

00346  
12  
24.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**"FACTORES BACTERIANOS INVOLUCRADOS EN LA PATOGENICIDAD DE  
Escherichia coli ENTEROAGREGATIVA"**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE**

**MAESTRO EN CIENCIAS  
(BIOLOGIA CELULAR)**

**P R E S E N T A :**

**JORGE MATEO VILLASECA FLORES**

**DIRECTOR DE TESIS: M. EN C. CARLOS ALBERTO ESLAVA CAMPOS**

**MEXICO, D. F.**

**1 9 9 7**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.



**"Factores bacterianos involucrados en la patogenicidad de Escherichia coli  
enteroagregativa"**

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México, en el laboratorio y con la asesoría de los **Doctores: Carlos Alberto Eslava Campos y Alejandro Cravioto Quintana.**

México D. F. 1997.

## DEDICATORIA

Dedico este trabajo con todo mi amor a mis hijas Elizabeth, Patricia y Claudia.

Con todo cariño a mi esposa Maria Guadalupe.

Con todo respeto a mis padres Pablo y Delfina.

A mis hermanos Sergio, Jaime, Silvia y Ana Maria,  
por la amistad que nos une.

A mi tía Angela por su comprensión y gran ayuda.

A la memoria de Dr. Héctor Barbosa Najera.

A los maestros de la querida Facultad de Ciencias de la UNAM.

México D. F. 1997.

## AGRADECIMIENTOS I

**Al comité dictaminador:**

**Al Dr. Carlos Alberto Eslava Campos** mi más sincero agradecimiento por su apoyo, paciencia y dedicación para la realización de esta tesis. Y por la gran amistad que siempre me ha brindado.

**Al Dr. Alejandro Rafael Cravioto Quintana** por su apoyo y oportuna asesoría en el planteamiento y realización de este trabajo.

**Al Dr. Rubén López Revilla** por mi estancia en su laboratorio de Biología Celular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV) del IPN. Y por su colaboración y apoyo en la realización de este trabajo.

**Al Dr. Hipólito Ángel Manjarrez Hernández** por su colaboración en la revisión, comentarios y sugerencias de este trabajo.

**A la Dra. Cecilia Teresa Ximénez García** por su apoyo en la realización de este trabajo, y por las observaciones y sugerencias en la revisión del mismo.

**A la Dra. Emma Isabel Melendro Lozano** por sus comentarios y observaciones en la revisión de este trabajo.

**A la M. en C. Gabriela García Pérez** por las sugerencias y comentarios en la revisión de esta tesis.

## AGRADECIMIENTOS II

**Al Biol. Armando Navarro Ocaña por su apoyo en la serotipificación de enterobacterias.**

**Al M. en C. José Molina López por su ayuda en el ensayo de adherencia bacteriana a células en cultivo.**

**Al Q. F. B. Ulises Hernández Chiñas por su apoyo técnico en el análisis de proteínas.**

**Al Dr. Fernando Navarro García del CINVESTAV del IPN por su apoyo en los ensayo electrofisiológicos de cámaras de Ussing.**

**Al Tec. Acad. Luis Antonio León Alamilla por su apoyo técnico en la inmunización y obtención de suero específicos.**

**Al Tec. Acad. Juan Manuel Hernández por su apoyo técnico en el cultivo de enterobacterias.**

**A la Q. F. B. Ruth Beatriz García Gámez por su apoyo técnico en cultivos celulares.**

**Al Tec. Acad. Gabriel Pérez Soto por su apoyo técnico y gráfico en la escritura de esta tesis, sin el cual no hubiera sido posible realizarla.**

**A todo el personal del Departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina, UNAM.**

**México D. F. 1997**

## **INDICE**

	<b>PAGINAS</b>
LISTA DE CUADROS . . . . .	ii
LISTA DE FIGURAS . . . . .	ii-v
LISTA DE DIAGRAMAS . . . . .	v
LISTA DE ABREVIACIONES . . . . .	vi-vii

## **RESUMEN**

INTRODUCCION . . . . .	1-22
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA . . . . .	23
OBJETIVO GENERAL Y ESPECIFICOS . . . . .	24
HIPOTESIS . . . . .	25
MATERIAL Y METODOS . . . . .	26-39
RESULTADOS . . . . .	40-49
DISCUSION . . . . .	50-57
BIBLIOGRAFIA . . . . .	58-72

## **APENDICE**

	<b>NUMERO</b>
CUADROS . . . . .	1-6
FIGURAS . . . . .	1-24
DIAGRAMAS . . . . .	1-2

## **LISTA DE CUADROS**

- Cuadro 1.- Características de los grupos de Escherichia coli causantes de diarrea.
- Cuadro 2.- Características de cepas de EAggEC aisladas de niños con diarrea.
- Cuadro 3.- Rendimiento del proceso de purificación de las proteínas de 116 y 108 kDa.
- Cuadro 4.- Propiedades eléctricas de yeyuno de rata medida en cámaras de Ussing.
- Cuadro 5.- Expresión de proteínas de 116 y 108 kDa por cepas E. coli enteroagregativas aisladas de niños con diarrea y asintomáticos.
- Cuadro 6.- Expresión de proteínas de 116 y 108 kDa por cepas de E. coli enteroagregativas aisladas del ambiente y de casos clínicos.

## **LISTA DE FIGURAS**

- Figura 1.- Patrón de adherencia agregativo de E. coli a células HEp-2 en cultivo.
- Figura 2.- Perfil electroforético (SDS-PAGE) de las proteínas de EAggEC obtenidas a partir del sobrenadante del cultivo.
- Figura 3.- Doble inmunodifusión (Ouchterlony) del suero de niños infectados por EAggEC.



- Figura 4.-** Inmunoelentrotrensferencia de proteínas secretadas por cepas EAggEC probadas con el suero de niños infectados por las mismas bacterias.
- Figura 5.-** Inmunoelctrotransferencia de proteínas secretadas por diferentes cepas EAggEC probadas con una mezcla de suero de niños infectados por las mismas bacterias.
- Figura 6.-** Inmunoelctrotransferencia de proteínas secretadas por la cepa 17-2 probadas con con el suero de voluntarios desafiados con la misma cepa.
- Figura 7.-** Inmunoelctrotransferencia de proteínas secretadas por la cepa JM221 probadas con con el suero de voluntarios desafiados con la cepa 17-2.
- Figura 8.-** Inmunoelctrotransferencia de proteínas secretadas por la cepa 49766 probadas con el suero de voluntarios desafiados con la cepa 17-2.
- Figura 9.-** Inmunoelctrotransferencia de proteínas secretadas por diferentes cepas EAggEC probadas con una mezcla de suero de voluntarios desafiados por la cepa 17-2.
- Figura 10.-** Perfil de elución de la cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Celulosa de proteínas de 116 y 108 kDa.
- Figura 11.-** SDS-PAGE de las fracciones proteicas obtenidas en el proceso de purificación de las proteínas de 116 y 108 kDa, a partir del sobrenadante del cultivo de la cepa EAggEC 49766.

- Figura 12.-** Inmunoelctrotransferencia de las fracciones proteicas obtenidas en el proceso de purificación de las proteínas de 116 y 108 kDa, a partir del sobrenadante del cultivo de la cepa EAggEC 49766, probadas con una mezcla de sueros de niños infectados con EAggEC.
- Figura 13.-** Perfil de elución de la cromatografía de intercambio iónico en Q-Sepharose de proteínas de 116 y 108 kDa.
- Figura 14.-** SDS-PAGE en gradientes discontinuos de las proteínas de 116 y 108 kDa, libres y en presencia de agentes reductores.
- Figura 15.-** Inmunoelctrotransferencia de proteínas secretadas por la cepa 49766 probadas con gamaglobulina (homóloga) de conejo anti 116 y 108 kDa.
- Figura 16.-** Inmunoelctrotransferencia de proteínas secretadas por diferentes cepas EAggEC probadas con gamaglobulina de conejo anti 116 y 108 kDa.
- Figura 17.-** Inmunoelctrotransferencia de proteínas secretadas por diferentes cepas EAggEC probadas con gamaglobulina de conejo anti hemolisina alfa de E. coli (HlyA).
- Figura 18.-** Inmunoelctrotransferencia de proteínas de 116 y 108 kDa de la cepa EAggEC 49766, que muestra homología antigénica con la toxina colerica (CT) y la toxina termolábil de E. coli (LT).
- Figura 19.-** Corte histológico de duodeno de rata inoculado con la cepa EAggEC 49766.

**Figura 20.-** Corte histológico de duodeno de rata inoculado con la cepa no adherente 30651.

**Figura 21.-** Corte histológico de duodeno de rata inoculado con las proteínas de 116 y 108 kDa.

**Figura 22.-** Propiedades eléctricas de yeyuno de rata medidas en cámaras de Ussing, inoculadas con las proteínas de 116 y 108 kDa.

**Figura 23.-** Propiedades eléctricas de yeyuno de rata medidas en cámaras de Ussing, inoculadas con las proteínas de 116 y 108 kDa, y el precipitado de la cepa no patógena K12.

**Figura 24.-** Propiedades eléctricas de yeyuno de rata medidas en cámaras de Ussing, donde se observa el efecto neutralizante de anticuerpos de conejo anti 116 y 108 kDa.

## **LISTA DE DIAGRAMAS**

**Diagrama 1.-** Metodología. Estrategias utilizadas en el trabajo.

**Diagrama 2.-** Obtención de proteínas totales a partir del sobrenadante del cultivo de la cepa 46766.

## LISTA DE ABREVIACIONES

°C	Grados centígrados.
cfu	Unidades formadoras de colonia.
cm	Centímetros.
cm <sup>2</sup>	Centímetros cuadrados.
EAggEC	<u>Escherichia coli</u> enteroagregativa.
<u>E. blattae</u>	<u>Escherichia blattae</u> .
<u>E. fergusonii</u>	<u>Escherichia fergusonii</u> .
<u>E. harmannii</u>	<u>Escherichia harmannii</u> .
EHEC	<u>Escherichia coli</u> enterohemorrágica.
<u>E. histolytica</u>	<u>Entamoeba histolytica</u> .
EIEC	<u>Escherichia coli</u> enteroinvasiva.
EPEC	<u>Escherichia coli</u> enteropatógena.
ETEC	<u>Escherichia coli</u> enterotoxigénica.
<u>E. vulneris</u>	<u>Escherichia vulneris</u> .
F	Antígeno fimbrial.
g	Fuerza de gravedad.
g/l'	Gramos/litro.
<u>G. lamblia</u>	<u>Giardia lamblia</u> .
H	Antígeno flagelar.
HEp-2	Células de carcinoma faríngeo.
h	Horas.
Isc	Corriente de corto circuito.
K	Antígeno capsular.
K1/K2	Amortiguador de fosfatos de potasio 3.5 M pH 6.8.
kDa	Kilodaltones
l	Litros.
M	Molar.

mA	Miliamperes.
MDa	Megadaltones.
min	Minutos.
mm	Milímetros.
mM	Milimolar.
mV	Milivolts.
$\mu$ A	Microamperios.
$\mu$ g	Microgramos.
$\mu$ l	Microlitro.
nm	Nanometros.
O	Antígeno somático.
OMS	Organización mundial de la salud.
PBS	Solución salina amortiguadora de fosfatos.
PD	Diferencia de potencial.
p/v	Peso/volumen.
R	Resistencia.
rpm	Revoluciones por minuto.
TBS	Amortiguador de tris HCl-cloruro de sodio
TBS-Tween	Amortiguador de tris HCl-Cloruro de sodio-Tween 20.
TRO	Terapia de rehidratación oral.
U	Unidades internacionales.
v	Volumen.
V	Volts.
v/v	Volumen entre volumen.
v:v	Volumen a volumen.
<u>V. cholerae</u>	<u>Vibrio cholerae.</u>
X <sup>2</sup>	Ji cuadrada.
$\Omega$	Ohm's.

## RESUMEN

Las cepas de Escherichia coli (E. coli) enteroagregativas (EAggEC) están epidemiológicamente asociadas con diarrea persistente y diarrea con sangre en niños menores de 5 años principalmente en países en desarrollo. Sin embargo, poco se conoce con respecto a sus mecanismos de patogenicidad.

En este trabajo se presentan datos referentes a la identificación de dos proteínas de alto peso molecular (116 y 108 kDa) presentes en el sobrenadante del cultivo bacteriano de diferentes cepas EAggEC. Estas proteínas fueron purificadas de la cepa EAggEC (O7:H10), aislada durante un brote de diarrea persistente en un Hospital de Pediatría. Las proteínas se precipitaron con sulfato de amonio al 75% de saturación, fraccionándose posteriormente con amortiguador de fosfatos de potasio (K1/K2) a 1.15 y 1.75 M. Al precipitado obtenido en el último paso del fraccionamiento se le realizó cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Celulosa y de manera alternativa en Q-Sepharose. El primer pico de elución de la cromatografía en Q-Sepharose mostró las dos proteínas, teniendo un rendimiento de 4.4% al recuperar 28 mg de proteína de un total de 630 mg. Al realizar la caracterización de ambas proteínas, se observó que son termolábiles y sensibles a proteinasa K. El análisis por SDS-PAGE en condiciones reductoras, mostró que no están constituidas por subunidades unidas por puentes disulfuro. Al analizar estas proteínas por inmunoelectrotransferencia con anticuerpos de conejos contra las toxinas colérica (CT) y termoestable de E. coli (LT); se observó que éstos reaccionaban contra la proteína de 108 kDa, no observándose la misma reactividad con anticuerpos preparados contra la hemolisina alfa de E. coli (HlyA). Al evaluar la reactividad del suero de niños infectados naturalmente por EAggEC y el de voluntarios retados con estas mismas bacterias, se encontró que en ambos casos se presentaba una respuesta intensa contra ambas proteínas.

Utilizando el modelo in vivo de asa ligada de yeyuno de rata, se analizó la actividad de estas proteínas, el estudio histopatológico realizado mostró acortamiento y disminución de las vellosidades intestinales, necrosis, hemorragia de la mucosa y edema, acompañado de una reacción inflamatoria intensa. El ensayo in vitro en Cámaras de Ussing, con intestino de rata, mostró un efecto de tipo enterotóxico, manifestado por el incremento en la corriente de corto circuito y la diferencia de potencial, efecto que fue inhibido cuando las proteínas se incubaron previamente con gamaglobulina de conejo anti 116 y 108 kDa.

El análisis de la frecuencia de expresión de las proteínas de 116 y 108 kDa, para conocer su importancia como posibles factores de virulencia de EAggEC, mostró que 85 (76%) de 126 (100%) cepas aisladas de niños con diarrea, expresaban ambas proteínas, mientras que sólo en 7 (16.2%) de 42 (100%) cepas EAggEC aisladas de niños sin cuadro clínico se identificaron tales productos.

Estos resultados apoyan la participación de estas proteínas (116 y 108 kDa) en la patogénesis de la diarrea por la infección de EAggEC.

## **INTRODUCCION**

Las enfermedades infecciosas afectan al hombre durante todas las etapas de su vida, lo cual las hace relevantes, ya que constituyen la mayor causa de muerte a nivel mundial. Sabemos que todas son prevenibles, lo que las hace factibles de controlar primeramente y posteriormente tender a su erradicación. Para 1990 la estimación mundial de muertes por enfermedades infecciosas y parasitarias fue de 50 millones de defunciones. En los países en desarrollo, una tercera parte de todas estas muertes fueron en menores de 5 años (cerca de 13 millones) (1), entre ellas, las del tracto gastrointestinal representan un serio problema de salud pública especialmente en la población infantil y preescolar (2-3).

## **DEFINICION Y CLASIFICACION DE LA DIARREA**

La diarrea se define como el aumento en el número de evacuaciones y disminución de la consistencia de las mismas (4). La diarrea se puede clasificar en base al tiempo de evolución y por su fisiopatología. En función del tiempo, la denomina diarrea aguda es aquella cuya duración es igual o inferior a 13 días (5), mientras que la diarrea persistente es aquella que tiene una duración de 14 días o más (6). Desde el punto de vista fisiopatológico, la diarrea se explica por uno o varios de los siguientes mecanismos (4-11): 1) disminución en la absorción, 2) secreción aumentada y 3) exudación.

1.-Disminución en la absorción, ésta se produce vía tres mecanismos diferentes: a) mecanismo osmótico (4, 7), b) movilidad intestinal alterada (4, 8) y c) malabsorción específica (4).



a) Mecanismo osmótico (4, 7). Este tipo de diarrea está causada por la ingestión de solutos que se absorben poco, generalmente carbohidratos o iones divalentes. Por ejemplo, magnesio o sulfato. Dentro de las causas exógenas que la originan se encuentra el abuso en el consumo de laxantes (leche de magnesia y sulfato de magnesio), antiácidos y medicamentos diversos (neomicina y colchicina). Las causas endógenas que la producen pueden ser congénitas y adquiridas. Las primeras se han relacionado con trastornos en la absorción de hidratos de carbono por deficiencias enzimáticas (deficiencias de disacaridasas) y las segundas con enfermedades con absorción deficiente, como es la deficiencia de disacaridasas post-enteritis, insuficiencia pancreática (alcohol), sobrecrecimiento bacteriano, enfermedad celiaca, enteritis por rotavirus o secundaria a cirugía (vagotomía, piloroplastía, gastroyeyunostomía).

b) Movilidad intestinal alterada (4, 8). Las diarreas relacionadas con trastornos de la movilidad se asocian principalmente a trastornos orgánicos. Esta puede ser secundaria a tres diferentes mecanismos: 1) aumento en el tránsito intestinal, en este caso se observa una disminución del contacto de la mucosa y el contenido luminal, en consecuencia malabsorción; 2) disminución en la peristalsis, en ésta se condiciona estasis y se favorece la sobrepoblación bacteriana que induce la diarrea; 3) vaceamiento colónico prematuro, se produce por anomalía del contenido o por "irritabilidad" colónica, con la consecuente disminución en el contacto del líquido luminal y la mucosa, y por lo tanto, disminución en la absorción.

c) Malabsorción específica (4). Un ejemplo de este tipo de diarrea es la clorhidrorrea congénita, entidad en donde el paciente es incapaz de absorber cloro activamente, lo que da como resultado disminución en la absorción de líquidos, disminución en la acidificación y aumento en la concentración de cloro, por lo que, los pacientes sufren alcalosis metabólica y diarrea crónica (9).

2.- Secreción aumentada (4, 9). Esta diarrea resulta de una variedad de circunstancias y el mecanismo incluye un agente estimulador, que pueden ser: toxinas bacterianas, hormonas, o bien otros agentes como ácidos biliares y laxantes. Entre los inductores más importantes tenemos microorganismos que elaboran productos con actividad enzimática, como es el caso de las enterotoxinas de Vibrio cholerae (V. cholerae) y E. coli enterotoxigénica (ETEC), que alteran el sistema de la adenilato ciclasa (9).

3.- Exudación (4, 10, 11). La ruptura de la mucosa intestinal debida a la inflamación y ulceración puede condicionar una descarga de moco, detritus celulares, proteínas séricas y sangre hacia la luz del intestino (10). El daño a la mucosa intestinal puede producirse a través de cuatro vías: a) infección, como es el causado por rotavirus, E. coli enteropatógena (EPEC), E. coli enteroinvasiva (EIEC), Shigella, Salmonella, Campylobacter jejuni, Yersinia enterocolitica, Entamoeba histolytica (E. histolytica), Giardia, Cryptosporidium, Ascaris, Trichinella y sprue tropical; b) hipersensibilidad, ésta es debida a infecciones por nemátodos, enfermedad celíaca (hipersensibilidad a las proteínas de la soya o de la leche), colitis inducida por medicamentos (alfa metildopa); c) idiopática o autoinmune (colitis ulcerativa, colitis colagenosa, enfermedad de injerto contra huésped, linfoma, enfermedad de Crohn); d) agentes citostáticos (anticáncer), quimioterapia (mucositis) y radioterapia (enteritis por radiación).

Independientemente del mecanismo fisiopatológico que induzca diarrea, los principales agentes etiológicos del padecimiento particularmente en los países en proceso de desarrollo son los infecciosos.

## **MAGNITUD Y TRASCENDENCIA DE LAS INFECCIONES GASTROINTESTINALES**

La transmisión de las infecciones gastrointestinales está asociada con el nivel de saneamiento y el desarrollo socioeconómico (3, 12-13). En 1990 se estimó la población mundial en 5,292 millones de habitantes, de los cuales, el 77.2% vivían en países en desarrollo, de éstos un tercio son menores de 15 años (2). Una quinta parte de la población mundial no dispone de abasto de agua potable (1,015 millones), de los cuales el 80% viven en zonas rurales. Una tercera parte de la población mundial no dispone de ningún tipo de sistema higiénico de eliminación de las excretas y el 60% de la población total es analfabeta, elevándose en las mujeres hasta el 75% (3).

En 1990 se estimó que la diarrea estuvo asociada en 3.2 millones de muertes en menores de 5 años, ocupando la tercera causa de mortalidad, después de las infecciones respiratorias agudas y las causas perinatales (1). La Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó en 1992, que los niños menores de 5 años (547 millones), que vivían en los países en desarrollo, presentaron en promedio 3 episodios diarreicos anuales (3, 12-14).

En 1991, la OMS estimó que a nivel mundial, el 68% de los niños menores de 5 años de países en desarrollo, tuvieron acceso a la terapia de rehidratación oral (TRO). A pesar de esta medida, sólo el 38% de los episodios de diarrea recibieron sobres de rehidratación oral (1, 13).

En un estudio realizado por la OMS en 5 países en desarrollo, en el que se estudiaron niños de 0 a 36 meses de edad, se encontró que los 3 agentes más frecuentes de diarrea aguda fueron: rotavirus, Shigella y ETEC (15). De las parasitosis más frecuentes se encontraron: ascaris, uncinarias, Trichuris y Giardia lamblia (G. lamblia) (14).

## **SITUACION DE LAS ENFERMEDADES DIARREICAS Y SU ETIOLOGIA EN MEXICO**

En los Estados Unidos Mexicanos, la población estimada para 1990 fue de 80 millones de habitantes, de los cuales, 10 millones eran menores de 5 años. El país se caracteriza por una amplia diversidad ecológica y sociocultural que determina grandes diferencias en las condiciones de salud. El porcentaje de analfabetismo en la población mayor de 10 años fue de 12.4%; en el Distrito federal éste era de 4%, mientras que en Chiapas, Oaxaca y Guerrero, la proporción fue siete veces mayor. El piso de tierra de las viviendas como factor condicionante de geohelmintiasis es de 19.5% y está presente en la mitad de las casas de Chiapas, Oaxaca y Guerrero. En todo el país, 20.6 y 26.4% de las viviendas no tienen agua entubada y drenaje respectivamente (16). A partir de la introducción del cólera en México, el número de hectáreas de cultivos restringidos, regados con aguas negras es insignificante. Sin embargo, el uso de aguas negras no tratadas, para cultivos no restringidos, es todavía una práctica común en las áreas de riego aledañas a las grandes metrópolis (17).

