T
723

103914

Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:
DISEÑO Y PRODUCCIÓN DE BIOLÓGICOS

"CARACTERIZACIÓN DE UNA TOXINA VARIANTE DE Pet (Plasmid encoded toxin) DE LA CEPA *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) 049766, AISLADA DE UN CASO CLÍNICO EN MÉXICO."

COMUNICACIÓN IDÓNEA DE RESULTADOS DE INVESTIGACIÓN QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS
PRESENTA

QFB. LUIS RAÚL GUTIÉRREZ LUCAS
MATRÌCULA 205280356

COMITÉ TUTORIAL
Tutor: DRA. TERESITA DEL ROSARIO SAINZ ESPUÑES
Asesor: DRA. BERTHA GONZÁLEZ PEDRAJO
Asesor: DR. CARLOS ESLAVA CAMPOS

ABRIL, 2008

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:
DISEÑO Y PRODUCCIÓN DE BIOLÓGICOS

"CARACTERIZACIÓN DE UNA TOXINA VARIANTE DE Pet (Plasmid encoded toxin) DE LA CEPA *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) 049766, AISLADA DE UN CASO CLÍNICO EN MÉXICO."

COMUNICACIÓN IDÓNEA DE RESULTADOS DE INVESTIGACIÓN QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS
PRESENTA

QFB. LUIS RAÚL GUTIÉRREZ LUCAS
MATRÌCULA 205280356

COMITÉ TUTORIAL
Tutor: DRA. TERESITA DEL ROSARIO SAINZ ESPUÑES
Asesor: DRA. BERTHA GONZÁLEZ PEDRAJO
Asesor: DR. CARLOS ESLAVA CAMPOS

ABRIL, 2008

Comunicación Idónea de Resultados de Investigación del Proyecto:

"Caracterización de una toxina variante de Pet (Plasmid encoded toxin) de la cepa *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) 049766, aislada de un caso clínico en México."

Vo.Bo. de los contenidos académicos.

Dra. Teresita del Rosario Sainz Espuñes.
Tutor

Dra. Bertha González Pedrajo
Asesor

Dr. Carlos Eslava Campos
Asesor

"CARACTERIZACIÓN DE UNA TOXINA VARIANTE DE Pet (Plasmid encoded toxin) DE LA CEPA *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) 049766, AISLADA DE UN CASO CLÍNICO EN MÉXICO."

Integración del Jurado del Examen de grado:

Presidente: Ma. del Carmen Wacher

Dra. María del Carmen Wacher Rodarte. UNAM

Vocal:

Dr. Guillermo Mendoza Hernández. UNAM

Secretaria: Teresita Sainz Espuñes

Dra. Teresita del Rosario Sainz Espuñes UAM-X

RESUMEN

Escherichia coli como el anaerobio facultativo predominante de la biota humana, coloniza el tracto gastrointestinal de los infantes a las pocas horas de vida. Permanece en el lumen del intestino sin causar daño, sin embargo, en un huésped inmunocomprometido, o cuando las barreras gastrointestinales son violadas, incluso las cepas "no patógenas" de *E. coli* pueden causar infección. Existen cepas patógenas que causan diarrea. Las cepas diarreogénicas se dividen en seis categorías principales de acuerdo con sus mecanismos de patogenicidad, su interacción con la mucosa intestinal, síntomas y características epidemiológicas. Una de estas categorías está integrada por la cepas de *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC).

Entre las variedades patógenas de *E. coli* se ha descrito la secreción de toxinas que son responsables de varios padecimientos. Dentro de estos productos se encuentran las proteasas con un motivo de serina que como característica particular es el hecho de que son autotransportadoras, se conocen como SPATEs (Serin Proteases Autotransporter from Enterobacteriaceae, por sus siglas en inglés). Las SPATEs poseen el motivo GDSGS en el cual se encuentra la actividad de serin proteasas.

En el 2000, Guyer y colaboradores, identificaron y caracterizaron una proteína autotransportadora de 107 kDa designada Sat, la cual es secretada por UPEC CFT073, una cepa altamente virulenta aislada de sangre y orina de una mujer con pielonefritis aguda.

En México durante un brote de diarrea en un hospital pediátrico, durante la necropsia se aisló del intestino de un niño muerto durante dicho brote, una cepa de *E. coli* altamente virulenta. Dicha cepa designada como 049766 se identificó con el serotipo O?:H10 y mediante un ensayo de adherencia a células HEp-2 se determinó que pertenecía al grupo EAEC.

En el presente trabajo, se determinó que la cepa EAEC 049766 produce la toxina Sat, proteína que se identificó previamente en una cepa UPEC. Se determinó la secuencia del gene obtenido del cromosoma de la cepa 049766, en ésta se identificó la existencia de 6 cambios en los aminoácidos cuando fue comparada con la secuencia reportada de la toxina Sat de la cepa de *E. coli* CFT073.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

El presente Proyecto de Investigación fue realizado con el apoyo de las siguientes Instituciones:

- Laboratorio de Biología Experimental G-007. Depto. Sistemas Biológicos. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco.

- Laboratorio 325 Nte del Departamento de Genética Molecular. Instituto de Fisiología Celular. Universidad Nacional Autónoma de México.

- Laboratorio de Salud Pública. Unidad de Posgrado de la Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México.

De la misma manera, se agradece el apoyo económico de parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por haber sido incluido en su Plan de Becas con el número de Registro 198449 y llevar a buen término la realización del Proyecto de Investigación.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

En primer lugar, quiero agradecer a Dios por todos los logros que me ha permitido alcanzar tanto de manera personal como profesional.

Quiero agradecer de manera muy especial a la Dra. Teresita del Rosario Sainz Espuñes, gracias por aceptarme como su alumno y tenerme la confianza de desarrollar un proyecto bajo su tutoría, gracias por sus consejos, sus observaciones, críticas y enseñanzas, que fueron y siguen siendo muy valiosas.
A Gaby, Jazmín, Sergio, Salvador y David, gracias por su compañerismo, amistad y sobre todo por sus ocurrencias que hicieron muy interesantes los días en el G-007.

Gracias al Dr. Carlos Eslava por todas las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo, gracias por sus asesorías, recomendaciones y orientación en el rumbo del mismo.
Gracias a sus alumnos Ulises y Domingo que también contribuyeron en este trabajo compartiendo resultados y técnicas de laboratorio.

Gracias a la Dra. Bertha González Pedrajo por las facilidades, atenciones, consejos, orientación, y en especial por la disposición de recibirme en su laboratorio para alcanzar la meta planteada dentro del proyecto.
Gracias a la Dra. Norma Espinosa por su ayuda en el conocimiento y manejo de nuevos equipos y técnicas de trabajo.
Y gracias, pero muchísimas gracias a mis amigos Erika, Mariana, Eli, Aurora, Julia, Miguel y Ángel por hacer super agradable mi estancia de dos años en el IFC, gracias por compartirme su conocimiento, gracias por brindarme su amistad haciendo mucho más productivo el tiempo y la experiencia en su laboratorio. Sólo espero haber respondido de la misma forma, y aunque no lo crean, fue un placer trabajar a su lado.

Gracias a mis amigos del grupo de Liturgia como de la Escuela de Pastoral, no me he olvidado de ustedes.

Gracias a todas las personas que de alguna u otra forma participaron en este logro, que aunque parece personal, sería una actitud egoísta de mi parte el no reconocer que sus comentarios, críticas y frases de apoyo fueron muy importantes y tengan por seguro que nunca pasaron desapercibidas.

Son demasiadas las personas a las que tengo y me gustaría agradecerles, sin embargo, les pido comprensión y que tengan el pleno conocimiento de que siempre los tengo presentes.

Gracias a mi hermana Paola, a mi cuñado Nerit, a mi hermano Marco, a mi cuñada Margarita, a mi sobrino consentido Tabb, gracias a todos por entender el trabajo y esfuerzo que he realizado para conseguir este objetivo. Gracias por su comprensión al faltar a eventos importantes para la familia, pero todo tiene un premio y aunque a veces el sacrificio parece ser mayor, la recompensa obtenida no tiene ni tendrá comparación.

Por último y no por eso menos importante, **MUCHÍSIMAS GRACIAS** a mi **Madre**, pues sin su apoyo, sin sus consejos, sin sus enseñanzas, nada de esto hubiera sido posible. Gracias por su exhortación de salir siempre adelante sin importar las dificultades, y si hay alguna persona que deba ser felicitada, no hay duda que serías tú Mamá. Nunca podre pagarte todo lo que has hecho [illegible] mí.

Gracias, gracias a todos y cada uno...

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	10
ANTECEDENTES	12
MARCO TEÓRICO	13
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	45
HIPÓTESIS	45
OBJETIVOS	46
MATERIALES Y MÉTODOS	47
RESULTADOS	57
DISCUSIÓN	68
CONCLUSIONES	74
REFERENCIAS	75

INTRODUCCIÓN

Escherichia coli es el anaerobio facultativo predominante de la biota humana. Este organismo coloniza el tracto gastrointestinal de los infantes a las pocas horas de vida.[1]

E. coli usualmente permanece confinado sin causar daño en el lumen del intestino, sin embargo, en un huésped debilitado o inmunocomprometido, o cuando las barreras gastrointestinales son violadas, incluso las cepas "no patógenas" de *E. coli* pueden causar infección.[2]

Aunque *E. coli* forma parte de la biota normal en el tracto digestivo de humanos, existen algunas cepas patógenas que causan diarrea. Las cepas diarreogénicas se dividen en seis categorías principales de acuerdo con sus diferentes mecanismos de patogenicidad, su interacción con la mucosa intestinal, síntomas diarreicos y características epidemiológicas, las cuales muestran al menos una propiedad relacionada con la virulencia en un plásmido, estas son: *E. coli* enteropatogénica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* de adherencia difusa (DAEC) y *E. coli* enteroagregativa (EAEC).

Las variedades patógenas de *E. coli* son responsables de diferentes padecimientos, entre los factores de virulencia de estos organismos, se ha descrito la secreción de toxinas. Dentro de estos productos se encuentran las proteasas con un motivo de serina que como característica particular es el hecho de que son autotransportadoras. Por lo anterior y por ser un componente común en la familia enterobacteriaceae se conocen como SPATEs (Serin Proteases Autotransporter from Enterobacteriaceae, por sus siglas en inglés). Estas proteínas incluyen EspC de EPEC, EspP de EHEC, Pet y Pic de EAEC, Sat de UPEC, Tsh de *E. coli* patógena para aves, Pic y SepA de *Shigella flexneri*. Las SPATEs poseen el motivo GDSGS, en el cual se encuentra la actividad de serin proteasas.[3]

Las cepas de EAEC son reconocidas por su característico patrón de adherencia en forma de "tabiques apilados" en cultivos de células HEp-2 y HeLa.[4]

La diarrea del viajero es debida a menudo por bacterias patógenas (principalmente ETEC), sin embargo, EAEC ha sido identificada como causa de diarrea aguda y persistente en países en vías de desarrollo y también ha sido asociada a la diarrea del viajero.[5]

La infección del tracto urinario es una de las infecciones extraintestinales más comunes. *E. coli* es uno de los organismos que más comúnmente la causan. En general, las infecciones del tracto urinario son iniciadas por las cepas de *E. coli* uropatogénicas presentes en el colon. Tales cepas exhiben distintas propiedades que contribuyen a su habilidad para entrar en el tracto urinario, colonizar la vejiga y ascender hacia el riñón. Estas herramientas le permiten a la bacteria evadir los mecanismos de defensa del huésped y alterar su fisiología. En el 2000, Guyer y colaboradores, identificaron y caracterizaron una proteína autotransportadora de 107 kDa designada Sat, la cual es secretada por UPEC CFT073, una cepa altamente virulenta aislada de sangre y orina de una mujer con pielonefritis aguda.[6]

En México durante un brote de diarrea en un hospital pediátrico, en la necropsia se aisló del intestino de un niño muerto durante dicho brote, una cepa de *E. coli* altamente virulenta. Dicha cepa, designada como 049766 se identificó con el serotipo O?:H10 y mediante un ensayo de adherencia a células HEp-2 se determinó que pertenecía al grupo EAEC.

En el presente trabajo, se determinó que la cepa EAEC 049766 produce la toxina Sat, proteína que se identificó previamente en una cepa UPEC. Se determinó la secuencia del gene obtenido del cromosoma de la cepa 049766, en ésta se identificó la existencia de 6 cambios en los aminoácidos cuando fue comparada con la secuencia reportada de la toxina Sat de la cepa de *E. coli* CFT073.

ANTECEDENTES

E. coli es el agente etiológico más importante de diarrea infantil y representa el mayor problema de salud pública en países industrializados como en aquéllos en vías de desarrollo.[7]

En 1998, Eslava y cols., caracterizaron y secuenciaron el gene de la toxina Pet codificada en el plásmido de 60 MDa aislado de la cepa de EAEC O42, sin embargo, al tratar de verificar la prevalencia de dicha toxina en otras cepas de EAEC, encontraron que los oligonucleótidos iniciadores diseñados con la secuencia de Pet no identificaban la presencia del gene reportado por ellos en un buen número de cepas de EAEC.[8]

En 2002, Sainz y cols., reportaron que en cortes de íleon de ratones inoculados con la cepa de EAEC O42 se presentaban alteraciones histológicas caracterizadas por un aumento de la celularidad del epitelio intestinal así como un acortamiento de las vellosidades intestinales y edema presente en la submucosa.[9]

En 2006, Sainz y cols., reportaron el daño causado en ratones infectados con la cepa EAEC 049766, encontrando las mismas alteraciones histológicas reportadas en los modelos animales infectados con EAEC O42. Las lesiones producidas por la cepa 049 fueron más severas que con la cepa O42.[10]

Especies patógenas de *E. coli* son responsables de una variedad de enfermedades. Un factor común de estos organismos es la secreción de moléculas proteicas de alto peso llamadas serin proteasa autotransportadoras de Enterobacterias (SPATEs).[3]

En el 2000, Guyer y colaboradores, identificaron y caracterizaron una proteína autotransportadora de 107 kDa designada Sat, la cual es secretada por UPEC CFT073, una cepa altamente virulenta aislada de sangre y orina de una mujer con pielonefritis aguda.[6]

MARCO TEÓRICO

Enterobacterias

Las enterobacterias pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*, la cual consta de varios géneros. Se caracterizan porque no forman esporas, son capaces de crecer tanto en aerobiosis como en anaerobiosis (es decir, son anaerobios facultativos), fermentan la glucosa, no producen enzimas oxidasas, y tienen una movilidad variable (dependiendo de la presencia o no de flagelos).[11]

Las enterobacterias son organismos Gram-negativos que poseen una membrana interna (citoplasmática), una cubierta de peptidoglicano (pared celular) que la rodea, una membrana externa, que contiene lipopolisacáridos y porinas (canales para la penetración de antibióticos y nutrientes), y en algunos casos, una cápsula de naturaleza polisacárida que rodea completamente a la célula. El lipopolisacárido (LPS) de la membrana externa está relacionado con una zona más interna denominada *core*, que contiene la molécula del lípido A de la que depende la actividad biológica de la endotoxina la cual es responsable del choque séptico (choque endotóxico), característico de las bacterias Gram-negativas. La cadena lateral del LPS esta constituida por diferentes azúcares que dependiendo de su variación constituyen los diferentes tipos del antígeno somático "O". El antígeno flagelar "H" de naturaleza protéica y el antígeno capsular "K" compuesto por polisacáridos son los otros dos antígenos de la bacteria que junto el antígeno O, son utilizados para realizar la caracterización de la enterobacterias mediante el empleo de sueros obtenidos en conejo. Durante mucho tiempo se utilizó la identificación de los antígenos O, H y K, para determinar si una bacteria pertenecía a algún grupo patógeno. En la actualidad este procedimiento se sigue utilizando pero en conjunto con métodos moleculares que identifican genes asociados para factores de virulencia, principalmente para estudios epidemiológicos.[12]

Entre los factores de virulencia se han identificado las fimbrias o *pili*, que son prolongaciones filamentosas que permiten la adherencia de la bacteria a receptores específicos de las células mucosas y epiteliales de las vías

respiratorias, digestivas y genitourinarias.[13] Otros factores de virulencia que pueden tener las enterobacterias son proteínas de membrana externa involucradas en la adherencia, las toxinas que pueden ser enterotoxinas o citotoxinas, o factores que contribuyen en la capacidad invasiva de las bacterias. Muchos de estos factores están relacionados con la presencia de material genéticos extracromosómico como los plásmidos, transposones e incluso conjuntos de genes integrados que conforman las islas de patogenicidad.[14]

Escherichia coli

Escherichia coli es un bacilo Gram-negativo, anaerobio facultativo de la familia *Enterobacteriaceae*, tribu *Escherichia*.[15] Figura 1.

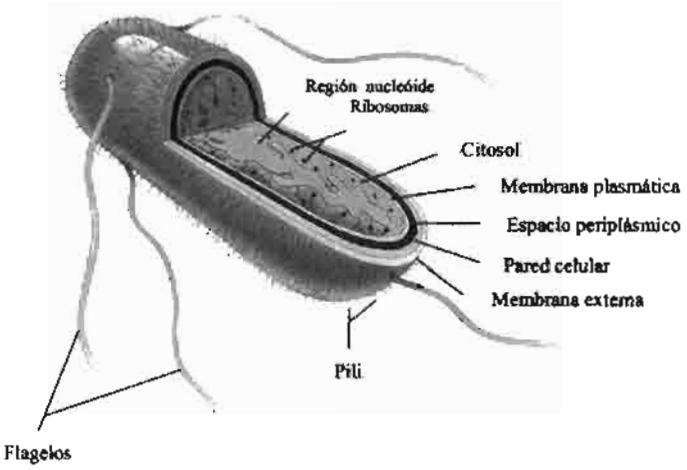


Figura 1. Estructura de *Escherichia coli*.[11]

E. coli es el anaerobio facultativo predominante de la biota humana. Este organismo coloniza el tracto gastrointestinal de los infantes a las pocas horas de vida, y a partir de ese momento, el huésped y *E. coli* viven en un mutuo beneficio.

Es una de las especies bacterianas más minuciosamente estudiadas, y no solamente por sus capacidades patogénicas, sino también como sustrato y modelo de investigaciones metabólicas, genéticas, poblacionales y de diversa índole.[1]

Se trata de bacterias de rápido crecimiento y amplia distribución en el suelo, el agua, vegetales y gran variedad de animales. En conjunto, la importancia de las enterobacterias en patología humana puede cuantificarse constatando que constituyen el 50% aproximadamente de todos los aislamientos clínicamente significativos en los laboratorios microbiológicos, y hasta el 80% de todos los bacilos Gram-negativos identificados.[16]

E. coli usualmente permanece confinado sin causar daño en el lumen del intestino, sin embargo, en un huésped debilitado o inmunocomprometido, o cuando las barreras gastrointestinales son violadas, incluso las cepas "no patógenas" de *E. coli* pueden causar infección.

También existen clonas de *E. coli* altamente adaptadas que pueden desarrollar la habilidad para causar un amplio espectro de enfermedades en el humano.
Infecciones debidas a cepas patógenas de *E. coli* pueden estar limitadas a la superficie de la mucosa o también pueden diseminarse por todo el cuerpo.
En general, son tres síndromes los que resultan de la infección con cepas patógenas de *E. coli*: 1) infecciones del tracto urinario, 2) sepsis, meningitis y 3) enfermedades entéricas o diarreas.[2]

La virulencia en *E. coli* es el resultado de la acumulación de una o varias propiedades especiales, o factores de virulencia (VFs), los cuales sirven para distinguir patógenos potenciales de las cepas inofensivas.[14]

E. coli es el agente etiológico más importante de diarrea infantil y representa el mayor problema de salud pública en países desarrollados como en aquéllos en vías de desarrollo.[7]

Se ha propuesto que *E. coli* sigue una estrategia de infección; *i*) colonización en el sitio de la mucosa, *ii*) evasión de las defensas del huésped, *iii*) multiplicación, y *iv*) daño al hospedero. La habilidad más conservada de las cepas diarreogénicas de *E. coli* es la de colonizar la superficie de la mucosa intestinal a pesar de la peristalsis y competencia por nutrientes de la biota del intestino.

La presencia de fimbrias de adherencia es una propiedad de todas las cepas de *E. coli*, incluyendo las variedades no patogénicas. Sin embargo, cepas diarreogénicas de *E. coli* poseen antígenos fimbriales específicos que realzan su habilidad para colonizar permitiendo su adherencia a la mucosa. Una vez establecida la colonización, las estrategias patogénicas de estas cepas diarreogénicas pueden variar de una manera muy marcada.[2]

Las cepas diarreogénicas de *E. coli* han adquirido diferentes genes de virulencia y por lo tanto, difieren en la forma en que estos organismos residen en el colon.[17]

Aunque *E. coli* forma parte de la biota normal en el tracto digestivo de humanos, existen algunas cepas patógenas que causan diarrea. Las cepas diarreogénicas se dividen en seis categorías principales de acuerdo con sus diferentes mecanismos de patogenicidad, su interacción con la mucosa intestinal, síntomas diarreicos y características epidemiológicas las cuales muestran al menos una propiedad relacionada con la virulencia en un plásmido, estas son: *E. coli* enteropatogénica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* de adherencia difusa (DAEC) y *E. coli* enteroagregativa (EAEC).[2]

***Escherichia coli* enteropatógena (EPEC)**

Ha sido ligada a la producción de diarrea infantil en países en vías de desarrollo. Se definió únicamente en base a su serotipo O y H, ahora se ha definido en base a sus características patogénicas. La principal característica de la infección debida a EPEC es la lesión de adherencia y eliminación (A/E).[2] Dicha lesión es el proceso de adherencia íntima entre la bacteria y la membrana de las células del epitelio intestinal, seguida de la destrucción de las microvellosidades, con polimerización de actina debajo del sitio de adherencia formando una estructura llamada pedestal, todo esto lleva a la alteración del citoesqueleto en el sitio de unión de la bacteria. Figura 2.

