



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUIMICA

“DETECCIÓN RÁPIDA DE PROTEASAS DE
SERINA DE LA SUB-FAMILIA SPATE’S
(SERINE PROTEASES AUTOTRANSPORTER
FROM ENTEROBACTERIACEAE)”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICO-BIOLÓGICA

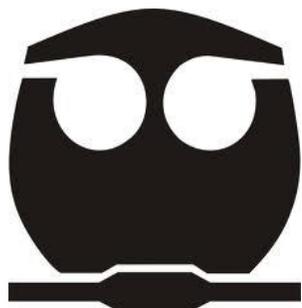
P R E S E N T A

COLUMBA GRISEL HERNÁNDEZ RUIZ

Tutor: Dr. Carlos A. Eslava Campos

Asesor Técnico: Dr. Ulises Hernández Chiñas

MÉXICO, D.F. MAYO 2013





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



JURADO ASIGNADO:

- PRESIDENTE:** **DR. Rodolfo Pastelin Palacios**
Facultad de Química-UNAM
- VOCAL:** **DR. Enrique Ortega Soto**
Instituto de Investigaciones Biomédicas
- SECRETARIO:** **DR. Carlos Alberto Eslava Campos**
Facultad de Medicina-UNAM.
- PRIMER SUPLENTE:** **MAESTRA. Martha Giles Gómez**
Facultad de Química-UNAM
- SEGUNDO SUPLENTE:** **Profesora. Beatriz Ruiz Villafán**
Facultad de Química-UNAM

LA PRESENTE INVESTIGACIÓN SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN BÁSICA DEL DEPARTAMENTO DE SALUD PÚBLICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA-UNAM, BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. CARLOS ALBERTO ESLAVA CAMPOS Y COMO ASESOR TÉCNICO A EL DR. ULISES HERNÁNDEZ CHIÑAS.



ÍNDICE



Índice.....	(4)
Índice de Figuras.....	(8)
Índice de Cuadros.....	(10)
Resumen.....	(12)
1.- Antecedentes.....	(14)
2.- Introducción.....	(25)
3.- Justificación.....	(41)
4.- Hipótesis.....	(44)
5.- Objetivo General.....	(46)
6.- Objetivos Particulares.....	(48)
7.- Materiales y Métodos.....	(50)
7.1.- Propagación de Fagótopos.....	(51)
7.2.- Cuantificación de Fagótopos.....	(52)
7.3.- Obtención de Anticuerpos Anti-fagótopo.....	(53)
7.4.- Obtención de γ -Globulinas.....	(54)
7.5.- Purificación de Pet, Pic y Sat.....	(55)
7.6.- Inmuno Electrotransferencia (Western-Blot).....	(56)
7.7.- Reactividad de los Anticuerpos de Conejo vs Fagótopos Homólogos.. por el Método de Elisa.	(57)
7.8.- Diseño de Péptidos Sintéticos.....	(58)
7.9.- Reactividad de Anticuerpos Anti-fagótopo contra Péptidos Sintéticos.....	(59)
7.10 Sensibilidad de Anticuerpos Anti-fagótopos.....	(60)
7.11 Reactividad de γ -Globulinas de Conejos Inmunizados con los..... Péptidos Sintéticos.	(61)
7.12 Reactividad de Anticuerpos Anti-fagótopo contra SPATE 's.....	(61)
7.13 Ensayo de Dot Blot.....	(62)
7.14 Detección de SPATE 's en Muestras de Orina.....	(63)
7.15 Análisis Bacteriológico de las Muestras de Orina.....	(65)
8.- Resultados.....	(66)
8.1.- Selección de Conejos para Inmunización.....	(67)
8.2.- Amplificación de Clonas de Fagos.....	(67)
8.3.- Reactividad de los Sueros Antifagotopos Contra Pet, Pic y Sat.....	(68)
8.4.- Purificación de las γ -Globulinas Anti-Fagótopos y Reactividad de Estas Contra el Fagótopo Homólogo.	(69)
8.5.- Reactividad de γ -Globulinas Antifagotopos Contra Péptidos Sintéticos.	(71)
8.5.1 Reactividad de las GAMMA Globulinas con los Péptidos Sintéticos.....	(73)



Homólogos.

8.5.2	Reactividad de las Diferentes GAMMA Globulinas Contra Tres Péptidos Sintéticos.	(74)
8.6.-	Reactividad de las γ -GLOBULINAS Anti-Fagotopo Contra Pet, Pic y Sat.	(75)
8.7.-	Detección de Pet, Pic y Sat en Muestras de Orina.	(78)
8.8	Detección de Pet, Pic y Sat en Muestras de Orina Inoculadas.	(79)
9.-	Discusión	(84)
10.-	Conclusiones	(92)
11.-	Referencias	(94)
12.-	Anexos	(97)
12.1	Anexo I Abreviaturas.	(98)
12.2	ANEXO II.- Medios y Soluciones.	(100)



ÍNDICE DE FIGURAS



Número	Figuras	Página
1	Frecuencia de Casos de Infección de Vías Urinarias por Sexo 2008-México.	18
2	Los Mecanismos Patógenos de <i>Escherichia coli</i> Extraintestinales. Las diferentes fases de infección de UPEC. a E. coli uropatógena (UPEC) se une al epitelio de la vejiga a través de los pili tipo 1, que se unen a los receptores uroplakin Ia y IIIa; esta unión estimula desconoce las vías de señalización (indicado por el signo de interrogación) que median en la invasión y la apoptosis. La unión de los pili tipo 1 a las integrinas $\alpha\beta 1$ también media la internalización de los las bacterias en las células de aspecto superficial para formar las comunidades de bacterias intracelulares (IBC) o las vainas. La hemolisina media la formación de poros A (HlyA) esta toxina puede inhibir la activación de las proteínas Akt y conducir a la apoptosis de las células huésped y exfoliación. Exfoliación del epitelio de la vejiga expone las células de transición subyacentes de la invasión, UPEC puede vivir en estas células en reposo como reservorios intracelulares (QIRs) que pueden estar implicados en las infecciones recurrentes. (Matthew A. Croxen y B. Brett Finlay 2009)	38
3	Esquema de ELISA Indirecto.	58
4	Esquema del Ensayo de ELISA Vs Péptidos Sintéticos.	60
5	Purificación de IgG's del Suero de Conejos Inmunizados con Fagótopos. SDS PAGE (12%) del Luido de una Cromatografía de Afinidad (Proteína G-agarosa) de los Sueros Pre-inmune y SPic-1. Se Observan las Cadenas Pesadas y Ligeras de las Inmunoglobulinas, con Pesos Moleculares de 50kDa y 25 kDa Respectivamente.	70
6	ELISA de la Reactividad de las γ -globulinas Anti-mimótopo contra su Fagótopo Homólogo. Análisis Comparativo de las Respuestas Obtenidas con los Sueros Completos y con las IgG's contra los Fagótopos Homólogos; Se Observa que la Respuesta Obtenida (D.O) con la IgG anti-FPic-1 fue Cinco Veces más Intensa (0.7 vs 0.2) que la Inducida por el Suero Completo; en el Caso de las IgG's FPic-6, FP3-1 y FP3-7 el Incremento (D.O.) fue Ligeramente Mayor las Lecturas Obtenidas que con los Sueros Completos.	70
7	ELISA, para Conocer la Concentración Óptima del Péptido Sintético. Concentraciones (0.5-20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) del Péptido Sintético P2 (ILLPQPPKLLLP), Fueron Adicionados a una Placa de 96 Pozos a los Cuales se les Agregaron las Gamma Globulinas $\gamma\text{P3-1}$ o $\gamma\text{P3-7}$ (anti-PQPxK) a una Concentración de (1mg/mL) y el Suero Pre-inmune (SPI) en una Dilución 1:100, se Utilizó SPI ya que por la Cantidad de Muestra no fue Posible Obtener un Liofilizado de la Misma. La Intensidad de la Reacción se Mantiene Constante con las Diferentes Concentraciones del Péptido P2, Siendo la Muestra de $\gamma\text{P3-1}$ la que Presento Mayor Reactividad.	71
8	ELISA para Determinar la Concentración Óptima de γ -globulinas. Una Placa de 96 Pozos se Forro con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del Péptido P2 (ILLPQPPKLLLP), Adicionándole las γ -globulinas Obtenidas de los Sueros Homólogos ($\gamma\text{P3-1}$ ó $\gamma\text{P3-7}$) y Suero Pre-inmune a Diferentes Concentraciones (0.5, 1.0, 2.5, 5 y 10 mg/mL). Se Observa una Reactividad Constante con Ambas γ -globulinas a Partir de 1mg/mL, con un Liger Incremento con 5 mg/mL de IgG.	72
9	ELISA para Evaluar la Reactividad de las γ -globulinas Anti-mimótopo Contra su Péptido Sintético Homólogo. Una Placa de 96 Pozos se Forro con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de los Péptidos y se Puso a Reaccionar con 1 mg/mL de la γ -globulina Homóloga: P1 (TYPGYINHASKAS) vs anti PGxxN ($\gamma\text{Pet-1}$ y $\gamma\text{Pet-3}$); P2 (ILLPQPPKLLLP) vs Anti-PQPxK ($\gamma\text{P3-1}$ y $\gamma\text{P3-7}$) y P3 (CNPDDSSMC) vs Anti-PDDSS ($\gamma\text{Pic-1}$ y $\gamma\text{Pic-6}$). En General se Identifica que las IgG Muestran una Reactividad más Alta que los Sueros Excepto la Muestra del Conejo Inmunizado con P3-1 en la que se Obtubo una Respuesta Similar.	73
10	Reactividad de las γ -globulinas Anti-mimótopo contra los Péptidos Sintéticos. Por un Ensayo de ELISA se Evaluó la Respuesta de Cada una de las Muestras de γ -globulinas Contra los Péptidos Sintéticos [PDDSS (P3), PGxxN (P1) PQPxK (P2)]. Una Placa de 96 Pozos se Arma con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Cada Péptido por que se Puso a Reaccionar con 1mg/mL de Cada Gamma Globulina. (Aunque se Realizo la Desviación Estándar, no se Considero Importante Incluir por el Hecho de que solo se Pretendía Evaluar la Respuesta Homóloga).	74
11	Reactividad de los Anticuerpos de Conejos Inmunizados con Diferentes Fagótopos Contra Pet, Pic y Sat. Una Microplaca de 96 Pozos fue Cubierta con 0.8 μg de Pet (barra azul), Pic (barra roja) o Sat (barra verde). Los Anticuerpos de Conejo, Anti-PQPxK ($\gamma\text{P3-1}$, $\gamma\text{P3-7}$), Anti-PGxI/LN ($\gamma\text{Pet-1}$, $\gamma\text{Pet-3}$), Anti-CxPDDSSxC ($\gamma\text{Pic-1}$, $\gamma\text{Pic-6}$) Obtenidos en Conejo y los Sueros Policlonales de Conejo Anti-Pet, Anti-Pic o Anti-Sat Utilizados como Controles, se Adicionó a Cada Pozo para Evaluar su Reactividad con las Diferentes SPATEs. La Reacción Antígeno-Anticuerpo se Evaluó con una Anti-IgG de Conejo Marcada con Fosfatasa Alcalina.	76
12	Dot blot para Evaluar la Respuesta de los Sueros Antifagótopo Contra Pet, Pic y Sat. Se Presentan los Criterios para Definir si la Respuesta era Positiva, Negativa o Dudosa.	77
13	Ensayo de Dot Blot para Evaluar la Respuesta de IgG Anti Fagótopos en Muestras de Orina Inoculadas con las Diferentes SPATEs. En la Imágenes se Representan Ejemplos de cómo es Visible la Respuesta Positiva en Diversas Intensidades Marcada como el Símbolo (+) y Respuesta Nula Marcada con (-) Mostrando Cada Resultado de las Muestras.	81



ÍNDICE DE CUADROS



Número	Cuadros	Página
1	Criterios para el Diagnóstico de las Infecciones del Tracto Urinario en México. (<i>Barragán A. Ignacio y cols. 2006</i>).	24
2	Factores de Virulencia en Cepas UPEC con Diferente Serotipo.	31
3	Fagótopos Seleccionados para la Inmunización de Conejos y Obtención de Anticuerpos.	52
4	Reactividad Evaluada por Western Blot de los Sueros de Conejo Anti-Fagótopo Contra Pet, Pic y Sat.	68
5	Rendimiento de IgG´s Purificadas y Liofilizadas Obtenidas de Sueros de Conejos Inmunizados con Fagótopos.	69
6	Reactividad de los Anticuerpos Anti-SPATE´s vs Pet, Pic y Sat.	77
7	Comparación de la Reactividad de las IgG´s Anti-mimótopo en los Diferentes Inmunoensayos.	78
8	Reactividad de las IgG´s Anti-fagótopos en Muestras de Orina.	79
9	Dot-blot en Muestras de Orina Filtrada e Inoculada con las Proteínas de Estudio.	80
10	Ensayo de Dot-blot Utilizando Orina Filtrada a Través de una Membrana Tratada con BSA e Inoculada con las Proteínas de Estudio.	82
11	Ensayo de Dot-blot Utilizando orina Filtrada Centrifugada e Inoculada con las Proteínas de Estudio.	83
12	Comparación de Reactividad de las IgG´s con las SPATE´s de Estudio Inoculadas en la Orina.	83



RESUMEN



Las proteasas de serina autotransportadas Pic, Sat, Vat, Tsh, se consideran marcadores de virulencia de *Escherichia coli* Uropatogena, principal agente etiológico de las infecciones de vías urinarias. Los procedimientos para realizar el diagnóstico de las infecciones de vías urinarias requieren de mucho tiempo, tal situación ha dado lugar a que el tratamiento de las mismas sea empírico. Por tal motivo el contar con un método de diagnóstico rápido, sería de gran utilidad para prescribir el tratamiento adecuado y evitar en la medida de lo posible la recurrencia de las infecciones urinarias asociadas con *Escherichia coli*. Estudios previos realizados con Pet y Pic con el método de Phage Display, mostraron la existencia de sitios inmunodominantes en dichas proteasas los cuales son compartidos por otros miembros integrantes de la misma familia. En este estudio se utilizaron seis diferentes fagos (fagótopos), que expresan en una de sus proteínas de superficie (PIII), péptidos que son mimótopos de los sitios inmunodominantes de las referidas proteasas. Los fagótopos fueron inoculados en conejos con el propósito de obtener anticuerpos contra los péptidos mimótopos de Pet y Pic y evaluar su utilidad en el desarrollo de un sistema para la detección de las serina proteasas directamente en la orina de pacientes con infección de vías urinarias. Los fagótopos utilizados para inmunizar expresan los motivos PQPxK (clonas FP3-1 y FP3-7), PGxxN (clonas FPet-1, FPet-3) o PDDSS (clonas FPic-1 y FPic-6). Con el suero de los seis animales y las gammaglobulinas (IgG's) obtenidas de cada suero, se analizó su reactividad por ELISA y Western-blot contra los fagótopos, los péptidos sintéticos diseñados de las secuencias identificadas en cada fago, así como contra las proteínas Pet, Pic y Sat, estas



últimas analizadas por el método Dot Blot para definir su utilidad en la identificación de SPATE's en orina.

El análisis de la respuesta de los anticuerpos obtenidos mostró que reaccionan tanto con los motivos expresados (péptidos) en la superficie del fago, como con los péptidos sintéticos diseñados con las secuencias reportadas. Los anticuerpos obtenidos contra las clonas FPic-1, FPic-6 que reaccionaron contra Sat así como FP3-1 y FP3-7 que reconocieron a Pet y Pic respectivamente, mostraron una mayor especificidad. Estos anticuerpos se seleccionaron para la detección de Pet, Pic y Sat en muestras de orina. Los resultados mostraron que los anticuerpos referidos reaccionan mejor con muestras de orina previamente centrifugada e incubada durante 15 minutos con las diferentes toxinas. Después de realizar los diferentes análisis de reactividad de los anticuerpos, se concluyó que los obtenidos contra los péptidos con las secuencias PQPxK y PDDSS, que reaccionan contra Pet, Pic y Sat pueden ser considerados como reactivos para el diseño de un método de diagnóstico rápido, para la identificación de las Serina Proteasas Auto Transportadas de la familia *Enterobacteriaceae* en muestras clínicas.



1.- ANTECEDENTES



Las infecciones del tracto urinario (ITU) representan la cuarta causa de morbilidad en México y ubicándose solo por debajo de la Diabetes Mellitus (INEGI. <http://www.inegi.org.mx/sistemas/sisept/default.aspx?t=msal04&s=est&c=22463>, 2012). Este padecimiento se considera como problema de salud pública, ya que es causa frecuente de consulta médica en el primer nivel de atención (atención primaria). Este padecimiento, además, representa un gasto importante que afecta la economía del país. Según análisis hechos en México los costos por consulta para la atención de las infecciones del tracto urinario se encuentran entre \$48.21 y \$104.88 pesos por consulta y sólo son superadas en costo con las respectivas por atención de infecciones respiratorias agudas. (A. Ignacio Barragán A. y cols. 2006)

ETIOLOGÍA

Diferentes microorganismos se han relacionado con la etiología de ITU, los bacilos Gram negativos como *Escherichia coli*, *Klebsiella sp* y *Proteus sp* son las bacterias principalmente asociadas con el padecimiento. De éstas bacterias *Escherichia coli* es responsable de casi el 80% de las ITU en comunidad, el 20% restante se asocia con los otros grupos de bacterias (De los dolores, María; 2009). Otros microorganismos como las bacterias Gram positivas también se relacionan con la etiología de dichas infecciones, entre éstas las más comunes son: *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* y Enterococos, además Micobacterias, Clamidas y Micoplasmas. Parásitos como *Trichomonas vaginalis* y algunos hongos también pueden ser responsables del padecimiento. (James H. Tabibian y cols. 2008)



Existen mecanismos de defensa contra ITU, entre estos se incluyen los anatómicos e inmunológicos que evitan las invasiones tisulares del aparato urinario. Al respecto se pueden mencionar el vaciado completo y periódico de la vejiga, acidez urinaria, excreción de urea que tiene efecto bacteriostático, el efecto fagocítico de la mucosa vesical, así como la actividad inmune celular y humoral como la producción de anticuerpos IgA.

No obstante a pesar de estos mecanismos de defensa del hospedero, los microorganismos pueden llegar al tracto urinario por vía hematogena o por vía ascendente, esta última es responsable del 95.0% de las ITU. Al respecto, el problema inicia con la colonización de la uretra por las bacterias generalmente asociado con malos hábitos higiénicos. Las mujeres, ancianos y niños representan la población más susceptible para desarrollar ITU.

El sexo masculino es más susceptible de presentar una infección de vías urinarias en los primeros tres meses de vida, después de esta edad la incidencia es más alta en las mujeres. Las mujeres desarrollan con mayor frecuencia estos padecimientos, debido a que su uretra es más corta y está cerca del ano. En el caso de personas con diabetes y los ancianos las infecciones se presentan porque su vejiga no se vacía por completo ocasionando reflujo urinario que se asocia a enfermedades de la vejiga y próstata.