De acuerdo a los resultados de la Encuestas Nacionales de Salud de 1985 a 1991, se estima que en México ocurren 100 a 110 millones de eventos diarreicos al año, de los cuales la incidencia en menores de cinco años es de cuatro episodios al año y de uno en los mayores de esta edad (18-20). En el 9.5% de las diarreas estudiadas había evidencias de sangre en heces y 9.2% tenía diarrea persistente, por lo que 81.3% correspondieron a diarrea aguda líquida (19).

Las enfermedades diarreicas en México muestran variación estacional, con incremento en el número de casos en primavera-verano y descenso en los meses fríos (diciembre, enero y febrero) (21).

Las tasas de mortalidad por diarrea en nuestro país durante los últimos cincuenta años han descendido más de veinte veces y durante los últimos diez años se redujeron a la mitad (asociado al incremento del uso de la TRO); para 1990 se registraron 22,196 muertes por esta causa, con tasa de 26.5 muertes por 100,000 habitantes, representando el 5.2% del total de las defunciones registradas (22).

Del total de muertes por diarrea en 1990, el 63% (14,011 muertes) ocurrieron en menores de cinco años. Anualmente, en el país mueren por diarrea uno de cada 1000 menores de cinco años (tasa de 133.3 muertes por 100,000 habitantes) y una de cada seis defunciones, en este rango de edad, es debida a diarrea (16.4%) (22).

Las muertes por diarrea en menores de cinco años disminuyó de 29,691 en 1980 a 14,011 en 1990. El mayor descenso se observa a partir de mediados de los años ochenta y está asociado al incremento del uso de los sobres de rehidratación oral (22).

Entre 1982 y 1985, Cravioto y col. (23-24) estudiando una cohorte de 75 niños de una localidad rural del estado de Morelos, encontraron ETEC en 33.5%, rotavirus en 9.9%, EPEC 8.1%, Salmonella en 6.2%, Campylobacter 5.6% y Shigella 3.8%; como los principales agentes etiológicos de diarrea.

Sepúlveda y col. (25) efectuaron en 1984 un estudio de casos y controles, en un área del sur de la Ciudad de México y encontraron los siguientes agentes: E. coli enteropatógena 28%, Campylobacter 15%, ETEC 13%, Shigella 9%, G. lamblia 8%, rotavirus 6%, E. histolytica 1.6% y Salmonella 0.8% (25).

En 1991, Olarte y col. (15) trabajando con niños de 0 a 35 meses de edad en el Hospital Infantil de México, identificaron algún agente patógeno en el 70% de los casos de diarrea y en 31% de los controles. Los agentes más frecuentemente identificados fueron ETEC (17% casos/7% controles), rotavirus (13% casos/2% controles), Campylobacter (15% casos/10% controles), Shigella sp. (11% casos/1% controles) y EPEC (10% casos/9.1% controles). El virus Norwalk se identificó en 5%, Salmonella sp. 4%, G. lambia 5%, adenovirus 3% y E. histolytica sólo en 0.7% de los casos.

Las helmintiasis intestinales, en países como México, no son tan importantes como causa de diarrea líquida, a pesar de tener un impacto importante en el crecimiento y desarrollo de los niños (18).

### **Escherichia coli (E. coli) AGENTE CAUSAL DE DIARREA**

Durante las últimas décadas del presente siglo, un número considerable de trabajos de investigación han establecido que E. coli constituye uno de los agentes etiológicos más importantes causantes de enteritis y otras infecciones intestinales. El bacteriólogo alemán Theodore Escherich fue el primero en describir a la bacteria, denominándola Bacterium coli commune. Este investigador aisló la bacteria de las heces normales de un infante y aunque constantemente propuso su participación como agente causal de diarrea, no fue sino hasta la década de los años cincuenta del presente siglo, cuando se estableció plenamente su participación como patógeno intestinal (27).

De acuerdo al manual Bergey's, el microorganismo se incluye en la familia Enterobacteriaceae, dentro del género Escherichia. En la actualidad se conocen cinco especies de este género: E. coli, E. harmannii, E. blattae, E. vulneris y E. fergusonii (28-29). De acuerdo a estudios de hibridación de DNA, el género

Shigella está íntimamente relacionado con E. coli (30). Sin embargo, la separación entre las dos especies se han mantenido principalmente por razones prácticas. E. coli es la especie mejor conocida como patógeno y las especies restantes se han empezado a estudiar respecto a su capacidad para producir enfermedad.

### **CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS, BIOQUIMICAS Y DEL CULTIVO DE E. coli**

E. coli es un bacilo corto Gram negativo, no esporulado, generalmente con flagelos peritricos y fimbrias. Frecuentemente presenta una cápsula y algunas cepas producen colonias mucoides. Es un anaerobio facultativo, crece en medios de cultivo simples y sintéticos, donde utiliza glicerol o glucosa como única fuente de carbono y energía. Fermenta la glucosa para dar ácido y gas. El cultivo en medio líquido de cepas lisas producen una turbiedad uniforme, mientras que las cepas rugosas presentan un sobrenadante claro con un depósito granular de crecimiento. Sobre medios sólidos, las colonias son circulares y lisas, con borde bien definido. En medio conteniendo eritrocitos lavados se observa alfa o beta hemólisis, relacionados con la producción de hemolisinas (31).

### **TIPIFICACION**

E. coli es una especie formada por cepas variables fenotípicamente, por tal motivo, diversos antígenos pueden ser usados para su tipificación. Además de éste, existen otros métodos que son útiles para caracterizar y ordenar los grupos de cepas hasta nivel de especie, como es el caso de la tipificación por fagos (32), por colicinas (33), por sus antígenos fimbriales (F) y capsulares (K) (34).

Mediante la caracterización serológica de sus 173 antígenos somáticos (O) y 56 flagelares (H), se ha demostrado que sólo un pequeño grupo de estos gérmenes están asociados con la producción de enfermedad (35-38).

### **MECANISMOS DE PATOGENICIDAD DE E. coli CAUSANTES DE DIARREA**

La asociación constante entre ciertos serotipos de E. coli con procesos diarreicos, ha permitido plantear medidas de control a través de la búsqueda de los mecanismos de patogenicidad que comparten estas clonas bacterianas. Estos mecanismos corresponden fundamentalmente a tres tipos: 1) Adherencia, indispensable para que la bacteria pueda acercarse, pegarse y colonizar el epitelio de ciertas áreas del intestino; 2) Producción de proteínas bacterianas (toxinas), liberadas una vez que la bacteria ha colonizado el intestino. Siendo su efecto final la estimulación de secreción de agua y electrolitos (enterotoxinas) o la destrucción celular (citotoxinas); 3) Invasión y reproducción bacteriana dentro del citoplasma de las células epiteliales del intestino, lo cual permite a las bacterias evadir los mecanismos de protección del hospedero, una vez que se encuentran en el interior de la célula.

El desarrollo de diversas técnicas de laboratorio han permitido clasificar a las cepas de E. coli, asociadas con procesos diarreicos, en cinco grupos principales (cuadro 1): Enteropatógeno (EPEC), enterotoxigénico (ETEC), enteroinvasor (EIEC), enterohemorrágico (EHEC) (39) y enteroagregativo (EA<sub>g</sub>gEC) (40).



## **CEPAS ENTEROTOXIGENICAS DE E. coli (ETEC)**

A partir de los estudios publicados por De y col. en 1956 (41), en los que se observó que al inocular asas ligadas de intestino de conejos con ultrafiltrados de cultivos bacterianos de cepas de E. coli, éstas se distendían por la acumulación de líquidos. Se demostró que algunas cepas de E. coli tenían la capacidad para producir exotoxinas, que al interactuar con las células epiteliales de la mucosa intestinal del hospedero, inducían aumento en la secreción de agua y electrólitos.

Las cepas ETEC elaboran dos diferentes toxinas. La primera es una proteína dimérica de 86.5 kilodaltones (kDa) de peso molecular, similar en estructura química, función y antigenicidad a la toxina producida por V. cholerae O1 (CT). Por su labilidad al calor (se inactiva a 100°C durante 10 minutos) se denomina termolábil (LT). La toxina está compuesta por dos subunidades conocidas como A y B; la subunidad A posee la actividad enzimática y tiene como función principal inducir una adenosindifosfato ribosilación (ADP ribosilación), que da lugar al incremento en los niveles de adenosinmonofosfato cíclico (AMPC) intracelular. La subunidad B es un pentámero que tiene la propiedad de unirse a las células del epitelio intestinal a través de receptores celulares (gangliósido GM1) de superficie (42). El incremento de los niveles de AMPC intracelular provoca que las células de las criptas intestinales aumenten la secreción de agua y electrólitos, con una consecuente disminución en la absorción en las vellosidades. Ambos eventos conducen a un incremento en la secreción de líquidos a nivel del lumen intestinal, que clínicamente se manifiesta como diarrea.

La otra familia de enterotoxinas producidas por las cepas ETEC son termoestables (ST), estructuralmente son péptidos de bajo peso molecular, entre 1 a 6 KDa, no inmunogénicas, pueden o no ser solubles en metanol y como su

nombre lo sugiere, resistentes al calentamiento (43-44). Aún no ha sido posible evidenciar como es que la toxina (ST) se pega a la membrana y penetra al citoplasma del enterocito. Sin embargo, lo que sí es conocido, es su capacidad para incrementar los niveles de guanosinmonofosfato cíclico (GMPc) al estimular la enzima guanilato ciclasa (44).

Además de la elaboración de las toxinas LT y ST, las cepas ETEC producen proteínas fimbriadas con las cuales se adhieren a receptores celulares específicos. Hasta la fecha, se han descrito cuando menos 15 diferentes tipos de estos factores adhesivos (45-46). Al igual que las enterotoxinas, la producción de los factores de adherencia está controlada genéticamente por plásmidos (45-48).

Las cepas ETEC son causa frecuente de diarrea severa en lactantes en países en desarrollo (49-51), así como la causa más común de diarrea en individuos de países industrializados que viajan a zonas menos desarrolladas del mundo (52).

### **CEPAS ENTEROPATOGENAS DE E. coli (EPEC)**

La capacidad patogénica de cepas de E. coli aisladas de niños con diarrea en los años 40 fue comprobada experimentalmente una década después por Neter y col. (53), cuando oralmente se inocularon voluntarios con dosis elevadas de bacterias ( $10^8$ - $10^9$ /ml). Su virulencia se demostró por la diarrea que desencadenaron, así como por la respuesta inmunológica sistémica desarrollada por los voluntarios, contra los antígenos somáticos de las cepas con las que fueron desafiados. Neter propuso el término EPEC para designar a este grupo de bacterias aisladas de niños con diarrea, capaces de reproducir el cuadro clínico cuando se administraban a adultos humanos.

Estudios de necropsias de niños fallecidos a consecuencia de diarreas causadas por EPEC mostraban lesiones de esfacelamiento en el intestino delgado (54), sin embargo, el mecanismo por el cual producían el daño no era conocido. Investigaciones posteriores, incluyendo estudios con microscopía electrónica, revelaron que las cepas EPEC se encontraban adheridas a la membrana del enterocito de manera íntima, observándose además destrucción importante de las vellosidades intestinales (55).

Cravioto y col. (56) utilizando cultivos de células HEp-2, encontraron que 80% de una colección importante de cepas EPEC se adherían a las células formando microcolonias sobre el citoplasma, característica que no era compartida por otros grupos de E. coli asociados con la producción de diarrea.

Estudios posteriores demostraron que existían cuando menos tres tipos de adherencia de E. coli, observados en células en cultivo HEp-2: 1) Localizada, caracterizada por la formación de microcolonias en la superficie celular; 2) Difusa, cuando las bacterias se adherían a toda la superficie celular y 3) Agregativa, cuando las bacterias formaban acúmulos, con una apariencia de ladrillos apilados tanto en la superficie celular, como en el vidrio de la preparación (57-58).

Diferentes estudios señalan que las cepas de E. coli, con adherencia de tipo localizado, se aíslan significativamente con mayor frecuencia de niños con diarrea secretora aguda (49, 59-60).

Knutton y col. (55) han propuesto que la adherencia de tipo localizado en las cepas EPEC tiene dos fases: una inicial mediada por adhesinas de tipo fimbriado, que permiten a la bacteria acercarse a sus receptores celulares y una segunda fase de adherencia íntima. Esta última se relaciona con el esfacelamiento del epitelio, pérdida de las microvellosidades y la formación de imágenes en pedestal.

Hasta fecha reciente, no existía confirmación morfológica en relación a la primera fase de adherencia. Girón y col. (61) encontraron que cuando crecían repetidas veces en agar sangre una cepa EPEC, ésta expresaba haces de fimbrias parecidos a los que elaboran V. cholerae y Neisseria gonorrhoeae. La codificación genética para la producción de estos haces está controlada por genes presentes en un plásmido, previamente relacionado tanto con la capacidad de cepas EPEC para adherirse en forma localizada, como para causar diarrea en voluntarios humanos (62).

La fase íntima de adherencia, posterior al esfacelamiento de las microvellosidades intestinales, está relacionada con la producción de una proteína de 94 kDa denominada intimina (63-65). La producción de esta proteína está controlada genéticamente por un locus en el cromosoma de la bacteria denominado eae (65). Para la expresión de este locus se requieren ciertos genes presentes en el plásmido antes mencionado, el cual tiene la información que codifica para la adherencia localizada y para la producción de haces de fimbrias en algunas cepas EPEC.

Estudios realizados por Baldwin y col. (66-67) han señalado que la adherencia íntima de las cepas EPEC da lugar a que se polimerice la actina del citoesqueleto, como respuesta a un incremento en los niveles intracelulares de calcio y la activación de la proteína cinasa C. El proceso de adherencia íntima entre la bacteria y la membrana de las células del epitelio intestinal, seguida de la destrucción de las microvellosidades con alteración del citoesqueleto en el sitio de unión de la bacteria, han sido denominados adherencia y esfacelamiento (A/E) (68-70). Los cambios bioquímicos relacionados con estos procesos son los que probablemente inducen a la célula intestinal a secretar agua y electrolitos (cloro y potasio); al espacio intraluminal. El efecto fisiológico secundario a estas alteraciones, así como la deficiente absorción de líquidos por la falta de microvellosidades en segmentos importantes del intestino, son los principales

responsables del cuadro de diarrea.

### **CEPAS ENTEROINVASIVAS DE E. coli (EIEC)**

Las cepas de E. coli cuyo mecanismo de patogenicidad es la invasividad, se caracterizan por pertenecer a un número de serogrupos relativamente pequeño. Desde el punto de vista de su metabolismo, presentan características intermedias con el género Shigella (71), y destaca su deficiente capacidad para utilizar la lactosa y la carencia de flagelos, por lo cual, al igual que las shigellas son inmóviles.

Estudios basados en el análisis de híbridos de una cepa de E. coli K12 con Shigella flexneri (S. flexneri) 2a, demostraron que por lo menos dos regiones del cromosoma de estas bacterias son indispensables para la virulencia: una es el locus kcp, que se relaciona con la capacidad de S. flexneri para producir queratoconjuntivitis y otra es una regiones cercanas al operón de la histidina, que codifican para antígenos somáticos O (72). Para que estas bacterias invadan y se multipliquen en el interior de las células, se requiere que posean un lipopolisacárido liso, ya que las cepas rugosas son incapaces de producir queratoconjuntivitis en la cornea de cobayo (Prueba de Sereny) (73).

Diversos estudios han concluido que además de los genes cromosomales involucrados en la virulencia de estas bacterias, son necesarios locus extracromosomales (74-75). Se ha podido establecer que un plásmido de 140 megadaltones (MDa) presente en las cepas de EIEC y de Shigella, es indispensable junto con los genes cromosomales antes señalados para conferir el fenotipo invasivo a estos microorganismos.

La participación patogénica de la toxina de Shiga, en el caso de Shigella dysenteriae (S. dysenteriae) tipo 1 o a toxinas semejantes en el caso de S. flexneri y EIEC, no es muy clara. Estudios histológicos realizados por Hale y Formal (76) mostraron que las cepas de Shigella se establecen en las células epiteliales, causando destrucción de la mucosa y la formación de abscesos. Estas alteraciones fueron atribuidas a la acción de las citotoxinas, cuya actividad específica es la inhibición de la síntesis proteica (77). Sin embargo, Sansonetti (78), al realizar estudios cinéticos de crecimiento intracelular, demostró que cepas de E. coli que tenían el plásmido de 140 MDa, pero que no producían la toxina semejante a la de Shiga, presentaron un crecimiento mucho mayor que una cepa altamente productora de esta toxina.

Estudios epidemiológicos realizados por Cravioto y col. (49, 79) muestran que EIEC como agente responsable de diarrea se aísla con poca frecuencia, identificándose preferentemente después del 6º mes de vida.

### **CEPAS ENTEROHEMORRAGICAS DE E. coli (EHEC)**

El término E. coli enterohemorrágica propuesto por Levine (39) incluye cepas de diferentes serotipos que presentan las mismas características clínicas, epidemiológicas y patogénicas del serotipo O157:H7; considerado como prototipo del grupo EHEC.

Tzipori y col. (80) utilizan un criterio más amplio para definir a este grupo bacteriano, señalando la asociación de EHEC con la etiopatogenia de colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico. Las cepas responsables de estos cuadros tienen la capacidad para elaborar una o más citotoxinas y son portadoras de un plásmido (50-70 MDa), y en modelos animales inducen distintas lesiones en la mucosa intestinal caracterizadas por el daño de A/E; semejante al causado

por cepas EPEC (68-70).

En la actualidad existe evidencia suficiente que permite reconocer la participación tanto de genes cromosomales como plasmídicos presentes en estas bacterias (69-70). Se ha identificado un locus cromosomal llamado eae, cuya expresión es regulada por genes presentes en el plásmido. Este locus codifica para una proteína de membrana externa (65), la cual confiere a la bacteria la capacidad para adherirse e inducir el efecto de destrucción de las microvellosidades (esfacelamiento) (69-70).

Las citotoxinas que produce el grupo enterohemorrágico de E. coli, por sus características antigénicas y por su actividad sobre cultivos celulares; reciben dos diferentes denominaciones aceptadas en la actualidad: citotoxina semejante a la de Shiga (SLT), por la característica que tiene una de las variedades de cruzar antigénicamente con la toxina de Shigella dysenteriae tipo 1 y el término de verotoxina (VT), por su efecto citotóxico sobre monocapas de células Vero.

Se conocen tres tipos antigénicos de las citotoxinas, dos de ellas afectan específicamente a humanos, refiriéndose como VT1 o SLT-I y VT2 o SLT-II (81), y una variedad antigénica de VT2, que afecta a animales denominada VTe o SLT-III (82).

Todas estas toxinas tienen estructura y mecanismo de acción similar. Son proteínas compuestas por dos subunidades, de las cuales la conocida como A tiene la función enzimática, la cual se encuentra unida al oligómero B, el cual es un pentámero que tiene como función específica: unirse a receptores presentes en la superficie celular (83-84). La actividad específica de estas toxinas consiste en inhibir la síntesis de proteínas a través de interferir con la unión del aminoacil t-RNA con la sub-unidad 60S del ribosoma (85).

Scotland y col. (86) inicialmente y posteriormente otros investigadores (87-88), observaron que los genes que controlan la expresión de la citotoxina era mediada por fagos en estado lisogénico. En México, Eslava y col. (89-90) identificaron en diferentes cepas de E. coli productoras de citotoxina, fagos similares tanto estructural como genéticamente a los descritos por otros investigadores.

Diferentes serotipos de EHEC se han relacionado con la etiología de la diarrea esporádica en adultos, colitis hemorrágica, síndrome urémico hemolítico y púrpura trombocitopénica (91-94). Estos padecimientos se han observado con mayor frecuencia en países con climas templados como son: Estados Unidos, Canadá, Inglaterra, Argentina, Australia y Alemania; entre otros (91-95). Los serogrupos involucrados son diversos, encontrándose más frecuentemente: O26, O111, O121, O145 y particularmente O157 (91-96).

En México, Cravioto y col. (94) encontraron que este tipo de microorganismos sólo se relacionan con diarrea de tipo secretor, leve o moderada. Los serogrupos identificados en este estudio, incluyen algunos de los observados en otras partes del mundo, además de otros como son: O119 y O128.

#### **CEPAS ENTEROAGREGATIVAS DE E. coli (EAggEC)**

Las cepas de EAggEC derivan su nombre por la forma de adherencia que presenta a células HEp-2 en cultivo (40). Esta adherencia se caracteriza por la formación de agregados bacterianos, con una apariencia de ladrillos apilados, observados tanto sobre las células como en la superficie del vidrio de la preparación.



El grupo EAggEC ha adquirido relevancia en los últimos años por considerarse responsable de cuadros de diarrea persistente (con más de 14 días de duración) y diarrea con sangre en niños menores de 5 años de edad, de diversas regiones geográficas tales como: la India, Brasil, Chile y México (40, 97-101).

Algunas cepas de EAggEC aisladas poseen antígeno O no tipificable. Muchas cepas de E. coli que pertenecían a los serogrupos de EPEC: O44, O111ab, O86 y O126; son enteroagregativas (102-103). En el Reino Unido, el grupo de Scotland (103) aisló cepas EAggEC del serotipo O44:H18 a partir de ancianos con diarrea. Además examinando 113 cepas de EAggEC aisladas de casos clínicos, de diversas regiones, encontraron que todos pertenecían al mismo serotipo O44:H18 (104).

En México, Cravioto y col. (60) han reportado una estrecha asociación entre el aislamiento de cepas EAggEC y la presencia de diarrea persistente, y diarrea con sangre en niños menores de 5 años de edad.

Para explicar el o los mecanismos por los cuales las cepas enteroagregativas de E. coli causan diarrea, se han desarrollado estudios en modelos animales, en voluntarios humanos y modelos in vitro; de donde varios factores de patogenicidad han sido propuestos con el fin de explicar el daño intestinal producido por este grupo bacteriano.

Tickoo y col. (105) demostraron que algunas cepas EAggEC vivas de origen humano, al ser administradas por vía oral a conejos fueron capaces de colonizar los intestinos delgado y grueso, causando diarrea, acortamiento moderado de las vellosidades y cariorraxis.

Estudios realizados por Vial y col. (106) demostraron que al inocular las cepas EAggEC O42 y 17-2 vivas de origen humano en asas ligadas de la porción ileal de intestino de conejo y rata, estas cepas producían lesiones histopatológicas semejantes a las causadas por cepas de E. coli productoras de SLT ensayadas en el mismo modelo. El daño observado se caracterizó por acortamiento y necrosis hemorrágica de las vellosidades intestinales, además por una respuesta inflamatoria intermedia, con edema e infiltración de la submucosa por células mononucleares.

Tzipori y col. (107) realizaron estudios con un modelo animal en cerdos gnotobioticos, a los cuales se les administraron las cepas EAggEC JM221 (aislada de un adulto con diarrea en México) y 17-2 (aislada de un niño con diarrea en Chile); los resultados obtenidos refieren la aparición de un cuadro diarreico e incluso la muerte de algunos cerdos. El examen histopatológico del intestino mostró hiperemia moderada de la porción distal del intestino delgado y del ciego, así como dilatación de las vellosidades del intestino delgado, en ausencia de una respuesta inflamatoria, además de agregados bacterianos junto con una matriz mucoide sobre el epitelio intacto.

