



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

DISTRIBUCIÓN DE LOS MARCADORES DE ADHESIÓN EN CEPAS DE *Escherichia coli* OBTENIDAS DE ENFERMEDAD PERIODONTAL

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I Ó L O G A
P R E S E N T A:

Monserrath Altamira Resendiz

Director de Tesis:

Dr. Eric Monroy Pérez

Los Resyes Iztacala, Tlanelplantla, Estado de México 2022





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** por brindarme un lugar en la máxima casa de estudios, por los mejores años y la mejor etapa de mi vida, por todos los conocimientos y experiencias adquiridas a lo largo de mi paso como estudiante.

Al **Laboratorio de Análisis Clínicos** a cargo de la **Dra. Gloria Luz Paniagua Contreras** por abrirme las puertas y aceptarme para la realización de mi proyecto final, por la orientación y por los conocimientos transmitidos a lo largo de este proceso.

A mi director de tesis, **Dr. Eric Monroy Pérez**, por el apoyo, por su conocimiento transmitido, por su paciencia para que aprendiera correctamente cada una de las técnicas y sobre todo por el tiempo y dedicación que puso sobre mi proyecto para que concluyera con éxito.

Al comité revisor, conformado por:

Dr. Felipe Vaca Paniagua

Bióloga Ma. Patricia Sánchez Yáñez

Bióloga Susana Esther González Almazán

Por ser parte importante de este proyecto.

Dedicatoria

A mi familia:

A **mi mamá**, por darme la vida y por siempre ofrecerme lo mejor; te amo con todo mi ser, por siempre estar para mí en todo momento, en los momentos más felices (sobre todo en esos momentos madre e hija que me mantienen de pie) y en los más tristes, jamás me has dejado caer y jamás has dejado de motivarme en todas las cosas y locuras que siempre quiero hacer. Gracias por estos cuatro años de apoyo, por esas veces que me ayudabas a estudiar para mis exámenes, por las veces que no podía más y siempre estabas ahí para escucharme, por despertarte temprano conmigo cada día, por llevarme hasta la puerta del autobús en cada práctica de campo y preocuparte por que nada se me olvidara. Eres mi ejemplo a seguir, mi motivación día con día, orgullosa de tener una madre como tú; esto es por y para nosotras.

A **mi novio**, por ser mi confidente y mi mejor amigo en todos estos años juntos, por esas veces que sin deberla pagaste los platos rotos de cuando no podía más pero siempre encontrabas la manera de darme ánimos y motivarme a que no desistiera, por poner toda tu confianza en mí, por hacerme saber lo orgulloso que estas de mí, por ayudarme a estudiar para mis presentaciones, a pasar mis exámenes, con mis tareas, por siempre escuchar datos curiosos de mi carrera y sorprenderte, y sobre todo por ya no matar insectos. Por estar en todo momento bueno y malo a mi lado y jamás soltarme, porque tú y la memoria de nuestros bebés siempre serán mi motivación para salir adelante. Gracias por todo, te amo con toda mi alma.

A la **memoria de mi abuelita**, por trascender tu amor por la naturaleza en mí, por esos días de clases en línea en que te sentabas conmigo a tomar clase o me subías un plato de comida, por ayudarme en mis tareas de botánica y por siempre presumir lo que estudiaba.

A la **memoria de mi cuñada Yazmin**, por darme a mis sobrinas que han sido mi alegría y consuelo, por siempre motivarme a ser la mejor en todo lo que hago, porque siempre mostrabas interés en cómo me iba con mis materias, por ser esa hermana que nunca tuve, por haber sido tan cálida y tan tú.

A **mis sobrinas, Zuri y Ale**; son mi alegría, mi adoración y siempre serán mis bebés consentidas. Son mi motivación para darles el mejor ejemplo de que todo lo que queramos hacer lo podemos lograr.

A **mi hermano**, por todas tus palabras de aliento, por siempre decirme lo orgulloso que estas de mí, por estar en cada momento importante de mi vida y por siempre darle chispa y alegría a mi vida.

A mis amigos:

A **mi amigo Carlos**, quien estuvo toda la carrera conmigo, por ser mi amigo desde el primer día, por las risas en clases y en el autobús, por todos los momentos icónicos, las tristezas y hasta los enojos, por todas esas veces que siempre estabas para escucharme y darme un consejo, por compartir el mismo sentido del humor. Gracias por la maravillosa amistad que formamos, siempre tendrás un lugar en mi corazón.

A **mis compañeros de laboratorio**; por siempre haber sido solidarios y empáticos, por las risas y los momentos de logros, incluso los momentos estresantes. Gracias por la bonita amistad y equipo que formamos.

A todos los amigos que fueron parte fundamental de esta gran aventura, quienes están desde el primero día y quienes fueron llegando, con quienes compartí clases, platicas, transporte y prácticas de campo.

Y especial dedicatoria **a mí**, por siempre demostrarme lo fuerte, valiente y resiliente que soy, por creérmela, por todos mis logros hasta el día de hoy, este es solo uno más a la lista.

ÍNDICE

RESUMEN	7
INTRODUCCIÓN	8
<i>Escherichia coli</i>	8
PATOLOGIAS DE <i>Escherichia coli</i>	9
PATOGENECIDAD	10
ENFERMEDADES PERIODONTALES.....	13
ANTECEDENTES	15
JUSTIFICACIÓN	17
OBJETIVOS	18
OBJETIVO GENERAL.....	18
OBJETIVOS PARTICULARES	18
MATERIAL Y MÉTODOS	19
ORIGEN DE LAS CEPAS.....	19
RESIEMBRA DE LAS CEPAS Y EXTRACCIÓN DE DNA.	19
IDENTIFICACIÓN DE <i>E. coli</i> POR PCR (REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA).....	19
DETECCIÓN DE LOS GENES DE VIRULENCIA POR PCR	20
CULTIVO BACTERIANO PARA LA EXTRACCIÓN DE RNA.....	21
EXTRACCIÓN DE RNA DE LAS CEPAS DE <i>E. coli</i>	22
REVERSOTRANSCRIPCIÓN	23
EXPRESIÓN DE LOS MARCADORES DE VIRULENCIA POR PCR EN TIEMPO REAL.....	24
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	25
RESULTADOS	25
ORIGEN DE LAS CEPAS.....	25
DIAGNÓSTICO DE LOS PACIENTES ANALIZADOS.....	26
IDENTIFICACIÓN DE <i>E. coli</i>	26
FRECUENCIA DE LOS GENES DE VIRULENCIA	27
EXPRESIÓN DE LOS MARCADORES DE VIRULENCIA POR PCR EN TIEMPO REAL.....	30
DISCUSIÓN	37
PACIENTES ANALIZADOS	37
IDENTIFICACIÓN DE <i>Escherichia coli</i>	38
FRECUENCIA DE LOS GENES DE VIRULENCIA	39
EXPRESIÓN DE LOS MARCADORES DE VIRULENCIA POR PCR EN TIEMPO REAL.....	40

CONCLUSIONES	42
ANEXO 1	43
BIBLIOGRAFÍA	46

RESUMEN

Las enfermedades periodontales son consideradas un problema de salud pública en todo el mundo, debido a que afecta al 50% de la población adulta, sobre todo en países en vías de desarrollo. Entre las bacterias anaerobias responsables de la enfermedad periodontal se encuentran *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythensis*, *Treponema denticola* y *Prevotella intermedia*, sin embargo, recientemente se ha descrito a *E. coli* como un patógeno secundario emergente asociado a la periodontitis. En nuestro país existe poca información sobre la patogenicidad de *E. coli* asociada a la enfermedad periodontal, por lo que el objetivo de este estudio fue determinar por PCR en tiempo real la expresión de los genes de adhesión *fimH*, *iha*, *papH*, *papG II* y *sfa* en cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con enfermedad periodontal. Se analizaron 5 cepas de *Escherichia coli* aisladas previamente de pacientes con diferentes grados de periodontitis de la Clínica de Endoperiodontología de la FES Iztacala. Las cepas fueron identificadas por las pruebas bioquímicas estándar y molecularmente por PCR mediante la amplificación del gen 16S rRNA. La expresión de los genes de adhesión se realizó por PCR en tiempo real después del crecimiento bacteriano en caldo nutritivo infusión-cerebro-corazón (BHI), y caldo de soya tripticaseína (ST). Los genes *papG II*, *papH* e *iha* se expresaron en todas las cepas de *E. coli* (100%; n=5) provenientes de pacientes con Periodontitis moderada y crónica después del crecimiento en BHI y ST, mientras que el gen *fimH* se expresó en todas las cepas asociadas a P. moderada (100%), mientras que en la Periodontitis crónica (50%). El gen *sfa* se expresó con mayor frecuencia en cepas aisladas de pacientes con P. crónica (100%), con relación a cepas de pacientes con P. moderada (50%). La elevada expresión de los genes que codifican para adhesinas evidencia la virulencia de las cepas para ocasionar infecciones periodontales crónicas en los pacientes estudiados.

INTRODUCCIÓN

Escherichia coli.

Theodor Escherich, pediatra alemán que en 1885 describió por primera vez a *Bacterium coli commune*, como una bacteria no patógena habitante común en el intestino de niños sanos. Posteriormente se le dio el nombre de *Escherichia coli* en su honor (Torres, 2016).

Escherichia coli es una bacteria que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, es Gram-negativa por poseer una membrana citoplasmática, una cubierta de peptidoglicano y una pared celular que contiene lipopolisacáridos (LPS). Existen tres tipos de antígenos de superficie que sirven para serotipar e identificar a las enterobacterias: el antígeno somático o **antígeno O**, el antígeno flagelar o **antígeno H**, y el antígeno capsular o **antígeno K** (Medina, 2010 ; Allocati *et al.*, 2013). *E. coli* es un bacilo anaerobio facultativo con metabolismo fermentador, es móvil por flagelos peritricos, oxidasa negativo, catalasa positivo, y temperatura de 37°C para un óptimo crecimiento (Aguilar-Zapata, 2016 ; Rodríguez-Angeles, 2002).

E. coli se ha aislado y encontrado en el suelo, agua, plantas y en una gran diversidad de animales, sin embargo, se puede encontrar con mayor frecuencia en vertebrados de sangre caliente (homeotermos) como, por ejemplo, los humanos (Gordon, 2013; Allocati *et al.*, 2013). Logra colonizar el tracto gastrointestinal humano unas horas después de su nacimiento, coexistiendo durante décadas con beneficio mutuo al ayudar a la producción de vitaminas B (12 y 3) y K y cooperar en la digestión (Burkholder *et al.*, 1942 ; Kaper *et al.*, 2004). La capa mucosa del colon es el nicho ideal de *E. coli*, quizá por que utiliza el gluconato (uno de los nutrientes presentes en la capa mucosa) de una manera más eficiente que las otras bacterias residentes, permitiéndole ocupar un nicho metabólico altamente específico (Kaper *et al.*, 2004). Las cepas de *E. coli* causan enfermedades en los humanos, principalmente en personas inmunocomprometidas o cuando se rompen las barreras gastrointestinales normales, por ejemplo, en la peritonitis. Actualmente, hay varias

cepas que han logrado adaptarse a nuevos nichos y provocar un amplio espectro de enfermedades (Kaper *et al.*, 2004).

PATOLOGIAS DE *Escherichia coli*

E. coli es un patógeno que puede provocar múltiples infecciones en los humanos, causando infecciones intestinales, y algunas cepas adquirieron genes de virulencia específicos que les permiten causar infecciones extra-intestinales, que incluyen infecciones urinarias, vaginales o infecciones periodontales (Khairy *et al.*, 2019).

Con base en criterios genéticos y clínicos, las cepas de *E. coli*, se clasifican en 3 grupos: cepas comensales que se encuentran en la microbiota fecal de humanos sanos, mamíferos y aves; no provocan ninguna enfermedad, cepas patógenas intestinales que causan gastroenteritis o diarreas y cepas patógenas extra-intestinales que pueden afectar cualquier órgano (Russo y Johnson, 2000 ; Andreu, 2005).

De acuerdo con el tipo de factor de virulencia y los síntomas que el hospedero presente, las cepas de *E. coli* causantes de enfermedades se clasifican en tipos de patógenos o patotipos, que son un grupo de cepas de la misma especie que causan una enfermedad en común (Rodríguez-Angeles, 2002 ; Allocati *et al.*, 2013).

Las cepas de *E. coli* que causan infecciones intestinales se clasifican en 6 patotipos: 1) *E. coli* enterotoxigénica (**ETEC**) que es una de las principales causas de enfermedades gastrointestinales en niños lactantes y también ocasiona la diarrea del viajero (Vidal *et al.*, 2016 ; Rodríguez-Angeles, 2002). 2) *E. coli* Enterohemorrágica (**EHEC**) productora de la toxina Shiga, es un patógeno zoonótico transmitido por los alimentos asociados a carne de res contaminada provocando desde un portador asintomático hasta colitis hemorrágica y/o síndrome urémico hemolítico: caracterizado por la tríada de anemia, trombocitopenia e insuficiencia renal (Vanaja *et al.*, 2013 ; Rivas *et al.*, 2016). 3) *E. coli* Enteropatógena (**EPEC**) causante de diarrea en infantes y adultos, principalmente diabéticos (Rodríguez-Angeles, 2002). 4) *E. coli* Enteroinvasiva (**EIEC**), que en conjunto con *Shigella* spp. son causantes de la disentería bacilar, enfermedad

importante en comunidades pobres y con poco acceso a agua limpia (Maurelli, 2013). 5) *E. coli* Enteroagregativa (**EAEC**) responsable de diarrea aguda en niños y pacientes inmunocomprometidos en países en vías de desarrollo (Elias y Navarro-Garcia, 2016). Y 6) *E. coli* de adherencia difusa (**DAEC**) causante de diarrea en niños de 4 a 5 años, pacientes con VIH y viajeros (Meza-Segura y Estrada-Garcia, 2016).