La adherencia está mediada por pilis o fimbrias rizadas llamadas Bfp (bundle-forming pilus) cuya información genética está codificada en un plásmido de 60

MDa denominado EAF (Enteropathogen Adherent Factor), así como en algunos genes cromosomales. En la adherencia es necesaria la síntesis de una proteína de membrana externa de 94 KDa llamada intimina, codificada por el gene cromosomal *eae* y que sirve como señal en la lesión A/E.[15] La lesión A/E es completamente diferente de la histopatología observada en cepas de ETEC y *V. cholerae*, en los cuales los organismos se adhieren en una forma no íntima y sin causar eliminación de microvellosidades o polimerización de actina. Además de la actina, la lesión A/E incluye otros componentes del citoesqueleto tales como α-actina, talina, ezrina, y cadenas ligeras de miosina. En la punta del pedestal, debajo de la membrana plasmática está localizada la proteína Tir, que es fosforilada en residuos de tirosina en respuesta a la infección con EPEC.

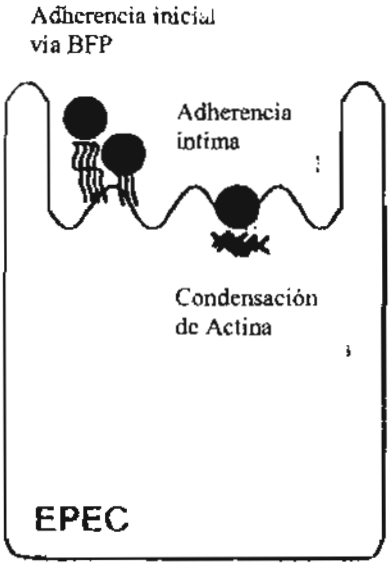


Figura 2. Lesión característica A/E de EPEC.[2]

Las cepas EPEC han sido el prototipo de una familia entera de patógenos entéricos que producen la lesión A/E sobre células epiteliales. Una secuencia de múltiples pasos ha sido involucrada en la producción de la característica histopatología A/E, sin embargo, en 1992, Donnenberg y Kaper propusieron un modelo de tres estados en la patogénesis de EPEC que consiste en *i)* adherencia localizada, *ii)* transducción de señales, y *iii)* adherencia íntima.[2]

EPEC puede ocasionar brotes o casos aislados de diarrea, afecta principalmente a niños menores de seis meses. También puede aislarse en

adultos enfermos y sanos. La forma de transmisión de la enfermedad es fecal-oral por manos contaminadas en la manipulación de alimentos. El cuadro clínico que produce EPEC se manifiesta con diarrea aguda, la cual puede ser leve o grave, con vómito, fiebre baja y mala absorción. Para su caracterización se recurre a ensayos in vitro en cultivos celulares para definir su patrón de adherencia y la alteración del citoesqueleto de la célula, así como al empleo de métodos moleculares para identificar los genes asociados a la expresión de factores de virulencia de la bacteria.[15]

***Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC)**

En 1983, Riley describió y relacionó a EHEC con brotes caracterizados por dolor abdominal, diarrea acuosa con sangre con presencia o ausencia de fiebre, a este cuadro se le llamó colitis hemorrágica (HC). La transmisión de esta bacteria se asocia con la ingesta de carne cruda o mal cocida, jugos de frutas no pasteurizadas y verduras que se consumen crudas. La bacteria que se aisló en todos los casos fue *E. coli* del serotipo O157:H7. También en 1983, Karmali, la asoció con casos aislados de síndrome urémico hemolítico (HUS por sus siglas en inglés) caracterizado por un daño renal agudo, trombocitopenia y anemia hemolítica microangiopática, precedida por diarrea con sangre, con la presencia en heces de *E. coli* productora de una citotoxina con actividad en células Vero, por lo que se le llamó Verotoxina (VT), y a las cepas capaces de producirla se les denominó *E. coli* verotoxigénicas (VTEC). Además, se observó que la citotoxina se neutralizó con antitoxina obtenida a partir de *Shigella dysenteriae* tipo 1, por lo que también se le llamó "Shiga-like toxin" o toxina semejante a Shiga (SLT) o "Shiga toxin" (Stx) y a las cepas de *E. coli* capaces de producirla se les llama STEC[2] Figura 3.

La capacidad toxigénica de las cepas es necesaria para que el paciente desarrolle colitis hemorrágica y diarrea con sangre, ya que la citotoxina Stx es el principal mecanismo de patogenicidad de EHEC y su síntesis está relacionada con la presencia del bacteriófago Stx, que se encuentra dentro del cromosoma. Stx actúa a nivel de síntesis de proteínas ya que se une a la subunidad 60S de los ribosomas de las células intestinales o renales del hospedero. En las cepas aisladas de EHEC, se han encontrado las variantes

Stx1 y Stx2 que son inmunológicamente diferentes, de tal manera que se pueden aislar bacterias que sinteticen alguna de las toxinas o ambas. Además de esta toxina, las cepas de EHEC tienen otros mecanismos de patogenicidad como el fenómeno de adherencia y eliminación (A/E), y presentan el gene cromosomal *eae* que codifica para la proteína de membrana externa de 94 KDa llamada intimina.

Otro factor de patogenicidad es el plásmido pO157 de 60 MDa que codifica para la enterohemolisina.

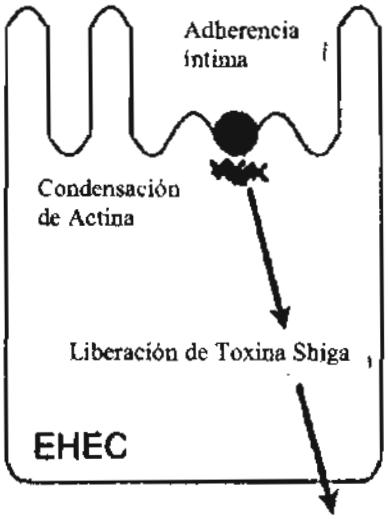


Figura 3. Lesión característica de las cepas EHEC. Liberación de la toxina Shiga.[2]

Actualmente hay al menos dos clasificaciones del grupo EHEC. Una es en función de la presencia de sus factores de patogenicidad: a) cepas típicas cuando tienen el fago, el plásmido de 60 MDa y presentan el fenómeno de A/E, y b) cepas atípicas, cuando no producen lesiones de A/E y pueden presentar o no el plásmido de 60 MDa.

La otra clasificación es en función del serotipo: a) cepas de *E. coli* O157:H7, este serotipo no fermenta el D-sorbitol ni la ramnosa y no produce β-glucoronidasa; esta bacteria puede producir principalmente síndrome urémico hemolítico (HUS) y colitis hemorrágica (HC) y b) cepas no-O157:H7, cuya frecuencia de aislamiento es cuatro veces mayor que las O157:H7. Estas cepas pueden ser sorbitol positivo y sus serotipos son diferentes de O157:H7.

El cuadro clínico causado por las cepas no-O157:H7, se caracteriza por diarrea acuosa con dolor abdominal y colitis hemorrágica. El principal mecanismo de patogenicidad de las cepas no-O157 es la toxina Stx, también causan la lesión A/E y pueden presentar el plásmido pO157.

El periodo de incubación de EHEC es de 1 a 8 días; inicialmente produce diarrea sin sangre, con o sin vómito, dolor abdominal, fiebre, y después de 1 a 2 días la diarrea se torna sanguinolenta y se identifica el dolor abdominal, de una duración de 4 a 10 días, con heces abundantemente sanguinolentas. Se cura o bien llega hasta el síndrome urémico hemolítico.[15]

***Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC)**

En 1971, DuPont mostró que las cepas de EIEC fueron capaces de causar diarrea en un estudio con voluntarios.

Las cepas EIEC están relacionadas bioquímica, genética y patológicamente a *Shigella* spp. EIEC es generalmente lisina descarboxilasa negativa, sin motilidad y lactosa negativa.[2]

El mecanismo de patogenicidad de EIEC es la invasión del epitelio del colon; el primer paso es la adherencia de la bacteria a las vellosidades de la mucosa por medio de mucinasa y adhesinas, después entra por endocitosis a la célula para posteriormente multiplicarse dentro de la célula y finalmente diseminarse a células sanas adyacentes.[15] Figura 4.

Cuando la infección es severa, esta secuencia de eventos provoca una fuerte reacción inflamatoria, la cual se manifiesta como una ulceración.[2]

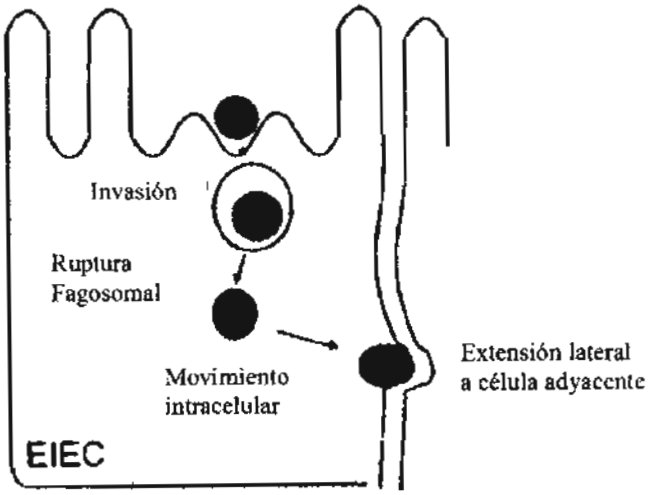


Figura 4. Lesión característica de EIEC. Adherencia bacteriana, endocitosis y diseminación.[2]

La información genética para este mecanismo se encuentra en el *loci* del cromosoma y del plásmido, además de tener la capacidad de elaborar una o más enterotoxinas que pudieran ser importantes en la producción de diarrea. Los genes necesarios para la invasión se encuentran en un plásmido de 140 MDa llamado *pInv*, que codifica para proteínas, por ejemplo, las Ipa y otras que están involucradas en el proceso de patogénesis.

Los síntomas característicos en personas infectadas por EIEC son diarrea acuosa, con sangre y moco, pero algunos casos sólo presentan diarrea, ésta en ocasiones no se puede diferenciar de la que produce ETEC. Las cepas de EIEC se asocian más con brotes que con casos aislados, en los cuales la transmisión puede ser de persona a persona, por ingestión de alimentos y agua contaminada, convirtiéndose en un patógeno importante en niños mayores de seis meses.

El diagnóstico de EIEC se hace por prueba in vivo como la prueba de Sereny, que es la inoculación de un cultivo puro de la bacteria en un ojo de un cobayo en el cual después de 24 a 96 horas se produce una ulceración en el ojo. También existen métodos inmunológicos y moleculares para su diagnóstico.[15]

***Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC)**

Coloniza la mucosa del intestino delgado por medio de pilis o fimbrias que tienen diversas formas denominadas CFA (Colonization Factor Antigens), siendo su principal mecanismo de patogenicidad la síntesis de alguna o ambas enterotoxinas llamadas toxina termolábil (LT) y toxina termoestable (ST).[15] Figura 5.

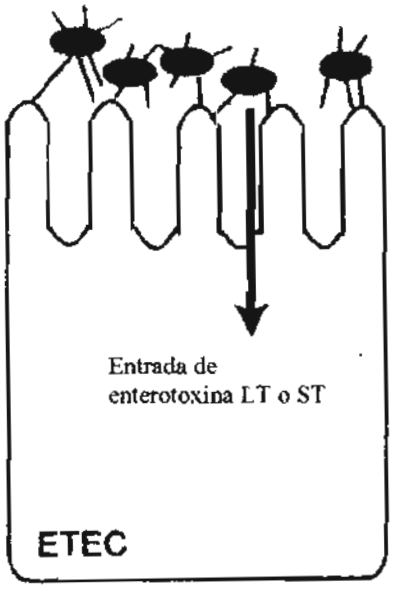


Figura 5. Lesión característica de ETEC. Liberación de enterotoxinas LT o ST.[2]

Las toxinas LT de *E. coli* son toxinas oligoméricas que se relacionan en estructura y función a la enterotoxina colérica (CT) expresada por *Vibrio cholerae*. LT y CT comparten muchas características, entre las que se encuentran su secuencia de proteínas (80% de identidad), receptor primario idéntico, actividad enzimática y actividad en ensayos con modelos animales y cultivos celulares. Los dos mayores serogrupos de LT: *i)* LT-I es expresada por cepas de *E. coli* que son patogénicas para humanos y animales, es una toxina oligimérica de 86 KDa compuesta de una subunidad A de 28 KDa y cinco subunidades B de 11.5 KDa. Las subunidades B están arregladas en un anillo y están unidos fuertemente al gangliosido GM_1 y de manera débil a GD1b y algunas glicoproteínas intestinales. La subunidad A es responsable de la actividad enzimática de la toxina. Se han descrito dos variantes de LT-I, estas variantes son llamadas LTp (LTp-I) y LTh (LTh-I). *ii)* LT-II se encuentra principalmente en cepas de *E. coli* aisladas de animales y raramente en

humanos. El serogrupo LT-II de la familia LT muestra 55 a 57% de identidad a LT-I y CT en la subunidad A, pero no una homología con la subunidad B. Dos variantes antigénicas, LT-IIa y LT-IIb, las cuales comparten de 71 y 66% de identidad con las subunidades A y B respectivamente. LT-II incrementa los niveles intracelulares de cAMP por mecanismos similares a los involucrados con LT-I, pero LT-II utiliza a GD1 como receptor en lugar de GM_1. No se ha observado evidencia de que LT-II esté asociada a enfermedades en humanos o animales.[2]

Las toxinas ST son pequeñas, monoméricas, contienen múltiples residuos de cisteína, cuyas uniones disulfuro explican su estabilidad al calor. Las toxinas STa (también llamadas ST-I), son producidas por ETEC y otras bacterias Gram-negativas incluyendo *Yersinia enterocolitica* y *Vibrio cholerae*. STa tiene alrededor de un 50% de identidad con la toxina EAST1 de EAEC que también ha sido descrita en algunas cepas de ETEC y que puede ser expresada junto con STa. STb ha sido reportada solamente en cepas ETEC.

i) STa. Es un péptido de 18 o 19 aminoácidos con una masa molecular de 2 KDa. Tiene dos variantes, llamadas STp (ST de porcino o STIa) y STh (ST de humano o STIb), aunque ambas variantes pueden ser encontradas en cepas de ETEC aisladas en humanos. Estas dos variantes son casi idénticas en los 13 residuos que son necesarios y suficientes para desarrollar su actividad enterotóxica, y de estos 13 residuos, 6 son cisteínas las cuales forman tres enlaces disulfuro intramoleculares.

ii) STb. Está asociada principalmente con cepas de ETEC aisladas de cerdos, aunque también se ha reportado que es expresada por algunas cepas aisladas en humanos. STb es una toxina con un peso molecular de 5.1 KDa. Su secuencia no tiene ninguna homología con STa, pero contiene 4 residuos de cisteína para formar los enlaces disulfuro. A diferencia de STa, STb induce daño histológico en el epitelio intestinal. El receptor para STb todavía es desconocido, aunque se ha sugerido que la toxina puede unirse de manera inespecífica a la membrana plasmática por endocitosis. STb no estimula el incremento en las concentraciones de cAMP o cGMP intracelulares, aunque sí estimula el incremento de los niveles de calcio intracelular proveniente de fuentes extracelulares, también estimula la liberación de PGE_2 (prostaglandina

de la serie E) y serotonina, sugiriendo que el ENS (sistema nervioso entérico) puede también estar involucrado en la respuesta secretora a la toxina.[2]

Los genes que codifican para las toxinas LT y ST, se encuentran en un plásmido que también puede contener información genética para los CFA´s (colonization factors antigens), aunque algunos genes de ST se han encontrado en transposones.[15]

Los mecanismos por los cuales ETEC se adhiere y coloniza la mucosa intestinal han sido sujetos a una investigación intensiva, se sabe que para causar diarrea, las cepas de ETEC primero se adhieren a los enterocitos, un evento mediado por fimbrias de superficie (también llamadas pili). Un gran número de antígenos fimbriales de ETEC han sido caracterizados. Esta heterogeneidad antigénica muestra la existencia de múltiples antígenos fimbriales, lo que representa un obstáculo para el desarrollo de una vacuna efectiva.[2]

Las ETEC son importantes en lactantes, principalmente en niños menores de dos años, y en particular durante los primeros seis meses de vida. La frecuencia de aislamiento de este grupo patógeno de *E. coli* en niños con diarrea es de 10 a 30%. En los niños en edad escolar y en adultos puede ser asintomática y poco frecuente o producir la diarrea del viajero. La enfermedad tiene un periodo de incubación de 14 a 50 horas. El cuadro clínico se caracteriza por diarrea aguda, generalmente sin sangre, sin moco, sin pus y en pocos casos se presenta fiebre y vómito. La diarrea producida por ETEC puede ser leve, breve y autolimitada, pero también puede ser grave. La contaminación fecal de agua y alimentos es la principal fuente de infección, siendo la dosis necesaria de 10^8 UFC.[15]

***Escherichia coli* de adherencia difusa (DAEC)**

El término "de adherencia difusa" inicialmente fue usado para referirse a la poca adherencia de estas cepas de *E. coli* a las células HEp-2, y no formar microcolonias como en el caso de EPEC. Figura 6. Con el descubrimiento de

las cepas de EAEC, muchos autores ahora reconocen a DAEC como una categoría independiente de *E. coli* diarreogénica potencial.

Se sabe poco acerca de su mecanismo de patogenicidad para provocar diarrea. En 1989, Bilge describió la clonación y caracterización de una fimbria de superficie en esta cepa, la cual participa en el fenotipo de la "adherencia difusa". Los genes que codifican para esta fimbria (llamada F1845), se pueden encontrar en el cromosoma o en el plásmido. Los genes fimbriales de DAEC muestran homología con los miembros del grupo Dr (adhesinas que reconocen el receptor del antígeno sanguíneo Dr (a^+)) de adhesinas bacterianas no fimbricas.

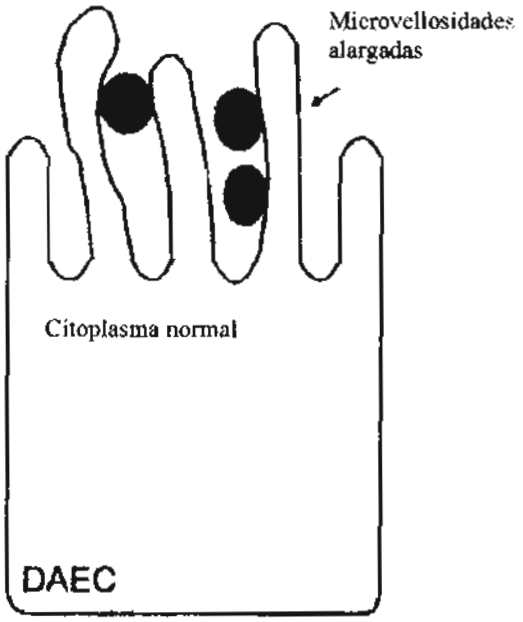


Figura 6. Mecanismo característico de DAEC.[2]

En 1992, Benz y colaboradores, describieron una proteína de membrana externa de 100 KDa que está asociada al fenotipo de adherencia difusa en una cepa de serotipo O126:H27. El gen que codifica para este factor (llamado AIDA-I) ha sido totalmente secuenciado. El uso de pruebas de ADN especificos para AIDA-I sugiere que este factor es expresado por una minoría de DAEC aisladas.

Yamamoto y colaboradores en 1994, así como Cookson y Nataro en 1996, al realizar ensayos in vitro en células HEp-2 y Caco-2, mostraron que las cepas

DAEC tienen la capacidad de inducir la formación de estructuras protuberantes, semejantes a dedos, las cuales le confieren protección a la bacteria, pero la presencia de dichas estructuras aún no se ha demostrado in vivo.

Varios estudios implican a las cepas DAEC como agentes de diarrea, mientras que otros estudios reportan que han aislado con mayor frecuencia cepas DAEC en pacientes control asintomáticos que en pacientes con diarrea.
Las cepas de DAEC están definidas por la presencia del patrón de adherencia difusa en ensayos sobre células HEp-2. Un polinucleótido de 700 pb derivado del gene *daaC* ha sido usado para la hibridación con sondas en la identificación de DAEC, *daaC* participa en la expresión de la fimbria F1845. Aproximadamente, el 75 % de las cepas de DAEC que se encuentran en el mundo son positivas a la prueba con el gene de la fimbria F1845. Sin embargo, por la relación que existe entre F1845 y los miembros de la familia Dr, las reacciones en la prueba de adherencia difusa pueden ocasionar falsos positivos.[2]

El grupo DAEC puede aislarse tanto de personas sanas como de personas con diarrea, siendo más importante en niños de 4 a 5 años. Los principales síntomas que se presentan son diarrea acuosa sin sangre y sin leucocitos.[15]

***Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC)**

Llamada así porque en ensayos con células HEp-2 exhiben un patrón de adherencia agregativa. Su propiedad agregativa es dependiente de la presencia de un plásmido de 65 MDa. En varios estudios epidemiológicos, las cepas de EAEC han sido encontradas en mayor número en pacientes con diarrea que en pacientes control. Estudios en India, México y Brasil han involucrado a *E. coli* enteroagregativa como un importante agente de diarrea persistente en niños con una duración mayor a 14 días.[18]

La diarrea del viajero es debida a menudo por bacterias patógenas (principalmente ETEC), sin embargo, EAEC ha sido identificada como causa de diarrea aguda y persistente en países en vías de desarrollo y también ha sido asociada a la diarrea del viajero. Las bacterias pertenecientes a EAEC, tienen

la habilidad para encontrar un nicho microbiológico en el intestino, este es un primer paso en el establecimiento de la patogénesis del organismo. En 1992, Knutton y colaboradores demostraron que las cepas de EAEC se adhieren al colon humano, y que son capaces de elaborar una toxina termoestable y una hemolisina termolábil. Esto sugiere que el sitio y grado de expresión dentro del intestino de estos u otros factores de virulencia es variable. También se piensa que algunos factores del huésped (receptores de toxinas por ejemplo) son requeridos para el desarrollo de la diarrea mediada por EAEC.[5]

Las cepas de EAEC son reconocidas por su característico patrón de adherencia en forma de "tabiques apilados" en cultivos de células HEp-2 y HeLa. Figura 7.