En un primer estudio realizado en humanos por Mathewson y col. (108), en un intento por identificar aislados de EAggEC patogénicos, voluntarios adultos fueron inoculados por vía oral con cepas EAggEC, encontrando que la cepa JM221 fue capaz de producir diarrea en 3 de 8 individuos.

En un segundo estudio, Nataro y col. (109) inocularon 19 voluntarios adultos por vía oral, con la cepa EAggEC 17-2, a una dosis de  $10^{10}$  unidades formadoras de colonias (cfu), encontrando que sólo un sujeto experimentó diarrea. El suero de 13, de los 19 individuos, mostró un incremento en anticuerpos hacia una proteína de 14 KDa en un ensayo de inmunoelectrotransferencia. El gen que

codifica para esta proteína está localizado en un plásmido en la cepa EAggEC 17-2.

En otro estudio realizado por Nataro y col. (110), al inocular cuatro grupos de 5 voluntarios adultos, cada grupo con una de 4 diferentes cepas EAggEC y cada individuo a una dosis de  $10^{10}$  cfu, encontraron que sólo la cepa O42 [JPN10] causó diarrea en 3 de 5 adultos; los otros 3 aislados de EAggEC (17-2, 34b y JM221) fallaron en la inducción de diarrea. Todos estos individuos fueron seleccionados para este trabajo por su condición de seronegatividad en contra de la proteína de 14 KDa.

La adherencia de tipo agregativo ha sido asociada con un plásmido de 60-65 MDa (106, 111), éste codifica para diferentes haces de fimbrias (AAF/I y AAF/II) de 2 a 3 nm de diámetro (109-110).

Knutton y col. (102) encontraron que las cepas EAggEC expresan cuatro tipos morfológicos de fimbrias (observadas por microscopía electrónica), con las que se adhieren a la mucosa del colon humano en ensayos in vitro. A diferencia de lo observado en EPEC (101, 103, 112), estas bacterias no se adhieren íntimamente a la membrana de la célula.

La simple adherencia de EAggEC a la superficie de las células epiteliales del intestino no explica el daño intestinal observado. Lo anterior sugiere que pudieran estar involucrados una o varias toxinas en el proceso de daño. Sin embargo, no elaboran toxinas como las enterotoxinas de V. cholerae (CT) y de ETEC (LT y ST) o citotoxinas como las que produce S. dysenteriae tipo 1 (SLT-I y SLT-II). No obstante que las lesiones histopatológicas descritas anteriormente en los modelos animales son similares a las producidas por cepas productoras de SLT, el DNA de cepas EAggEC no hibridiza con sondas específicas para SLT-I o SLT-II (106).

Savarino y col. (113-114) reportaron en una cepa EAggEC (17-2) una toxina termoestable de aproximadamente 10 kDa, la cual denominaron enterotoxina termoestable 1 de EAggEC (EAST1). El gen que codifica para esta proteína (astA) está localizado en el plásmido previamente mencionado (113-114). EAST1 incrementa los niveles de GMPc y en el modelo in vitro de cámaras de Ussing produce un incremento en la corriente de corto circuito (debido a la secreción de líquidos), sugiriendo un efecto enterotóxico semejante al producido por la enterotoxina termoestable de ETEC (STa), sin embargo, no da reactividad cruzada con anticuerpos producidos contra STa.

Baldwin y col. (115) encontraron que el sobrenadante del cultivo de diferentes cepa EAggEC, precipitado con sulfato de amonio, tenía la propiedad de incrementar los niveles de calcio intracelular en células Hep-2. Estos autores señalaron como posible responsable de tal efecto a una proteína de 120-140 kDa, la cual mostró reactividad cruzada con anticuerpos preparados en contra de la porción carboxilo terminal (RTX) de la hemolisina alfa producida por E. coli, la cual es una secuencia repetida de 9 aminoácidos rica en glicina (L-X-G-G-X-G-(N/D)-D-X). Los autores propusieron que esta proteína, semejante a la hemolisina alfa de E. coli, induce la elevación del calcio intracelular libre por entrada de calcio extracelular, seguido de un proceso de fosforilación proteica, debida probablemente a la acción de cinasas calcio dependientes.

Una actividad hemolítica por contacto ha sido reportada por Haque y col. (117), aunque este efecto posiblemente es debido a la hemolisina alfa de E. coli (HlyA) previamente reportada por Welch (117-118). Knutton (102) ha observado propiedades de una hemolisina alfa por algunas cepas EAggEC en ensayos de citotoxicidad en monocapas de células en cultivo HEP-2. Elliot y col. (119) han propuesto que varias cepas EAggEC produce hemolisina alfa, observaciones basadas en ensayos de hemólisis de eritrocitos, sondas de ADN y anticuerpos monoclonales.

**Todo lo anterior indica que sólo algunas cepas EAggEC producen alguna de estas toxinas y ninguna de ellas ha sido asociada plenamente con la enfermedad entérica inducida por el microorganismo.**

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha establecido epidemiológicamente que el aislamiento de cepas de EAggEC se asocia con casos de diarrea persistente y diarrea con sangre en humanos, experimentalmente se ha demostrado la capacidad de estas cepas para adherirse a la superficie de células en cultivo, a enterocitos humanos y de animales de experimentación a través de fimbrias, evento que es indispensable para la colonización del intestino (102, 106-107, 110, 120-121). Sin embargo, este último fenómeno no explica en su totalidad la patogénesis de EAggEC. Lo anterior sugiere que en el proceso de daño al intestino deben estar participando factores tóxicos como son la HlyA descrita por Welch (117-118), la EAST1 descrita por Savarino (113-114) y la hemolisina estimuladora de fosforilación de proteínas de Baldwin (115). De las dos últimas no se ha demostrado su participación en el proceso de daño al intestino, tanto en ensayos in vivo en animales de experimentación como en voluntarios humanos. De igual manera, no existe evidencia de una respuesta inmunológica en contra de alguno de estos factores en casos clínicos o en los individuos inoculados experimentalmente.

Hasta el momento, aunque se han descritos diferentes factores bacterianos no se ha establecido la participación de alguno en la patogénesis de la diarrea. Conocer plenamente los mecanismos por los cuales la bacteria induce el cuadro clínico, permitirá proponer los procedimientos idóneos para el control de la infección por este grupo bacteriano.

## **OBJETIVO GENERAL**

Identificar y caracterizar componentes secretados al medio de cultivo por cepas EAggEC, que pudieran participar en el proceso de daño intestinal relacionado con la diarrea producida por este grupo bacteriano.

## **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- 1.- Obtener, purificar y caracterizar los componentes proteicos secretados por diferentes cepas EAggEC.
- 2.- Obtener anticuerpos específicos contra las fracciones proteicas identificadas.
- 3.- Evaluar la respuesta inmune contra los componentes identificados, en el suero de niños convalecientes de diarrea por EAggEC.
- 4.- Determinar la actividad biológica de las fracciones proteicas identificadas utilizando un modelo animal.
- 5.- Evaluar la actividad biológica de las fracciones proteicas obtenidas empleando el sistema in vitro de cámaras de Ussing.
- 6.- Determinar la frecuencia de expresión de las fracciones proteicas secretadas por cepas EAggEC, aisladas de niños con diarrea y del ambiente.

## **HIPOTESIS**

**Las cepas de EAggEC están relacionadas principalmente con diarrea persistente y diarrea con sangre. El simple proceso de adherencia bacteriana no explica los cuadros clínicos, por lo que, la patogénesis de las mismas debe estar relacionada además de la adherencia con productos con actividad tóxica secretados por la bacteria.**



## **MATERIAL Y METODOS**

En el diagrama 1 se muestran los procedimientos metodológicos utilizados en el análisis de los factores secretados por cepas EAggEC durante el desarrollo de este trabajo.

### **CEPAS**

Se utilizaron 191 diferentes cepas de *E. coli* con adherencia de tipo agregativo a células HEp-2, algunas positivas en la prueba de hibridación con una sonda para EAggEC (cuadro 2). Las cepas fueron aisladas en estudios previos realizados por Cravioto y col. (23-24, 49, 60), y actualmente éstas forman parte del cepario del Laboratorio de Serología del Departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina de la UNAM. Del total de cepas EAggEC, 126 fueron aisladas de niños con diferentes tipos de diarrea (aguda, persistente y con sangre), 43 fueron aisladas de niños sin cuadro clínico de diarrea y 22 aisladas de diferentes fuentes ambientales. Las cepas prototipo EAggEC utilizadas como control fueron: 17-2 (aislada de un niño con diarrea en Chile, productora de EAST1), O42 [JPN10] (aislada de un niño con diarrea en Lima, Perú. Productora de la proteína de 120-140 kDa que cruza antígenicamente con la hemolisina alfa de *E. coli* y que induce fosforilación de proteínas), 34b (aislada de un niño con diarrea persistente en la India), JM221 (aislada de un adulto con diarrea en México). Las cepas 30651 y K12 sin propiedades de virulencia como controles negativos; la primera aislada de un niño sin diarrea y la segunda que se utiliza como recipiente en ensayos de transformación en biología molecular.

Todas las cepas fueron caracterizadas para los antígenos somático (O) y flagelar (H), mediante aglutinación en microplaca, utilizando anticuerpos contra los 173 antígenos O y 56 H ((122-123).

Las cepas bacterianas se conservaron en medio de Dorset y su pureza se comprobó cultivándolas en medio de gelosa sangre y Mac Conkey.

## ENSAYO DE ADHERENCIA A CELULAS

Se prepararon monocapas de células HEp-2 en lentes de vidrio colocadas en placas de 24 pozos. Las células se cultivaron en medio mínimo esencial (MEM), éste fue suplementado con 10% (v/v) de suero fetal de ternera (inactivado a 56°C por 30 min), 2 mM de L-glutamina, 10 mM de HEPES, 0.075% (p/v) de bicarbonato de sodio y una mezcla de antibióticos (penicilina-estreptomicina a una concentración final de 100 U/ $\mu$ g/ml). Se crecieron en una atmósfera al 90% de humedad, en presencia de una mezcla de CO<sub>2</sub>:O<sub>2</sub> (5%:20%; [v/v]); a temperatura de 37°C. Previo al ensayo de adherencia, la monocapa obtenida fue lavada con PBS pH 7.4 e incubadas con 1% (p/v) de D-manosa en MEM libre de suero fetal y antibióticos.

Las bacterias se crecieron en caldo peptonado al 2% (p/v), con 1% (p/v) de D-manosa y se incubaron a 37°C durante toda la noche. De este cultivo se inocularon 25  $\mu$ l sobre las monocapas de células HEp-2 previamente preparadas. Las placas se incubaron durante 3 h, después se lavaron con PBS y se fijaron con metanol 10 min. En seguida se tiñeron con colorante de Giemsa por 30 min, se lavó una vez más con PBS y se decoloraron las preparaciones obtenidas utilizando: acetona (100%; [v/v]), acetona:xileno; (50%:50%; [v:v]), acetona:xileno (33%:66%; [v:v]) y xileno (100%; [v/v]). Por último, las monocapas sobre las lentes se montaron en un portaobjetos con resina (Depex) y se observaron las preparaciones al microscopio con el objetivo 100X. Las cepas de E. coli se consideraron adherentes cuando el 40% de las células presentaron al menos diez bacterias adheridas.

## **OBTENCION DE PROTEINAS TOTALES**

Para obtener las proteínas secretadas al medio de cultivo, las cepas de EAggEC se crecieron en caldo nutritivo (Difco Laboratories Cat. No 0003-01-6) a 8 g/l de medio. Tubos conteniendo 5 ml de caldo nutritivo fueron adicionados con las bacterias y se incubaron durante 4 h a 37°C; en agitación para obtener un preinóculo. De éste se tomaron 200 µl para reinocular matraces de 500 ml, conteniendo 200 ml del mismo medio, éstos se incubaron durante 18 h a 37°C en agitación continua. Los cultivos se centrifugaron a 12,000 g durante 30 min a 4°C, el paquete bacteriano se descartó y el sobrenadante se precipitó con sulfato de amonio a una saturación de 60 o 75% (350 y 470 g/l de sal respectivamente). El sulfato de amonio se adicionó lentamente al sobrenadante del cultivo bacteriano libre de bacterias, con agitación suave hasta su total disolución, dejándose en reposo durante toda la noche a 4°C (124). El precipitado se obtuvo por centrifugación a 12,000 g durante 30 minutos a 4°C. Posteriormente fue resuspendido y dializado con solución amortiguadora de fosfatos de sodio 0.07 M pH 8.2. La muestra se dializó durante tres días, haciendo dos cambios de 4 l por día (127). El producto dializado se estabilizó con glicerol a una concentración final del 20% v/v y se guardó en alícuotas a -20°C para su análisis posterior (diagrama 2).

## **CUANTIFICACION DE PROTEINAS TOTALES**

La concentración de proteínas de los productos obtenidos se determinó por el método de Bradford (126), utilizando el microensayo en placa, empleando seroalbúmina bovina (fracción V) como estándar, la reacción colorida se midió a 575 nm en un espectrofotómetro Dynatech MR 580.

## **ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA CON SDS (SDS-PAGE)**

Las proteínas obtenidas a partir del sobrenadante del cultivo de las cepas EAggEC se analizaron por electroforesis convencional en una dimensión, bajo condiciones desnaturizantes en geles de poliacrilamida al 10% (p/v) con 0.1% (p/v) de dodecil-sulfato de sodio (SDS-PAGE), libres o en presencia de beta-mercaptoetanol (127-128). Las dimensiones del gel resolutor (separador) fueron de 10 cm de altura por 1.5 mm de espesor (10 X 1.5). La corriente aplicada al gel concentrador fue de 100 V y de 200 al gel resolutor, en ambos casos con el amperaje variable. La cantidad de proteína aplicada por carril fue de 10 a 100 ug.

La migración de las proteínas fue comparada con marcadores de peso molecular conocido preteñidos (129): beta-galactosidasa de E. coli, subunidad de 116 kDa; fructosa-6-fosfato cinasa de músculo de conejo, subunidad de 91.8 KDa; piruvato cinasa de músculo de pollo, subunidad de 72.7 KDa; fumarasa de corazón de cerdo, subunidad de 57.8 KDa; deshidrogenasa láctica de músculo de conejo, subunidad de 48.8 KDa; triosafosfato isomerasa, subunidad de 34.1 KDa, (Sigma Kit No. MW-SDS-BLUE).

Los geles se tiñeron con azul de Coomassie R (Coomassie Brilliant Blue R, Sigma Chemical Co., cat No B 0630) y con nitrato de plata (Sigma Chemical Co. Kit No AG-25, Silver stain) para analizar el perfil proteico de cada cepa (127, 139).

## **GELES EN GRADIENTES DISCONTINUOS**

Como método alternativo se analizaron los productos proteicos utilizando SDS-PAGE en gradiente (127). Este tipo de geles tienen las mismas características de los anteriores, con la diferencia que el gel resolutor se formó en dos fases: una inferior que abarcó cuatro quintas partes y una quinta parte superior, con 6 y 8% (p/v) de acrilamida respectivamente.

## **ANTICUERPOS**

Se probaron diferentes antisueros y anticuerpos en contra de los componentes proteicos secretados por EAggEC:

- 1.- Suero de 116 niños que fueron hospitalizados en la Sala de Nutrición del Instituto Nacional de Pediatría (INP) de la Ciudad de México por problemas de desnutrición asociada con diarrea, de los cuales se aislaron cepas EAggEC.
- 2.- Suero y fluido intestinal de yeyuno, proporcionados por Nataro J. P. del CVD en Baltimore. Obtenidos de 10 voluntarios humanos, antes y después de la administración por vía oral con  $10^{10}$  cfu de la cepa EAggEC 17-2.
- 3.- IgG de conejo anti-hemolisina alfa de E. coli, molécula completa (anti-HlyA), purificada por cromatografía de afinidad (proporcionada por Welch).
- 4.- Gamaglobulina de conejo anti-toxina colérica (anti-CT).
- 5.- Gamaglobulina de conejo anti-toxina termolábil de E. coli (anti-LT).

- 6.- IgG de conejo anti-toxina tetánica (anti-TT).
- 7.- Anticuerpo monoclonal de ratón (13C4) anti-citotoxina semejante a la de Shiga-I/Verotoxina 1 PR87-32 (anti-SLT I/VT 1).
- 8.- Anticuerpo monoclonal de ratón (BC5 BB12) anti-citotoxina semejante a la de Shiga-II/Verotoxina 2 PR87-32 (anti-SLT II/VT 2).

La detección de los anticuerpos anteriores combinados con el antígeno se llevó a cabo mediante un segundo anticuerpo en contra del primero, estando el segundo anticuerpo conjugado a la enzima peroxidasa. Se utilizaron:

- 1.- Anti-IgG de conejo (Kinkergaard and Perry Laboratories, cat. No 074-1516).
- 2.- Anti-IgG de humano (Hy Clone, cat. No EA-1164-U).
- 3.- Anti-IgA humana (Kinkergaard and Perry Laboratories, cat. No 14-10-01).
- 4.- Anti-gama globulinas de ratón: IgG, IgA y IgM (Sigma No A0412).

## **DOBLE INMUNODIFUSION**

Los 116 sueros de niños convalecientes de cuadros diarréicos, internados en el INP, se analizaron por doble inmunodifusión en agar de acuerdo con la técnica descrita por Ouchterlony (130). El ensayo se realizó en portaobjetos, cubriendo éstos con 5 ml de agar al 1% (p/v) en amortiguador de barbital conteniendo azida de sodio al 0.02% (p/v). En el pozo central se colocó el

antígeno bacteriano (precipitado proteico total) obtenido de la cepa 49766 y el precipitado de una cepa K12 como control negativo, los sueros de los infantes se colocaron en pozos laterales. La reacción se llevó a cabo a 4°C en cámara húmeda por 48 h, las muestras se lavaron durante 72 h con PBS pH 7.4 en presencia de azida de sodio 0.02% (p/v). Después se llevaron con agua destilada durante un día y se secaron a temperatura ambiente. Por último, las laminillas se tiñeron con amido negro (negro amido 10B Sigma I.C. No.20470) al 0.5% (p/v), en ácido acético al 20% (v/v) durante 7 min, eliminando el exceso de colorante al lavar con ácido acético al 5% (v/v).

## **INMUNOELECTROTRANSFERENCIA**

Los productos proteicos obtenidos de las diferentes cepas bacterianas, sometidos a SDS-PAGE, fueron transferidos a membranas de papel de nitrocelulosa (Inmunobilon-N C, Millipore HAHY 304 FO). Para esto se utilizó el método de Towbin y col. (131). El amortiguador de transferencia se preparó con 0.25% (p/v) de Trizma-base, 1.2% (p/v) de glicina y 16.6% (v/v) de metanol. Las condiciones de transferencia fueron las siguientes: 200 mA constante por 3 h para geles normales de (10 X 1.5), mientras que en los geles en gradientes discontinuos se utilizaron 200 mA constante por 1.5 h. La transferencia de las proteínas al papel de nitrocelulosa se comprobó mediante la tinción reversible con amido negro al 0.001% (p/v) en 0.5% (v/v) de ácido acético glacial, éste posteriormente se eliminó lavando las membranas con un exceso de 0.5% (v/v) de Tween-20 en H<sub>2</sub>O destilada, seguido de amortiguador 0.01 M Tris-HCl en 0.15 M NaCl pH 7.4 (TBS). Los sitios libres de las membranas fueron bloqueados durante 1 h a temperatura ambiente con leche descremada al 5% (p/v) en TBS. Al terminar se lavó tres veces (5 min cada uno) con Tween-20 al 0.05% (v/v) en TBS (TBS-Tween). Los antisueros y anticuerpos fueron diluidos en leche descremada al 5% (p/v) en TBS. Posteriormente se incubaron con las membranas

de manera independiente durante 1 h a temperatura ambiente. Después de incubar con el primer anticuerpo, las membranas se lavaron con TBS-Tween como se describió anteriormente. Para la detección del complejo antígeno-anticuerpo se utilizaron anticuerpos marcados con peroxidasa diluidos en leche descremada al 5% en TBS: anti-IgG de conejo (1:5000), anti-IgG humana (1:1000), anti-IgA humana (1:1000) y anti-gama globulina total de ratón (1:1000). En seguida se lavó con TBS-Tween y se incubó durante 5 min en 0.01 M Tris-HCl pH 6.8 (TB). La reacción fue evidenciada por la degradación del sustrato  $H_2O_2$  en presencia de 4-cloro-1-naftol, dando para una reacción positiva, bandas de un precipitado insoluble oscuro. La reacción se detuvo lavando con un exceso de agua corriente.

## **PURIFICACION DE PROTEINAS**

Para la producción y purificación de las proteínas identificadas se utilizó la cepa 49766, empleando la siguiente secuencia:

Se utilizó un cultivo bacteriano de 6 l en caldo nutritivo para la obtención de los precipitados proteicos tal como se describió previamente (124). Las proteínas se precipitaron con sulfato de amonio al 75% (p/v) de saturación y se dializaron contra amortiguador de fosfatos de sodio 0.07 M pH 8.2 (124-125).

El precipitado obtenido se fraccionó con una solución de fosfatos de potasio 3.5 M pH 6.8 (K1/K2) (125), primeramente a 1.15 M durante 18 h, el precipitado fue separado del sobrenadante mediante centrifugación a 12,000 g durante 30 min a 4°C. El sobrenadante de la precipitación anterior (1.15 M) fue nuevamente fraccionado, ahora a 1.75 M con K1/K2 también por 18 h. El precipitado fue separado del sobrenadante mediante centrifugación a 12,000 g durante 30 min a 4°C. Las fracciones obtenidas (precipitados y sobrenadantes



a 1.15 y 1.75 M con K1/K2) se dializaron contra amortiguador de fosfatos de sodio 0.07 M pH 8.2. El preprecipitado a 1.75 M se sometió a cromatografía (127, 132, 134-135), la primera de intercambio iónico en DEAE-Celulosa (Sigma D 6418), seguida por otra de exclusión molecular en Sephadex G-100 (Farmacia Fine Chemicals No 17-0060-01). De manera alterna, el precipitado en 1.75 M se sometió a cromatografía en columna de intercambio iónico (127, 132-133) en Q-Sepharose (Farmacia Fine Chemical No 17-0510-01).

Las dimensiones de las columnas y las condiciones de elución fueron las siguientes:

- 1.- DEAE-Celulosa 1.5 cm de diámetro por 50 cm de largo. Velocidad de flujo de 10 ml/h. Fracciones de 5 ml.
- 2.- Sephadex G-100 1.2 cm de diámetro por 60 cm de largo. Velocidad de flujo 10 ml/h. Fracciones de 2.5 ml.
- 3.- Q-Sepharose 1.4 cm de diámetro por 57.5 cm de largo. Velocidad de flujo 50 ml/h. Fracciones de 10 ml.

Todas las columnas fueron equilibradas con amortiguador 0.05 M Tris-HCl en 0.01 M EDTA.2Na a pH 8.0. Algunas proteínas fueron eluidas en el mismo amortiguador. Las fracciones proteicas retenidas por las columnas de intercambio iónico se eluyeron aumentando la fuerza iónica del sistema con 0.5 M de NaCl.