Dentro de las cepas de *E. coli* que ocasionan infecciones extra-intestinales (**ExPEC**) hasta el momento se conocen dos patotipos: la uropatógena (**UPEC**) responsable de las infecciones del tracto urinario y la *E. coli* causante de meningitis bacteriana neonatal (**NMEC**) que deja secuelas neurológicas en los sobrevivientes. (Rodríguez-Angeles, 2002 ; Allocati *et al.*, 2013).

PATOGENECIDAD

Todas las bacterias han logrado evolucionar hasta el grado de poseer mecanismos de patogenicidad específicos para lograr invadir el ambiente del hospedero, como por ejemplo, expresar receptores para la adhesión, la evasión del sistema inmune, y la invasión y colonización de los tejidos del hospedero, produciendo así enfermedades y daño tisular con el fin de obtener fuentes de nutrientes necesarias para su crecimiento y reproducción (Cárdenas-Perea *et al.*, 2014).

En *E. coli* la presencia de los antígenos, determina la patogenicidad de las cepas: por ejemplo, el antígeno O actúa como factor de adhesión/colonización y de endotoxina. El Antígeno H ha sido encontrado en los flagelos, está asociado a la producción del síndrome hemolítico urémico, y es responsable de la capacidad de invadir las vías urinarias. Por último, el antígeno K (capsular), son polisacáridos ácidos, que se asocian con el desarrollo de meningitis neonatal, bacteremia e infección urinaria (Medina, 2010).

También, la patogenicidad de *E. coli* se debe a la gran cantidad de genes de virulencia que posee. La *E. coli* extra-intestinal (ExPEC) presenta una amplia gama de factores de virulencia que codifican para adhesinas, sistemas de captación de hierro, protectinas y toxinas (Ewers, *et al.*, 2007 ; Lee, *et al.*, 2016).

- I. **Adhesinas:** La adhesión entre la bacteria y la superficie del tejido del hospedero esta mediada por un conjunto de proteínas denominadas adhesinas (pilis, fimbrias o flagelos), ubicadas en la superficie microbiana, y las cuales favorecen la colonización y la invasión, las adhesinas son lectinas (proteínas con afinidad por los azúcares). Entre los genes de adhesión más importantes de *E. coli* se encuentran (Karimian *et al.*, 2012 ; Cárdenas-Perea *et al.*, 2014):
- a. **Fimbria tipo 1 (*fim*):** Se les considera un factor de virulencia definitivo en *E. coli* uropatógena (UPEC). Se ha comprobado que son esenciales para invadir el tracto urinario en ratones y humanos. La unión de FimH a los receptores manosilados de la célula favorece la adhesión, la invasión y promueve la formación de comunidades bacterianas intracelulares (IBC). Por lo tanto, su función es la colonización bacteriana (Lüthje y Brauner, 2014).
 - b. **Fimbria P o Pili asociado a pielonefritis (*pap*):** Esta adhesina se une a glicolípidos de la membrana celular del hospedero y no es inhibida por la manosa. El Pilus asociado a pielonefritis *alelo II* (*PapGII*) se asocia con la cistitis, pielonefritis y bacteremia en humanos debido a su unión con los glicolípidos globotetraosilceramida y globotriaosilceramida (GbO3) (Lüthje y Brauner, 2014).
 - c. **Fimbria S (*sfa*):** Esta adhesina es común en las uropatógenas (UPEC), pero no tan frecuente como la Fimbria P (Pili asociado a la pielonefritis (Pap) o a la Fimbria tipo 1 (*fimH*)). La fimbria S (*Sfa*) se une a los receptores de los eritrocitos, células epiteliales tubulares renales y al epitelio de la vejiga. La fimbria S tiene afinidad con la proteína de la matriz extracelular laminina, de ahí, su relación con la sepsis y la meningitis (Lüthje, y Brauner, 2014).
 - d. **Adhesina afrimbrial o de adherencia difusa (*afa*):** Las cepas que contienen operones que codifican para estas adhesinas se asocian con infecciones intestinales en niños pequeños y con mayor

frecuencia en cepas de infecciones extraintestinales como la infección del tracto urinario (Lüthje, y Brauner, 2014).

- e. **Adhesina homóloga superficial receptora de hierro (*iha*):** Inicialmente *iha* se consideraba una adhesina en las uropatógenas (UPEC), sin embargo, muestra una alta homología con los receptores de sideróforos como el receptor del sideróforo catecolato (IroN) (PONER EL SIGNIFICADO DE ESTAS ABREVIATURAS ¡!!!. La adhesina *Iha* sirve como receptor alternativo para el sideróforo enterobactina (Lüthje, y Brauner, 2014).

Cabe mencionar que la adhesión y colonización a los tejidos es la primera etapa que se requiere para la patogenicidad bacteriana (Karimian *et al.*, 2012 ; Cárdenas-Perea *et al.*, 2014).

Sistemas de captación de hierro: El hierro es esencial para el crecimiento, supervivencia y virulencia de microorganismos patógenos, los cuales han desarrollado complejos mecanismos para adquirirlo de forma eficiente. Con el fin de obtener hierro para reproducirse y causar infecciones, las bacterias presentan regiones en su genoma con genes que codifican las proteínas del sistema de captación de hierro para facilitar su obtención. Los genes relacionados a la captación de hierro son: *feoB* (gen que media la absorción de hierro férrico) , *irp2* (gen reprimible por hierro asociado) *iroN* (iron), *ireA* (codifica un elemento sensible al hierro), (Del Castillo-Rueda, y Khosravi-Shahi, 2010 ; Lee, *et al.*, 2016).

- II. **Toxinas:** La toxinas ayudan para que la bacteria se propague a tejidos más profundos y así acceder a los nutrientes de la célula del hospedero. Entre los genes de toxinas más frecuentes en *E. coli* se encuentra el factor citotóxico necrotizante (*cnf1*), y la α -hemolisina (*hylA*) (Lüthje, y Brauner, 2014 ; Lee, *et al.*, 2016).

- III. **LPS:** El lipopolisacárido (LPS) es el principal componente de la pared celular en las bacterias Gram negativas y es altamente inmunogénico (Lüthje, y Brauner, 2014).
- IV. **Protectinas: conjunto de proteínas que** favorecen la evasión de la respuesta inmune del hospedero, y entre los principales genes que codifican las proteínas se encuentran: *kpsMTI*, II y III (antígeno capsular K) (Ávalos González, *et al.*, 2000).

ENFERMEDADES PERIODONTALES

Las enfermedades periodontales son consideradas un problema de salud pública en todo el mundo, debido a que afecta al 50% de la población adulta, sobre todo en países en vías de desarrollo. Son la segunda causa de enfermedades bucales después de la caries (Medina, 2010 ; Camarena, *et al.*, 2017).

Su etiología se debe a la acumulación de bacterias que forman parte de la placa bacteriana o biopelícula en el área cervical de los dientes hasta llegar a la raíz de estos. Las enfermedades periodontales se clasifican en dos grupos (Camarena, *et al.*, 2017):

- I. **Etapa inicial:** Solo la encía se ve afectada y se denomina gingivitis; se caracteriza por la inflamación, enrojecimiento y sangrado de la encía. En esta fase el proceso inflamatorio aún es reversible, y si no es tratado progresa a periodontitis (Camarena *et al.*, 2017).
- II. **Periodontitis:** Puede ser leve, moderada o severa, aquí la placa bacteriana actúa en estructuras más profundas como el ligamento periodontal y el hueso alveolar. Si no es tratado el daño es irreversible y conlleva a la pérdida parcial o total de los dientes (Camarena *et al.*, 2017).
- III. **Periodontitis crónica o agresiva:** Pérdida total o parcial de los dientes (Camarena *et al.*, 2017).

Dentro de los microorganismos comunes de la microbiota subgingival responsables de las enfermedades periodontales se encuentran: *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythensis*, *Eikenella*

corrodens, *Campylobacter rectus*, *Peptoestreptococo micros*, *Treponema denticola* y *Prevotella intermedius*, entre otras (Medina, 2010 ; Camarena *et al.*, 2017).

Sin embargo, se ha logrado aislar bacterias de la familia Enterobacteriaceae de las bolsas periodontales, en diferentes regiones del mundo, dentro de las cuales se encuentra *E. coli*, y por mencionar algunos; en Enugu, Nigeria se trabajó con 178 especies clínicas de enterobacterias previamente aisladas de pacientes con gingivitis y periodontitis donde se registró la presencia de ***E. coli*** (n=44) (Iroha *et al.*, 2022); en Bogotá, Colombia se registraron 3 pacientes con periodontitis crónica encontrando a ***E. coli*** como una de las enterobacterias más frecuentes (Gamboa *et al.*, 2013) y por último, un trabajo en México donde analizaron 42 muestras de pacientes con periodontitis encontrando enterobacterias como ***E. coli*** con una prevalencia de 9.3% (Hurtado Camarena, 2017).

La frecuencia de enterobacterias en las bolsas periodontales en un problema debido a que pueden complicar el cuadro clínico de los pacientes con periodontitis, llevándolos a complicaciones sistémicas al entrar al torrente sanguíneo, provocando septicemias en pacientes inmunosuprimidos, enfermedades cardiovasculares, y en los neonatos, bajo peso al nacer, además de parto pretérmino (Medina, 2010 ; Camarena *et al.*, 2017).

La frecuencia de *E. coli* y de los marcadores de virulencia asociados a la enfermedad periodontal en México y en otras partes del mundo ha sido poco estudiada.

ANTECEDENTES

- Medina *et al.*, (2012) en Medellín, Colombia examinaron la presencia de microorganismos subgingivales de 76 pacientes con periodontitis crónica. Los microorganismos con mayor frecuencia fueron *P. gingivalis* (64,4%), *F. nucleatum* (46,3%) y *P. intermedia/nigrescens* (44,3%), los cuales son microorganismos comunes relacionados con las enfermedades periodontales. Además, se observaron bacilos entéricos Gram-negativos en 20 (26,31%) de 76 pacientes.
- Gamboa *et al.*, (2013) en Bogotá, Colombia determinaron la presencia de *Enterobacteriaceae* en 64 pacientes con periodontitis crónica y 22 con gingivitis. Los resultados arrojaron la presencia de 29 especies de enterobacterias distribuidas de la siguiente manera: 7 en el grupo con gingivitis y 22 en el grupo con periodontitis crónica. En el grupo de periodontitis crónica las especies más comunes fueron: *K. oxytoca* (n=5), *S. liquefaciens* (n=4) y *K. pneumoniae* y *E. coli* (n=3). El grupo de gingivitis tuvo la mayor frecuencia de *Erwinia* sp. (n= 2).
- Karimian *et al.*, (2012) analizaron en Irán un total de 123 cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con infecciones del tracto urinario, utilizando la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la detección de factores de virulencia de *E. coli*. Encontraron que el gen *fimH* tuvo una presencia del 79,6%, también se encontró la presencia de genes de virulencia como *cnf1*, *hlyA*, *pap*, *ironN*, *afa*, *iuc*, *iha*, *ompT* e *irp2* con 50,4%, 50,4%, 50,4%, 42,2%, 8,1%, 10,5%, 17,8%, 4,8% y 11,3%, respectivamente. Encontrando una alta presencia de genes de virulencia en cepas de pacientes con infecciones del tracto urinario.
- López-Banda *et al.*, (2014) analizaron en México cepas de *E. coli* aisladas de mujeres mexicanas, con infección del tracto urinario. Por PCR identificaron 16 genes de virulencia que codifican adhesinas, toxinas, sideróforos,

lipopolisacáridos (LPS) e invasinas. La frecuencia de los genes de virulencia fue; *ecp* 98.1%, *fimH* 86.1%, *traT* 77.8%, *sfa / focDE* 74.1%, *papC* 62%, *iutA* 48.1%, *fyuA* 44.4%, *focG* 2.8%, *sfaS* 1.9%, *hlyA* 7.4%, *cnf-1* 6.5%, *cdt-B* 0.9%, *cvaC* 2.8%, *ibeA* 2.8% y *rfa* 0.9%.

