

Caracterización molecular de aislados clínicos de *Escherichia coli* obtenidas de pacientes con infecciones en vías urinarias

Eduardo Peña Jiménez^{1*}, Megan Alejandra Contreras Paredes^{2*}, Danna Paola Maximo Galicia^{4*}, José Alfredo Vázquez Valadez^{2*}, Ismael Aguayo Ayala^{3*}, Ximena Avalos Ayala^{1*}, Sergio López Briones⁵, Marco Antonio Hernández Luna⁵

¹Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato.

²Licenciatura en Médico Cirujano, División Ciencias de la Salud, Campus León, Universidad de Guanajuato.

³Ingeniería en Biotecnología, División de Ciencias de la Salud e Ingenierías, Campus Celaya-Salvatierra, Universidad de Guanajuato.

⁴Área Ciencias Naturales, Exactas y de la Salud, Escuela de Nivel Medio Superior Centro Histórico León, Universidad de Guanajuato.

⁵Departamento de Medicina y Nutrición, División de Ciencias de la Salud, Campus León, Universidad de Guanajuato.

*Autores que contribuyeron igualmente en el proyecto.

e.penajimenez@ugto.mx¹

Resumen

Las infecciones de vías urinarias (IVUs) son una de las infecciones de mayor recurrencia en el humano. El principal agente causal de las IVUs es *Escherichia coli* Uropatogénica o UPEC, bacteria que tiene factores de virulencia que facilitan su invasión y colonización en el sistema genitourinario. Entre las toxinas presentes en UPEC se encuentra la ciclodulina CNF-1, la cual está asociada al proceso inflamatorio del huésped. La identificación de esta toxina en aislados clínicos de pacientes con IVUs podría contribuir a realizar un mejor diagnóstico y tratamiento por parte del personal médico. Por lo que el objetivo del estudio fue determinar la presencia de CNF-1 en cinco aislados clínicos de *E. coli* utilizando técnicas moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y Western Blot. Los resultados obtenidos muestran que solo uno de los aislados tuvieron el gen de *cnf-1*, pero no se detectó la toxina por Western Blot. En conclusión, en este trabajo observamos que CNF-1 no está presente en todos los aislados clínicos de *E. coli* obtenidas de pacientes con IVUs.

Palabras clave: IVU; *Escherichia coli* Uropatogénica; CNF-1.

Introducción

Las infecciones de vías urinarias (IVUs), son ocasionadas por la invasión de microorganismos en el aparato genitourinario (riñón, uréteres, vejiga, uretra, etcétera). Estas infecciones son las más comunes en el humano. Las poblaciones de alto riesgo de infección sintomática del tracto urinario son neonatos, niñas en edad preescolar, mujeres sexualmente activas y adultos mayores. [1]

El cuadro clínico en las IVUs sintomáticas, en la mayoría, vienen acompañadas de disuria (dificultad al evacuar orina), polaquiuria (necesidad de orinar muchas veces durante el día o la noche), tenesmo (sensación persistente de ganas de orinar tras haber finalizado la micción), dolor suprapúbico (cuadros de dolor pélvico en la ingle, que aumenta con la deambulación y la abducción de la cadera, y puede presentar incluso fiebre leve en algunos casos), síntomas que en su conjunto se denominan síndrome miccional; además puede haber hematuria, fiebre y dolor en flanco, si se trata de una infección alta. Sin embargo, las infecciones de orina también pueden ser asintomáticas. [2], [3]

Las IVUs han adquirido mayor prevalencia sobre la población en la última década, siendo el grupo de infecciones bacterianas más frecuente en Estados Unidos, y el tercer lugar en México. [Error! No se encuentra el origen de la referencia.]

Si bien es cierto que estas infecciones son causadas por bacterias, tanto Gram-positivas como Gram-negativas, estas no son los únicos agentes que infectan al sistema genitourinario, ya que se han identificado ciertas especies de hongos como principales agentes etiológicos de las IVUs. [5] El principal agente etiológico bacteriano es *Escherichia coli* (microorganismo principal aislado del 70 – 90 % de las IVUs) seguida por *Staphylococcus saprophyticus*, *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) y *Proteus*

mirabilis (*P. mirabilis*) y menos frecuentemente *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) y *Candida albicans* (*C. albicans*). [Error! No se encuentra el origen de la referencia.], [5], [6]