Los niños pueden presentar las infecciones del tracto urinario con síntomas diferentes según la edad y el sexo, la sospecha puede surgir por una gran



variedad de signos y síntomas aunque ninguno de ellos es suficientemente específico para asegurar el diagnóstico sin apoyo del laboratorio de bacteriología. Un ejemplo al respecto son los niños con bacteriuria asintomática ya que generalmente solo presentan incontinencia urinaria y no muestran sintomatología de una infección. Los síntomas de una infección vesical abarcan: orina turbia, olor intenso y fétido de la orina, urgencia o incremento de la frecuencia urinaria, la necesidad de orinar por la noche, dolor o ardor al orinar, fiebre baja (no toda persona tendrá fiebre), presión en la parte inferior de la pelvis e incluso relación sexual dolorosa.

EPIDEMIOLOGÍA

Reportes del año **2003** y hasta el **2009**, señalan que las Infecciones de vías urinarias en México, ocupan el tercer lugar dentro de las 20 principales causas de morbilidad que se reportan en la República Mexicana (clave CIE-10^a N30, N34, N39.0). En el año **2003** se notificaron 3'287,111 casos con una incidencia de 3,154.2 y en el **2008** el número de casos fue de 3'244,994 con una incidencia de 3,041.7 la incidencia en el **2009** se incremento nuevamente con 3, 329.7. Estas observaciones muestran que el problema es persistente y requieren mayor atención en el diagnóstico, tratamiento pero principalmente en la prevención. En el año 2010, datos publicados por la Secretaria de Salud de México a través del boletín epidemiológico (*Num.51 Vol.26 semana 51 2010*), muestran que ITU en hombres fue de 24.4% con 791,386 casos e incidencia de 1,508.4 en mujeres



75.6% con 2'453,608 casos e incidencia de 4,508.6 ambas por 100,000 habitantes. (**Figura 1**)

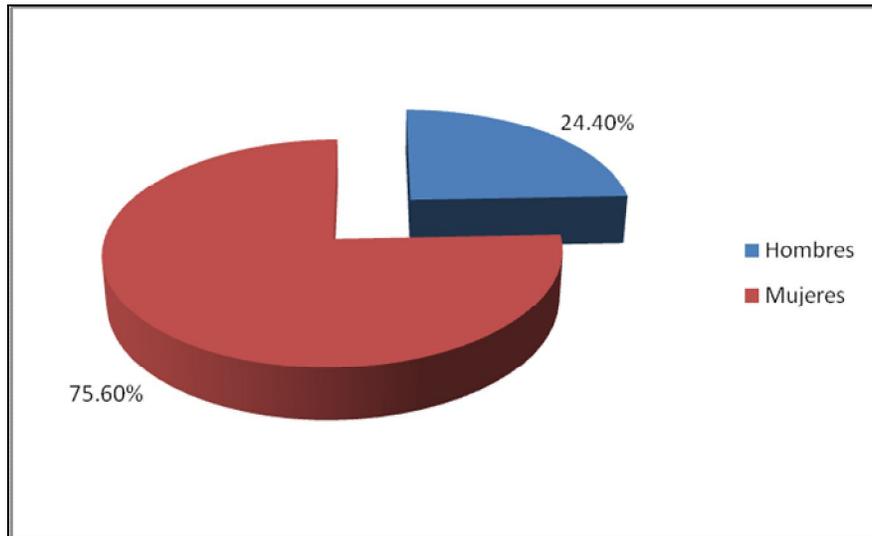


Figura 1. Frecuencia de Casos de Infección de Vías Urinarias por Sexo 2008-México.
Fuente: SUIVE/DGAE/Secretaría de Salud.

DIAGNÓSTICO

La gran mayoría de los casos de infección del tracto urinario en los pacientes ambulatorios en general no presentan complicaciones. Sin embargo, se sabe que las infecciones urinarias se complican cuando existen factores de riesgo o por daños secundarios que llevan al paciente a manifestaciones clínicas graves. Hay recomendaciones especiales para ITU complicadas, como es la precisión en el diagnóstico y las diferentes estrategias terapéuticas.

El estándar de oro para el diagnóstico de una ITU es la detección del patógeno asociado a la presencia de síntomas clínicos. El patógeno se detecta y es identificado al realizar el cultivo de orina, esto a su vez permite realizar la estimación del nivel de bacteriuria (presencia de bacterias en orina). Sin embargo,



existen manifestaciones atípicas principalmente en niños, el diagnóstico clínico sólo orienta en un 40.0% de los casos, por lo que se requiere confirmación por medio de cultivo cuantitativo de orina el cual se realiza ante sospecha de infección en infantes febriles, principalmente con fiebres inexplicables de dos o tres días. La *American Academy of Pediatrics (AAP)*, sugiere uroanálisis en todos los casos y un cultivo en todos los niños menores de 6 meses de edad y en niñas menores de dos años que tengan una temperatura de 39°C. Si se encuentra en el uroanálisis más de 5 leucocitos por campo se puede considerar que hay infección urinaria. La piuria (leucocitos en orina), proteinuria y hematuria pueden ocurrir o no en una infección de vías urinarias. Sin embargo, la alta frecuencia del problema y los tiempos de respuesta para un diagnóstico, hacen que en general se implemente una terapia empírica antes de conocer al agente etiológico responsable. Esta situación, ha dado lugar a una mayor incidencia de la enfermedad probablemente relacionado con la implementación de los tratamientos sin diagnóstico confirmativo, hecho que da lugar a la necesidad de realizar un diagnóstico más rápido y efectivo.

Se propone que para el diagnóstico de la ITU's se sigan los siguientes tres pasos:

- 1) Historia Clínica.
- 2) Examen Físico Orientado.
- 3) Estudios de Orina.



DIAGNOSTICO CLÍNICO

Historia Clínica: La información que el paciente proporciona al médico puede predecir la frecuencia, gravedad y localización de los síntomas y signos clínicos. Se estima que en mujeres, la presencia de uno o más síntomas sugieren infección en aproximadamente 50% de los casos y si es combinado con otros síntomas, aumentan la probabilidad de infección de vías urinarias a un 90%. (*Guido Schmiemann y cols. 2010*)

Examen Físico: Este proporciona al médico información referente al dolor en las fosas renales, crecimiento de los riñones o de trastornos de la vejiga con lo que se puede sugerir el diagnóstico rápido.

DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

Examen General de Orina: La prueba de detección más común es la tira reactiva de orina, esta es una herramienta que facilita de primera instancia evaluar si es una infección y el daño aproximado. La tira urinaria ha sustituido al microscopio y al cultivo urinario, porque es una herramienta barata y rápida, con una sensibilidad del 75% y con una especificidad del 82% (*Guido Schmiemann y cols. 2010*), al detectar simultáneamente nitritos y esterasa leucocitaria (EL). El análisis microscópico de orina con una combinación de EL y la prueba de nitritos, es un procedimiento más dirigido y efectivo llegando a alcanzar sensibilidades de 78% a 92% y



especificidades de 65% a 98%. La presencia de piuria en el urianálisis tiene una sensibilidad alta para definir infección del tracto urinario (95%) pero una especificidad baja (71%). La presencia de bacterias visibles al microscopio es menos sensible (40% a 70%) pero más específica (85% a 95%). (*Guido Schmiemann y cols. 2010*)

La presencia de eritrocitos y hemoglobina debe sugerir la existencia de patología asociada a la infección de vías urinarias. Un pH alcalino es un hallazgo frecuentemente asociado a infección ya que orienta el diagnóstico, al igual que la densidad urinaria alterada y la proteinuria.

Urocultivo: Es la prueba diagnóstica confirmatoria de ITU's, desafortunadamente solo se realiza en un 40% de los casos y principalmente si son pacientes hospitalizados por sospecha de ITU. Solo se llega a realizar en el 10% de los casos de pacientes ambulatorios, esto, debido al tiempo que se requiere para la identificación del agente etiológico. Se considera indispensable que se realice a pacientes con enfermedad recurrente, con falla terapéutica, infección complicada de vías urinarias y en pacientes hospitalizados, ya que en estos las complicaciones pueden ser muy severas afectando otros órganos. (*Barragán A Ignacio y cols. 2006*)

Para realizar un urocultivo que reporte resultados confiables, es indispensable contar primeramente con una muestra adecuada que proporcione la certeza de que se utilizó una buena técnica en la recolección, transporte y procesamiento de la muestra, que al final permita realizar una buena interpretación de los resultados



Aun cuando existen excelentes técnicas para la recolección, se recomienda tomar muestra de orina de chorro medio, por ser no invasiva, indolora, de bajo costo y sin complicaciones. Sin embargo, este método tiene el riesgo de que la muestra se contamine por situaciones, como mal aseo, mala técnica de recolección etc.

En cuanto al transporte de la muestra se recomienda mantenerla sin movimiento y en condiciones de refrigeración, se debe procesar en menos de dos horas. Para poder hacer un análisis efectivo y una cuenta correcta de microorganismos presentes en la muestra, esta se debe procesar con asa calibrada y en medios como Agar Sangre y Mac Conkey. La clasificación de los microorganismos encontrados se hace de acuerdo a la obtención del espécimen.

Estudios de Gabinete: En general se utilizan para evaluar la función renal, por lo que es indispensable definir el estudio más conveniente, la medicación y dosis a utilizar, pero en general solo se practican cuando el paciente se encuentra en situaciones de alto riesgo.

Imagen y Ultrasonido: Los objetivos de la evaluación por imagen son los siguientes:

- 1) Identificar daño parenquimatoso al momento del diagnóstico y con esto poder dar un pronóstico y tratamiento adecuado.
- 2) Identificar la presencia de anomalías anatómicas o funcionales subyacentes que predispongan a ITU's o a daño renal.



- 3) Brindar un punto de referencia para comparaciones posteriores y así poder evaluar el desarrollo de la enfermedad y que zonas anatómicas son más afectadas.

El estudio incluye la toma de una placa simple de abdomen, la cual permite identificar si no hay modificaciones evidentes en los mismos. El ultrasonido (US) de vías urinarias con medición de orina residual es útil para identificar enfermedad renal o signos de uropatía obstructiva, el cual puede efectuarse en cualquier momento durante el curso del tratamiento. La urografía excretora todavía se utiliza en algunas situaciones, para pacientes que cursan con hematuria que puede ser de origen no infeccioso.

TRATAMIENTO

El tratamiento de la infección urinaria debe de ser individualizado; lleva como objetivo erradicar la infección, descubrir y corregir anormalidades funcionales o anatómicas; prevenir recidivas; preservar la función renal. Se debe de administrar un medicamento antibacteriano, pudiendo utilizarse también acidificantes de la orina y antisépticos urinarios. Sin embargo, por la falta de diagnósticos rápidos y específicos, en general se opta por una terapia empírica en la que se indica el antibiótico más potente en un tiempo más corto, por lo que es necesario desarrollar métodos para un diagnóstico efectivo, ya que la selección del antimicrobiano depende del agente causal.



Cuadro III. Criterios para el Diagnóstico de Infecciones del Tracto Urinario de la Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas (IDSA) y la Sociedad Europea de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas (ESCMID)

Categoría	Diagnóstico clínico	Laboratorio
Infección del tracto urinario no complicada en la mujer; cistitis aguda no complicada en la mujer	Disuria, urgencia, frecuencia, dolor suprapúbico, ausencia de síntomas urinarios en las cuatro semanas previas al presente episodio	Leucocitos $\geq 10 \text{ mm}^3$ $\geq 10^3$ unidades formadoras de colonias por mL de orina obtenida en muestra de chorro medio
Pielonefritis aguda no complicada	Fiebre, escalofrío, dolor en flanco, con exclusión de otros diagnósticos. Sin historia o evidencia clínica de anomalías en las vías urinarias o por estudios de gabinete	Leucocitos $\geq 10 \text{ mm}^3$ $\geq 10^4$ ufc/mL de orina obtenida en muestra de chorro medio
IVU complicada	Cualquier combinación de síntomas de las categorías 1 y 2 previas; uno o más factores asociados	Leucocitos $\geq 10 \text{ mm}^3$ $\geq 10^4$ ufc/mL de orina obtenida en muestra de chorro medio, en la mujer $\geq 10^5$ ufc/mL de orina obtenida en muestra de chorro medio, en el hombre o en muestra obtenida por cateterismo vesical
Bacteriuria asintomática	No existen síntomas urinarios	Leucocitos $\geq 10 \text{ mm}^3$ $\geq 10^5$ ufc/mL de orina obtenida en muestra de chorro medio, en dos muestras sucesivas, tomadas con intervalo de más de 24 horas
Infección recurrente de las vías urinarias	Al menos tres episodios de IVU's no complicadas, documentada con urocultivo, en los últimos 12 meses; sólo mujeres; ausencia de alteraciones estructurales/funcionales	$>10^3$ ufc/mL de orina obtenida en muestra de chorro medio

Cuadro 1. Criterios para el Diagnóstico de las Infecciones del Tracto Urinario en México. (Barragán A. Ignacio y cols. 2006)

Sin embargo debido al uso indiscriminado de antimicrobianos y de la falta de apego a los tratamientos, se ha propiciado la selección de microorganismos con resistencia múltiple a dichos medicamentos, disminuyendo cada día las posibilidades de un control adecuado de las infecciones que de manera secundaria han generado problemas de persistencia o recurrencia de las ITU, casos de re-infección o recaída.



2.- INTRODUCCIÓN



La diversidad de microorganismos causantes de las infecciones del tracto urinario y la falta de técnicas sensibles para su detección, hace que en una gran parte de episodios de ITU no se establezca la etiología del padecimiento. Tal hecho a lo que ha conducido es a la implementación de tratamientos empíricos, utilizando antibióticos de amplio espectro sin un enfoque dirigido a eliminar al agente causal de la infección. En estudios retrospectivos se ha evidenciado que solo en un 10% de los casos de infección, se realiza un urocultivo para establecer el diagnóstico etiológico del padecimiento y la susceptibilidad del microorganismo a los antimicrobianos (Barragán A. Ignacio y cols. 2006). Esta situación ha dado lugar a la emergencia de cepas resistentes a varios antimicrobianos, por lo que la Organización Mundial de la Salud (OMS) considera que: "el uso abusivo de los antibióticos es una de las principales causas del incremento de la resistencia bacteriana, y en la actualidad uno de los mayores problemas de salud pública."

El conocer los patrones de resistencia de los diferentes agentes etiológicos causales de infecciones del tracto urinario, es de gran importancia ya que se puede utilizar junto con un diagnóstico rápido, para implementar un tratamiento oportuno y adecuado, con lo que se pueda disminuir la incidencia de ITU. (Arteaga Nancy, 2010)

Diferentes reportes señalan a *Escherichia coli* como principal patógeno causante de ITU's en cerca del 60% de las infecciones intrahospitalarias y en el 90% de los casos en pacientes ambulatorios (Venice Chávez, 2010). Los estudios de sensibilidad



a antimicrobianos de las cepas involucradas, muestran una frecuencia alta de resistencia a ampicilina y amoxicilina/ácido-clavulónico. Datos al respecto se obtuvieron en un estudio realizado en el Hospital Infantil de México (*Arteaga Nancy, 2010*), cuyos autores recomiendan dejar de utilizar Ampicilina y Trimetoprim con Sulfametoxazol como elección en los tratamientos empíricos, ya que los aislados analizados en dicho estudio presentaron un alto nivel de resistencia a estos antimicrobianos.

Escherichia coli es una bacteria con enorme plasticidad genómica que le ha permitido adaptarse a distintos entornos fisiológicos. Tal hecho ha dado lugar a que existan clonas de la bacteria habitantes naturales del intestino que se consideran patógenas cuando salen de su hábitat natural, y clonas asociadas a infecciones intestinales, que presentan características de virulencia específicas no presentes en las cepas que conforman la biota intestinal.

Esta situación ha dado lugar a que en la actualidad *Escherichia coli* se encuentre integrada en varios grupos dependiendo de sus características serológicas (serogrupos y serotipos) determinadas estas por las variedades de sus antígenos somático (O), flagelar (H), capsular (K), por sus factores de virulencia o por su distribución epidemiológica y los cuadros clínicos que desencadena. Considerando todos estos atributos es que se conocen los grupos de *E. coli* que producen infecciones intestinales que de acuerdo a sus factores de virulencia y al tipo de Cuadro Clínico se clasifican en: *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica



(EHEC), *E. coli* productora de toxinas semejantes a la de Shigella (STEC), *E. coli* enteroadherente en las que se incluyen las que muestran un fenotipo de adherencia difusa (DAEC) y las que presentan un patrón de adherencia agregativo (EAEC).

Con respecto a las que ocasionan infecciones extraintestinales (EXEC), en este grupo se incluyen las que producen meningitis y septicemias y las responsables de infecciones del tracto urinario conocidas generalmente como *E. coli* uropatógenas (UPEC). (Nataro and Kaper 1998)

Las cepas UPEC han adquirido una serie de factores (**Cuadro 2**), que contribuyen conjuntamente a potenciar su virulencia, en especial han logrado desafiar el hecho de salir del tracto intestinal para establecerse en un ambiente diferente como lo es el tracto urinario, en el que como fuente de carbono utilizan péptidos y aminoácidos como. La capacidad para ascender el tracto urinario de la uretra a la vejiga y por último a los riñones, manifiesta la existencia de mecanismos de tropismo, propiedades para evadir la respuesta inmune innata y la expresión de factores de colonización mediante los cuales evita su expulsión por la micción. Si a todo lo anterior se le agrega la selección de mutantes resistentes por el manejo inadecuado de los antimicrobianos durante el tratamiento, podemos entender porque resulta difícil su erradicación, lo que plantea la necesidad de proponer procedimientos de detección más rápidos que orienten sobre la etiología del padecimiento y así poder combatir más efectivamente al microorganismo.



La entrada de UPEC en el tracto urinario es seguida por adhesión al epitelio de la vejiga mediada por adhesinas fimbriales H (FimH), que se ubican en la punta del pili tipo 1 (**Figura 2**). FimH se une a la proteína uroplakin IIIa glucosilada de las células superficiales del epitelio, las interacciones entre FimH y uroplakin IIIa dan lugar a eventos de fosforilación que se requieren para estimular vías de señalización para la invasión (encapsulado) y la activación de apoptosis (Croxen A. Matthew, 2009). La invasión de UPEC mediada por FimH se relaciona con la unión de ésta fimbria a las integrinas $\beta 1 \alpha 3$ que se agrupan con actina en los sitios de invasión, así como con los microtúbulos, lo que provoca una desestabilización de la célula. Estas interacciones locales de actina repercuten en una actividad envolvente de internalización de las bacterias adheridas (Keira Melican y cols. 2011). Dicho efecto se encuentra asociado a la prevalencia de las infecciones ya que les permite permanecer dentro de las células en reservorios.

