





ORIGINAL BREVE

RESPUESTA INMUNOLÓGICA Y BIOQUÍMICA DE ANCIANOS CON INFECCIÓN URINARIA FRENTE FACTORES DE VIRULENCIA EN *Escherichia coli* UROPATÓGENAS

Arturo Octavio Gonzales-Rodriguez ^{1,a}, Stefany Fiorella Infante Varillas ^{1,b}, Heli Jaime Barrón Pastor ^{2,c}, Yesica Llimpe Mitma ^{2,d}, Doris Huerta Canales ^{2,d}, Paolo Alberto Wong Chero ^{1,e}, César Gutierrez ^{1,f}, Silvia Suarez Cunza ^{2,g}

¹ Universidad de Piura, Lima, Perú.

² Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

^a Tecnólogo médico en Laboratorio Clínico, bachiller en Tecnología Médica en Laboratorio clínico y Anatomía Patológica;

^b bióloga-microbióloga, magister en Investigación Biomédica; ^c tecnólogo médico en Laboratorio Clínico, doctor en Ecología Evolutiva y Genética; ^d biólogo, doctora en Ciencias Biológicas; ^e médico cirujano; ^f médico cirujano, magister en Epidemiología; ^g químico farmacéutico, doctor en Farmacia y Bioquímica.

RESUMEN

Con el objetivo de evidenciar diferencias en la respuesta inmunológica y bioquímica de ancianos con infección del tracto urinario (ITU) por *Escherichia coli* (*E. coli*) frente a factores de virulencia de importancia en la patogenia de la ITU, se realizó un estudio descriptivo en el cual se evaluaron 24 muestras de orina de adultos mayores con ITU provenientes de centros de reposo gerontológicos. Se determinó la concentración de hierro, TNF- α , IL-1 β y la capacidad antioxidante en la orina, encontrándose una relación entre una mayor concentración de hierro y de hematíes en la orina con la presencia del gen *pap GII* en la *E. coli*. Se concluye que los adultos mayores con ITU por *E. coli* portadoras del gen *pap GII*, presentan mayor daño tisular.

Palabras clave: Asilos de Ancianos; Ancianos; *Escherichia coli* Uropatogénica; Biomarcadores; Factores de Virulencia; Infecciones Urinarias; Inmunología; Orina; Antioxidantes; Citoquinas (Fuente: DeCs BIREME).

IMMUNOLOGICAL AND BIOCHEMICAL RESPONSE FROM OLDER ADULTS WITH URINARY TRACT INFECTION TO UROPATHOGENIC *Escherichia coli* VIRULENCE FACTORS

ABSTRACT

Descriptive study in which 24 urine samples from older adults with urinary tract infection (UTI), from nursing homes, were evaluated; in order to identify differences in the immune and biochemical response from older adults with UTI by *Escherichia coli* (*E. coli*) to major virulence factors in the pathogenesis of UTI. Iron concentration, TNF- α , IL-1 β and antioxidant capacity in urine were determined. A relation was found between, an increase in iron and red blood cell concentration in urine, and the presence of the *pap GII* gene found in *E. coli*. It is concluded that older adults, with UTIs by *E. coli* with the gene *pap GII*, have increased tissue damage.

Keywords: Nursing Homes; Elderly; Uropathogenic *Escherichia coli*; Biomarkers; Virulence Factors, Urinary Tract Infections, Immunology, Urine, Antioxidants, Cytokines (Source: MeSH NLM).

INTRODUCCIÓN

La *Escherichia coli* (*E. coli*) es el agente causal más frecuente de bacteriemias en el hombre ⁽¹⁾, siendo el tracto urinario la principal forma de ingreso en pacientes geriátricos ⁽²⁾. En forma parcial esto se debe a que la población adulta mayor (PAM) presenta características inmunológicas particulares, con un estado subclínico de inflamación crónica, conocida como inmunosenescencia, donde el linaje polimorfonuclear (principal línea de defensa en las infecciones del tracto urinario [ITU]) ⁽³⁾ se encuentra limitado en su función ⁽⁴⁾. Por otro lado, se han descrito diversos factores de virulencia en *E. coli*, asociados con bacteriemias y sepsis, en los que se incluyen moléculas de adhesión celular, sistemas de captación del hierro y exotoxinas

Citar como: Gonzales-Rodriguez AO, Infantes Varillas SF, Barrón Pastor HJ, Llimpe Mitma Y, Huerta Canales D, Wong Chero PA, et al. Respuesta inmunológica y bioquímica de ancianos con infección urinaria frente factores de virulencia en *Escherichia coli* uropatogénica. Rev Peru Med Exp Salud Publica. 2020;37(3):527-31. doi: <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2020.373.4918>.

