCR convencional. Carriles 1-4 y 6: serogrupo O15 (amplicón de 183 pb); carril 5 MPM (100 pb); carril 7: control positivo, cepa de *E. coli* perteneciente al serogrupo O15; carril 8: control negativo (sin DNA).

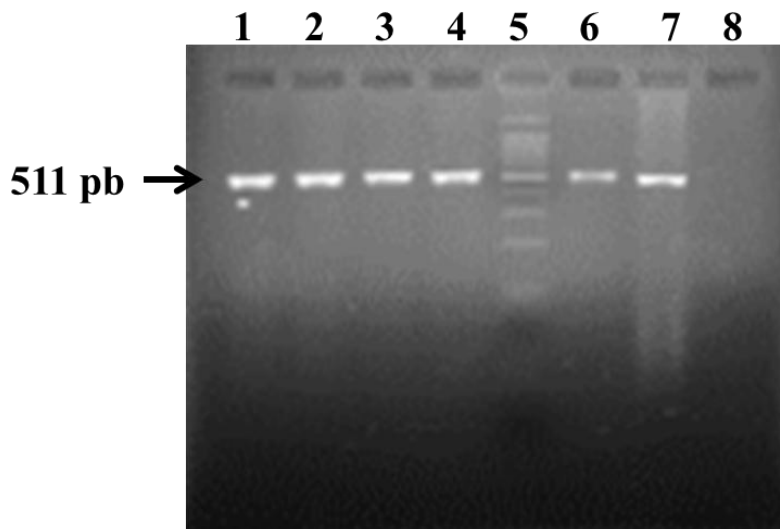


Figura 62. Identificación del serogrupo O75 en las cepas de *E. coli* uropatógenas por PCR convencional. Carriles 1-4 y 6: serogrupo O75 (amplicón de 511 pb); carril 5 MPM (100 pb); carril 7: control positivo, cepa de *E. coli* perteneciente al serogrupo O75; carril 8: control negativo (sin DNA).

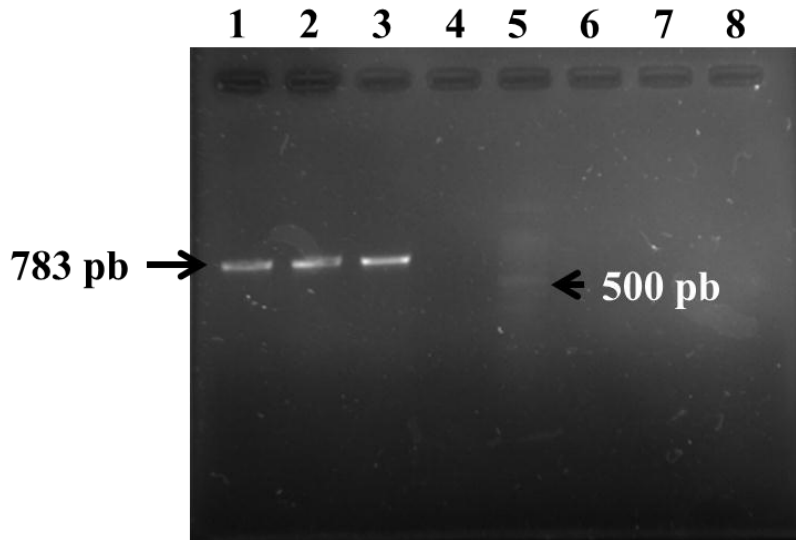


Figura 63. Identificación del serogrupo O6 en las cepas de *E. coli* uropatógenas por PCR convencional. Carriles 1 y 2: serogrupo O6 (amplicón de 783 pb); carril 5 MPM (100 pb); carril 3: control positivo, cepa de *E. coli* perteneciente al serogrupo O6; carril 4: control negativo (sin DNA).

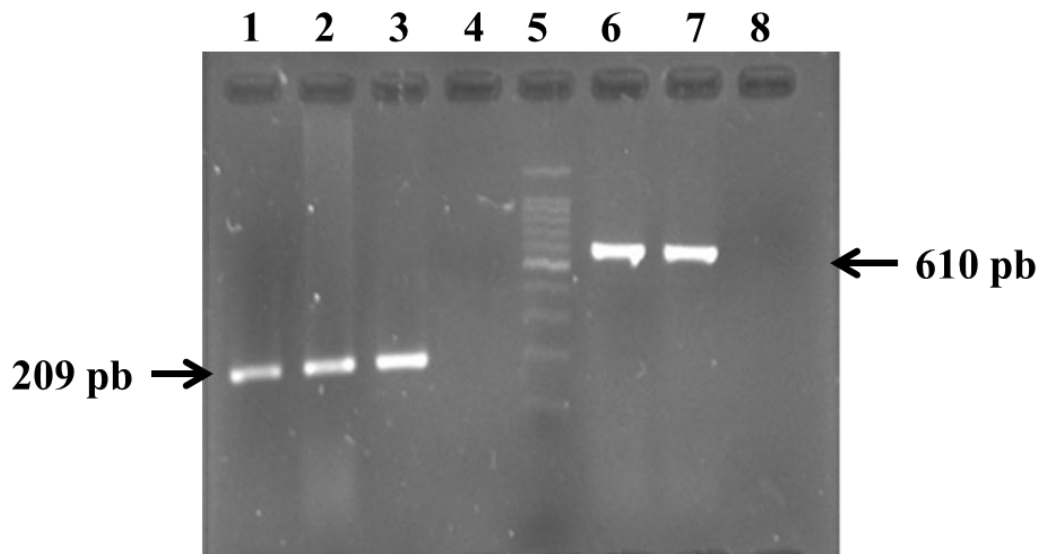


Figura 64. Identificación de los serogrupos O21 y O7 en las cepas de *E. coli* uropatógenas por PCR convencional. Carriles 1 y 2: serogrupo O21 (amplicón de 209 pb); carril 5 MPM (100 pb); carril 3: control positivo, cepa de *E. coli* perteneciente al serogrupo O21; carril 4: control negativo (sin DNA). Carril 6: serogrupo O7 (amplicón de 610 pb); carril 7: control positivo, cepa de *E. coli* perteneciente al serogrupo O7; carril 8: control negativo (sin DNA).