Una vez interiorizada UPEC rápidamente se puede reproducir y formar biofilm, uniéndose en grupos de microorganismos formando complejos alineados, a estos se les denomina Comunidad Intracelular Bacteriana (IBC por sus siglas en ingles) o las vainas, que le sirven como protección (Keira Melican y cols. 2011), (**Figura 2**).

También se ha observado que UPEC puede esparcirse de una célula infectada e invadir las células circundantes superficiales como respuesta a la inmunidad innata del huésped, debido a la invasión se producen señalizadores que provocan la exfoliación de las células de la vejiga inducida por la hemolisina (HylA), que puede inhibir la activación de las AKT y conducir a apoptosis dejando una zona



más vulnerable a la infección y por lo tanto la difusión de UPEC se hace más efectiva (Keira Melican y cols. 2011), (**Figura 2**).

UPEC tiene la facultad de evadir la desnaturalización por endocitosis activada por el sistema inmune, ya que puede inhibir la secreción de actina, y quedar dentro de la vacuola celular sin ser destruida o totalmente fagocitada, lo que le sirve como refugio en contra de la inmunidad del huésped, permitiéndole la persistencia a largo plazo en la vejiga. En esta zona se puede reproducir con mayor facilidad, lo que conduce a la formación de IBC en el citosol y fuera de la célula, la cepa puede quedarse inactiva por un largo periodo hasta que por medio de señalizaciones y debido al incremento de microorganismos los procesos para poder invadir al huésped se reactivan (Croxen A. Matthew, 2009).

Se ha reportado que las infecciones del tracto urinario que se dejan sin tratar pueden diseminarse al riñón en una progresión ascendente de la enfermedad esto mediante la capacidad de motilidad que le proporcionan las fimbrias, UPEC suele expresar las fimbrias P que se adhieren a Gal α (1-4) y Gal β que son restos de la globoseridos, glicolípidos que se encuentran en la superficie de las células epiteliales de los riñones. Existe una correlación entre las fimbrias P y el grado de virulencia, debido a la capacidad de adherencia que este organelo le confiere a la bacteria (Keira Melican y cols. 2011).



Cuadro 2. Factores de Virulencia en Cepas UPEC con Diferente Serotipo

Genes	CFT073*	536*	UT189*	ABU 83972*	APEC-01*
Serotipo	O6:K2:H1	O6:K15:H31	O18:K1:H7	OR:K5:H-	O1:K1:H7
Adquisición de Hierro					
Sideóforo de Enterobactina	+	+	+	+	+
Sideróforo de Salmoquelina	+	+	+	+	+
Transporte Hierro-Manganeso	+	-	+	+	+
PILI					
fim (Tipo 1)	+	+	+	+/nf	+
pap (P)	++	+	+	+/nf	+
Sfa (S)	+	+	+	-	-
Foc (FiC)	+	+	-	+/nf	-
SPATEs					
Hly (hemolisina)	+	++	+	+/nf	-
Vat	+	+	+	?	+
Sat	+	-	-	?	-
UpaH	++	?	?	?	?

*CFT073 (*E. coli* que Secreta a Sat), 536 (Aislamiento de Pielonefritis), UT189 (Aislamiento de Cistitis), ABU 83972 (Bacteriuria Asintomática por *E. coli*), APEC-01 (*E. coli* Patógena Aviar)

FIMBRIAS EN UPEC

Las cepas UPEC han desarrollado diversos mecanismos para soportar situaciones como el flujo en la vejiga, tanto las fimbrias de tipo 1 como las tipo P contribuyen al establecimiento de la bacteria en el epitelio (*Keira Melican y cols. 2011*). Las fimbrias P y tipo 1 actúan en sinergismo para facilitar la colonización bacteriana y poder soportar los cambios físicos del tracto urinario, la principal función de la fimbria tipo



P es servir como una capa base, ya que tiene la capacidad de inserción a las células epiteliales, ésta inserción se lleva a cabo cuando ocurre la adherencia de las bacterias con los glicolípidos de las membranas celulares del huésped, posteriormente la fimbria tipo 1 genera un biofilm que se va desarrollando a partir de la primera capa de células, las capas se van incrementado su volumen hasta la obstrucción del centro del túbulo donde no hay epitelio al cual se fijan. Las bacterias forman una población heterogénea de fimbrias para poder evitar los flujos que se encuentran en contra, con esta capa (tapón) disminuyen la intensidad del flujo urinario en los microtúbulos los que pueden ser sellados por completo (Keira Melican y cols. 2011).

CAPTACIÓN DE HIERRO

Para las bacterias un factor esencial para sobrevivir, es la captación de hierro necesario para procesos celulares. En el huésped mamífero, las concentraciones de hierro son muy bajas en el tracto urinario. Para el crecimiento, las bacterias necesitan obtener hierro, UPEC ha desarrollado múltiples estrategias para extraer el hierro del huésped, para llevar a cabo esta tarea se ha dotado de la facultad de expresión de los sistemas de adquisición de hierro que utilizan sideróforos para capturar el hierro del medio y posteriormente concentrarlo en el citosol bacteriano. Los sideróforos son secretados al medio como moléculas de bajo peso molecular que tienen una alta afinidad por el hierro férrico (Fe^{+3}), que es insoluble como catión libre (Andrews y cols. 2003). Las bacterias capturan a los sideróforos por medio



de receptores especiales que se encuentran en la membrana externa de la misma, lo que facilita el transporte de complejos de hierro a través de la membrana bacteriana hasta el citosol donde el hierro se libera.

Limitar la disponibilidad de hierro es una importante defensa del huésped contra la invasión de patógenos bacterianos, los organismos eucariotes usan quelantes de hierro como la lactoferrina y transferrina para eliminar el hierro libre transportado dentro y fuera de las células con lo que no dejan que las bacterias obtengan hierro. UPEC expresa una gran variedad de opciones para la adquisición de hierro algunos de estos aparentemente iguales, como los sideróforos; salmochelina, yersiniabactina, y aerobactina. La salmochelina es una variante de enterobactina que ha sido modificada por glucosilación a través de la acción de la glucosiltransferasa, esta modificación hace que la salmochelina impida su reconocimiento y beneficia así el secuestro de hierro (Croxen A. Matthew, 2009).

La transferrina es una proteína transportadora que se conserva entre los mamíferos (Keira Melican y cols. 2011). Sin embargo, un sideróforo común conocido como la enterobactina compite con la transferrina por la fijación del hierro, la transferrina permite suprimir la capacidad de colonizar en sitios con poco hierro disponible como las vías urinarias (Croxen A. Matthew, 2009).



TOXINAS SECRETADAS

En general las bacterias utilizan diferentes mecanismos que contribuyen a facilitar su invasión hacia los tejidos del huésped, al respecto UPEC se ha dotado de grandes armas químicas como son las toxinas que le facilitan colonizar exitosamente. Las Cepas Viec carecen del sistema de secreción tipo III que un gran número de patógenos utilizan para inducir cambios en las células huésped para infectar, sin embargo, UPEC en su lugar utiliza los sistemas denominados tipo I y tipo V primero para liberar hemolisinas que son útiles para la obtención de hierro y el segundo para secretar demás toxinas. El sistema de secreción del tipo V se ha definido como de autotransporte por lo que las proteínas secretadas se conocen como autotransportadas. Estas en general son proteínas de gran tamaño y están compuestas de una secuencia señal (N-terminal), un dominio denominado "pasajero", ya que este sirve como canal en el que se transportan las toxinas al exterior, excede los 100 kDa, y un dominio β o C-terminal (translocador) con un peso aproximado de ~30 kDa. Un ejemplo de este son las Serina Proteasas Autotransportadas de la familia Enterobactereacea (SPATEs).

α -HEMOLISINA (HlyA) y FACTOR NECROSANTE TIPO 1 (CnF1)

La α -hemolisina (HlyA) está codificada en alrededor del 50% de las cepas de UPEC y su expresión se asocia con un aumento de la gravedad clínica de los pacientes con infección del tracto urinario (Marrs y cols. 2005). HlyA es una toxina de 110 kDa dependiente de calcio, es capaz de formar poros de hasta 2nm en toda la



membrana celular, dando lugar a la lisis celular, esto ocurre cuando hay grandes concentraciones de HlyA. Los ambientes en los que UPEC se desarrolla son generalmente pobres en nutrientes, por lo que la principal función y beneficio que se obtiene con la expresión de HlyA es la destrucción de las células del huésped para la liberación de nutrientes y otros factores, como el hierro, que son fundamentales para la colonización bacteriana como se explicó anteriormente (Croxen A. Matthew, 2009).

No está claro con qué frecuencia HlyA alcanza niveles lo suficientemente altos como para lisar las células blanco durante el curso de una infección grave. Por el contrario, concentraciones bajas de HlyA son más relevantes ya que en estudios recientes se ha demostrado que las concentraciones bajas, provocan una variedad de señales, incluyendo la estimulación transitoria de las oscilaciones de calcio, la activación de MAP cinasa que son parte de señalización y alteración de la fosforilación de las histonas y los patrones de acetilación (Hamon y cols. 2007; Ratner y cols. 2006).

El factor de necrosis 1 (CnF1) es una toxina producida por cepas de UPEC y es secretada para poder colonizar al huésped. Aproximadamente un tercio de las cepas de UPEC codifican para CnF1, esta toxina pesa alrededor de 113 kDa, y se le atribuye la capacidad para activar constitutivamente la Rho GTPasas. La activación de las Rho GTPasas afecta numerosas funciones celulares incluyendo, la formación de fibras de estrés de actina, la alteración de la membrana, y la modulación de la señalización para el proceso inflamatorio. Para ejercer sus



efectos, CnF1 debe tener acceso al citosol de la célula blanco, utilizando las células adheridas inicialmente provocando la introducción de la toxina en un compartimiento endosomal. Debido a las condiciones ácidas dentro del endosoma se puede inducir la translocación del dominio catalítico de CnF1 a través de la vacuola y en el citosol es donde se estimulan las Rho GTPasas. La activación prolongada de las Rho provoca una degradación de la pared celular (Croxen A. Matthew, 2009). La expresión de CnF1 puede influir en la patogénesis de la UTI ya que CnF1 pueden promover la apoptosis del las células de epitelio de la vejiga, estimulando su exfoliación y haciendo más fácil el acceso de las bacterias a los tejidos subyacentes (Davis y cols. 2006) reportaron que la secreción de CnF1 inhibe la actividad fagocítica y quimiotáctica de neutrófilos. En concreto CnF1 puede facilitar la difusión y persistencia de UPEC en el tracto urinario.

SERIN PROTEASAS AUTOTRANSPORTADAS DE LA FAMILIA ENTEROBACTERIACEAE (SPATE´S)

UPEC también cuenta con genes que codifican para toxinas secretadas por el sistema de secreción tipo V, entre estas se incluyen: Vat (Vacuolating auto transporter), Pic (Protein invoved in colonization), Sat (Secreted autotransporter toxin) y Tsh.

Vat y Sat fueron inicialmente caracterizadas por su capacidad de inducir una gran variedad de efectos citopáticos en las células del huésped, incluyendo vacuolización e hinchazón. Se ha demostrado que Sat es responsable de



ocasionar el daño renal observado en las ITU relacionadas con la infección por UPEC. El efecto se relaciona con la disolución de la membrana glomerular, pérdida de las células epiteliales tubulares y la vacuolización del tejido de los riñones (Guyer y cols. 2002). Sat no parece influir en la capacidad de UPEC para colonizar el epitelio. Las toxinas expresadas por UPEC no necesariamente son secretadas como proteínas solas, sino que pueden estar asociadas con vesículas de membrana externa (VME) para evitar la degradación de las células. Las VME son utilizadas por muchas especies bacterianas para facilitar la comunicación entre especies, el intercambio de material genético, adherencia bacteriana, invasión de las células y la entrega de las toxinas. La proteína Sat es citotóxica para células de riñón (células VERO), vejiga humana (células HK-2) y líneas celulares HEp-2. Esta proteína al estar en contacto con las células del huésped, provoca elongación celular y vacuolización de las células de la vejiga y del riñón, esto mediado por su actividad de proteasa y su internalización en las células huésped. Además se ha reportado que Sat tiene la capacidad de romper la fodrina y actúa principalmente como una toxina citotóxica pero no muestra ninguna actividad de hemaglutinina (Dautin Nathalie, 2010).

VAT

Vat tiene al igual que Sat una actividad vacuolizante, induce la formación de vacuolas intracelulares lo que sugiere que dicha proteína también participa en el daño ocasionado durante la infección por UPEC. Al igual que para Sat, el efecto



de Vat se ha relacionado con su actividad de proteasa, sin embargo, hasta el momento no se han identificado sustratos para Vat (Pinaki R. Dutta y cols. 2002).

PIC U

Pic fue identificada inicialmente en cepas de Shigella flexneri y de EAEC, posteriormente se encontró un homólogo de dicha proteasa en cepas UPEC por lo que a esta se le denominó Pic U. Se ha identificado que Pic estimula la secreción de moco, degrada la hemoglobina y la mucina, se une al grupo hem e induce efecto de hemaglutinación (Matthew A. Croxen y cols. 2010; Navarro y cols. 2011).

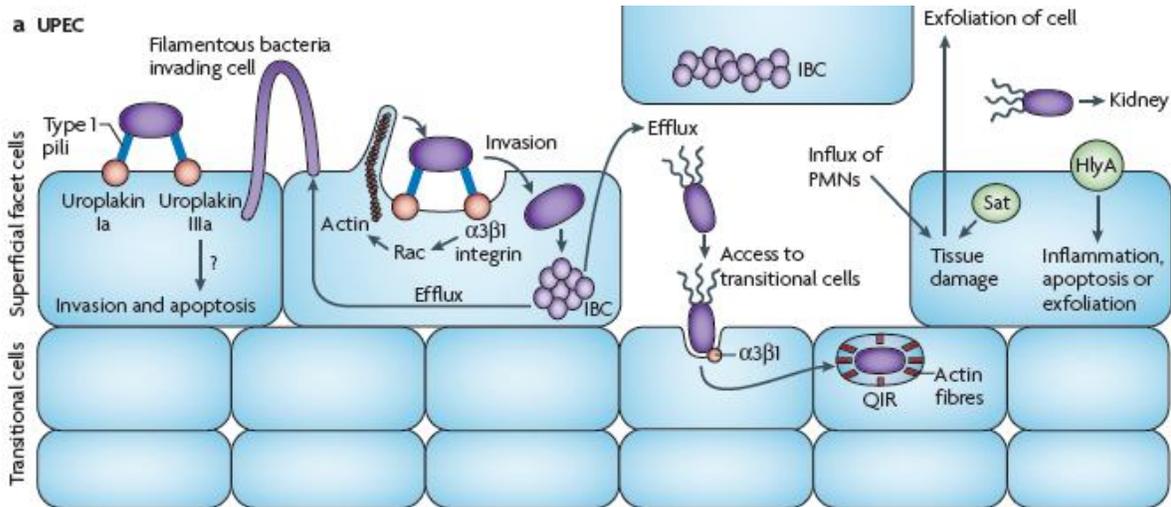


Figura 2: Los Mecanismos Patógenos de *Escherichia coli* Extraintestinales. Las diferentes fases de infección de UPEC. a | *E. coli* uropatógena (UPEC) se une al epitelio de la vejiga a través de los pili tipo 1, que se unen a los receptores uroplakin Ia y IIIa; esta unión estimula desconoce las vías de señalización (indicado por el signo de interrogación) que median en la invasión y la apoptosis. La unión de los pili tipo 1 a las integrinas $\alpha3\beta1$ también media la internalización de las bacterias en las células de aspecto superficial para formar las comunidades de bacterias intracelulares (IBC) o las vainas. La hemolisina media la formación de poros A (HlyA) esta toxina puede inhibir la activación de las proteínas Akt y conducir a la apoptosis de las células huésped y exfoliación. Exfoliación del epitelio de la vejiga expone las células de transición subyacentes de la invasión, UPEC puede vivir en estas células en reposo como reservorios intracelulares (QIR) que pueden estar implicados en las infecciones recurrentes. (Matthew A. Croxen y B. Brett Finlay 2009)



PET

Pet es una proteasa que originalmente se identificó en cepas EACE, se considera el prototipo para el estudio de las autotransportadoras (SPATEs) y un hecho interesante es que tiene alta identidad con Sat con solo mínimas diferencias en la secuencia. Sin embargo, biológicamente se ha identificado que muestran algunas diferencias en su comportamiento (*Eslava C. y cols. 1998; Guyer D, y cols. 2002*).

Se ha reportado que Pet se internaliza a la célula por endocitosis dependiente de clatrina, posteriormente es transportada por el retículo endoplásmico hasta el citosol. Una vez en el citoplasma, la toxina daña el citoesqueleto rompiendo la fodrina (espectrina en eritrocitos) induciendo efectos citopáticos que ocasionan el desprendimiento celular de los sustratos (*Dautin Nathalie, 2010; Villaseca y cols. 2000*).

PHAGE DISPLAY.

El método de Phage Display ha adquirido enorme impacto ya que representa una alternativa en el campo del diagnóstico clínico. Mediante esta metodología es posible seleccionar péptidos expresados en la proteína III de la superficie del bacteriófago filamentoso M-13, que son mimótopos de epítomos inmunodominantes de proteínas. El sistema se originó a través de generar una biblioteca de péptidos que fue fusionada genéticamente a una de las proteínas (P III) de superficie de los fagos filamentosos. La relativa sencillez de manipulación de fagos permite la generación rápida de diferentes moléculas (mimótopos), a un



bajo costo y poco tiempo con ventajas sobre otras técnicas para el desarrollo de biomoléculas que pueden ser utilizadas en el diagnóstico clínico. El método de Phage Display, ha sido utilizado para la detección de agentes biológicos tales como toxinas, bacterias, esporas y virus, como en el caso de la hepatitis B y C, el procedimiento ha resultado exitoso para la identificación de epítopes y mimótopos relevantes de diferentes proteínas. Mediante el empleo de sueros de pacientes infectados se pudieron detectar secuencias de péptidos específicos expresados en la infección por el virus del papiloma humano (HPV), con este sistema los mimótopos seleccionados pueden ser utilizados para la detección de péptidos, toxinas o el factor relacionado con la infección por HPV y de lesiones precancerosas. Su uso no está limitado a las infecciones bacterianas o virales, también se ha utilizado en enfermedades parasitarias como es el caso de la neurocisticercosis, donde utilizando bibliotecas de péptidos al azar fue posible la caracterización de anticuerpos específicos presentes en el líquido cefalorraquídeo de pacientes parasitados, teniendo aplicaciones también en la identificación de varios tipos de cáncer y enfermedades autoinmunes (*Valery A. Petrenko y cols. 2003*).