Correspondencia: Arturo Gonzales Rodriguez; calle Mártir José Olaya 162, Miraflores, Lima, Perú; arturo.gonzales@udep.edu.pe

Recibido: 24/10/2019
Aprobado: 06/05/2020
En línea: 14/07/2020

que configuran un sistema proteico que le permite eludir o injuriar al sistema inmune del paciente en detrimento de su salud ^(5,6).

La interacción entre el sistema inmunológico de los pacientes con ITU y la capacidad genética que tiene la bacteria de formar factores de virulencia determina el aclaramiento bacteriano en el tracto urinario ⁽⁶⁾, por lo que es necesario explorar la diferencia en la respuesta inmunológica y bioquímica que tiene el adulto mayor con ITU ante los diversos factores de virulencia asociados a sepsis en *E. coli* uropatógenas (UPEC, por sus siglas en inglés).

EL ESTUDIO

Entre abril y julio del 2018, se evaluó la orina de 24 adultos mayores con ITU, de ambos sexos, residentes en centros de reposo gerontológicos privados de Lima. El criterio diagnóstico de ITU se definió a partir de un recuento microscópico mayor a cinco leucocitos por campo de 400 aumentos, la conversión de nitritos por el método de Griess y un recuento mayor a 100 000 unidades formadoras de colonias en el medio de cultivo agar sangre. Se estandarizó el análisis de sedimento urinario conforme a las recomendaciones del Instituto de Salud de Chile ⁽⁷⁾.

Se identificó el agente etiológico con métodos bioquímicos tradicionales y se preservaron las bacterias identificadas como *E. coli* en caldo tripticasa de soya y glicerol al 20%. Los cultivos polimicrobianos fueron excluidos del estudio. Posteriormente, se extrajo el ADN bacteriano utilizando el kit GeneJet Genomic (Thermo Scientific®, Massachusetts, EE. UU.) y se evaluó la presencia de 11 genes de virulencia: *aer*, *α-hly*, *cnf-1*, *sfa*, *chuA*, *TcpC*, *nanA*, *pap GI*, *GII*, *GIII* y *iucC* mediante reacción en cadena de polimerasa de punto final.

Las muestras de orina fueron centrifugadas a 3000 g (Sigma, 3-30KS) por 10 minutos, preservando el sobrenadante. Se determinó la concentración del TNF-α, IL-1β y hierro; además, se evaluó la capacidad antioxidante total en la orina por los métodos de ABTS⁺ y FRAP como marcador de la respuesta inmunológica a través del aumento de sustancias reactivas al oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés). Todos los analitos fueron medidos empleando el espectrofotómetro Multiskan Go (Thermo Scientific®, Massachusetts, EE. UU.).

El análisis estadístico se realizó con el programa Epidat versión 4.1. La descripción de las variables cualitativas se realizó a través de tablas de frecuencia. Se aplicó la prueba de normalidad de Shapiro Wilk para determinar la distribución de las variables cuantitativas y la prueba de homogeneidad de varianza de Levene. Las variables cuantitativas con distribución normal fueron analizadas mediante la prueba de T de Student. Los valores p < 0,05 se consideraron significativos.

El presente estudio obtuvo la aprobación del Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, acta 1812 con código de proyecto 0013.

MENSAJES CLAVE

Motivación para realizar el estudio: Los adultos mayores presentan un sistema inmunológico inmunosenescente por lo que es conveniente identificar los factores de virulencia en la bacteria que alteran su respuesta inmunológica.

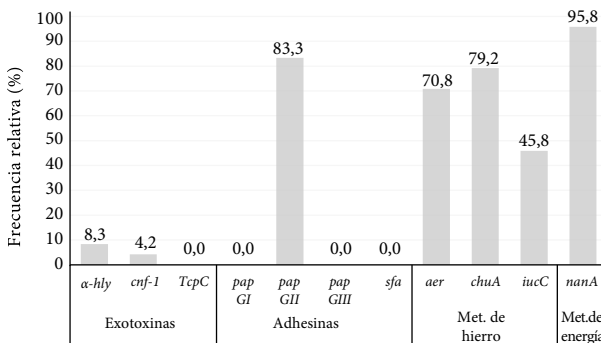
Principales hallazgos: Las *Escherichia coli* portadoras del gen *pap GII* inducen un mayor daño tisular, lo que incrementa la concentración de hierro y hematies. Además, existe la presencia generalizada del gen *nanA*, de importancia en estadios de sepsis.