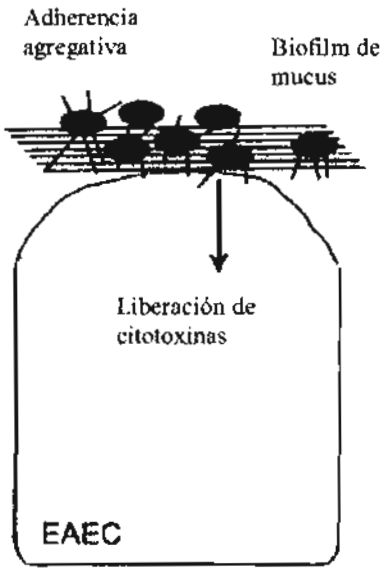
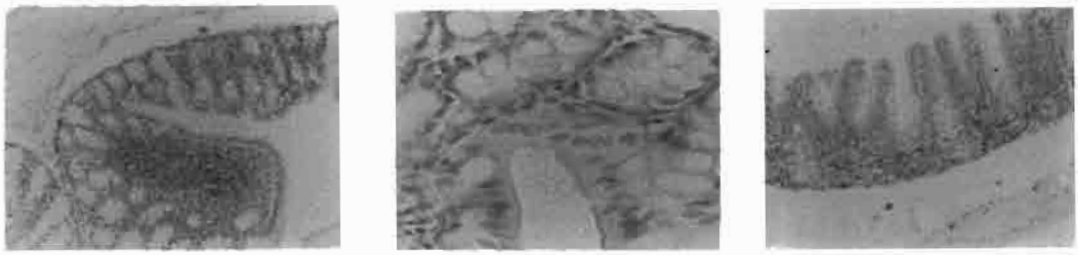


Figura 7. Patrón característico de adherencia de las cepas EAEC.[2]

Su fenotipo de adherencia está asociado con la fimbria BFP (bundle-forming pilus), AAF/1, la cual está codificada en un plásmido de 65MDa, y con la producción de una enterotoxina termoestable (EAST/1), que está codificada en el mismo plásmido. Benjamín y colaboradores demostraron el potencial de las cepas de EAEC para internalizarse en células HeLa, pero esta habilidad de internalizarse en células no se puede considerar un factor de virulencia de las cepas enteroagregativas, aunque esta propiedad está presente en un gran número de ellas.[4] Figura 8.1 y 8.2.



A B C

Figura 8.1. Sección histológica de íleon de un ratón infectado con EAEC 049766. Se observó respuesta inflamatoria con edema e infiltración mononuclear (Tinción con hematoxilina y eosina). Ampliación; A) x650, B) x1300. C) Ampliación Control x300.[10]

A B C

Figura 8.2. Se observó incremento en la secreción de moco, la lámina propia también presenta aumento celular. A) Tinción de Mac Manus. Ampliación x650. B) Ampliación x1300. C) Ampliación Control x650.[10]

El mecanismo por el cual EAEC causa diarrea no se ha caracterizado totalmente, sin embargo, varios factores probables han sido reportados. Varios estudios con diferentes sistemas han demostrado que EAEC es capaz de causar la destrucción de la mucosa intestinal. En 1998, Vial y colaboradores fueron los primeros en demostrar que las cepas EAEC provocan severos daños sobre la mucosa utilizando el modelo de asa ligada en ratas y conejos. Tzipori y cols., subsecuentemente reportaron que EAEC induce de manera más leve, pero significativa, cambios en la mucosa con modelos de cerdos gnotobióticos. Varios investigadores han establecido que tal daño a la mucosa también puede ser demostrada en tejidos humanos. En 1993, Eslava y cols., demostraron el daño a la mucosa en íleon de niños muertos a causa de diarrea provocada por EAEC en México. Identificaron una probable citotoxina inmunogénica de 108 KDa, la cual provocaba la toxicidad sobre la mucosa cuando era inyectada en el asa del íleon de rata.[19]

Savarino y cols. (1993), reportaron que la cepa EAEC 17-2 producía una enterotoxina de 30 aminoácidos llamada EAST-1. Aunque EAST-1 de EAEC y

STI de ETEC son genética e inmunológicamente distintas, EAST-1 activa la guanilato ciclasa como STI lo hace.

En 1997, Yamamoto y cols., realizaron un estudio de comparación entre las secuencias de EAST-1 en cepas de diferentes categorías (EAEC, DAEC, EPEC y EIEC), encontrando que la identidad entre los genes de EAST-1 iba de un 6.7 a 53.3 %, confirmando la heterogeneidad que existe en cuanto a la virulencia entre las diferentes categorías como también entre las mismas cepas agregativas, lo que había sido reportado por Nataro y col.[20]

Muchas cepas enteroagregativas contienen el plásmido de 65 MDa llamado pAA, el cual es requerido para la expresión de las fimbrias de adherencia agregativa (AAFs). Estas estructuras median el fenotipo de adherencia agregativa (AA) a las células HEp-2. El plásmido pAA también es requerido para el desarrollo del daño a la mucosa en modelos in vitro. El papel de las citotoxinas en enfermedades por EAEC ha sido sugerido basado en modelos in vivo e in vitro, los cuales muestran daño en el epitelio intestinal. En 1993, durante el brote de diarrea en México, Eslava y col., identificaron dos proteínas (de 108 y 116 KDa), las cuales provocaban necrosis y lesiones hemorrágicas en íleon de rata. En 1998, estas dos proteínas fueron purificadas de la cepa de EAEC 049766 (cepa implicada en el brote de diarrea en México, 1993), encontrando que causaban efectos citotóxicos y enterotóxicos en tejidos de yeyuno de rata montados sobre cámaras de Ussing. La toxina de 108 KDa induce efectos enterotóxicos, pero también provoca daño a los tejidos, inflamación y secreción de moco, por lo que se propuso que esta toxina juega un papel muy importante en la diarrea producida por EAEC. Estos datos les permitieron sugerir un modelo de infección para EAEC, en el cual, la adherencia inicial está mediada por las fimbrias AAF, seguido de la secreción de la enterotoxina de 108 KDa y tal vez de EAST-1, para continuar con el desarrollo de la citotoxicidad sobre la mucosa que también es inducida por la toxina de 108 KDa o por algún otro factor todavía no identificado.[21]

Las cepas de EAEC difieren en su patogenicidad, muchas contienen el plásmido de 60 a 65 MDa (pAA), el cual codifica varios factores de los

probables factores de virulencia, incluyendo la fimbria AA caracterizada como AAF/I o AAF/II. Para la biogénesis de AAF/I y AAF/II, se requiere la acción del activador transcripcional *aggR*. Sin embargo, muchas cepas contienen el gene *aggR*, pero no expresan AAF/I ni AAF/II. En muchas cepas enteroagregativas, dentro del plásmido existe un gene llamado *aspU*, el cual codifica una proteína secretora, pero ninguno de estos factores ha sido ligado directamente a la virulencia in vivo, aunque cada una podría tener un papel dentro de la patogénesis por EAEC.

También se ha reportado la producción in vivo de interleucina-8 (IL-8) en células epiteliales infectadas con EAEC.

Las cepas de EAEC pueden ser encontradas en alimentos contaminados, su infección por lo regular es asintomática. El huésped y los factores ambientales pueden influenciar el desarrollo de la diarrea (por ejemplo la dieta, tamaño del inoculo, estrés).[22]

La adherencia agregativa (AA) a la mucosa intestinal, es el primer paso en la patogénesis de EAEC. EAEC se adhiere a la superficie de la mucosa, estimula la secreción de moco y la formación de una gruesa agregación llamada biopelícula. Después de la adhesión, multiplicación y colonización de la superficie, la bacteria se rodea a si misma con sustancias exopoliméricas y recluta más bacterias para formar microcolonias intercaladas entre los canales de flujo, lo que le permite a las colonias embebidas dentro de la biopelícula no ser erradicadas fácilmente por antibióticos bactericidas y al mismo tiempo les permite ser protegidas del ataque del sistema inmune del intestino, provocando una infección prolongada.

Varios factores de virulencia tales como *aggA*, *aggR* y *aap* (dispersina), son importantes en la adherencia de EAEC a la mucosa intestinal y en la formación de la biopelícula.
En el 2001, Sheik y col., reportaron que *fis* y *yafK*, a través de la activación de *aggR*, también son importantes en la formación de esta biopeliculalm. Otros genes, incluyendo *aatA*, *pet*, ShET1 (enterotoxina de *Shigella*), *irp*2 (gene de

biogénesis de yersiniabactina) y *shf* se piensa que también podrían estar involucrados en la patogénesis de EAEC.[24]

En 2002, Sainz y cols., reportaron que en cortes de Ileon de ratones inoculados con la cepa de EAEC O42 se presentaban alteraciones histológicas caracterizadas por un aumento de la celularidad del epitelio intestinal así como un acortamiento de las vellosidades intestinales y edema presente en la submucosa.[9]

En 2006, Sainz y cols., reportaron el daño causado en ratones infectados con la cepa EAEC 049766, encontrando las mismas alteraciones histológicas reportadas en los modelos animales infectados con EAEC O42. Las lesiones producidas por la cepa 049 fueron más severas que con la cepa O42.[10]

Un gran número de estudios han respaldado la asociación de EAEC con diarrea en países desarrollados, y de manera más predominante asociada a diarrea persistente. Varios estudios en niños con diarrea han mostrado una significativa prevalencia de EAEC.[25]

La patogénesis de EAEC es compleja, y las cepas son muy heterogéneas. Estudios en animales y humanos han demostrado que EAEC es capaz de unirse al yeyuno, íleon y colon. Estudios de microscopía electrónica de fragmentos de mucosa intestinal infectada extraída de niños de entre 3 y 190 meses, revelan que la bacteria se encuentra embebida en una gruesa capa de moco. Numerosas enterotoxinas y citotoxinas han sido identificadas como probables factores de virulencia, pero su implicación clínica sigue sin ser aclarada. El factor de virulencia mejor estudiado es AggR, el regulador maestro de la virulencia de EAEC, el cual controla la expresión de los factores de adherencia, una proteína dispersina y un gran número de genes codificados en el cromosoma de EAEC. Los síntomas clínicos por una infección de EAEC pueden variar de un estudio a otro. Los síntomas más comúnmente reportados son diarrea acuosa con o sin sangre, moco, náusea, vómito, dolor abdominal y leve fiebre. El periodo de incubación de la diarrea causada por EAEC va de 8 a 18 horas. Las variaciones en los síntomas clínicos por infección de EAEC

pueden deberse a factores tales como la susceptibilidad genética del huésped, su respuesta inmune, la heterogeneidad de la virulencia entre las cepas EAEC, así como a la cantidad de bacteria ingerida por el huésped para provocar la infección.[26]

Sistemas de Secreción

La secreción de proteínas hacia ambientes extracelulares es importante para la mayoría de las bacterias, así como también para la interacción patogénica o simbiótica de las bacterias con su huésped eucariótico. Tres sistemas son responsables de la secreción de proteínas a través de la membrana citoplásmica bacteriana: Sec, SRP y Tat.[27]

Los sistemas de exportación de proteínas están presentes en todos los organismos vivos, incluyendo bacterias Gram-negativas y eucariontes. En contraste a otros organismos, las bacterias Gram-negativas contienen numerosos y aparentemente independientes sistemas de exportación de proteínas. Estos incluyen sistemas que median el cruce o inserción de proteínas dentro de la membrana interna y otros que específicamente intervienen en el cruce o inserción de proteínas dentro del lipopolisacárido contenido en la membrana.[28]

Las bacterias secretan un gran número de proteínas al medio extracelular entre las que se incluyen toxinas, adhesinas y diversas enzimas hidrolíticas que se requieren en diferentes aspectos del ciclo de vida bacteriano, como por ejemplo, en la biogénesis de organelos, la adquisición de nutrientes y la expresión de factores de virulencia. Se sabe que en las bacterias Gram-negativas, las proteínas a translocarse tienen que atravesar dos barreras lipídicas separadas por el espacio periplásmico y la capa de peptidoglicano: la membrana citosólica o membrana interna (MI), y la membrana externa (ME), que es una membrana asimétrica cuya cara exterior está compuesta principalmente por lipopolisacáridos. A pesar del número, la diversidad y la amplia variedad de funciones que desempeñan las proteínas secretadas

(proteólisis, hemólisis, citotoxicidad, reacciones de fosforilación, etc.), éstas son translocadas utilizando un número limitado de mecanismos.[29]

Las bacterias Gram-negativas patógenas usan al menos seis tipos de sistemas de secreción (referidos como tipo I-VI, o SST1-SST6) para el transporte de proteínas a través de las multicapas que envuelven a la célula, y en algunos casos, dentro de células blanco del huésped. Estos sistemas de secreción están diferenciados en parte por los componentes estructurales conservados que los definen, pero también por las características de los sustratos y vías que estos sustratos toman durante el proceso de exportación.[29]

La clasificación sobre las vías de secreción en las bacterias Gram-negativas se basa en la naturaleza molecular de las maquinarias de transporte y las reacciones que éstas catalizan. Sin embargo, estos grupos se pueden aún subdividir en dos grandes clases dependiendo del mecanismo que se utilice para el transporte a través de la membrana plasmática. Las vías Sec-dependientes, que utilizan el sistema de secreción denominado Sec, en el que las proteínas a secretarse presentan una secuencia señal o péptido líder en el extremo amino terminal; y las Sec-independientes, en las que los sustratos se pueden translocar directamente desde el citosol hasta el exterior celular sin que exista un intermediario periplásmico, ni una secuencia señal en el amino terminal.[29]

Sistema de Secreción Tipo 1 (SSTI)

Es utilizado por un gran número de bacterias para la secreción de toxinas, proteasas y lipasas. Es una vía Sec-independiente, por lo que no se requiere del procesamiento de un péptido líder para atravesar la membrana citoplásmica; la secreción proteica se da en un solo paso desde el citosol hasta el exterior celular. Los sustratos a exportarse por este sistema presentan una señal de secreción en el extremo carboxilo terminal, que sin embargo no es procesada. El SSTI está constituido por tres componentes: un canal en la membrana externa denominado PME (proteína de membrana externa), un transportador ABC (ATP *binding cassette*) en la membrana interna (MI) y una

proteína periplásmica que también esta anclada a la MI y que se denomina PF (proteína de fusión). Figura 9.

El prototipo para ejemplificar este sistema es la secreción de la toxina α-hemolisina (HlyA) en *E. coli*. Dicha toxina se produce principalmente en cepas de *E. coli* que causan infecciones del tracto urinario (*E. coli* uropatógena), y es un importante factor de virulencia debido a su actividad citolítica y citotóxica.[28] HlyA es una proteína lipídica modificada con un dominio compuesto de 11 a 179 aminoácidos repetidos, los cuales se unen al calcio y se piensa que interactúan con las células huésped. Esta interacción estimula la inserción de HlyA dentro de la membrana plasmática de las células eucariontes causando la formación de un poro y liberando su contenido. Otros miembros bien estudiados de este grupo incluyen la metaloproteasa de *Erwinia chrysanthemi*, la leucotoxina de *Pasteurella haemolítica* y la adenilato ciclasa de *Bordetella pertussis*.[30]

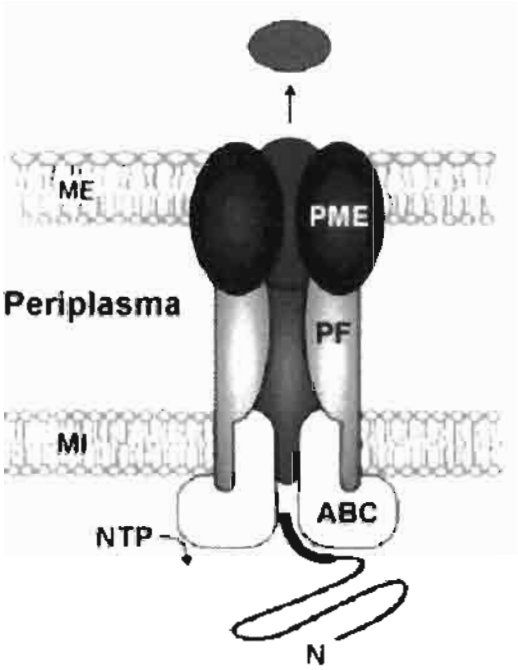


Figura 9. Componentes del Sistema de Secreción de Tipo I. La proteína periplásmica de fusión PF interactúa con el transportador ABC en la MIy con la proteína PME que forma un canal en la ME.[29]

Sistema de Secreción Tipo 2 (SSTII)

Este sistema es responsable de secretar una gran cantidad de enzimas hidrolíticas y toxinas, como la toxina del cólera (Figura 10). Ocurre en dos etapas, primero, la maquinaria Sec transloca el sustrato con péptido líder a través de la membrana plasmática, por lo que el SSTII es una vía Sec-dependiente. En una segunda etapa, la proteína pierde el péptido señal y adquiere su conformación nativa en el espacio periplásmico, para posteriormente ser secretada a través de la ME por un complejo sistema multiproteico llamado tipo II o secretón. Una de las características únicas de esta vía es su capacidad de transportar proteínas plegadas.[29]

El SSTII puede ser ejemplificado por la secreción de Pululanasa (PulA) de *Klebsiella oxytoca*. PulA es una lipoproteína, la cual forma micelas una vez que ha sido secretada dentro del medio ambiente externo. Desde el descubrimiento del SSTII en *K. oxytoca*, esta vía ha sido identificada en una gran variedad de otras especies bacterianas que exportan un alto número de proteínas con diversas funciones, incluyendo, como ya se había mencionado, la toxina del cólera de *Vibrio cholerae*, también la exotoxina A de *P. aeruginosa* y varias enzimas que degradan la pared celular.[30]

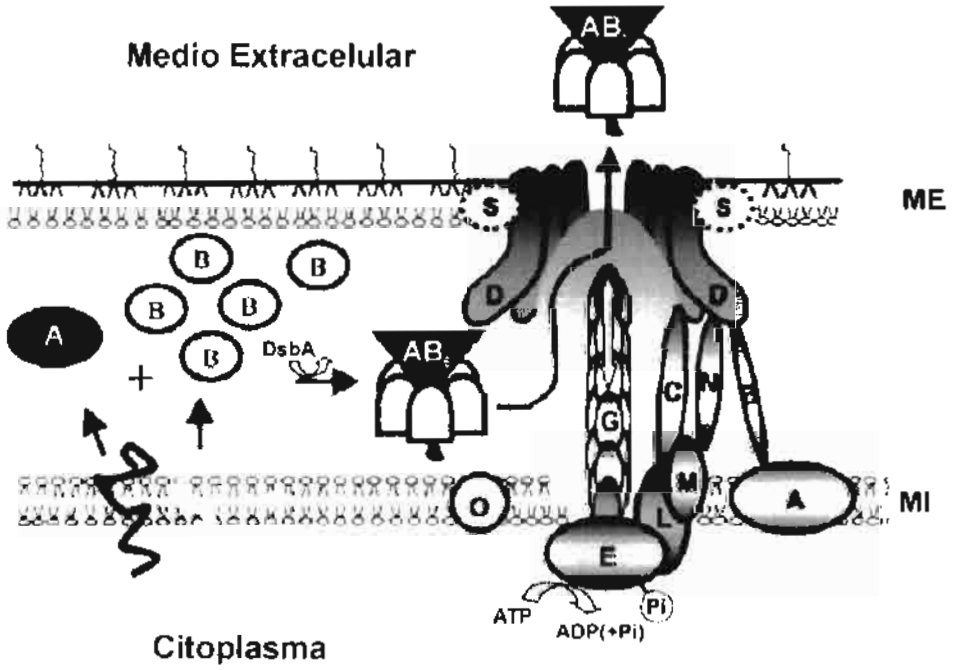


Figura 10. Modelo de secreción de la toxina del cólera por el SSTII. Primera etapa, las subunidades A y B de la toxina son translocadas a través de la MI como precursores

monoméricos utilizando la vía Sec. Segunda etapa, las subunidades se pliegan y ensamblan en el periplasma en un complejo AB_5. El complejo es dirigido al poro de la ME para su translocación.[29]

Sistema de Secreción Tipo 3 (SSTIII)

Es una vía Sec-independiente en la que la secreción ocurre en un solo paso desde el citosol hasta el exterior celular, que desempeña un papel central en la patogenicidad de muchas bacterias Gram-negativas.[29]

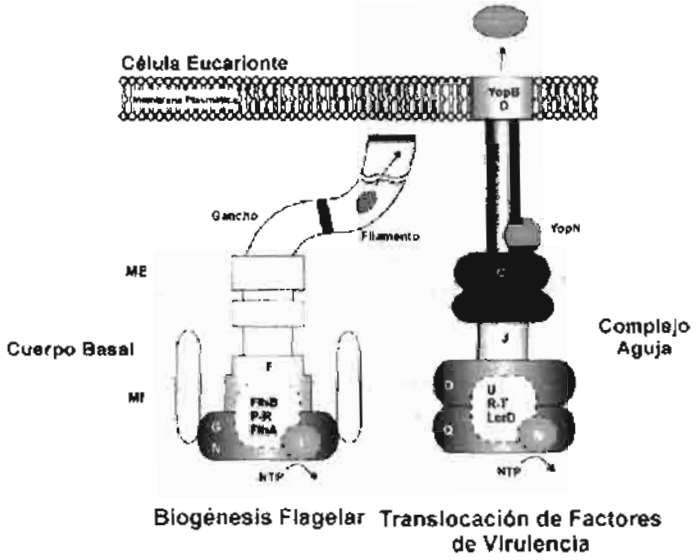


Figura 11. Modelos de secreción tipo III ejemplificados por la biogénesis flagelar y la translocación de factores de virulencia en *Yersinia*. Se muestran los componentes del cuerpo basal del flagelo bacteriano que son homólogos a los del complejo aguja del sistema de translocación de factores de virulencia.[29]

Este sistema se constituye por aproximadamente veinte proteínas situadas en las membranas externa e interna, aunque otras moléculas proteicas conocidas como "chaperonas" también desempeñan papeles críticos como por ejemplo; unirse en el citoplasma al producto a secretarse, a fin de estabilizarlo, evitar su plegamiento e impedir su asociación a otras proteínas.[31]

El SSTIII fue identificado por primera vez en *Yersinia* spp., en la secreción de las proteínas Yop. También ha sido identificado en varios patógenos de animales y plantas incluyendo *Salmonella enterica*, *Shigella flexneri*, *E. coli*,

Ralstonia solancearum, *Pseudomona syringae* y *Chlamydia trachomatis*.[30] Figura 11.