Para que un método de diagnóstico sea efectivo debe cumplir con normas de calidad, como sensibilidad, especificidad, sencillez, bajo costo y alcance para la población. El objetivo de un método de diagnóstico para un problema de salud pública como lo son las ITU, es que mediante este se pueda realizar la identificación oportuna del agente causal de la enfermedad, lo que posteriormente contribuirá a implementar el tratamiento adecuado.



3.- JUSTIFICACIÓN



Las infecciones del tracto urinario (ITU) son un problema de salud pública en el país, su tasa de morbilidad es muy alta (INEGI, 2012) y esto se debe entre otros aspectos a la recurrencias de la infección ya sea por el tratamiento empírico que se realiza y/o en conjunto con la resistencia o multiresistencia a los antimicrobianos que presenta el agente causal del padecimiento. El 80-90% de las ITU en la comunidad, son causadas por *E. coli* de los serogrupos UPEC, estos se caracterizan por presentar diferentes propiedades de virulencia entre las que se incluyen diversos tipos de fimbrias y toxinas incluidas en estas a integrantes de la familia de las SPATE's, el grupo UPEC expresa una o dos variedades de dichas proteasas (Sat, Pic, Vat). Como ya fue mencionado estas son proteínas de alto peso molecular (más de 100 kDa) y altamente inmunogénicas; característica esta última que las hace buenas candidatas para el desarrollo de métodos de diagnóstico mediante el empleo de anticuerpos específicos, para realizar su detección directa en muestras clínicas. En un trabajo previo (Hernández Chiñas y cols. 2009), utilizando el Método de Phage Display identificaron motivos inmunodominantes en Pic y Pet los que al ser analizados por Blast, se identificaron en las secuencias reportadas para diferentes integrantes de las SPATEs. En estudios previos (Hernández Chiñas y cols. 2009; González Cesar 2008; Arteaga Nancy, 2010), se identificó que aproximadamente el 30% de cepas de *Escherichia coli* aisladas de pacientes con infección de vías urinarias eran productoras de SPATEs. Por tal motivo es que se considero de interés evaluar la



posibilidad de emplear anticuerpos que reaccionen con sitios inmunodominantes de dichas proteasas, para realizar la detección de SPATE´s en muestras clínicas de tal forma que se pueda contar con un sistema que permita la detección rápida de cepas UPEC y así asegurar o descartar su participación en el proceso infeccioso de las ITU.



4.- HIPÓTESIS



Anticuerpos obtenidos contra mimótopos de regiones inmunodominantes de las Serina Proteasas Pet, Pic y Sat secretadas por *Escherichia coli* Uropatógena (UPEC), son útiles para la detección de las proteasas en muestras de orina de pacientes con infección de vías urinarias.



5.- OBJETIVO GENERAL



Obtener anticuerpos contra péptidos mimótopos de Pet, Pic y Sat, para evaluar su utilidad en el desarrollo de un sistema para la detección de dichas Proteasas en muestras clínicas.



6.- OBJETIVOS PARTICULARES



- Purificar las proteínas Pet, Pic y Sat.
- Obtener anticuerpos anti-mimótopo de las SPATE´s, Pet, Pic y Sat de conejos inmunizados con diferentes fagótopos.
- Purificar las Gamma globulinas del suero de los conejos inmunizados.
- Diseñar péptidos con las secuencias identificadas en los fagótopos seleccionados.
- Evaluar la reactividad contra Pet, Pic y Sat de las IgG´s obtenidas tanto contra los fagótopos como contra los péptidos mimotopos sintéticos diseñados.
- Implementar un sistema simple (prototipo), para identificar las proteínas Pet, Pic y Sat en muestras de orina, utilizando los anticuerpos anti-mimótopo.



7.- MATERIALES Y MÉTODOS



7.1. Propagación de Fagotopos

Se seleccionaron 6 clonas de bacteriófagos M13 seleccionadas por el método de Phage-Display utilizando anticuerpos anti-Pet y anti-Pic obtenidos en conejos y del sueros de dos niños infectados naturalmente con EAEC productora de de Pet y Pic (Hernández Chiñas y cols. 2009). Cada una de las clona expresa en su superficie péptidos de 12 aminoácidos con el motivos PQPxK, PGxxN o PDDSS correspondientes a sitios inmunodominantes de Pet, Pic y Sat respectivamente (Cuadro 3). Ciento cincuenta microlitros de cada una de las clonas (10^{12} ufp/mL) se colocaron en un matraz con 1.5 L de 2xYT/Tetraciclina con 15 mL del cultivo en fase logarítmica de la *Escherichia coli* ER2738 (New England Bio Lab), bacteria que expresa el pili F receptor específico de los bacteriófagos M13. El cultivo se incubo 4.5 horas a 37°C en agitación (200 r.p.m) (Estufa con agitación, Newbrunswick). Los bacteriófagos se recuperaron después de centrifugar a 17,000g por 15 min. (Sorval RC 5). El sobrenadante obtenido se transfirió a un matraz, el cual contenía $\frac{1}{4}$ de volumen de polietilenglicol 8000 al 20% con NaCl 2.5M estéril (PEG-NaCl) para precipitar los fagos. La mezcla se dejo en reposo durante toda la noche a 4°C, al concluir se centrifugó a 17,000g durante 15 minutos, el precipitado obtenido se suspendió con PBS (1mL). Para asegurarnos de solo tener fagos, el tubo se volvió a centrifugar con las mismas condiciones durante cinco minutos y el sobrenadante se pasó a un tubo nuevo para ser almacenado a 4 °C.



7.2. Cuantificación de Fagótopos

Para conocer el número de fagos obtenidos de cada amplificación se realizaron diluciones seriadas a partir de 10^1 hasta 10^3 . De cada dilución se tomo 1µL que se colocó en 200µL de un cultivo de la Cepa *E. coli* ER2738 crecido toda la noche, la mezcla se dejo incubar 3 minutos a temperatura ambiente y una vez transcurrido el tiempo de incubación la mezcla se agrego a Agarosa fundida (4ml) que fue vertida a una caja con agar LB/tetraciclina que se incubo toda la noche a 37°C. Las placas lisogénicas inducidas por los fagos se contaron y el número obtenido se multiplico por el factor de dilución para determinar las UFP obtenidas en cada propagación.

Cuadro 3. Fagótopos Seleccionados para la Inmunización de Conejos y Obtención de Anticuerpos.

Clona	Secuencia de Aminoácidos del Péptido Fusionado al Fago M13	Ubicación del Motivo en la Secuencia Lineal			Nomenclatura Utilizada para Definir el Origen de los Sueros y su Respectiva Gama Globulina	
		Pet	Pic	**Sat	Suero	γ-globulinas
*FP3-1	ILLPQPPKLLLP	NU	NU	NU	SP3-1	γP3-1
FP3-7	APLPQPNKPHL F				SP3-7	γP3-7
FPet-1	TYPGYINSKAS	⁷⁷ PGSTH ⁸¹	⁸⁹ PGAND ⁷³	⁷⁸ PGSTD ⁸²	SPet-1	γPet-1
FPet-3	QGIHPYPGYINH				SPet-3	γPet-3
FPic-1	CNPDDSSMC	¹⁰⁰ PDFSS ¹⁰⁴	⁹³ ADFSS ⁹⁷	¹⁰¹ PDFSG ¹⁰⁵	SPic-1	γPic-1
FPic-6	CSLDDSSTC				SPic-6	γPic-6

UN, no se Ubico en la Secuencia Lineal.* F. Fagotopo; **Se Incluye la Ubicación en Sat por su Alta Homología con Pet y su Presencia en UPEC.



7.3. Obtención de Anticuerpos Anti Fagótopo

Para la obtención de anticuerpos contra cada uno de los fagótopos seleccionados (**Cuadro 3**), se utilizaron ocho conejos Nueva Zelanda de aproximadamente 2.0 Kg de peso, previo a la inmunización se evaluó la ausencia de anticuerpos contra las proteínas Pet, Pic y Sat, tomando una muestra de sangre de la vena marginal previa asepsia de la zona con alcohol (70%), utilizando una aguja de 22x32 estériles (Medicor). La sangre se colectó en tubos Eppendor para microcentrifuja de 1.5 mL estériles (Axigen). Para la formación del coagulo, los tubos con las muestras de sangre se incubaron 1 hora a 37°C, y el suero se obtuvo después de centrifugar los tubos a 3000g (Sorvall 6000) por 5 min. Al suero obtenido se le midió la reactividad contra las proteínas Pet, Pic y Sat por un ensayo de Western-Blot (**Ver Sección 7.6**). Todos los experimentos con animales fueron desarrollados de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 (técnica específica para la producción, cuidados y uso de animales de laboratorio) vigente. Una vez que se seleccionaron los conejos que no presentaban anticuerpos contra alguna de las SPATE´s en estudio (Pet, Pic y Sat), se inició la inmunización administrando a cada conejo uno de los 6 fagótopos seleccionados (**Cuadro 3**). Cada uno de las clonas de fagos se amplificó como anteriormente fue referido y la muestra para inocular se ajustó a 1×10^{15} o 1×10^{13} UFP diluido en SSI (Solución salina isotónica). Para la inmunización de conejos se utilizó el esquema reportado por (*Galfrè y cols. 1996*) con las modificaciones que se señalan a continuación:



Día 0 Primera inmunización 1×10^{15} UFP en solución salina.

Día 20 Segunda inmunización 1×10^{13} UFP en solución salina.

Día 35 Tercera inmunización 1×10^{13} UFP en solución salina.

Día 50 Cuarta inmunización 1×10^{13} UFP en solución salina.

Día 60 Sangría a blanco de los conejos.

Antes de cada inmunización se tomo de la vena marginal de la oreja, una muestra de sangre (2 mL) como se mencionó anteriormente. La administración de los inoculo se llevó a cabo por vía subcutánea aplicando sobre el dorso del animal previa asepsia con alcohol (70%).

Diez días después del último desafío que corresponde a 60 días después de la primera inmunización, se realizó sangría a blanco por punción cardiaca previa anestesia de los conejos con asepsia de la zona con alcohol al 70%. La sangre se colectó en tubos cónicos (Corning de 50 mL estériles), posteriormente se obtuvo el suero siguiendo la metodología descrita previamente. El suero se colocó en alícuotas (1 mL) y se mantuvo en congelación a -70°C hasta su uso.

7.4. Obtención de γ -Globulinas

Con la intención de tener resultados en los que se pudiera evidenciar con más intensidad la reactividad de los anticuerpos, se precipito la fracción gamaglobulina del suero cuya precipitación se realizó con una solución saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$



4.1M. Para iniciar la precipitación se agregó la solución saturada 50%(v/v) del volumen total de la muestra, agregando la solución de sulfato de amonio lentamente al suero en agitación a 4 °C, después de 20 minutos el precipitado se centrifugó 16,000g. (Sorvall 6000) por 30 minutos, se decanto el sobrenadante y el precipitado se homogeniza con PBS en el volumen original de la muestra. Una segunda precipitación se realizó con un volumen de solución de sulfato de amonio al 33% (v/v) del volumen total de la muestra, agregando dicho volumen de la solución saturada, nuevamente se dejó en agitación a 4°C, después de 20 minutos el precipitado se recuperó como anteriormente fue referido. Para eliminar el exceso de sulfato de amonio la gamaglobulina precipitada se dializó en agua manteniendo a 4°C, realizando dos cambios de cuatro litros al día cada uno, por 3 días. Las muestras se guardaron en alícuotas de 3 mL a -70°C y posteriormente se liofilizaron para una mejor conservación.

7.5. Electroforesis en SDS-Page de Pet, Pic y Sat

Para la obtención de las toxinas Pet, Pic y Sat se utilizaron los sobrenadantes del cultivo de las clonas *E. coli* HB101 (pCEFN1) (*Eslava y cols. 1998*), *E. coli* HB101 (pP56) (*Henderson y cols. 1999*) y *E. coli* HB101 (pPDG4) (*Guyer y cols. 2002*) respectivamente siguiendo el procedimiento descrito por (*Villaseca y cols. 2000*). Las proteínas precipitadas con sulfato de amonio al 60% se analizaron por electroforesis en SDS-PAGE en una dimensión, bajo condiciones desnaturalizantes en geles de poliacrilamida con 0.1% (p/v) de dodecil-sulfato de



sodio, las muestras a analizar se pusieron en presencia de β -mercaptoetanol y SDS. Las dimensiones del gel resolutor (separador) fueron de 10 cm de altura por 1.0 mm de espesor. La corriente aplicada al gel concentrador fue de 100 V y de 200 V al gel resolutor; en ambos casos con el amperaje variable. La migración relativa de las proteínas y su peso molecular aproximado fue analizada al comparar con marcadores pre-teñidos de peso molecular conocido (Precisión Plus Protein Standards, BIORAD). Los perfiles proteicos obtenidos en SDS-PAGE se visualizaron después de que los geles fueron teñidos con azul de Coomassie R (Coomassie Brilliant Blue R, Sigma Chemical Co.).

7.6. Inmuno Electrotransferencia (Western-Blot)

Las proteínas separadas (Pet, Pic o Sat) por SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad, USA) de acuerdo al procedimiento descrito por (Towbin y cols. 1979). La transferencia se realizó utilizando amortiguador Tris 0.1 M (0.25% w/v), glicina (1.2% w/v) y metanol (16.6% v/v) a 200 mA constante durante 90 min. La eficiencia de la transferencia, se analizó realizando una tinción reversible de las membranas utilizando rojo de Ponceau (0.01%). Una vez corroborada la presencia de las proteínas, la membrana se destiñó con PBS/Tween 0.01% (PBS-T), los espacios libres se bloquearon incubando las membranas durante toda la noche (a 4°C) con leche descremada al 5% en PBS (PBS-L). Para evaluar la respuesta de los anticuerpos, las membranas se lavaron tres veces con PBS-T (5 min cada una) y se les adicionaron en forma individual los



anticuerpos obtenidos del suero de los conejos inmunizados con las proteínas (Pet, Pic, Sat) así como el suero preinmune a diluciones 1:50 y 1:100 en PBS-L. La respuesta se hizo evidente incubando posteriormente las membranas con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina (Zymed, USA) a una dilución 1:3500 en PBS-L. La reacción se visualizó agregando BCIP/NBT (Sigma-Aldrich, USA) y se detuvo con agua corriente.

7.7. Reactividad de los Anticuerpos de Conejo vs Fagótopos Homólogos Evaluada por el Método de Elisa

Para evaluar la respuesta del suero de los conejos inmunizados con las clonas de fagos F3-1, F3-7, FPic-1, FPic-6, FPet-1 y FPet-3 contra sus fagótopos homólogos, se desarrolló una prueba de ELISA indirecta (**Figura 3**). Los pozos de una placa de ELISA (Nunc-Immuno Plate, MaxiSorp F96, NUNC, Dinamarca) se cubrieron con los anticuerpos de los conejos pre-inmune e inmune a una dilución del suero 1:50 en buffer de carbonatos (200µL por pozo) o 200 µg de las y globulinas en 200 µl del buffer de carbonato. Las placas se incubaron toda la noche a 4°C, al día siguiente se lavó con PBS-T y los espacios libres se bloquearon con 200 µl PBS-BSA durante 2 h a temperatura ambiente (TA); después de cinco lavados con PBS-T se adicionaron 200 µl de PBS que contenían 10^9 - 10^{10} UFP de las diferentes clonas amplificadas anteriormente. La reactividad IgG-fago fue identificada con el anticuerpo anti-M13 (New England Bio Labs, USA) a una dilución de 1:3000 en PBS-BSA por 1 hora a 37°C y se lavó 6 veces con



PBS-T. Para identificar la reacción antígeno-anticuerpo, se utilizó anti-IgG de conejo (1:1000) marcada con fosfatasa alcalina (Zymed, USA). La cantidad de anticuerpo secundario unido fue estimado por la adición del sustrato ABTS (Sigma-Aldrich, USA) incubándolo a 37 °C por 20 min, la placa se leyó a 405 nm en un lector de ELISA (MR580, Dynatech). Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

ELISA contra los fagótopos correspondientes

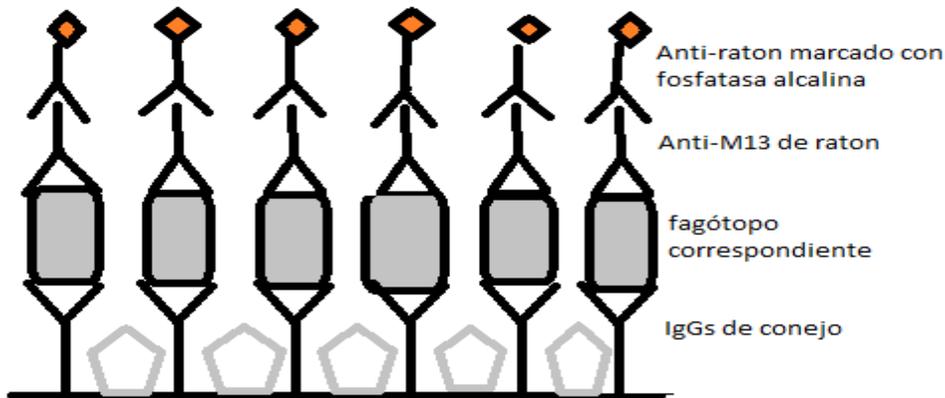


Figura 3: Esquema de ELISA Indirecto

7.8. Péptidos Sintéticos

Con las secuencias obtenidas de los fagótopos FP3-1 y FPet-1 portadores de las secuencias PQPxK y PGxxN (**Cuadro 3**), se diseñaron los péptidos **P1** (TYPGYINHSKAS), **P2** (ILLPQPPKLLLP) y **P3** (CNPDDSSMC) que fueron sintetizados por la compañía Biosynthesis (*Lewisville, Texas*).



7.9. Reactividad de Anticuerpos Anti-Fagótopos Contra los Péptidos Sintéticos

Con el propósito de conocer si se generaron anticuerpos en el conejo contra el péptido fusionado al fago, después de inmunizar con el fagótopo F3-1, F3-7, FPic-1, FPic-6, FPet-1 y FPet-3, se realizó un ensayo de ELISA como se describió previamente, pero en esta ocasión se recubrieron los pozos de una placa de ELISA (Nunc-Immuno Plate, MaxiSorp F96, NUNC, Dinamarca) con 1.25, 1.5, 5, 10, 15 y 20 $\mu\text{g/mL}$ de los péptidos sintéticos **TYPGYINHSKAS (P1)**, **ILLPQPPKLLLP (P2)** y **CNPDDSSMC (P3)** disueltos en amortiguador de carbonato 0.2M, pH 9.5. La placa se incubó toda la noche (4°C), concluido el periodo de incubación se bloquearon los espacios libres con BSA 2% en PBS (w/v), posteriormente se lavo en tres ocasiones con PBS-T y se agregaron los diferentes sueros de conejo a cada uno de los pozos a una dilución 1:50 en PBS-BSA o 200 μg de las gammaglobulinas $\gamma\text{P3-1}$ y $\gamma\text{P3-7}$ (se decidió trabajar solo con las muestras $\gamma\text{P3-1}$ y $\gamma\text{P3-7}$, porque estas se obtuvieron en mayor cantidad después del liofilizado). La detección del complejo antígeno-anticuerpo se realizó agregando anti-IgG de conejo (1:1000), marcados con fosfatasa alcalina y utilizando como sustrato p-nitrofenilfosfato (Sigma-Aldrich, USA), disolviendo 1 pastilla del sustrato en 5 mL de buffer de citratos y de esta solución se añade 200 μL por pozo, se incubó a 37°C durante 15 y 20 minutos, la reacción colorida se midió su absorbencia a una longitud de 405 nm en el lector de ELISA (Dynatech) (**Figura 4**). Como en las ocasiones anteriores el ensayo se realizó por duplicado.