10. LITERATURA CITADA

1. Abraham JM, Freitag CS, Clements JR, Einstein BI. 1985. An invertible element of DNA control phase variation type of type 1 fimbriae of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 82(17):5724-5727.
2. Agarwal J, Mishra B, Srivastava S, Srivastava R. 2013. Genotypic characteristics and biofilm formation among *Escherichia coli* isolates from Indian women with acute cystitis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 107:183–187.
3. Agarwal J, Srivastava S, Singh M. 2012. Pathogenomics of uropathogenic *Escherichia coli*. *Indian J Med Microbiol* 30(2):141-149.
4. Alteri CJ, Mobley HL. 2007. Quantitative profile of the uropathogenic *Escherichia coli* outer membrane during growth in human urine. *Infect Immun* 75(6):2679-2688.
5. Ananias M, Yano T. 2008. Serogroups and virulence genotypes of *Escherichia coli* isolated from patients with sepsis. *Braz J Med Biol Res* 41:877–883.
6. Anderson GG, Goller CC, Justice S, Hultgren SJ, Seed PC. 2010. Polysaccharide capsule and sialic acid-mediated regulation promote biofilm-like intracellular bacterial communities during cystitis. *Infect Immun* 78(3):963-975.
7. Anderson GG, Palermo JJ, Schilling JD, Roth R, Heuser J, Hultgren SJ. 2003. Intracellular bacterial biofilm-like pods in urinary tract infections. *Science* 301(5629):105-107.
8. Antao EM, Wieler LH, Ewers C. 2009. Adhesive threads of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Pathog* 1(1):22.
9. Bach S, de Almeida A, Carniel E. 2000. The Yersinia high-pathogenicity island is present in different members of the family *Enterobacteriaceae*. *FEMS Microbiol Lett* 183(2):289-294.
10. Basalobre C, Silván JM, Berglund S, Mizunoe Y, Uhlin BE, Wal SN. 2006. Release of the type I secreted alpha-hemolysin via outer membrane vesicles from *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 59(1):99-112.
11. Bauer RJ, Zhang L, Foxman B, Siitonen A, Jantunen ME, Saxen H, Marrs CF. 2002. Molecular epidemiology of 3 putative virulence genes for *Escherichia coli* urinary tract infection-*usp*, *iha*, and *iroN* (*E. coli*). *J Infect Dis* 185(10):1521–1524.
12. Benz I, Schmidt MA. 2011. Structures and functions of autotransporter proteins in microbial pathogens. *Int J Med Microbiol* 301:461-468.
13. Berry RE, Klumpp DJ, Schaeffer AJ. 2009. Urothelial Cultures Support Intracellular Bacterial Community Formation by Uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect immune* 77: 2762–2772.

14. Bidet P, Mahjoub-Messai F, Blanco J, Blanco J, Dehem M, Aujard Y, Bingen E, Bonacorsi S. 2007. Combined multilocus sequence typing and O serogrouping distinguishes *Escherichia coli* subtypes associated with infant urosepsis and/or meningitis. *J Infect Dis* 196:297–303.
15. Bister B, Bischoff D, Nicholson GJ, Valdebenito M, Schelder K, Winkelmann G, Hantke K, Süssmuth RD. 2004. The structure of salmochelins: C-glucosylated enterobactins of *Salmonella enterica*. *Biometals* 17(4):471-481.
16. Blum G, Ott M, Lischewski A, Ritter A, Imrich H, Tschape H, Hacker J. 1994. Excision of large DNA regions termed pathogenicity islands from tRNA-specific loci in the chromosome of an *Escherichia coli* wild-type pathogen. *Infect Immun* 62:606-14.
17. Brumbaugh AR, Smith SN, Subashchandrabose A, Himpf SD, Hazen TH, Rasko DA, Mobley HL. 2015. Blocking Yersiniabactin import attenuates extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in cystitis and pyelonephritis and represents a novel target to prevent urinary tract infection. *Infect Immun* 83(4):1443-1450.
18. 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 USA* 103(34):12879-12884.
19. Cassat JE, Skaar EP. 2013. Iron in infection and immunity. *Cell Host Microbe* 13(5):509-519.
20. Cash P. 2014. Proteomic analysis of uropathogenic *Escherichia coli*. *Expert Rev Proteomics* 11(1):43-58.
21. Chaturvedi KS, Hung CS, Crowley JR, Stapleton AE, Henderson JP. 2012. The siderophore yersiniabactin binds copper to protect pathogens during infection. *Nat Chem Biol* 8(8): 731-736.
22. Chromek M, Brauner A. 2008. Antimicrobial mechanisms of the urinary tract. *J Mol Med* 86(1):37-47.
23. Corbett D, Roberts IS. 2008. Capsular polysaccharides in *Escherichia coli*. *Adv Appl Microbiol* 65:1-26.
24. Davis JM, Carvalho HM, Rasmussen SB, O'Brien AD. 2006. Cytotoxic necrotizing factor type 1 delivered by outer membrane vesicles of uropathogenic *Escherichia coli* attenuates polymorphonuclear leukocyte antimicrobial activity and chemotaxis. *Infect Immun* 74(8):4401-4408.
25. Dhakal BK, Mulvey MA. 2009. Uropathogenic *Escherichia coli* invades host cells via an HDAC6-modulated microtubule-dependent pathway. *J Biol Chem* 284(1):446-454.