Como se mencionó anteriormente, *E. coli* es el principal agente causal de las IVUs. *E. coli* es una enterobacteria Gram-negativa anaerobia facultativa localizada en el tubo digestivo, así como, en vías urinarias que llegan por medio de transmisión fecal, cateterismo uretral y transmisión sexual.^[7]

Escherichia coli Uropatogénica (UPEC) contiene varios factores de virulencia como FimH o adhesinas pili tipo 1 que facilita la invasión de las células huésped, así como, la colonización tanto en vía urinaria ascendente y descendente.^[8] Otros factores como el pili P están asociados a la patogénesis de pielonefritis, la S fimbriae y Fic están involucradas en sepsis y meningitis.^[9] Así mismo, UPEC producen toxinas como El Factor Necrotizante Citotóxico- 1 y 2 (CNF-1 y CNF-2)^[10].

La toxina CNF-1 es una proteína citoplasmática que desamina la glutamina en la posición 61 o 63 cambiandola a ácido glutámico en las proteínas de la familia Rho, ocasionando la activación constitutiva de RhoA.^{[10], [13]} Por lo que se ha propuesto que CNF-1 actúa como un "switch" de activación de la familia de GTPasas Rho que regulan la organización del citoesqueleto de actina.^{[10], [14]} La activación constitutiva de Rho GTPasas por los CNF-1 induce la polimerización y el reordenamiento de las fibras de actina^[14]. Otros estudios han mostrado que a mayor tiempo de exposición a la toxina el número de microvellosidades disminuye^{[10], [11]}; además de inhibir el ciclo celular^{[11], [12]}; y ocasionar reordenamientos del núcleo durante este proceso resultando en la formación de células multinucleadas.^[10]

Debido a los múltiples efectos que ocasiona CNF-1 en el huésped consideramos la importancia de identificar la toxina en aislados clínicos de *E. coli* obtenidas de pacientes con IVUs. Por lo que nuestro objetivo fue determinar la presencia de CNF-1 por medio de técnicas moleculares como la PCR, la cual es una técnica altamente sensible, precisa y eficiente, que produce resultados confiables en un corto periodo y fáciles de interpretar^[15], que junto con la técnica de Western Blot, que se basa en la detección molecular, permiten identificar de manera específica y sensible una proteína.^[16] Estas dos técnicas podrían contribuir a realizar un mejor diagnóstico al paciente brindándole al médico tratante más herramientas para poder realizar un mejor tratamiento al paciente.

Objetivo

Determinar la presencia de la toxina CNF-1 en aislados clínicos de *E. coli* obtenidos de pacientes con IVUs, mediante dos técnicas moleculares: PCR y Western Blot.

Materiales y métodos

CEPAS BACTERIANAS UTILIZADAS

Se emplearon cinco cepas de laboratorio (DH5 α , BL21, Top10, CDC-AR 0346 y CFT073), así como, cinco aislados clínicos (URO1189, URO1205, URO1210, URO1211 y URO1226) obtenidos de pacientes con IVUs.

SIEMBRA PRIMARIA EN CALDO DE SOYA TRIPTICASEÍNA Y AGAR MACCONKEY

Para el cultivo en medio sólido se seleccionó el agar MacConkey que es un medio selectivo para bacterias Gram-negativas y a su vez permite la diferenciación sobre la base de la fermentación de la lactosa, así mismo se realizó el sembrado de las bacterias en estría cruzada método que permite el crecimiento de colonias aisladas. Posteriormente las colonias aisladas se sembraron en caldo soya tripticaseína (CST) que es un medio rico en nutrientes, el cual se utiliza para pruebas de asilamiento y sensibilidad de todos los tipos de patógenos.

EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ADN

A partir de los cultivos de las 10 cepas de *E. coli* en medio CST se procedió a la extracción de ADN genómico utilizando el protocolo de Wizard® Genomic DNA Purification Kit (PROMEGA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, a partir de 1.5 mL del cultivo de bacterias se centrifugó a 12000 g para concentrar las bacterias, se eliminó el sobrenadante y se añadió la solución de lisis nuclear de 600 μ L

para romper la membrana nuclear y así liberar el material genético. Posteriormente, se agregó 3 µL ARNasas para eliminar el ARN y se agregó 200 µL de la solución de precipitación de proteínas. Después, se incubó a 4°C por 5 minutos, se centrifugó y el sobrenadante de ADN se trasvasó hacia un microtubo limpio con 600 µL de isopropanol, el cual se encarga de precipitar el ADN debido a su insolubilidad en este medio. Posteriormente, se centrifugó, se drenó el sobrenadante y se lavó con etanol al 70%, se centrifugó a 12,000 g por 2 minutos, se drenó cuidadosamente y secó el microtubo por capilaridad en papel absorbente de 10 a 15 minutos. Por último, se añadieron 60 µL de la solución de rehidratación de ADN y se incubaron a 4°C toda la noche hasta su uso.