ELISA contra péptidos sintéticos

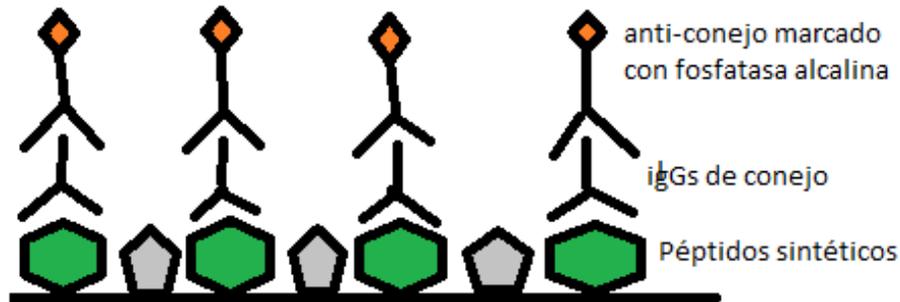


Figura 4: Esquema del Ensayo de ELISA Vs Péptidos Sintéticos.

7.10 Sensibilidad de los Anticuerpos Anti-Fagótopos

Para medir la sensibilidad de los sueros de conejos obtenidos contra los diferentes fagótopos (FP3-1, FP3-7, FPic-1, FPic-6, FPet-1 y FPet-3) se realizó nuevamente un ensayo de ELISA como se mencionó anteriormente. En este ensayo se colocaron $2\mu\text{g}$ de los péptidos P1 o P2 ($200\mu\text{L}$ por pozo a partir de una concentración de $10\mu\text{g/mL}$) diluidos en buffer de carbonatos en cada pozo, incubándolo a 4°C durante la noche, después de los lavados con PBS-T, se adicionó el suero de los conejos en diluciones seriadas al doble desde 1:50 y hasta 1:1600 o las γ -globulinas de los mismos sueros a concentraciones de 0.0156 a 10 mg/mL . Como anticuerpo secundario se utilizó anti- IgG de conejo marcado con fosfatasa alcalina en una dilución 1:1000 en PBS/BSA 0.1% y se reveló utilizando el sustrato de fosfatasa alcalina, bajo las condiciones antes mencionadas. La reactividad se leyó a una longitud de 405 nm . (**Figura 4**)



7.11 Reactividad de las γ -Globulinas de Conejos Inmunizados Contra los Péptidos Sintéticos

Una vez determinada la cantidad específica de antígeno (péptidos 10 μ g) y γ -globulinas (200 μ g) óptimas para las lecturas, se analizó la reactividad de las 6 muestras de γ -globulinas (γ Pic1, γ Pic6, γ Pet-1, γ Pet-3, γ P3-1 y γ P3-7) de conejo obtenidas después de la inmunización con los fagótopos (**Cuadro 3**) contra su péptido homólogo. Se realizó un ensayo de ELISA como se menciona en el apartado anterior utilizando 2 μ g de cada péptido por pozo (colocando 200 μ L a partir de una dilución 10 μ g/mL) y 200 μ g de γ -globulinas a partir de una dilución de 1mg/mL (200 μ L) esto en base a las respuestas obtenidas en la prueba anterior. Como anticuerpo secundario se utilizó una anti-IgG de conejo marcada con fosfatasa alcalina (1:1000), la reactividad se observó añadiendo el sustrato correspondiente (p-nitrofenilfosfato), midiendo a 405 nm. El ensayo se realizó por duplicado.

7.12 Reactividad de los Anticuerpos Anti-Fagótopo Contra SPATE´S

La reactividad de las gamma globulinas γ Pic-1, γ Pic-6, γ Pet-1, γ Pet-3, γ P3-1 y γ P3-7 contra las proteasas en estudio (Pet, Pic y Sat) (**Cuadro 3**) se evaluó en un ensayo de ELISA. Placas de 96 pozos (Nunc-Immuno Plate, MaxiSorp F96, NUNC, Dinamarca) se sensibilizaron con cada una de las tres proteínas a una concentración de 0.8 μ g/mL en buffer de carbonatos, colocando 200 μ L por pozo, se incubó a 4°C durante toda la noche y al siguiente día se lavó 3 veces con PBS-T. Los espacios libres se bloquearon con PBS/BSA 1%, agregando 200 μ L por



pozo e incubando durante una hora a 37°C, posteriormente se lavo 3 veces con PBS-T y se colocaron en forma individual 200µL de las diferentes γ-globulinas (1 mg/mL) diluidas en PBS/BSA 0.1% o anticuerpos específicos para cada una de las proteasas de estudio (Pet, Pic y Sat) y como testigos negativos se utilizaron los sueros pre-inmunes de los conejos inmunizados ambos a una dilución 1:1000. Después de incubar 1 hora a 37°C se lavó 5 veces con PBS-T y se adicionó el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo marcado con fosfatasa alcalina en una dilución 1:1000, se incubo por 1 hora más a 37 °C, se lavo 6 veces con PBS-T y se agregaron 200µL por pozo del sustrato de fosfatasa alcalina, se incuba 15 minutos a 37°C y se lee en el lector de ELISA a una longitud de 405 nm.

7.13 Dot Blot

Con el propósito de desarrollar un método de diagnóstico en base solida como tira reactiva, se evaluó la reactividad de los anticuerpos anti-mimotopo contra las proteínas Pet, Pic y Sat utilizando el método de Dot blot. Diferentes concentraciones de cada proteína (de 1.56 a 100 µg/mL de las proteínas Pet, Pic y Sat) reaccionaron con cada muestra de gama globulinas obtenidas. Dos microlitros de proteína se colocaron sobre una tira de nitrocelulosa (Millipore) de 0.5 cm x 6 cm., se dejó secar por 15 minutos y las tiras se colocaron en una charola con canales independientes (BioRad) que contenían 1 mL de leche descremada al 5% en PBS. La charola con las tiras de nitrocelulosa se incubó durante una hora a temperatura ambiente, posteriormente se lavó con PBS-T tres



veces de 5 minutos cada uno, seguido de la adición de las γ -globulinas de conejo (γ Pic-1, γ Pic-6, γ Pet-1, γ Pet-3, γ P3-1 y γ P3-7) a una concentración de 1mg/mL diluidas en leche al 5%/PBS. Se incubo una hora más a temperatura ambiente, se lavó nuevamente con las mismas condiciones antes mencionadas y posteriormente se colocó anti-IgG de conejo marcado con fosfatasa alcalina a una dilución de 1:3500 en leche 5%/PBS, después de una hora de incubación se lavó y se reveló con el sustrato para fosfatasa alcalina BCIP/NBT (Bio-Rad). Como controles positivos se utilizaron anticuerpos específicos para cada una de las proteasas de estudio (Pet, Pic y Sat) y como testigos negativos se utilizaron los sueros pre-inmunes de los conejos inmunizados ambos a una dilución 1:1000.

7.14 Detección de SPATE´S en Muestras Clínicas de Orina

Se evaluó la aplicabilidad el método de diagnóstico en base sólida para la detección de SPATE´S de estudio (Pet, Pic y Sat) en muestras de orina de pacientes sin enfermedad (ITU), para tal objetivo se evaluaron 3 muestras de orina (10 mL) colectadas de la micción media.

Sobre tiras de nitrocelulosa de 3 cm x 0.5 cm se colocaron por triplicado 2 μ L de cada muestra de orina, estas se analizaron en tres condiciones en la primera se utilizaron directamente la muestra sin tratar, en la segunda se usaron las muestras posterior a una centrifugación (5000 g) y la última se utilizaron después de filtrar las muestras a través de membranas de 22 μ m (Millipore), dichas membranas previamente saturadas con una solución de 40 μ g/mL de BSA. Las membranas de



nitrocelulosa con las diferentes muestras se dejaron secar a temperatura ambiente. Los espacios libres (sin proteínas) de las membranas se saturaron con leche al 5% en PBS por 1 hora a temperatura ambiente, las tiras de nitrocelulosa con las muestras se lavaron 3 veces con PBS-T, posteriormente se agregaron las γ -globulinas (1mg/mL) de cada muestra (γ Pic-1, γ Pic-6, γ Pet-1, γ Pet-3, γ P3-1 y γ P3-7). Como controles positivos se utilizaron anticuerpos específicos para cada una de las proteasas de estudio (Pet, Pic y Sat) obtenidos de conejos inmunizados y como testigos negativos se utilizaron los sueros pre-inmunes de cada conejos (**Cuadro 3**), todos a una dilución 1:1000, como control del anticuerpo secundario se utilizó una tira sin anticuerpo primario y como anticuerpo secundario anti-IgG de conejo marcado con Fosfatasa Alcalina a una dilución 1:3500. La reacción antígeno anticuerpo se observó después de agregar el sustrato BCIP/NBT.

Para la evaluación de la detección de SPATE´S en la muestra de orina filtrada o centrifugada, previamente se colocó 1 mL de orina en tres tubos de 1.5 mL y se le inoculo con 50 μ g de las proteínas Pet, Pic o Sat, de estas muestras se tomaron 2 μ L a las 0, 2 y 4 horas y se colocó sobre una membrana de nitrocelulosa (3 cm x 0.5 cm), como control negativo se utilizó orina filtrada sin inocular. La prueba se visualizó incubando las tiras de nitrocelulosa con las γ -globulinas de conejos inmunizados (**Cuadro 3**) y como controles positivos los anticuerpos obtenidos contra las proteínas Pet, Pic y Sat (1:1000), así como los sueros pre-inmune de tres de los conejos (SPI FPic-1, SPI FP3-1 y SPI FP3-7).



7.15. Análisis Bacteriológico de las Muestras de Orina

En todas las muestras de orina utilizadas se realizó la cuantificación bacterias por el método de vaciado en placa para asegurar que el donante no presentara un proceso infeccioso que influyera en los resultados observados. De cada muestra de orina se tomaron 100µL de orina y se vertieron en una Caja Petri con Agar LB, la muestra se extendió por toda la caja con un rastrillo de metal previamente esterilizado, una vez que la muestra fue uniformemente esparcida se incubo a 37°C por 24 horas, transcurrido el tiempo se cuantificaron las UFC por mL de orina.



8.- RESULTADOS



8.1. Selección de Conejos para Inmunizar

Previo a la inmunización con los fagos que expresaban los mimótopos en estudio, se analizó en el suero de un lote de seis conejos que nos fueron proporcionados por el Bioterio de la Facultad de Medicina, la presencia de anticuerpos (Western Blot) contra diferentes SPATE´s. Los resultados mostraron que el suero de todos los animales presentaba anticuerpos contra las proteínas Pet, Pic y Sat por lo que se evaluó un lote de animales de un bioterio externo (CINVESTAV-IPN). El análisis del suero de estos conejos evaluados por el mismo procedimiento utilizado previamente, reportó que estos no reaccionaban con las proteínas en estudio.

8.2. Amplificación de Clonas de Fagos

Las clonas de fagos FPet-1, FPet-3, FPic-1, FPic-6, FP3-1 y FP3-7 previamente seleccionadas (**Cuadro 3**) se amplificaron, en cinco de estas se obtuvieron entre 10^{15} a 10^{21} UFP/mL, solo la clona FPic-6 requirió una segunda propagación debido a que en la primera el título de UFP fue inferior (10^{13} UFP/mL). La segunda propagación de dicha clona dio 10^{16} UFP/mL, una vez que se contó con el título de fagos adecuado se procedió a realizar la inmunización de conejos para obtener los anticuerpos correspondientes.



8.3.- Reactividad de los Sueros Antifagotopos Contra Pet, Pic y Sat

Con los sueros antifagotopos obtenidos en conejo se analizó si reaccionaban con las proteínas Pet, Pic y Sat en su forma desnaturalizada. Se utilizó un ensayo de Western Blot y en este se observó que los sueros SPic-6 (anti- FPic-6), SPet-1 (anti-FPet-1), SPet-3 (anti-FPet-3) y SP3-1 (anti-FP3-1) reaccionaban con Pic; los sueros SPic-1 (anti-FPic-1), SPet-3 y SP3-1 reconocían a Sat y los sueros, SP3-7, SPet-1 y SPet-3 mostraron reacción con Pet (**Cuadro 4**). Es importante señalar que la intensidad de la respuesta vario con cada anticuerpo y contra cada proteína. Los resultados en conjunto reportaron que se cuenta con anticuerpos específicos contra cada una de las proteínas como es el caso de SPic-1 específico para Sat, SPic-6 específico para Pic y SP3-7 específico para Pet.

Cuadro 4. Reactividad Evaluada por Western Blot de los Sueros de Conejo Anti-Fagótopo Contra Pet, Pic y Sat.

SUERO	Secuencia del Péptido	Pic	Sat	Pet
<u>SPic-1</u>	CSPDDSSTC	--	+	--
<u>SPic-6</u>	CNPDDSSMC	+	--	--
<u>SPet-1</u>	TYPGYINHSKAS	+	--	+*
<u>SPet-3</u>	QGIHPYPGYINH	+	+*	+*
<u>SP3-1</u>	ILLPQPPKLLLP	+	+*	--
<u>SP3-7</u>	APLPQPNKPHLF	--	--	+

(+*) Representan Respuesta poco Intensa, los Espacios Marcados con (--) Indican que no se Presento Respuesta Contra Alguna de las Proteinas, y los Marcados con (+) Señalan los Sueros con Respuesta Evidente hacia la Proteína.



8.4. Purificación de γ -Globulinas de Anticuerpos Anti Fagótopos y Reactividad de estas Contra el Fagotopo Homólogo.

La purificación de inmunoglobulinas de los diferentes sueros anti-fagótopos, mostró una fracción pura (*Figura 5*), el rendimiento que se obtuvo fue en promedio de 2.26 mg/mL, la más alta concentración, la muestra de SPic-1 (3.23mg/mL) y la más baja de 1.95 mg/mL de SPic-6 (*Cuadro 5*). Las diferentes IgGs se liofilizaron y se ajustó su concentración a 1mg/mL para evaluar su reactividad contra los fagótopos homólogos. Los resultados mostraron una respuesta con las IgGs hasta tres veces mayor (SPic-1) que la obtenida con los anticuerpos totales, en todos los casos la respuesta (D.O.) de las IgGs purificadas fue más intensa que la obtenida con los sueros (*Figura 6*).

Cuadro 5. Rendimiento de IgG's Purificadas y Liofilizadas Obtenidas de Sueros de Conejos Inmunizados con Fagótopos.

Muestra	Volumen de Suero Colectado	Cantidad Total del Liofilizado	Rendimiento
SPic-1	72 mL	233 mg	3.23 mg/mL
SPic-6	61 mL	119 mg	1.95 mg/mL
SPet-1	63 mL	88 mg	1.33 mg/mL
SPet-3	63 mL	151 mg	2.39 mg/mL
S3-1	76 mL	189 mg	2.48 mg/mL
S3-7	66 mL	146 mg	2.21 mg/mL

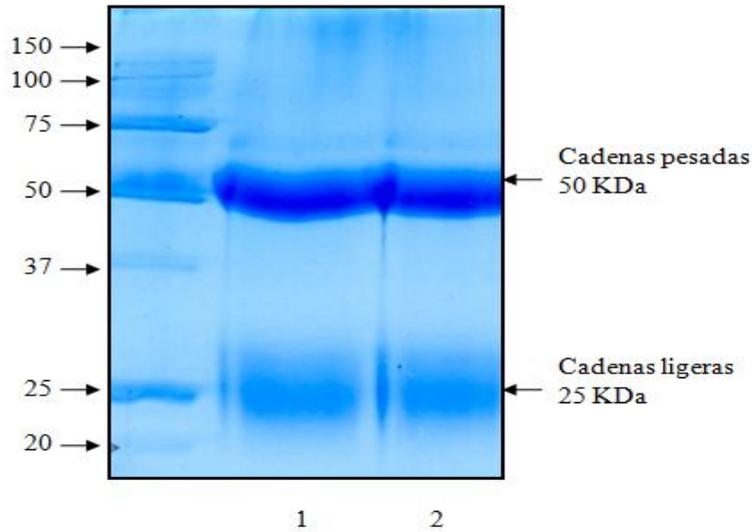


Figura 5. Purificación de IgG's del Suero de Conejos Inmunizados con Fagótopos. SDS PAGE (12%) del Luido de una Cromatografía de Afinidad (Proteína G-agarosa) de los Sueros Pre-inmune y SPic-1. Se Observan las Cadenas Pesadas y Ligeras de las Inmunoglobulinas, con Pesos Moleculares de 50kDa y 25 kDa Respectivamente.

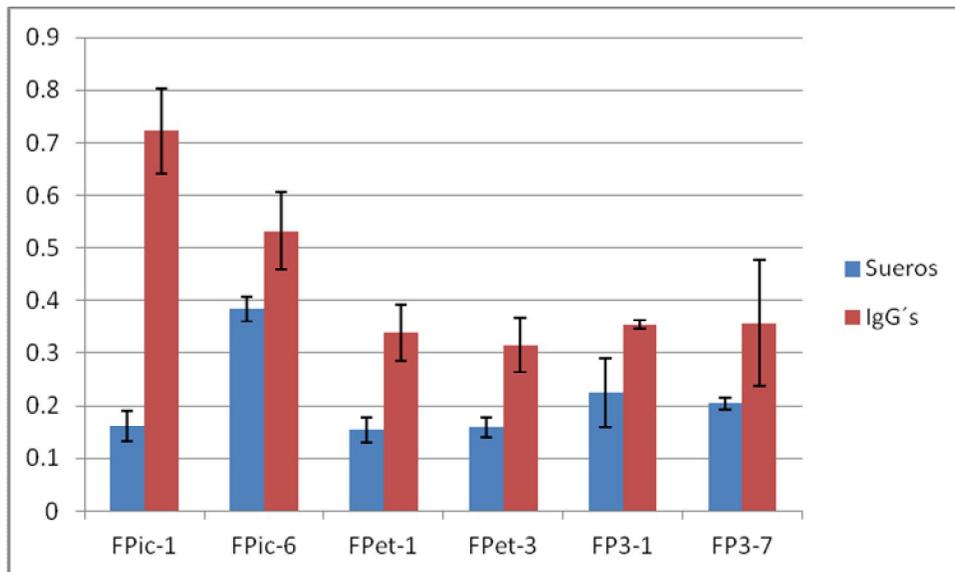


Figura 6. ELISA de la Reactividad de las γ -globulinas Anti-mimótopo contra su Fagótopo Homólogo. Análisis Comparativo de las Respuestas Obtenidas con los Sueros Completos y con las IgG's contra los Fagótopos Homólogos; Se Observa que la Respuesta Obtenida (D.O) con la IgG anti-FPic-1 fue Cinco Veces más Intensa (0.7 vs 0.2) que la Inducida por el Suero Completo; en el Caso de las IgG's FPic-6, FP3-1 y FP3-7 el Incremento (D.O.) fue Ligeramente Mayor las Lecturas Obtenidas que con los Sueros Completos.