26. Dhakal BK, Mulvey MA. 2012. The UPEC pore-forming toxin α -hemolysin triggers proteolysis of host proteins to disrupt cell adhesion, inflammatory, and survival pathways. *Cell Host Microbe* 11(1):58-69.
27. Ejrnaes K, Stegger M, Reisner A, Ferry A, Monsen T, Holm SE, Lundgren B, Frimodt-Moller N. 2011. Characteristics of *Escherichia coli* causing persistence or relapse of urinary tract infections. *Virulence* 2(6):528-537.
28. Elmore S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35(4):495-516.
29. Etienne-Manneville S, Hall A. 2002. Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420(6916):629-635.
30. Eto DS, Jones TA, Sundsbak JL, Mulvey MA. 2007. Integrin-Mediated Host Cell Invasion by Type 1-Piliated Uropathogenic *Escherichia coli*. *PLoS Pathog* 3:e100.
31. Ewers C, Janssen T, Kiessling S, Philipp HC, Wieler LH. 2005. Rapid detection of virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *Avian Dis* 49(2):269-273.
32. Fasano A, Noriega FR, Liao FM, Wang W, Levine MM. 1997. Effect of Shigella enterotoxin 1 (ShET1) on rabbit intestine *in vitro* and *in vivo*. *Gut* 40 (4):505-511.
33. F eria C, Machado J, Duarte Correia J, Gonçalves J, Gastra W. 2001. Distribution of *papG* alleles among uropathogenic *Escherichia coli* isolated from different species. *FEMS Microbiol Lett.* 202:205-208.
34. Fischbach MA, Lin H, Liu DR, Walsh CT. 2006a. How pathogenic bacteria evade mammalian sabotage in the battle of iron. *Nat Chem Biol* 2:132-138.
35. Fischbach MA, Lin H, Zhou L, Yu Y, Abergel RJ, Liu DR, Raymond KN, Wanner BL, Strong RK, Walsh CT, Aderem A, Smith KD. 2006b. The pathogen associated *iroA* gene cluster mediates bacterial evasion of lipocalin 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(44):16502-16507.
36. Fischer H, Ellstrom P, Ekstrom K, Gustafsson L, Gustafsson M, Svanborg C. 2007. Ceramide as TLR4 agonist; a putative signalling intermediate between sphingolipid receptors for microbial ligands and TLR4. *Cell Microbiol* 9(5):1239-1251.
37. Foxman B. 2003. Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. *Dis Mon* 49:53-70.
38. Foxman B. 2010. The epidemiology of urinary tract infection. *Nat Rev Urol* 7:653-660.
39. Frendeus B, Wachtler C, Hedlund M, Fischer H, Samuelsson P, Svensson M, Svanborg C. 2001. *Escherichia coli* P fimbriae utilize the Toll-like receptor 4 pathway for cell activation. *Mol Microbiol* 40(1):37-51.
40. Gal-Mor O, Finlay BB. 2006. Pathogenicity islands: a molecular toolbox for bacterial virulence. *Cell Microbiol* 8:1707-1719.

41. Garcia EC, Brumbaugh AR, Mobley HL. 2011. Redundancy and specificity of *Escherichia coli* iron acquisition systems during urinary tract infection. *Infect Immun* 79(3):1225-1235.
42. Garenaux A, Caza M, Dozois CM, 2011. The ins and outs of siderophore mediated iron uptake by extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Vet Microbiol* 153(1-2):89-98.
43. Garofalo CK, Hooton TM, Martin SM, Stamm WE, Palermo JJ, Gordon JI, Hultgren SJ. 2007. *Escherichia coli* from urine of female patients with urinary tract infections is competent for intracellular bacterial community formation. *Infect Immun* 75(1):52-60.
44. Goetz DH, Holmes MA, Borregaard N, Bluhm ME, Raymond KN, Strong RK. 2002. The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition. *Mol Cell* 10:1033-1043.
45. Goldberg MB, DiRita VJ, Calderwood SB. 1990. Identification of an iron-regulated virulence determinant in *Vibrio cholera*, using TnphoA mutagenesis. *Infect Immun* 58(1):55-60.
46. Hacker J, Kaper JB. 2000. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu Rev Microbiol* 54:641–679.
47. Hagan EC, Lloyd AL, Rasko DA, Faeberg GJ, Mobley HL. 2010. *Escherichia coli* global gene expression in urine from women with urinary tract infection. *PLoS Pathog* 6(11):e1001187.
48. Haley KP, Skaar EP. 2012. A battle for iron: host sequestration and *Staphylococcus aureus* acquisition. *Microbes Infect* 14(3):217-227.
49. Hamon MA, Batsché E, Régnauld B, Tham TN, Seveau S, Muchardt C, Cossart P. 2007. Histone modifications induced by a family of bacterial toxins. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(33):13467-13472.
50. Hancock V, Seshasayee AS, Ussery DW, Luscombe NM, Klemm P. 2008. Transcriptomics and adaptive genomics of the asymptomatic bacteriuria *Escherichia coli* strain 83972. *Mol Genet Genomics* 279:523-534.
51. Hancock V, Vejborg RM, Klemm P. 2010. Functional genomics of probiotics *Escherichia coli* Nissle 1917 and 83972, and UPEC strain CFT073: comparison of transcriptomes, growth and biofilm formation. *Mol Genet Genomics* 284(6):437-454.
52. Hannan TJ, Mysorekar IU, Chen SL, Walker JN, Jones JM, Pinkner JS, Hultgren SJ, Seed PC. 2008. LeuX tRNA-dependent and -independent mechanisms of *Escherichia coli* pathogens in acute cystitis. *Mol Microbiol* 67(1):116-128.
53. Hantke K, Nicholson G, Rabsch W, Winkelmann G. 2003. Salmochelins, siderophores of *Salmonella enterica* and uropathogenic *Escherichia coli* strains, are recognized by the outer membrane receptor IroN. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(7):3677-3682.