- Monroy-Pérez *et al.*, (2020) en México definieron los perfiles de transcripción de genes de virulencia después de la infección *in vitro* de la línea celular vaginal A431. Se analizaron un total de 200 cepas de *E. coli* aisladas de mujeres mexicanas con Infecciones cérvico-vaginales (ICV) de dos unidades médicas del Instituto Mexicano del Seguro Social. La transcripción de los genes de virulencia se midió mediante PCR en tiempo real. Los genes expresados con mayor frecuencia en estas cepas fueron *fimH*, *papC*, *irp2*, *iroN*, *kpsMTII*, *cnf1* y *ompT*. Las cepas mostraron una gran diversidad de transcripción del genotipo de virulencia

JUSTIFICACIÓN

Debido a que en nuestro país existe poca información sobre la patogenicidad de *E. coli* asociada a la enfermedad periodontal, en el presente estudio se determinará por PCR en Tiempo Real la expresión de los genes de adhesión (*fimH*, *iha*, *papH*, *papG II* y *sfa*) en cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con enfermedad periodontal.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar la expresión de los genes involucrados en la adhesión en cepas de *E. coli* provenientes de infecciones periodontales.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar la frecuencia de los genes de adhesión, *fimH*, *iha*, *papH*, *papG II* y *sfa* en cepas periodontales de *Escherichia coli*.
2. Comparar la expresión de los genes de adhesión *fimH*, *iha*, *papH*, *papG II* y *sfa* en las cepas de *Escherichia coli*, en un crecimiento de dos diferentes caldos nutritivos de cultivo.

MATERIAL Y MÉTODOS.

ORIGEN DE LAS CEPAS

Las cepas de *Escherichia coli* (n=5) estudiadas en este trabajo fueron previamente aisladas de pacientes con infecciones periodontales de la Clínica de Endoperiodontología de la FES Iztacala. Las cepas periodontales de *E. coli* y la cepa control (ATCC 25922) se encontraban almacenadas en medio BHI (infusión-cerebro-corazón) más Glicerol en el Laboratorio de Análisis Clínicos, CUSI, FES Iztacala, UNAM.

RESIEMBRA DE LAS CEPAS Y EXTRACCIÓN DE DNA.

A partir del medio de cultivo de BHI más glicerol se tomó un inóculo por medio de un asa estéril de las cepas y del control por separado, se sembraron en 2 mL de BHI y se incubaron a 37° C por 24 horas. Al término se tomó un inóculo de las muestras por medio de un asa estéril y se sembraron por el método de estría cruzada en el agar Mueller Hinton (MH), y se incubaron a 37° C por 24 horas. A partir del crecimiento bacteriano se tomaron varias colonias con un asa estéril y se depositaron en un tubo con tapón de rosca de 16x150 con 2 mL de agua desionizada estéril. El inóculo se agitó en un vortex por 30 segundos y se llevó a ebullición durante 20 min. Al término la muestra se colocó en hielo por 10 min. y se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 min. El sobrenadante que contiene el DNA se transfirió a un tubo eppendorf estéril y se guardó a -20 °C hasta su utilización.

IDENTIFICACIÓN DE *E. coli* POR PCR (REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA)

La identificación molecular de *E. coli* por PCR de punto final se realizó mediante la amplificación del gen 16S rRNA utilizando los oligonucleótidos wl-3110 (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) y wl-3111 (CCGTCAATTCATTGAGTT) (Lane *et al.*, 1985). El volumen final para la mezcla de reacción fue de 25 µL; 12 µL de Taq

DNA polimerase 2x Master mix Red (AMPLIQON), 9 µL de agua libre de nucleasas, 1 µL de cada oligonucleótido (forward y reverse; 10 pmol) y 2 µL del DNA bacteriano (100 pmol). Las condiciones de PCR consistieron en una fase de desnaturalización inicial de 5 minutos a 95°C, 30 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 segundos, alineamiento a 55°C por 1 minuto y extensión a 72°C por 1 minuto. Para terminar, la fase de extensión se prolongó por 5 minutos a 72°C. En cada ensayo de PCR se usó como control positivo la cepa de *E. coli* ATCC 11775. El tamaño del ampliación esperado fue de 919 pb.

DETECCIÓN DE LOS GENES DE VIRULENCIA POR PCR

Los genes *fimH*, *iha*, *papH*, *papG II* y *sfa* de *E. coli* fueron identificados por PCR de acuerdo con lo descrito por (Rodriguez-Siek *et al.*, 2005, Momtaz *et al.*, 2013). El volumen final para la mezcla de reacción fue de 25 µL; 12 µL de Taq DNA polimerase 2x Master mix Red (AMPLIQON), 9 µL de agua libre de nucleasas, 1 µL de cada oligonucleótido (forward y reverse; 10 pmol) y 2 µL del DNA bacteriano (100 pmol). Las condiciones de PCR y la secuencia de los oligonucleótidos se observan en la tabla 1.

GEN	SECUENCIA DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS (5´-3´)	TAMAÑO DEL AMPLICIÓN	CONDICIONES DE PCR
<i>fimH</i>	F-TCGAGAACGGATAAGCCGTGG R-GCAGTCACCTGCCCTCCGGTA	508	12 min a 95 °C para activar el AmpliTaq Gold Taq, 25 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 63 °C y 3 min a 68 °C, con un ciclo final de 10 min a 72 °C, seguido de una retención a 4 °C.
<i>iha</i>	F-CTGGCGGAGGCTCTGAGATCA R-TCCTTAAGCTCCCGCGGCTGA	829	
<i>papH</i>	F-ATGGCAGTGGTGTGTTTGGTG R-CGTCCCACCATACGTGCTCTTC	717	
<i>papG II</i>	F-GGGATGAGCGGGCCTTTGAT R-CGGGCCCCCAAGTAACTCG	190	
<i>sfa</i>	F-CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC R-CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA	410	

Tabla 1. Secuencias de los oligonucleótidos y condiciones de PCR.

ANALISIS DE LOS AMPLICONES POR ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

Se preparó una solución stock concentrada 10X de Tris-borato (TBE): 108 g de Tris base, 40 mL de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0.5 M (pH 8.0), 55 g de ácido bórico y se aforó a 1 L con agua destilada. Para llevar a cabo la electroforesis se necesitó TBE 1X por lo que la solución stock se diluyó en una proporción 1:10 hasta tener una concentración 1X. Posteriormente se preparó el gel de agarosa al 2%, para ello se pesaron 2 g de agarosa y se depositaron en 100 mL de TBE 1X para ser fundida hasta quedar una solución transparente. Después se agregaron 0.7 μ L de Midori Green (como fluoróforo) por cada 100 mL de agarosa. La agarosa se depositó en un contenedor que posee un peine para que se formen los pozos. Una vez gelificada la agarosa se retiró el peine y el gel se colocó en la cámara de electroforesis junto con el TBE 1X hasta cubrir el gel. Se colocaron 5 μ L de los amplicones de PCR en los pozos y 3 μ L del marcador de peso molecular (100 pb). Las condiciones para correr el gel fueron: 120 volts, 94 mA durante 40 minutos.

CULTIVO BACTERIANO PARA LA EXTRACCIÓN DE RNA

Para la extracción del RNAm de las cepas es fundamental promover la expresión de los genes de virulencia de interés, en este trabajo las adhesinas, para lo cual las cepas de *E. coli* se crecieron en 3mL de caldo BHI (infusión-cerebro-corazón), y caldo de soya tripticaseína (ST) a 37° C durante 24 h en agitación constante. Al término, se realizaron diluciones 1:10 en caldo BHI o ST estéril, según el caso, hasta obtener una $DO_{600\text{ nm}} = 0.4$, lo que indicó una concentración de 1×10^9 células. Las células bacterianas fueron recuperadas por centrifugación a 2000 rpm por 3 minutos, al término la pastilla fue resuspendida en 2 mL de Buffer Fosfato Salino (PBS), posteriormente se agitaron en un vortex por 10 segundos y se centrifugaron a 2,000 rpm durante 3 minutos. Se decantó el sobrenadante y la pastilla se utilizó para la extracción del RNA.

EXTRACCIÓN DE RNA DE LAS CEPAS DE *E. coli*

La extracción total de RNA se realizó con el kit comercial MiniKit RNeasy (Qiagen, Hilden, Germany) utilizando el equipo robotizado QIAcube (Figura 1). Para lo cual, las pastillas bacterianas obtenidas de los cultivos fueron colocadas en la placa de agitación del equipo. Al mismo tiempo en la posición “A” de la sección correspondiente al buffer de lisis se colocó el buffer TE (solución preparada a pH de 8 con 10 Mm Tris-Cl, 1 Mm de EDTA y 1 mg/mL de lisozima). Después de alimentar el equipo QIAcube con los diferentes reactivos del kit RNeasy, se llenó el contenedor con puntas de 1 mL y se depositaron los tubos de columna y elución (extracción) en el carrusel (centrífuga) del equipo. Finalmente, el QIAcube se programó para la extracción de RNA con lisis celular siguiendo el protocolo del fabricante (RNeasy Protect Bacteria® Qiagen, Hilden, Germany) y se inició la corrida. El equipo robotizado adicionó 100 µL de buffer TE (Tris-EDTA) a cada tubo con la pastilla celular bacteriana. Los tubos fueron agitados para lisar las paredes celulares. Posteriormente el robot QIAcube adicionó 350 µL de buffer RLT (amortiguador de pH de lisis con Isotiocianato de guanidina con 100 µl/mL de β-mercaptoetanol) que permitió inactivar las RNAsas y favorecer la unión del RNA a la membrana de sílica de la columna utilizada en el QIAcube.

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

flujo fue descartado. Nuevamente adicionó 500 μ l de buffer RPE a la columna y centrifugó a 10,000 rpm durante 2 minutos para volver a lavar la membrana y remover restos de sales, descartando nuevamente el líquido de flujo.

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

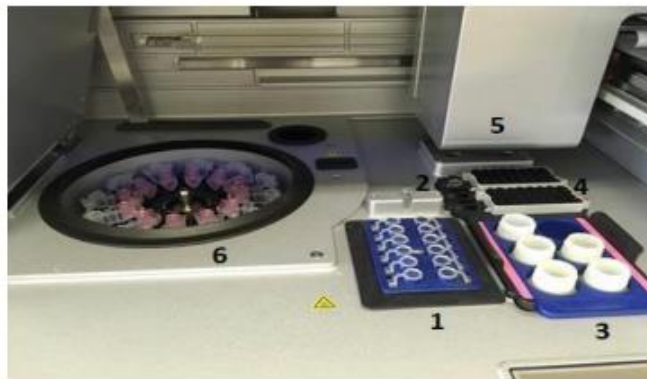


Figura 1. Interior del equipo QIAcube. 1. Placa de agitación, 2. Posición para buffer de lisis, 3. Posición para reactivos MiniKit RNeasy, 4. Depósito de puntas, 5. Brazo robótico, 6. Carrusel (centrifuga).

REVERSOTRANSCRIPCIÓN

Para el proceso de la reversotranscripción de RNA a cDNA se utilizó el kit comercial QuantiTec Reverse transcription (Qiagen®) siguiendo las instrucciones del fabricante. Primero se realizó la eliminación de DNA genómico. Para un volumen final por mezcla de reacción de 14 μ L se agregaron cada uno de los siguientes componentes: Para cada muestra se depositó en un tubo eppendorf 2 μ L de gDNA Wipeout buffer7x®, 7 μ L de agua libre de RNAsas y 5 μ L de RNA molde. Posteriormente se incubó a 42°C durante 2 minutos, e inmediatamente se colocó en hielo. Para la reverso transcripción se preparó la mezcla de reacción en un tubo eppendorf con todos los componentes necesarios para la síntesis de la primera cadena complementaria de cDNA: 1 μ L de Quantiscript Reverse Transcriptasa®, 4

μ L Quantiscript RT buffer 5x®, 1 μ L RT Primer mix® y 14 μ L de RNA templado (obtenido de la reacción anterior) para un volumen final de reacción de 20 μ L. Posteriormente los tubos se incubaron a 42°C por 15 minutos. Para inactivar la transcriptasa reversa el tubo se incubó en un termoblock a 95°C durante 3 minutos. La concentración total del 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.

EXPRESIÓN DE LOS MARCADORES DE VIRULENCIA POR PCR EN TIEMPO REAL

Los oligonucleótidos utilizados para la expresión de los diferentes genes de virulencia fueron los mismos que se utilizaron para la identificación de los genotipos de virulencia por PCR convencional (tabla 1). Para determinar la expresión de los diferentes genes de virulencia se utilizó el aparato de PCR en Tiempo Real Corbette® (Rotor Gene). El volumen final por mezcla de reacción fue de 25 μ L: 12.5 μ L de master mix SYBRGreen PCR (QIAGEN), 1 μ L del oligonucleótido Forward (10 pmol), 1 μ L del oligonucleótido Reverse (10 pmol), 9.5 μ L de agua libre de nucleasas y 1 μ L de cDNA templado (100 ng/ μ L). Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo de activación de la Hot Start a 95°C durante 5 minutos y 40 ciclos de amplificación, que se inicia con la desnaturalización a 95°C por 5 segundos y finalmente alineación a 60 °C por 10 segundos. Los controles internos (House keeping) para cada ensayo fueron los genes *ARCA* (Proteína de control de la respiración anaerobia) y *RPO* (RNA polimerasa sigma). La melting point se realizó en cada corrida de PCR en Tiempo Real. La cepa de *E coli* ATCC 25922 se usó como control positivo en cada ensayo.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para analizar la frecuencia de la expresión de los genes de virulencia en las cepas de *E. coli* asociados al medio de cultivo BHI (infusión-cerebro-corazón) y ST (caldo de soya tripticaseína) se utilizó el análisis estadístico X^2 ; definiendo $\alpha=0.05$ (Anexo 1).