Sistema de Secreción Tipo 4 (SSTIV)

Es una vía homóloga a los sistemas de conjugación y al sistema VirB de *Agrobacterium tumefaciens* que facilitan la translocación de DNA. Este sistema es un transportador versátil que secreta tanto ácidos nucléicos como proteínas. La noción general aceptada para esta vía es que no requiere de intermediarios periplásmicos, por lo que la secreción es Sec-independiente.[29] Figura 12.

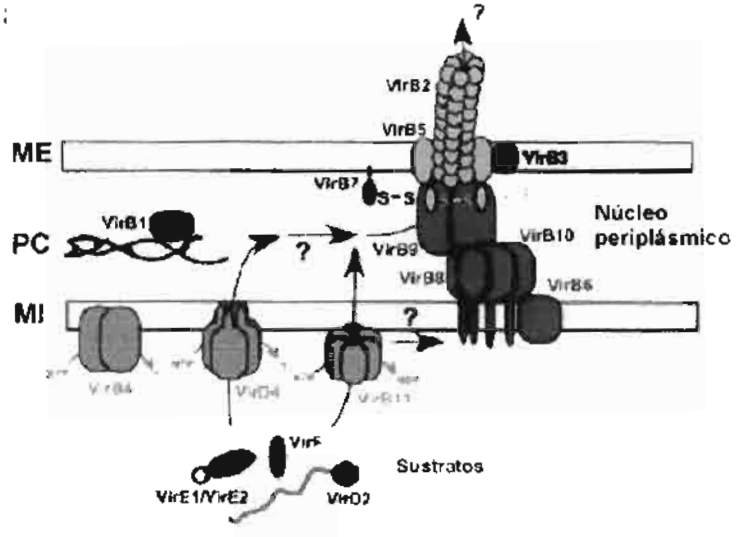


Figura 12. Modelo de secreción a través del SSTIV. Se propone que se lleva a cabo una asociación entre los componentes generadores de energía en la MI y la maquinaria de secreción (núcleo periplásmico). Las estructuras en la superficie celular pueden iniciar el contacto con la célula hospedera, sin embargo, la vía de translocación del sustrato es aún desconocida.[29]

Sistema de Secreción Tipo 6 (SSTVI)

Muy poco se conoce del mecanismo de transporte de proteínas a través de este sistema, los genes del SSTVI están altamente conservados y se encuentran presentes en varias especies bacterianas Gram-negativas como *P. aeruginosa*, *Y. pestis*, *E. coli*, *S. enterica*, *A. tumefaciens*, *Rhizobium leguminosarum*, *Francisella tularensis*, *Burkholderia mallei*, y algunas especies de *Edwardsiella*.

Pukatzki y colaboradores (2007), encontraron que genes que codifican para el SSTVI, están ampliamente distribuidos en bacterias Gram-negativas patógenas. En *Vibrio cholerae*, el SSTVI secreta tres proteínas extracelulares, VgrG-1, VgrG-2 y VgrG-3.[32]

Sistema de Secreción Tipo 5, Autotransportadoras (SSTV)

Muchos patógenos bacterianos ejecutan una selección de complejas funciones para sobrevivir, multiplicarse y diseminarse dentro del huésped. Sus determinantes de virulencia son principalmente de naturaleza proteica.[33]

A través del SSTV se exportan proteínas con diferentes funciones, incluyendo proteasas, toxinas, adhesinas e invaginas. En general, el SSTV o Autotransportadoras representa una vía Sec-dependiente ya que utiliza la maquinaria Sec para atravesar la MI; sin embargo, las proteínas no requieren de factores adicionales para transitar del periplasma hacia el exterior celular, como su nombre lo indica, dirigen su propia exportación. El extremo carboxilo terminal de la proteína dirige la secreción de la región amino terminal a través de la ME.[29]

En esta vía de secreción se incluyen tres sistemas; el Sistema de Autotransportadoras (Tipo Va o AT-1), la vía de secreción del doble compañero (Tipo Vb) y el recién descrito sistema tipo Vc, también llamado AT-2. Las proteínas secretadas por estas vías son similares en su estructura primaria, así como también en su proceso de biogénesis.[32] Figura 13.

Sistema de secreción de autotransportadoras (Tipo Va)

En 1987, Pohlner y colaboradores fueron los primeros en describir y proponer un modelo de secreción Tipo V. Mostraron la relación entre el gene que codifica la inmunoglobulina gonococal A1 (IgA1) y su producto extracelular. La secuencia de ADN de un fragmento clonado (4.6 Kb) mostró un gene que codifica para un precursor de la proteasa IgA1; el precursor contiene tres dominios funcionales: la región amino terminal (la cual se asume que inicia el transporte del precursor a través de la membrana interna), la proteasa extracelular IgA1, y un dominio carboxilo terminal (el cual es requerido para la

secreción a través de la membrana externa). Los autores proponen el concepto de que el precursor de la proteasa IgA1 contienen todos los determinantes necesarios para dirigir su translocación desde el periplasma hacia el medio sin la participación de proteínas accesorias. Por la falta de acoplamiento energético, por la falta de factores accesorios que son requeridos para la translocación en otros procesos y por su improbable inserción dentro de los sistemas de secreción I a IV, las proteínas que son secretadas por este proceso, reciben el nombre de autotransportadoras. Muchas proteínas que siguen esta vía de secreción han sido identificadas en un gran número de Gram-negativas. En general, las proteínas autotransportadoras consisten de tres dominios funcionales; la secuencia señal (también llamada péptido señal o secuencia líder), la cual está presente en la región amino terminal de la proteína, el siguiente es el dominio pasajero (también llamado dominio α), el cual confiere las funciones efectoras de varias autotransportadoras, y por último, el dominio principal, localizado en la región carboxilo terminal de la proteína, es la unidad de translocación, también es conocida como dominio β o dominio autotransportador. Consiste de una pequeña región de unión con una estructura secundaria α-hélice y un eje-β que adopta la estructura terciaria de β-barril cuando se encuentra embebida en la membrana externa, y con esto facilita la translocación del dominio pasajero a través de la misma por la formación un poro.[32]

Vía de secreción del doble compañero (Tipo Vb)

En esta vía de secreción, como en la vía de secreción de autotransportadoras, el dominio pasajero posee una secuencia señal que dirige su translocación a través de la membrana interna. Después de ser exportada dentro del periplasma, el dominio pasajero se inserta dentro de la membrana externa por el poro formado por el β-barril. Una vez en la superficie de la bacteria, el dominio pasajero puede sufrir proteólisis para conseguir su función fisiológica. Sin embargo, en contraste a la vía de las autotransportadoras, donde la proteína es producida como un polipéptido simple, el dominio pasajero o exoproteína y el dominio β formador del poro son traducidas como dos proteínas separadas. Son referidas como TpsA y TpsB respectivamente. A pesar de ciertas diferencias, esta vía de secreción comparte algunas

características con las autotransportadoras, por ejemplo, al examinar la secuencia señal de los miembros de la familia de las TpsA revelan que varias de estas proteínas poseen una inusual secuencia señal, la cual está altamente conservada con la secuencia señal de las autotransportadoras. También se ha encontrado similitud al realizar el análisis filogenético. Debido a estas diferencias y similitudes, varios autores han estado de acuerdo en que la vía de secreción del doble compañero esté agrupada dentro del SST5 y que sea identificada como un subgrupo.[32]

Tipo Vc

YadA de *Y. pestis* es el ejemplo tipo de esta vía. YadA posee seis diferentes dominios: i) una secuencia señal amino terminal, ii) una cabeza D, iii) cuello D, iv) tallo D, v) conector R y vi) una región carboxilo terminal. Recientes investigaciones estructurales han demostrado que la adhesina Hia de *H. influenzae* es una proteína trimérica que es secretadad de manera análoga a YadA. Este tipo de conformación trimérica y su modo de secreción han sido propuestos como un modelo alternativo del sistema de secreción de autotransportadoras y ha sido llamado Tipo Vc o vía AT-2.[32]

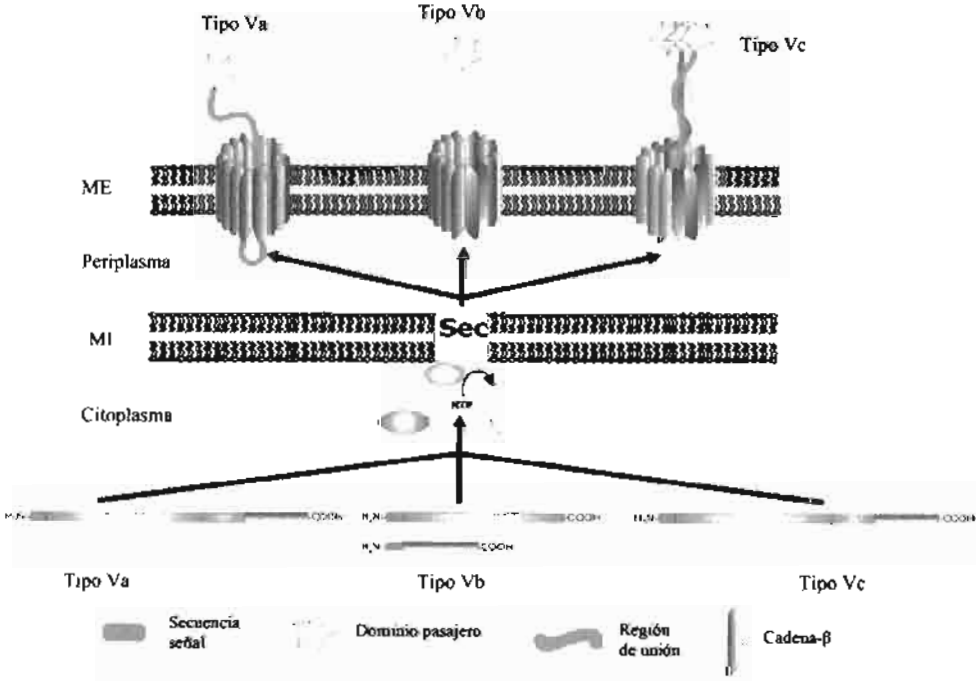


Figura 13. Esquema de los sistemas de secreción de tipo V. Se muestran los cuatro dominios funcionales de las proteínas; la secuencia señal, el dominio pasajero, la región de unión y el dominio β.[32]

Especies patógenas de *E. coli* son responsables de una variedad de enfermedades. Un factor común de estos organismos es la secreción de moléculas proteicas de alto peso molecular llamadas serin proteasa autotransportadoras de enterobacterias (SPATEs). Estas proteínas incluyen EspC de EPEC, EspP de EHEC, Pet de EAEC, Sat de UPEC, Tsh de *E. coli* patógena para aves, Pic de *Shigella flexneri* y EAEC, y SepA también de *S. flexneri.* Las SPATEs poseen un motivo GDSGS serin proteasa característico, el cual les permite tener la actividad de serin proteasas. Las proteínas SPATEs muestran una alta similitud entre sí (alrededor del 58% de identidad), lo que sugiere un origen común.[3]

Los miembros de la familia de las SPATEs son proteínas de *E. coli* y *Shigella* spp., son altamente inmunogénicas, y tal como la proteasa IgA1 y Hap (proteína de adhesión y penetración de *H. influenzae*), poseen el motivo serin proteasa característico.

En 1994, se describió una hemaglutinina sensible a temperatura (Tsh) en *E. coli* patógena para aves (APEC), la cual causa infecciones en esa población. Tiene un peso molecular de 104 kDa. El gene *tsh* está localizado en el plásmido ColV. La correlación entre la expresión de Tsh y su actividad de hemaglutinación es un fenómeno que se ve influenciado por la cepa, así como también por el medio ambiente. Tsh produce lesiones dentro de los sacos de aire de las aves. Recientemente, una proteína llamada proteasa de unión a hemoglobina (Hbp), fue caracterizada de una cepa de *E. coli* aislada de una herida causada por infección. Hbp es 99.9% idéntica a Tsh, encontrándose dos cambios en la secuencia de aminoácidos del dominio pasajero.[32]

Benjelloum-Touimi y colaboradores, en 1995 describieron un homólogo de Tsh al cual designaron SepA (proteína extracelular de *Shigella*). Investigaciones en una mutante *sepA* demostró la reducción en la habilidad para inducir daño a la mucosa e inflamación en el tejido al ser probado en un modelo con conejos.[29] SepA es una proteína que se encuentra de manera abundante en el sobrenadante de cultivos de *Shigella* spp., y está relacionada con la inflamación intestinal y la invasión al tejido.[3]

En 1996, Stein y colaboradores describieron EspC (proteína C secretada por EPEC), es la mayor proteína encontrada en los sobrenadantes de la cepa tipo de EPEC E2368/69.[32] Al ser probada sobre yeyuno de rata montado en cámaras de Ussing, EspC mostró actuar como una enterotoxina.[30] De manera interesante, genes homólogos para *espC* también existen en otras bacterias patogénicas que provocan la lesión A/E. La presencia de genes homólogos en cepas patogénicas causantes de la lesión A/E pero no en cepas no-patogénicas implica que EspC puede jugar un papel en la virulencia de los patógenos que causan dicha lesión. Esto puede ser posible ya que EspC es una proteína altamente inmunogénica. Investigaciones recientes han demostrado que la incubación de altas concentraciones de EspC con células epiteliales *in vitro* y bajo periodos prolongados, induce efectos citopáticos similares a los producidos por su homólogo Pet.[32]

En 1997, de manera casi simultánea, Brunder y colaboradores describen EspP (serin proteasa extracelular codificada en plásmido) y Djafari describe PssA (proteasa secretada por STEC) en EHEC O157:H7 y STEC O26:H- respectivamente. Estas proteínas son idénticas, están codificadas en un plásmido de virulencia, y representan la mayor proteína extracelular de ambos organismos.[32] EspP puede actuar como una cititoxina, causando disrupción de actina.[3]

Pet (toxina codificada en plásmido) es una enterotoxina termolábil que fue descrita como una proteína de 108 kDa codificada en el plásmido de virulencia de EAEC .[34] Diferentes estudios muestran que tiene efecto enterotóxico e induce acumulación de fluidos y efectos citotóxicos sobre la mucosa. Experimentos con órganos in vitro (IVOC) sobre la mucosa intestinal de humanos, demostraron que una mutante nula en el gene *pet* no se vio afectada en su habilidad para adherirse al tejido del colon, pero no fue capaz de provocar los cambios característicos sobre la mucosa observados en la cepa nativa.[35]

El gene de la toxina se encuentra localizado en el plásmido de virulencia de EAEC de 65 MDa (plásmido AA), y está agrupado dentro del locus de probables genes asociados a la virulencia.[8]

El mecanismo de acción específico de Pet sobre las células epiteliales todavía no ha sido bien elucidado, pero se ha observado que Pet causa disrupción de espectrina y fodrina (espectrina no-eritroide, la cual esta distribuida en la mayoría de los tipos celulares, incluyendo las células epiteliales), proteínas de la membrana que están conectadas con la actina citoplásmica. La degradación de fodrina podría explicar las alteraciones celulares y el desarrollo de diarrea causada por EAEC.[36]

Pic (proteína involucrada en la colonización intestinal) es otra proteasa integrante de la familia de las SPATEs que se identificó en EAEC, el gene *pic* se localizada en el cromosoma de EAEC.[34] Tiene un peso molecular de 116 kDa aproximadamente, el producto de *pic* es sintetizado como un precursor de 146.5 kDa, el cual es procesado en su región amino y carboxilo terminal durante la secreción, y libera la proteína madura dentro del sobrenadante de los cultivos celulares.[37] Los fenotipos identificados en Pic sugieren que está involucrada en las etapas tempranas de la patogénesis y de manera más probable promoviendo la colonización intestinal.[32] También se ha identificado un homólogo de Pic en cepas de *E. coli* uropatogénicas (UPEC), llamada PicU que muestra funciones similares con la ya reportada. Pic U muestra una identidad del 96% con su homólogo de EAEC.[38]

En el 2000, Guyer y colaboradores, identificaron y caracterizaron una proteína autotransportadora de 107 kDa designada Sat (Secreted auto transporters), la cual es secretada por la cepa UPEC CFT073, altamente virulenta aislada de sangre y orina de una mujer con pielonefritis aguda. El análisis de la región amino terminal de la proteína mostró homología con Pet y EspC, dos conocidas proteínas que pertenecen a la familia de las SPATEs. Sat exhibe actividad de serina proteasa, tiene actividad citopática sobre el riñón, la vejiga y otras líneas celulares. El gene *sat* está localizado en PAI II (Isla de patogenicidad II) de *E. coli* CFT073, es decir, Sat tiene localización cromosomal. Tanto el gene *sat* como la proteína producida, están ligadas a las cepas uropatogénicas que causan los síndromes clínicos de la pielonefritis aguda.[6]
En recientes estudios, se demostró que el gene *sat* tiene una alta prevalencia en cepas DAEC. Se reportó la expresión de Sat por la cepa DAEC FBC114

aislada de un niño con diarrea y mostró actividad enterotóxica y citotóxica al ser probada sobre tejido de íleon de conejo.[38]

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las diarreas son un problema de salud pública que afecta principalmente a la población infantil. Las infecciones por EAEC se han relacionado con cuadros de diarrea persistente y con sangre que por sus características favorecen la desnutrición de los niños que las presentan con las desventajas que esto representa.

Una toxina denominada Pet es un factor de virulencia de estas cepas de EAEC cuyos mecanismos de acción se han empezado a dilucidar tomando como modelo una cepa tipo aislada de un caso en Lima, Perú. En México, se aisló una cepa altamente virulenta de un niño que murió a consecuencia de la infección por la cepa EAEC denominada 049766. Ensayos en modelos con animal mostraron que la infección por esta bacteria ocasiona daño al epitelio intestinal con una reacción inflamatoria intensa. Los mismos ensayos utilizando la cepa EAEC de referencia O42 (O44:H18), mostraron que aunque dicha cepa provoca daño intestinal, las alteraciones observadas son menos intensas que las descritas en 049766. El objetivo del presente trabajo consistió en realizar la purificación de la toxina secretada por la cepa EAEC 049766 e identificación y secuenciación del gene involucrado en su expresión con el propósito de establecer si ésta es una variante de Pet SPATE identificada en la cepa EAEC de referencia O42.

HIPÓTESIS

La toxina secretada por la cepa EAEC 049776 es una variante de Pet serina proteasa identificada en la cepa tipo EAEC O42 (O44:H18), la cual tiene un efecto biológico más intenso que cepa tipo, determinado por las alteraciones inducidas por EAEC 049776 en un ensayo de infección en el modelo en ratón.

OBJETIVOS

Objetivo General.

Determinar si la proteína secretada por la cepa EAEC 049766 es una variante de la toxina Pet identificada en la cepa tipo EAEC O42, para desarrollar un método de detección específico de cepas productoras de esta nueva toxina.

Objetivos Particulares.

1.- Purificar la toxina variante a partir de cultivos celulares de la cepa de EAEC 049766.

2.- Por análisis Western blot y empleando anticuerpos anti-toxina Pet preparados en conejo, identificar la producción de la toxina variante en la cepa 049766.

3.- Secuenciar el extremo amino terminal de la toxina, y comparar la secuencia obtenida con la reportada para la cepa tipo O42.

4.- Aislar y purificar los plásmidos de las cepas de EAEC 049766 y O42.

5.- Diseñar iniciadores para identificar el gene de la toxina variante.

6.- Digerir con enzimas de restricción el plásmido de la cepa 049766 para elaborar un patrón de restricción.

7.- Identificar el gene que codifica para la toxina en los fragmentos de restricción empleando técnicas de PCR.

8.- Secuenciación del gene de la toxina presente en la cepa 049766.

9.- Posible clonación del fragmento deseado.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Cepas bacterianas. Se utilizó la cepa tipo EAEC O42 (serotipo O44:H18), aislada durante un estudio epidemiológico en Lima, Perú, en 1983.

Para determinar la producción de la toxina Pet, una clona hiperproductora (CEFN1) fue usada como control.

Cepa nativa EAEC 049766 (serotipo O?:H10), que fue aislada directamente del intestino de un niño muerto infectado durante un brote de diarrea en un hospital pediátrico de la ciudad de México.

Crecimiento de las cepas. Se obtuvieron para cada cepa cultivos de 3 litros en caldo Luria Bertani (LB, 10g/l de triptona, 5g/l de extracto de levadura, 5g/l de cloruro de sodio). Se incubaron a 37°C con agitación constante de 150 rpm durante 18 horas.