54. 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: 769-774.
55. He XL, Wang Q, Peng L, Qu YR, Puthiyakunnon S, Liu XL, Hui CY, Boddu S, Cao H, Huang SH. 2015. Role of uropathogenic *Escherichia coli* outer membrane protein T in pathogenesis of urinary tract infection. *FEMS Pathog Diseases* 73:doi:10.1093
56. Heimer SR, Rasko DA, Lockett CV, Johnson DE, Mobley HL. 2004. Autotransporter genes *pic* and *tsh* are associated with *Escherichia coli* strains that cause acute pyelonephritis and are expressed during urinary tract infection. *Infect Immun* 72(1):593-597.
57. Henderson IR, Czeczulin J, Eslava C, Noriega F, Nataro JP. 1999. Characterization of Pic, a secreted protease of *Shigella flexneri* and enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun* 67:5587-5596.
58. Henderson IR, Nataro JP. 2001. Virulence functions of autotransporter proteins. *Infect Immun* 69(3):1231-1243.
59. Henderson IR, Navarro-Garcia F, Desvaux M, Fernandez RC, Ala'Aldeen D. 2004. Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol Mol Biol Rev* 68(4):692-744.
60. Henderson JP, Crowley JR, Pinkner JS, Walker JN, Tsukayama P, Stamm WE, Hooton TM, Hultgren SJ. 2009. Quantitative metabolomics reveals an epigenetic blueprint for iron acquisition in uropathogenic *Escherichia coli*. *PLoS Pathog* 5(2):e1000305.
61. Hernday A, Krabbe M, Braaten B, Low D. 2002. Self-perpetuating epigenetic piliswitches in bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 99 (supl 4):16470-16476.
62. Holden NJ, Gally DL. 2004. Switches, cross-talk and memory in *Escherichia coli* adherence. *J Med Microbiol* 53:585-593.
63. Holden NJ, Totsika M, Mahler E, Roe AJ, Catherwood K, Lindner K, Dobrindt U, Gally DL. 2006. Demonstration of regulatory cross-talk between P fimbriae and type 1 fimbriae in uropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology* 152:1143-1153.
64. Hui CY, Guo Y, He QS, Peng L, Wu SC, Cao H, Huang SH. 2010. *Escherichia coli* outer membrane p-protease OmpT confers resistance to urinary cationic peptides. *Microbiol Immunol* 54(8):452-459.
65. Jadhav S, Hussain A, Devi S, Kumar A, Parveen S, Gandham N, Wieler LH, Ewers C, Ahmed N. 2011. Virulence characteristics and genetic affinities of multiple drug resistant uropathogenic *Escherichia coli* from a semi urban locality in India. *PLoS One* 6(3):e18063.
66. Johnson JR, Brown JJ. 1996. A novel multiply primed polymerase chain reaction assay for identification of variant papG genes encoding the Gal

- (alpha 1–4) Gal-binding PapG adhesins of *Escherichia coli*. *J Infect Dis* 173(4):920–926.
67. Johnson JR, Jelacic S, Schoening LM, Clabots C, Shaikh N, Mobley HL, Tarr PI. 2005a. The IrgA homologue adhesin Iha is an *Escherichia coli* virulence factor in murine urinary tract infection. *Infect Immun* 73(2):965–971.
68. Johnson JR, Kaster N, Kuskowski MA, Ling GV. 2003. Identification of urovirulence traits in *Escherichia coli* by comparison of urinary and rectal *E. coli* isolates from dogs with urinary tract infection. *J Clin Microbiol* 41(1):337–345.
69. Johnson JR, Kuskowski MA, Gajewski A, Soto S, Horcajada JP, Jiménez de Anta MT, Vila J. 2005b. Extended virulence genotypes and phylogenetic background of *Escherichia coli* isolates from patients with cystitis, pyelonephritis or prostatitis. *J Infect Dis* 191(1):46–50.
70. Johnson JR, Russo TA, Brown JJ, Stapleton A. 1998. *papG* alleles of *Escherichia coli* strains causing first-episode or recurrent acute cystitis in adult women. *J Infect Dis* 177:97–101.
71. Johnson JR, Russo TA, Tarr PI, Carlino U, Bilge SS, Vary JC Jr, Stell AL. 2000. Molecular epidemiological and phylogenetic associations of two novel putative virulence genes, *iha* and *iroN* (*E. coli*), among *Escherichia coli* isolates from patients with urosepsis. *Infect Immun* 68(5):3040–3047.
72. Johnson JR, Stell AL. 2000. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *J Infect Dis* 181:261–72.
73. Justice SS, Hung C, Theriot JA, Fletcher DA, Anderson GG, Footer MJ, Hultgren SJ. 2004. Differentiation and developmental pathways of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(5):1333–1338.
74. Kanamaru S, Kurazono H, Ishitoya S, Terai A, Habuchi T, Nakano M, Ogawa O, Yamamoto S. 2003. Distribution and genetic association of putative uropathogenic virulence factors *iroN*, *iha*, *kpsMT*, *ompT* and *usp* in *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections in Japan. *J Urol* 170(6 Pt 1):2490–2493.
75. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2(2):123–140.
76. Kerrn MB, Struve C, Blom J, Frimodt-Moller N, Krogfelt KA. 2005. Intracellular persistence of *Escherichia coli* in urinary bladders from mecillinam-treated mice. *J Antimicrob Chemother* 55(3):383–386.
77. King JE, Owaiif HA, Jia J, Roberts IS. 2015. Phenotypic heterogeneity in expression of the K1 polysaccharide capsule of uropathogenic *Escherichia coli* and downregulation of the capsule genes during growth in urine. *Infect Immun* 83(7):2605–2612.
78. Koh EI, Hung CS, Parker KS, Crowley JR, Giblin DE, Henderson JP. 2015. Metal selectivity by the virulence-associated yersiniabactin metallophore system. *Metallomics* 7(6):1011–1022.