RESULTADOS

ORIGEN DE LAS CEPAS

Se analizaron 5 cepas de *Escherichia coli* aisladas previamente de pacientes con diferentes grados de periodontitis de la Clínica de Endoperiodontología de la FES Iztacala. Se encontró que el 60% (n=3) de los pacientes fueron mujeres y el 40% (n=2) hombres (Figura 2). Por otro lado, el rango de edad más abundante fue de 70-79 años con el 60% (n=3), seguido por el de 60-69 con el 40% (n=2); en la figura 3 se representa la distribución de los pacientes por rango de edad.

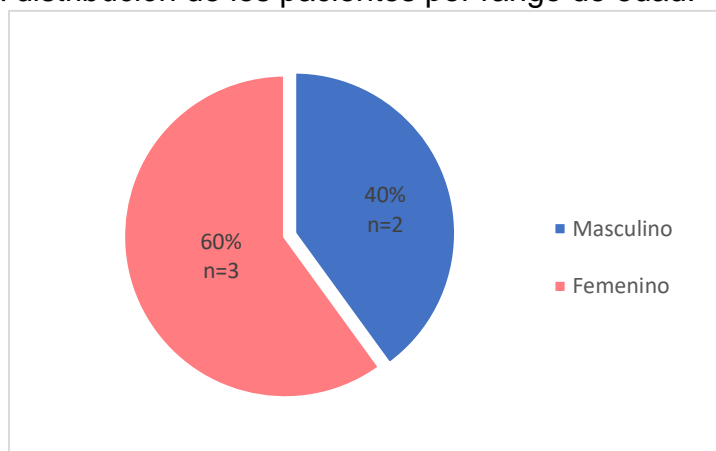


Figura 2. Distribución por sexo de los pacientes analizados.

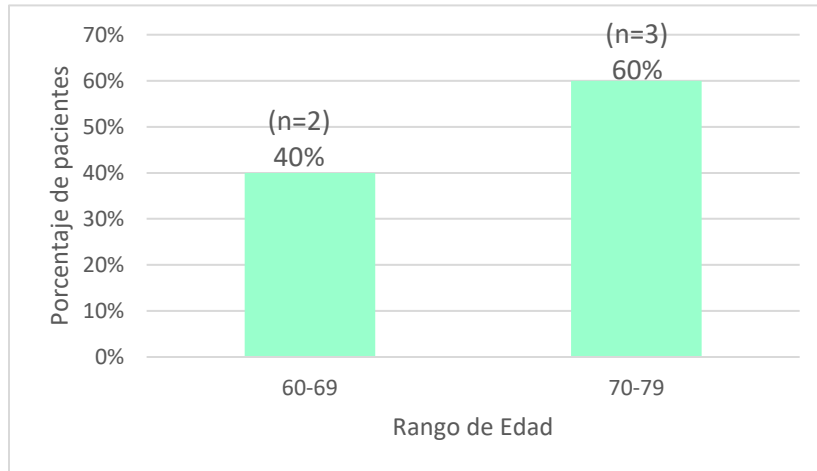


Figura 3. Distribución de los pacientes por rango de edad.

DIAGNÓSTICO DE LOS PACIENTES ANALIZADOS

En la tabla 2, se observa el diagnóstico periodontal de los 5 pacientes. El más frecuente fue periodontitis moderada con el 60% (n=3), mientras que el menos frecuente fue la periodontitis crónica con el 40% (n=2).

Grado de Periodontitis	Número (%)
Moderada	3 (60%)
Crónica	2 (40%)

Tabla 2. Grado de periodontitis de los pacientes estudiados.

IDENTIFICACIÓN DE *E. coli*.

Las 5 cepas fueron identificadas por las pruebas bioquímicas estándar y molecularmente por PCR mediante la amplificación del gen 16S rRNA utilizando los oligonucleótidos wl-3110 (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) y wl-3111 (CCGTCAATTCATTGAGTT) (Figura 4).

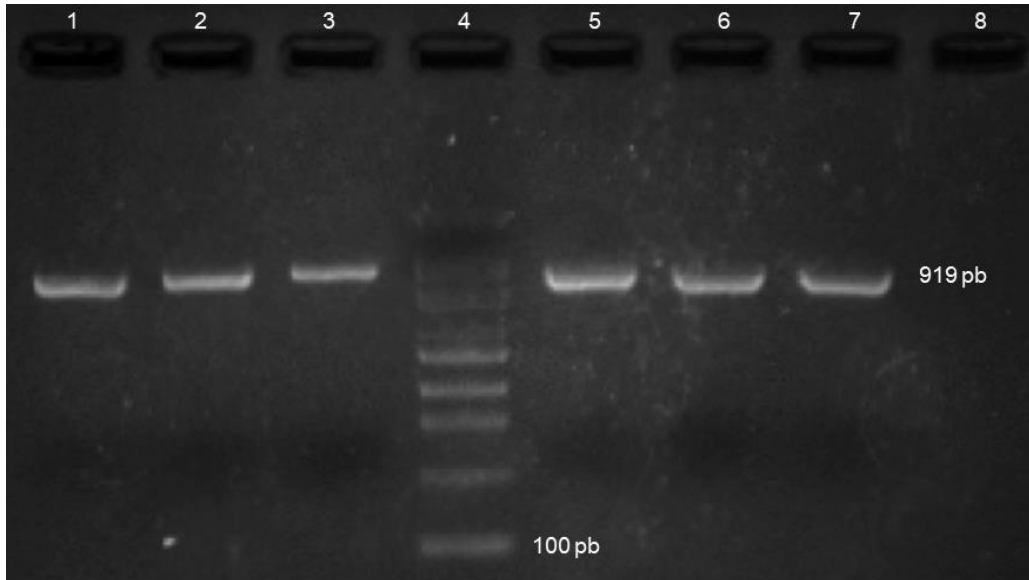


Figura 4. Detección de *E. coli* mediante la amplificación del gen 16S rRNA (919 pb) por PCR. Carriles 1-3 y 5-6. cepas de *E. coli* de pacientes; carril 4, marcador de peso molecular (MWM; 100 pb); carril 7 control positivo, *E. coli* ATCC 25922; carril 8, control negativo (sin DNA molde).

FRECUENCIA DE LOS GENES DE VIRULENCIA

Se estudiaron cinco genes en las cepas de *E. coli* periodontales (n=5). En la tabla 3 se aprecia que los genes *papG II* (figura 5), *papH* (figura 6) e *iha* (figura 7) se detectaron en todas las cepas (n=5), mientras que el gen *fimH* (figura 8) se detectó en el 80% (n=4) de las cepas y el gen *sfa* (figura 9) en el 60% (n=3).

Función	Gen	Periodontitis moderada (n= 3) No. %	Periodontitis crónica (n=2) No. %	Total (n=5) No. %
Adhesinas	<i>fimH</i>	3 (100)	1 (50)	4 (80)
	<i>papG II</i>	3 (100)	2 (100)	5 (100)
	<i>papH</i>	3 (100)	2 (100)	5 (100)
	<i>sfa</i>	1 (33.3)	2 (100)	3 (60)
	<i>iha</i>	3 (100)	2 (100)	5 (100)

Tabla 3. Frecuencia de los genes de virulencia en los diferentes grados de periodontitis

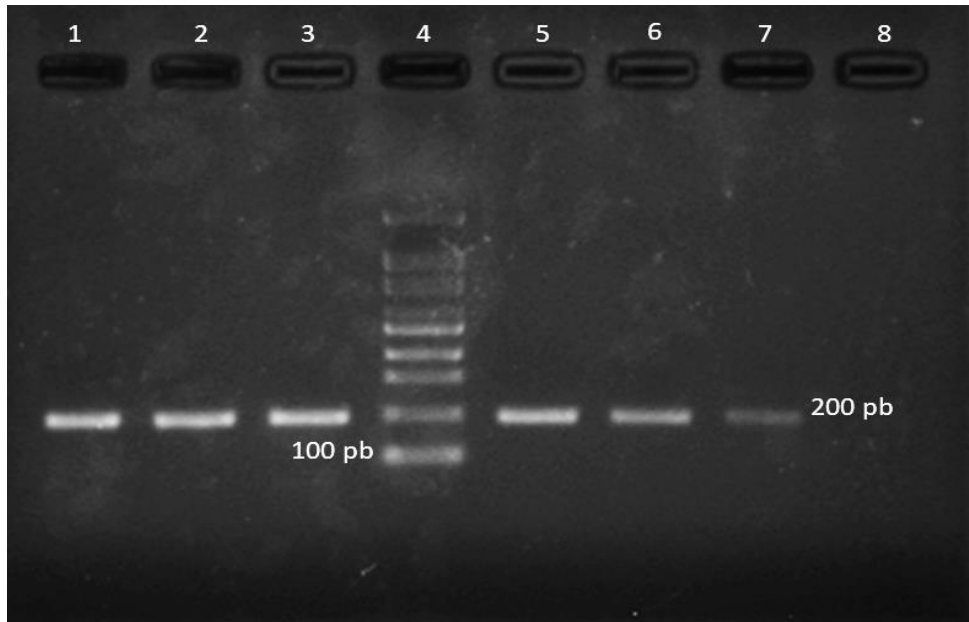


Figura 5. Detección de *papG II* por PCR de punto final (MWM: 200 pb). Carriles 1-3 y 5-6, cepas de *E. coli* de pacientes con periodontitis; carril 4, marcador de peso molecular (100 pb); carril 7, control positivo (ATCC 25922); carril 8, control negativo (sin DNA molde).

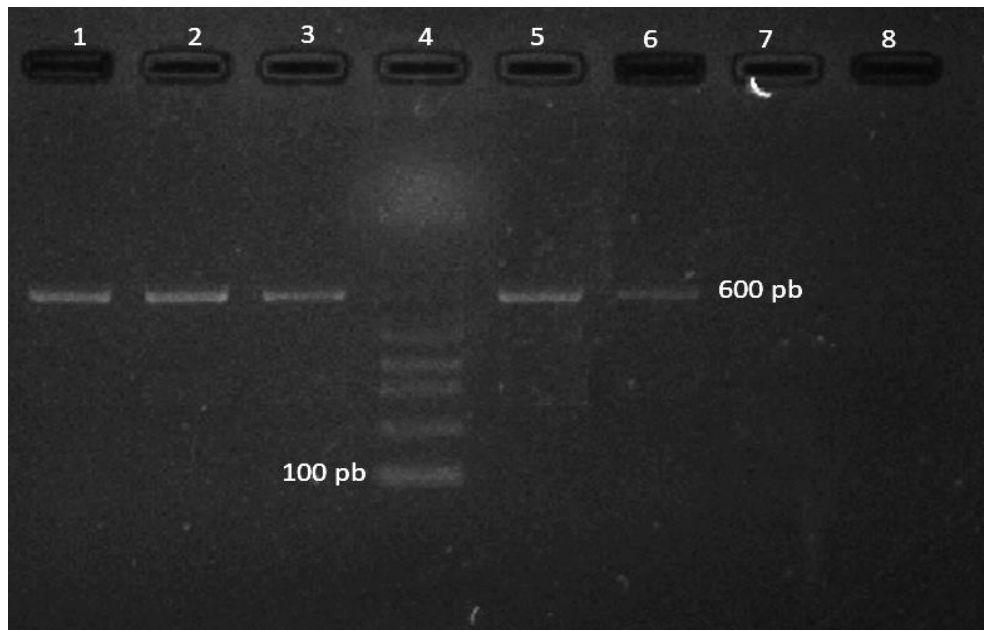


Figura 6. Detección de *papH* por PCR de punto final (600 pb). Carriles 1-3 y 5, cepas de *E. coli* de pacientes con periodontitis; carril 4, marcador de peso molecular (MWM;100 pb); carril 6, control positivo (ATCC 25922); carril 8 ,control negativo (sin DNA molde).