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

El método molecular empleado para la detección del gen que codificaba para la toxina CNF-1 fue la PCR, para la cual se utilizaron oligonucleótidos específicos para el gen de interés, los cuales se hibridaron con el ADN bacteriano y acotaron la región amplificada, obteniendo un fragmento de 400 pb.

Para la reacción se utilizaron 3 µL de cada dilución del ADN genómico extraído previamente para la siguiente mezcla de reacción: 3 µL de templado, 1 µL del oligonucleótido directo, 1 µL del oligonucleótido reverso, 14.8 µL de agua, 5 µL de buffer (dNTPs y Mg²⁺) y 0.2 µL de Taq Polimerasa. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 1 ciclo a 95°C por 1 min; 40 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 s, 56.5°C por 15 s de alineamiento y 72°C durante 20 s de extensión. Las muestras fueron cargadas en un gel de agarosa al 0.8% teñido con SYBR Green I y sometidas a electroforesis. El gel de agarosa se observó en un fotodocumentador iBright CL1500 (ThermoFisher).

WESTERN BLOT

Para la identificación de CNF-1 por western blot, a partir del cultivo de bacterias (aislados clínicos) en medio CST se recolectaron 1.5 mL se concentraron por centrifugación a 12000 g por 1 minuto. Posteriormente las bacterias se lavaron en buffer de fosfatos y se concentraron nuevamente por centrifugación. Por último, las bacterias se resuspendieron en 200 µL de buffer Laemli con beta mercaptoetanol y se hirieron por 10 minutos. Las proteínas se separaron en un gel de poliacrilamida al 10% y posteriormente se transfirieron a una membrana de PVDF utilizando un equipo de transferencia semiseco Trans-Blot (Bio-Rad). La membrana de PVDF se bloqueó con un buffer PBST + 5% de leche, durante una hora. Posteriormente, la membrana se incubó 1 hora con un anticuerpo primario anti-E. coli (marca Novus) y un anticuerpo anti-CNF-1 (marca Abcam). Posteriormente se lavó con buffer PBST, 3 veces por 5 minutos. Posteriormente se incubó una hora con un anticuerpo secundario marcado con HRP (Santa Cruz Biotechnology). Al finalizar se lavó nuevamente tres veces con buffer PBST y al final las membranas se trataron con el sustrato para HRP. La detección se realizó en un fotodocumentador iBright CL1500 (ThermoFisher).

Resultados

EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ADN

Se extrajo y purificó ADN genómico de 10 cepas de *E. coli*; 5 cepas de laboratorio (DH5a, BL21, Top10, la cepa multiresistente CDC-AR-0346 y la cepa de referencia de UPEC CFT073) y 5 aislados clínicos obtenidos de pacientes con IVUs.

En la Figura 1 se observa el ADN genómico purificado de las 10 cepas en un gel de agarosa al 0.8%. Al observar el gel se puede determinar que se ha obtenido ADN puro e íntegro ya que en cada carril se observa una única banda, la cual representa el ADN genómico bacteriano.

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

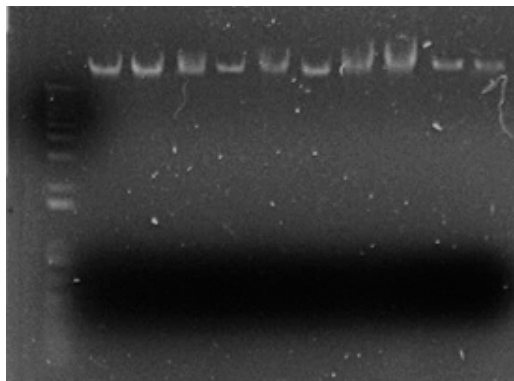


Figura 1. ADN genómico de diferentes cepas de *Escherichia coli*. El ADN genómico purificado se separó en un gel de agarosa al 0.8% teñido con SYBR Green. Carril M, marcadores de 1 kb; En los siguientes cinco carriles se encuentran cepas de laboratorio: carril 1, cepa CFT073; carril 2, cepa CDC-AR; carril 3, cepa TOP 10; carril 4, cepa BL21 y carril 5, cepa DH5a. En los últimos cinco carriles, se encuentran cepas provenientes de aislados clínicos: carril 6, cepa. URO1189; carril 7, cepa URO1205; carril 8, cepa URO1210; carril 9, cepa URO1211 y carril 10, cepa URO1226.