79. Kramer RA, Zandwijken D, Egmond MR, Dekker N. 2000. *In vitro* folding, purification and characterization of *Escherichia coli* outer membrane protease ompT. *Eur J Biochem* 267(3):885-893.
80. Kuehn MJ, Kesty NC. 2005. Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. *Genes Dev* 19(22):2645-2655.
81. Lalioui L, Le Bouguéneq C. 2002. *afa-8* gene cluster is carried by pathogenicity island inserted into the tRNA(Phe) of human and bovine pathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 70(6):3308
82. Lane MC, Alteri CJ, Smith SN, Mobley HL. 2007. Expression of flagella is coincident with uropathogenic *Escherichia coli* ascension to the upper urinary tract. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(42):16669-16674.
83. Lane MC, Mobley HL. 2007. Role of P-fimbrial-mediated adherence in pyelonephritis and persistence of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) in the mammalian kidney. *Kidney Int* 72(1):19-25.
84. Le Bouguenec C, Archambaud M, Labigne A. 1992. Rapid and specific detection of the *pap*, *afa*, and *sfa* adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 30(5):1189–1193.
85. Le Bouguenec C, Servin AL. 2006. Diffusely adherent *Escherichia coli* strains expressing Afa/Dr adhesins (Afa/Dr DAEC): Hitherto unrecognized pathogens. *FEMS Microbiol Lett* 256(2):185-194.
86. Lee JW, Helmann JD. 2007. Functional specialization within the Fur family of metalloregulators. *Biometals* 20(3-4):485-499.
87. Lemonnier M, Landraud L, Lemichez E. 2007. Rho GTPase-activating bacterial toxins: from bacterial virulence regulation to eukaryotic cell biology. *FEMS Microbiol Rev* 31(5):515-534.
88. Li D, Liu B, Chen M, Guo D, Guo X, Liu F, Fng L, Wang L. 2010. A multiplex PCR method to detect 14 *Escherichia coli* serogroups associated with urinary tract infections. *J Microbiol Meth*
89. Lindberg S, Xia Y, Sondén B, Göransson M, Hacker J, Uhlin BE. 2007. Regulatory interactions among adhesion gene systems of uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 76(2):771-780.
90. Liu B, Knirel YA, Feng L, Perepelov AV, Senchenkova SN, Wang Q, Reeves PR, Wang L. 2008. Structure and genetics of Shigella O antigens. *FEMS Microbiol Rev* 32:627–653.
91. Lloyd AL, Rasko DA, Mobley HL. 2007. Defining genomic islands and uropathogen-specific genes in uropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 189:3532–3546.
92. Lüthje P, Brauner A. 2014. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* and their interaction with the host. *Adv Microbiol Physiol* 65:337-372.
93. Mak RH, Kuo HJ. 2006. Pathogenesis of urinary tract infection: an update. *Curr Opin Pediatr* 18(2):148-152.

94. Marrs CF, Zhang L, Foxman B. 2005. *Escherichia coli* mediated urinary tract infections: are there distinct uropathogenic *E. coli* (UPEC) pathotypes? *FEMS Microbiol Lett* 252(2):183-190.
95. Martinez JJ, Mulvey MA, Schilling JD, Pinkner JS, Hultgren SJ. 2000. Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells. *EMBO J* 19(12):2803-2812.
96. Mashburn-Warren LM, Whiteley M. 2006. Special delivery: vesicle trafficking in prokaryotes. *Mol microbial* 61(4):839-846.
97. Mendez-Arancibia E, Vargas M, Soto S, Ruiz J, Kahigwa E, Schellenberg D, Urassa H, Gascón J, Vila J. 2008. Prevalence of different virulence factors and biofilm production in enteroaggregative *Escherichia coli* isolates causing diarrhea in children in Ifakara (Tanzania). *Am J Trop Med Hyg* 78(6):985-989.
98. Mirzarazi M, Rezatofghi SE, Pourmahdi M, Mohajeri MR. 2015. Occurrence of genes encoding enterotoxins in uropathogenic *Escherichia coli* isolates. *Brazilian J Microbiol* 46(1):155-159.
99. Miyazaki J, Ba-Thein W, Kumao T, Yasukoa MO, Akaza H, Hayashi H. 2002. Type 1, P and S fimbriae, and afimbrial adhesin I are not essential for uropathogenic *Escherichia coli* to adhere to and invade bladder epithelial cells. *FEMS immunol Med Microbiol* 33(1):23-26.
100. Molina-López J, Aparicio-Ozores G, Ribas-Aparicio RM, Gavilanes-Parra S, Chávez-Barrocal ME, Hernández-Castro R, Manjarrez-Hernández HA. 2011. Drug resistance, serotypes, and phylogenetic groups among uropathogenic *Escherichia coli* including O25-ST131 in Mexico City. *J Infect Dev Ctries* 5:840-9.
101. Momtaz H, Dehkordi FS, Rahimi E, Asgarifar A. 2013a. Detection of *Escherichia coli*, *Salmonella* species, and *Vibrio cholera* in tap water and bottled drinking water in Isfahan, Iran. *BMC Public Health* 13(1);556.
102. Momtaz H, Karimian A, Madani M, Safarpour F, Ranjbar R, Sarshar M, Souod N. 2013b. Uropathogenic *Escherichia coli* in Iran: serogroup distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 12:8 doi:10.1186.
103. Morales-Espinosa R, Hernández-Castro R, Delgado G, Mendez JL, Navarro A, Manjarrez A, Cravioto A. 2016. UPEC strain characterization isolated from Mexican patients with recurrent urinary tract infections. *J Infect Dev Ctries* 10(4):317-328.
104. Müller CM, Aberg A, Straseviciene J, Emody L, Uhlin BE, Balsalobre C. 2009. Type 1 fimbriae, a colonization factor of uropathogenic *Escherichia coli*, are controlled by the metabolic sensor CRP-cAMP. *PLoS Pathog* 5(2):e1000303.