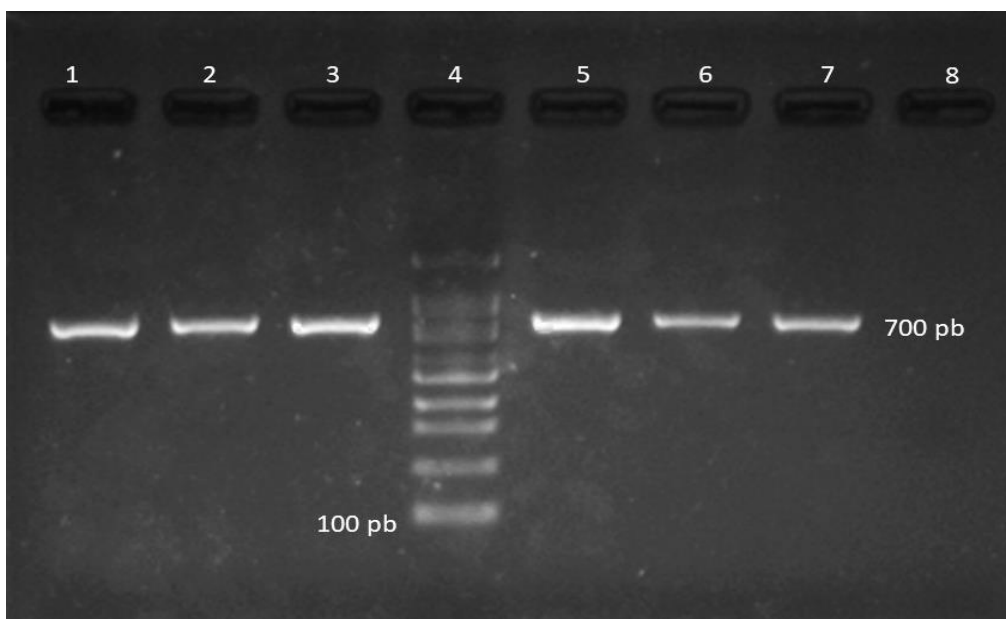


Figura 7. Detección de *iha* por PCR de punto final (700 pb). Carriles 1-3 y 5-6, cepas de *E. coli* de pacientes con periodontitis; carril 4, marcador de peso molecular (MWM; 100 pb); carril 7, control positivo (ATCC25922) y carril 8, control negativo (sin DNA molde)

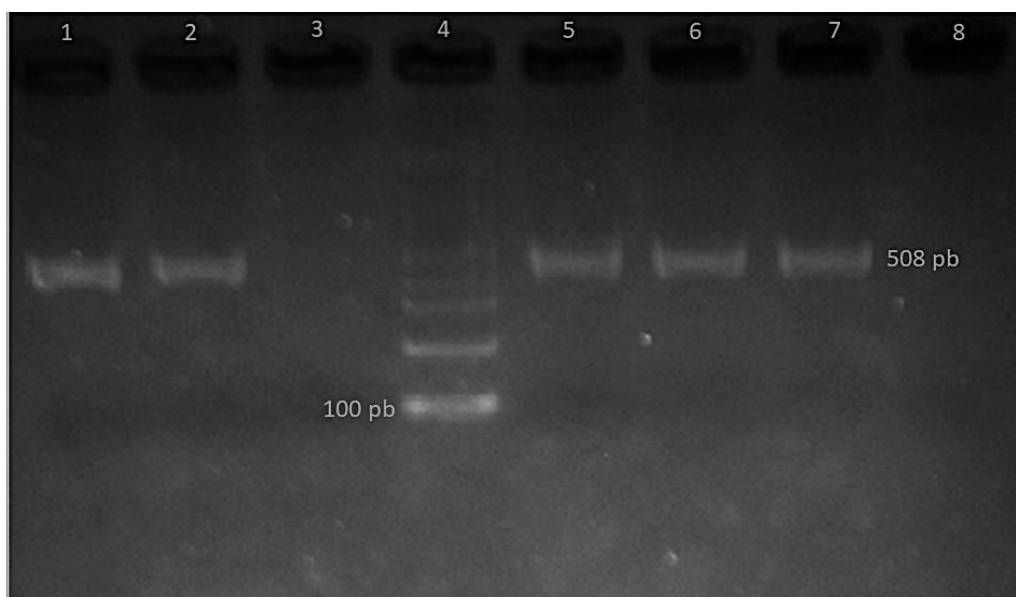


Figura 8. Detección de *fimH* por PCR de punto final (MWM; 508 pb). Carriles 1-2 y 5-6, cepas de *E. coli* de pacientes con periodontitis; carril 4, marcador de peso molecular (MWM; 100 pb); carril 7, control positivo (ATCC25922); carril 8, control negativo (sin DNA molde).

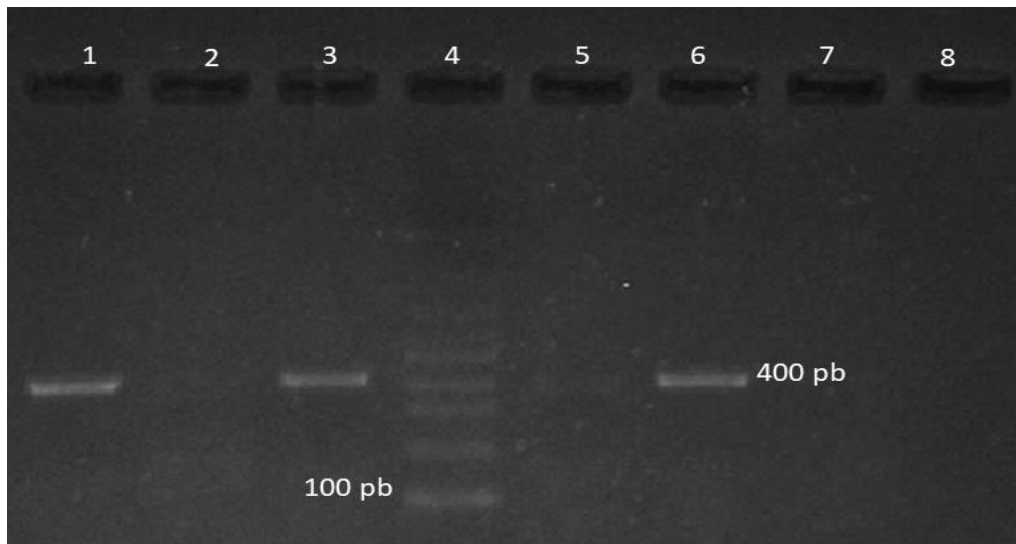


Figura 9. Detección de *sfa* por PCR de punto final (400 pb). Carriles 1 y 3 cepas de *E. coli* de pacientes con periodontitis; carril 4 marcador de peso molecular (MWM;100 pb); carril 6, control positivo (ATCC 25922); carril 8, control negativo (sin DNA molde).

EXPRESIÓN DE LOS MARCADORES DE VIRULENCIA POR PCR EN TIEMPO REAL

En la tabla 4 se aprecian los porcentajes de expresión de los genes de virulencia de las cepas de *E. coli* periodontales (n=5) bajo crecimiento en caldo nutritivo infusión-cerebro-corazón (BHI), y caldo de soya tripticaseína (ST). Los genes *papG II* (figura 10), *papH* (figura 11) e *iha* (figura 12) se expresaron en todas las cepas (100% n=5), provenientes de pacientes con Periodontitis moderada y crónica después del crecimiento en BHI y ST, mientras que el gen *fimH* (figura 13) se expresó más en las cepas asociadas a P. moderada (100%), con respecto a P. crónica (50%). El gen *sfa* (figura 14) se expresó con mayor frecuencia en cepas aisladas de pacientes P. crónica (100%), con relación a cepas de pacientes con P. moderada (33%; Tabla 3).

Función	Gen	Periodontitis moderada (n= 3) No. %		Periodontitis crónica (n=2) No. %		Total (n=5) 100%
		BHI	ST	BHI	ST	
Adhesinas	<i>fimH</i>	3(100)	3(100)	1(50)	1(50)	4(80)
	<i>papG II</i>	3(100)	3(100)	2(100)	2(100)	5(100)
	<i>papH</i>	3(100)	3(100)	2(100)	2(100)	5(100)
	<i>sfa</i>	1(33.3)	1(33.3)	2(100)	2(100)	3(60)
	<i>iha</i>	3(100)	3(100)	2(100)	2(100)	5(100)

Tabla 4. Frecuencia de la expresión de los genes de virulencia en las cepas de *E. coli* asociada a los diferentes grados de periodontitis y al medio de cultivo,

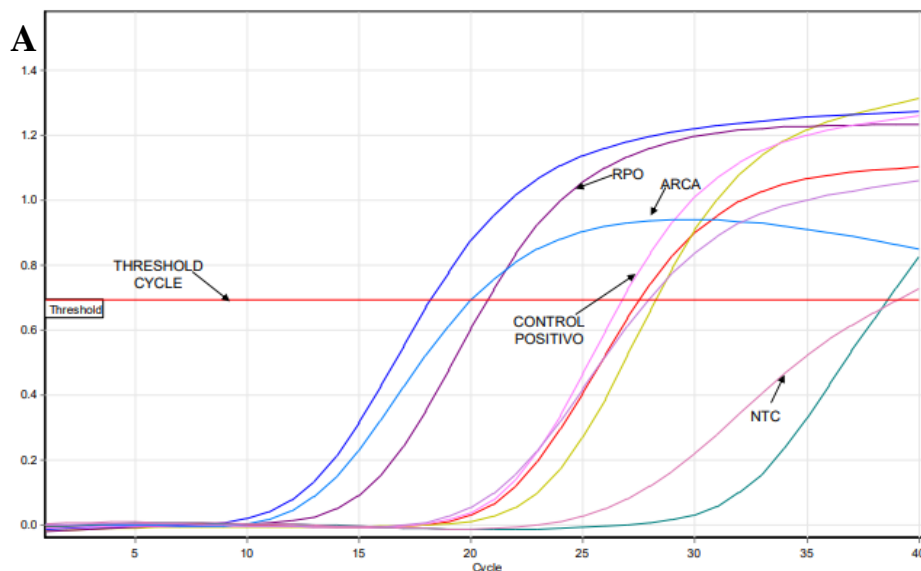


Figura 10 A). Detección de la expresión de *papG II* en las cepas de *E. coli* por PCR tiempo real después del crecimiento en BHI. La fluorescencia se leyó a 60°C en el canal verde. Control positivo (*E. coli* ATCC 25922). NTC (No control template). Controles internos (*RPO* y *ARCA*).

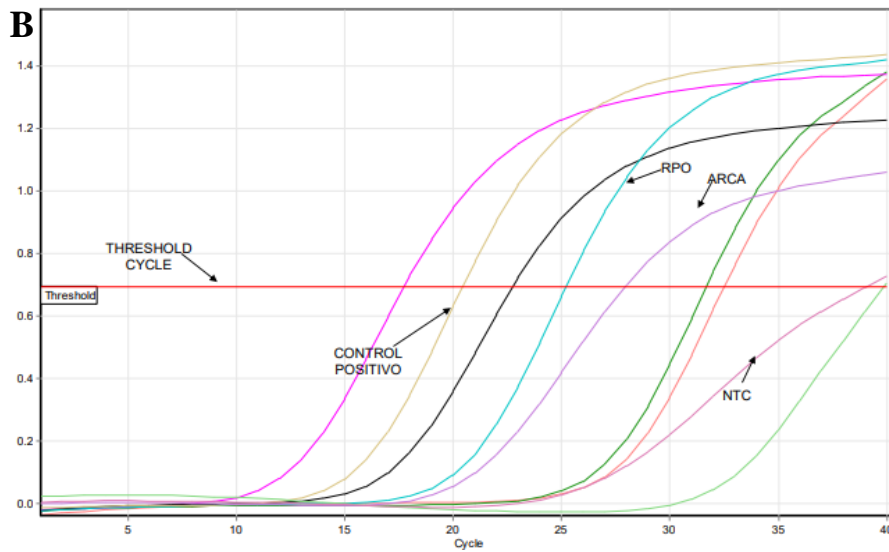


Figura 10 B). Detección de la expresión de *papG II* en las cepas de *E. coli* por PCR tiempo real después del crecimiento en ST. La fluorescencia se leyó a 60°C en el canal verde. Control positivo (*E. coli* ATCC 25922). NTC (No control template). Controles internos (*RPO* y *ARCA*)

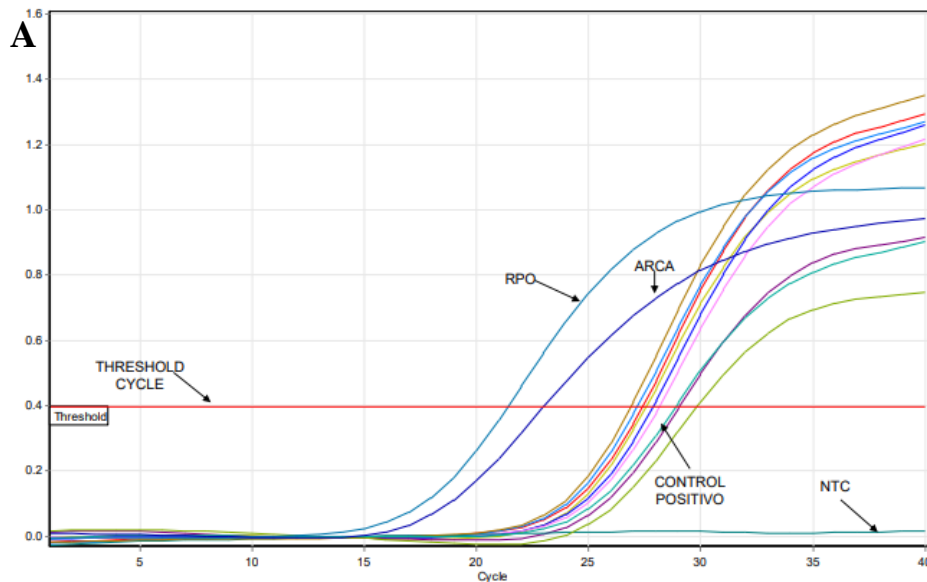


Figura 11. A). Detección de la expresión de *papH* en las cepas de *E. coli* por PCR tiempo real después del crecimiento en BHI. La fluorescencia se leyó a 60°C en el canal verde. Control positivo (*E. coli* ATCC 25922). NTC (No control template). Controles internos (*RPO* y *ARCA*)