DETECCIÓN DE CNF-1 POR PCR Y WESTERN BLOT

A partir del ADN genómico se realizó la PCR para la detección de CNF-1. En la Figura 2 se muestra la PCR de las 5 cepas de laboratorio utilizadas en este estudio, donde se observa que solo la cepa CFT073 contiene el gen de *cnf-1*.

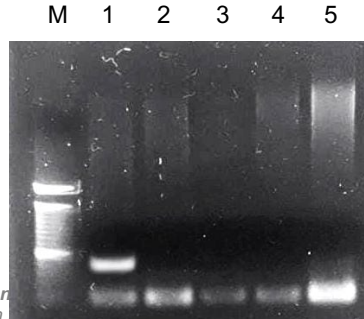


Figura 2. Sensibilidad a la PCR con los oligonucleótidos para el gen *cnf-1* de UPEC. Productos de amplificación por PCR empleando como templado el ADN de *E. coli* en un gel de agarosa al 0.8% teñido con SYBR Green I. Carril M, marcadores de 1 kb; En los siguientes cinco carriles se encuentran cepas de laboratorio: carril 1, cepa CFT073; carril 2, cepa CDC-AR; carril 3, cepa BL21; carril 4, cepa DH5a y carril 5, cepa TOP10.

En la Figura 3 se observa los productos de amplificación del gen de *cnf-1* en los 5 aislados clínicos de *E. coli*. Los resultados muestran en el segundo carril la banda del gen *cnf-1* de la cepa control CFT073, mientras que en los demás carriles se cargaron las muestras de URO 1189, URO 1205, URO1210, URO1211 y URO 1226, solo se logró la identificación del gen en uno de los aislados clínicos, el cual fue URO1205. Un total de 1 de 5 (20%) aislados clínicos fueron positivo.

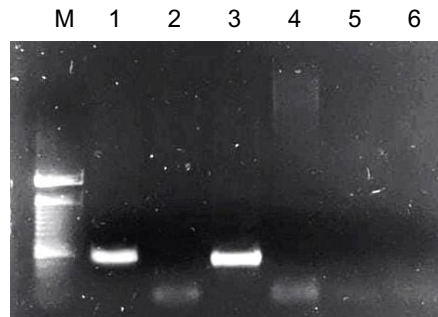


Figura 3. Sensibilidad a la PCR con los oligonucleótidos para el gen *cnf-1* de UPEC. Productos de amplificación por PCR empleando como templado el ADN de *E. coli* en un gel de agarosa al 0.8% teñido con SYBR Green I. Carril M, marcador de pesos moleculares. En el primer carril se encuentra la cepa de laboratorio carril 1, CFT073; en los siguientes cinco carriles se encuentran los aislados clínicos: carril 2, URO1189; carril 3, URO1205; carril 4, URO1210; carril 5, URO1211 y carril 6, URO1226.

En los experimentos de Western Blot, se emplearon extractos totales de las 10 cepas. Para la detección se utilizó un anticuerpo policlonal contra *E. coli* y un anticuerpo monoclonal contra CNF-1. En la Figura 4 se muestra el resultado de Western Blot contra *E. coli* donde se observaron diversas bandas debido a que este anticuerpo es recomendado para inmunohistoquímica o ELISA y detecta diferentes epitopes de *E. coli*.

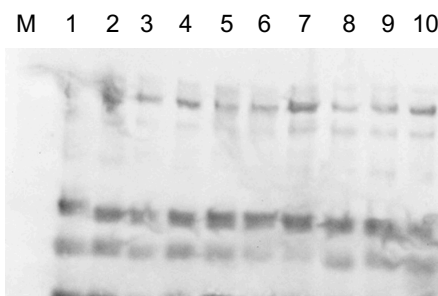


Figura 4. Proteínas específicas de la enterobacteria *Escherichia coli*. Productos obtenidos por Western blot empleando como templado el extracto de *E. coli* en una membrana de PVDF con anticuerpo anti-*E. coli*. Carril M, marcadores de tamaños. Carril 1, CFT073; carril 2, CDC-AR; carril 3, TOP10; carril 4, BL21; carril 5, DH5 α ; carril 6, URO1189; carril 7, URO1205; carril 8, URO1210; carril 9, URO1211 y carril 10, URO1226.