105. Mulvey MA. 2002. Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol* 4:257-71.
106. Mulvey MA, Schilling JD, Hultgreen SJ. 2001. Establishment of a persistent *Escherichia coli* reservoir during the acute phase of a bladder infection. *Infect Immun* 69:4572-4579.
107. Mysorekar IU, Hultgren SJ. 2006. Mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli* persistence and eradication from the urinary tract. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(38):14170-14175.
108. Navarro-Garcia F, Gutierrez-Jimenez J, Garcia-Tovar C, Castro LA, Salazar-Gonzalez H, Cordova V. 2010. Pic, an autotransporter protein secreted by different pathogens in the *Enterobacteriaceae* family, is a potent mucus secretagogue. *Infect Immun* 72(1):4101-4109.
109. Nipic D, Podlesek Z, Budic M, Crnigoj M, Zgur-Bertok D. 2013. *Escherichia coli* uropathogenic-specific protein, Usp, is a bacteriocin-like genotoxin. *J Infect Dis* 208:1545-1552.
110. Norinder BS, Luthje P, Yadav M, Kadas L, Fang H, Nord CE, Brauner A. 2011. Cellulose and PapG are important for *Escherichia coli* causing recurrent urinary tract infection in women. *Infection* 39(6):571-574.
111. Ooka T, Terajima J, Kusumoto M, Iguchi A, Kurokawa K, Ogura Y, Asadulghani M, Nakayama K, Murase K, Ohnishi M, Iyoda S, Watanabe H, Hayashi T. 2009. Development of a multiplex PCR-based rapid typing method for enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains. *J Clin Microbiol* 47(9):2888-2894.
112. Paniagua-Contreras GL, Hernández-Jaimes T, Monroy-Pérez E, Vaca-Paniagua F, Díaz-Velásquez C, Uribe-García A, Vaca S. 2017. Comprehensive expression analysis of pathogenicity genes in uropathogenic *Escherichia coli* strains. *Microb Pathog* 103:1-7.
113. Paniagua-Contreras GL, Monroy-Pérez E, Rodríguez-Moctezuma JR, Domínguez-Trejo P, Vaca-Paniagua F, Vaca S. 2015. Virulence factors, antibiotic resistance phenotypes and O-serogroups of *Escherichia coli* strains isolated from community-acquired urinary tract infection patients in Mexico. *J Microbiol Immunol Infect* pii: S1684-1182(15)00827-0.
114. Parham NJ, Pollard SJ, Desvaux M, Scott-Tucker A, Liu C, Fivian A, Henderon IR. 2005. Distribution of the serine protease autotransporters of the *Enterobacteriaceae* among extraintestinal clinical isolates of *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 43(8):4076-4082.
115. Park BS, Lee JO. 2013. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. *Exp Mol Med* 45:e66.
116. Parreira VR, Gyles CL. 2003. A novel pathogenicity island integrated adjacent to the *thrW tRNA* gene of avian pathogenic *Escherichia coli*

- encodes a vacuolating autotransporter protein. *Infect Immun* 71(9):5087-5096.
117. Rahdar M, Rashki A, Miri HR, Ghalehnoo MR. 2015. Detection of *pap*, *sfa*, *afa*, *foc* and *fim* adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* isolates collected from patients with urinary tract infection. *Jundishapur J Microbiol* 8(8):e22647.
 118. Rakin A, Schneider L, Podlchalchikova O. 2012. Hunger for iron: the alternative siderophore iron scavenging systems in highly virulent *Yersinia*. *Front Cell Infect Microbiol* 2:151 doi:10.3389/fcimb.2012.00151.
 119. Ratner AJ, Hippe KR, Aguilar JL, Bender MH, Nelson AL, Wesler JN. 2006. Epithelial cells are sensitive detectors of bacterial pore-forming toxins. *J Biol Chem* 281(18):12994-12998.
 120. Reigstad CS, Hultgren SJ, Gordon JI. 2007. Functional genomic studies of uropathogenic *Escherichia coli* and host urothelial cells when intracellular bacterial communities are assembled. *J Biol Chem* 282(29):21259-21267.
 121. Restieri C, Garriss G, Locas MC, Dozols CM. 2007. Autotransporter-encoding sequences are phylogenetically distributed among *Escherichia coli* clinical isolates and reference strains. *Appl Environ Microbiol* 73(5):1553-1562.
 122. Rijavec M, Müller-Premru M, Zakotnik B, Zgur-Bertok D. 2008. Virulence factors and biofilm production among *Escherichia coli* strains causing bacteraemia of urinary tract origin. *J Med Microbiol* 57(Pt 11):1329-1334.
 123. Roos V, Klemm P. 2006. Global gene expression profiling of the asymptomatic bacteriuria *Escherichia coli* strain 83972 in the human urinary tract. *Infect Immun* 74(6):3565-3575.
 124. Roos V, Ulett GC, Schembri MA, Klemm P. 2006. The asymptomatic bacteriuria *Escherichia coli* strain 83972 outcompetes uropathogenic *E. coli* strains in human urine. *Infect Immun* 74(1): 615-624.
 125. Rosen DA, Hooton TM, Stamm WE, Humphrey PA, Hultgren SJ. 2007. Detection of intracellular bacterial communities in human urinary tract infections. *PLoS Med* 4(12):e329.
 126. Ruiz J, Simon K, Horcajada JP, Velasco M, Barranco M, Roig G, Moreno-Martínez A, Martínez JA, Jiménez de Anta T, Mensa J, Vila J. 2002. Differences in virulence factors among clinical isolates of *Escherichia coli* causing cystitis and pyelonephritis in women and prostatitis in men. *J Clin Microbiol* 40(12):4445-4449.
 127. Ruiz-Perez F, Wahid R, Faherty CS, Kolappaswamy K, Rodriguez L, Santiago A, Murphy E, Cross A, Sztein MB, Nataro JP. 2011. Serine protease autotransporter from *Shigella flexneri* and pathogenic *Escherichia*