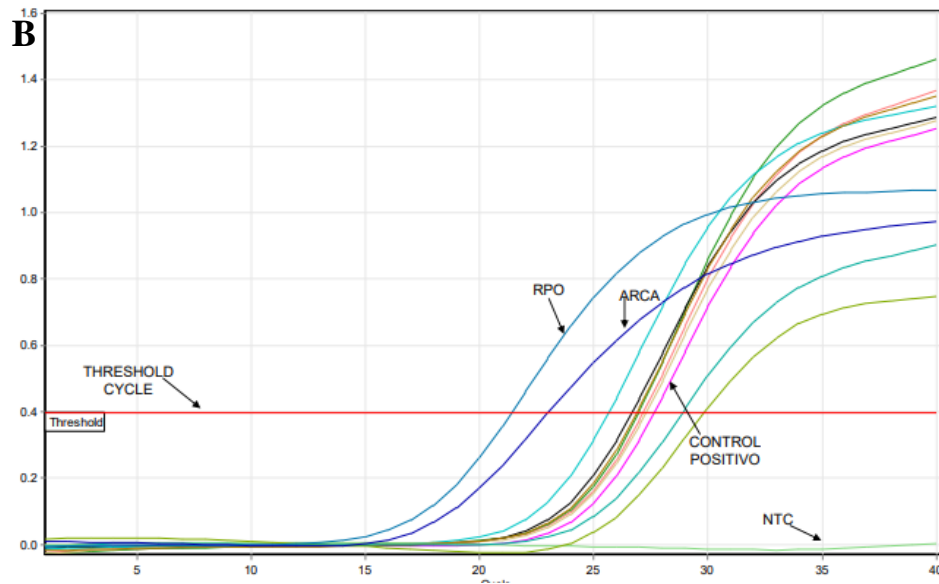


Figura 11. B). Detección de la expresión de *papH* en las cepas de *E. coli* por PCR tiempo real después del crecimiento en ST. La fluorescencia se leyó a 60°C en el canal verde. Control positivo (*E. coli* ATCC 25922). NTC (No control template). Controles internos (*RPO* y *ARCA*)

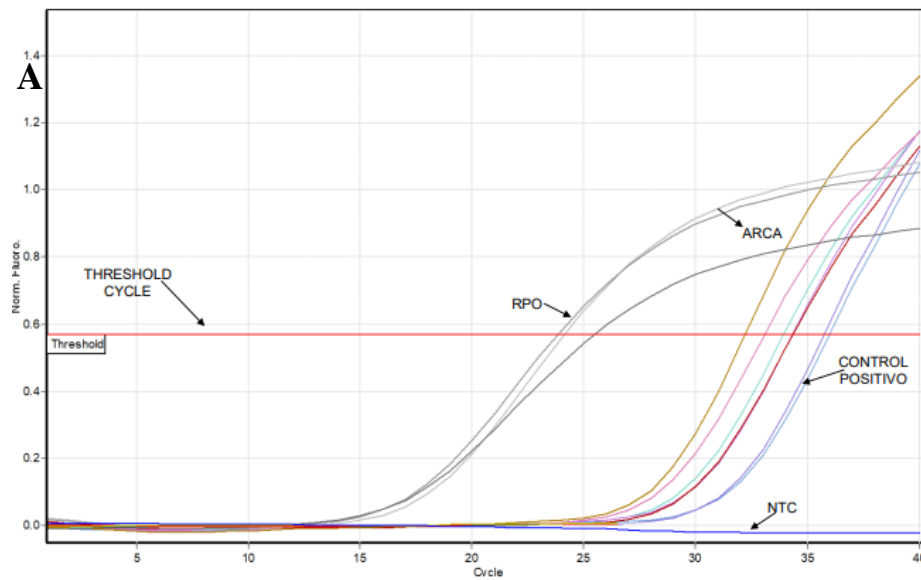


Figura 12. A). Detección de la expresión de *iha* en las cepas de *E. coli* por PCR tiempo real después del crecimiento en BHI. La fluorescencia se leyó a 60°C en el canal verde. Control positivo (*E. coli* ATCC 25922). NTC (No control template). Controles internos (*RPO* y *ARCA*).

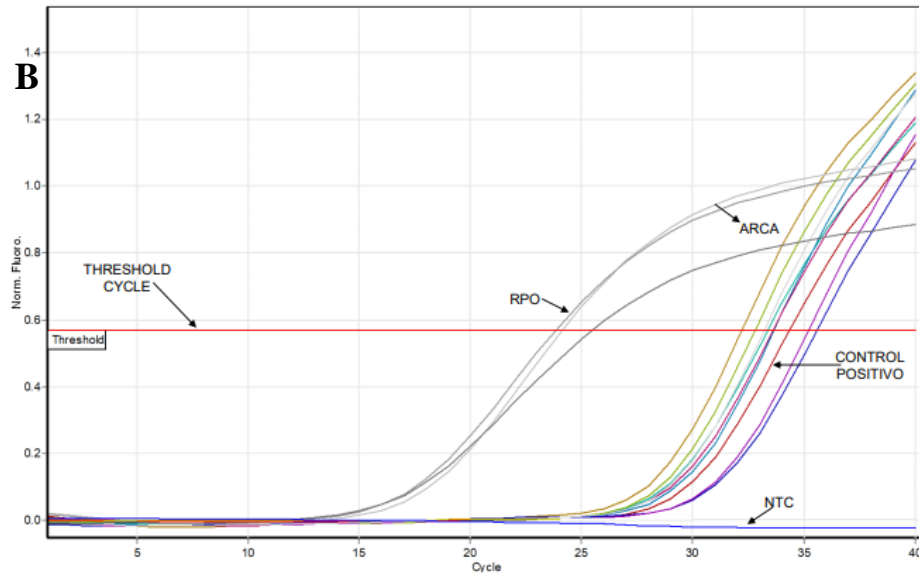


Figura 12. B). Detección de la expresión de *iha* en las cepas de *E. coli* por PCR tiempo real después del crecimiento en ST. La fluorescencia se leyó a 60°C en el canal verde. Control positivo (*E. coli* ATCC 25922). NTC (No control template). Controles internos (*RPO* y *ARCA*).

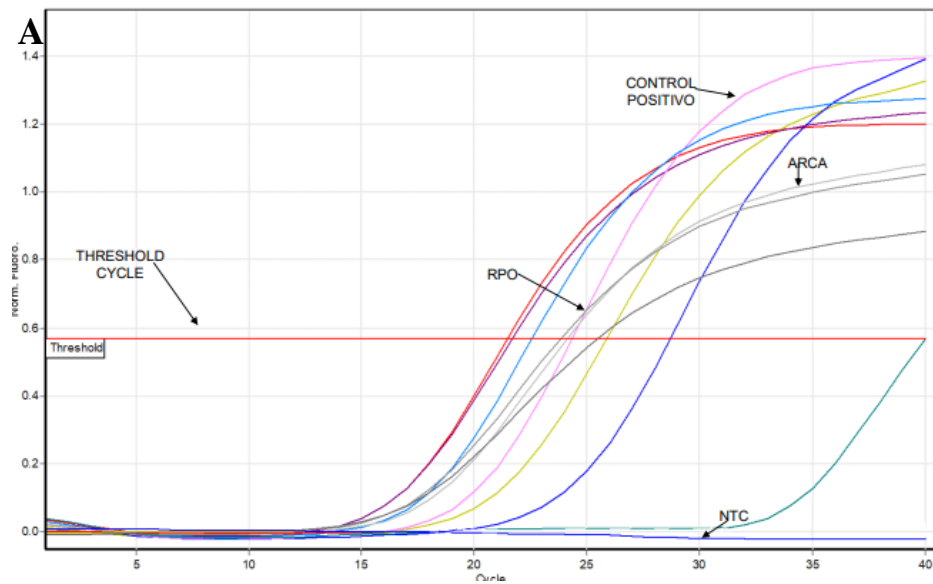


Figura 13. A). Detección de la expresión de *fimH* en las cepas de *E. coli* por PCR tiempo real después del crecimiento en BHI. La fluorescencia se leyó a 60°C en el canal verde. Control positivo (*E. coli* ATCC 25922). NTC (No control template). Controles internos (*RPO* y *ARCA*).

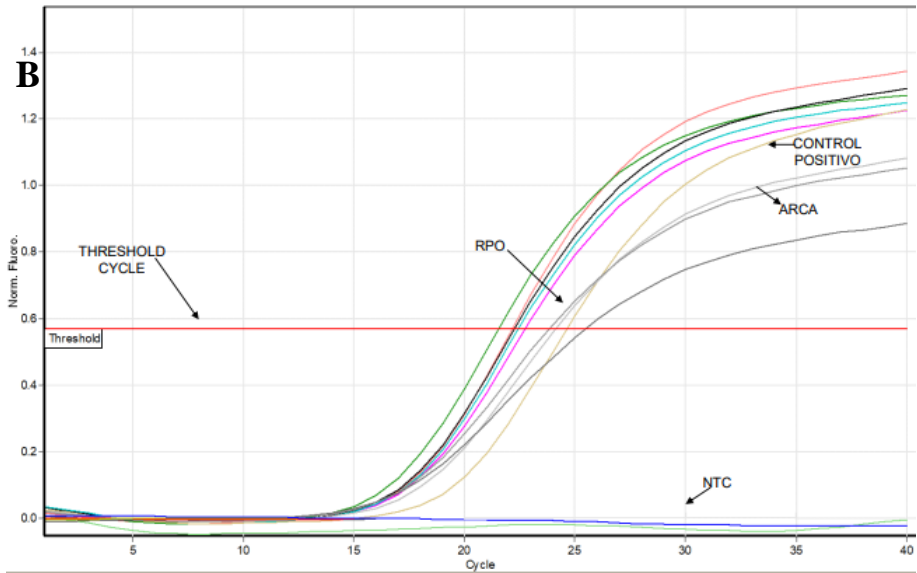


Figura 13. B). Detección de la expresión de *fimH* en las cepas de *E. coli* por PCR tiempo real después del crecimiento en ST. La fluorescencia se leyó a 60°C en el canal verde. Control positivo (*E. coli* ATCC 25922). NTC (No control template). Controles internos (*RPO* y *ARCA*).

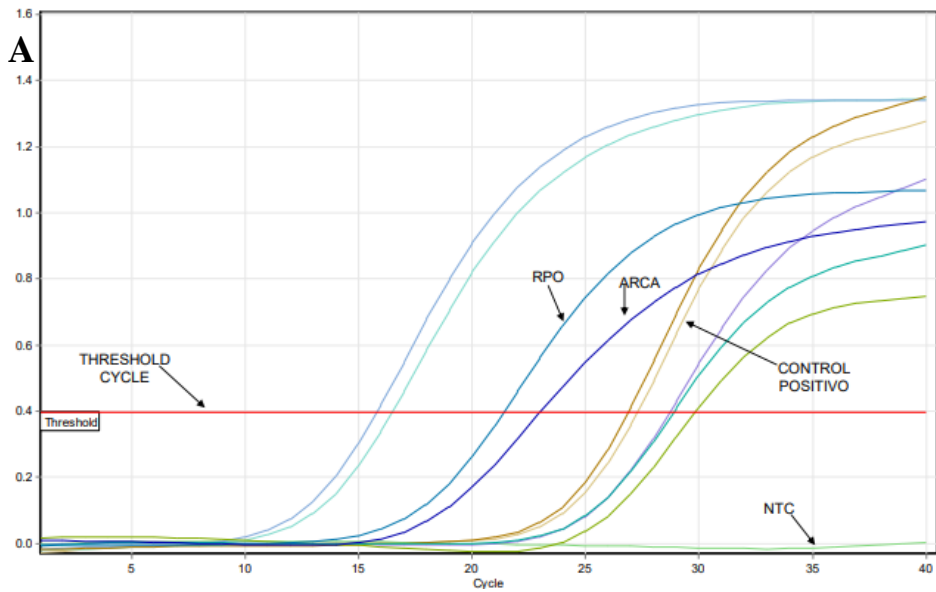


Figura 14. A). Detección de la expresión de *sfa* en las cepas de *E. coli* por PCR tiempo real después del crecimiento en BHI. La fluorescencia se leyó a 60°C en el canal verde. Control positivo (*E. coli* ATCC 25922). NTC (No control template). Controles internos (*RPO* y *ARCA*).