Implicancias: Los hallazgos contribuyen al estudio de la respuesta inmunológica en adultos mayores con ITU; además, es el primer reporte en el Perú de la frecuencia de factores de virulencia en *Escherichia coli* uropatógenas en centros de reposo gerontológicos.

HALLAZGOS

Se analizaron 24 muestras de orina de adultos mayores, provenientes de centros de reposo gerontológicos, con ITU por *E. coli*. Los genes de virulencia más frecuentes fueron el gen *nanA*, *pap GII*, *aer*, *chuA* e *iucC*. También se encontraron, en una baja proporción, genes *α-hly* y *cnf-1*, pero no se hallaron genes *TcpC*, *pap GI*, *pap GIII* y *sfa* (Figura 1).

En relación con la respuesta inmunológica y bioquímica de los adultos mayores ante los diversos genes de virulencia evaluados, se observó una concentración de 37,6 hematies/uL y de 193,4 ug/L de hierro en los pacientes portadores del gen *pap GII*, significativamente mayor en los pacientes infectados con *E. coli*, pero sin este gen. Además, en los pacientes con cepas portadoras del gen *pap GII* se evidenció una tendencia positiva de tener una mayor capacidad antioxidante en la orina con respecto a la prueba ABTS⁺ (1348,7 vs. 634,8 Eq-Vit C real ug/mL) (Tabla 1). Por otro lado, se observó una tendencia a presentar mayor concentración de



Met: Metabolismo

Figura 1. Frecuencia relativa de genes de virulencia en *Escherichia coli* uropatógenas en adultos mayores de centros de reposo

Tabla 1. Marcadores inmunológicos y bioquímicos en comparación con la presencia del gen *pap GII*

Marcadores inmunológicos y bioquímicos	Presencia de <i>pap GII</i> ^a	Ausencia de <i>pap GII</i> ^a	Valor de p ^b
Leucocitos/uL	270,1 ± 240,7	225,8 ± 126,0	0,729
Hematies/uL	37,6 ± 37,4	12 ± 8,2	0,010
Hierro (ug/L)	193,4 ± 139,6	85,3 ± 26,2	0,004
IL-1β (pg/mL)	375 ± 293,2	147 ± 98,8	0,144
TNF- α (pg/mL)	65,2 ± 35,0	94,5 ± 61,5	0,195
ABTS Eq-Vit C real (ug/mL)	1348,7 ± 1455,7	634,8 ± 299,0	0,059
FRAP (mM)	1,006 ± 0,416	0,801 ± 0,332	0,366

^a media ± desviación estándar; ^b prueba T de Student

FRAP: Recuperación de fluorescencia después de photobleaching, ABTS: Ácido 2,2'-azino-di-(3-etilbenzotiazolona)-6-sulfónico

leucocitos ($p = 0,070$) en los pacientes infectados con *E. coli*, portadores de los tres genes relacionados al metabolismo del hierro evaluados (*iucC*, *aer* y *chuA*) (Tabla 2).

DISCUSIÓN

El presente estudio evaluó la respuesta inmunológica y bioquímica en la orina de pacientes adultos mayores institucionalizados, infectados por UPEC (el principal agente etiológico de las ITU). Entre los principales hallazgos se encontró que la presencia del gen *pap GII* indujo hematuria y una mayor concentración de hierro en la orina. También se evaluó la frecuencia de los genes de virulencia importantes en el proceso de patogenicidad en las ITU y entre los principales hallazgos se tiene que el 95,8% de las UPEC albergaron al gen *nanA*.

El ácido N-acetilneuramínico, sustrato importante en la producción energética de la *E. coli*, es escindido a través de la enzima N-acetilneuramínico liasa (*nanA*) en piruvato y N-acetil-D-manosamina⁽⁸⁾. La presencia de la enzima *nanA* genera una alta competitividad en las UPEC productoras de bacteriemias; y aunque su función en la patogénesis de la ITU en modelos murinos es menos relevante⁽⁸⁾, los resultados indican la existencia de un alto riesgo de desarrollar sepsis en los adultos mayores con bacteriemias.