Extracción de toxinas. Los cultivos se centrifugaron a 10000 rpm (Centrífuga Beckman Coulter Avanti, Rotor JA-14 Beckman) durante 15 minutos a 4°C. Se desechó el sedimento y el sobrenadante fue colectado para la extracción de toxinas. La precipitación se llevó a cabo por la adición de 398g de sulfato de amonio (65% de saturación) por cada litro de cultivo. El sulfato de amonio fue adicionado en fracciones de 100g con agitación constante para lograr su disolución. Todo el proceso de precipitación se realizó a una temperatura de 4°C. Disuelto todo el sulfato de amonio, se observa la formación de un precipitado color café, el cual se dejó reposar durante 24 horas a 4°C. Concluido el tiempo de reposo, el precipitado se centrifugó a 15000 rpm (Rotor JA-14 Beckman) durante 20 minutos a 4°C. El sobenadante se desechó y el sedimento se recuperó en 10ml de amortiguador de fosfatos de sodio (Na_2HPO_4 9.5g/l y NaH_2PO_4 0.422g/l, pH 8.2). Esta solución se dializó primero contra agua destilada durante una noche y posteriormente contra el mismo amortiguador de fosfatos de sodio. Para verificar la ausencia de sales, se realizó una prueba con cloruro de bario (JT-Baker). Todo el tiempo de diálisis se llevó a cabo con agitación constante y a una temperatura de 4°C. El

dializado se centrifugó a 18000 rpm (Rotor JA-50) a 4°C, el sedimento se desechó y se colectó el sobrenadante. De este sobrenadante se tomó una alícuota de 1ml para la determinación de proteínas, mientras que el resto se colocó en microtubos de 1.5 ml para las siguientes pruebas.

Determinación de proteínas. La determinación de la concentración de proteínas se llevó a cabo por el método de Bradford[4], utilizando un reactivo comercial (Bradford Bio-Rad) y una curva de calibración hecha con albúmina sérica bovina (BSA, 1µg/ µl, Sigma) (Ver la Tabla 1.). La absorbancia de las muestras se realizó en un espectrofotómetro (Spectrophotometer Beckman Coulter, DU-650), a una longitud de onda de 580 nm.

Tabla 1. Determinación de proteínas. Método de Bradford.

Muestra	**µl de muestra**	**µl de agua desionizada**	**µl de reactivo de Bradford**
Clona Pet CFEN1	1	799	200
Toxina Variante EAEC 049766	1	799	200
BSA	0	800	200
BSA	2	798	200
BSA	4	796	200
BSA	6	794	200
BSA	8	792	200
BSA	10	790	200

Nota. Las muestras de las toxinas se realizaron por duplicado.

Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (PAGE-SDS). Para determinar la pureza y el peso molecular de la toxina variante, se corrió una electroforesis PAGE-SDS (Mini Protean III Bio-Rad) al 8% de concentración de poliacrilamida. (Tabla 2) Se corrieron muestras de 45 µg tanto

de la toxina variante como de la toxina Pet EAEC O42 junto con un marcador de peso molecular utilizado como referencia (MPM Bio-Rad No. de Cat. 161-0318). El gel se reveló con solución de azul de Coomassie (Bio-Rad).

Tabla 2. Preparación de gel de poliacrilamida 8%.

Gel Separador	
Concentración de gel	8%
Acrilamida/bis	2.66 ml
Tris-HCl 1.5 M pH 8.8	2.5 ml
Agua desionizada	4.67 ml
SDS 10% (dodecil sulfato sódico)	100 µl
PSA 10% (persulfato de amonio)	50 µl
Temed (tetra metil etil endiamina)	5 µl

Gel Concentrador	
Concentración de gel	4%
Acrilamida/bis	650 µl
Tris-HCl 0.5 M pH 6.8	1.25 ml
Agua desionizada	3.05 ml
SDS 10%	50 µl
PSA 10%	50 µl
Temed	10 µl

Nota. Las cantidades de reactivo están diseñadas para preparar dos geles de acrilamida.

Western Blot. Para probar la actividad antigénica de la toxina variante, se realizó una prueba de inmunotransferencia (Western Blot) con muestras de 10 µg de toxina 049766. Se transfirieron las proteínas de un gel de poliacrilamida (8%) a un papel de nitrocelulosa (NC) en una cámara de transferencia (Mini Transfer Bio-Rad, 250 mA durante 1 hora). Una vez transferidas las muestras del gel al papel de NC, este se lavó con amortiguador salino de fosfatos (PBS, NaCl 8g/l, KH_2PO_4 0.2g/l, Na_2HPO_4 1.15g/l, KCl 0.2 g/l, pH 7.2) y posteriormente se bloqueó durante una hora a temperatura ambiente con solución de PBS-leche descremada al 5%. Terminado el tiempo de bloqueo, la

membrana se lavó con el amortiguador. Se adicionó el primer anticuerpo diluido en PBS (suero anti-Pet O42 preparado en conejo 1:500). Se dejó incubando toda la noche a 4°C. Transcurrido el tiempo, la membrana de NC se lavó con solución de PBS-Tween 3% para retirar el exceso de anticuerpo. Se adicionó el segundo anticuerpo diluido en PBS-leche descremada 5% (Anti IgG de conejo marcado con peroxidasa. 1:5000. Sigma). Se dejó incubar durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente se recuperó el anticuerpo, la membrana se lavó con PBS-Tween 0.3%. Para concluir la prueba, la membrana se reveló utilizando como sustrato una solución de α-4-cloro naftol (Sigma).[40]

Aislamiento y purificación de plásmidos. La extracción de plásmidos de ambas cepas se realizó utilizando el procedimiento descrito en el equipo comercial Plasmid Mini Kit (Cat. No. 12125, QIAGEN).

Mapa de restricción. Se utilizó la enzima EcoRI (New England Bio Labs) para obtener un patrón de restricción y comparar los perfiles de los plásmidos extraídos, Tabla 3.

Tabla 3. Mezcla de reacción para la digestión de plásmido con enzima Eco RI.

Reactivos	Volumen
Plásmido	10 µl
Enzima EcoRI	1 µl
Amortiguador NEBuffer EcoRI	2 µl
Agua desionizada	7 µl
Volumen final	20 µl

Diseño de iniciadores. Tomando como base la secuencia reportada para la toxina Pet EAEC O42 (No. de Acceso AF056581) y la reportada para la toxina Sat de *E. coli* CFT073 (No. de Acceso AF289092), se diseñaron iniciadores con el fin de obtener la secuencia de la toxina variante de EAEC 049766. Los iniciadores utilizados se describen en la Tabla 4 y 4.1. Su localización dentro de su respectiva secuencia se muestra en la figura 14.

Tabla 4. Oligos específicos para la toxina Pet.

Iniciadores	Tamaño del producto	Secuencia
Universales F	249 pb	5' TGACTCTGCATGGATTGAGC 3'
Universales R		3' GACGCATCACTCAGTACAGT 5'
Pet DP548 F	548 pb	5' GTATCAAAAATGCCCCTCTGGTAA 3'
Pet DP548 R		3' ATTCGCCCCCTTGTGGATAGTCA 5'
Pet DP871 F	871 pb	5' CGGGATTATCTCGATCTGGC 3'
Pet DP871 R		3' GGTGACAGTGGATCAGGCGT 5'
Pet AT787 F	787 pb	5' TCTTCCTCCTTCATTTTATTCTAC 3'
Pet AT787 R		3' ATCAGCCCCTCTTGTTTCCACGAC 5'

Iniciadores diseñados sobre secuencia reportada de Pet EAEC O42.

Tabla 4.1. Oligos específicos para la toxina Sat.

Iniciadores	Tamaño del producto	Secuencia
Sat AT387 F	387 pb	5' ACTGGCGGACTCATTGCTGT 3'
Sat AT387 R		3' AACCCTGTAAGAAGACTGAG 5'
Sat AT3888 F	3888 pb	5' ATGAATAAAATATACTCCCTTAAAT 3'
Sat AT3888 R		3' TCAGAAAGAGTAACGGAAGTTG 5'
Sat AT3159 F	3159 pb	5' CATAACAAAAAGAACCCTCAG 3'
Sat AT3159 R		3' TACAGCACCGTAAACAAGTTC 5'
Sat DP203 F	203 pb	5' GTTCACAAATGGGGGAGATG 3'
Sat DP203 R		3' CGGGGCCTATTTTGTGTAAA 5'
Sat DP221 F	221 pb	5' AGGTGGCATCACTGCACATA 3'
Sat DP221 R		3' GACCCGGCGTTACAGTTTTA 5'

Iniciadores diseñados sobre secuencia reportada de Sat CFT073.

A) Secuencia Pet EAEC O42 y localización de iniciadores.

```
  1 tattcttcct ccttcatttt attctacttt ccatgtgaca tctcagatgg aagctcagat
 61 ggaacctgat aatgctcgta aatatgagca aaaaaaaaca aaaatgatta atttatgatc
121 aatcagcatt ggtttacatg acatcgtatc attaacgaga gcattgtcac acattaacaa
181 tatagaactg ttacttttta cgggatatta gtaacaaacc attactaatg gttttaattc
```

241 ttaatccttt gttcattcaa taaatgagtt gagagaatat atgaataaaa tatactccat
301 taaatatagt gctgccactg gcggactcat tgctgtttct gaattagcga aaaaagtcat
361 atgtaaaaca aaccgaaaaa tttctgctgc attattatct ctggcagtta ttagttatac
421 taatataata tatgccgcca atatggatat atctaaagca tgggcccggg attatctcga
481 tctggcacag aataaagggg tgtttcaacc aggttcaaca catgtaaaaa taaaactgaa
541 agacgggact gatttttcat ttccagcact tcctgttcct gacttttcat ctgcaaccgc
601 aaatggagct gcaacaagta ttggtggtgc ctatgccgta accgttgcac acaatgcaaa
661 aaataagtca tcagctaatt atcaaacata cggttctacg caatatactc aaataaacag
721 aatgacaact ggaaacgatt tttccattca gcgattaaac aagtatgtcg tggaaacaag
781 aggggctgat acatcattta attataatga gaacaaccaa aatattattg acagatatgg
841 cgtagacgtt ggaaatggaa aaaaagaaat cattggtttt cgtgttggtt caggaaacac
901 cactttttcc ggaataaaaa catcccaaac atatcaggct gacctgttaa gtgcatcact
961 attccatata acaaatttac gagcaaatac tgtcggaggt aacaaagtgg aatatgaaaa
1021 tgactcatat ttcactaact taaccactaa tggtgacagt ggatcaggcg tgtatgtatt
1081 tgataacaaa gaagataaat gggttctact tggaacaacc catggaataa tagggaacgg
1141 aaaaacgcaa aaaacatatg taacaccatt tgactccaaa accaccaatg aattaaagca
1201 actatttatt caaaatgtta atattgataa caatactgct accattggtg gtggtaagat
1261 aactattggc aatacaactc aagatatcga gaaaaataaa aataaccaga ataaagacct
1321 agtgttctct ggtggtggta aaatctcatt aaaagagaat cttgatcttg gatatggtgg
1381 gtttattttt gatgaaaata aaaaatatac tgttagcgct gaagggaata ataatgtcac
1441 ctttaaaggt gcaggcattg atataggtaa aggcagtact gttgactgga acatcaaata
1501 tgcctcaaat gatgcactgc ataaaattgg tgaagggagc cttaatgtca tacaggcaca
1561 gaatacgaat ctgaaaaccg ggaacgggac cgtcattctt ggcgcacaga aaacgttcaa
1621 caatatctat gtcgccggtg gcccgggcac agtacaactc aatgcagaga acgccctggg
1681 tgagggtgat tatgctggta tttttttcac tgaaaacggc ggaaaactcg acctgaatgg
1741 tcataaccag accttcaaaa aaattgctgc aacagattcc ggaaccacca tcactaacag
1801 taacaccact aaagagagtg tactgtcggt caataaccag aataactata tctatcatgg
1861 taatgtggac ggcaatgtac gccttgaaca tcacctcgac actaagcagg ataatgcccg
1921 cctgatactg gatggtgata ttcaggcaaa cagtatcagt atcaaaaatg cccctctggt
1981 aatgcagggc catgcgactg atcacgccat tttcagaaca acaaaaacaa ataattgtcc
2041 tgagttcctc tgtggtgttg actgggtcac cagaatcaaa aatgctgaga attcagtaaa
2101 tcagaagaat aaaaccacct ataaatcgaa taaccaggtt tccgatttgt cccagccgga
2161 ctgggaaacc agaaaattta gattcgacaa tctgaatatt gaagattcat cattatccat
2221 tgccagaaat gcagatgttg aaggtaacat ccaggctaaa aactctgtga taaatatcgg
2281 ggacaaaacg gcatatattg atctgtactc aggaaaaaat attaccggtg ccggattcac
2341 ctttcgtcag gacataaaaa gcggtgactc catcggtgaa agtaaattta ccgggggcat
2401 tatggcaaca gatggctcca tcagcatagg ggataaagcc attgtcacgc tgaacacggt
2461 ctcgtctctg gacagaacag cgctgactat ccacaagggg gcgaatgtta cggccagcag
2521 ttccctttc accaccagta acatcaaatc cggaggcgac ctgaccctga ctggcgcaac
2581 agaatcgacc ggggaaatca ctccgtcgat gttctatgct gcaggaggat atgaactgac
2641 ggaagacggg gctaacttta ccgccaaaaa tcaggcctct gtaaccggtg atattaaatc
2701 cgaaaaagca gcaaaacttt catttggctc cgctgacaag gataattctg ccacaagata
2761 ttcgcagttt gctctcgcga tgctggatgg ctttgatacg tcctatcagg gcagcattaa
2821 ggctgcacaa tccagccttg caatgaataa tgcgctctgg aaagtgaccg gcaattccga
2881 gttgaaaaaa ctgaactcca ccggcagtat ggtgctcttc aacggaggga aaaacatctt
2941 caatacactg actgtcgatg aactgacaac cagtaacagt gcctttgtga tgcgaaccaa
3001 tacacaacag gcagaccagt taattgttaa aaacaaactg gaaggtgcaa acaacctgct
3061 gttagtcgat tttattgaga aaaaaggaaa cgacaaaaac ggtctgaaca tcgatctggt
3121 taaggctcct gagaatacca gtaaggatgt cttcaaaact gaaacacaga ccattggttt
3181 cagtgatgta acccctgaaa ttaaacagca ggaaaaagat ggcaaatctg tctggacgct
3241 gaccgggtat aaaacggtgg caaatgctga tgctgcgaaa aaggcaacat cactgatgtc

```
3301 aggcggctat aaagccttcc ttgcagaggt caacaacctc aacaaacgta tgggtgatct
3361 gcgtgacatt aacggtgagg ccggtgcatg ggcccgtatc atgagtggaa ccgggtctgc
3421 cggcggtgga ttcagtgaca actacaccca cgttcaggtc ggtgcggata acaaacatga
3481 actcgatggc cttgacctct tcaccggggt gaccatgacc tataccgaca gccatgcagg
3541 cagtgatgcc ttcagtggtg aaacgaagtc tgtgggtgcc ggtctctatg cctctgccat
3601 gtttgagtcc ggagcatata tcgacctcat cggtaagtac gttcaccatg acaacgagta
3661 taccgcaact ttcgccggcc ttggcaccag agactacagc tcccactcct ggtatgccgg
3721 tgcggaagtc ggttaccgtt accatgtaac tgactctgca tggattgagc cgcaggcgga
3781 acttgtttac ggtgctgtat ccgggaaaca gttctcctgg aaggaccagg gaatgaacct
3841 caccatgaag gataaggact ttaatccgct gattgggcgt accggtgttg atgtgggtaa
3901 atccttctcc ggtaaggact ggaaagtcac agcccgcgcc ggccttggct accagtttga
3961 cctgtttgcc aacggtgaaa ctgtactgcg tgatgcgtcc ggtgaaaaac gtatcaaagg
4021 tgaaaaagac ggccgtatgc tcatgaatgt tggtctgaat gctgagattc gtgacaacgt
4081 acgctttggt cttgagtttg agaaatcggc atttggtaag tacaacgtgg ataacgccat
4141 caacgccaac ttccgttact ccttctgatg acaataaggg ccgcagacgc ggctcttaat
4201 tcagagctaa ccgggtat
```

B) Secuencia Sat de *E. coli* CFT073 y localización de iniciadores.

```
   1 atgaataaaa tatactccct taaatatagt gctgccactg gcggactcat tgctgtttct
     gaattagcga aaagagtttc tggtaaaaca aaccgaaaac ttgtagcaac aatgttgtct
 121 ctggctgttg ccggtacagt aaatgcagca aatattgata tatcaaatgt atgggcgaga
     gactatcttg atcttgcaca aaataaaggt attttccagc ccggagcaac agacgtaaca
 241 atcactttaa aaaacggaga taaattctct ttccataatc tctcaattcc ggatttttct
     ggtgcagcag cgagtggcgc agctaccgca ataggaggtt cttatagtgt tactgttgca
 361 cataacaaaa agaaccctca ggccgcagaa acccaggttt acgctcagtc ttcttacagg
     gttgttgaca gaagaaattc caatgatttt gagattcaga ggttaaataa atttgttgtg
 481 gaaacagtag gtgccacccc ggcagagacc aaccctacaa catattctga tgcattagaa
     cgctacggta tagtcacttc tgacggttca aaaaaaatca taggttttcg tgctggctct
 601 ggaggaacat catttattaa tggtgaatcc aaaatctcaa caaattcagc atatagccat
     gatctgttaa gtgctagtct atttgaggtc acccaatggg actcatacgg catgatgatt
 721 tataaaaatg ataaaacatt tcgtaatctt gaaatattcg gagacagcgg ctctggagca
     tacttatatg ataacaaact agaaaaatgg gtattagtcg gaacaaccca tggtattgcc
 841 agcgttaatg gtgaccaact gacatggata acaaaataca atgataaact ggttagtgag
     ttaaaagata cctatagtca taaaataaat ctgaatggca ataatgtaac cattaaaaac
 961 acagatataa cattacacca aaacaatgca gataccactg gtactcaaga aaaaataact
     aaagacaaag atattgtgtt cacaaatggg ggagatgtcc tgtttaagga taatttggat
1081 tttggtagcg gtggtattat ctttgacgaa ggccatgaat ataacataaa cggtcaggga
     tttacattta aaggagcagg aattgatatc ggaaaagaaa gcattgtaaa ctggaatgca
1201 ttgtattcca gtgatgatgt tttacacaaa ataggccccg gtactctgaa tgttcaaaaa
     aaacaggggg caaatataaa gataggtgaa ggaaatgtta ttcttaatga agaaggaaca
1321 tttaacaata tataccttgc aagcggaaat ggtaaggtaa tactaaataa agataattcc
     cttggcaatg atcaatatgc ggggatattt tttactaaac gtggtggtac gctagattta
1441 aatggacaca atcagacttt tactagaatt gccgccactg acgatggaac aacaataact
     aactcagata caacgaaaga agccgttctg gcaatcaata acgaagactc ctacatatat
1561 catgggaaca taaatggcaa tataaaacta acgcacaata ttaattctca ggataagaaa
     actaatgcaa aattaattct ggatggtagt gtcaacacaa aaaatgatgt tgaagtcagt
1681 aatgccagtc ttaccatgca aggccatgca acagagcatg caatattcag aagctcagcg
     aatcattgct ccctggtatt tctttgtgga acggactggg tcaccgtttt gaaagaaaca
1801 gagagttcat ataataaaaa attcaattct gattacaaaa gtaataatca gcagacctca
     tttgatcagc ctgactggaa aaccggggtg tttaaatttg atacattaca cctgaacaat
1921 gctgactttt caatatcacg caatgccaat gttgaaggaa atatatcagc aaataaatca
     gctatcacaa tcggcgataa aaatgtttac attgataatc ttgcagggaa aaatattact
2041 aataatggtt ttgacttcaa acaaactatc agtactaatc tatccatagg agaaactaaa
     tttacaggtg gcatcactgc acataacagc caaatagcca taggtgatca agctgtagtt
2161 acacttaatg gtgcaacctt tctggataat actcctataa gtatagataa aggagcaaaa
     gttatagcac aaaattccat gttcacaaca aaaggtattg atatctccgg tgaactgact
2281 atgatgggaa tccctgaaca gaatagtaaa actgtaacgc cgggtctcca ctacgctgct
     gatggattca ggctgagtgg tggaaatgca aatttcattg ccagaaatat ggcatctgtc
2401 accggaaata tttatgctga tgatgcagca accattactc tgggacagcc tgaaactgaa
     acaccgacta tatcgtctgc ttatcaggca tgggcagaga ctcttttgta tggctttgat
2521 accgcttatc gaggcgcaat aacagccccc aaagctacag ttagcatgaa taatgcgatc
     tggcatctaa atagccagtc atcaattaat cgtctagaaa caaaagacag tatggtgcgt
2641 tttactggtg ataatgggaa gtttacaacc cttacagtga acaaccttac tatagatgac
     agtgcatttg tgctgcgtgc aaatctggcc caagcagatc agcttgttgt caataaatcg
2761 ttgtctggta aaaacaacct tctgttagtc gacttcattg agaaaaatgg aaacagcaac
     ggactgaata tcgatctggt cagcgcacca aaaggaactg cagtagatgt ctttaaagct
```

```
2881 acgactcgga gtattggctt cagtgatgta acaccggtta tcgagcaaaa gaacgataca
     gacaaagcaa catggactct gatcggctat aaatctgtgg ccaacgccga tgcggctaaa
3001 aaggcaacat tactgatgtc aggcggctat aaagccttcc ttgctgaggt caacaacctt
     aacaaacgta tgggtgatct gcgtgacatt aacggtgagt ccggtgcatg ggcccgaatc
3121 attagcggaa ccgggtctgc cggcggtgga ttcagtgaca actacaccca cgttcaggtc
     ggtgcggata acaaacatga actcgatggc cttgacctct tcaccggggt gaccatgacc
3241 tataccgaca gccatgcagg cagtgatgcc ttcagtggtg aaacgaagtc tgtgggtgcc
     ggtctctatg cctctgccat gtttgagtcc ggagcatata tcgacctcat cggtaagtac
3361 gttcaccatg acaacgagta taccgcaact ttcgccggcc ttggcaccag agactacagc
     tcccactcct ggtatgccgg tgcggaagtc ggttaccgtt accatgtaac tgactctgca
3481 tggattgagc cgcaggcgga acttgtttac ggtgctgtat ccgggaaaca gttctcctgg
     aaggaccagg gaatgaacct caccatgaag gataaggact ttaatccgct gattgggcgt
3601 accggtgttg atgtgggtaa atccttctcc ggtaaggact ggaaagtcac agcccgcgcc
     ggccttggct accagtttga cctgtttgcc aacggtgaaa ccgtactgcg tgatgcgtcc
3721 ggtgagaaac gtatcaaagg tgaaaaagac ggtcgtatgc tcatgaatgt tggtctcaac
     gccgaaattc gcgataatct tcgcttcggt cttgagtttg agaaatcggc atttggtaaa
3841 tacaacgtgg ataacgcgat caacgccaac ttccgttact ctttctga
```

Figura 14. A) Iniciadores diseñados sobre Pet EAEC O42. B) Iniciadores diseñados sobre Sat de *E. coli* CFT073.