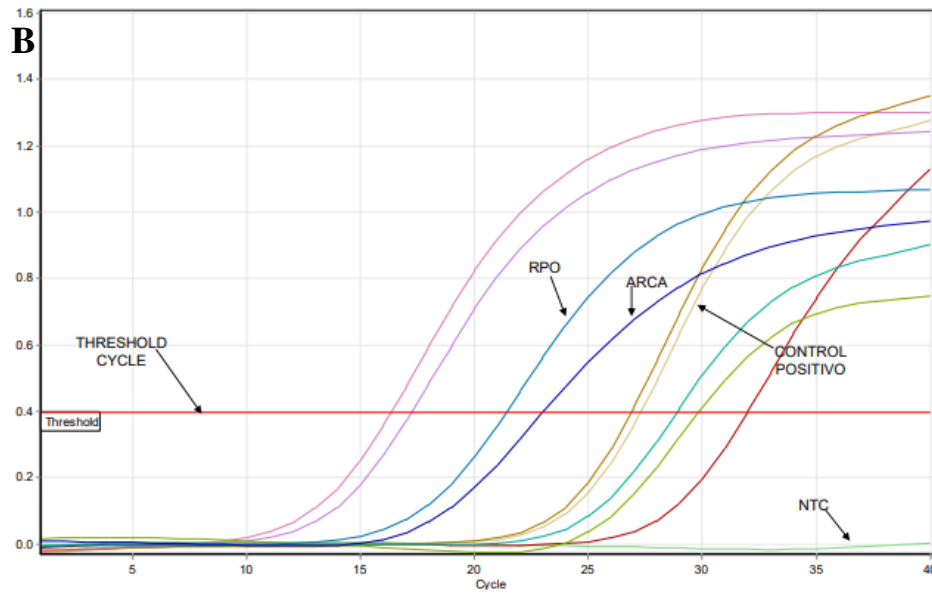


Figura 14. B). Detección de la expresión de *sfa* en las cepas de *E. coli* por PCR tiempo real después del crecimiento en ST. La fluorescencia se leyó a 60°C en el canal verde. Control positivo (*E. coli* ATCC 25922). NTC (No control template). Controles internos (*RPO* y *ARCA*).

DISCUSIÓN

PACIENTES ANALIZADOS

Se analizaron 5 cepas de *Escherichia coli* aisladas de la Clínica de Endoperiodontología de la FES Iztacala, de pacientes con diferentes grados de periodontitis; periodontitis moderada (n=3) y periodontitis crónica (n=2). Se sabe que la periodontitis es una enfermedad infecciosa ocasionada por la acumulación de bacterias anaerobias de la cavidad bucal, entre las especies más frecuentes se encuentran: *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycescomitans*, *Tannerella forsythensis*, *Eikenella corrodens*, *Campylobacter rectus*, *Peptoestreptococo micros*, *Treponema denticola* y *Prevotella intermedius* (Medina, 2010 ; Camarena *et al.*, 2017). Actualmente se ha descrito la presencia de *E. coli* como patógeno emergente en pacientes con periodontitis crónica, por ejemplo; en Colombia analizaron 202 pacientes con periodontitis crónica, 139 con periodontitis agresiva, encontrando la presencia del 36% de enterobacterias (Jaramillo *et al.*, 2006); en Enugu, Nigeria se trabajó con 178 especies clínicas de enterobacterias previamente aisladas de pacientes con gingivitis y periodontitis: *K. pneumoniae* n=65), ***E. coli*** (n=44), *Salmonella* (n=35) y *K. oxytoca* (n=34) (Iroha *et al.*, 2022); en Bogotá, Colombia se registraron 3 pacientes con periodontitis crónica encontrando a ***E. coli*** como una de las enterobacterias más frecuentes (Gamboa *et al.*, 2013); en Mexicali, México analizaron 42 muestras de pacientes con periodontitis encontrando enterobacterias como ***E. coli***, *K. oxytoca* y *K. pneumoniae* con una prevalencia de 9.3% (Hurtado Camarena, 2017).

En este estudio se encontró que el 60% (n=3) de los pacientes analizados fueron mujeres y el 40% (n=2) hombres (figura 2), y, el rango de edad más abundante fue de 70-79 años con el 60% (n=3), seguido por el de 60-69 con el 40% (n=2; figura 2). Las enfermedades periodontales afectan alrededor del 50% de la población adulta (hombres y mujeres) en todo el mundo, es la segunda causa de enfermedades bucales seguida de la caries, los factores de riesgo dependen de la

genética, etnia, edad, hábitos de higiene, tabaquismo, diabetes, sexo, condiciones económicas, culturales y obesidad. Con la edad la placa dental bacteriana va sufriendo distintos cambios favoreciendo la colonización de bacterias, además se ha encontrado que el incremento de hormonas maternas en la saliva influye en la predisposición de la presencia de ciertas especies periodonto patógenas (Carrillo-de-Albornoz *et al.*, 2010 ; Camarena *et al.*, 2017).

IDENTIFICACIÓN DE *Escherichia coli*

Las 5 cepas aisladas de pacientes con diferentes grados de periodontitis fueron identificadas por las pruebas bioquímicas estándar y molecularmente por PCR convencional mediante la amplificación del gen 16S rRNA (figura 4). *Escherichia coli* es una enterobacteria patógena que puede provocar diversas infecciones en los humanos, como infecciones intestinales, infecciones del tracto urinario, y algunas cepas adquirieron genes de virulencia específicos que les permiten causar infecciones extra-intestinales, que incluyen infecciones urinarias, vaginales y actualmente se han registrado infecciones periodontales en distintas partes del mundo. (Medina *et al.*, 2012 ; Gamboa *et al.*, 2013; Khairy *et al.*, 2019).

El encontrar la presencia de enterobacterias como *E. coli* en los pacientes con enfermedad periodontal es un problema de salud, debido a que además de agravar el cuadro clínico de los pacientes con periodontitis, también puede ocasionar otros tipos de padecimientos, al entrar al torrente sanguíneo y provocar septicemias en pacientes inmunosuprimidos, por diabetes mellitus, cáncer, trasplante de órganos, neumonía, etc. (Medina, 2010 ; Camarena *et al.*, 2017).

FRECUENCIA DE LOS GENES DE VIRULENCIA

La adhesión bacteriana a las células epiteliales del hospedero es uno de los principales mecanismos de virulencia que favorece la colonización, invasión y multiplicación bacteriana. Entre los genes de adhesión más importantes se encuentra la fimbria tipo 1 (*fim*), fimbria P o Pilus asociado a pielonefritis (*pap*), fimbria S (*sfa*), adhesina afrimbrial o de adherencia difusa (*afa*) y adhesina homóloga superficial receptora de hierro (*iha*) (Cárdenas-Perea *et al.*, 2014).

La frecuencia y participación de los marcadores de virulencia de *E. coli* durante la patogénesis de las enfermedades periodontales en México y en otras partes del mundo no ha sido estudiada.

En este trabajo se encontró una elevada frecuencia de los genes de adhesión *papG II*, *papH*, *iha*, *fimH* y *sfa* en las cepas periodontales de *E. coli* (Tabla 2), Porcentaje similar para *fimH* (85%) fue descrito en cepas uropatógenas (Karimian *et al.*, 2012) y también con el descrito en cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con infecciones de vías urinarias (Najafi *et al.*, 2018), mientras que los porcentajes para *papG* (9.3%), *papC* (38.6%) y *sfa* (0.7%) en las cepas uropatógenas fueron menores a los encontrados en las cepas periodontales. La frecuencia de *papG II*, *fimH* y *sfa* también coincide con la reportada en cepas uropatógenas de *E. coli* aisladas de pacientes en Irán (Malekzadegan *et al.*, 2018).

La frecuencia de *fimH*, y *papG II* detectada en las cepas periodontales de *E. coli* evidencia la patogenicidad de las cepas para ocasionar otros tipos de infecciones, debido a que *fimH*, y *papG II* han sido asociados en cepas causantes de cistitis y pielonefritis (Bower *et al.*, 2005).

EXPRESIÓN DE LOS MARCADORES DE VIRULENCIA POR PCR EN TIEMPO REAL

En este trabajo no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las frecuencias de expresión de los genes de adhesión de las cepas de *E. coli* periodontales (n=5) bajo crecimiento en caldo nutritivo infusión-cerebro-corazón (BHI), y caldo de soya tripticaseína (ST) (tabla 6 y 7).

Los genes *papG II*, *papH*, e *iha* (tabla 3) se expresaron en todas las cepas (100% n=5), provenientes de pacientes con Periodontitis moderada y crónica después del crecimiento en BHI y ST. Estos porcentajes contrastan con los descritos en un amplio estudio realizado en cepas uropatógenas de *E. coli* (n=194), donde la expresión de los genes de adhesión después de la infección en un modelo *in vitro* utilizando la línea celular vaginal A431 fue para *papGII* de 15.4% (n=30), *papC* 33.5% (n=65), *iha* 64.9% (n=126), *papGI* 4.1% (n=8) y *papGIII* 5.7% (n=11) (Paniagua-Contreras *et al.*, 2017). La elevada expresión de los genes de adhesión en las cepas periodontales demuestra la virulencia de las cepas para ocasionar no solamente infecciones periodontales más agudas, sino también otro tipo de infecciones, sobre todo considerando que las fimbrias P o fimbrias asociadas a pielonefritis se han encontrado frecuentemente en cistitis, pielonefritis y bacteremia en cepas de *E. coli* uropatógenas. Estas adhesinas se unen al resto del disacárido alfa-galactosidasa y beta-galactosidasa presente en la superficie de las células uroepiteliales y en los eritrocitos humanos (Krogfelt, 1991 ; Lüthje, y Brauner, 2014), mientras que la proteína *Iha*, que anteriormente era considerada como una adhesina en las *E. coli* uropatógenas (UPEC), y después de varios estudios filogenéticos se demostró una alta homología con los receptores de sideróforos, por lo tanto, *Iha* sirve como receptor alternativo para el hierro, además ha sido descrita como un factor de virulencia capaz de ofrecer un fenotipo adherente a cepas que carecen de mecanismos de adherencia conocidos (Araya González, 2019 ; Lüthje, y Brauner, 2014).

En este estudio el gen *fimH* (figura 13) se expresó más en las cepas asociadas a Periodontitis moderada (100%; tabla 3), con respecto a Periodontis crónica (50%). La elevada expresión de *fimH* en las cepas de *E. coli* asociadas a P. moderada es similar al 89.5% (n= 173) descrito en cepas cérvico-vaginales de *E. coli* (n=200) después de la infección in vitro en células epiteliales vaginales humanas (Monroy-Pérez *et al.*, 2020), mientras que el porcentaje de expresión de *fimH* en las cepas asociadas a P. crónica es similar al 58.2% (n=113) encontrado en cepas UPEC (n=194) (Paniagua-Contreras *et al.*, 2017). La proteína *fimH* es un factor de virulencia importante en UPEC, que es esencial para invadir el tracto urinario en humanos por la acción de unirse a receptores manosilados, favoreciendo la adhesión, invasión y formación de comunidades bacterianas (Lüthje, y Brauner, 2014).

En este estudio el gen *sfa* (figura 14) se expresó con mayor frecuencia en cepas aisladas de pacientes con P. crónica (100%), con relación a cepas de pacientes con P. moderada (50%; Tabla 3). Estos porcentajes contrastan con el 26% (n=5) identificado en cepas uropatógenas (UPEC) (n=194) (Paniagua-Contreras *et al.*, 2017) y con el 10% (n=20) identificado en cepas cérvico-vaginales (n=200) aisladas de mujeres con infecciones vaginales ocasionales, recurrentes y crónicas (Monroy-Pérez *et al.*, 2020). Se ha reportado que *Sfa* es una adhesina común en UPEC, que se une a los receptores de los eritrocitos, de células epiteliales renales y del epitelio de la vejiga, y ha sido relacionada con la sepsis y meningitis (Lüthje, y Brauner, 2014).

La elevada expresión de los marcadores de adhesión en las cepas periodontales de *E. coli* pone de manifiesto la capacidad de las cepas para adherirse a las células epiteliales de la encía durante la patogénesis de la enfermedad periodontal, por lo que podría ser un patógeno secundario emergente que favorecería la agudeza de las infecciones, con el riesgo de ocasionar otro tipo de infecciones, sobre todo en pacientes con algún otro tipo de padecimiento (diabetes, hipertensión, cáncer, etc), debido a que estos factores de virulencia han sido encontrados frecuentemente en otros patotipos de cepas, como lo son las cepas uropatógenas de *E. coli* y en cepas cérvico-vaginales.

CONCLUSIONES

1. La mayoría de las cepas de *Escherichia coli* analizadas provinieron de mujeres de la tercera edad principalmente con periodontitis moderada.
2. Los genes de adhesión detectados con mayor frecuencia en las cepas asociadas tanto a Periodontitis moderada como Periodontitis crónica fueron, *papG II*, *papH* e *iha*, mientras que *fimH* fue más frecuente en pacientes con Periodontitis moderada.
3. Los genes de adhesión de las cepas de pacientes con Periodontitis moderada y crónica expresados con mayor frecuencia después del crecimiento tanto en BHI como en caldo ST fueron *papGII*, *papH* e *iha*, mientras que *sfa* se expresó más frecuentemente en cepas de pacientes con periodontitis crónica, indistintamente del caldo nutritivo de cultivo.
4. La expresión de los genes de adhesión de las cepas no se vio afectada durante el crecimiento en los caldos nutritivos de Infusión Cerebro Corazón (BHI) y Soya Trypticaseína (ST).
5. La elevada expresión de los genes que codifican para las proteínas adhesinas evidencia la virulencia de las cepas para ocasionar infecciones periodontales crónicas en los pacientes estudiados.