En el caso CNF-1 no se logró la detección por Western Blot (Figura 5) debido que la expresión de CNF-1 por parte de *E. coli* depende del contacto entre la bacteria y la célula huésped, como se discute más adelante, y en esta ocasión se utilizaron extractos de bacterias crecidas en suspensión.



Figura 5. Ausencia de la toxina CNF-1. No se observa ningún producto obtenido por Western Blot empleando como extracto de *E. coli* en una membrana de PVDF con un anticuerpo anti-CNF-1.

Discusión y Conclusiones

CNF-1 es una toxina producida por algunas cepas patogénicas de *E. coli* incluyendo UPEC, que afecta a las células mediante el bloqueo de la citocinesis por la reorganización del citoesqueleto de actina.^{[17], [18]} Además, induce la fagocitosis y promueve la maduración de células dendríticas.^{[19], [20]}

En este trabajo se identificó el gen *cnf-1* por PCR en aislados clínicos de *E. coli* obtenidos de pacientes con IVUs, en donde solo una cepa proveniente de los cinco aislados clínicos que se utilizaron tuvo la presencia del gen que codifica para la toxina.

Mediante el uso de la técnica Western Blot se obtuvo un resultado negativo a la búsqueda intencionada de la proteína CNF-1. Este resultado era esperado debido a que la producción de CNF-1 por parte de *E. coli* depende de la interacción huésped-patógeno porque el gen de *cnf-1* comparte la isla patogénica (elementos móviles integrados que codifican un factor de virulencia) con la α -hemolisina y la fimbriae P. Así mismo, se ha reportado que la expresión de CNF-1 es regulada por la Norepinefrina, en donde bajas concentraciones de

esta hormona aumentan la expresión de CNF-1.^[21] No obstante en este estudio, solo se emplearon los cultivos bacterianos en un medio rico en nutrientes y no hay presencia de algún factor del huésped que pueda inducir la expresión de la toxina.

En conclusión, en el presente estudio, se encontró que de todos los aislados clínicos de *E. coli*, obtenidos de pacientes con IVUs, solo uno fue tiene el gen que codifica para la toxina CNF- 1. Lo anterior se demostró mediante el uso de técnicas moleculares tales como la PCR en la que se amplificó una región específica del gen de la toxina de interés mediante el uso de oligonucleótidos dirigidos contra esa región génica. La cepa URO1205 fue la única muestra, de los aislados clínicos, en denotar la presencia del gen de la toxina CNF-1.

Por último, consideramos la importancia de analizar la presencia de CNF-1 en una mayor cantidad de aislados clínicos de *E. coli* obtenida de pacientes con IVUs y poder determinar el grado de incidencia de la toxina en este tipo de pacientes y hacer una correlación clínica con la evolución de la infección.