Secuencia de ADN. La secuencia de ADN del gene de la toxina variante fue obtenida por la secuenciación de productos de PCR utilizando distintos iniciadores para tener productos con diferentes amplificados. Los reactivos empleados se enlistan en la Tabla 5. Se usó un equipo comercial para PCR (Taq PCR Core Kit, Cat. No. 2012223, QIAGEN Inc., Valencia CA., USA.). Las condiciones de la reacción de PCR en el termociclador se detallan en la Tabla 5.

Tabla 5. Mezcla de reacción para prueba de PCR.

Reactivos	Volumen final
Amortiguador 10X (QIAGEN)	10 µl
dNTPs (2mM) (QIAGEN)	10 µl
Oligo F (25pg/ µl)	2 µl
Oligo R (25pg/µl)	2 µl
DNA (Plásmido)	1 µl
Taq polimerasa (QIAGEN)	1 µl
Agua desionizada	74µl
Volumen Final	100 µl

Nota. Mezcla de reacción general. La cantidad de ADN y agua pueden variar.

Condiciones de reacción para prueba de PCR.

Paso	Temperatura	Tiempo
1	94°C	4 min.
2	94°C	1 min.

3	55°C	1 min.
4	72°C	1 min. por Kb
5	Repetición desde paso 2 durante 29 ciclos.	
6	72°C	5 min.
7	4°C	Pausa

Nota. El tiempo de extensión se modificó dependiendo el tamaño del producto esperado.

Gradiente en cloruro de cesio (CsCl). A pesar de que el ADN plasmídico se extrajo y se purificó mediante equipos comerciales (QIAGEN) ya estandarizados, la contaminación por ADN cromosomal estuvo presente. Para eliminar esta contaminación, el plásmido de la cepa EAEC 049766 se sometió a un gradiente de cloruro de cesio (CsCl) (Sigma). En un tubo cónico de 50 ml se prepararon 15 ml de solución de CsCl en amortiguador TE (10-1mM) (10.8g de cloruro de cesio/10 ml de amortiguador TE (1ml de solución Tris-HCl 1M y 200µl de solución de etilen diamino tetra acético (EDTA) 0.5M en 100 ml de agua desionizada). Se adicionó bromuro de etidio (10mg/ml) a la solución CsCl-TE (800µl/10ml de solución). Dentro de esta mezcla se agregó todo el plásmido extraído en el Midi Prep (QIAGEN). Con ayuda de una pipeta Pasteur se pasó la mezcla completa a un tubo Beckman (16 x 76 mm) Quick Seal 65 Ti. Una vez que se ha terminado de llenar el tubo con la solución, este fue sellado mediante calor utilizando el equipo Sealing Quick Seal. Después de formar el sello, el tubo se colocó dentro del rotor vertical VTi 65.1 (No. de serie 845, Beckman). El rotor se cerró a una presión de 120 pulgadas por libra con un torquímetro (Torque Wrench). La muestra se centrifugó a 55000 rpm durante 20 horas con una temperatura de 20°C (Ultracentrifuga Beckman). Después de la centrifugación, el tubo se colocó en un soporte universal y con una lámpara de luz UV se verificó la formación del gradiente y la separación del ADN plasmídico y cromosomal. Con una jeringa se hizo un orificio en la banda correspondiente al plásmido y se extrajo del tubo teniendo cuidado de no volver a contaminar el ADN. La muestra se colocó en un tubo de vidrio y se extrajo con 1 volumen de butanol saturado para retirar el bromuro de etidio. La mezcla

se agitó y se dejó reposar hasta la formación de dos fases, la fase orgánica (fase color rosa) se desechó. Este paso se repitió hasta obtener dos fases claras. La fase acuosa se recolectó y se precipitó el ADN por la adición de 6 volumenes de etanol y 2 volumenes de agua. Esta mezcla se dejó en congelación (-20°C) durante toda la noche. Después de esta incubación, el precipitado se centrifugó a 15000 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante fue desechado por decantación y se hizo un lavado con etanol al 70%. Se centrifugó a 15000 rpm durante 20 minutos. Se desechó el etanol y el sedimento se resuspendió en 500µl de agua desionizada.

Secuenciación de aminoácidos y nucleotídica. La secuenciación del extremo amino terminal de la proteína purificada se realizó en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UNAM, fue hecha por degradación de Edman en un secuenciador automático de proteínas en fase gaseosa (LF3000, Beckman Instruments Inc, Fullerton, California, USA).

Los productos de PCR fueron purificados (PCR Purification Kit QIAGEN, Cat. No. 28104) y secuenciados en un secuenciador automático ABI Prism 3100 Genetic Analayzer (Foster City, CA., USA), en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

RESULTADOS

Después de purificar la toxina de la cepa EAEC 049766 y de la clona hiperproductora de Pet, se determinó la concentración de proteínas obteniendo los siguientes resultados:

Proteína	Concentración
Toxina Pet (CFEN1)	10.05 µg/µl
Toxina Variante Pet EAEC 049766	9.34 µg/µl

En la electroforesis PAGE-SDS al 8% con muestras de la toxina de EAEC O42 y 049766, el gel muestra una banda correspondiente al peso esperado (107-108 KDa aproximadamente) para la toxina. El peso molecular se determinó mediante el programa de computación GeneTools. Figura 15.

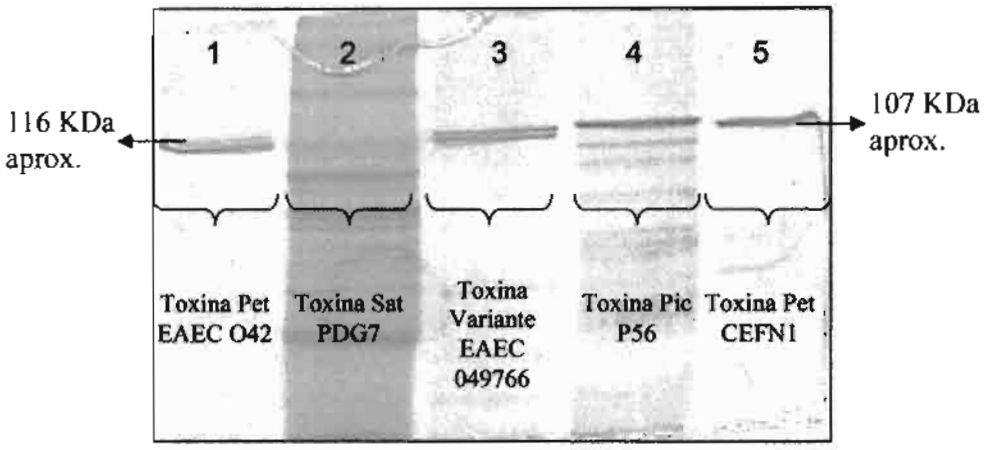


Figura 15. Electroforesis PAGE-SDS 8%. 1) Toxina Pet EAEC O42, 2) Toxina Sat (PDG7), 3) Toxina Variante EAEC 049766, 4) Toxina Pic (P56) y 5) Toxina Pet (CEFN1). Se incluye como control las clonas hiperproductoras de Sat (PDG7), Pet (CEFN1) y Pic (P56).

En la prueba de inmunotransferencia se encontró que la toxina variante EAEC 049766 es reconocida por el suero anti-Pet EAEC O42. También la toxina Pic es reconocida por el suero anti-Pet. El peso molecular se determinó por el programa GeneTools. Figura 16.

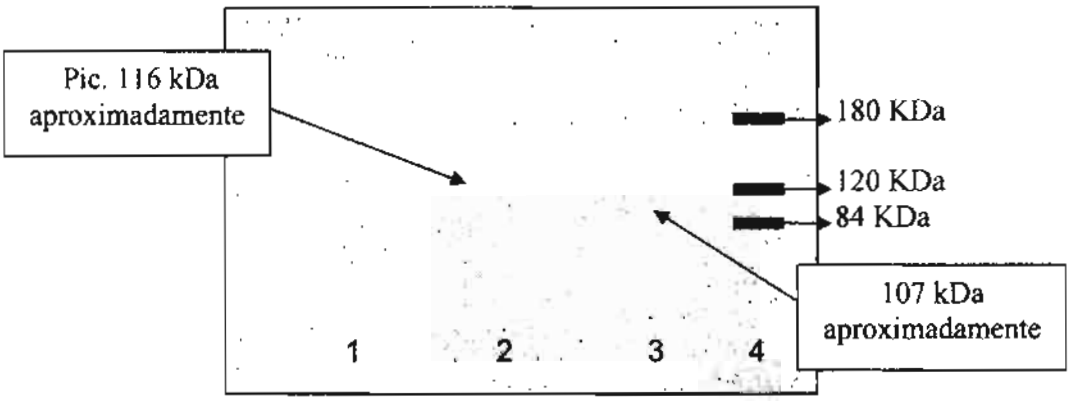


Figura 16. Inmunotransferencia. Prueba cruzada de toxina variante identificada con suero anti-Pet O42. 1) Toxina Variante EAEC 049766, 2) Toxina Pic (P56), 3) Toxina Pet (CEFN1), 4) MPM.

La secuencia del extremo amino terminal de la toxina variante mostró diferencias con respecto a la secuencia reportada de Pet EAEC O42. Con la secuencia de la proteína total obtenida por la técnica de degradación de Edman, se demostró que la toxina de EAEC 049766 no es una variante de la toxina Pet O42, sino que se trataba de una variante de Sat, otra proteína que forma parte de la familia de las SPATEs, la cual ha sido descrita con localización cromosomal e identificada en cepas UPEC y DAEC.[6, 39]

Toxina Variante EAEC 049766 AN I DIS NV WARDYLDLAQNK
Toxina Pet EAEC O42 AN M DIS KA WARDYLDLAQNK

Aminoácido Pet O42		Aminoácido Toxina variante 049766	
M	Metionina	I	Isoleucina
K	Lisina	N	Asparagina
A	Alanina	V	Valina

Con el objeto de determinar la localización de la toxina variante, se hizo la extracción del plásmido de ambas cepas (EAEC O42 y 049766). La comparación de sus perfiles se realizó mediante un patrón de restricción

utilizando la enzima EcoRI. En los resultados de la restricción, los perfiles muestran diferencias en cuanto a los cortes realizados por la enzima. Figura 17.

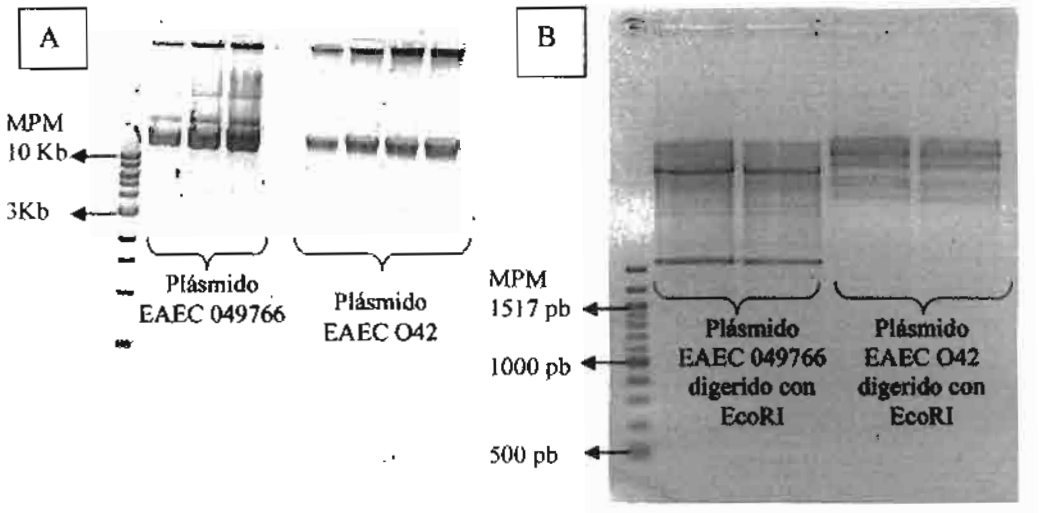


Figura 17. Mapa de restricción de Plásmido EAEC 049766 y EAEC O42. A) Plásmidos purificados de las cepas EAEC 049766 y O42. B) Mapa de restricción del plásmido 049766 comparado con la restricción del plásmido O42 con enzima EcoRI.

Cada uno de los fragmentos obtenidos en el mapa de restricción del plásmido EAEC 049766 se purificó y se utilizó como templado en una prueba de PCR utilizando los iniciadores universales. El amplificado esperado (249 pb) se identificó en un fragmento de 3Kb. El producto de PCR se purificó y se secuenció. La secuencia mostró ser idéntica a la reportada en la toxina Pet O42. Figura 18.

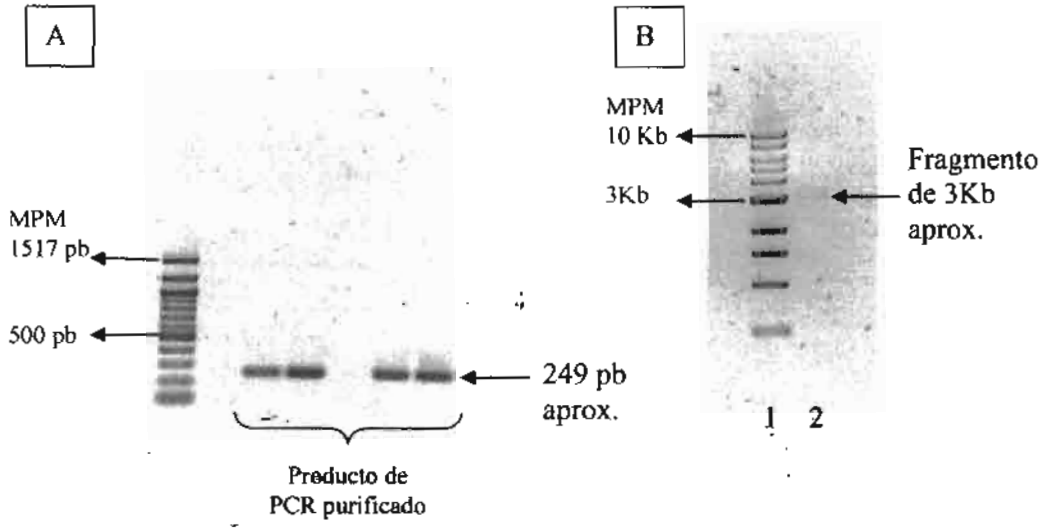


Figura 18. PCR con oligos Universales. A) Producto amplificado (249 pb) con inicidores universales sobre un fragmento de 3 Kb identificado en el mapa de restricción de EAEC 049766. B) 1.- MPM 1Kb. 2.- Fragmento de 3 Kb purificado.

Como en un principio se sospechaba que se trataba de una variante de Pet, los iniciadores fueron diseñados sobre la secuencia reportada de Pet O42. Sin embargo, los iniciadores que fueron diseñados sobre el extremo amino terminal de la secuencia reportada de Pet no mostraron productos de amplificación al ser utilizados sobre el plásmido de la cepa 049766.

Con estos resultados, se hizo un BLAST de aminoácidos del producto que se obtiene con los oligos Universales (diseñados sobre el extremo carboxilo terminal de Pet O42), encontrándose que estos oligos reconocen a la mayoría de las toxinas que pertenecen a la familia de las SPATEs por estar diseñados sobre una región altamente conservada en esa familia.

El alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la toxina Pet EAEC O42 mostró una identidad del 65% con la secuencia reportada de Sat CFT073. Figura 19

```
Sat UPEC    1       MNKIYSLKYSAATGGLIAVSELAKRVSGKTNRKLVATMLSLAVAGTVN---AANIDISNV  57
                    MNKIYS+KYSAATGGLIAVSELAK+V  KTNRK+ A +LSLAV    N   AAN+DIS
Pet O42Sbjct  1     MNKIYSIKYSAATGGLIAVSELAKKVICKTNRKISAALLSLAVISYTNIIYAANMDISKA  60
              58    WARDYLDLAQNKGIFQPGATDVTITLKNGDKFSFHNLSIPDFSGAAASGAATAIGGSYSV  117
                    WARDYLDLAQNKG+FQPG+T V I LK+G  FSF  L +PDFS A A+GAAT+IGG+Y+V
              61    WARDYLDLAQNKGVFQPGSTHVKIKLKDGTDFSFPALPVPDFSSATANGAATSIGGAYAV  120
              118   TVAHNKKNPQAAETQVYAQSSYRVVDRRNS-NDFEIQRLNKFVVETVGATPAETNPTTYS  176
                    TVAHN KN  +A  Q Y  + Y  ++R  + NDF IQRLNK+VVET GA  +
              121   TVAHNAKNKSSANYQTYGSTQYTQINRMTTGNDFSIQRLNKYVVETRGADTSFNYNENNQ  180
              177   DALERYGIVTSDGSKKIIGFRAGSGGTSFINGESKISTNSAYSHDLLSASLFEVTQWDSY  236
                    + ++RYGI   +G K+IIGFR GSG T+F    S I T+  Y  DLLSASLF +T   +
              181   NIIDRYGVDVGNGKKEIIGFRVGSGNTTF----SGIKTSQTYQADLLSASLFHITNLRAN  236
              237   GM----MIYKNDKTFRNLEIFGDSGSGAYLYDNKLEKWVLVGTTHGIASVNGDQLTWITK  292
                     +    + Y+ND  F NL   GDSGSG Y++DNK +KWVL+GTTHGI      Q T++T
              237   TVGGNKVEYENDSYFTNLTTNGDSGSGVYVFDNKEDKWVLLGTTHGIIGNGKTQKTYVTP  296
              293   YNDKLVSELKDTYSHKINLNGNNVTIKNTDITLHQNNADTTGTQEKITKDKDIVFTNGGD  352
                    ++ K  +ELK  +   +N++ N  TI    IT+     D    + K  ++KD+VF+ GG
              297   FDSKTTNELKQLFIQNVNIDNNTATIGGGKITIGNTTQDIE--KNKNNQNKDLVFSGGGK  354
              353   VLFKONLDFGSGGIIFDEGHEYNINGQG---FTFKGAGIDIGKESIVNWNALYSSDDVLH  409
                    +  K+NLD G GG IFDE  +Y ++ +G    TFKGAGIDIGK S V+WN  Y+S+D LH
              355   ISLKENLDLGYGGFIFDENKKYTVSAEGNNNVTFKGAGIDIGKGSTVDWNIKYASNDALH  414
              410   KIGPGTLNVQKKQGANIKIGEGNVILNEEGTFNNIYLASGNGKVILNKDNSLGNDQYAGI  469
                    KIG G+LNV + Q  N+K G G VIL  + TFNNIY+A G G V LN +N+LG   YAGI
              415   KIGEGSLNVIQAQNTNLKTGNGTVILGAQKTFNNIYVAGGPGTVQLNAENALGEGDYAGI  474
```

```
.    ------------------------------------------------------------ 529
     FFT+ GG LDLNGHNQTF +IAATD GTTITNS+TTKE+VL+-NN+++YIYHGN++GN++
475  FFTENGGKLDLNGHNQTFKKIAATDSGTTITNSNTTKESVLSVNNQNNYIYHGNVDGNVR 534
530  LTHNINSQDKKTNAKLILDGSVNTKNDVEVSNASLTMQGHATEHAIFRSSANHCSLVFLC 589
     L H++++  K+ NA+LILDG +   N + + NA L MQGHAT+HAIFR++  +    FLC
535  LEHKLDT--KQDNARLILDGDIQA-NSISIKNAPLVMQGHATDHAIFRTTKTNNCPEFLC 591
590  GTDWVTVLKETESSYNKKFNSDYKSNNQQTSFDQPDWKTGVFKFDTLHLNNADFSISRNA 649
     G DWVT +K  E+S N+K  + YKSNNQ +   QPDW+T  F+FD L++ ++  SI+RNA
592  GVDWVTRIKNAFNSVNQKNKTTYKSNNQVSDLSQPDWETRKFRFDNLNIEDSSLSIARNA 651
650  NVEGNISANKSAITIGDKNVYIDNLAGKNITNNGFDFKQTISTNLSIGETKFTGGITAHN 709
     +VEGNI A  S I IGDK  YID  +GKNIT  GF F+Q I +  SIGE+KFTGGI A +
652  DVEGNIQAKNSVINIGDKTAYIDLYSGKNITGAGFTFRQDIKSGDSIGESKFTGGIMATD 711
710  SQIAIGDQAVVTLNGATFLDNTPISIDKGAKVIAQNSMFTTKGIDISGELTMMGIPEQNS 769
       I+IGD+A+VTLN  + LD T ++I KGA V A +S+FTT  I   G+LT+ G  E
712  GSISIGDKAIVTLNTVSSLDRTALTIHKGANVTASSSLFTTSNIKSGGDLTLTGATESTG 771
770  KTVTPGLHYAADGFRLSGGNANFIARNMASVTGNIYADDAATITLGQPETETPTISSAYQ 829
     + +TP + YAA G+ L+   ANF A+N ASVTG+I ++ AA ++ G  + +    ++ Y
772  E-ITPSMFYAAGGYELTEDGANFTAKNQASVTGDIKSEKAAKLSFGSADKDNS--ATRYS 828
830  AWAETLLYGFDTAYRGAITAPKATVSMNNAIWHLNSQSSINRLETKDSMVRFTGDNGKFT 889
      +A  +L GFDT+Y+G+I A ++++MNNA+W +   S + +L +  SMV F G    F
829  QFALAMLDGFDTSYQGSIKAAQSSLAMNNALWKVTGNSELKKLNSTGSMVLFNGGKNIFN 888
890  TLTVNNLTIDDSAFVLRANLAQADQLVVNKSLSGKNNLLLVDFIEKNGN-SNGLNIDLVS 948
     TLTV+ LT  +SAFV+R N  QADQL+V   L G NNLLLVDFIEK GN  NGLNIDLV
889  TLTVDELTTSNSAFVMRTNTQQADQLIVKNKLEGANNLLLVDFIEKKGNDKNGLNIDLVK 948
949  APKGTAVDVFKATTRSIGFSDVTPVIEQKNDTDKATWTLIGYKSVANADAAKKATLLMSG 1008
     AP+ T+ DVFK  T++IGFSDVTP I+Q+    K+ WTL GYK+VANADAAKKAT LMSG
949  APENTSKDVFKTETQTIGFSDVTPEIKQQEKDGKSVWTLTGYKTVANADAAKKATSLMSG 1008
1009 GYKAFLAEVNNLNKRMGDLRDINGESGAWARIISGTGSAGGGFSDNYTHVQVGADNKHEL 1068
     GYKAFLAEVNNLNKRMGDLRDINGE+GAWARI+SGTGSAGGGFSDNYTHVQVGADNKHEL
1009 GYKAFLAEVNNLNKRMGDLRDINGEAGAWARIMSGTGSAGGGFSDNYTHVQVGADNKHEL 1068
1069 DGLDLFTGVTMTYTDSHAGSDAFSGETKSVGAGLYASAMFESGAYIDLIGKYVHHDNEYT 1128
     DGLDLFTGVTMTYTDSHAGSDAFSGETKSVGAGLYASAMFESGAYIDLIGKYVHHDNEYT
1069 DGLDLFTGVTMTYTDSHAGSDAFSGETKSVGAGLYASAMFESGAYIDLIGKYVHHDNEYT 1128
1129 ATFAGLGTRDYSSHSWYAGAEVGYRYHVTDSAWIEPQAELVYGAVSGKQFSWKDQGMNLT 1188
     ATFAGLGTRDYSSHSWYAGAEVGYRYHVTDSAWIEPQAELVYGAVSGKQFSWKDQGMNLT
1129 ATFAGLGTRDYSSHSWYAGAEVGYRYHVTDSAWIEPQAELVYGAVSGKQFSWKDQGMNLT 1188
1189 MKDKDFNPLIGRTGVDVGKSFSGKDWKVTARAGLGYQFDLFANGETVLRDASGEKRIKGE 1248
     MKDKDFNPLIGRTGVDVGKSFSGKDWKVTARAGLGYQFDLFANGETVLRDASGEKRIKGE
1189 MKDKDFNPLIGRTGVDVGKSFSGKDWKVTARAGLGYQFDLFANGETVLRDASGEKRIKGE 1248
1249 KDGRMLMNVGLNAEIRDNLRFGLEFEKSAFGKYNVDNAINANFRYSF  1295
     KDGRMLMNVGLNAEIRDN+RFGLEFEKSAFGKYNVDNAINANFRYSF
1249 KDGRMLMNVGLNAEIRDNVRFGLEFEKSAFGKYNVDNAINANFRYSF  1295
```

Figura 19. Alineamiento de secuencia Sat CFT073 con secuencia Pet EAEC O42.