ANEXO 1

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En las tablas 5, 6 y 7 se presentan los resultados para la prueba estadística χ^2 . Los resultados no arrojaron diferencias significativas de expresión en cuanto a los medios de cultivo BHI y ST. Los valores obtenidos indican una asociación entre los medios de cultivo.

Observado			
Gen	Detección de genes		Total
	Si	No	
<i>fimH</i>	4	1	5
<i>papGII</i>	5	0	5
<i>papH</i>	5	0	5
<i>sfa</i>	3	2	5
<i>iha</i>	5	0	5
Total	22	3	25
	88%	12%	

Chi ²			
Gen	Detección de genes		Total
	Si	No	
<i>fimH</i>	0.04	0.27	
<i>papGII</i>	0.08	0.60	
<i>papH</i>	0.08	0.60	
<i>sfa</i>	0.45	3.27	
<i>iha</i>	0.08	0.60	
Total	1	5	6

Esperado			
Gen	Detección de genes		Total
	Si	No	
<i>fimH</i>	4	1	5
<i>papGII</i>	4	1	5
<i>papH</i>	4	1	5
<i>sfa</i>	4	1	5
<i>iha</i>	4	1	5
	22	3	25

Valores cercanos a 0 indican que no hay asociación.

Valores lejanos a 0 indican asociación.

Tabla 5. Prueba estadística χ^2 de la detección de los genes de virulencia de *E. coli*

Observado			
Gen	Expresión de genes BHI		Total
	Si	No	
<i>fimH</i>	4	1	5
<i>papGII</i>	5	0	5
<i>papH</i>	5	0	5
<i>sfa</i>	3	2	5
<i>iha</i>	5	0	5
Total	22	3	25
	88%	12%	

Esperado			
Gen	Expresión de genes BHI		Total
	Si	No	
<i>fimH</i>	4	1	5
<i>papGII</i>	4	1	5
<i>papH</i>	4	1	5
<i>sfa</i>	4	1	5
<i>iha</i>	4	1	5
	22	3	25

Chi^2			
Gen	Expresión de genes BHI		Total
	Si	No	
<i>fimH</i>	0.04	0.27	
<i>papGII</i>	0.08	0.60	
<i>papH</i>	0.08	0.60	
<i>sfa</i>	0.45	3.27	
<i>iha</i>	0.08	0.60	
Total	1	5	6

Valores cercanos a 0 indican que no hay asociación.
Valores lejanos a 0 indican asociación.

Tabla 6. Prueba estadística χ^2 de la expresión de los genes de virulencia de *E. coli* en el medio de cultivo BHI.

Observado			
Gen	Expresión de genes ST		
	Si	No	Total
fimH	4	1	5
papGII	5	0	5
papH	5	0	5
sfa	3	2	5
iha	5	0	5
Total	22	3	25
	88%	12%	

Chi ²			
Gen	Expresión de genes ST		
	Si	No	Total
fimH	0.04	0.27	
papGII	0.08	0.60	
papH	0.08	0.60	
sfa	0.45	3.27	
iha	0.08	0.60	
Total	1	5	6

Esperado			
Gen	Expresión de genes ST		
	Si	No	Total
fimH	4	1	5
papGII	4	1	5
papH	4	1	5
sfa	4	1	5
iha	4	1	5
	22	3	25

Valores cercanos a 0 indican que no hay asociación.

Valores lejanos a 0 indican asociación.

Tabla 6. Prueba estadística χ^2 de la expresión de los genes de virulencia de *E. coli* en el medio de cultivo ST.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aguilar-Zapata D. *E. coli* BLEE, la enterobacteria que ha atravesado barreras. *Médica Sur*. 2016;22(2):57-63.
2. Allocati N, Masulli M, Alexeyev MF, Di Ilio C. *Escherichia coli* in Europe: an overview. *International journal of environmental research and public health*. 2013;10(12).
3. Andreu A. Pathogenesis of urinary tract infections. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. 2005;23:15-21.
4. Araya González A. Participación del sistema AtoS-AtoC en la expresión inducida por ácidos grasos de cadena corta del factor de virulencia iha en una cepa de *E. coli* STEC LEE (Bioquímico). Universidad de Chile Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. 2019.
5. Ávalos GJ, López LM, García VR, Ugalde MS. Principales factores bacterianos que promueven la colonización e invasión de los tejidos humanos. *Educación Química*. 2000;11(2): 274-283.
6. Burkholder PR, McVeigh I. Synthesis of vitamins by intestinal bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1942;28(7):285-289.
7. Hurtado CAH, Bojórquez AY, Montaña PML, Mendoza JA. Bacterial related to periodontal diseases. *Oral*. 2016;17 (54):1374-1378.
8. Cárdenas-Perea ME, Cruz OR, Gándara-Ramírez LJL, Pérez-Hernández MA. Factores de virulencia bacteriana: la “inteligencia” de las bacterias. *Elementos* 94. 2014;35-43.
9. Carrillo-de-Albornoz A, Figuero E, Herrera D, Bascones-Martínez A. Gingival changes during pregnancy: II. Influence of hormonal variations on the subgingival biofilm. *Journal of Clinical Periodontology*. 2010; 37(3): 230-40
10. Del Castillo-Rueda A, Khosravi-Shahi P. Papel del hierro en la interacción entre el huésped y el patógeno. *Medicina Clínica*. 2010;134(10); 452-456.
11. Elias WP, Navarro-Garcia F. Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC). *Escherichia coli* in the Americas. 2016; 27–57.
12. Ewers C, Li G, Wilking H, Kießling S, Alt K, Antão EM, Wieler LH. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*:

how closely related are they? International journal of medical microbiology. 2007; 297(3):163-176.

13. Gamboa F, García DA, Acosta A, Mizrahi D, Paz A, Martínez D, Abba M. Presence and antimicrobial profile of gram-negative facultative anaerobe rods in patients with chronic periodontitis and gingivitis. *Acta Odontológica Latinoamericana*. 2013; 26(1):24-30.
14. Gordon DM. The ecology of *Escherichia coli*. In *Escherichia coli*. Academic Press. 2013; 3-20.
15. Hurtado CA. Prevalencia y susceptibilidad antimicrobiana de especies de enterobacterias en bolsas periodontales de pacientes con periodontitis crónica confirmada (maestro). Universidad Autónoma de Baja California Facultad de Enfermería, Mexicali. 2017.
16. Iroha IR, Mohammed ID, Moses IB, Ngwu NJ, Uzoeto HO, Oladimeji AS, Ikemesit UP, Onuora LA, Ewa NJ, Edemekong C. Molecular characterization of Enterobacteriaceae isolated from gingivitis and periodontitis patients and the antimicrobial activity of mouth wash agents. *Scientific African*. 2022; 15: e01106.
17. Jaramillo A, Cruz C, Mat I, Contreras A. Microorganismos inusuales en surcos y bolsas periodontales. *Colombia Médica*. 2006;37(1):6-14.
18. Bower JM, Eto DS, Mulvey MA. Covert operations of uropathogenic *Escherichia coli* within the urinary tract. *Traffic* 6. 2005;18-31.
19. Karimian A, Momtaz H, Madani M. Detection of uropathogenic *Escherichia coli* virulence factors in patients with urinary tract infections in Iran. *African Journal of Microbiology Research*. 2012; 6(39).
20. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*. 2004; 2(2):123-140.
21. Khairy RM, Mohamed ES, Abdel Ghany HM, Abdelrahim SS. Phylogenetic classification, and virulence genes profiles of uropathogenic *E. coli* and diarrhegenic *E. coli* strains isolated from community acquired infections. *PLoS One*. 2019; 14(9).

22. Krogfelt KA. La Adhesión bacteriana: la Genética, la Biogénesis, y su Papel en la Patogénesis de Adhesinas Fimbriales de *Escherichia coli*. Clínica De Enfermedades Infecciosas. 1991; 13(4): 721-735.
23. Lane DJ, Pace B, Olsen GJ, Stahl DA, Sogin ML, Pace NR. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1983;82(20).
24. Lee JH, Subhadra B, Son YJ, Kim DH, Park HS, Kim JM, Choi CH. Phylogenetic group distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties of uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from patients with urinary tract infections in South Korea. Letters in Applied Microbiology. 2016;62(1):84-90.
25. Lobos O, Padilla A, Padilla C. Análisis genético y propiedades virulentas de cepas de *Escherichia coli* aisladas desde infección vaginal. Revista Chilena de Infectología. 2013;30(4):381-387.
26. López-Banda DA, Carrillo-Casas EM, Leyva-Leyva M, Orozco-Hoyuela G, Manjarrez-Hernández ÁH, Arroyo-Escalante S, Moncada-Barrón D, Villanueva-Recillas S, Xicohtencatl-Cortes J, Hernández-Castro R. Identification of virulence factor genes in *E. coli* isolated from women with urinary tract infection in Mexico. BioMed research international. 2014.
27. Lüthje P, Brauner A. Virulence factors of uropathogenic *E. coli* and their interaction with the host. Advances in Microbial Physiology. 2014; 65:337-372.
28. Malekzadegan Y, Khashei R, Sedigh Ebrahim-Saraie H, Jahanabadi Z. Distribution of virulence genes and their association with antimicrobial resistance among uropathogenic *Escherichia coli* isolates from Iranian patients. BMC Infectious Diseases. 2018;18(1):572.
29. Martínez Cruz, D. Caracterización fenotípica y genotípica de cepas de *Escherichia coli* aisladas de infecciones del tracto urinario (Tesis de Licenciatura). Benemerita Universidad Autónoma de Puebla. 2017.
30. Maurelli AT. Shigella and enteroinvasive *Escherichia coli*: Paradigms for pathogen evolution and host–parasite interactions. In *Escherichia coli*. Academic Press. 2013; 215-245.

31. Medina A. Efecto de las enterobacterias en pacientes con periodontitis crónica. *Avances en Periodoncia e Implantología Oral*. 2010;22(1):27-35.
32. Medina A, Arbeláez Montoya MI, Guzmán Zuluaga IC. Perfil microbiológico subgingival de pacientes con periodontitis crónica en una población de Colombia. *Avances en periodoncia e implantología oral*. 2012;24(1):47-53.
33. Meza-Segura M, Estrada-García T. Diffusely Adherent *Escherichia coli*. *Escherichia coli in the Americas*. 2016;125–147.
34. Momtaz H, Karimian A, Madani M, Dehkordi FS, Ranjbar R, Sarshar M, Souod N. Uropathogenic *Escherichia coli* in Iran: serogroup distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 2013; 12(1), 1-12.
35. Monroy-Pérez E, Cerón AB, García Cortés LR, Alonso NN, Domínguez-Trejo P, Hernández-Jaimes T, Bustos-Martínez J, Hamdan-Partida A, Rojas Jiménez EA, Vaca S, Vaca-Paniagua F, Paniagua-Contreras GL. Virulence gene transcription, phylogroups, and antibiotic resistance of cervico-vaginal pathogenic *E. coli* in Mexico. *PLoS One*. 2020;15(6): e0234730.
36. Najafi A, Hasanpour M, Askary A, Aziemzadeh M, Hashemi N. Distribution of pathogenicity island markers and virulence factors in new phylogenetic groups of uropathogenic *Escherichia coli* isolates. *Folia Microbiologica (Praha)*. 2018;63(3):335-343.
37. Paniagua-Contreras GL, Hernández-Jaimes T, Monroy-Pérez E, Vaca-Paniagua F, Díaz-Velásquez C, Uribe-García A, Vaca S. Comprehensive expression analysis of pathogenicity genes in uropathogenic *Escherichia coli* strains. *Microbial Pathogenesis*. 2017;1- 7
38. Pérez Ama A. Estudio de las propiedades de virulencia en cepas de *Escherichia coli* uropatógena (Tesis de Maestría). Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. 2018.
39. Rivas M, Chinen I, Guth BEC. Enterohemorrhagic (Shiga Toxin Producing) *Escherichia coli*. *Escherichia coli in the Americas*. 2016;97–123.
40. Rodríguez-Angeles G. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud pública de México*. 2002;44:464-475.

41. Rodriguez-Siek KE, Giddings CW, Doetkott C, Johnson TJ, Fakhr MK, Nolan LK. Comparison of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005;151(6).
42. Russo TA, Johnson JR. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *The Journal of Infectious Diseases*. 2000;181(5):1753-1754.
43. Tolentino López E. Detección genotípica de los factores de virulencia: Fimbria tipo1, Fimbria P y α -Hemolisina en *Escherichia coli* aislados de urocultivos (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 2017.
44. Torres AG. *Escherichia coli* in the Americas. Springer. 2016 (ed). doi: 10.1007/978-3-319-45092-6
45. Vanaja SK, Jandhyala DM, Mallick EM, Leong JM, Balasubramanian S. Enterohemorrhagic and other Shigatoxin-producing *Escherichia coli*. In *Escherichia coli*. Academic Press. 2013;121-182
46. Vidal RM, Chamorro NL, Girón JA. Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Escherichia coli* in the Americas. 2016;1–26.