Los perfiles de elución se determinaron por dos vías: 1) midiendo la densidad óptica de cada fracción con luz ultravioleta a 280 nm, utilizando un espectrofotómetro Zeiss (PM 2K), 2) por otro lado, una muestra de cada fracción se utilizó en una reacción colorida por el método de Bradford y se leyó en un espectrofotómetro Dynatech MR 580 a 575 nm.

Las fracciones proteicas obtenidas se estabilizaron con glicerol al 20% (v/v).

## **OBTENCION DE ANTICUERPOS POLICLONALES DE CONEJO**

Para la obtención de sueros hiperinmunes en contra de las proteínas de 116 y 108 kDa, obtenidas a partir de los sobrenadantes de los cultivos de las cepas EAggEC, se utilizaron conejos Nueva Zelanda blancos de 2 meses de edad bajo dos protocolos de inmunización:

1.- Un lote de cuatro conejos fueron inmunizados con las proteínas obtenidas por cromatografía en Sephadex G-100. Se administraron 7 dosis con 100  $\mu$ g de proteína en solución. Las cuatro primeras dosis se inocularon en presencia de adyuvante completo de Freund (136), en proporción de 1:1 (v:v), cada 15 días. La vía de administración de la primera dosis fue por vía subcutánea en el dorso y en el cojinete plantar, de la segunda a la cuarta por vía subcutánea en el dorso. Las últimas 3 dosis se administraron por vía intramuscular, libres de adyuvante, cada 7 días.

2.- Por otro lado, dos fracciones proteicas obtenidas de la cromatografía en Q-Shepharose se sometieron a SDS-PAGE en gradientes discontinuos (6 y 8%; [v/v]). Las bandas de proteína se detectaron por tinción con azul de Coomassie, se cortaron y homogeneizaron. Cada bandas fue inoculada en un conejo. La vía de administración fue subcutánea en el dorso, administrándose un total de cinco dosis, con intervalos de 15 días.

Previo a la inmunización se tomó una muestra sanguínea de cada uno de los conejos para emplear el suero como control negativo.

## **OBTENCION Y PURIFICACION DE GAMAGLOBULINA HIPERINMUNE HOMOLOGA**

Los conejos inmunizados se sangraron a blanco, la sangre se dejó durante varias horas coagular a temperatura ambiente y se removió el coágulo con un aplicador de madera que permitió su contracción durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se centrifugó a 2000 g durante 30 min a 4°C y se recuperó el suero del sobrenadante. La fracción gamaglobulina del suero se obtuvo por precipitación con sulfato de amonio (124, 137), inicialmente al 50% (p/v) de saturación y posteriormente al 33% (p/v). La gamaglobulina precipitada se dializó contra PBS pH 7.4 a 4°C para eliminar el exceso de sulfato de amonio, haciendo dos cambios diarios de cuatro litros cada uno, durante 3 días. Las muestras se guardaron en alícuotas de 50 µl a -20°C hasta su uso.

## **MODELO DE ASA LIGADA DE INTESTINO DE RATA**

Se utilizó el modelo de asa ligada de intestino delgado de rata (106, 138) para evaluar la actividad de las fracciones obtenidas. Ratas Sprague-Dawley de 2 a 3 meses, mantenidas en ayuno durante 24 h, se les practicó laparotomía para exponer el intestino delgado, se localizó el duodeno y sobre éste se prepararon tres segmentos de aproximadamente 10 cm de longitud, dejando entre ellos, un segmento de aproximadamente 2 cm. En cada segmento se inocularon 100 µg de cada una de las fracciones proteicas obtenidas de la cepa 49766. En este caso se utilizó como controles: solución salina en la que se diluyeron las fracciones y un precipitado de una cepa no patógena (K12) obtenido en las mismas condiciones que el de la cepa 49766. Empleando el mismo sistema se administraron de manera independiente  $3 \times 10^8$  bacterias vivas de cada una de las cepas EAggEC: 49766, 17-2 y JM221. También se utilizó la cepa no adherente 30651 como control. Una vez terminada la inoculación se introdujo el

intestino y se cerró por planos, dejando a los animales en reposo 6 h sin alimento (sólo con ingesta de agua). Al finalizar dicho tiempo, los animales se anestesiaron y posteriormente se sacrificaron para visualizar los segmentos inoculados. De cada segmento se tomó una porción de aproximadamente 1 cm, el cual se colocó en formaldehído al 3% (v/v) en amortiguador salino. Los segmentos se incluyeron en parafina, se cortaron en microtomo y se tiñeron en hematoxilina eosina para su posterior observación al microscopio de luz.

## **MODELO DE CAMARAS DE USSING**

La actividad biológica de las proteínas previamente identificadas se determinó empleando el sistema in vitro de cámaras de Ussing (113-114, 139). Se utilizaron fragmentos de yeyuno de ratas adultas Spregue Dawley. Las ratas fueron anestesiadas previamente con pentobarbital sódico. El tejido se conservó en solución Ringer, gasificado con una mezcla de O<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub> (95%:5%). Los segmentos se cortaron siguiendo el borde del mesenterio, se lavaron con solución de Ringer fría y se dividieron en dos fragmentos, uno de los cuales se utilizó para el ensayo y el otro como control. Estos fragmentos fueron colocados entre las aberturas circulares (6 mm de diámetro, 0.28 cm<sup>2</sup>) de dos hemicámaras de Ussing adyacentes. Cada hemicámara se llenó con 10 ml de solución de Ringer gasificante y se mantuvo a 37°C con burbujeo constante de la mezcla O<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>. La diferencia de potencial transmural (PD) y la corriente de corto circuito (I<sub>sc</sub>), expresadas en milivolts (mV) y en microamperios entre cada centímetro cuadrado ( $\mu$ A/cm<sup>2</sup>) respectivamente, fueron determinados a intervalos de 1 min empleando un aparato fijador de voltaje.

Las fracciones obtenidas por cromatografía en Q-Sepharose (del precipitado 1.75 M de la cepa 49766) y el precipitado total de la cepa K12 fueron ajustadas a la concentración de 2.5  $\mu$ g/ml, para lo cual se utilizó como

diluyente solución de Ringer previamente calentada a 37°C. En seguida se agregaron 10 ml (25 µg de proteína) a la hemicámara que contenía la preparación con la porción mucosa del yeyuno de rata. Solución fresca de Ringer calentada a 37°C se colocó en la porción serosa y ambas hemicámaras fueron sometidas a burbujeo con la mezcla O<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>. Los valores de resistencia transmural (R), expresada en Ohm's por cm cuadrado (Ωcm<sup>2</sup>), se obtuvieron de los valores de la PD y I<sub>sc</sub> al utilizar la ecuación de la ley de Ohm.

## INACTIVACION

Las fracciones obtenidas por cromatografía en Q-Sepharose (25 µg de proteína) fueron tratadas con calor a 75°C durante 15 min o con 200 µg/ml de proteinasa K (proteasa de Tritirachium album, Sigma cat. 2308) a 37°C durante 1 h, antes de ser adicionadas al lado luminal de las porciones de yeyuno montadas en las cámaras de Ussing (142). Los valores de PD e I<sub>sc</sub> fueron registrados 30 min después de la adición a la hemicámara, lo anterior fue con el propósito de determinar si es termoestable y de naturaleza proteica.

Por otra parte, en el mismo modelo de cámaras de Ussing se evaluó el efecto neutralizante de los antisueros y anticuerpos siguientes: 1) gamaglobulina hiperinmune contra las fracciones proteicas identificadas, 2) gamaglobulina contra toxina colérica (anti-CT) y 3) el suero de un infante del cual se aisló EAggEC. Las fracciones proteicas obtenidas por cromatografía en Q-Sepharose se incubaron durante 10 min con cada uno de los anticuerpos antes de ser agregados a la porción luminal de la hemicámara de Ussing. Los antisueros y anticuerpos fueron calentados a 56°C por 30 min previamente para inactivar factores del complemento) (143).

## **FRECUENCIA DE EXPRESION DE PROTEINAS SECRETADAS POR FAggEC**

Se analizó la frecuencia de expresión de las fracciones proteicas secretadas por cepas EAggEC aisladas de pacientes con diarrea. Las cepas fueron aisladas en estudios previos realizados por Cravioto y col. (23-24, 49, 60). Cada cepa EAggEC corresponde a un paciente, estos últimos presentaron diferentes características clínicas (diarrea aguda, diarrea persistente y diarrea con sangre). Así también se estudiaron cepas EAggEC aisladas de individuos asintomáticos y de cepas EAggEC ambientales. Para este propósito se procedió a obtener precipitados con sulfato de amonio (75% [p/v] de saturación) de los sobrenadantes de los cultivos, a los productos obtenidos se les realizó SDS-PAGE e inmuno-electrotransferencia utilizando los antisueros hiperinmunes en contra de las fracciones proteicas. Para evaluar la significancia de los resultados obtenidos, se realizó un análisis estadístico utilizando el paquete estadístico Epi. Info. Versión 5. Utilizando ji cuadrada ( $X^2$ ), con un intervalo de confianza del 95%, para un riesgo relativo del 2.59, ignorando los controles. Las correcciones de Yates y Fisher fueron empleadas en datos menores de 10 y de 5 respectivamente (144).

## **RESULTADOS**

### **ANALISIS DE CEPAS EAggEC**

Los serotipos identificados en las cepas en estudio resultaron muy heterogéneos, encontrándose en muy baja proporción el serotipo O44:H18 considerado como prototipo del grupo EAggEC.

El cuadro 2 muestra las características de las cepas de referencia y de algunas de las cepas analizadas en el trabajo. Las cepas de referencia como las cepas aisladas de casos de diarrea mostraron un patrón de adherencia agregativo a células HEp-2 (figura 1). Las cepas K12 y 30651 utilizadas como controles negativos no fueron adherentes.

### **PERFIL ELECTROFORETICO DE PROTEINAS SECRETADAS AL MEDIO POR DIFERENTES CEPAS EAggEC**

El análisis por SDS-PAGE (en condiciones no reductoras) de los precipitados proteicos obtenidos con sulfato de amonio a partir del sobrenadante del cultivo de diferentes cepas EAggEC, mostró que tanto las cepas con adherencia agregativa como las no adherentes a células HEp-2 expresaban una amplia gama de proteínas de alto, mediano y bajo peso molecular. Entre las proteínas de alto peso molecular destacaron dos con pesos de 108 y 116 kDa, presentes únicamente en las cepas con adherencia de tipo agregativo aisladas de diferentes niños que presentaron diferentes tipos de diarrea: persistente, aguda y con sangre. Se observó que estas proteínas eran secretadas en mayor abundancia por la cepa EAggEC 49766 (probado por Bradford y SDS-PAGE), por lo que, se consideró como cepa prototipo (en la expresión de estas proteínas) y se empleó

en los experimentos siguientes. También se observó que en particular la cepa 17-2 expresaba una proteína abundante, ligeramente mayor de aproximadamente 120 kDa pero ausente en las otras cepas EAggEC (figura 2). En la misma figura se puede observar que la cepa no adherente K12 no expresa las proteínas de alto peso molecular antes mencionadas.

### **RECONOCIMIENTO INMUNOLOGICO DE PROTEINAS DE 116 Y 108 kDa (SECRETADAS POR CEPAS EAggEC) POR EL SUERO DE NIÑOS CONVALESCIENTES DE DIARREA**

Utilizando el método de doble inmunodifusión en agar se observó que el suero de 26 niños, de un total de 116 convalientes de cuadros de diarrea, reaccionaron con los extractos proteicos obtenidos al precipitar con sulfato de amonio el sobrenadante del cultivo de la cepa EAggEC 49766. La mayoría de los sueros positivos mostraron sólo una banda de identidad, sin embargo, algunos presentaron más de un reconocimiento antigénico (figura 3). La identidad en algunos de los sueros fue total, mientras que otros presentaron reconocimiento parcial con el mismo extracto proteico. La respuesta de estos sueros contra extractos proteicos de cepas no adherentes (K12) obtenida con el mismo tratamiento fue negativa.

La respuesta en el ensayo de inmunoelectrotransferencia de los 26 sueros en el que dieron la prueba de Ouchterlony positivo mostró que algunos sueros reconocen únicamente proteínas de bajo peso molecular, otros además de las proteínas de bajo peso molecular reconocen una proteína de aproximadamente 116 kDa y otros además de las proteínas antes referidas reaccionan con una de peso molecular aproximado de 108 kDa (figura 4). Ninguna de las proteínas de alto peso molecular fue identificada por los sueros que dieron la prueba de Ouchterlony negativa.



Con el mismo ensayo de inmunoelectrotransferencia se analizó la respuesta de una mezcla de sueros de los niños contra proteínas de alto peso molecular en diferentes cepas EAggEC (49766, 58275, 88142, O42 [JPN10], 17-2, 86978 [10e], 88134 y 59319). Como puede observarse en la figura 5, reaccionan contra las moléculas de 116 y 108 kDa. En esta prueba el suero de los infantes no mostró reacción con el precipitado proteico de la cepa K12 (figura 5).

### **RECONOCIMIENTO INMUNOLOGICO DE FRACCIONES PROTEICAS (116 y 108 kDa) POR SUERO Y FLUIDO INTESTINAL OBTENIDOS DE VOLUNTARIOS HUMANOS INOCULADOS CON LA CEPA EAggEC 17-2**

El ensayo de inmunoelectrotransferencia utilizando el fluido intestinal y suero de 10 voluntarios humanos desafiados con la cepa EAggEC 17-2, contra los precipitados proteicos de las cepas EAggEC 17-2, JM221 y 49766, mostró que el fluido intestinal no contenía anticuerpos que reaccionaran contra las fracciones proteicas en estudio. Sin embargo, no se encontraron diferencias en la reactividad de los sueros antes y despues del desafío contra una proteína de 120 kDa, presente sólo en la cepa 17-2 (figura 6). Las dos fracciones proteicas presentes en las cepas JM221 y 49766 correspondientes a las proteínas de 116 y 108 kDa (figuras 7 y 8 respectivamente) fueron reconocidas también por el suero de voluntarios.

En la figura 9 se muestra la respuesta de los sueros de voluntarios posteriores al desafío en contra de los precipitados proteicos de las cepas EAggEC: 49766, 58275, 88144, O42 [JPN10], 17-2, 86978 [10e], 88134 y 59319. En ésta se observa que los sueros reaccionan contra tres proteínas de alto peso molecular, dos de ellas son de 116 y 108 kDa presentes en las cepas en estudio, así como una proteína de 120 kDa que se observa únicamente en la cepa 17-2. En la misma figura se puede observar además, que los sueros no

reaccionan contra fracciones de alto peso molecular (116, 108 y 120 kDa) en la cepa no adherente K12.

### **PURIFICACION DE FRACCIONES PROTEICAS DE 116 Y 108 kDa.**

Para la purificación de las proteínas identificadas se seleccionó la cepa 49766 aislada de un niño con diarrea persistente, la cual resultó ser hiperproductora de las dos proteínas de 116 y 108 kDa. El precipitado obtenido con el tratamiento con sulfato de amonio del cultivo de la cepa sometido a precipitación fraccionada (1.15-1.75 M) con K1/K2, mostró enriquecimiento de las proteínas de 116 y 108 kDa a 1.75 M. Este precipitado al ser sometido a cromatografía en columna en DEAE-Celulosa muestra cuatro picos en el perfil de elución (figura 10). En el primero se encontraron las proteínas de 116 y 108 kDa (figura 11: carril 9) libres de otras moléculas de menor peso. El perfil electroforético de las diferentes fracciones proteicas obtenidas durante el proceso de purificación de las proteínas de 116 y 108 kDa también se pueden observar en la figura 11. Para corroborar la eficiencia de la purificación de las proteínas de 116 y 108 kDa se realizó inmunoelectrotransferencia utilizando una mezcla de los sueros de niños que fueron infectados por cepas EAggEC y que reconocen estas proteínas (figura 12).

Con el propósito de obtener las proteínas de 116 y 108 kDa por separado, el producto obtenido de la cromatografía anterior se sometió a una cromatografía de filtración molecular en Sephadex G-100, en donde se obtuvo un sólo pico en el perfil de elución (datos no mostrados). Al realizar SDS-PAGE e inmunoelectrotransferencia del eluido anterior se encontró que las fracciones proteicas de 116 y 108 kDa no se pudieron separar (figuras 11 y 12: carril 10). El producto obtenido en Sephadex G-100 mostró que la proteína de 108 kDa se mantuvo, mientras que la proteína de 116 kDa desapareció, formándose

subproductos de 60, 40 y 35 kDa. Sin embargo por inmunoelectrotransferencia sólo se detectó la proteína de 108 kDa (figura 12: carril 10)

En la SDS-PAGE e Inmunoelectrotransferencia que corresponden a las figuras 11 y 12 se aplicaron 100  $\mu$ g de proteína por carril, a excepción de los carriles 9 y 10 donde sólo se aplicaron 10  $\mu$ g de proteína, ésto se debió a que una mayor cantidad de proteína (100  $\mu$ g) alteraba el corrimiento y resolución de las proteínas de 116 y 108 kDa.

Tratando de obtener en forma individual las proteínas de 116 y de 108 kDa, el precipitado a 1.75 M con K1/K2 se sometió a una cromatografía de intercambio iónico en columna en Q-Sepharose. Como puede apreciarse en la figura 13 se obtuvieron tres picos del perfil de elución. En el primer pico se encontraron las proteínas de 116 y de 108 kDa libres de otras moléculas de menor peso, similar a lo encontrado con DEAE-Celulosa. Lo anterior se corroboró al realizar SDS-PAGE en gradientes discontinuos (6-8%) en condiciones no reductoras (figura 14). El análisis de estas proteínas bajo condiciones reductoras (en presencia de beta-mercaptoetanol) no mostró cambios en el perfil electroforético (figura 14).

El cuadro 3 muestra el rendimiento del proceso de purificación de las proteínas de 116 y 108 kDa producidas por la cepa EAggEC 49766, utilizando como último paso la cromatografía en Q-Sepharose del precipitado a 1.75 M en K1/K2.

### **RESPUESTA DE ANTICUERPOS EN EL SUERO DE CONEJOS INMUNIZADOS CON LAS PROTEINAS DE 116 Y 108 kDa**

Los cuatro conejos inmunizados con las proteínas de 116 y 108 kDa en

solución (en presencia de adyuvante de Freund) respondieron satisfactoriamente. La fracción gamaglobulina del suero obtenida por precipitación con sulfato de amonio (anti-116 y 108 kDa), al ser probada por inmunodifusión mostró un título de 1:32 y de 1:1000 por inmunolectrotransferencia cuando se utilizó el antígeno homólogo. La intensidad de la respuesta de la gamaglobulina anti 116 y 108 kDa hacia ambas proteínas (116 y 108 kDa) medida por inmunolectrotransferencia fue similar (figura 15).

La respuesta de los conejos inmunizados con de las proteínas de 116 o de 108 kDa (obtenidas por SDS-PAGE en gradientes discontinuos) resultó también satisfactoria, mostrando un título de 1:1000 cuando se probó por inmunolectrotransferencia cuando se utilizó una mezcla de las proteínas de 116 y 108 kDa como antígeno. No obstante haber inmunizado con cada una de las proteínas, la especificidad de las gamaglobulinas anti-116 y anti-108 kDa no fue satisfactoria, ya que mostraron reacción cruzada entre ellas. La gamaglobulina anti-116 kDa reconoció las proteínas de 116 y 108 kDa con intensidad semejante. Sin embargo, la gamaglobulina anti y 108 kDa mostró respuesta principalmente contra la proteína de 108 kDa (figura 15).

La gamaglobulina de conejo anti 116 y 108 KDa se probó por inmunolectrotransferencia contra los precipitados proteicos de diferentes cepas EAggEC: 49766 (cepa homóloga control positivo), 58275, 88142, O42 [JPN10], 17-2, 86978 [10e], 88134 y 59319. También se probó una cepa no adherente (K12). La figura 16 muestra que las proteínas de 116 y 108 KDa secretadas por diferentes cepas EAggEC aisladas de casos clínicos son idénticas entre sí. En la cepa 17-2 no se detectó la proteína de 116 KDa aunque sí la de 108 kDa. También se pudo corroborar que las cepas K12 y 86978 [10e] no expresan ninguna de las proteínas identificadas en las cepas EAggEC restantes. De igual modo, la cepa 30651 aisladas de un niño sin cuadro clínico de diarrea no expresó las proteínas de 116 y 108 kDa (datos no mostrados). El suero preinmune de los

conejos ensayado por con la misma técnica y con las mismas cepas no mostraron respuesta (datos no mostrados).

## **HOMOLOGIA ANTIGENICA DE LAS PROTEINAS 116 Y 108 kDa DE EAggEC CON OTRAS TOXINAS CONOCIDAS**

La respuesta de la IgG anti-hemolisina alfa de E. coli (anti-HlyA) en contra de los precipitados totales de diferentes cepas EAggEC mostró que reconocen dos proteínas de 120 y 80 kDa presentes sólo en las cepas 17-2 y 86978 [10e], pero ausentes en las demás cepas EAggEC (particularmente en la cepa 49766) (figura 17).

Los anticuerpos anti-SLT I/VT 1, anti-SLT II/VT 2 y anti-toxina tetánica no tienen cruce antigenico con estas proteínas, sin embargo, los anticuerpos anti-CT y anti-LT reconocen principalmente la proteína de 108 kDa (figura 18).

## **ACTIVIDAD DE LAS CEPAS EAggEC Y DE LAS PROTEINAS DE 116 Y 108 kDa EN EL MODELO DE ASA LIGADA DE INTESTINO DE RATA**

Los ensayos en asas ligadas de intestino de rata utilizando cepas EAggEC vivas y las fracciones proteicas de la cepa 49766 mostraron que éstas no inducen secreción de líquidos que sugieran actividad enterotóxica. Sin embargo, las asas ligadas de intestino de rata inoculadas con bacterias vivas de la cepa 49766 mostraron alteraciones en la morfología de las vellosidades, acompañada de una enteritis aguda necrotico-hemorrágica con inflamación transmural (figura 19). Además se aprecia necrosis multifocal en el epitelio superficial apical, necrosis con microabscesos en el epitelio del fondo de las vellosidades, hemorragia e inflamación aguda en la muscular y un exudado fibrinopurulento en

la mucosa. Los resultados obtenidos con la cepa 17-2 fueron similares a los descritos con la cepa 49766 (datos no mostrados). La cepa JPN10 mostró un efecto semejante al inducido por la cepa no adherente 30651 (figura 20).

Cuando el inóculo administrado en las asas ligadas fueron las proteínas (116 y 108 kDa) obtenidas a partir del sobrenadante del cultivo de la cepa 49766, las alteraciones histológicas fueron semejantes a las inducidas por las bacterias vivas, como el mostrado en la figura 19.