8.5. Reactividad de γ -Globulinas Anti Fagotopos Contra Péptidos Sintéticos

Para evaluar la respuesta de anticuerpos contra el péptido fusionado al fago, primeramente se procedió a definir la concentración óptima de uno de los péptidos (P2) con la secuencia ILLPQPPKLLLP, para esta se utilizaron las gamma globulinas γ P3-1 y γ P3-7 (anti-PQPxK) obtenidas después de inmunizar con los fagos FP3-1 y FP3-7 que expresaban dicha secuencia. La reactividad de las IgG no fue dependiente de la concentración del péptido, aunque, los cambios en la densidad óptica (DO) fueron más evidentes en las concentraciones de 5 a 15 μ g/mL de péptido (*Figura 7*).

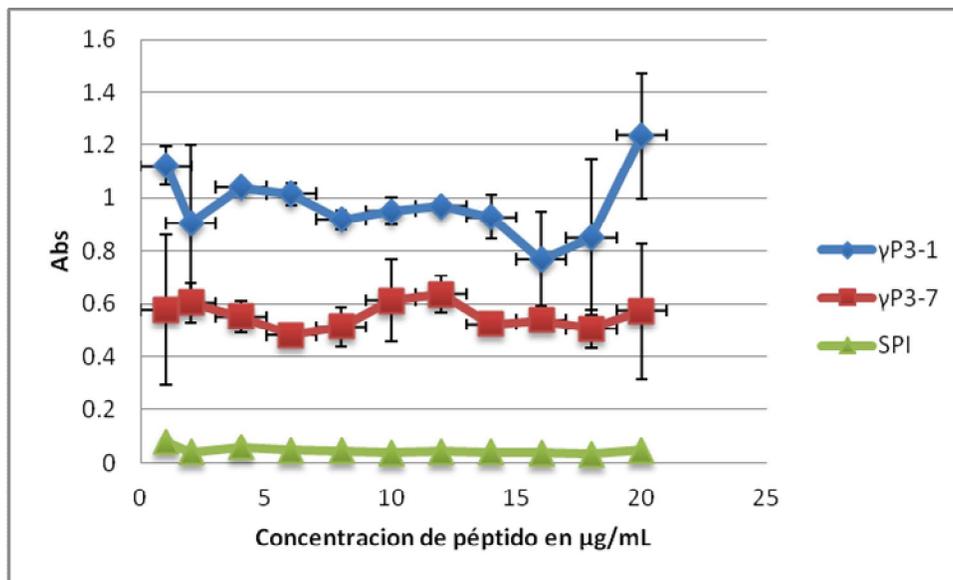


Figura 7. ELISA, para Conocer la Concentración Óptima del Péptido Sintético. Concentraciones (0.5-20 μ g/mL) del Péptido Sintético P2 (ILLPQPPKLLLP), Fueron Adicionados a una Placa de 96 Pozos a los Cuales se les Agregaron las Gamma Globulinas γ P3-1 o γ P3-7 (anti-PQPxK) a una Concentración de (1mg/mL) y el Suero Pre-inmune (SPI) en una Dilución 1:100, se Utilizó SPI ya que por la Cantidad de Muestra no fue Posible Obtener un Liofilizado de la Misma. La Intensidad de la Reacción se Mantiene Constante con las Diferentes Concentraciones del Péptido P2, Siendo la Muestra de γ P3-1 la que Presento Mayor Reactividad.



Definida la concentración adecuada de péptido, en base a el rango de actividad más favorable tanto en respuesta como a la cantidad de reactivo (péptido), se procedió a buscar la concentración óptima de las gamma globulinas, para esto se utilizaron 10 µg/mL del péptido P2 que se puso a reaccionar con diferentes concentraciones de las gamma globulinas γ P3-1 y γ P3-7 (0.5 a 10 mg/mL). La reactividad de las gamma globulinas contra el péptido se presenta a partir de 1.0 mg/mL y se mantiene con la misma intensidad hasta la mayor concentración utilizada (10 mg/mL), las lecturas de D.O obtenidas fueron entre 1.0-1.2 para la γ P3-1 y de 0.7-0.9 para γ P3-7 (**Figura 8**). Por los resultados obtenidos en los ensayos posteriores se utilizó 1mg/ml de IgG.

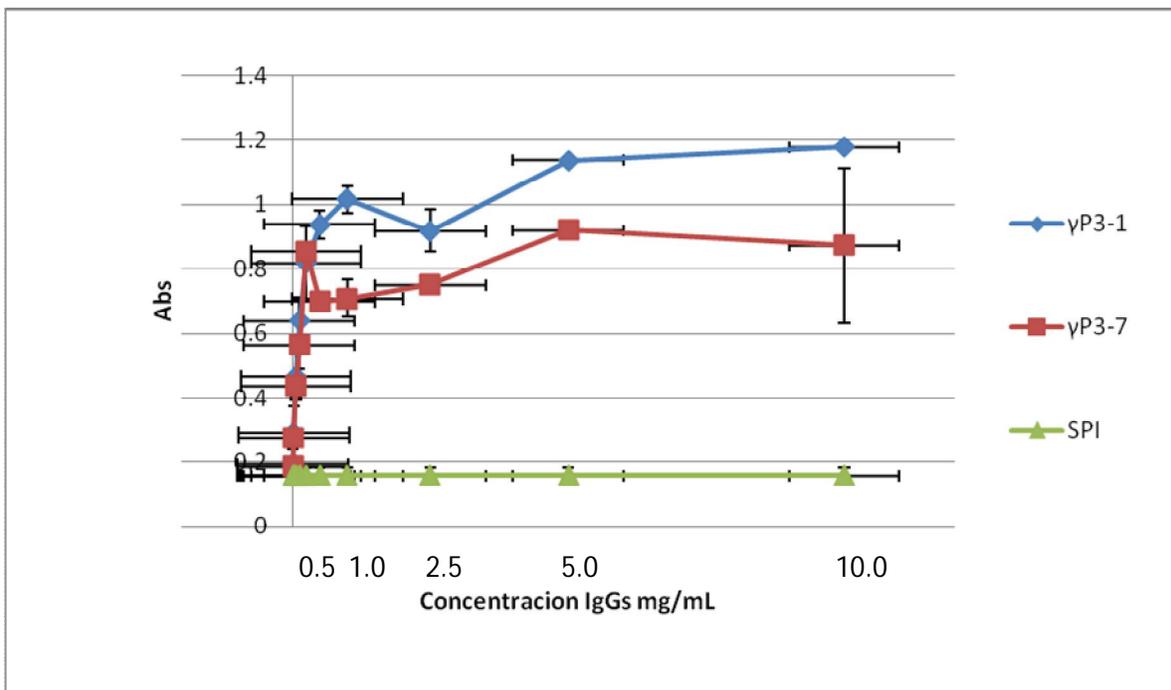


Figura 8. ELISA para Determinar la Concentración Óptima de γ -globulinas. Una Placa de 96 Pozos se Forro con 10 µg/mL del Péptido P2 (ILLPQPPKLLLP), Adicionándole las γ -globulinas Obtenidas de los Sueros Homólogos (γ P3-1 ó γ P3-7) y Suero Pre-inmune a Diferentes Concentraciones (0.5, 1.0, 2.5, 5 y 10 mg/mL). Se Observa una Reactividad Constante con Ambas γ -globulinas a Partir de 1mg/mL, con un Ligero Incremento con 5 mg/mL de IgG.



8.5.1. Reactividad de las Gamma Globulinas Contra los Péptidos Sintéticos Homólogos

La respuesta de las IgG anti-PGxxN (γ Pet-1 y γ Pet-3) contra el péptido P1 (TYPGYINHASKAS), anti-PQPxK (γ P3-1 y γ P3-7) contra el péptido P2 (ILLPQPPKLLLP), anti-PGxxN (γ Pet-1 y γ Pet-3) contra el péptido P1 (TYPGYINHASKAS) y anti-PDDSS (γ Pic-1 y γ Pic-6) contra el péptido P3 (CNPDDSSMC), mostraron reactividad hasta 10 veces mayor que la observada con los sueros completos (**Figura 9**). El análisis individual de cada IgG señala que las gamma globulinas obtenidas de los sueros anti-PPic-1 (CSLDDSSTC) y anti-PP3-7 (APLPQPNKPHLF) presentaron las lecturas de densidad óptica más altas (1.3 y 2 nm).

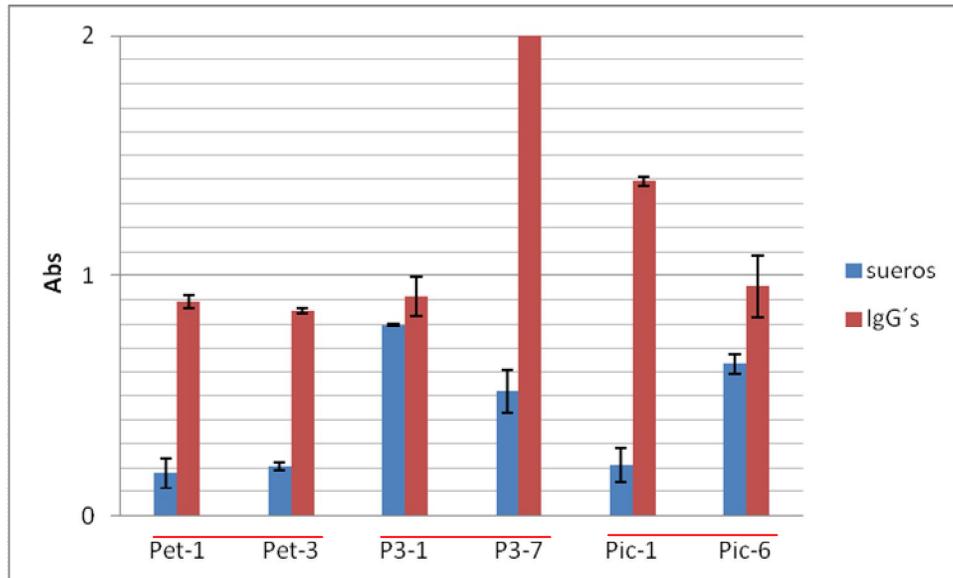


Figura 9. ELISA para Evaluar la Reactividad de las γ -globulinas Anti-mimótopo Contra su Péptido Sintético Homólogo. Una Placa de 96 Pozos se Forro con 10 μ g/mL de los Péptidos y se Puso a Reaccionar con 1 mg/mL de la γ -globulina Homologa: P1 (TYPGYINHASKAS) vs anti PGxxN (γ Pet-1 y γ Pet-3); P2 (ILLPQPPKLLLP) vs Anti-PQPxK (γ P3-1 y γ P3-7) y P3 (CNPDDSSMC) vs Anti-PDDSS (γ Pic-1 y γ Pic-6). En General se Identifica que las IgG Muestran una Reactividad más Alta que los Sueros Excepto la Muestra del Conejo Inmunizado con P3-1 en la que se Obtuvo una Respuesta Similar.



8.5.2. Reactividad de las Gamma Globulinas Contra Péptidos Sintéticos

La reactividad de cada una de las muestras de gamma globulinas se analizó contra los tres péptidos sintéticos, los resultados mostraron que todas las γ -globulinas (γ Pic-1, γ Pic-6, γ Pet-1, γ Pet-3, γ P3-1 y γ P3-7), reaccionaban con los péptidos mostrando lecturas de 0.8 D.O a 2.0 D.O. (**Figura 10**). Se observó además que γ Pic-1, γ Pet-1 y γ P3-7 presentaban respuestas más intensas contra su péptido homólogo (1.4, 1.8 y 2.0 D.O. respectivamente). El análisis de las respuestas obtenidas en el ensayo de ELISA contra las secuencias de aminoácidos de los péptidos sintéticos, mostró que la presencia de por lo menos dos aminoácidos iguales induce la respuesta de las inmunoglobulinas la cual se intensifica cuando en las secuencias se encuentra un mayor número de aminoácidos del mismo tipo.

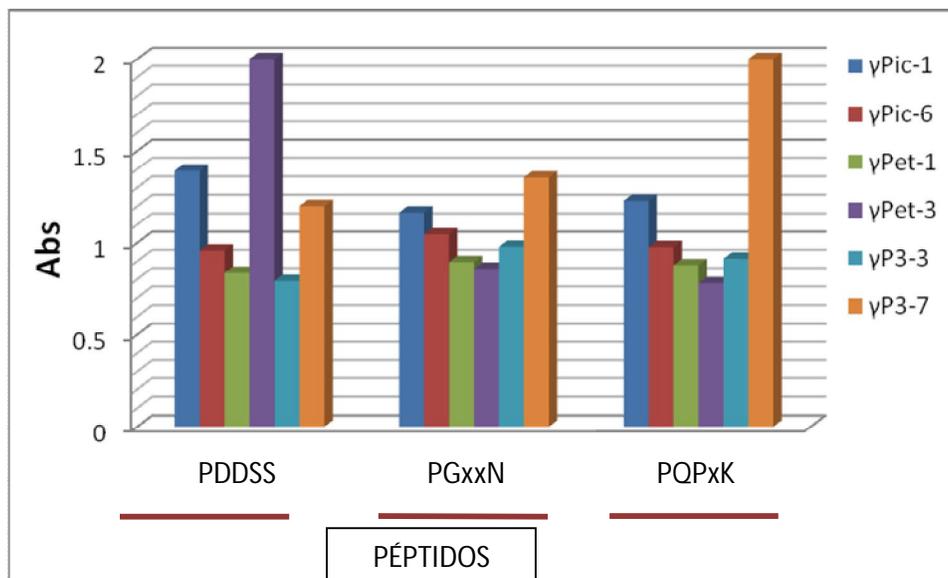


Figura 10. Reactividad de las γ -globulinas Anti-mimótopo contra los Péptidos Sintéticos. Por un Ensayo de ELISA se Evaluó la Respuesta de Cada una de las Muestras de γ -globulinas Contra los Péptidos Sintéticos [PDDSS (P3), PGxxN (P1) PQPxK (P2)]. Una Placa de 96 Pozos se Arma con 10 μ g/mL de Cada Péptido por que se Puso a Reaccionar soj 1m/mL de Cada Gamma Globulina. (Aunque se Realizo la Desviación Estándar, no se Considero Importante Incluir por el Hecho de que solo se Pretendía Evaluar la Respuesta Homóloga).



8.6. Reactividad de γ -Globulinas Anti-Fagótopo Contra Pet, Pic y Sat

Para cuantificar los resultados obtenidos contra Pet, Pic y Sat en el ensayo de western-blot con los sueros antifagotopo (**Cuadro 4**), se realizó la prueba de ELISA utilizando las gama globulinas anti-PQPxK (γ P3-1 y γ P3-7), anti-PGxxN (γ Pet-1 y γ Pet-3) y anti-PDDSS (γ Pic-1 y γ Pic-6). Los resultados obtenidos mostraron diferente reactividad con las seis IgG analizadas. En el caso de γ Pic-1 se observó una respuesta más intensa contra Pic y Sat que contra Pet y dos veces mayor que la obtenida con las IgG's de conejos inmunizados con Pic y Sat. La respuesta con γ Pic-6, aunque, de menor intensidad que la anterior presenta la misma afinidad hacia Pic y Sat que la observada con las IgGs anti Pic y anti Sat; γ Pet-1 mostro una respuesta menor que los controles contra Pet y Sat pero más intensa contra Pic. γ Pet-3 muestran una respuesta contra Pic cuatro veces mayor que la obtenida con la IgG de conejo (control), sin embargo, fue menor contra Pet y Sat. La respuesta de γ P3-1 contra las tres proteínas es homogénea con un ligero incremento contra Sat y una reactividad contra Pic dos veces mayor que la observada con la IgG de conejos inmunizados con Pic. Finalmente γ P3-7 fue la única que reacciona con las tres proteínas (Pet, Pic y Sat) con intensidad (D.O.) superior a la observada con los anticuerpos de conejos inmunizados con las proteínas de estudio (**Figura 11**).

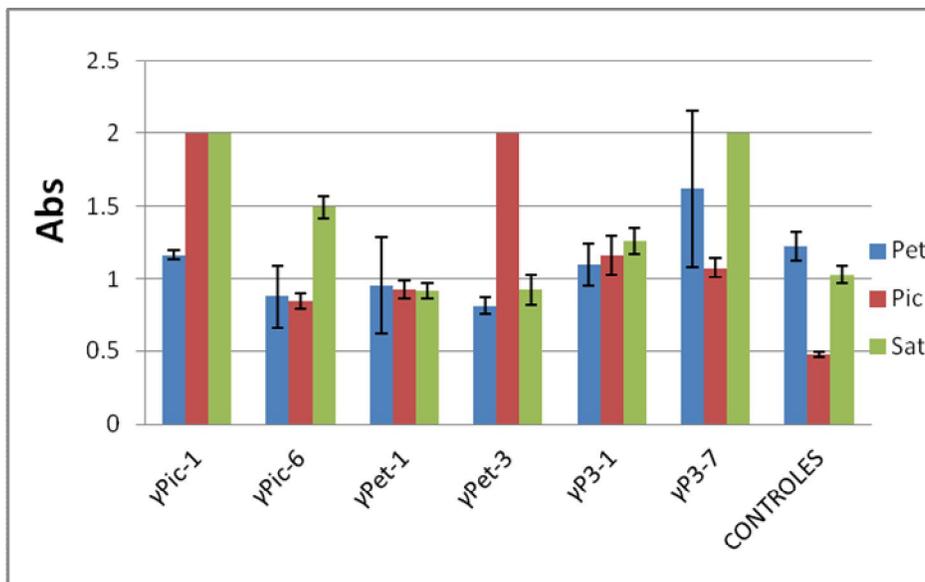


Figura 11. Reactividad de los Anticuerpos de Conejos Inmunizados con Diferentes Fagótopos Contra Pet y Sat. Una Microplaca de 96 Pozos fue Cubierta con 0.8 μ g de Pet (barra azul), Pic (barra roja) o Sat (barra verde). Los Anticuerpos de Conejo, Anti-PQPxK (γ P3-1, γ P3-7), Anti-PGxI/LN (γ Pet-1, γ Pet-3), Anti-CxPDDSSxC (γ Pic-1, γ Pic-6) Obtenidos en Conejo y los Sueros Policlonales de Conejo Anti-Pet, Anti-Pic o Anti-Sat Utilizados como Controles, se Adicionó a Cada Pozo para Evaluar su Reactividad con las Diferentes SPATEs. La Reacción Antígeno-Anticuerpo se Evaluó con una Anti-IgG de Conejo Marcada con Fosfatasa Alcalina.