Por otro lado, las exotoxinas tienen una función en la patogenicidad de la ITU. Los neutrófilos, principal línea de defensa en las ITU, son lisados por la α -hemolisina (*HlyA*) en dosis elevadas y, además, las células de la vejiga en bajas dosis son exfoliadas⁽⁹⁾, lo cual deteriora las dos principales líneas de defensa del cuerpo⁽³⁾. No obstante, en las UPEC estudiadas obtuvimos una frecuencia de 8,3%, resultado menor al encontrado en otros estudios realizados en población geriátrica^(10,11). Asimismo, las exotoxinas, como el factor citotóxico necrotizante tipo 1 (*CNF1*) relacionado genéticamente a la *HlyA*, inducen un rearrreglo del citoesqueleto de los neutrófilos mediante la activación de las enzimas de tipo Rho GTPasa⁽⁹⁾. En concordancia con lo reportado por la α -*hly* se encontró una UPEC portadora del gen *cnf-1*.

En relación con la proteína *TcpC* recientemente descrita como interferente en la producción de citoquinas proinflamatorias en la ITU⁽¹²⁾, no fue encontrada en ninguna de las UPEC evaluadas, lo cual puede reflejar la ausencia de la isla de patogenicidad tipo IV, dependiente de su transferencia horizontal, o la reciente adquisición evolutiva del gen en las *E. coli* extraintestinales⁽¹²⁾.

En relación con la respuesta inmunológica y bioquímica observada en los adultos mayores, el hierro, escaso en el fluido urinario, es indispensable en el metabolismo bacteriano^(13,14), los microorganismos que infectan el tracto urinario deben tener la capacidad de captar y competir por su asimilación⁽¹⁴⁾. Las UPEC tienen tres sistemas de captación

Tabla 2. Marcadores inmunológicos y bioquímicos en comparación con la presencia de los genes *iucC+aer+chuA*

Marcadores inmunológicos y bioquímicos	Presencia de <i>iucC+aer+chuA</i> ^a	Ausencia de <i>iucC+aer+chuA</i> ^a	Valor de p ^b
Leucocitos/uL	391,7 ± 226,6	209,6 ± 206,5	0,070
Hematies/uL	35,3 ± 36	32,6 ± 36,4	0,903
Hierro (ug/L)	210,6 ± 140,2	160,9 ± 132,6	0,418
IL-1β (pg/mL)	421,1 ± 280,5	302,4 ± 284,4	0,359
TNF- α (pg/mL)	82,8 ± 24,2	64,9 ± 45	0,332
ABTS Eq-Vit C real (ug/mL)	1763,7 ± 2349,6	1009,9 ± 626,8	0,435
FRAP (mM)	0,957 ± 0,307	0,978 ± 0,447	0,911

^a media ± desviación estándar; ^b prueba T de Student

FRAP: Recuperación de fluorescencia después de photobleaching, ABTS: Ácido 2,2'-azino-di-(3-etilbenzotiazolona)-6-sulfónico

de hierro (sideróforos, hemóforos y captación directa de hierro en su estado ferroso) y se ha informado el aumento de su expresión *in vivo* (15). Por otro lado, la restricción del hierro es un mecanismo de defensa inmunitario utilizado por el hospedero para limitar la proliferación bacteriana (16). Aunque no pudimos encontrar diferencias significativas entre los marcadores inmunológicos y bioquímicos y los genes asociados al metabolismo del hierro, se puede observar que los pacientes con UPEC, portadores de los genes *iucC*, *aer* y *chuA*, tienden a presentar una mayor concentración de leucocitos, lo cual puede indicar un mayor estrés inmunológico. Además, la presencia del gen *chuA* y de otros sistemas sideróforos están altamente concentrados en cepas causantes de ITU recurrente (17), situación común en centros de reposo gerontológicos.

Finalmente, el gen *pap GII* es un factor de virulencia cuya función es procurar la adhesión de las UPEC al tejido renal. Se ha documentado la asociación del gen *pap GII* con estadios de pielonefritis (6), además, se ha postulado su ventaja competitiva durante estadios de bacteriemia por ITU (8). Cierta evidencia señala que su presencia no es determinante en estadios de pielonefritis, por lo tanto, su función aún no es concluyente en el proceso de infección en el tracto urinario (18).