- coli* target a broad range of leukocyte glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 108(31):12881-12886.
128. Russo TA, Johnson JR. 2000. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *J Infect Dis* 181:1753–1754.
 129. Sarkar S, Ulett GC, Totsika M, Phan M-D, Schembri MA. 2014. Role of capsule and antigen O in the virulence of uropathogenic *Escherichia coli*. *PLoS ONE* 9(4):e94786.
 130. Samuelsson P, Hang L, Wullt B, Irjala H, Svanborg C. 2004. Toll-like receptor 4 expression and cytokine responses in the human urinary tract mucosa. *Infect Immun* 72(6):3179-3186.
 131. Schaeller M, Bein M, Korting CH, Baur S, Hamm G, Monod M, Beinhauer S, Hube B. 2003. The Secreted Aspartyl Proteinases Sap1 and Sap2 Cause Tissue Damage in an in Vitro Model of Vaginal Candidiasis Based on Re-constituted Human Vaginal Epithelium. *Infect Immun* 71:3227-3234.
 132. Schilling JD, Martin SM, Hunstad DA, Patel KP, Mulvey MA, Justice SS, Lorenz RG, Hultgren SJ. 2003. CD14- and Toll-like receptor-dependent activation of bladder epithelial cells by lipopolysaccharide and type 1 pilated *Escherichia coli*. *Infect Immun* 71(3):1470-1480.
 133. Schilling JD, Mulvey MA, Vincent CD, Lorenz RG, Hultgren SJ. 2001. Bacterial invasion augments epithelial cytokine responses to *Escherichia coli* through a lipopolysaccharide-dependent mechanism. *J Immunol* 166(2):1148-1155.
 134. Scholes D, Hooton TM, Roberts PL, Gupta K, Stapleton AE, Stamm WE. 2005. Risk factors associated with acute pyelonephritis in healthy women. *Ann Intern Med* 142(1):20-27.
 135. Schubert S, Darlu P, Clermont O, Wieser A, Giuseppe M, Hoffmann C, Weinert K, Tenaillon O, Matic I, Denamur E. 2009. Role of intraspecies recombination in the spread of pathogenicity islands within the *Escherichia coli* species. *PLoS Patho* 5(1):e1000257.
 136. Schubert S, Rakin A, Karch h, Carniel E, Heesemann J. 1998. Prevalence of the high-pathogenicity island of Yersinia species among *Escherichia coli* strains that are pathogenic to humans. *Infect Immun* 66(2):480-485.
 137. Schwan WR, Lee JL, Lenard FA, Matthews BT, Beck MT. 2002. Osmolarity and pH growth conditions regulate *fim* gene transcription and type 1 pilus expression in uropathogeni *Escherichia coli*. *Infect Immun* 70(3):1391-1402.
 138. Sivick KE, Mobley HL. 2010. Waging war against uropathogenic *Escherichia coli*: winning back the urinary tract. *Infect Immun* 78(2):568-585.

139. Smati M, Magistro G, Adiba S, Wieser A, Picard B, Schubert S, Denamur E. 2016. Strain-specific impact of the high-pathogenicity island on virulence in extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol* 307(1):44-56.
140. Smith KD. 2007. Iron metabolism at the host pathogen interface: lipocalin 2 and the pathogen-associated iroA gene cluster. *Int J Biochem Cell Biol* 39(10): 1776-1780.
141. Smith KD, Andersen-Nissen E, Hayashi F, Strobe K, Bergman MA, Barrett SL, Cookson BT, Aderem A. 2003. Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility. *Nat Immunol* 4(12):1247-1253.
142. Snyder JA, Haugen BJ, Buckles EL, Lockett CV, Johnson DE, Donnenberg MS, Welch RA, Mobley HL. 2004. Transcriptome of uropathogenic *Escherichia coli* during urinary tract infection. *Infect Immun* 72(11):6373-6381.
143. Stordeur P, Bree A, Mainil J, Moulin-Schouleur M. 2004. Pathogenicity of pap-negative avian *Escherichia coli* isolated from septicemic lesions. *Microbes Infect* 6(7):637-645.
144. Torres AG, Redford P, Welch RA, Payne SM. 2001. TonB-dependent systems of uropathogenic *Escherichia coli*: aerobactina and heme transport and TonB are required for virulence in the mouse. *Infect Immun* 69(10):6179-6185.
145. Snyder JA, Haugen BJ, Lockett CV, Maroncle N, Hagan EC, Johnson DE, Welch RA, Mobley HL. 2005. Coordinate expression of fimbriae in uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 73(11): 7588-7596.
146. Soto SM, Guiral E, Bosch J, Vila J. 2009. Prevalence of the set-1B and astA genes encoding enterotoxins in uropathogenic *Escherichia coli* clinical isolates. *Microb Pathog* 47(6):305–307.
147. Spurbeck RR, Stapleton AE, Johnson JR, Walk ST, Hooton TM, Mobley HL. 2011. Fimbrial profiles predict virulence of uropathogenic *Escherichia coli* strains: contribution of *ygi* and *yad* fimbriae. *Infect Immun* 79(12):4753-4763.
148. Stamm WE. 1982. Recent developments in the diagnosis and treatment of urinary tract infections. *Western J Med* 137(3):213-220.
149. Stenutz R, Weintraub A, Widmalm G. 2006. The structures of *Escherichia coli* O-polysaccharide antigens. *FEMS Microbiol Rev* 30:382-403.
150. Struve C, Krogfelt KA. 1999. In vivo detection of *Escherichia coli* type 1 fimbrial expression and phase variation during experimental urinary tract infection. *Microbiol* 145(Pt10):2683–2690.
151. Subashchandrabose S, Mobley HL. 2015a. Virulence and fitness determinants of uropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr* 3(4):.doi:10.1128/microbiolspec.UTI-0015-2012.