Dot-blot. Con las inmunoglobulinas antifagótopos (γ Pic-1, γ Pic-6, γ Pet-1, γ Pet-3, γ P-3 y γ P-7), se estandarizó un ensayo de Dot Blot contra Pet, Pic y Sat. Las proteínas se utilizaron a concentraciones de 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.56 μ g/mL y las inmunoglobulinas a una concentración de 1mg/mL. La respuesta fue cualitativa y se evaluó por la intensidad en la coloración. Los resultados confirmaron lo mostrado en el (**Cuadro 4**), al respecto se observó que γ Pic-1(anti-PDDSS) es específico para Sat y Pic, γ P3-7 (anti-PQPxK) para Pet, y γ P3-1 (anti-PQPxK) para Pic (**Cuadro 6, Figura 12**).



Cuadro 6. Reactividad de los Anticuerpos Anti-SPATE's vs Pet, Pic y Sat.

IgG's	Pic	Concentración de Toxina Detectada	Pet	Concentración de Toxina Detectada	Sat	Concentración de Toxina Detectada
Control Pic	+	25 µg/mL	-		/	--
Control Pet	-		+	6.25 µg/mL	/	--
Control Sat	-		-		+	12.5 µg/mL
γ-Pic-1	+	6.25 µg/mL	-		+	12.5 µg/mL
γ-Pic-6	/		-		+*	50 µg/mL
γ-Pet-1	-**		-		-	
γ-Pet-3	-		-		-**	
γ-P3-1	+	25 µg/mL	-		-**	
γ-P3-7	-		+	25 µg/mL	-**	
Suero Pre-immune	-		-		+*	100 µg/mL

(+) Resultados Positivos, (-) Resultados Negativos, *Reactividad Baja. **Se Considero como Resultado Negativo Debido a que Presentó una Reactividad Similar al Suero Pre-immune a la Concentración de 100 µg/mL.



Figura 12. Dot blot para Evaluar la Respuesta de los Sueros Antifagótopo Contra Pet, Pic y Sat. Se Presentan los Criterios para Definir si la Respuesta Era Positiva, Negativa o Dudosa. Los Resultados Obtenidos se Presentan en el (Cuadro 6).

Al realizar la correlación de los tres métodos (Western Blot, ELISA y Dot blot), utilizados para evaluar la reactividad de los anticuerpos hacia cada una de las proteínas de estudio (Pet, Pic y Sat), se encontró que hay correspondencia entre los procedimientos. Las proteínas Pic y Sat fueron reconocidas por los diferentes anticuerpos analizados y Pet solo por la γP3-7 (Cuadro 7). Con estos resultados se decidió trabajar con γPic-1 (reconoce a Pic y Sat por ELISA y Dot-blot), γP3-1 (reconoce solo a Pic por Dot-blot y WB) y γP3-7 (reconoce solo a Pet por Dot-blot y WB).



Cuadro 7. Comparación de la Reactividad de las IgG's Anti-mimótopo en los Diferentes Inmunoensayos.

IgG's	ELISA			Dot-blot			WB		
	Pic	Pet	Sat	Pic	Pet	Sat	Pic	Pet	Sat
γPic-1	+	/	+	+	/	+	/	/	+
γPic-6	+	/	+	/	/	+*	+	/	/
γPet-1	+	/	/	-	/	+*	+	+*	/
γPet-3	+	/	/	/	/	-*	+	/	+*
γP3-1	+	/	+	+	/	-*	+	/	+*
γP3-7	+	+	+	/	+	-*	/	+	/

(+) Resultados Positivos, (-) Resultados Nulos, (*) Baja Reactividad.

8.7. Detección de Pet, Pic y Sat en Muestras de Orina sin Inocular

Previamente se realizó un ensayo para evaluar si las muestras de orina (de una persona sana), mostraban la presencia de algún componente que reaccionara inespecíficamente con las inmunoglobulinas seleccionadas. Los resultados al respecto mostraron una reactividad inespecífica de las inmunoglobulinas (incluyendo un suero pre-inmune), con algún componente de la orina (**Cuadro 8**). Los resultados obtenidos sugerían que la muestra de orina requiere un tratamiento previo, para eliminar la reacción inespecífica de las inmunoglobulinas. Para tal propósito se realizó el mismo ensayo pasando previamente la orina por un filtro de 22µm para eliminar bacterias contaminantes.

Con esta variante se analizó la orina de 3 voluntarios sin signos de IVU (sanos), al revelar las tiras de nitrocelulosa para visualizar la reacción, se observó que con este procedimiento se eliminaba la respuesta inespecífica de las inmunoglobulinas, lo que lleva a suponer que la reacción en la muestra sin filtrar contiene bacterias que pueden generar falsos positivos. Para evaluar un sistema que no ocupara la



filtración se utilizó como método alternativo el centrifugado de las muestras de orina, los resultados fueron similares a los obtenidos con el procedimiento de filtración (Cuadro 8).

Cuadro 8. Reactividad de las IgG's Anti-fagótopos en Muestras de Orina

IgG's	Muestra de Orina sin Tratar	Muestra de Orina Filtrada o Centrifugada		
		1	2	3
Muestra de Sujetos				
Anti-Pic	+	-	-	-
Anti- Pet	+	-	-	-
Anti- Sat	+	-	-	-
SPI Pic-1	+	-	-	-
SPI P3-1	+	-	-	-
SPI P3-7	+	-	-	-
γPic-1	+	-	-	-
γP3-1	+	-	-	-
γP3-7	+	-	-	-
Control de Anticuerpo Secundario	-	-	-	-

(+) Para Representar las Respuestas Positivas, (-) Respuestas Nulas.

8.8 Detección de Pic, Pet y Sat en Muestras de Orina Inoculadas

En este ensayo las muestras de orina fueron inoculadas antes de ser sometidas a tres tratamientos: **i)** Filtradas por una membrana de 0.22µm, **ii)** Filtrada a través de una membrana de 0.22µm bloqueada con albumina sérica bovina, **iii)** Centrifugada.

- i) Filtrada a Través de una Membrana de 0.22 µm.** Antes de ser filtrada la orina fue inoculada con 50µg/mL de cada una de las proteínas de estudio e incubada por 15 min 1.5 h y 2.5 h. Utilizando como control una muestra de



orina filtrada sin inocular e incubada a los mismos tiempos. Los resultados observados muestran que la intensidad para reconocer las proteínas Pet, Pic o Sat por las IgG´s anti mimótopos es tiempo dependiente observándose una mejor reactividad a partir de los 90 minutos de incubación. La IgG anti-PDDSS (γ Pic-1) reconoció las muestras inoculadas con Pic y Sat a partir de los 90 minutos, un comportamiento similar al observado con la IgG de conejo anti-Pic, utilizado como control positivo. Como control negativo se utilizaron anticuerpos de conejo pre-inmune y la reactividad del anticuerpo secundario a las proteínas de estudio, en ambos casos la reactividad fue nula (**Cuadro 9, Figura13**).

Cuadro 9. Dot-blot en Muestras de Orina Filtrada e Inoculada con las Proteínas de Estudio

IgG´s	SPATE´s								
	Pic			Pet			Sat		
Tiempo	15´	90´	150´	15´	90´	150´	15´	90´	150´
Anti-Pic	-	+	+	-	-	-	-	-	+
Anti- Pet	-	-	-	-	+	+	-	+	+
Anti- Sat	+	+	-	-	-	-	-	+	+
SPI de Conejo	-	-	-	-	-	-	-	-	-
γ Pic-1	-	+	+	-	-	-	-	+	+
γ P3-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
γ P3-7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Control de Anticuerpo Secundario	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(+) Representan Respuestas Positivas, (-) Representan Respuestas Nulas

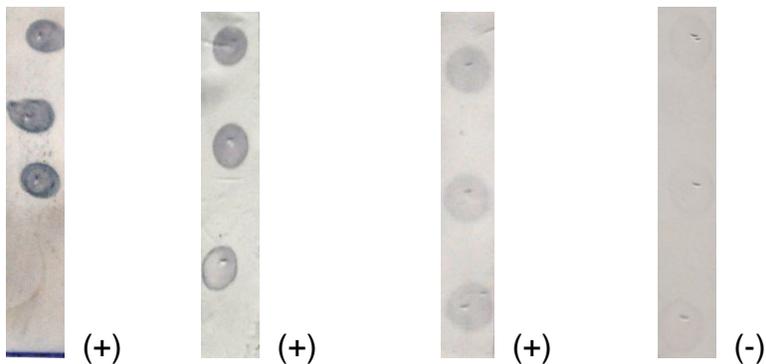


Figura 13. Ensayo de Dot Blot para Evaluar la Respuesta de IgG Anti Fagótopos en Muestras de Orina Inoculadas con las Diferentes SPATEs. En la Imágenes se Representan Ejemplos de cómo es Visible la Respuesta Positiva en Diversas Intensidades Marcada como el Símbolo (+) y Respuesta Nula Marcada con (-) Mostrando Cada Resultado de las Muestras.

ii) **Filtrada a Través de una Membrana de 0.22µm Bloqueada con Albumina Sérica Bovina.** Para poder descartar la posibilidad de que las proteínas de estudio se quedaran adheridas a la membrana de filtración, se realizó el ensayo bloqueando la membrana con una solución de BSA. Las tres muestras de orina se inocularon con las proteínas de estudio y se incubaron por 15, 120 y 240 minutos, utilizando como control una muestra de orina sin inocular. En este ensayo de Dot-blot los resultados muestran una reactividad desde los 15 minutos de incubación observando una especificidad de los anticuerpos anti-Pet y anti-Pic con su proteína homologa, solo el anticuerpo anti-Sat presentó una reacción cruzada con las tres proteínas SPATE's. Además podemos observar que γ Pic-1 anti-mimotopo (PDDSS) es capaz de reconocer a las tres proteínas de estudio (Cuadro 10).



Cuadro 10. Ensayo de Dot-blot Utilizando Orina Filtrada a Través de una Membrana Tratada con BSA e Inoculada con las Proteínas de Estudio

IgG's	SPATE's								
	Pic			Pet			Sat		
	15'	120'	240'	15'	120'	240'	15'	120'	240'
Anti-Pic	-	+	+	-	-	-	-	-	+
Anti-Pet	-	-	-	+	+	+	-	+	+
Anti-Sat	-	-	-	-	-	-	+	+	+
SPI de Conejo	-	-	-	-	-	-	-	-	-
γPic-1	+	+	+	+	+	+	-	+	+
γP3-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
γP3-7	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Control de Anticuerpo Secundario	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(+) Respuestas Positivas, (-) Respuestas Nulas

- iii) **Centrifugada.** El ensayo de Dot-blot con la orina centrifugada e inoculada con las proteínas Pet, Pic y Sat mantenidas a temperatura ambiente por 15 minutos y 4 horas. El anticuerpo anti-mimotopo γ P3-7 (PQPxK) reaccionó específicamente con Pet en los dos tiempos analizados, la proteína Pic solo fue reconocida por el anticuerpo γ Pic-1 (anti-PDDSS), mismo que reaccionó con Sat a las 4 horas de incubación. El anticuerpo γ P3-1 (anti-PQPxK), fue capaz de reconocer a Pet y Sat solo después de 4 horas de incubación (Cuadro 11).



Cuadro 11. Ensayo de Dot-blot utilizando orina filtrada centrifugada e inoculada con las proteínas de estudio.

IgG´s	Pic		Pet		Sat	
	15´	240´	15´	240´	15´	240´
Anti-Pic	+	+	-	-	-	-
Anti- Pet	-	-	+	+	-	-
Anti- Sat	-	-	-	+	-	+
SPI de Conejo	-	-	-	-	-	-
γ-Pic-1	+	+	-	-	-	+
γ-P3-1	-	-	-	+	-	+
γ-P3-7	-	-	+	+	-	-
Control de Anticuerpo Secundario	-	-	-	-	-	-

(+) Respuesta positiva, (-) Respuesta nula

Haciendo un análisis general de las respuestas obtenidas con los tres diferentes tratamientos de las muestras, se observan resultados diferentes, solo la muestra γPic-1 presentó resultados semejantes en los tres ensayos, la muestra γP3-1 solo reconoció a Pet y Sat en la orina centrifugada y la γP3-7 fue capaz de reaccionar con Pet y Sat en la orina filtrada y saturada, pero con la orina filtrada sin bloqueo solo reconoce a Pet. (Cuadro 12)

Cuadro 12. Comparación de Reactividad de las IgG´s con las SPATE´S de Estudio Inoculadas en la Orina.

IgG´s	Orina Filtrada				Orina Filtrada a Través de una Membrana Saturada con BSA				Orina Centrifugada			
	s/in	Pic	Pet	Sat	s/in	Pic	Pet	Sat	s/in	Pic	Pet	Sat
γ-Pic-1	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+
γ-P3-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
γ-P3-7	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-

(+) Respuesta Positiva, (-) Respuesta Nula.



9.- DISCUSIÓN



Las infecciones del tracto urinario (ITU), se encuentran entre las primeras cinco causas de enfermedad con mayor tasa de morbilidad en el país (INEGI), por lo que puede considerarse un problema importante de Salud Pública. Al respecto, este padecimiento se presenta tanto en pacientes ambulantes, como en pacientes hospitalizados con una alta incidencia (Gonzales Cesar, 2008). El diagnóstico del padecimiento generalmente se basa en los signos y síntomas del paciente y solo en pocas ocasiones (10% de los casos), se realiza la identificación del microorganismo responsable de la infección (Barragán A. y cols. 2006). En relación a la etiología del padecimiento *Escherichia coli* uropatógena (UPEC), es el principal microorganismo asociado a las ITU's en la comunidad (80%), aunque bacterias como *S. saprophyticus*, *Proteus mirabilis* *S. agalactae* y *Klebsiella spp.* también son causantes del padecimiento (De los Dolores, María, 2009). Con respecto a las ITU intrahospitalarias *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *E. coli* son los patógenos asociados a la etiología del padecimiento (James H. Tabibian y cols. 2008). El hecho de que en la mayoría de los casos el tratamiento de las ITU's es empírico, ha dado lugar a la selección de microorganismos con resistencia múltiple a antimicrobianos y de manera consecuente a que el manejo de la enfermedad se dificulte haciendo de este un problema de Salud Pública (Arteaga Nancy, 2010). De tal forma que si se supiera que microorganismo causa la infección, con los patrones de resistencia actualmente definidos se podría dar ya un tratamiento apegado a atacar más específicamente al microorganismo.

Las cepas UPEC presentan diversos factores de virulencia, entre estos se incluyen diferentes adhesinas, hemolisinas, sistemas de captación de fierro y



algunas proteasas (*Keira Melican y cols. 2011*). Entre estas últimas se incluyen las SPATE´s, son dos de las SPATEs identificadas en cepas UPEC (*Guyer y cols. 2002*). Entre las propiedades biológicas de las SPATEs, se ha señalado su participación en la colonización, efecto vacuolizante en células de riñón, citotóxico sobre el epitelio urinario (Sat), capacidad para degradar la mucina y para la producción de moco, degradación de la hemoglobina y fijación al grupo hem entre otras (*Pinaki R. Dutta y cols. 2002*). La presencia de los genes involucrados en la expresión de estas proteasas en cepas UPEC es variable (Pic 21%, Vat 42% y Sat 56%), sin embargo, se pueden considerar como marcadores de virulencia que pueden ser empleados para el diseño de métodos para diagnóstico rápido de ITU´s relacionadas con UPEC (*Hernández Chiñas y cols. 2009*).

El Método de Phage Display es un procedimiento útil para la detección de sitios inmunodominantes en diferentes compuestos. En un estudio (*Hernandez-Chiñas y cols. 2009*), analizaron por este procedimiento Pet (Plasmid encoded toxin) y Pic e identificaron tres motivos (mimótopos) compartidos por ambas proteínas y presentes en otras SPATEs incluida Sat (*Hernández Chiñas y cols. 2009*). Para la identificación de dichos motivos se analizaron las secuencias de seis fagótopos (fagos que expresan secuencias de péptidos que mimetizan un epítope), que fueron utilizados para la obtención de los anticuerpos anti-mimótopo (**Cuadro 3**) utilizados en nuestro trabajo.

En la fase inicial del proyecto después de propagar los fagótopos, era necesario contar con animales (conejos) que no presentaran anticuerpos contra las proteínas



objeto del estudio (Pet, Pic y Sat). En el análisis de un lote de 6 conejos del bioterio de la Facultad de Medicina, se encontró que todos presentaban anticuerpos contra las SPATE's. Lo anterior plantea dos situaciones lamentables, por un lado el hecho de que los animales presente anticuerpos contra proteínas secretadas por bacterias, indica que no se tienen un control de calidad ni de bioseguridad con los animales del bioterio de la Facultad de Medicina. El otro hecho es que la presencia de estos anticuerpos en los conejos proporcionados, sugiere que las bacterias (probablemente *E. coli*) que colonizan a estos conejos, son productoras de SPATEs. Con respecto al segundo lote de conejos, este no mostro la presencia de anticuerpos contra las SPATEs, lo que sugiere que no son bacterias de la biota intestinal de los conejos las responsables de la inmunización contra SPATEs en los animales de la Facultad de Medicina y muy probablemente estos se infecten a través de los trabajadores del bioterio.

La inmunización de los conejos con las seis clonas de fagos seleccionados se realizó con el esquema propuesto por (Galfre y cols. 1996), en eta se administran cuatro dosis con espacios de 15 días entre cada inmunización. Al evaluar la reactividad de los sueros contra los fagótopos y péptidos sintéticos homólogos el resultado obtenido fue pobre. Lo anterior pudiera estar relacionado con el hecho de que los fagos no se administraron con algún adyuvante, esta decisión se tomo por antecedentes que señalan que los fagos por si mismos funcionan como adyuvantes ya que son buenos inmunógenos (Galfre y cols. 1996). Ante este resultado se consideró conveniente el empleo de un adyuvante para obtener un mejor título de anticuerpos. En esta fase del trabajo, se identificó que a los 45 días



después de la primera inmunización se obtiene una buena respuesta por lo que se recomiendan 3 inmunizaciones lo que acorta el tiempo de inmunizaciones. Con el propósito de incrementar la respuesta de los anticuerpos, se procedió a precipitar el suero con sulfato de amonio para obtener las IgG específicas contra las proteínas en estudio. Los resultados fueron satisfactorios ya que a partir de 1mg/mL de gamma globulinas se observa un incremento de la reactividad por arriba de 1 D.O, la que fue diez veces más alta que la observada al utilizar el suero sin precipitar (**Figura 8**).