Al ensayar las proteínas de 116 y 108 kDa (obtenidas de los picos I de las cromatografías en DEAE-Celulosa, Q-Sepharose y Sephadex G-100) en el mismo modelo, se observaron lesiones necrotico-inflamatorias, con úlceras en la mucosa, necrosis del epitelio de las vellosidades, además de un exudado fibrinopurulento transmural, hemorragia en la superficie mucosa, en la muscular y serosa (figura 21). En algunos casos se observa una inflamación focal de las glándulas en aquellos sitios con Placas de Peyer. Los resultados obtenidos con el precipitado total de la cepa K12 no presentaron alteraciones en la morfología de las vellosidades intestinales.

#### **ACTIVIDAD DE LAS PROTEINAS DE 116 Y 108 kDa EA<sub>g</sub>EC EN EL MODELO DE CAMARAS DE USSING.**

La propiedades eléctricas de las proteínas de 116 y 108 kDa juntas (25  $\mu$ g del pico I en Q-Sepharose) respecto del tiempo, medidas en el modelo *in vitro* de cámaras de Ussing mostraron que inducen un incremento en la corriente de corto circuito (Isc) y en la diferencia de potencial (PD), sin observarse alteración en la resistencia eléctrica (figura 22). Esto se observó cuando se graficaron los valores antes mencionados con respecto del tiempo (figura 22). Mientras que el precipitado total de la cepa la cepa K12 mostró una disminución en Isc y PD,

manteniéndose la R constante (figura 23).

Al realizar un ensayo de neutralización utilizando los anticuerpos de conejo anti 116 y 108 kDa se encontró que éstos inhiben el incremento en Isc y en PD inducidas por las proteínas EAggEC, permaneciendo constante la R (figura 24). Esto se observó cuando se graficaron los parámetros eléctricos respecto del tiempo. Un efecto semejante se observó cuando se incubaron las proteínas de 116 y 108 kDa con gamaglobulina de conejo anti-CT, y con el suero de un niño infectado por cepas EAggEC (que reconoce las proteínas por inmunoelectrotransferencia). De igual manera, el tratamiento con calor y proteinasa K también inhiben el incremento de los parámetros electrofisiológicos de Isc y PD (cuadro 4). En este último ensayo se observa una inhibición de los valores de PD del 100 y 95% cuando se trata con calor y con proteinasa K de forma respectiva. Los valores de Isc también se inhiben al 95 y 100% al ser tratadas de igual modo (cuadro 4).

## **FRECUENCIA DE EXPRESION DE PROTEINAS DE 116 Y 108 kDa SECRETADAS POR EAggEC**

En el estudio de la frecuencia de expresión de las proteínas de 116 y 108 kDa secretadas por cepas EAggEC, empleando el ensayo de inmunoelectrotransferencia, se encontró que de 126 cepas EAggEC aisladas de casos de diarrea, 85 de las cepas EAggEC (67%) expresaron ambas proteínas, mientras que únicamente en 7 (16.2%) de 42 niños sin cuadro clínico se identificaron tales productos (cuadro 5). Se encontró significancia estadística al analizar la expresión de las fracciones proteicas de 116 y 108 kDa de cepas EAggEC aisladas de niños con diarrea en comparación con bacterias obtenidas de niños sin cuadro clínico ( $P=0.0001$ )(cuadro 5). Cuando se considero de manera independiente las fracciones se observó que la de 108 kDa se presenta

en todos los cuadros de diarrea, mientras que la de 116 kDa se detecta preferentemente en los casos de diarrea con sangre con una significancia estadística de  $P < 0.0005$ .

Al comparar las cepas de cuadro clínico con las de origen ambiental encontramos que únicamente las cepas EAggEC aisladas de pacientes expresan las proteínas de 116 y 108 kDa (cuadro 6).



## DISCUSION

Estudios epidemiológicos han establecido la importancia de EAggEC como agente causal de diarrea persistente y diarrea con sangre en humanos, principalmente en niños menores de cinco años de edad (40, 97-101). Sin embargo, ni los estudios con voluntarios (108-110), ni los ensayos con modelos animales (105-107) han logrado establecer plenamente los mecanismos de patogenicidad de las cepas EAggEC, implicados en el daño al intestino, que conducen al cuadro clínico. Experimentalmente se ha demostrado la capacidad de estas cepas para adherirse por medio de fimbrias a la superficie de los enterocitos del intestino humano y de animales de experimentación (102, 109-112). Wai y col. (143) describieron una proteína de membrana externa de 38 kDa en cepas EAggEC, con propiedades hidrofóbicas que puede estar participando en la agregación bacteriana, que favorece la colonización de grandes extensiones del epitelio intestinal. Sin embargo, el evento por si solo no explica en su totalidad el daño observado en las infecciones por EAggEC. Las lesiones observadas en diferentes modelos animales (105-107), sugieren la participación de algún factor con actividad toxigénica como responsable del daño intestinal descrito en dichos modelos.

El péptido soluble con actividad enterotóxica denominado EAST1 (113-114), es un compuesto de bajo peso molecular cuya actividad fue demostrada en el modelo de cámaras de Ussing, este factor no obstante que fue identificado en cepas EAggEC, se ha reportado que es elaborado por diferentes grupos patogénicos de *E. coli* (144). Baldwin y col. (115) identificaron un segundo compuesto presente en el sobrenadante del cultivo de una cepa EAggEC (O42 [JPN10]). Este compuesto es una proteína de 120-140 kDa que cruza antígenicamente con la hemolisina alfa de *E. coli* (HlyA), e induce fosforilación de proteínas a través de la activación de proteínas cinasas calcio dependientes. Aunque existen datos de actividad biológica *in vitro* de la proteína HlyA y del

peptido EAST1, su participación en el proceso de daño al intestino no ha sido demostrada en ensayos con modelos animales, ni en los estudios con voluntarios humanos que se han realizado. Así mismo, tampoco existe evidencia de respuesta inmunológica contra estos productos, ni de casos clínicos infectados naturalmente ni de los individuos desafiados experimentalmente.

En este trabajo se muestran resultados referentes a la expresión de dos proteínas de alto peso molecular (116 y 108 kDa [SDS-PAGE]), presentes en el sobrenadante del cultivo de cepas EAggEC aisladas de diferentes casos clínicos (figura 2). También se observó que dichas proteínas no eran elaboradas por cepas de referencia no adherentes (K12). En el trabajo también se observó que diferentes cepas EAggEC aisladas en otros estudios secretan las proteínas de 116 y 108 kDa antes referidas (figura 5).

El ensayo de doble inmunodifusión (figura 3), utilizando como antígeno el precipitado de la cepa EAggEC 49766 (O?:H10) mostró que el suero de niños convalescientes de un cuadro de diarrea persistente, relacionado con la infección por esta y otra cepa EAggEC (O44:H18), daba una reacción de precipitación, observación que sugiere la participación de estas proteínas en el proceso patogénico de las bacterias identificadas, ya que activan la respuesta inmune humoral. La reactividad específica de los sueros contra ambas proteínas se determinó por la prueba de inmunoelectrotransferencia (figura 4), observándose también respuesta contra proteínas de bajo peso molecular (10 y 30 kDa), las cuales probablemente son componentes de proteínas de membrana externa (porinas).

La respuesta específica del suero de niños contra las proteínas identificadas se corroboró al analizar el suero de un grupo de voluntarios humanos, desafiados por vía oral con la cepa EAggEC 17-2 (109). Al respecto, es importante mencionar que la reactividad del suero de estos voluntarios fue

similar tanto con los sueros obtenidos antes del desafío, que con las muestras posteriores al reto (figuras 6, 7 y 8). Este hecho podría explicar los resultados obtenidos por Nataro y col. (109), quienes reportaron que sólo uno de los voluntarios desafiados presentó un cuadro de diarrea aguda de corta duración. Las cepas EAggEC (O42 [JPN10], JM221, 34b y 17-2) utilizada en el estudio de voluntarios de Nataro (110), fueron analizadas con respecto a su capacidad para elaborar las proteínas identificadas, encontrándose que todas producen una (108 kDa) o ambas proteínas (figura 9). Lo anterior sugiere que los individuos se infectan con estas bacterias en etapas tempranas de su vida y al llegar a la edad adulta poseen anticuerpos de tipo IgG capaces de neutralizar la actividad de estas toxinas. También se determinó por inmunolectrotransferencia la reactividad del fluido intestinal de los mismos voluntarios contra las proteínas identificadas, para evaluar la respuesta local mediada por IgA, obteniéndose resultados negativos. Las posibles explicaciones a estas observaciones podrían relacionarse con diferentes aspectos como son: 1) sensibilidad de la técnica empleada; 2) el número, la frecuencia y la cantidad de los estímulos antigénicos, que son necesarios para desencadenar una respuesta inmune local y sistémica, de células productoras de IgA secretora; 3) y la regulación de la respuesta inmunológica en la producción de anticuerpos del isotipo IgA en la mucosa intestinal (145). Con respecto a la primera posibilidad, ésta podría probarse utilizando la técnica de radioinmunoanálisis, con la cual sería posible detectar IgA específica. En la segunda y tercera causas no existe información al respecto, por lo tanto, ésto sería motivo de nuevos estudios.

Al purificar las proteínas de 116 y 108 kDa a partir de los sobrenadantes del cultivo de la cepa EAggEC 49766 y realizar su análisis por SDS-PAGE bajo condiciones reductoras, se encontró que estas moléculas no poseen subunidades que estén unidas por puentes disulfuro (figura 14).

Los anticuerpos obtenidos en conejo contra las proteínas de 116 y 108 kDa, mostraron reactividad cruzada entre ambas en el ensayo de inmunoelectrotransferencia (figura 15), lo anterior sugiere que se trata de dos proteínas diferentes, probablemente con epitopes comunes. Al respecto, durante el estudio para evaluar la capacidad de cepas EAggEC para elaborar las proteínas de 116 y 108 kDa, se encontró que mientras unas cepas expresan ambas proteínas, otras alguna de las dos (figura 16).

La respuesta de la gamaglobulina de conejo contra las proteínas de 116 y 108 kDa fue específica e intensa, cuando se analizaron precipitados de la cepa homóloga 49766, a partir de la cual se prepararon los inoculos para inmunizar (figura 16; carril 2), observandose respuesta poco intensa contra otros componentes (figura 16; carril 2), sin embargo, cuando se probó contra otras cepas se observó que además de reconocer las proteínas específicas éstos reaccionaban contra otras fracciones que variaban entre 50 a 92 kDa (figura 16). El hecho de haber utilizado anticuerpos policlonales de animales que en el transcurso de su vida han estado expuestos a una gran variedad de antígenos, podría en cierta medida explicar la respuesta inespecífica observada contra diferentes fracciones. La respuesta podría estar dirigida contra los residuos de azúcares presentes en algunas proteínas (glicoproteínas con epitopes compartidos). La oxidación con meta-peryodato de sodio, podría abolir la reacción cruzada entre los residuos de azúcares y de esta manera, se podría aclarar mayormente el resultado obtenido (146). La generación de anticuerpos monoclonales en contra de las proteínas de 116 y 108 kDa ayudaría enormemente a la especificidad en la detección de estos factores (147).

Las proteínas de 116 y 108 kDa identificadas en este trabajo se obtuvieron por un procedimiento semejante al descrito por Baldwin y col. (115), para obtener un producto proteico con peso molecular de 120-140 kDa. Lo anterior planteaba la posibilidad de que las proteínas identificadas pudieran ser

el mismo producto descrito por dichos autores. Esto se descartó al observar que ninguna de las dos proteínas (116 y 108 kDa) era reconocida por anticuerpos anti-hemolisina alfa de E. coli (anti-HlyA), tal y como lo describió Baldwin (115) con la proteína de 120-140 kDa identificada en algunas cepas EAggEC (figura 17). La proteína de 120-140 kDa con homología antigénica con la hemolisina (HlyA), es producida por algunas cepas de EAggEC, sin embargo, no es constante su expresión, y no se ha observado respuesta inmune en individuos infectados naturalmente o desafiados experimentalmente contra esta proteína, por lo que hasta el momento no podría ser considerado como un posible factor de patogenicidad de EAggEC.

Existen varios ejemplos de homología antigénica y de actividad biológica entre proteínas producidas por bacterias de diferentes géneros, al respecto se conoce la relación que existe entre la toxina de S. dysenteriae y la denominada semejante a la de Shiga de E. coli enterohemorrágica (81, 83), en el grupo enteroagregativo de E. coli se conoce la proteína de 120-140 kDa descrita por Baldwin y col.(115) que comparte características con la hemolisina (HlyA) de otros grupos de E. coli. En este trabajo se encontró que la proteína de 108 kDa tiene homología antigénica con las toxinas de V. cholerae (CT) y de E. coli (LT) (figura 18). Esta observación concuerda con el efecto de tipo enterotóxico identificado mediante el modelo de cámaras de Ussing (figuras 22, 23 y 24), falta por establecer si además de la homología antigénica existe homología en la secuencia de aminoácidos y en el mecanismo de acción.

En este trabajo se pudo observar que además del efecto enterotóxico las proteínas de 116 y 108 kDa muestran actividad citotóxica identificada en el modelo de asa ligada de intestino de rata. El daño inducido por los precipitados conteniendo ambas proteínas fue similar al causado por las bacterias vivas (figuras 19 y 21). Estas observaciones brindan un apoyo más consistente, en relación a la participación de estos productos en la patogénesis de la diarrea.

Estudios previos, describen la presencia de respuesta inflamatoria intensa, hemorragia y alteraciones de las microvellosidades del intestino en diferentes modelos animales desafiados con cepas EAggEC (105-107). Alteraciones similares fueron identificadas en nuestro laboratorio, en necropsias del intestino de niños muertos a consecuencia de una infección severa por EAggEC (datos no mostrados).

La posible activación de células linfoides y mieloides en el tracto intestinal, consistente al efecto estimulador de las proteínas de 116 y 108 kDa secretadas por las cepas EAggEC, podría ser una de las causas de la liberación de citocinas y de la respuesta inflamatoria (148), efecto que podría relacionarse con algunas de las alteraciones descritas en el estudio histológico de los cortes de intestino tanto de los modelos animales como el referente a los cortes de intestino de niños. La localización de las proteínas de 116 y 108 kDa en el sitio de la lesión, aportaría nuevos elementos que ayudarían a esclarecer el mecanismo de patogenicidad de estas proteínas.

Recientemente Hicks y Nataro (149-150) trabajando en ensayos de toxicidad y adherencia de cepas EAggEC: JM221, 17-2 y O42 [JPN10], en biopsias de yeyuno, ileon y colon de niños, reportaron un efecto citotóxico severo principalmente en colon, que incluye vacuolización de las vellosidades intestinales, ampliación de la apertura de las criptas, la formación de grietas entre las criptas y extrusión de las células epiteliales. En células polarizadas T84, derivadas de células epiteliales humanas, las cepas mencionadas produjeron sobre la membrana apical de las células vacuolización, subnuclear del citoplasma, y en algunos casos separación del núcleo del citoplasma que lo rodea y desprendimiento de las microvellosidades. Las proteínas de 116 y 108 kDa podrían estar participando en la inducción de tales efectos, ya que las cepas utilizadas por Nataro y Hicks (O42 [JPN10] y JM221) fueron analizadas en este estudio y se determinó que expresan ambas proteínas.

La codificación de la información genética para la expresión de la proteína de 108 kDa se identificó que se encuentran en el mismo plásmido que porta la información para la expresión de las fimbrias (AAF/I, AAF/II), así como la toxina EAST1 (manuscrito en preparación). Tal hecho ha facilitado realizar la clonación del gen implicado en la expresión de estas proteínas. Al respecto, al realizar el análisis de la secuencia de bases se encontró que tiene homología con diferentes proteínas bacterianas relacionadas con virulencia. Entre las proteínas que se observó homología se encuentran la proteína EspC de EPEC (33%), cuya actividad no está aún determinada (151), SepA de *S. flexneri* (44%), proteína que participa en la invasión a los tejidos (152) y Tsh de *E. coli* (39%), una hemaglutinina de cepas patógenas de aves (153); todas ellas miembros de una familia de proteínas secretadas semejantes a proteasas para IgA (manuscrito en preparación).

Otra observación interesante con respecto a las proteínas estudiadas se relaciona con la secuencia de 28 aminoácidos del extremo amino terminal en la proteína de 116 kDa, de estos, los 20 primeros aminoácidos mostraron entre 50 y 75% de homología con diferentes tipos de colágenas. Del mismo modo, una secuencia de 24 aminoácidos del extremo amino terminal de la proteína de 108 kDa, mostró homología con colágenas. Este resultado apoya el planteamiento de que ambas proteínas comparten algunas secuencias, lo que permite proponer que se trata de miembros de una familia de proteínas, una de las cuales (108 kDa) está codificada por un plásmido y cuya actividad es principalmente citotóxica. La otra proteína es probablemente la responsable del efecto enterotóxico lo cual se apoya en observaciones preliminares no descritas en este texto.

El estudio de la frecuencia de expresión de las proteínas de 116 y 108 kDa permitió constatar que estas proteínas están implicadas en la patogénesis de la diarrea, al determinar que las cepas EAggEC aisladas de niños con diarrea las expresan en mayor proporción que las cepas aisladas de niños sin cuadro clínico,

las diferencias observadas al respecto mostraron diferencia estadísticamente significativa. Lo anterior permite considerar que estos compuestos pueden ser utilizados como marcadores de virulencia y sugieren además que existen diferentes clones de EAggEC, algunas de las cuales son patógenas causantes de diarrea. La obtención de sondas moleculares específicas, para la detección de las proteínas de 116 y 108 kDa en muestras de heces, ayudaría al diagnóstico oportuno de EAggEC y estudio de prevalencia de estos patógenos en la población susceptible.

Es importante considerar que son diferentes factores de virulencia, los que actúan coordinadamente en la patogénesis de las cepas EAggEC. Los resultados obtenidos hasta el momento permiten vislumbrar parte del proceso, por lo cual, es importante continuar realizando estudios al respecto. Falta por estudiar aspectos relacionados con posibles receptores celulares, así como la respuesta del huésped, para poder entender mejor la patología del proceso, y así poder diseñar estrategias de control de la infección por EAggEC.



## REFERENCIAS

- 1.- WHO. 1993. Global health situation III. WER **6**:33.
- 2.- WHO. 1992. Global health situation I. WER **45**:337.
- 3.- WHO. 1992. Global health situation II. WER **47**:350.
- 4.- Phillips, S. F. 1972. Diarrhea: a current view of the pathophysiology. *Gastroenterology* **63**:495-518.
- 5.- Marine, E. 1991. Diarrea aguda. En: Llamas Esperón G. (ed.). *Diagnóstico y terapéutica en medicina interna*. México: Méndez Cervantes, p. 571-574.
- 6.- Dehesa, N. 1991. Diarrea crónica. En: Llamas Esperón G. (ed.). *Diagnóstico y terapéutica en medicina interna*. México: Méndez Cervantes, p. 574-579.
- 7.- Bond, J. H., B. E. Currier, H. Buchwald, and M. D. Levitt. 1980. Colonic conservation of malabsorbed carbohydrate. *Gastroenterology* **78**:1500-1507.
- 8.- Camilleri, M. D., and S. F. Phillips. 1989. Disorders of small intestinal motility. *Gastro. Clin. N. Amer.* **18**:405-424.
- 9.- Gill, D. M., and M. Woolkalis. 1985. Toxin wich activate adenilate cyclase. In: Pitman Publishing Ltd, (Ciba Foundation Symposium 112)(ed.). London, UK, p. 57-73.
- 10.- Guerrant, L. C. 1990. Inflammatory enteritis. In: Mandell G. L., R. G. Douglas., E. J. Bennett (ed.). *Principles and practice of infectious diseases*. 3ed. Churchill, Livingtone. New York.
- 11.- Anthonisen, P., and P. Riis. 1961. A new diagnostic approach to mucosal inflammation in proctocolitis. *Lancet* ii. 81-82.
- 12.- WHO. 1992. Programme for control of diarrhoeal diseases. VIII programme report 1990-1991. Geneve.
- 13.- WHO. 1993. Programme for control of diarrhoeal diseases. Interim programme report 1992. Geneve.

- 14.- WHO. 1993. Global health situation IV. WER 7:43.
- 15.- Hullan, S., Z. L. Guang., and Mathan. 1991. Etiology of diarrhoea among children in developing countries: A multicentre study in five countries. Bull. WHO 89:542.
- 16.- INEGI. 1990. XI Censo general de población y vivienda 1990. Estados Unidos Mexicanos. INEGI, México.
- 17.- Avances de la epidemiología de cólera en México. 1993. Boletín Mensual de cólera/diarreas infecciosas 3:293-296.
- 18.- SSA. 1988. Encuesta de morbilidad, mortalidad y tratamiento de diarreas en 1985 (EMMTD). SSA, México.
- 19.- SSA. 1988. Encuesta sobre práctica y prevalencia de la terapia de rehidratación oral en 1987 (EPPTRO). SSA, México.
- 20.- Mota, H. F., C. R. Tapia y C. Welti. 1993. Manejo de la enfermedad diarrea en el hogar en algunas regiones de México. En: SSA/UNICEFF/OPS, México.
- 21.- Dirección General de Epidemiología. 1980-1992. Boletín semanal de epidemiología. SSA, México.
- 22.- Lezana, F. M. A. 1993. Morbilidad y mortalidad por enfermedades diarreicas en México. En: SSA/UNICEFF/OPS: Manejo efectivo de diarreas agudas en niños y colera. SSA/UNICEFF/OPS, México.
- 23.- Cravioto, A., R. Ortega y P. Rodriguez. 1985. Estudio longitudinal de colonización intestinal en una cohorte de niños rurales mexicanos. I. Diseño de estudio y hallazgos iniciales durante durante el período neonatal. Bol. Med. Hosp. Infant. Méx. 42, 5:287.
- 24.- Cravioto, A., R. E. Reyes y R. Ortega. 1987. Incidencia y etiología de la diarrea aguda durante los dos primeros años de vida de una cohorte de niños rurales. Bol. Med. Hosp. Infant. Méx. 44, 6:316.
- 25.- Sepulveda, J. 1990. Malnutrition and infectious diseases. A longitudinal study of interaction and risk factor. Perspectivas en salud pública No. 9. Instituto nacional de salud pública, México.