Se realizó una prueba de PCR sobre el ADN plasmídico y cromosomal de EAEC 049766 con los iniciadores Sat AT387 (Tabla 4), diseñados sobre el extremo amino terminal de la secuencia reportada. El resultado del PCR mostró el amplificado esperado tanto en el ADN plasmídico como en el cromosomal. El producto obtenido (387 pb) se secuenció. Figura 20.

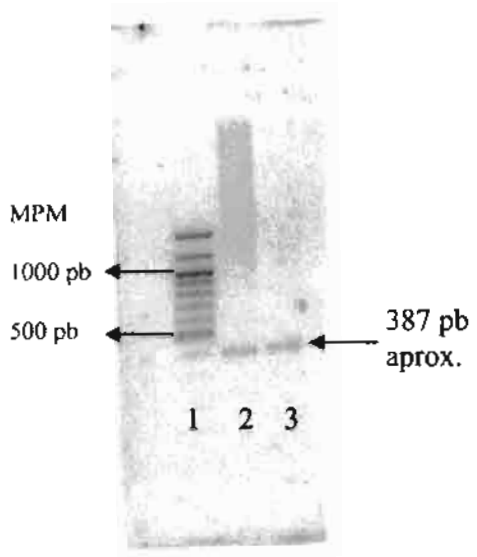


Figura 20. PCR con oligos Sat AT387. Se muestra la amplificación de 387 pb tanto en el ADN plasmídico (2) como en el ADN cromosomal (3).

Para obtener la secuencia de nucleótidos completa del gene de la toxina variante, se realizaron pruebas de PCR utilizando combinaciones de los iniciadores diseñados para Sat con el fin de obtener productos de mayor tamaño para secuenciar. Tabla 6 y Figura21.

Combinación de Iniciadores	**Tamaño del Producto**
Sat DP221 F Sat AT3159 R	1723 pb
Sat AT3159 F Sat DP221 R	1966 pb
Sat DP203 F Sat AT3159 R	2482 pb

Tabla 6. Productos de PCR obtenidos por combinación de iniciadores y que fueron secuenciados.

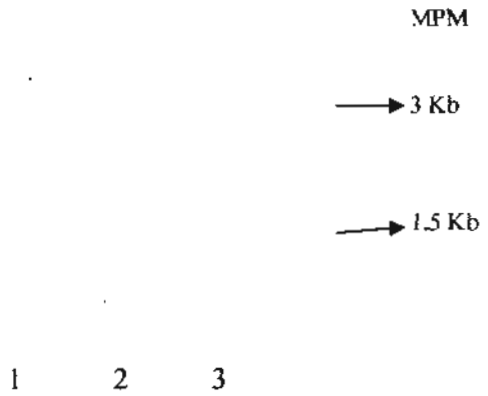


Figura 21. Productos purificados obtenidos por PCR. 1) Amplificado de 1723 pb. 2) 1966 pb y 3) 2482 pb. Todos los productos fueron secuenciados.

Durante este trabajo, todas las pruebas se realizaron sobre ADN plasmídico, sin embargo, el gene *sat* sólo está descrito para cepas UPEC y DAEC con localización cromosomal. A partir de esto, se pensó que el plásmido de la cepa 049 podría estar contaminado con ADN cromosomal. Para comprobar o desechar esta idea, se realizó un gradiente de cloruro de cesio que permitió tener plásmido sin ninguna contaminación cromosomal. Figura 22.

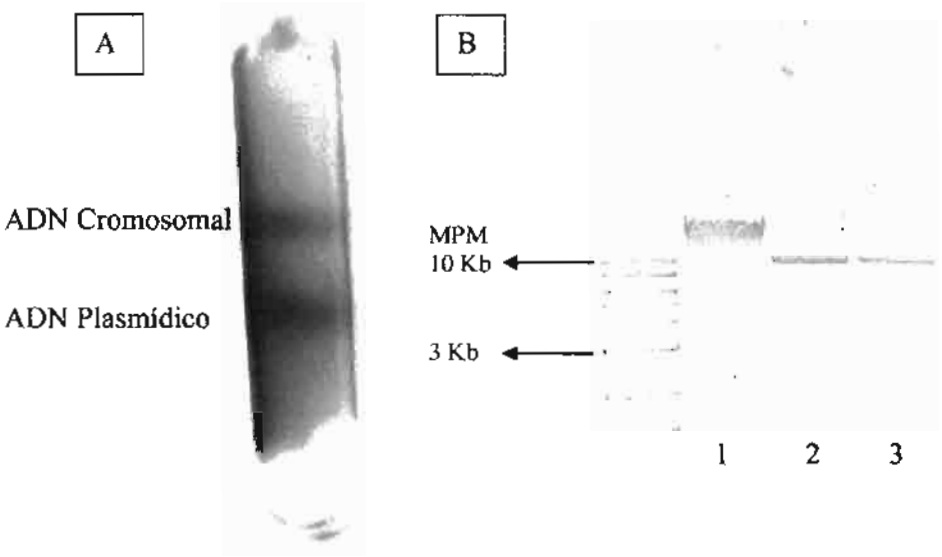


Figura 22. Purificación por gradiente de cloruro de cesio. A) Fotografía de gradiente de CsCl, se observa la separación del ADN plasmídico y cromosomal. B) 1.- ADN cromosomal EAEC 049766. 2.- ADN plasmídico contaminado EAEC 049766. 3.- ADN plasmídico purificado EAEC 049766 (CsCl).

Con una prueba de PCR se verificó si el gene de la toxina variante de Sat se encontraba en el plásmido purificado de EAEC 049766 obtenido del gradiente. Los resultados de la prueba mostraron que la variante de la toxina Sat no se encuentra en el ADN plasmídico de EAEC, sin embargo, al probar los oligos universales sobre el plásmido purificado de la cepa 049766, se obtiene un amplificado que corresponde al esperado (249pb), lo que indica que existe una toxina autotransportadora (SPATE) en el plásmido que requerirá ser identificada en posteriores estudios. Figura 23.

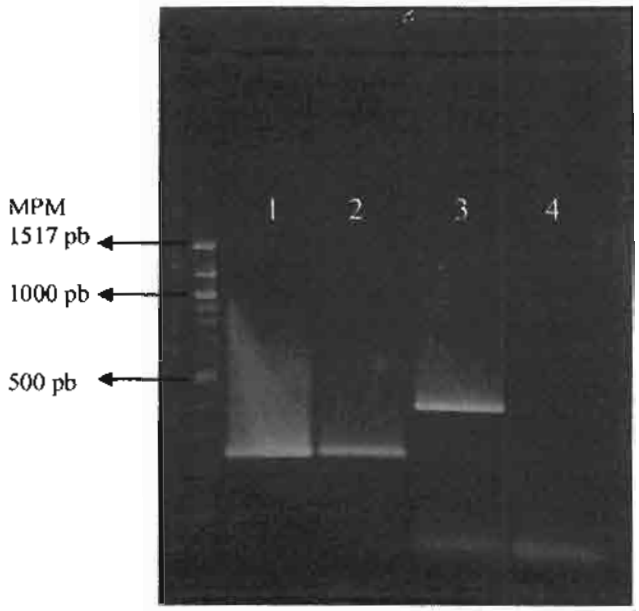


Figura 23. PCR con iniciadores Universales y Sat AT387. 1) PCR sobre plásmido EAEC 049766 contaminado (iniciadores universales, producto de 249 pb). 2) PCR sobre plásmido purificado EAEC 049766 (iniciadores universales, 249pb). 3) PCR sobre plásmido EAEC 049766 contaminado (iniciadores Sat AT387, producto de 387 pb). 4) PCR sobre plásmido purificado de EAEC 049766 (iniciadores Sat AT387, 387 pb). Se observa que no hay amplificación con oligos específicos de Sat en el plásmido purificado, corroborando su localización cromosomal, sin embargo, se identificó un amplificado con los oligos Universales, lo que indica la presencia de una toxina autotransportadora dentro del plásmido de EAEC 049766.

Se obtuvo la secuencia completa de nucleótidos de la toxina variante de Sat EAEC 049766. Con el programa de computación TranslationTools se obtuvo la secuencia de aminoácidos de la toxina variante. Al ser comparada con la secuencia de la toxina Sat CFT073 se encontraron 14 cambios con respecto a la secuencia reportada: 8 cambios de una sola base que codifican para el mismo aminoácido y 6 cambios de una sola base que codifican para un aminoácido diferente. Esta secuencia será integrada al GenBank para que se le asigne un número de uso. Figura 24.

A

```
   1 atgaataaaa tatactccct taaatatagt gctgccactg gcggactcat tgctgtttct
  61 gaattagcga aaagagtttc tggtaaaaca aaccgaaaac ttgtagcaac aatgttgtct
 121 ctggctgttg caggtacagt aaatgcagca aatattgata tatcaaatgt atgggcgaga
 181 gactatcttg atcttgcaca aaataaaggt attttccagc ccggagcaac agacgtaaca
 241 atcactttaa aaaacggaga taaattctct ttccataatc tctcaattcc ggatttttct
 301 ggtgcagcag cgagtggcgc agctaccgca ataggaggtt cttatagtgt tactgttgca
 361 cataacaaaa agaaccctca ggccgcagaa actcaggttt acgctcagtc ttcttacagg
 421 gttgttgaca gaagaaattc caatgatttt gagattcaga ggttaaataa atttgttgtg
 481 gaaacagtag gtgccacccc ggcagagacc aaccctacaa catattctga tgcattagaa
 541 cgctacggta tagtcacttc tgacggttca aaaaaaatca taggttttcg tgctggctct
 601 ggaggaacat catttattaa tggtgaatcc aaaatctcaa caaattcagc atatagccat
 661 gatctgttaa gtgctagtct atttgaggtc acccaatggg actcatacgg catgatgatt
 721 tataaaaatg ataaaacatt tcgtaatctt gaaatattcg gagacagcgg ctctggagca
 781 tacttatatg ataacaaact agaaaaatgg gtattagtcg gaacaaccca tggtattgcc
 841 agcgttaatg gtgaccaact gacatggata acaaaataca atgataaact ggttagtgag
 901 ttaaaagata cctatagcca taaaataaat ctgaatggca ataatgtaac cattaaaaac
 961 acagatataa cattacatca aaacaatgca gataccactg gtactcaaga aaaaataact
1021 aaagacaaag atattgtgtt cacaaatggg ggaaatgtcc tgtttaagga taatttggat
1081 tttggtagcg gtggtattat ctttgacgaa ggccatgaat ataacataaa cggtcaggga
1141 tttacattta aaggagcagg aattgatatc ggaaaagaaa gcattgtaaa ctggaatgca
1201 ttgtattcca gtgatgatgt tttacacaaa ataggccccg gtactctgaa tgttcaaaaa
1261 aaacaggggg caaatataaa gataggtgaa ggaaatgtta ttcttaatga agaaggaaca
1321 tttaacaata tataccttgc aagcggaaat ggtaaggtaa tactaaataa agataattcc
1381 cttggcaatg atcaatatgc ggggatattt tttactaaac gtggtggtac gctagattta
1441 aatggacaca atcagacttt tactagaatt gccgccactg acgatggaac aacaataact
1501 aactcagata caacgaaaga agccgttctg gcaatcaata acgaagactc ctacatatat
1561 catgggaaca taaatggcaa tataaaacta acgcacaata ttaattctca ggataagaaa
1621 actaatgcaa aattaattct ggatggtagt gtcaacacaa aaaatgatgt tgaagtcagt
1681 aatgccagtc ttaccatgca aggccatgca acagagcatg caatattcag aagcacagcg
1741 aatcattgct ccctggtatt tctttgtgga acggactggg tcaccgtttt gaaagaaaca
1801 gagagttcat ataataaaaa gttcaattct gattacaaaa gtaataatca gcagacctca
1861 tttgatcagc ctgactggaa aaccggggtg tttaaatttg atacattaca cctgaacaat
1921 gctgactttt caatatcacg caatgccaat gttgaaggaa atatatcagc aaataaatca
```

1981 gctatcacaa tcggcgataa aaatgcttac attgataatc ttgcagggaa aaatattact
2041 aataatggtt ttgacttcaa acaaactatc agtactaatc tatccatagg agaaactaaa
2101 tttacaggtg gcatcactgc acataacagc caaatagcca taggtgatca agctgtagtt
2161 acacttaatg gtgcaacctt tctggataat actcctataa gtatagataa aggagcaaaa
2221 gttatagcac aaaattccat gttcacaaca aaaggtattg atatctccgg tgaactgact
2281 atgatgggaa tccctgaaca gaatagtaaa gctgtaacgc cgggtctcca ctacgctgct
2341 gatggattca ggctgagtgg tggaaatgca aatttcattg ccagaaatat ggcatctgtc
2401 accggaaata tttatgctga tgatgcagca accattactc tgggacagcc tgaaactgaa
2461 acaccgacta tatcgtctgc ttatcaggca tgggcagaga ctcttttgta tggctttgat
2521 accgcctatc gaggcgcaat aacagccccc aaagctacag ttagcatgaa taatgcgatc
2581 tggcatctaa atagccagtc atcaattaat cgtctagaaa caaaagacag tatggtgcgt
2641 tttactggtg acaatgggaa gtttacaacc cttacagtgg acaaccttac tatagatgac
2701 agtgcatttg tgctgcgtgc aaatctggcc caagcagatc agcttgttgt caataagtcg
2761 ttgtctggta aaaacaacct tctgttagtc gacttcattg agaaaaatgg aaacagcaac
2821 ggactgaata tcgatctggt cagcgcacca aaaggaactg cagtagatgt ctttaaagct
2881 acgactcgga gtattggctt cagtgatgta acaccggtta tcgagcaaaa gaacgataca
2941 gacaaagcaa catggactct gatcggctat aaatctgtgg ccaacgccga tgcggctaaa
3001 aaggcaacat tactgatgtc aggcggctat aaagccttcc ttgctgaggt caacaacctt
3061 aacaaacgta tgggtgatct gcgtgacatt aacggtgagt ccggtgcatg ggcccgaatc
3121 atgagcggaa ccgggtctgc cggcggtgga ttcagtgaca actacaccca cgttcaggtc
3181 ggtgcggata acaaacatga actcgatggc cttgacctct tcaccggggt gaccatgacc
3241 tataccgaca gccatgcagg cagtgatgcc ttcagtggtg aaacgaagtc tgtgggtgcc
3301 ggtctctatg cctctgccat gtttgagtcc ggagcatata tcgacctcat cggtaagtac
3361 gttcaccatg acaacgagta taccgcaact ttcgccggcc ttggcaccag agactacagc
3421 tcccactcct ggtatgccgg tgcggaagtc ggttaccgtt accatgtaac tgactctgca
3481 tggattgagc cgcaggcgga acttgtttac ggtgctgtat ccgggaaaca gttctcctgg
3541 aaggaccagg gaatgaacct caccatgaag gataaggact ttaatccgct gattgggcgt
3601 accggtgttg atgtgggtaa atccttctcc ggtaaggact ggaaagtcac agcccgcgcc
3661 ggccttggct accagtttga cctgtttgcc aacggtgaaa ccgtactgcg tgatgcgtcc
3721 ggtgagaaac gtatcaaagg tgaaaaagac ggtcgtatgc tcatgaatgt tggtctcaac
3781 gccgaaattc gcgataatct tcgcttcggt cttgagtttg agaaatcggc atttggtaaa
3841 tacaacgtgg ataacgcgat caacgccaac ttccgttact ctttctga

B

M N K I Y S L K Y S A A T G G L I A V S E L A K R V S G K T N R K L V
A T M L S L A V A G T V N A A N I D I S N V W A R D Y L D L A Q N K G
I F Q P G A T D V T I T L K N G D K F S F H N L S I P D F S G A A A S
G A A T A I G G S Y S V T V A H N K K N P Q A A E T Q V Y A Q S S Y R
V V D R R N S N D F E I Q R L N K F V V E T V G A T P A E T N P T T Y
S D A L E R Y G I V T S D G S K K I I G F R A G S G G T S F I N G E S
K I S T N S A Y S H D L L S A S L F E V T Q W D S Y G M M I Y K N D K
T F R N L E I F G D S G S G A Y L Y D N K L E K W V L V G T T H G I A
S V N G D Q L T W I T K Y N D K L V S E L K D T Y S H K I N L N G N N

V T I K N T D I T L H Q N N A D T T G T Q E K I T K D K D I V F T N G
G N V L F K D N L D F G S G G I I F D E G H E Y N I N G Q G F T F K G
A G I D I G K E S I V N W N A L Y S S D D V L H K I G P G T L N V Q K
K Q G A N I K I G E G N V I L N E E G T F N N I Y L A S G N G K V I L
N K D N S L G N D Q Y A G I F F T K R G G T L D L N G H N Q T F T R I
A A T D D G T T I T N S D T T K E A V L A I N N E D S Y I Y H G N I N
G N I K L T H N I N S Q D K K T N A K L I L D G S V N T K N D V E V S
N A S L T M Q G H A T E H A I F R S T A N H C S L V F L C G T D W V T
V L K E T E S S Y N K K F N S D Y K S N N Q Q T S F D Q P D W K T G V
F K F D T L H L N N A D F S I S R N A N V E G N I S A N K S A I T I G
D K N A Y I D N L A G K N I T N N G F D F K Q T I S T N L S I G E T K
F T G G I T A H N S Q I A I G D Q A V V T L N G A T F L D N T P I S I
D K G A K V I A Q N S M F T T K G I D I S G E L T M M G I P E Q N S K
A V T P G L H Y A A D G F R L S G G N A N F I A R N M A S V T G N I Y
A D D A A T I T L G Q P E T E T P T I S S A Y Q A W A E T L L Y G F D
T A Y R G A I T A P K A T V S M N N A I W H L N S Q S S I N R L E T K
D S M V R F T G D N G K F T T L T V D N L T I D D S A F V L R A N L A
Q A D Q L V V N K S L S G K N N L L L V D F I E K N G N S N G L N I D
L V S A P K G T A V D V F K A T T R S I G F S D V T P V I E Q K N D T
D K A T W T L I G Y K S V A N A D A A K K A T L L M S G G Y K A F L A
E V N N L N K R M G D L R D I N G E S G A W A R I M S G T G S A G G G
F S D N Y T H V Q V G A D N K H E L D G L D L F T G V T M T Y T D S H
A G S D A F S G E T K S V G A G L Y A S A M F E S G A Y I D L I G K Y
V H H D N E Y T A T F A G L G T R D Y S S H S W Y A G A E V G Y R Y H
V T D S A W I E P Q A E L V Y G A V S G K Q F S W K D Q G M N L T M K
D K D F N P L I G R T G V D V G K S F S G K D W K V T A R A G L G Y Q
F D L F A N G E T V L R D A S G E K R I K G E K D G R M L M N V G L N
A E I R D N L R F G L E F E K S A F G K Y N V D N A I N A N F R Y S F
Stop

Figura 24. Secuencia de nucleótidos (A) y aminoácidos (B) de la toxina variante de Sat EAEC 049766. Los cambios identificados con respecto a la secuencia reportada se presentan en color rojo.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

E. coli es el organismo predominante de la biota humana, coloniza el tracto gastrointestinal de los infantes a las pocas horas de vida.[15, 1]

Permanece sin causar daño en el lumen del intestino, sin embargo, en un huésped debilitado o inmunocomprometido, incluso las cepas "no patógenas" de *E. coli* pueden causar infección. Existen clonas de *E. coli* altamente adaptadas que pueden desarrollar la habilidad para causar un amplio espectro de enfermedades en el humano.