En los resultados obtenidos se observa que los pacientes con UPEC positivas para el gen *pap GII* presentaron mayor concentración de hierro en comparación con los pacientes con UPEC negativas para el gen *pap GII*. Se ha encontrado que la interacción del *pap GII* con su receptor induce la transcripción rápida del gen *airS* en las UPEC en orina, el cual tiene un papel fundamental en la activación de los sistemas sideróforos (aerobactina/enterobactina) (19) al disminuir la concentración de hierro en la orina. En los resultados obtenidos no encontramos esta relación. Sin embargo, esto podría ser explicado por la mayor concentración de hematíes y hemólisis en este grupo de pacientes. La adhesión de la proteína *pap GII* activa la síntesis de citoquinas (20), ocasionando la ruptura de vasos sanguíneos ubicados en la lámina propia. Por otro lado, mediante la prueba ABTS⁺ se describe que en los pacientes con

UPEC *pap GII* positivos existe la tendencia de tener mayor capacidad antioxidante, lo cual podría deberse a la mayor concentración de hierro, lo que interfiere con el ensayo, aunque también podría ser explicado por la deficiencia de los neutrófilos para producir sustancias reactivas al oxígeno. Recientes estudios han descrito que en la PAM existe un aumento de la subpoblación de neutrófilos CD16/CD62L, la cual presenta un menor nivel de respuesta ante el estímulo de citoquinas (4).

El presente estudio tiene una serie de limitaciones. En primer lugar, no se pudo registrar información de los pacientes referente a su condición clínica, estadio en la infección, uso de antibióticos, recurrencia de la infección. La segunda limitación fue el bajo número de muestras de orina analizadas, lo cual aumenta la probabilidad de obtener un error de tipo II. La tercera limitación es que no complementamos nuestros estudios con análisis de expresión genética, por lo que no sabemos si los genes evaluados son ciertamente expresados por las bacterias.

En conclusión, las *E. coli* portadoras del gen *pap GII* pueden inducir un mayor daño tisular que, posiblemente, favorece una mayor concentración de hierro en la orina, lo cual estimula su incremento. Además, la tendencia positiva en los pacientes infectados con *E. coli pap GII* de tener una mayor capacidad antioxidante puede deberse a la deficiencia de neutrófilos reclutados en la PAM en la producción de ROS. Finalmente, la presencia generalizada del gen *nanA* es importante debido a su alta relevancia en estadios de sepsis.

Contribuciones de los autores: AGR, HJBP, YLLM y DVRC concibieron del artículo. AGR, CG, SFIV, PW, HJBP y YLLM recolectaron los datos e hicieron el análisis estadístico. AGR, PW, HJBP y SSC redactaron y aprobaron la versión final.

Fuentes de financiamiento: Financiamiento para grupos de investigación de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (código de proyecto A17011681) y financiamiento interno de la Universidad de Piura.

Conflictos de interés: Los autores declaran no tener conflictos de interés con la publicación de este artículo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Nicolle LE. Urinary Tract Infections in the Older Adult. *Clin Geriatr Med*. 2016;32(3):523-38. doi: 10.1016/j.cger.2016.03.002.
- Mylotte JM, Tayara A, Goodnough S. Epidemiology of Bloodstream Infection in Nursing Home Residents: Evaluation in a Large Cohort from Multiple Homes. *Clin Infect Dis*. 2002;35(12):1484-90. doi: 10.1086/344649.
- Luna-Pineda VM, Ochoa S, Cruz-Córdova A, Cázares-Domínguez V, Vélez-González F, Hernández-Castro, R, et al. Infecciones del tracto urinario, inmunidad y vacunación. *Bol Med Hosp Infant Mex*. 2018; 75(2): 67-78. doi: 10.24875/BMHIM.M18000011.
- Sauce D, Dong Y, Campillo-Gimenez L, Casulli S, Bayard C, Autran B, et al. Reduced oxidative burst by primed neutrophils in the elderly individuals is associated with increased levels of the CD16bright/CD62Ldim immunosuppressive subset. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2017;72(2):163-72. doi: 10.1093/gerona/glw062.
- Daga AP, Koga VL, Gabriel J, Soncini M, Matos CM De, Regina M, et al. Escherichia coli Bloodstream Infections in Patients at a University Hospital: Virulence Factors and Clinical Characteristics. *Front Cell Infect Microbiol*. 2019;9:191. doi: 10.3389/fcimb.2019.00191.
- Johnson JR. Virulence factors in Escherichia coli urinary tract infection. *Clin Microbiol Rev*. 1991; 4(1):80-128. doi: 10.1128/cmr.4.1.80.
- Gómez R, Pellegrini P. Recomendaciones para el Análisis del Sedimento urinario. Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia. Instituto Nacional de Salud Pública de Chile. 2013 [citado el 03 de mayo de 2020]. Disponible en: https://www.araucanasur.cl/wp-content/uploads/2019/11/sedimento-urinario_10052013A.pdf.
- Smith SN, Hagan EC, Lane MC, Mobley HLT. Dissemination and Systemic Colonization of Uropathogenic *Escherichia coli* in a Murine Model of Bacteremia. *MBio*. 2010;1(5):1-9. doi: 10.1128/mBio.00262-10.