152. Subashchandrabose S, Mobley HL. 2015b. Back to the metal age: battle for metals at the host-pathogen inference during urinary tract infection. *Metallomics* 7(6):935-942.
153. Tabasi M, Asadi Karam MR, Habibi M, Yekaninejad MS, Bouzari S. 2015. Phenotypic assays to determine virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) isolates and their correlation with antibiotic resistance. *Osongong Public Health Res Perspect* 6(4):261-268.
154. 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. *Inter J Infect Dis* 17:e450-3.
155. Tarr PI, Bilge SS, Vary JC, Jelacic JrS, Habeeb RL, Ward TR, Baylor MR, Besser TE. 2000. Iha: a novel *Escherichia coli* O157:H7 adherence-conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure. *Infect Immun* 68(3):1400-1407.
156. Telli M, Guiral E, Martínez JA, Almela M, Bosch J, Vila J, Soto SM. 2010. Prevalence of enterotoxins among *Escherichia coli* isolates causing bacteraemia. *FEMS Microbiol Lett* 306(2):117-121.
157. Thomas WE, Nilsson LM, Forero M, Sokurenko EV, Vogel V. 2004. Shear-dependent "stick-and-roll" adhesion type 1 fimbriated *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 53(5):1545-1557.
158. Thong KL, Hoe SL, Puthuchearu SD, Yasin R. 2005. Detection of virulence genes in Malaysian *Shigella* species by multiplex PCR assay. *BMC Infect Dis* 14:5-8.
159. Tivendale K. 2000. Assessing the role of the virulence plasmid in avian pathogenic *Escherichia coli*. University of Melbourne: B.Sc. (Hons.).
160. Ulett GC, Mabbett AN, Fung KC, Webb RI, Schembri MA. 2007. The role of F9 fimbriae of uropathogenic *Escherichia coli* in biofilm formation. *Microbiology* 153(Pt 7):2321-2331.
161. Vejborg RM, Hancock V, Schembri MA, Klemm P. 2011. Comparative genomics of *Escherichia coli* strains causing urinary tract infections. *Appl Environ Microbiol* 77(10):3268-3278.
162. Vila J, Vargas M, Henderson IR, Gascón J, Nataro JP. 2000. Enteroaggregative *Escherichia coli* virulence factors in traveler's diarrhea strains. *J Infect Dis* 182(6):1780-1783.
163. Vollmerhausen TL, Katouli M. 2014. Molecular characterisation of *Escherichia coli* isolated from hospitalised children and adults with urinary tract infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* doi10.1007/s10096-013-2035-1.
164. Warren JW, Abrutyn E, Hebel JR, Johnson JR, Schaeffer AJ, Stamm WE. 1999. Guidelines for antimicrobial treatment of uncomplicated acute bacterial cystitis and acute pyelonephritis in women. *Clin Infect Dis* 29(4):745-759.
165. Waksman G, Hultgren SJ. 2009. Structural biology of the chaperoneusher pathway of pilus biogenesis. *Nat Rev Microbiol* 7(11):765-774.

166. Weiss J, Victor M, Cross AS, Elsbach P, 1982. Sensivity of K-1 encapsulated *Escherichia coli* to killing by the bactericidal permeability-increasing protein of rabbit and human-neutrophils. *Infect Immun* 38(3):1149-1153.
167. Welch RA. 2016. Uropathogenic *Escherichia coli*-associated exotoxins. *Microbiol Spectr* 4(3):doi:10.1128.
168. Welch RA, Burland V, Plunkett G 3rd, Redford P, Roesch P, Rasko D, Bukles EL, Liou SR, Boutin A, Hackett J, Stroud D, Mayhew GF, Rose DJ, Zhou S, Schwartz DC, Perna NT, Mobley HL, Donnenberg MS, Blattner FR. 2002. Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(26):17020-17024.
169. Whitfield C, Roberts IS. 1999. Structure, assembly and regulation of expression of capsules in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 31(5):1307-1319.
170. Wiles TJ, Dhakal BK, Eto DS, Mulvey MA. 2008. Inactivation of host akt/pkb signaling by bacterial pore-forming toxins. *Mol Biol Cell* 19:1427-1438.
171. Wiles TJ, Kulesus RR, Mulvey MA. 2009. Origins and virulence Mechanisms of Urpathogenic *Escherichia coli*. *Exp Mol Pathol* 85(1):11-19.
172. Wright J. Seed CP, Hultgren JS. 2007. Development of intracellular bacterial communities of uropathogenic *Escherichia coli* depends on type 1 pili. *Cell Microbiol* 9:2230–2241.
173. Wu XR, Kong XP, Pellicer A, Kreibich G, Sun TT. 2009. Uroplakins in urothelial biology, function and disease. *Kidney Int* 75(11):1153-1165.
174. Wurpel DJ, Beatson SA, Totsika M, Petty NK, Schembri MA. 2013. Chaperone-usher fimbriae of *Escherichia coli*. *PLoS One* 8(1):e52835.
175. Yamamoto S, Nakano M, Terai A, Yuri k, Nakata k, Nair GB, Kurazono H, Ogawa O. 2001. The presence of the virulence island containing the USP gene in uropathogenic *Escherichia coli* is associated with urinary tract infection in an expermental mouse model. *J Urol* 165(4):1347-1351.
176. Yamamoto S, Terai A, Yuri K, Kurazono H, Takeda Y, Yoshida O. 1995. Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *FEMS Immunol Med Microbiol* 12(2):85–90.
177. 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(6):455-61.
178. Zhanel G, Hisanaga T, Laing N, DeCorby MR, Nichol KA, Weshnoweski B, Johnson J, Noreddin A, Low DE, Karlowsky JA; NAUTICA Group, Hoban DJ. 2006. Antibiotic resistance in *Escherichia coli* outpatient urinary isolates: final results from the North American Urinary Tract Infection Collaborative Alliance (NAUTICA). *Int J Antimicrob Agents* 27(6):468-475.

179. Zhou G, Mo WJ, Sebbel P, Min G, Neubert TA, Glockshuber R, Wu XR, Sun TT, Kong XP. 2001. Uroplakin Ia is the urothelial receptor for uropathogenic *Escherichia coli*: Evidence from *in vitro* FimH binding. *J Cell Sci* 114(Pt22):4095-4103.