Infecciones debidas a cepas patógenas de *E. coli* pueden estar limitadas a la superficie de la mucosa o también pueden diseminarse por todo el cuerpo, enfermedades entéricas o diarreas son uno de los síndromes causados por la infección con este organismo.[2]

Especies patógenas de *E. coli*, son responsables de una variedad de enfermedades. Un factor común de estos organismos es la secreción de moléculas proteicas de alto peso molecular llamadas serin proteasa autotransportadoras de enterobacterias (SPATEs). EAEC se encuentra entre los organismos que secretan proteínas autotransportadoras, ha sido asociada a casos de diarrea aguda y persistente, así como también se le ha relacionado con la diarrea del viajero.[3, 5]

En 1983, en un estudio epidemiológico en Lima, Perú, fue aislada la cepa de EAEC O42 (serotipo O44:H18). En 2002, Sainz y cols., reportaron que esta cepa causaba alteraciones histológicas en cortes de íleon de ratones inoculados con EAEC O42. Estas lesiones se caracterizaban por un aumento de la celularidad del epitelio intestinal así como un acortamiento de las vellosidades intestinales y edema presente en la submucosa.[9]

En México, durante un brote de diarrea, fue aislada una de las cepas más virulentas. Se aisló directamente del intestino de un niño muerto por dicho brote. Después de hacer su análisis serológico, se determinó que pertenecía al

grupo de EAEC de las cepas diarreogénicas. Se le llamó EAEC 049766. En esta cepa fueron identificadas dos proteínas (de 108 y 116 kDa) que se relacionaron con la necrosis y lesiones hemorrágicas en el íleon de rata. A pesar de que la toxina de 107-108 kDa fue primero identificada en la cepa EAEC 049766, la caracterización del gene se realizó tomando como base la cepa tipo EAEC O42. La toxina de 108 kDa (después designada Pet), induce efectos enterotóxicos, además de provocar daño a los tejidos, inflamación y secreción de moco, por lo que se propuso que esta toxina juega un papel muy importante en la diarrea producida por EAEC. En 1998, Eslava y cols., caracterizaron y secuenciaron el gene de la toxina de 108 kDa codificada en el plásmido de 65 MDa aislado de la cepa de EAEC O42. En 2006, Sainz y cols., reportaron que al infectar ratones con la cepa EAEC 049766, se producían las mismas alteraciones histológicas que habían sido reportadas antes en los modelos animales infectados con la cepa O42, sólo que las lesiones producidas por la cepa 049766, fueron mucho más severas. [18, 10, 21]

Tomando en cuenta todas las similitudes existentes entre las cepas O42 y 049766 (las dos cepas pertenecen a la categoría de EAEC, secretan la toxina de 108 kDa, producen las mismas alteraciones histológicas, las pruebas de inmunotransferencia son positivas, etc.), en un principio se pensó que la toxina presente en la cepa EAEC 049766 se podría tratar de una variante de la toxina Pet descrita por Eslava y cols.[34]

La extracción de la toxina de la cepa 049766 se realizó de manera simultánea utilizando como control una clona sobreproductora de Pet. La extracción de la toxina para la cepa como para la clona se realizó bajo las mismas condiciones. El método de extracción fue una modificación del método descrito por Eslava y cols.[8]

Los resultados en la determinación de la concentración de proteínas por el método de Bradford, mostraron que la cepa nativa de EAEC 049766 produce una cantidad de toxina muy similar a la clona sobreproductora, es decir, que la cepa EAEC 049766 podría tratarse de una sobreproductora natural, lo que

explicaría la mayor severidad en el daño causado en modelos animales tal como los resultados reportados por Sainz y cols.[10, 34]

En la electroforesis PAGE-SDS al 8%, se utilizó como control una muestra de la toxina Pet de EAEC O42, en el gel se observa una proteína que corresponde al peso reportado en estudios anteriores que es de 107-108 kDa aproximadamente, así como también se observa la banda correspondiente (116 kDa aprox.) a la toxina Pic. Ambas toxinas han sido implicadas con la producción de diarrea, así como también, en el caso de ambas toxinas se ha reportado su presencia en la cepa de EAEC O42.[21, 34, 35]

Al comparar la muestra observada en el gel que pertenece a la toxina variante de la cepa EAEC 049766, se observa claramente el mismo perfil que presenta la toxina Pet de la cepa tipo. Se encontró una proteína que corresponde al peso esperado, así como también es posible identificar la proteína que corresponde a la toxina Pic, esto concuerda con los resultados reportados por Navarro y cols. (1998), en donde describen dos toxinas con un peso de 108 y 116 kDa presentes en precipitados con sulfato de amonio de sobrenadantes de cultivos de la cepa EAEC 049766.[21]

En 1998, Navarro y cols., en pruebas de inmunotransferencia, utilizando anticuerpos preparados en conejo contra las proteínas de 108 kDa y 116 kDa de la cepa EAEC 049766, identificaron dichas toxinas en precipitados con sulfato de amonio de sobrenadantes de cultivos tanto de EAEC O42 como de EAEC 049766.[26] En este trabajo, en la prueba cruzada de inmunotransferencia, se utilizó suero anti-Pet O42 hecho en conejo. Si la toxina de la cepa EAEC 049766 se trataba de una variante de Pet, se esperaba que dicha variante tuviera actividad antigénica y pudiera ser reconocida por los anticuerpos del suero. La prueba fue positiva al revelar una banda que corresponde al peso reportado de la toxina, así como también, el suero anti-Pet O42 es capaz de reconocer a la toxina Pic, lo que indica que la toxina variante, la toxina Pic y la toxina Pet comparten epitopes que son reconocidos por los anticuerpos policlonales elaborados de manera específica con la toxina Pet O42.

Con los resultados anteriores, todo indicaba que se trataba de una variante de la toxina Pet presente en la cepa EAEC 049766, sin embargo, iniciadores específicos para la identificación de Pet (iniciadores Pet DP548) fueron probados sobre el plásmido de la cepa EAEC 049766, sin que se observara ninguna amplificación. Eslava y cols., al tratar de verificar la prevalencia de la toxina Pet en otras cepas enteroagregativas, encontraron que los iniciadores diseñados con la secuencia de dicha toxina, no identificaban la presencia del gene reportado por ellos en un buen número de cepas de EAEC. [9]

A pesar de no haber encontrado alguna amplificación sobre el plásmido de EAEC 049766 al utilizar iniciadores específicos de Pet, los estudios previos realizados sobre dicha cepa, seguían sugiriendo que se trataba de una toxina variante de Pet.

Mas iniciadores diseñados sobre la secuencia reportada de Pet fueron utilizados y probados sobre el plásmido de la cepa EAEC 049766, sin embargo, no pudo observarse ningún amplificado. Ante estos resultados, se realizó un BLAST para saber si entre las secuencias de las proteínas reportadas de la familia de las SPATEs había alguna región conservada que pudiera ser utilizada para diseñar iniciadores que pudieran identificar la toxina variante de EAEC 049766. En 2002, Dutta y cols., reportaron que los miembros de la familia de las proteínas autotransportadoras muestran una identidad de alrededor del 58% entre ellas.[6] Después de realizar el BLAST, se encontró que hay una región altamente conservada en el extremo carboxilo terminal de las autotransportadoras, por esta razón, se diseñaron los iniciadores universales en dicha región.

Al no tener resultados utilizando iniciadores específicos de Pet, se realizó la extracción del plásmido de ambas cepas (EAEC O42 y 049766). Para conocer si sus perfiles eran iguales, se utilizó la enzima EcoRI para crear un mapa de restricción de los plásmidos. Se encontró que los perfiles de los plásmidos de ambas cepas son diferentes, tal y como fue reportado por Sainz y cols., en 2006.[34] Cada uno de los fragmentos encontrados en el mapa de restricción de la cepa EAEC 049766 fue purificado. Utilizando los iniciadores universales

CONSULTA EN SERVICIOS DE INFORMACIÓN
ACERVO HISTÓRICO

sobre cada uno de estos fragmentos, se identificó el amplificado esperado (249 pb) en un fragmento de 3 Kb. Después de purificar el producto de PCR obtenido con los iniciadores universales, éste fue secuenciado. La secuencia de nucleótidos obtenida, fue comparada con la reportada para la toxina Pet, no encontrándose ninguna diferencia entre ambas secuencias. Este resultado era de esperarse ya que los iniciadores universales están diseñados sobre una región altamente conservada en las proteínas autotransportadoras.

Después de que la proteína total fue secuenciada, al hacer un BLAST se encontró que la toxina en realidad era una variante de la toxina Sat (otro miembro de la familia de las SPATEs) y que ha sido reportada en cepas UPEC y DAEC.[9, 39]

La proteína Sat tiene una identidad del 65% con la proteína Pet, lo que explica la falta de resultados positivos al seguir realizando pruebas de PCR con iniciadores diseñados específicamente en la secuencia reportada de Pet. Sin embargo, al ser Sat un miembro de la familia de las proteínas autotransportadoras, dentro de la secuencia reportada para la cepa de *E. coli* uropatogénica CFT073, se localiza la región conservada de esa familia, lo que explica el resultado positivo al utilizar los iniciadores universales.

En el 2000, Guyer y cols., identificaron y caracterizaron una toxina de 107 kDa a la cual llamaron Sat, y reportaron su localización en el cromosoma de *E. coli* uropatogénica CFT073.[19] Después de utilizar iniciadores específicos para Sat, y al encontrar el producto de amplificación esperado (387 pb) tanto en el ADN plasmídico como en el ADN cromosomal, esto hizo pensar que se trataba de una duplicidad de genes, lo que podría haber explicado la mayor severidad en el daño provocado por EAEC 049766. El ADN plasmídico fue extraído con un equipo comercial (Plasmid Midi Kit, QIAGEN), por lo que nunca se pensó en que el plásmido pudiera estar contaminado con ADN cromosomal. Sin embargo, el gradiente de cloruro de cesio demostró que el plásmido de EAEC 049766 se encontraba contaminado con ADN del cromosoma, y debido a ésta contaminación, se observaban falsos positivos en las amplificaciones

realizadas. Además de que no existen reportes de que Sat haya sido encontrada con localización plasmídica.

Con el plásmido purificado de EAEC 049766 obtenido en el gradiente de cloruro de cesio, se realizaron pruebas de PCR utilizando combinaciones de los iniciadores diseñados sobre la secuencia reportada de Sat. Se comprobó que la toxina Sat tiene localización cromosomal tal como fue descrito en el 2000 por Guyer y cols.[15] Todos los productos obtenidos por PCR fueron secuenciados logrando obtener la secuencia total de nucleótidos de la toxina variante de Sat de EAEC 049766. Esta secuencia de nucleótidos muestra 14 cambios con respecto a la secuencia reportada. Ocho cambios de una sola base que codifican para el mismo aminoácido y 6 cambios de una sola base que codifican para un aminoácido diferente. La secuencia de aminoácidos se obtuvo por el programa de computación "TranslationTools", confirmando los cambios de aminoácidos.

El gene de la toxina Sat de EAEC 049766 tiene localización cromosomal, sin embargo, en una prueba de PCR utilizando los iniciadores universales sobre el plásmido purificado, hay una amplificación en el peso esperado (249 pb), lo que indica que efectivamente se encuentra presente una toxina de la familia de las SPATEs en el plásmido, lo que tiene mucho sentido y abre la posibilidad de explicar la mayor severidad causada y observada en las lesiones provocadas por EAEC 049766.

En 2000, Guyer y cols., así como Taddei y cols., en 2005, describen la presencia de la toxina Sat en cepas UPEC y DAEC respectivamente. Algo importante de destacar, es que aunque se ha reportado la presencia de Sat en un porcentaje bajo, en cepas de *E. coli* enteroagregativas, no existen reportes en donde se describa la toxicidad en células intestinales en modelos animales de esta toxina.

CONCLUSIONES

Se identificó la toxina variante de Sat en ADN cromosomal de la cepa EAEC 049766.

Es la primera vez que se describen sus efectos en una cepa de *E. coli* enteroagregativa.

Se obtuvo la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos del gene de la toxina variante de Sat EAEC 049766. La secuencia de aminoácidos de la toxina variante muestra seis cambios con respecto a la reportada de *E. coli* CFT073.

Los iniciadores llamados Universales pueden ser utilizados para identificar a varios de los miembros de la familia de las SPATEs en cepas de *E. coli* implicadas en brotes de diarrea.

Se reveló la existencia de una toxina de la familia de las SPATEs dentro del plásmido de EAEC 049766, lo que requerirá estudios posteriores para su identificación y caracterización.

REFERENCIAS

1.- Neidhardt, F.C. 1999. *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular Biology. 2nd ed. ASM Press. Washington. USA.

2.- Nataro, James, P., Koper James, B. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin. Microbiol. 11(1): 142-201.

3.- Dutta, P., Cappello, R., Navarro-García, F., Nataro, J. 2002. Functional Comparison of Serine Protease Autotransporter of *Enterobacteriaceae*. Infection and Immunuty. 70(12): 105-7113.

4.- Benjamín, P., Federman, M., Wanke, C. 1995. Characterization of an Invasive Associated with Enteroaggregative *Escherichia coli*. Infection and Immunity. 63(9): 3417-3421.

5.- Cohen, M., Hawkins, J., Weckbach, L., Staneck, J., Levine, M., Heck, J. 1993. Colonization by Enteroaggregative *Escherichia coli* in Travelers with and without Diarrhea. Journal of Clinical Microbiology. 31(2): 351-353.

6.- Guyer, D., Henderson, I., Nataro, J., Mobley, H. 2000. Identification of Sat, an autotransporter toxin produced by uropathogenic *Escherichia coli*. Molecular Microbiology. 38: 53-66.

7.- Esquivel, G.P., Lifschitz, V., Medina, M., Gorodner, J., Merino, L. 2006. Puesta a punto de una técnica para la identificación de *Escherichia coli* diarreogénicas mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Comunicaciones Científicas y Tecnológicas.

8.- Eslava, C., Navarro-García, F., Czeczulin, J., Henderson, I., Cravioto, A., Nataro, J. 1998. Pet, an Autotransporter Enterotoxin from Enteroaggregative *Escherichia coli*. Infection and Immunity. 66(7): 3155-3163.

9.- Sainz, T., Pérez, J., Fresán, C., Flores, V., Jiménez, L., Hernández, U., Herrera, I., Eslava, C. 2002. Histological alterations and immune response induced by Pet toxin during colonization with enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) in a mouse model infection. *The Journal of Microbiology*. 40: 91-97.

10.- Sainz, T., Gutiérrez-Lucas, R., Hernández, U., Herrera, I., González, B., Villaseca, J., Eslava, C. 2006. General Meeting American Society For Microbiology. 2006. Abstr. B-026.

11.- Eisenstein, BI. 1990. Enterobacteriaceae. Principles and Practice of Infections Diseases. New York: Churchill Livingstone.

12.- Cross, AS., Gemski, P., Sadoff, JC., Orskoe, I. 1984. The importance of the K1 capsule in invasive infections caused by *Escherichia coli*. J Infect Dis. 149: 184-193.

13.- Agata, N., Ohta, M., Miyazawa, M., Mori, M., Kido, N., Kato, N. 1989. Serological response to *P. fimbriae* of *E. coli* in patients with urinary tract infections. Clin Microbiol Infect Dis. 8: 156-159.

14.- Johnson, JR. 1991. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. Clin Microbiol. 4: 80.

15.- Rodríguez, G. 2002. Principales Características y Diagnóstico de los Grupos Patógenos de *Escherichia coli*. Salud Pública. 44: 464-475.

16.- Drasar, B.S., Hill, M.J. 1974. Human Intestinal Flora. Academia Press. Lóndres, Inglaterra.

17.- Boudeau, J., Glasser, A., Masseret, E., Joly, B., Darfeuille-Michaud, A. 1999. Invasive Ability of an *Escherichia coli* Strains Isolated from the Ileal Mucosa of a Patient with Crohn's Disease. Infection and Immunity. 67(9): 4499-4509.

18.-Tzipori, S., Montanaro, J., Robins-Browne, R., Vial, P., Gibson, R., Levine, M. 1992. Studies with Enteroagregative *Escherichia coli* in the Gnotobiotic Piglet Gastroenteritis Model. Infection and Immunity, 60(12): 5302-5306.

19.- Nataro, J., Hicks, S., Phillips, A., Vial, P., Sears, C. 1996. T84 Cells in Culture as a model for Enteroaggregative *Escherichia coli* Pathogenesis. Infection and Immunity. 64(11): 4761-4768.

20.- Yamamoto, T., Wakisaka, N., Sato, F., Kato, A. 1997. Comparison of the nucleotide sequence of enteroaggregative *Escherichia coli* hat-stable enterotoxin 1 genes among diarrhea-associated *Escherichia coli*. FEMS Microbiology letters. 147: 89-95.

21.- Navarro-García, F., Eslava, C., Villaseca, J., López-Revilla, R., Czeczulin, J., Srinivas, S., Nataro, J., Cravioto, A. 1998. In vitro Effects of a High-Molecular-Weight Heat-Labile Enterotoxin from Enteroaggregative *Escherichia coli*. Infection and Immunity. 66(7): 3149-3154.

22.- Jiang, Z., Greenberg, D., Nataro, J., Steffen, R., DuPont, H. 2002. Rate of Occurrence and Pathogenic Effect of Enteroaggregative *Escherichia coli* Virulence Factors in International Travelers. Journal of Clinical Microbiology. 40(11): 4185-4190.

23.- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem*. 72: 248-250.

24.- Mohamed, J., Huang, D., Jiang, Z., DuPont, H., Nataro, J., Belkind-Gerson, J., Okhuysen, P. 2007. Association of Putative Enteroaggregative *Escherichia coli* Virulence Genes and Biofilm Production in Isolates from Travelers to Developing Countries. Journal of Clinical Microbiology. 45(1): 121-126.

25.- Weintraub, A. 2007. Enteroaggregative *Escherichia coli*: epidemiology, virulence and detection. Journal of Medical Microbiology. 56: 4-8.

26.- Huang, D., Mohanty, A., DuPont, H., Okhuysen, P., Chiang, T. 2006. A review of an emerging enteric pathogen: enteroaggregative *Escherichia coli.* Journal of Medical Microbiology. 55: 1303-1311.

27.- Pallen, M., Chaudhuri, R., Henderson, I. 2003. Genomic analysis of secretion systems. Current Opinion in Microbiology. 6: 519-527.

28.- Saier, M. 2006. Protein Secretion Systems in Gram-Negative Bacteria. Microbe. 1(9): 414-419.

29.- González-Pedrajo, B., Dreyfus, G. 2003. Sistemas de secreción de proteínas en las bacterias Gram-negativas: biogénesis flagelar y translocación de factores de virulencia. Mensaje Bioquímico. XXVII: 45-63.

30.- Pukatzki, S., Ma, A., Revel, A., Sturtevant, D., Mekalanos, J. 2006. Type VI secretion system translocates a phage tail spike-like protein into target cells where it cross-links actin. PNAS. 104(39): 15508-15513.

31.- Garza-Velasco, R., Ávalos-González, J., Ugalde-Matehuala, S., López-López, M. 1999. Principales Factores Bacterianos que Promueven la Colonización e Invasión de los Tejidos Humanos. 34: 1-21.

32.- Henderson, I., Navarro-García, F., Desvaux, M., Fernández, R., Ala'Aldeen, D. 2004. Type V Protein Secretion Pathway: The Autotransporter Story. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 68(4): 692-744.

33.- Henderson, I., Nataro, J. 2001. Virulence Functions of Autotransporter Proteins. Infection and Immunity. 69(3): 1231-1243.

34.- Eslava, C., Villaseca, J., Morales, M., Navarro, A., Cravioto, A. 1993. General Meeting American Society For Microbiology. 1993. Abstr. B-105.

35.- Henderson, I., Hicks, S., Navarro-García, F., Elias, W., Philips, A., Nataro, J. 1999. Involvement of the Enteroaggregative *Escherichia coli* Plasmid-Encoded Toxin in Causing Human Intestinal Damage. Infection and Immunity. 67(10): 5338-5344.

36.- Villaseca, J., Navarro-García, F., Mendoza-Hernández, G., Nataro, J., Cravioto, A., Eslava, C. 2000. Pet Toxin from Enteroaggregative *Escherichia coli* Produces Cellular Damage Associated with Fodrin Disruption. Infection and Immunity. 68(10): 5920-5927.

37.- Henderson, I., Czeczulin, J., Eslava, C., Noriega, F., Nataro, J. 1999. Characterization of Pic, a Secreted Protease of *Shigella flexneri* and Enteroaggregative *Escherichia coli*. Infection and Immunity. 67(11): 5587-5596.

38.- Parham, N., Srinivasan, U., Desvaux, M., Foxman, B., Marrs, C., Henderson, I. 2004. PicU, a second serine protease autotransporter of uropathogenic *Escherichia coli*. Federation of European Microbiological Societies. Microbiology Letters. 230: 73-83.

39.- Taddei, C., Fasano, A., Ferreira, A., Trabulsi, L., Martínez, M. 2005. Secreted autotransporter toxin produced by a diffusely adhering *Escherichia coli* strain causes intestinal damage in animal model assays. FEMS. Microbiology Letters. 250: 263-269.

40.- Towbin, A., Staelin, T., Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from poliacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. 76: 4350-4354.