9. Lüthje P, Brauner A. Virulence Factors of Uropathogenic *E. coli* and Their Interaction with the Host. *Adv Microb Physiol.* 2014;65:337-72. doi: 10.1016/bs.ampbs.2014.08.006.
10. Santo E, Macedo C, Marin JM. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* from a University Hospital in Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2006;48(4):185-88. doi: 10.1590/s0036-46652006000400002.
11. Croxall G, Hale J, Weston V, Manning G, Cheetham P, Achtman M, *et al.* Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolates from a regional cohort of elderly patients highlights the prevalence of ST131 strains with increased antimicrobial resistance in both community and hospital care settings. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66(11):2501-8. doi: 10.1093/jac/dkr349.
12. Xiao T, Waldhuber A, Svanborg C, Snyder G, Römmeler F, Miethke T, *et al.* A Comparative Analysis of the Mechanism of Toll-Like Receptor-Disruption by TIR-Containing Protein C from Uropathogenic *Escherichia coli*. *Pathogens.* 2016;5(1):25. doi: 10.3390/pathogens5010025.
13. Pfrimer K, Micheletto RF, Marchini JS, Padovan GJ, Moriguti J, Ferriolli E. Impact of Aging on Urinary Excretion of Iron and Zinc. *Nutr Metab Insights.* 2014;7:47-50 doi:10.4137/NMIS12977.
14. Alteri CJ, Smith SN, Mobley HLT. Fitness of *Escherichia coli* during urinary tract infection requires gluconeogenesis and the TCA cycle. *PLoS Pathog.* 2009;5(5):e1000448. doi:10.1371/journal.ppat.1000448.
15. Hagan EC, Lloyd AL, Rasko DA, Faerber GJ, Mobley HLT. *Escherichia coli* global gene expression in urine from women with urinary tract infection. *PLoS Pathog.* 2010; 11;6(11): e1001187. doi: 10.1371/journal.ppat.1001187.
16. Bullen JJ. The Significance of Iron in Infection. *Clin Infect Dis.* 1981;3(6):1127-38. doi:10.1093/clinids/3.6.1127.
17. Ejrnæs K, Stegger M, Reisner A, Ferry S, Monsen T, Holm SE, *et al.* Characteristics of *Escherichia coli* causing persistence or relapse of urinary tract infections: Phylogenetic groups, virulence factors and biofilm formation. *Virulence.* 2011;2(6):528-37. doi: 10.4161/viru.2.6.18189.
18. Mobley HLT, Jarvis KG, Elwood JP, Whittle DI, Lockett CV, Russell RG, *et al.* Isogenic P-fimbrial deletion mutants of pyelonephritogenic *Escherichia coli*: the role of alpha Gal(1-4) beta Gal binding in virulence of a wild-type strain. *Mol Microbiol.* 1993;10(1):143-55. doi: 10.1111/j.1365-2958.1993.tb00911.x.
19. Zhao R, Shi J, Shen Y, Li Y, Han Q, Zhang X, *et al.* Phylogenetic distribution of virulence genes among ESBL-producing uropathogenic *Escherichia coli* isolated from long-term hospitalized patients. *J Clin Diagnostic Res.* 2015;9(7):1-4. doi: 10.7860/JCDR/2015/13234.6157.
20. Svensson M, Duan R, Svanborg C. Role of the Ceramide-signaling Pathway in Cytokine Responses to P-fimbriated. *J Exp Med.* 1996;183(3):1037-44. doi: 10.1084/jem.183.3.1037.