- 26.- Velasco, O., A. Escobar y J. L. Valdespino. 1993. Epidemiología de las helmintiasis intestinales en México. Bases para su control. Publicación técnica del INDRE. No. 24, SSA, México.
- 27.- Lior, H. 1994. Clasificación of Escherichia coli. In: Gyles C. L. (ed.). Escherichia coli in domestic animals and humans. C. A. B. International Wallingford, Oxon, Ox10, 8DE. UK, p. 7-45.
- 28.- Krieg, N. R., and J. G. Holt (eds). 1984. Bergey's manual of systematic bacteriology, Volume 1, Williams & Wilkins, Baltimore USA, p. 408-600.
- 29.- Farmer, J. J., B. R. Davis, and F. W. Hickman-Brenner. 1985. Bioquímica identification of new species and biogroups of Enterobacteriaceae isolated from clinical specimens. J. Clin. Microbiol. **21**:46-76.
- 30.- Brenner, D. J. 1978. Characterization and clinical identification of Enterobacteriaceae by DNA hybridization. Prog. Clin. Pathol. **7**:71-117.
- 31.- Sussman, M. 1985. Escherichia coli in human and animal disease. In: Sussman M. (ed.). The virulence of Escherichia coli. Academic Press, Inc., New York, p. 7-45.
- 32.- Milch, H. 1978. Phage typing of Escherichia coli. In: Bergan T. and J. R. Norris (eds.). Methods in Microbiology. Vol. II. Academic Press, London, p. 87-155.
- 33.- Gillies, R. R. 1978. Bacteriocin typing of Enterobacteriaceae. In: Bergan T. and J. R. Norris (eds.). Methods in Microbiology. Vol. II, Academic Press, London, p. 78-86.
- 34.- Jann, K., and B. Jann. 1985. Cell surface components and virulence: Escherichia coli O and K antigens in relation to virulence and pathogenicity. In: Sussman M. (ed.). The virulence of Escherichia coli. Academic Press, Inc., New York, p. 157-177.
- 35.- Kauffmann, F. and A. Dupont. 1950. Escherichia coli from infantile gastroenteritis. Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. **27**:552-564.
- 36.- Parry, S. H., S. N. Abraham, and M. Sussman. 1982. The biological and serological properties of adhesion determinants of Escherichia coli isolated from urinary tract infections. In: Schulte-Wissermann H. (ed.). Clinical, bacteriological and immunological aspects of urinary tract infection in children. Thieme. Stuttgart. p. 113-125.

- 37.- Orskov, I. and F. Orskov. 1983. Serology of Escherichia coli fimbriae. *Progress in Allergy* **33**:80-105.
- 38.- Orskov, F. and I. Orskov. 1984. Serotyping of Escherichia coli. In: Bergan T. (ed.). *Methods in microbiology*. Vol. 14, Academic Press, London. p. 43-112.
- 39.- Levine, M. M. 1987. Escherichia coli that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J. Infect. Dis.* **155**:377-389.
- 40.- Nataro, J. P., J. B. Kaper, R. Robins-Browne, V. Prado, P. A. Vial, and M. M. Levine. 1987. Patterns of adherence of diarrheogenic Escherichia coli to HEp-2 cells. *J. Ped. Infect. Dis.* **6**:829-831.
- 41.- De, S. N., k. Bhattacharya, J. K. Sarkar. 1956. A study of the pathogenicity of strains of Bacterium coli from acute and chronic enteritis. *J. Pathol. Bacteriol.* **71**:201-206.
- 42.- Sprangler, B. D. 1992. Structure and function of cholera toxin and the related Escherichia coli heat-labile enterotoxin. *Microbiol. Rev.* **56**:622-647.
- 43.- Yoshimura, S., H. Ikemura, H. Watanabe, et al. 1985. Essential structure for full enterotoxigenic activity of heat-stable enterotoxin produced by enterotoxigenic Escherichia coli. *FEBS Lett.* **181**:138-142.
- 44.- Kupersztoch, Y. M., K. Tachias, and C. R. Mooman. 1990. Secretion of methanol insoluble heat-stable enterotoxin (STb): energy-and-secA-dependent conversion of pre STb to an intermediate indistinguishable from the extracellular toxin. *J. Bacteriol.* **172**:2427-2432.
- 45.- De Graff, F. K. 1990. Genetic of adhesive fimbriae of intestinal Escherichia coli. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **151**:29-53.
- 46.- Willshaw, G. A., M. M. McConnell, H. R. Smith, B. Rowe. 1990. Structural and regulatory genes for coli surface associated antigen 4 (CS4) are encoded by separate plasmids in enterotoxigenic Escherichia coli strains of serotype O25:H42. *FEMS Microbiol. Lett.* **68**:225-260.
- 47.- Caron, J., L. M. Coffield, and J. R. Scott. 1989. A plasmid-encoded regulatory gene, rns required for expression of CS1 and CS2 adhesins of enterotoxigenic Escherichia coli. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:963-967.

- 48.- Gastra, W., B. J. A. M. Jordi, and E. M. A. Mul. 1990. A silent regulatory gene cfad' on region 1 of the CFA/I plasmid NTP113 of enterotoxigenic Escherichia coli. Microbial. Pathogen. **9**:285-291.
- 49.- Cravioto, A., R. E. Reyes y F. Trujillo. 1990. Risk of diarrhea during the first year of life associated with initial and subsequent colonization by specific enteropathogens. Am. J. Epidemiol. **131**:886-904.
- 50.- Sack, R. B. 1975. Human diarrheal disease caused by enterotoxigenic Escherichia coli. Annu. Rev. Microbiol. **29**:333-353.
- 51.- Merson, M. H., G. K. Morris, and D. A. Sack. 1976. Travellers' diarrhea in Mexico: a prospective study of physicians and family members attending a congress. N. Engl. J. Med. **294**:1299-1305.
- 52.- Hyams, K. C., A. L. Bourgeois, and B. R. Merrell. 1991. Diarrheal disease during Operation Desert Shield. N. Engl. J. Med. **325**:1423-1428.
- 53.- Neter, E., and C. Shuymway. 1950. Escherichia coli d 433: Occurrence in intestinal and respiratory tracts. Cultural characteristics, pathogenicity, sensitivity to antibiotics. Proc. Soc. Expe. Biol. Med. **75**:504-507.
- 54.- Varela, C., A. Aguirre y J. Carrillo. 1946. Escherichia coli Gómez, nueva especie aislada de un caso mortal de diarrea. Bol. Med. Hosp. Inf. Méx. **3**:623-627.
- 55.- Knutton, S., D. R. Lloyd, and A. S. McNeish. 1987. Adhesion of enteropathogenic Escherichia coli to human intestinal enterocytes and cultured human intestinal mucosa. Infect. Immun. **55**:69-77.
- 56.- Cravioto, A., R. J. Gross, S. M. Scotland, and B. Rowe. 1979. An adhesive factor found in strains of Escherichia coli belonging to the traditional enteropathogenic serotypes. Curr. Microbiol. **3**:95-99.
- 57.- Scaletsky, I. C. A., M. L. M. Silva, and L. R. Trabulsi. 1984. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic Escherichia coli to HeLa cells. Infect. Immun. **45**:534-536.
- 58.- Vial, P. A., R. M. Robins-Browne, H. Lior, V. Prado, J. B. Nataro, D. Maneval, A. Elsayed, M. M. Levine. 1988. Characterization of enteroadherent-aggregative Escherichia coli, a putative agent of diarrheal disease. J. Infect. Dis. **158**:70-79.

- 59.- Levine, M. M., and R. Edelman. 1984. Enteropathogenic Escherichia coli of classic serotypes associated with infant diarrhea: epidemiology and pathogenesis. *Epidemiol. Rev.* **6**:31-51.
- 60.- Cravioto, A., A. Tello, A. Navarro, J. Ruiz, H. Villafan, F. Uribe, and C. Eslava. 1991. Association of Escherichia coli HEP-2 adherence patterns with type and duration of diarrhoea. *Lancet.* **337**:262-264.
- 61.- Girón, J. A., S. Y. Ho, and G. K. Schoolnick. 1991. An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic Escherichia coli. *Science* **254**:710-713.
- 62.- Sohel, I., J. L. Puente, W. J. Murray, J. Vuopio-Varkila, and G. K. Schoolnik. 1993. Cloning and characterization of the bundle-forming pili gene of enteropathogenic Escherichia coli and its distribution in Salmonella serotypes. *Molec. Microbiol.* **7**:563-575.
- 63.- Levine, M. M., J. P. Nataro, H. Karch, M. M. Baldini, J. B. Kaper, R. E. Black, M. L. Clements, and A. D. O'Brien. 1985. The diarrheal response of humans to some classic serotypes of enteropathogenic Escherichia coli is dependent on a plasmid-encoding an enteroadhesiveness factor. *J. Infect. Dis.* **152**:550-559.
- 64.- Nataro, J. P., M. M. Baldini, J. B. Kaper, R. E. Black, N. Bravo, and M. M. Levine. 1985. Detection of an adherence factor of enteropathogenic Escherichia coli with a DNA probe. *J. Infect. Dis.* **152**:560-565.
- 65.- Jerse, A. E., and J. B. Kaper. 1991. The eae gene of enteropathogenic Escherichia coli encodes a 94-kilodalton membrane protein, the expression of which is influenced by the EAF plasmid. *Infect. Immun.* **59**:4302-4309.
- 66.- Knutton, S., T. Baldwin, P. H. Williams, and A. S. McNeish. 1989. Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of a new diagnostic test for enteropathogenic Escherichia coli. *Infect. Immun.* **57**:1290-1298.
- 67.- Baldwin, T. J., S. F. Brooks, S. Knutton, H. A. Manjarrez-Hernandez, A. Aitken, and P. H. Williams. 1990. Protein phosphorylation by protein kinase C in HEP-2 cells infected with enteropathogenic Escherichia coli. *Infect. Immun.* **58**:761-765.
- 68.- Moon, H. W., S. C. Whipp, R. A. Argenzio, M. M. Levine, and R. A. Giannella. 1983. Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic Escherichia coli in pig and rabbit intestines. *Infect. Immun.* **41**:1340-1351.

- 69.- Jerse, A. E., Y. Jun, B. D. Tall, and J. B. Kaper. 1990. A genetic locus of enteropathogenic Escherichia coli necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **87**:7839-7843.
- 70.- Jerse, A. E., K. G. Gicquelais, and J. B. Kaper. 1991. Plasmid and chromosomal elements involved in the pathogenesis of attaching and effacing Escherichia coli. Infect. Immun. **59**:3869-3875.
- 71.- Formal, S., and R. B. Hornick. 1978. Invasive Escherichia coli. J. Infect. Dis. **137**:641-647.
- 72.- Collins, H., and S. B. Formal. 1983. Alteraciones in the pathogenicity of Escherichia coli K12 after transfer of plasmid and chomosomal genes from shigella flexneri. Infect. Immun. **39**:1392-1402.
- 73.- Sereny, B. 1975. Experimental kerato conjuntivitis Shigellosa. Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung. **4**:367-376.
- 74.- Sansonetti, P., D. A. Kopecko, and S. B. Formal. 1982. Involment of a plasmid in the invasive ability of Shigell flexneri. Infect. Immun. **35**:852-860.
- 75.- Sasakawa, C., K. Kamata, T. Sakai, S. Murayama, S. Makmo, and Yoshikawas. 1986. Molecular alteration of the 140-megadalton plasmid associated with Ios of virulence and congo red binding activity in Shigella fleneri. Infect. Immun. **51**:470-475.
- 76.- Hale, T., and S. B. Formal. 1981. Protein Synthesis in HeLa of Henle 407 cells infect with Shigella dysenteriae 1, Shigella flexneri 2a or Salmonella typhimurium w 118. Infect. Immun. **32**:137-144.
- 77.- Brow, E., and S. Rothman. 1980. Inhibition of protein syntesis in intact HeLa cells by Shigella dysenteriae toxin. Infect. Immun. **29**:90-107.
- 78.- San-Sonetti, P., A. Ryter, P. Clerc, A. Maurilli, and J. Maunier. 1986. Multiplication of Shigella flexneri within HeLa cells: Lysis of the phagocytic vacuole and plasmid mechated contact hemoysis. Infect. Immun. **51**:461-469.
- 79.- Cravioto, A., R. E. Reyes, R. Ortega, G. Fernandez, R. Hernandez, and D. Lopez. 1988. Prospective study of diarrhoeal disease in a cohort of rural Mexican children: incidence and isolated pathogens during the first two years of life. Epidemiol. Infect. **101**:123-134.

- 80.- Tzipori, S., R. M. Robins-Browne, G. Gonis, J. Hayes, M. Withers, and E. McCarty col. 1985. Enteropathogenic Escherichia coli enteritis: evaluation of the gnotobiotic piglet as a model of human infection. *Gut*. **26**:570-578.
- 81.- Scotland, S. M., H. R. Smith, and B. Rowe. 1985. Two distinct toxins active on Vero cells from Escherichia coli O157. *Lancet* ii:**885-886**.
- 82.- Marquez, L. R. M., J. S. M. Peiris, S. J. Cryz, and A. D. O'Brien. 1987. Escherichia coli strains isolated from pigs with edema disease produce a variant of Shiga-like toxin II. *FEMS Microbiol. Lett.* **44**:33-38.
- 83.- Ito, H., T. Yutsudo, T. Hirayama, and Y. Takeda. 1988. Isolation and some properties of A and B subunits of Vero toxin 2 and in vitro formation of hybrid toxins between subunits of Vero toxin 1 and Vero toxin 2 from Escherichia coli O157:H7. *Microbiol. Pathogen.* **5**:188-195.
- 84.- Pellizzari, A., H. Pang, and C. A. Lingwood. 1992. Binding of verocytotoxin 1 to it's receptor is influenced by differences in receptor fatty acid content. *Biochemistry* **31**:1363-1370.
- 85.- Igarishi, K., T. Ogasawara, and K. Ito. 1987. Inhibition of elongation factor 1 dependent aminoacyl-tRNA binding to ribosomes by Shiga-like toxin I (VT1) from Escherichia coli O157:H7 and by Shiga toxins. *FEMS Microbiol. Lett.* **44**:91-94.
- 86.- Scotland, S. M., H. R. Smith, G. A. Willshaw, and B. Rowe. 1983. Verocytotoxin production in strains of Escherichia coli is determined by genes carried on a bacteriophage. *Lancet* ii:**216**.
- 87.- O'Brien, A. D., J. W. Newland, S. F. Miller, R. K. Holmes, H. W. Smith, and S. B. Formal. 1984. Shiga-like toxin converting phages from Escherichia coli strains that cause hemorrhagic colitis or infantile diarrhea. *Science* **226**:694-696.
- 88.- Smith, H. R., N. P. Day, and S. M. Scotland. 1984. Phage-determined production of verocytotoxin in strains of Escherichia coli of serogroup O157. *Lancet* i:**1242-1243**.
- 89.- Eslava, C. A., H. M. Zepeda, and M. P. Herrera. 1990. Phage detection of cytotoxic Escherichia coli strains. *Rev. Lat-amer. Microbiol.* **32**:95-97.



- 90.- Eslava, C. A., P. Cano, A. Cravioto, and S. Giono. 1990. Characterization of phages obtained from Shiga-like toxin-producing Escherichia coli isolated from Mexican children. Washington, D.C. Proceedings of the Annual Meeting of the American Society for Microbiology., (abstracts 106).
- 91.- Scotland, S. M., N. P. Day, and B. Rowe. 1980. Production of a cytotoxin affecting Vero cells by strains of Escherichia coli belonging to traditional enteropathogenic serogroups. FEMS Microbiol. Lett. 7:15-17.
- 92.- Karmali, M. A., M. Petric, B. T. Steele, and C. Lim. 1983. Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing Escherichia coli in stools. Lancet i:619-620.
- 93.- Spika, J. S., J. E. Parson, and D. Nordenberg. 1986. Hemolytic uremic syndrome and diarrhea associated with Escherichia coli O157:H7 in day care center. J. Peadiatr. 109:287-291.
- 94.- Cravioto, A., V. Vazquez, and A. Soria. 1988. Producción de citotoxina tipo Shiga (SLT) 1 en cepas de Escherichia coli aisladas de niños con diarrea en una comunidad rural. Bol. Med. Hosp. Infant. Mex. 45:206-210.
- 95.- Lopez, E. L., M. Diaz, and S. Grinstein. 1989. Hemolytic uremic syndrome and diarrhea in Argentine children: the role of Shiga-like toxins. J. Infect. Dis. 160:469-475.
- 96.- Johnson, W. M., H. Lior, and G. S. Bezanson. 1983. Cytotoxic Escherichia coli O157:H7 associated with haemorrhagic colitis in Canada. Lancet i:76.
- 97.- Levine, M. M., V. Prado, R. Robins-Browne, H. Lior, J. B. Kaper, S. L. Moseley, K. Gicquelais, J. P. Nataro, P. Vial, and B. Tall. 1988. Use of DNA probes and HEP-2 cell adherence assay to detect diarrheogenic Escherichia coli. J. Infect. Dis. 158:224 -228.
- 98.- Bhan, M. K., P. Raj, M. M. Levine, J. B. Kaper, N. Bhandari, R. Srivastava, R. Kumar, and S. Sazawal. 1989. Enteroaggregative Escherichia coli associated with persistent diarrhea in a cohort of rural children in India. J. Infect. Dis. 159:1061-1064.
- 99.- Baqui, A. H., R. Bradley Sack, R. E. Black, K. Haider, A. Hossain, A. R. M. Abdul Alim, M. Yunus, H. R. Chowdhury, and A. K. Siddique. 1992. Enteropathogens associated with acute and persistent diarrhea in Bangladesh in children < 5 years of age. J. Infect. Dis. 166:792-796.

- 100.- Gomes, T. A. T., V. Rassi, K. L. MacDonald, S. R. T. S. Ramos, L. R. Trabulsi, M. A. M. Vieira, B. E. C. Guth, J. A. N. Candeias, C. Ivey, M. R. F. Toledo, and P. A. Blake. 1991. Enteropathogens associated with acute diarrheal disease in urban infants in Sao Paulo. *J. Infect. Dis.* **164**:331-337.
- 101.- Mathewson, J. J., R. A. Oberhelman, H. L. DuPont, F. J. de la Cabada, and E. V. Garybay. 1987. Enteroadherent Escherichia coli as a cause of diarrhea among children in Mexico. *J. Clin. Microbiol.* **25**:1917-1919.
- 102.- Knutton, S., R. K. Shaw, M. K. Bhan, H. R. Smith, M. M. McConnell, T. Cheasty, P. H. Williams, and T. J. Baldwin 1992. Ability of Enteroaggregative Escherichia coli Strains To Adhere In Vitro To Human Intestinal Mucosa. *Infect. Immun.* **60**:2083-2091.
- 103.- Scotland, S. M., H. R. Smith, B. Said, G. A. Willshaw, T. Cheasty, and B. Rowe. 1991. Identification of enteropathogenic Escherichia coli isolated in Britain as enteroaggregative or as members of a subclass of attaching-and effacing E. coli not hybridising with the EPEC adherence-factor probe. *J. Med. Microbiol.* **35**:278-283.
- 104.- Smith, H. R., S. M. Scotland, G. A. Willshaw, B. Rowe, A. Cravioto, and C. Eslava. 1994. Isolates of Escherichia coli O44:H18 of diverse origin are enteroaggregative. *J. Infect. Dis.* **170**:1610-1613.
- 105.- Tickoo, S. K., M. K. Bham, R. Srivastava, B. K. Dass, M. Shariff, S. Saini, and R. Kumar. 1992. Intestinal colonization and production of diarrhea by enteroadherent-aggregative E. coli. *Indian J. Med. Res.* **95**:278-283.
- 106.- Vial, P.A., R. Robins-Brown, H. Lior, V. Prado, J.B. Kaper, J.P. Nataro, D. Maneval, A. Elsayed, and M. M. Levine. 1988. Characterization of enteroadherent-aggregative Escherichia coli, a putative agent of diarrheal disease. *J. Infect. Dis.* **158**:70-79.
- 107.- Tzipori, S., J. Montanaro, R. M. Robins-Browne, P. Vial, R. Gibson, and M. M. Levine. 1992. Studies with Enteroaggregative Escherichia coli in the Gnotobiotic Piglet Gastroenteritis Model. *Infect. Immun.* **60**:5302-5306.
- 108.- Mathewson, J. J., P. C. Johnson, H. L. DuPont, T. K. Satterwhite, D. K. Winsor. 1986. Pathogenicity of enteroadherent E. coli in adult volunteers. *J. Infect. Dis.* **154**:524-527.

- 109.- Nataro, J. P., Y. Deng, D. R. Maneval, A. L. German, W. C. Martin and M. M. Levine. 1992. Aggregative adherence fimbriae I of enteroaggregative Escherichia coli mediate adherence to HEp-2 cell and hemagglutination of human erythrocytes. *Infect. Immun.* **60**:2297-2303.
- 110.- Nataro, J. P., D. Yikang, S. Cookson, A. Cravioto, S. J. Savarino, L. D. Guers, M. M. Levine, C. O. Tacket. 1995. Heterogeneity of enteroaggregative Escherichia coli virulence factors demonstrated in volunteers. *J. Infect. Dis.* **171**:465-468.
- 111.- Nataro, J. P., I. C. A. Scaletsky, J. B. Kaper, M. M. Levine, L. R. Trabulsi. 1985. Plasmid-mediated factors conferring diffuse and localized adherence of enteropathogenic Escherichia coli. *Infect. Immun.* **48**:378-383.
- 112.- Knutton, S., T. Baldwin, P. H. Williams, and A.S. McNeish. 1989. Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue cultured cells: basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic Escherichia coli. *Infect. Immun.* **57**:1290-1298.
- 113.- Savarino, S. J., A. Fasano, D. C. Robertson, and M. M. Levine. 1991. Enteroaggregative Escherichia coli elaborate a heat-stable enterotoxin demonstrable in an in vitro rabbit intestinal model. *J. Clin. Invest.* **87**:1450-1455.
- 114.- Savarino, S. J., A. Fasano, J. Watson, B. M. Martin, M. M. Levine, S. Guandalini, and P. Guerry. 1993. Enteroaggregative Escherichia coli heat-stable enterotoxin 1 represents another subfamily of E. coli heat-stable toxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:3093-3097.
- 115.- Baldwin, T. J., S. Knutton, L. Sellers, H. A. Manjarrez-Hernandez, A. Aitken, and P.H. Williams. 1992. Enteroaggregative Escherichia coli strains secrete a heat labile toxin antigenically related to E. coli hemolysin. *Infect. Immun.* **60**:2092-2095.
- 116.- Haque, M. A., K. Ohki, M. Kikuchi, and O. Kahashi. 1994. Contact hemolysin production by strains of enteroaggregative Escherichia coli isolated from children with diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* **32**:1109-1111.
- 117.- Welch, R. A., and S. Falkow. 1984. Characterization of Escherichia coli hemolysins conferring quantitative differences in virulence. *Infect. Immun.* **43**:156-160.
- 118.- Welch, R. A., 1991. Pore-forming cytolysins of Gram negative bacteria. *Mol. Microbiol.* **5**:521-528.

- 119.- Elliot, S. J., B. J. Mee, B. J. Chang. 1995. Diarrhoea-associated alpha-hemolytic *E. coli* display both enteropathogenic and uropathogenic features. Washington D. C. Proceeding of the General Meeting of the American Society for Microbiology, (abstract C44).
- 120.- Yamamoto, T., Y. Koyama, M. Matsumoto, E. Sonada, S. Nakayama, M. Uchimura, W. Paveenkittiporn, K. Tamura, T. Yokota, and P. Echeverria. 1992. Localized, aggregative, and diffuse adherence to HeLa cells, plastic, and human small intestines by *Escherichia coli* isolated from patients with diarrhea. *J. Infect. Dis.* **116**:1295-1310.
- 121.- Yamamoto, T., S. Endo, T. Yacota, and P. Echeverria. 1991. Characteristics of adherence of enteroaggregative *Escherichia coli* to human and animal mucose. *Infect. Immun.* **59**:3722-3739.
- 122.- Kauffman, F., and F. Orskov. 1956. Die Bakteriologie der *E. coli*-enteritis. In: Adam A. (ed.) Sauglingsenteritis. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, p. 1-4.
- 123.- Kauffman, F. 1947. The serology of the coli group. *J. Immunol.* **57**:71-100.
- 124.- Green, A. A., and W. L. Hughes. 1955. Protein fractionation on the basis of solubility in aqueous solutions of salts and organic solvents. *Methods in Enzymology*. Colowick S. P. and N. O. Kaplan (ed.). Vol. 1. Academic Press, New York, p. 67-87.
- 125.- Bizzini, B., A. Turpin, and M. Raynaud. 1969. Production et purification de la toxine tétanique. *Annales de l'Institut Pasteur* **116**:686-712.
- 126.- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-254.
- 127.- Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, 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 and Wiley-Interscience, New York, Chap. 10, p. 10.0.1-10.12.9.
- 128.- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **22**:680-683.