En el trabajo previo realizado por (*Hernandez-Chiñas y cols. 2009*), reportaron que los motivos PQPxK, PGxIN, PDDSS identificados en las secuencia de péptidos (mimótopos) de los fagótopos que seleccionaron son compartidos por diferentes SPATE's. En nuestro trabajo para corroborar lo anterior y establecer que dichos motivos son sitios inmunodominantes de las diferentes SPATEs, fue que se inmunizó con los fagótopos portadores de dichas secuencias. La evaluación de las IgG's obtenidas del suero de los conejos inmunizados, se realizó por los ensayos de ELISA, Western-blot y Dot-blot. Lo anterior con el propósito de evaluar la reactividad de las IgG's anti-mimótopo contra las serinas proteasas Pet, Pic y Sat, en su estado nativo (ELISA y Dot-blot) o desnaturalizado (Western-blot). Los resultados mostraron una respuesta similar contra los tres antígenos en los ensayos de ELISA y Dot-blot, pero con algunas diferencias en el ensayo de Western-blot. Las diferencias en el ensayo de Western-blot pudieran estar relacionadas con el hecho de que las proteínas están desnaturalizadas y las secuencias de las proteínas son lineales, por el contrario en el ELISA y Dot Blot la



proteína está en su forma nativa por lo que la conformación de los aminoácidos puede ser distinta y por ende modificar la afinidad del anticuerpo. No obstante lo anterior, el objetivo del trabajo que consiste en desarrollar un sistema para la detección de SPATE´s con anticuerpos dirigidos contra un epítopo se cumple, lo que a su vez corrobora la utilidad del Método de Phage Display en la detección de sitios inmunodominantes (*Hernández Chiñas y cols. 2009; Palacios Yadira, 2007*).

Los ensayos previamente referidos muestran que aunque las secuencias de los mimótopos son compartidas por diferentes SPATEs, al obtener las IgG´s del suero de los conejos inmunizados la reactividad de estas contra cada una de las proteínas es diferente. Los resultados muestran que la γ Pic-1(anti-PDDSS) reacciona bien con Sat y Pic, los anticuerpos γ P3-7 (anti-PQPxK) reconoce solo a Pet, y la γ P3-1 (anti-PQPxK) reacciona únicamente con Pic (**Cuadro 6, Figura 13**). Esto pudiera estar relacionado con la distribución de los aminoácidos de dichas secuencias, en la estructura terciaria de las proteínas. Lo anterior confirma que aunque se trata de proteínas integrantes de una familia, no obstante que muestren una alta identidad al conformarse su estructura tridimensional las proteínas presentan diferentes motivos lo que a su vez se relaciona con diferentes actividades biológicas (*Guyer y cols. 2002*).

El hecho de contar con IgG´s que reconocen a las SPATE´s, permitió continuar con el trabajo y cumplir con el objetivo del mismo. Aunque, este no es el primer trabajo en el que se utilizan anticuerpos anti-mimótopo, para el desarrollo de métodos de diagnóstico (*Azzazy HME and Highsmith WE. 2002, Paschke M, 2006*), si es el primero en el que se propone la detección de SPATE´s en muestras clínicas.



Al realizar los ensayos en muestras clínicas para estandarizar el procedimiento, se observaron resultados falsos positivos tanto con los anticuerpos anti-mimótopo, como con los sueros control de conejos inmunizados con Pet, Pic y Sat. Al respecto una de las explicaciones podría estar relacionada con la presencia de estas SPATE´s en la muestra de orina, ó que los anticuerpos reaccionaran con componentes de bacterias contaminantes presentes en la orina. Para confirmar o descartar lo anterior se propusieron dos acciones, la primera consistió en pasar la muestra a través de un filtro de 0.22 μm y la segunda en solo centrifugar y quedarnos con el sobrenadante de la muestra. Ambos procedimientos resultaron satisfactorios ya que se eliminó la reacción inespecífica de los anticuerpos, lo anterior sugiere que en la muestra existen compuestos no solubles con los que reaccionan los anticuerpos originando los resultados falsos positivos.

Con la anterior observación se continuo con la estandarización del procedimiento, para estos se utilizaron dos muestras de orina, una de ellas filtrada a través de una membrana saturada con BSA y la otra únicamente centrifugada. Ambas muestras de orina se inocularon de manera independiente con Pet, Pic y Sat las que dejaron incubando diferentes tiempos (15min, 1, 2 y 4 horas), lo anterior para conocer si el proceso de diagnóstico debe realizarse al momento de ser entregada la muestra o si hay que considerar un tiempo adecuado para la prueba. Como se mostro en el apartado de resultados la reactividad del anticuerpo anti-mimótopo se identifica mejor después de una hora de incubación de la orina a temperatura ambiente. Trabajos previos realizados con estas proteasas (*Villaseca y cols. 2000, Eslava C. y cols. 1998; Benítez Alejandro y cols. 2011*), refieren que las proteínas se



autodegradan, tal situación hace suponer que al encontrarse proteolizada la proteína (Pet, Pic o Sat) se exponen un mayor número de epítopes con características inmunodominantes, obteniendo una reacción positiva más evidente. Al poder tener un diagnóstico rápido sobre el agente causante de las ITU puede favorecer el sentido del tratamiento y por ende la prescripción adecuada de antimicrobianos efectivos contra bacterias productoras de SPATEs (Pet, Pic y Sat) y así poder evitar reincidencias de la infección.



10.-CONCLUSIONES



- Es importante evaluar si hay reacción de los sueros de conejos contra las proteínas a evaluar, previo a los desafíos con los fagótopos.
- Para la inmunización de los conejos con fagótopos es recomendable solo aplicar tres dosis en periodos de 15 días entre cada inmunización.
- La reactividad de los anticuerpos contra las proteínas depende de su estado, ya que de acuerdo a la conformación estructural presenta o no algunos epitopos.
- El empleo de fagótopos que expresan mimótopos de las SPATE´s resultan de gran utilidad para la obtención de anticuerpos específicos contra dichas proteasas.
- La prueba de detección de SPATE´s en orina con anticuerpos anti fagótopo resulto satisfactoria y se recomienda utilizar la muestra centrifugada, ya que es rápida y el costo es bajo.
- El tiempo de evaluación de una muestra de orina por el método de Dot blot, es optima a las 2 horas de haberse tomado.



11.-BIBLIOGRAFÍA



Arteaga Resendiz Nancy Karina 2010. Perfil de Susceptibilidad y Frecuencia de Genes de Virulencia de *Escherichia coli*, Patógeno Implicado en Infecciones Intestinales y de Vías Urinarias de Niños Hospitalizados. Tesis Instituto Politécnico Nacional.

Ausubel F. M., R. Brent, R. E. Kington, D. D. More, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl 1987. Analysis of Proteins, In Ausubel F. M., et al. (ed). Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates Wiley-Interscience, New York; **10**: 10.0.1-10.12.9.

Barragán Arteaga Ignacio Antonio, Gustavo Barriga Angulo, Francisco Calderón Ferro, Julio Ismael Casasola González, Víctor Alfonso Francolugo Vélez, Ernesto Jamaica Verduzco, Alfredo Medina Ocampo, Jorge Gustavo Morales Montor, Il Rayo Morfín Otero, Luis Rodríguez Gutiérrez, Isidro G Zavala Trujillo 2006. 1er Consenso Nacional Sobre Manejo Antimicrobiano de Infecciones de Vías Urinarias (IVU's) en el Adulto, México.

Benítez-Guzmán Alejandro, Carlos Eslava, Claudia González-Espinosa and M. Eugenia Torres-Márquez, 2011. Pet Induces IL1, TNF α , MIF and IL1Ra Through the IKK α β NF κ B Pathway. Open Immunol. J; **4**:16-21.

Eslava C, Navarro F, Czczuln JR, Henderson IR, Cravioto A, Nataro J. 1998. Pet, an Autotransporter Enterotoxina from Enteroaggregative *Escherichia coli*. Infect Immun; **66**:3155-3163

Dautin Nathalie 2010. Serine Protease Autotransporters of *Enterobacteriaceae* (SPATEs): Biogenesis and Function. Toxins J.; **2**:1179 – 1206.

Gonzales Galindo Cesar 2008. Aislamiento e Identificación de Bacterias que Causan Diarrea Grave en Niños. Tesis Licenciatura UAM-Xochimilco

Guido Schmiemann, Eberhardt Kniehl, Klaus Gebhardt, Martha M. Matejczyk, Eva Hummers Hradier 2010. The Diagnosis of Urinary Tract Infection. Dtsch Arztebl Int; **107**:361–367

Guyer DM, Radulovic S, Jones FE, Mobley HL 2002. Sat the Secreted Autotransporter Toxin of Uropathogenic *Escherichia coli*, Is a Vacuolating Cytotoxin for Bladder and Kidney Epthelial Cells. Infect. Immun; **70**:4539–4546.

Henderson IR, Czczulin J, Eslava C, Noriega F, Nataro JP. 1999. Characterization of Pic, a Secreted Protease of *Shigella flexneri* and Enteroaggregative *Escherichia coli*. Infect. Immun; **67**: 5587–5596.

Hernández Chiñas Ulises, Gazarian Tatiana, Gazarian Karlen, Mendoza-Hernández Guillermo, Xicohtencatl-Cortes Juan, Eslava Carlos 2009. Peptide Sequences Identified by Phage Display are Immunodominant Functional Motifs of Pet and Pic Serine Proteases Secreted by *Escherichia coli* and *Shigella flexneri*. Peptides **30**:2127-2135

Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). 2012:
<http://www.inegi.org.mx/sistemas/sisept/default.aspx?t=msal04&s=est&c=22463>.

James H. Tabibian, Jeffrey Gornbein, Arash Heidari, Sarah L. Dien, Valerie H. Lau, Puneet Chahal, Bernard M. Churchill y David A. Haake 2008. Uropathogens and Host Characteristics, J. Clin. Microbiol. **27**:135-137.

Martínez María 2009. Panorama Epidemiológico de las Infecciones de Vías Urinarias en México 2003-2008, Vigilancia Epidemiológica; **12**:3980-3986.



Matthew A., Croxen y B. Brett Finlay 2010. Molecular Mechanisms of *Escherichia coli* Pathogenicity Macmillan Publishers Limited; **8**: 26-38.

Melican Keira, Ruben M. Sandoval, Abdul Kader, Lina Josefsson, George A. Tanner, Bruce A. Molitoris, Agneta Richter-Dahlfors 2011. Uropathogenic *Escherichia coli* P and Type 1 Fimbriae Act in Synergy in a Living Host to Facilitate Renal Colonization Leading to Nephron Obstruction, Plos One Pathogens; **7**:1298-1317.

Nick J. Parham, Usha Srinivasan, Mickaël Desvaux, Betsy Foxman, Carl F. Marrs, Ian R. Henderson 2005. PicU, a Second Serine Protease Autotransporter of Uropathogenic *Escherichia coli*, Microbiol. Lett; **230**:73-83.

Palacios-Rodriguez Y, Gazarian T, Rowley M, Mailuf-Cruz A, Gazarian K.2007. Collection of phage-peptide probes for HIV-1 immunodominant loop-epitope. J Microbiol Methods;68:225–35.

Pinaki R. Dutta, Renato Cappello, Fernando Navarro-García and James P. Nataro 2002. Functional Comparison of Serine Protease Autotransporters of *Enterobacteriaceae*, Infect. Immun; **70**:7105-7113.

Rutherford Nancy and Michael Mourez 2003. Surface Display of Proteins by Gram-negative Bacteria Autotransporters, Microb. Cell Fact; **5**:1186-1208.

Santamaría Hugo 2003. Phage Display y su Aplicación en el Diagnóstico Clínico, Rev. Invest. Clin;. Secretaría de Salud (SSA), 2012, www.dgepi.salud.gob.mx.

Travis J. Wiles, Richard R. Kulesus, and Matthew A. Mulvey 2005. Origins and Virulence Mechanisms of Uropathogenic *Escherichia coli*, Exp Mol Pathol; **85**:11-9.

Valery A. Petrenko, Vitaly J. Vodyanoy 2003. Phage Display for Detection of Biological Threat Agents, J. Microbiol.Methods; **53**:253– 262.

Venice Chávez-Valencia, Selma Gallegos-Nava y C. Alejandro Arce-Salinas 2010. Patrones de Resistencia Antimicrobiana y Etiología en Infecciones Urinarias no Complicadas, Servicio de Medicina Interna, Hospital Central Sur de Pemex, México D.F.

Villaseca JM, Hernández U, Sainz-Espuñes TR, Rosario C, Eslava C. 2005, Enteroaggregative *Escherichia coli* an Emergent Pathogen with Different Virulence Properties, Rev. Lat. Microb.; **47**: 140-159.



12.-ANEXOS



Abreviaturas	Significado
2 x YT	Medio 2xYT
°C	Grado Centígrado
µL	Microlitros

Bacteriuria Asintomática: Es la presencia de la misma bacteria (especie al menos) en dos muestras sucesivas de chorro intermedio, con intervalo de más de 24 horas, correspondiente a 10^5 unidades formadoras de colonias (ufc) por mL de orina y sin manifestaciones clínicas.

cm	Centímetro
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
<i>E. Coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
g.	Gravedad
h.	Hora
IgG	Inmunoglobulina G
ITU	Infección del Tracto Urinario
KDa	Kilo Dalton
L.	Litro
LB	Medio Luria-Bertani
M	Concentración Molar
mA	Mili-Amper
mg	Miligramo
min	Minuto
mL	Mililitro
nm	Nanómetro
mm	Milímetro
NaCl	Cloruro de Sodio
PBS	Buffer de Fosfatos (Phosphate buffered Saline)
PBS-L	Buffer de Fosfatos con Leche Descremada
PBS-T	Buffer de Fosfatos con Tween 20
PEG.NaCl	Propietilenglicol con Cloruro de Sodio

Persistencia o Recurrencia: Es producida por la cepa originalmente infectante (la cual es clasificada por especie, antibiograma, serotipo y tipo molecular), después de tratamiento antimicrobiano.

Pic	Protein Involved in Colonization
p/v	Concentración Peso-Volumen

Recaída: Infección provocada por la misma cepa, tipificada por metodología molecular, que se hace evidente dentro de las dos semanas posteriores a la interrupción del tratamiento instituido.

Reinfección: Infecciones Provocadas por una Cepa Nueva.

rpm	Revoluciones por Minuto
Sat	Secreted Autotransporter Toxin
SDS-PAGE	Gel de Poliacrilamida en Condiciones Desnaturalizantes
SPATE´S	Proteasas Autotransportadas de la Familia Enterobacteriaceae
SSI	Solución Salina Isotónica
UFP	Unidades Formadoras de Placa



UPEC

V

Vat

v/v

w/v

Escherichia coli Uropatógena

Voltaje

Vacuolating Autotransporter Toxin

Concentración Volumen-Volumen

Concentración Peso-Volumen



AGAR Y MEDIOS DE CULTIVO

Agar Luria con Tetraciclina (LB/Tetraciclina), para 1 Litro

10g, de Bacto Triptona.
5g, de Extracto de Levadura.
10g, de NaCl.
15g, de Agar.
100mg/L, de Tetraciclina.

Se esteriliza en autoclave, se deja enfriar a temperatura aproximada de 40°C y se vaciar en cajas petri.

Agarosa Top para un 1L

10g, de Bacto Triptona.
5g, de Extracto de Levadura.
5g, de NaCl.
1g, de MgCl₂.6H₂O.
7g, de Agarosa.

Se Esteriliza en Autoclave y se Mantiene a Temperatura Ambiente.

Medio 2xYT 1L/tetraciclina

10g, de NaCl.
10g, de Extracto de Levadura.
16g, de Bacto Triptona.
100mg/L, de Tetraciclina.

Caldo Luria (LB), Para Preparar un1L

10g, de Bacto Triptona.
5g, de Extracto de Levadura.
10g, de NaCl.

Se Esteriliza en Autoclave y se Mantiene a Temperatura Ambiente.

SOLUCIONES y BUFFERS

Acrilamida al 30% en Agua Destilada.
N-metilen-bisacrilamida al 0.8%.

Azul de Coomassie (PIERCE)

Azul de Coumasie al 0.06%.
Metanol al 30%.
Ácido Acético al 10%.

Buffer de Carbonatos para ELISA

NaCO₃ al 0.2M
pH 9.5

Se Esteriliza en Autoclave.



Leumli

B-mercaptoetanol.
SDS.
Glicerol.
Tris pH 6.8.
Azul de Bromofenol

PBS 10x 1L

80g de NaCl.
2.0g de KCl.
14.4g de Na₂HPO₄.
2.4g KH₂PO₄

Ajustar a pH 7.4 Esterilizar en Autoclave y Conservar a Temperatura Ambiente.

PBS/BSA 0.1% para un 1L

Se mezcla 999 mL de PBS 1X (previamente esterilizado con filtro de 0.22µm), con 1 mL de BSA, la mezcla se agita muy bien sin generar demasiada espuma y se mantiene en frío.

PBS/Tween 0.3% para un 1L

Se mezcla 999 mL de PBS 1X (previamente esterilizado con filtro de 0.22µm), con 1 mL de BSA, la mezcla se agita muy bien sin generar demasiada espuma y se mantiene en frío.

PBS/Tween 0.1% para un 1L

Se mezcla 999 mL de PBS 1X (previamente esterilizado con filtro de 0.22µm), con 1 mL de BSA, la mezcla se agita muy bien sin generar demasiada espuma y se mantiene en frío.

Propietilenglicol al 20%, Cloruro de Sodio 2.5 M y (PEG/NaCl)

Las soluciones de Propietilenglicol y Cloruro de sodio se tienen que preparar aparte.

Propietilenglicol 8000 (MEYER) al 40% en agua y se esteriliza en autoclave.

Cloruro de Sodio 2.5 M

Se esteriliza en autoclave.

Posteriormente se mezclan en un recipiente estéril y se agita, se conserva a temperatura ambiente.

Solución Saturada de Sulfato de Amonio (NH₄) SO₄

Sulfato de Amonio 4.1M

Cloruro de Sodio 2.5 M

Se esteriliza en autoclave

Posteriormente se mezclan en un recipiente estéril y se agita, se conserva a temperatura ambiente.



Stock de Tetraciclina

20mg de tetraciclina
1mL de etanol

Se conserva a -20°C con protección de la luz.

Rojo de Ponceau (Sigma-Aldrich)

Solución ya preparada por el fabricante, solo se mantiene en refrigeración.

Gel de Poliacrilamida

Gel	Concentrador (1mL)	Resolutor (5mL)
H ₂ O	0.68	2.3
Acrilamida 30%	0.17	1.3
Tris 1.5 M pH 8.8	/	1.3
Tris 1.5 M pH 6.8	0.13	/
SDS 10%	0.01	0.05
APS 10%	0.01	0.05
TEMED	0.001	0.003