Referencias

1. Medic, C. V. (2010). *Prevalencia de infecciones de vías urinarias en embarazadas atendidas en el Hospital Universitario de Puebla*. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=27338>
2. Foxman B. (2010). The epidemiology of urinary tract infection. *Nature reviews. Urology*, 7(12), 653–660. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2010.190>
3. Tandogdu, Z., & Wagenlehner, F. M. (2016). Global epidemiology of urinary tract infections. *Current opinion in infectious diseases*, 29(1), 73–79. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000228>
4. Chavolla-Canal, A.J., Gonzalez-Mercado, M.G. & Ruiz-Larios, Ó.A. (2016). Prevalencia de bacterias aisladas con resistencia antibiótica extendida en los cultivos de orina durante 8 años en un hospital de segundo nivel en México. *Revista Mexicana de Urología*, 76(4), 213-217. <http://dx.doi.org/10.1016/j.uromx.2016.04.003>
5. Lagunas-Rangel, F.A. (2018). Susceptibility profiles of bacteria causing urinary tract infection in Mexico — Single center experience with 10 years results. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 14, 90-94. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2018.03.004>
6. Garza-Montúfar, M.E., Treviño-Valdez, P.D. & De la Garza-Salinas, L.H. (2017). Resistencia bacteriana y comorbilidades presentes en pacientes urológicos ambulatorios con urocultivos positivos. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 56(4), 347-353. http://revistamedica.imss.gob.mx/editorial/index.php/revista_medica/rt/printerFriendly/1149/3042
7. Murray, P., Rosenthal, K. S., & Pfaller, M. A. (2017). *Microbiología Médica*. Elsevier Health Sciences. Capítulo 25 (Sección 4). Pp. 644-680.
8. Tamadonfar, K. O., Omattage, N. S., Spaulding, C. N., & Hultgren, S. J. (2019). Reaching the end of the line: urinary tract infections. *Microbiology spectrum*, 7(3). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.bai-0014-2019>
9. Justyna Bien, Olga Sokolova, Przemyslaw Bozko, "Role of Uropathogenic Escherichia coli Virulence Factors in Development of Urinary Tract Infection and Kidney Damage", *International Journal of Nephrology*, vol. 2012, Article ID 681473, 15 pages, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/681473>
10. Carlini, F., Maroccia, Z., Fiorentini, C., Travaglione, S., & Fabbri, A. (2021). Effects of the Escherichia coli Bacterial Toxin Cytotoxic Necrotizing Factor 1 on Different Human and Animal Cells: A Systematic Review. *International journal of molecular sciences*, 22(22), 12610. <https://doi.org/10.3390/ijms222212610>
11. Chaoprasid, P., & Dersch, P. (2021). The Cytotoxic Necrotizing Factors (CNFs)-A Family of Rho GTPase-Activating Bacterial Exotoxins. *Toxins*, 13(12), 901. <https://doi.org/10.3390/toxins13120901>
12. Caprioli, A., Falbo, V., Roda, L. G., Ruggeri, F. M., & Zona, C. (1983). Partial purification and characterization of an escherichia coli toxic factor that induces morphological cell alterations. *Infection and immunity*, 39(3), 1300–1306. <https://doi.org/10.1128/iai.39.3.1300-1306.1983>
13. Pavone, F., Luvisetto, S., Marinelli, S., Straface, E., Fabbri, A., Falzano, L., Fiorentini, C., & Malorni, W. (2009). The Rac GTPase-activating bacterial protein toxin CNF1 induces analgesia up-regulating mu-opioid receptors. *Pain*, 145(1-2), 219–229. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2009.06.026>

14. Fiorentini, C., Arancia, G., Caprioli, A., Falbo, V., Ruggeri, F. M., & Donelli, G. (1988). Cytoskeletal changes induced in HEP-2 cells by the cytotoxic necrotizing factor of Escherichia coli. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 26(11), 1047–1056. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(88\)90203-6](https://doi.org/10.1016/0041-0101(88)90203-6)
15. Tamay de Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad*, 2(2), 70-78. <https://www.medigraphic.com/pdfs/invidis/ir-2013/ir132d.pdf>
16. Hernández D, Cabiedes J. Técnicas inmunológicas que apoyan el diagnóstico de las enfermedades autoinmunes. *Reumatol clin*. 2016(3):173-7. doi: 10.1016/j.reuma.2016.10.003.
17. Diabate, M., Munro, P., Garcia, E., Jacquel, A., Michel, G., Obba, S., Goncalves, D., Luci, C., Marchetti, S., Demon, D., Degos, C., Bechah, Y., Mege, J. L., Lamkanfi, M., Auburger, P., Gorvel, J. P., Stuart, L. M., Landraud, L., Lemichez, E., & Boyer, L. (2015). Escherichia coli α -hemolysin counteracts the anti-virulence innate immune response triggered by the Rho GTPase activating toxin CNF1 during bacteremia. *PLoS pathogens*, 11(3), e1004732. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004732>
18. Lemichez, E., Flatau, G., Bruzzone, M., Boquet, P., & Gauthier, M. (1997). Molecular localization of the Escherichia coli cytotoxic necrotizing factor CNF1 cell-binding and catalytic domains. *Molecular microbiology*, 24(5), 1061–1070. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.4151781.x>
19. Engelsöy, U., Rangel, I., & Demirel, I. (2019). Impact of Proinflammatory Cytokines on the Virulence of Uropathogenic Escherichia coli. *Frontiers in microbiology*, 10, 1051. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01051>
20. Gall-Mas, L., Fabri, A., Namini, M. R. J., Givskov, M., Fiorentini, C., & Krejsgaard, T. (2018). The Bacterial Toxin CNF1 Induces Activation and Maturation of Human Monocyte-Derived Dendritic Cells. *International journal of molecular sciences*, 19(5), 1408. <https://doi.org/10.3390/ijms19051408>
21. Gümüş, D., Kalaycı Yüksek, F., Sefer, Ö., Yörük, E., Uz, G., & Anç Küçüker, M. (2019). The roles of hormones in the modulation of growth and virulence genes' expressions in UPEC strains. *Microbial Pathogenesis*, 132, 319–324. doi:10.1016/j.micpath.2019.05.019