- 129.- Weber, K., and M. Osborn. 1969. The reability of molecular weight determination by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **244**:4406-4412.
- 130.- Uchterlony, Ö. 1949. Antigen-antibody reactions in gel. *Ark. Kemi. Mineral. Geol.* **26**:1.
- 131.- Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**:4530-4534.
- 132.- Fahey J. L., and E. W. Terry. 1978. Ion exchange chromatography and gel filtration. In: Weir D. M. (ed). *Handbook of experimental immunology*, vol. **1**: Immunochemistry, 3rd. Blackwell Scientific Publications Ltd., Oxford, chap. **8**, p. 8.1-8.16.
- 133.- *Ion Exchange Chromatography. Principles and methods.* Pharmacia Fine Chemicals AB, Box 175, S-715 04 Uppsala 1, Sweden.
- 134.- Fischer, L. 1986. *Gel Filtration Chromatography.* Elsevier, New York.
- 135.- *Gel filtration theory and practice.* Pharmacia Fine Chemicals AB, Box 175, S-715 04 Uppsala 1, Sweden.
- 136.- Freund, J. 1974. Some aspects of active immunization. *Ann. Rev. Microbiol.* **1**:291-298.
- 137.- Ishikawa, E., M. Imagawa, S. Hashida, S. Yoshitake, Y. Hamaguchi, and T. Ueno. 1983. Enzyme labeling of antibodies and their fragments for enzyme immunoassay and immunohistochemical staining. *J. Immunoassay* **4**:209-327.
- 138.- Lange, S.A. 1982. A rat model for an in vivo assay of enterotoxigenic diarrhea. *FEMS Microbiol Lett.* **15**: 239-242.
- 139.- Li, F. Y., N. W. Weisbrodt, Y. Harari, and F. G. Moody. 1991. Use of a modified Ussing Chamber to monitor intestinal epithelial and smooth muscle functions. *Special communications. Am. Physiol. Soc.* G166-G170.
- 140.- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1980. In: Ford, N., C. Nolan, and M. Froguson (ed.). *Molecular cloning. A laboratory manual.* 2ed. Book 3. Cold Spring Harbor Laboratory, USA, p. B.16.

- 141.- Porter, R. R. and K. B. M. Reid. 1978. The biochemistry of complement. *Nature* **275**:699-704.
- 142.- Dean, G. A., J. A. Dean, A. H. Burton, and R. C. Dicker. 1990. *Epi. Info. Version 5: a word processing database and statistics program for epidemiology on microcomputers.* Georgia USA, Incorporates, Stone Mountain.
- 143.- Wai, N. S., A. Takade, and K. Amako. 1996. The hydrophobic surface protein layer of enteroaggregative *Escherichia coli* strains. *FEMS. Microbiol. Lett.* **135**:17-22.
- 144.- Savarino, S. J., A. Mc Veigh, J. Watson, A. Cravioto, J. Molina, P. Echeverria, M. K. Bham, M. M. Levine, and A. Fasano. 1996. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin is not restricted to enteroaggregative *E. coli*. *J. Infect. Dis.* **173**:1019-1022
- 145.- Weess, J. A. and T. M. Petro. 1987. Modulation of murine Peyer's patch immunoglobulin A response by enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **55**:1085-1089.
- 146.- Wenneras, C., J-R. Neeser, and A-M. Svennerholm. 1995. Binding of the fibrillar CS3 adhesin of enterotoxigenic *Escherichia coli* to rabbit intestinal glycoproteins is competitively prevented by galNAc $\beta$ 1-4gal containing glycoconjugates. *Infect. Immun.* **63**:640-646.
- 147.- Kohler, G., and C. Milsteins. 1975. Continuous cultures of fused cell secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* **256**:495.
- 148.- Santor, R. B. 1994. Cytokines in intestinal inflammation: pathophysiological and clinical considerations. *Gastroenterology.* **106**:533-539.
- 149.- Hicks, S., D. C. K. Candy, and A. D. Phillips. 1996. Adhesion of enteroaggregative *Escherichia coli* to pediatric intestinal mucosa *In vitro*. *Infect. Immun.* **64**:4751-4760.
- 150.- Nataro, J. P., S. Hicks, A. D. Phillips, P. A. Vial, and C. L. Sears. 1996. T84 cells in culture as a model for enteroaggregative *Escherichia coli* pathogenesis. *Infect. Immun.* **64**:4761-4768.
- 151.- Stein, M., B. Kenny, M. A. Stein, and B. B. Finlay. 1996. Characterization of EspC, a 110-Kilodalton protein secreted by enteropathogenic *Escherichia coli* which is homologous to members of the immunoglobulin A protease-like family of secreted proteins. *J. Bacteriol.* **178**:6546-6554.

- 152.- Benjellountouimi, Z., P. J. Sansonetti, and C. Parsot. 1995. SepA, the major extracellular protein of Shigella flexneri-autonomous secretion and involvement in tissue invasion. *Mol. Microbiol.* **17**:123-135.
- 153.- Provence, D. L., and R. Curtiss. 1994. Isolation and characterization of a gene involved in hemagglutination by avian pathogenic Escherichia coli strain. *Infect. Immun.* **62**:1369-1380.

**CUADRO 1**  
**CARACTERISTICAS DE LOS GRUPOS DE *Escherichia coli* CAUSANTE DE DIARREA**

GRUPO	TIPO DE DIARREA	SÍNDROMES EPIDEMIOLÓGICOS	SEROTIPOS "O" MAS COMUNES	ASOCIACION CON ENTEROCITOS	TOXINAS ELABORADAS	DTA ASOCIADO
Enterotoxigénico (ETEC)	Diarrea acuosa	Diarrea en niños en países en desarrollo. Diarrea del viajero (adultos)	8, 15, 20, 25, 27, 63, 78, 80, 85, 115, 128, 148, 159	Se adhiere por medio de fimbrias CFAI, CFAII	Termolábil (LT) y/o termoestable (ST)	30 - 75 mDa (plásmido)
Enteroinvasivo (EIEC)	Diarrea con moco y sangre (disenteria)	Afecta adultos principalmente, a veces brotes por alimentos contaminados	28, 112, 124, 136, 143, 144, 147, 152, 164	Invade y se multiplica en enterocitos; inflamación por PMN		140 mDa (plásmido)
Enterohemorrágico (EHEC)	Diarrea aguda y crónica en niños	Brotes de alimentos contaminados	157	Se adhiere al enterocito por fimbrias	Citotoxina semejante a Shiga I y II (SLT)	Fagos lisogénicos
Enteropatógeno (EPEC)	Diarrea aguda y crónica en niños	Brotes de diarrea en cuneros, diarrea epidémica y esporádica en comunidades, es rara en adultos	26, 55, 86, 111, 114, 119, 125, 126, 127, 128, 142	Se adhiere íntimamente a enterocitos y destruye microvelocidades		55 - 60 mDa (plásmido)
Enterogregativo (EAggEC)	Diarrea persistente y con sangre en niños	Diarrea en niños en países en desarrollo	O44 serotipo (O44 : H18)	Se adhiere formando agregados bacterianos por medio de fimbrias AAFII y AAFIII	Hemolisina termolabil fosforiante  Enterotoxina termoestable (EAST 1)	60 - 65 mDa (plásmido)



**CUADRO 2**  
**CARACTERISTICAS DE CEPAS EAggEC AISLADAS DE NIÑOS CON DIARREA**  
**PERSISTENTE Y/O CON SANGRE, Y UNA CEPA NO ADHERENTE**

K 12	OR : H11	NEGATIVA	NEGATIVA
49766	O? : H10	AGREGATIVA	POSITIVA
58275	O44 : H18	AGREGATIVA	POSITIVA
88142	O105 : NM <sup>2</sup>	AGREGATIVA	ND <sup>3</sup>
O42 [JPN10]	O44 : H18	AGREGATIVA	POSITIVA
17 - 2	O3 : NM	AGREGATIVA	ND
86978 [10e]	O51 : NM	AGREGATIVA	NEGATIVA
88134	OR : H30	AGREGATIVA	ND
59319	O? : NM	AGREGATIVA	POSITIVA

1. BAUNDRY B., & et al. 1990, J INFECT DIS; 161 : 1249 - 1251.

2. NM = NO MOVILES.

3. ND = NO DETERMINADA.

### CUADRO 3

#### RENDIMIENTO DEL PROCESO DE PURIFICACION DE PROTEINAS DE 116 Y 108 kDa SECRETADAS POR LA CEPA 49766.

<b>FRACCION PROTEICA</b>	<b>VOLUMEN (ml)</b>	<b>CONCENTRACION (mg/ml)</b>	<b>TOTAL (mg)</b>	<b>RENDIMIENTO (%)</b>
SN CULTIVO	6000	0.105	630	100
PP (NH <sub>4</sub> ) SO <sub>2</sub>	160	3.76	601.6	95.49
PP 1.15 M	3.6	3.8	13.68	2.17
SN 1.15 M	73	6.8	497.6	78.98
PP 1.75 M	40.8	3.38	137.9	21.88
SN 1.75 M	98.4	1.35	133.1	21.12
PICO I Q-SEPHAROSE	50	0.56	28	4.4

PP = PRECIPITADO; SN = SOBRENADANTE

PICO I Q-SEPHAROSE = FRACCIONES 7-11 (PICO I) DEL PERFIL DE ELUCION DE LA CROMATOGRAFIA EN Q-SEPHAROSE DEL PRECIPITADO 1.75 M EN K1/K2.

CUADRO 4

PROPIEDADES ELECTRICAS (PD Y I<sub>sc</sub>) DE YEYUNO DE RATA MEDIDAS EN CAMARAS DE USSING, PARA EVALUAR LA SENSIBILIDAD AL CALOR Y A PROTEINASA K DE LAS PROTEINAS DE 116 Y 108 kDa, OBTENIDAS EN EL PICO I EN Q-SEPHAROSE

ADICION	TRATAMIENTO	PD <sup>a</sup> (mV)	I <sub>sc</sub> <sup>a</sup> ( $\mu$ A/cm <sup>2</sup> )
NINGUNO (SOLUCION RINGER)	NINGUNO	0.92	3.89
PROTEINAS 116 Y 108 kDa (PICO I EN Q-SEPHAROSE)	NINGUNO	2.20	15.3
	CALOR <sup>b</sup>	0.50	4.49
	PROTEINASA K <sup>c</sup>	0.98	3.63

<sup>a</sup> VALORES PROMEDIO REGISTRADOS 30 MIN. DESPUES DE LA ADICION A LA HEMICAM

<sup>b</sup> 25  $\mu$ g DE PROTEINAS DE 116 Y 108 kDa PRECALENTADAS A 75° C POR 15 MIN.

<sup>c</sup> 25  $\mu$ g DE PROTEINAS DE 116 Y 108 kDa PREINCUBADAS CON 200  $\mu$ g / ML DE PROTEINASA K POR 1 HORA A 37° C.

CUADRO 5  
 EXPRESION DE PROTEINAS DE 116 Y 108 kDa POR CEPAS DE  
 E. coli ENTEROAGREGATIVAS, AISLADAS DE NIÑOS CON  
 DIARREA Y ASINTOMATICOS.

GRUPO (n)	PROTEINA					
	<sup>(1)</sup>		<sup>(2)</sup>		<sup>(3)</sup>	
	116 kDa	No (%)	108 kDa	No (%)	116 Y 108 kDa	No (%)
ASINTOMATICOS (43)	2	(4.6)	5	(11.6)	0	(0)
DIARREA AGUDA (70)	28	(40.0)	18	(25.7)	4	(5.7)
DIARREA PERSISTENTE (18)	8	(44.4)	7	(38.8)	5	(27.7)
DIARREA AGUDA C/SANGRE (39)	15	(38.4)	7	(17.9)	4	(10.2)
DIARREA PERSISTENTE C/SANGRE (6)	3	(50.0)	2	(33.3)	2	(33.3)
TOTAL DE DIARREA C/SANGRE (45)*	18	(40.0)	9	(20.0)	6	(13.3)
DIARREA INDETERMINADA (38)	11	(28.9)	13	(34.2)	7	(18.4)
TOTAL DE CASOS CON DIARREA (126)**	47	(37.3)	38	(30.1)	16	(12.6)

TOTAL DE CEPAS 169.

\* INCLUYEN LAS CEPAS DE DIARREA AGUDA Y DIARREA PERSISTENTE.

\*\* NO INCLUYEN PACIENTES ASINTOMATICOS.

(1) CEPAS QUE PRESENTAN LA PROTEINA DE 116 kDa

(2) CEPAS QUE PRESENTAN LA PROTEINA DE 108 kDa

(3) CEPAS QUE PRESENTAN AMBAS PROTEINAS (116 Y 108 kDa) QUE TAMBIEN FUERON INCLUIDAS EN (1) Y (2).

## CUADRO 6

EXPRESION DE PROTEINAS DE 116 Y 108 kDa POR CEPAS DE  
E. coli ENTEROAGREGATIVAS AISLADAS DEL AMBIENTE Y DE  
 CASOS CLINICOS CON DIARREA.

<b>GRUPO (n)</b>	<b>FRACCION PROTEICA</b>		
	<b>116 kDa (1)</b>	<b>108 kDa (2)</b>	<b>116 Y 108 kDa (3)</b>
	<b>No (%)</b>		
AMBIENTALES (22)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)
CASOS CLINICOS (126)*	47 (37.3)	38 (30.1)	16 (12.6)

TOTAL DE CEPAS 148

\* NO INCLUYE PACIENTES ASINTOMATICOS.

(1) CEPAS QUE PRESENTAN LA PROTEINA DE 116 kDa

(2) CEPAS QUE PRESENTAN LA PROTEINA DE 108 kDa

(3) CEPAS QUE PRESENTAN AMBAS PROTEINAS (116 Y 108 kDa) QUE TAMBIEN FUERON INCLUIDAS EN (1) Y (2).



Figura 1.- Patrón de adherencia agregativo de *E. coli* a células HEp-2 en cultivo. Se observan agregados bacterianos con una apariencia de de ladrillos apilados sobre las células. Ensayo a tres horas. Teñido con Giemsa. 100X.

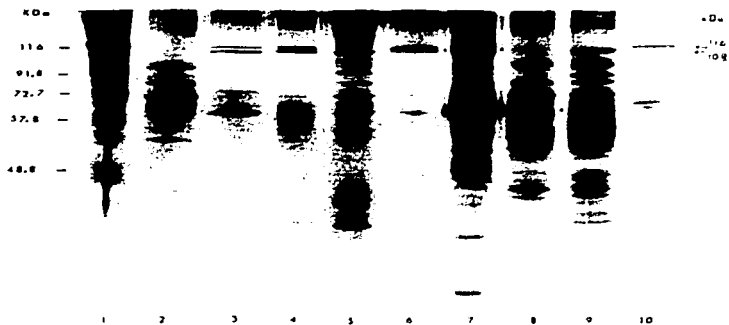
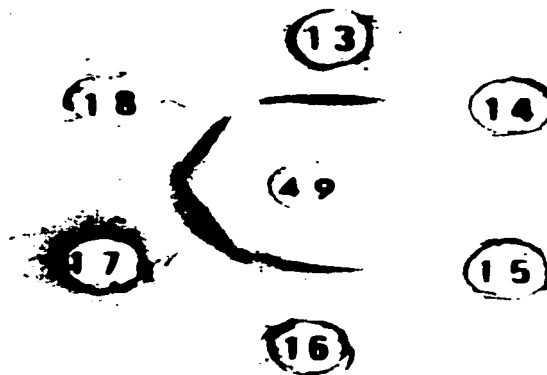


Figura 2.- Perfil electroforetico (SDS-PAGE 10% [v/v]) de las proteínas obtenidas a partir del sobrenadante del cultivo de cepas EAggEC y un control no adherente (K12), precipitados con sulfato de amonio al 75% (p/v) de saturación. Se aprecian dos bandas de proteínas de 116 y 108 kDa constantes en las cepas EAggEC y ausente en la cepa K12. Marcadores de pesos moleculares (carril 1), cepa K12 (carril 2), 49766 (carril 3), 58275 (carril 4), 88142 (carril 5), O42 [JPN10] (carril 6), 17-2 (carril 7), 86978 [10e] (carril 8), 88134 (carril 9) y 59319 (carril 10). Se aplicaron 100  $\mu$ g de proteína por carril, libres de agentes reductores (beta-mercaptoetanol). Teñido con nitrato de plata.



**Figura 3.-** Doble inmunodifusión (Ouchterlony) del suero de diferentes niños infectados por cepas EAggEC contra las proteínas secretadas por la cepa EAggEC 49766. Los suero de niños (pozos laterales) contra las proteínas precipitadas con sulfato de amonio al 75% (p/v) de saturación a partir del sobrenadante de los cultivos de las cepas EAggEC 49766 (pozo central). Los sueros 13 y 18 muestran una reacción de identidad total, y los sueros 16, 17 y 18 una reacción de identidad parcial contra el mismo antígeno. Los sueros 14 y 15 fueron negativos en la prueba. Ensayo en agar 1% (p/v). Teñido con amido negro.



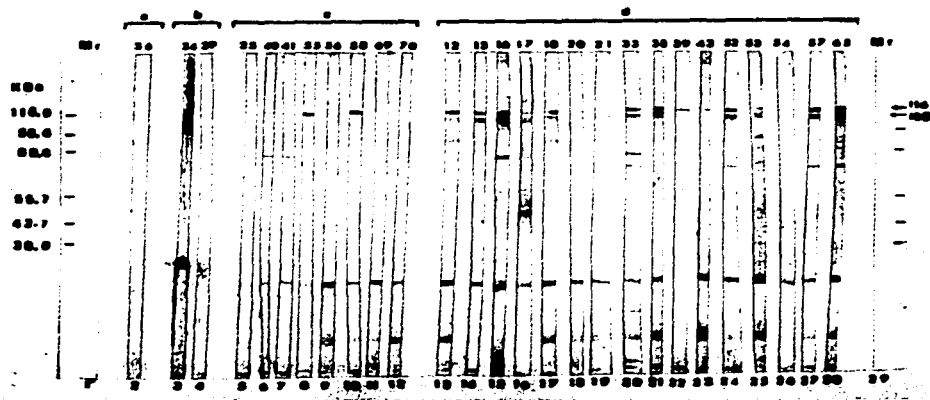
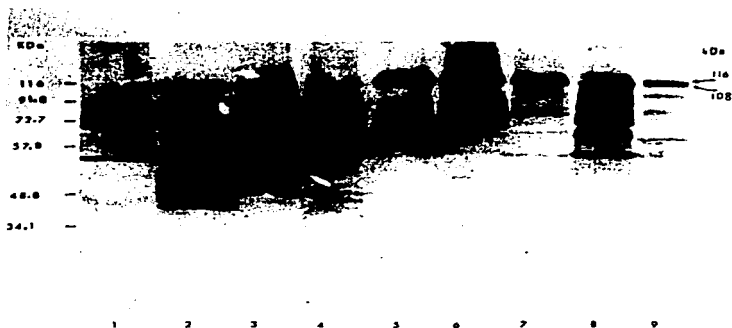


Figura 4.- Inmunoelctrotransferencia de proteínas secretadas por la cepa EAggEC 49766, precipitadas con sulfato de amonio al 75% (p/v) de saturación, probadas con los suero de niños infectados por EAggEC (dilución 1:25). Los sueros reconocen dos fracciones proteicas de alto peso molecular (116 y 108 kDa). Suero control Ouchterlony negativo (grupo A), sueros Ouchterlony positivos (grupos B, C, y D). Los números superiores muestran el número del paciente. Marcadores de pesos moleculares (carriles 1 y 29), suero control con respuesta negativa (grupo A, carril 2), sueros que reconocen sólo las proteínas de bajo peso (grupo B, carriles 3 y 4), sueros que reconocen una proteína de 116 kDa y otras de bajo peso (grupo C, carriles 5 a 12), sueros que reconocen las fracciones proteicas de 116 y 108 kDa, y otras de menor peso (grupo D, carriles 13 a 28). La separación electroforetica fue en SDS-PAGE al 10% (p/v). Se aplicaron 100 µg de proteína por carril libres de agentes reductores (beta-mercaptoetanol).



**Figura 5.-** Inmunoelctrotransferencia de proteínas secretadas por diferentes cepas EAggEC y una cepa no adherente (K12), precipitadas con sulfato de amonio al 75% de saturación a partir del sobrenadante del cultivos. Fueron probadas con una mezcla de sueros de niños infectados por EAggEC que reconocen las proteínas de 116 y 108 kDa (figura 4, grupo D). Los marcadores de pesos moleculares (kDa) se muestran a la izquierda. La mezcla de sueros no reconoce en la cepa K12 proteínas de alto peso molecular (carril 1). En los carriles restantes se observa una respuesta preferentemente contra dos proteínas de alto peso molecular (116 y 108 kDa) semejantes a las producidas por la cepa 49766 (carril 2). Las muestras corresponden a las cepas 58275 (carril 3), 88142 (carril 4), O42 [JPN10] (carril 5), 17-2 (carril 6), 86978 [10e] (carril 7), 88134 (carril 8) y 59319 (carril 9). La cepa 17-2 presenta una proteína ligeramente más pesada de 120 kDa. La separación electroforética fue en SDS-PAGE al 10% (p/v). Se aplicaron 100  $\mu$ g de proteína por carril libres de agentes reductores (beta-mercatoetanol).

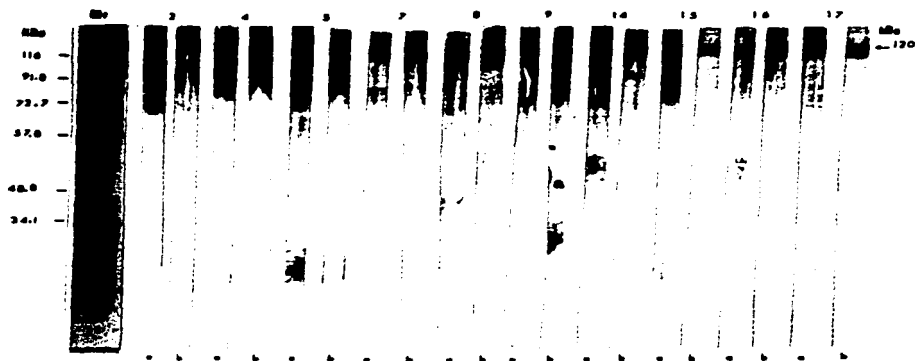


Figura 6.- Inmunoelctrotransferencia de proteínas secretadas por la cepa 17-2, precipitadas con sulfato de amonio al 75% de saturación, probadas con sueros de diez voluntarios humanos desafiados con  $10^{10}$  cfu de la misma cepa (cuadro 3). A la izquierda se observa los marcadores de pesos moleculares (kDa). El número de paciente se indica en la parte superior. Los sueros previos y posteriores al desafío (carriles a y b respectivamente) reconocen principalmente una proteína de 120 kDa y otra de 108 kDa (esta última presente en los precipitados de otras cepas EAggEC). Algunas proteínas de bajo peso son también detectadas. La diferencia en la respuesta de los sueros previos y posteriores al desafío fue mínima. La separación electroforética fue en SDS-PAGE al 10% (p/v). Se aplicaron  $100 \mu\text{g}$  de proteína por carril libres de agentes reductores (beta-mercaptoetanol).

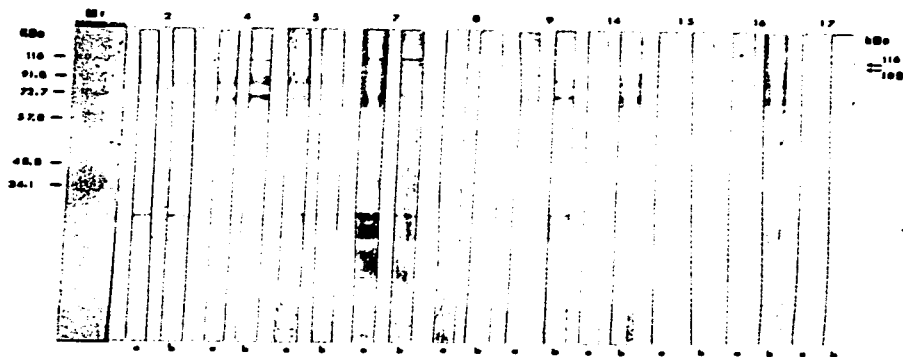


Figura 7.- Inmunoelectrotransferencia de proteínas secretadas por la cepa JM221, precipitadas con sulfato de amonio al 75% (p/v) de saturación, probadas con los mismos sueros de voluntarios y bajo las mismas condiciones que la figura 6. Los sueros previos y posteriores al desafío (carriles a y b respectivamente) reconocen principalmente las proteínas de 116 y 108 kDa. Algunas proteínas de bajo peso son también detectadas. La diferencia en la respuesta de los sueros previos y posteriores al desafío fue mínima. Se aplicaron 100  $\mu$ g de proteína por carril libres de agentes reductores (beta-mercaptoetanol).



**Figura 8.-** Immunoelectrotransferencia de proteínas secretadas por la cepa 49766, precipitadas con sulfato de amonio al 75% (p/v) de saturación, probadas con los mismos sueros de voluntarios y bajo las mismas condiciones figura 6. Los sueros previos y posteriores al desafío (carriles a y b respectivamente) reconocen principalmente las proteínas de 116 y 108 kDa. Algunas proteínas de bajo peso son también detectadas. La diferencia en la respuesta de los sueros previos y posteriores al desafío fue mínima. Se aplicaron 100  $\mu$ g de proteína por carril libres de agentes reductores (beta-mercaptoetanol).

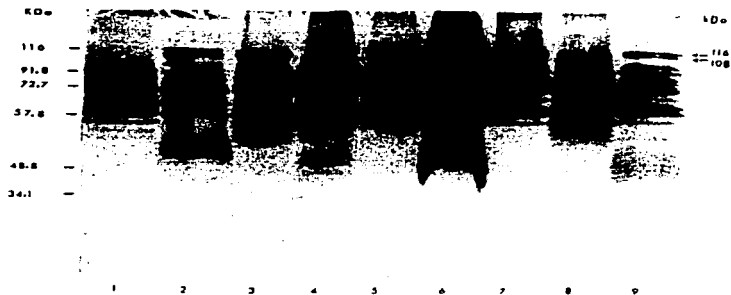


Figura 9.- Inmunoelctrotransferencia de proteínas secretadas por diferentes cepas EAggEC y una cepa no adherente (K12), precipitadas con sulfato de amonio al 75% (p/v) de saturación a partir del sobrenadante del cultivo. Fueron probadas con una mezcla de sueros de voluntarios posteriores al desafío con  $10^{10}$  cfu de la cepa 17-2. Los marcadores de pesos moleculares (kDa) se muestran a la izquierda. La mezcla de sueros no reconoce en la cepa K12 proteínas de alto peso molecular (carril 1). En los carriles restantes se observa una respuesta preferentemente contra dos proteínas de alto peso molecular (116 y 108 kDa) semejantes a las producidas por la cepa 49766 (carril 2), 58275 (carril 3), 88142 (carril 4), O42 [JPN10] (carril 5), 17-2 (carril 6), 86978 (10e) (carril 7), 88134 (carril 8) y 59319 (carril 9). La cepa 17-2 presenta una proteína ligeramente más pesada de 120 kDa. La separación electroforética fue en SDS-PAGE al 10% (p/v). Se aplicaron  $100 \mu\text{g}$  de proteína por carril libres de agentes reductores (beta-mercaptoetanol).

# CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO EN DEAE-CELULOSA DE PROTEINAS DE 116 Y 108 kDa

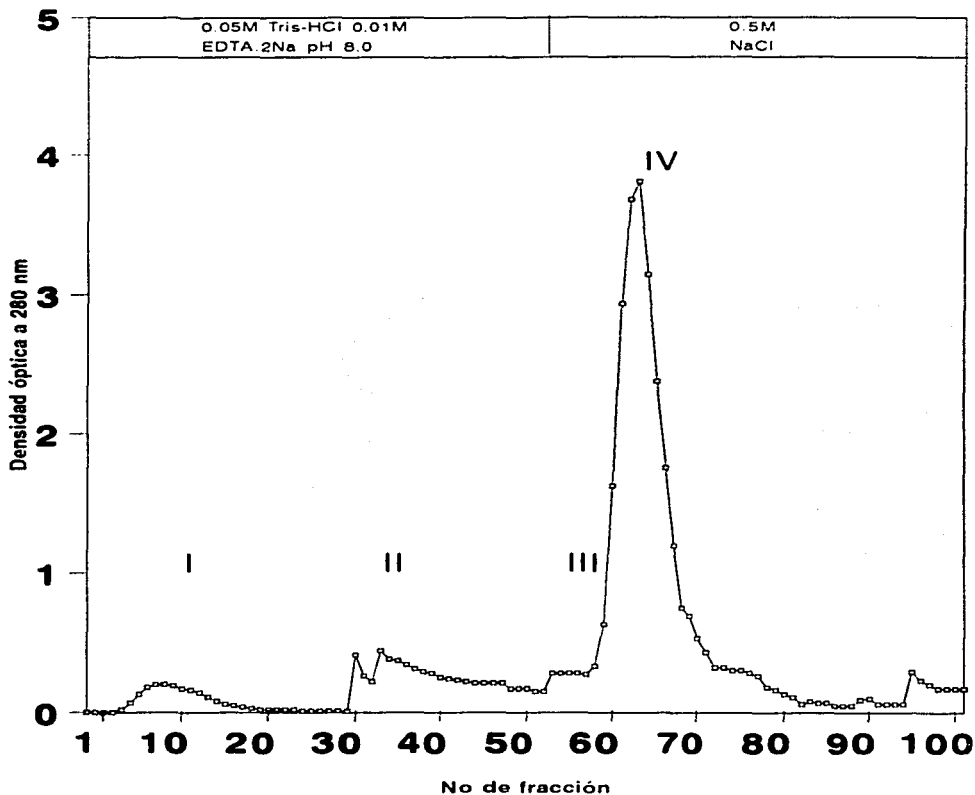


Figura 10.- Cromatografía en DEAE-Celulosa del PP 1.75 M con K1/K2. El pico I (fracciones 6-16) del perfil de elución contiene las proteínas de 116 y 108 kDa.

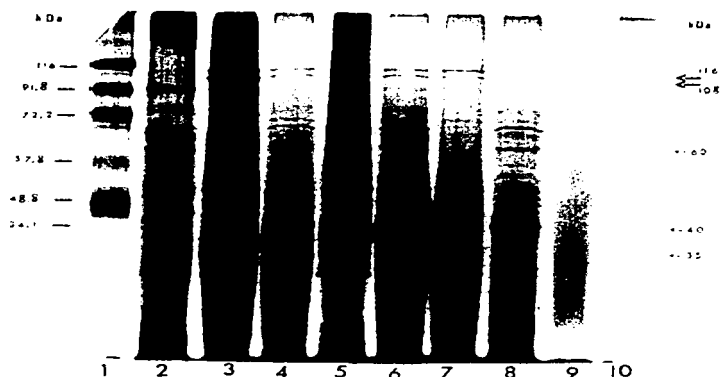
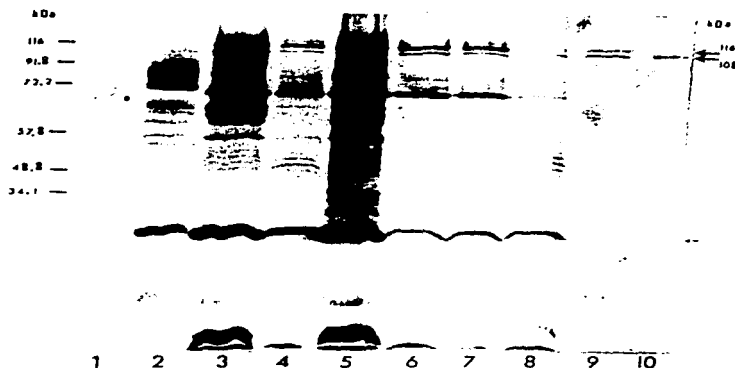


Figura 11.- SDS-PAGE 10% (p/v) de las fracciones proteicas obtenidas en el proceso de purificación de las proteínas de 116 y 108 kDa, obtenidas a partir del sobrenadante del cultivo de la cepa EAggEC 49766. Marcadores de pesos moleculares (carril 1), precipitado con sulfato de amonio al 60% (p/v) de saturación de la cepa K12 (carril 2), precipitados con sulfato de amonio al 60 y 75% (p/v) de saturación de la cepa 47766 (carriles 3 y 4 respectivamente), precipitado y sobrenadante a 1.15 M con K1/K2 de la cepa 49766 (carriles 5 y 6 respectivamente), precipitado y sobrenadante a 1.75 M con K1/K2 de la cepa 49766 (carriles 7 y 8). En el pico I de la cromatografía en DEAE-Celulosa se concentran preferentemente las proteínas de 116 y 108 kDa (carril 9). El producto obtenido en el único pico de la cromatografía en Sephadex G-100 no fue posible separar las proteínas de 116 y 108 kDa (carril 10), en este caso la proteína de 116 kDa desaparece y aparecen subproductos de 60, 40 y 35 kDa. La cantidad de proteína aplicada fue 100  $\mu$ g (carriles 2 a 9) y 10  $\mu$ g (carriles 9 y 10) libres de agentes reductores (beta-mercaptoetanol).





**Figura 12.-** Inmunoelctrotransferencia de las fracciones proteicas del proceso de purificación de las proteínas de 116 y 108 kDa, obtenidas a partir del sobrenadante del cultivo de la cepa 49766. La separación electroforetica fue idéntica al mostrado en la figura 11. Se utilizó como primer anticuerpo una mezcla de sueros de niños infectados por cepas EAggEC (figura 4, grupo D). Marcadores de pesos moleculares (carril 1), precipitado con sulfato de amonio al 60% (p/v) de saturación de la cepa K12 (carril 2), precipitados con sulfato de amonio al 60 y 75% (p/v) de saturación de la cepa 47766 (carriles 3 y 4 respectivamente), precipitado y sobrenadante a 1.15 M con K1/K2 de la cepa 49766 (carriles 5 y 6 respectivamente), precipitado y sobrenadante a 1.75 M con K1/K2 de la cepa 49766 (carriles 7 y 8). En el pico I de la cromatografía en DEAE-Celulosa se detectó únicamente las proteínas de 116 y 108 kDa (carril 9). El producto obtenido en la cromatografía en Sephadex G-100 se encontró respuesta preferentemente con la proteína de 108 kDa (carril 10). Se aplicaron 100  $\mu$ g (carriles 2 a 9) y 10  $\mu$ g de proteína (carriles 9 y 10) libres de agentes reductores (beta-mercaptoetanol).

# CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO EN Q-SEPHAROSE DE PROTEINAS DE 116 Y 108 kDa

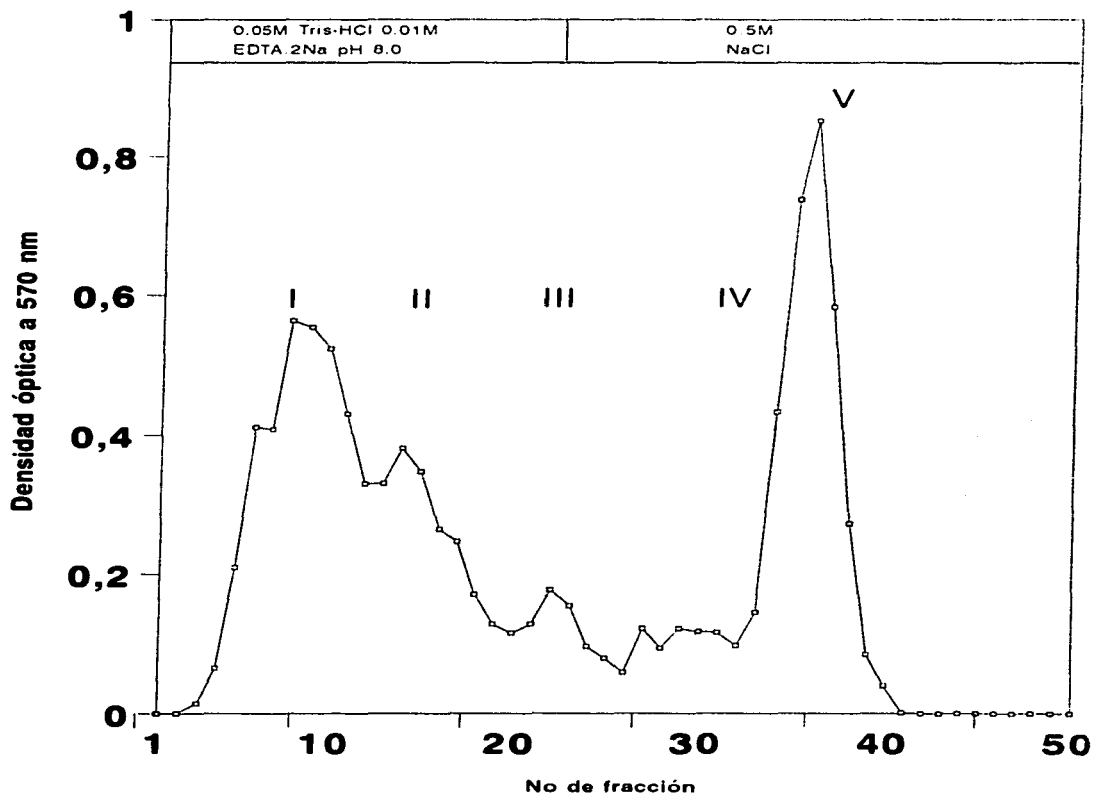
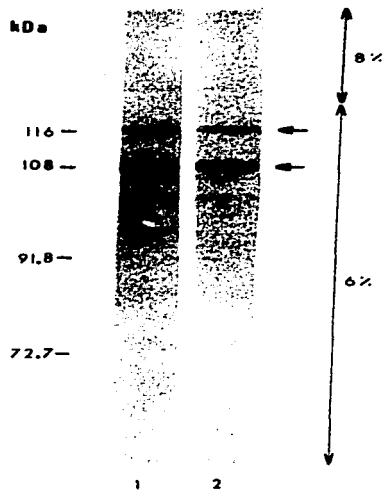
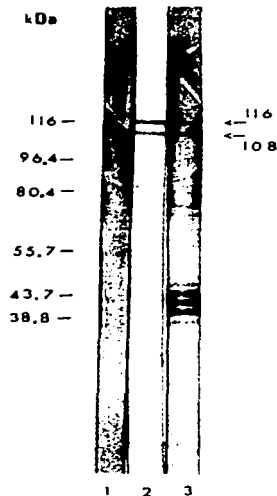


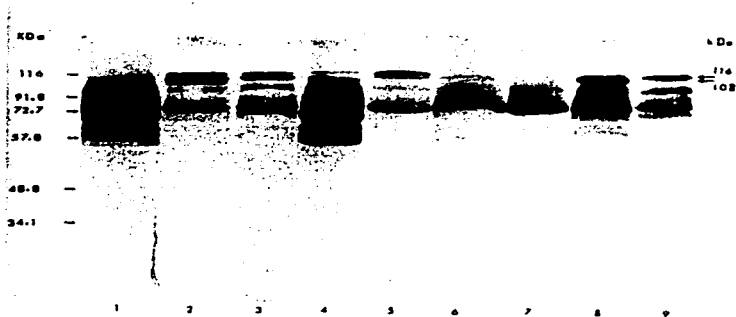
Figura 13.- Cromatografía en Q-Sepharose del PP 1.75 M con K1/K2. El pico I (fracciones 7-11) del perfil de elución contiene las proteínas de 116 y 108 kDa.



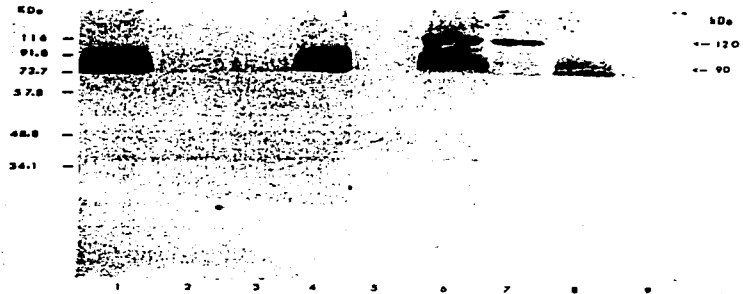
**Figura 14.-** SDS-PAGE en gradientes discontinuos (6 y 8% [p/v]) de las proteínas de 116 y 108 kDa, obtenidas en el pico I de la cromatografía en Q-Sepharose. A la izquierda se indican los marcadores de pesos moleculares. La SDS-PAGE libre y en presencia de agentes reductores (beta-mercaptoetanol), no mostró cambios en el patrón electroforetico (carriles 1 y 2 respectivamente). Se aplicaron 10  $\mu$ g de proteína por carril. Teñido con azul de Coomassie.



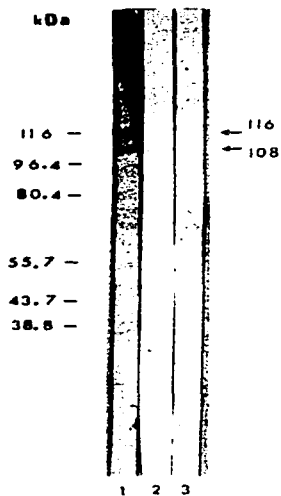
**Figura 15.-** Inmunoelctrotransferencia de proteínas secretadas por la cepa EAggEC 49766, precipitadas con sulfato de amonio al 75% (p/v) de saturación, probadas con gamaglobulinas de conejos inmunizados con las proteínas de 116 y 108 kDa. La respuesta de la gamaglobulina del conejo inmunizado con la banda de proteína de 108 kDa, obtenida por SDS-PAGE, reconoce sólo la proteína homóloga (carril 1); la respuesta de la gamaglobulina de conejo inmunizado con la banda de proteína de 116 kDa, obtenida por SDS-PAGE, reconoce la proteína homóloga y la proteína de 108 kDa, además otra de 80 kDa (carril 2); la respuesta de las gamaglobulinas de conejos inmunizados con las proteínas de 116 y 108 kDa en solución, en presencia de Adyuvante de Freund, reconoce ambas proteínas de 116 y 108 kDa, y otra de menor peso (80 kDa) (carril 3). Los marcadores de pesos moleculares se indican a la izquierda.



**Figura 16.-** Inmunoelctrotransferencia de proteínas secretadas por diferentes cepas EAggEC y una cepa no adherente (K12), precipitadas con sulfato de amonio al 75% (p/v) de saturación probadas con gamaglobulinas de conejo anti 116 y 108 kDa. Los marcadores de pesos moleculares (kDa) se muestran a la izquierda. Las cepas 49766, 58275, 88142, O42 [JPN10], 88134 y 59319 (carriles 2, 3, 4, 5, 8 y 9 respectivamente) expresan las proteínas de 116 y 108 kDa. La cepa 17-2 expresa unicamente la proteína de 108 kDa (carril 6) y las cepas 86978 y K12 no expresan las proteínas (carriles 1 y 7). La separación electroforetica fue en SDS-PAGE al 10% (p/v). Se aplicaron 100 µg de proteína por carril.



**Figura 17.-** Inmunoelctrotransferencia de las proteínas secretadas por diferentes cepas EAggEC y una cepa no adherente (k12), precipitadas con sulfato de amonio al 75% (p/v) de saturación, a partir de los sobrenadantes de los cultivos. Fueron probadas con el anticuerpo IgG anti-HlyA observandose reconocimiento inmune en los precipitados de la cepa 17-2 (carril 6) contra una proteína de 120 kDa y otra cercana a 80 kDa. También se encontró respuesta el en precipitado de la cepa 86978 [10e] (carril 7) contra una proteína de 120 kDa. Las cepas K12, 49766, 58275, 88142, O42 [JPN10], 88134 y 59319 (carriles 1, 2, 3, 4, 5, 8 y 9 respectivamente), no mostraron reacción cruzada con anti-HlyA. La separación electroforetica fue en SDS-PAGE al 10% (p/v). Se aplicaron 100  $\mu$ g de proteína por carril, libres de agentes reductores (beta-mercaptoetanol).



**Figura 18.-** Inmunoelctrotransferencia de las proteínas de 116 y 108 kDa de la cepa EAggEC 49766, que muestran homología antigénica con la toxina colérica (CT) y la toxina termolábil de *E. coli* (LT). Las proteínas fueron reconocidas por las gamaglobulinas de conejo anti 116 y 108 kDa (carril 1), la anti-LT reconoce preferentemente la proteína de 108 kDa (carril 2) y la anti-CT también reconoce preferentemente la proteína de 108 kDa (carril 3). Las proteínas de 116 y 108 kDa fueron obtenidas en el pico I de la cromatografía en Q-Sepharose y separadas por SDS-PAGE al 10% (p/v). Se aplicaron 10  $\mu$ g de proteína por carril libres de agentes reductores (beta-mercaptoetanol).



Figura 19.- Corte de intestino de rata (duodeno) inoculada con  $3 \times 10^{10}$  bacterias vivas de la cepa 49766; incubada por 6 horas. Muestra deformación y acortamiento de las vellosidades intestinales (1), inflamación (infiltrado celular [2]), necrosis del epitelio (3) y hemorragia transmural (4). Teñido con hematoxilina-eosina. (10 X).



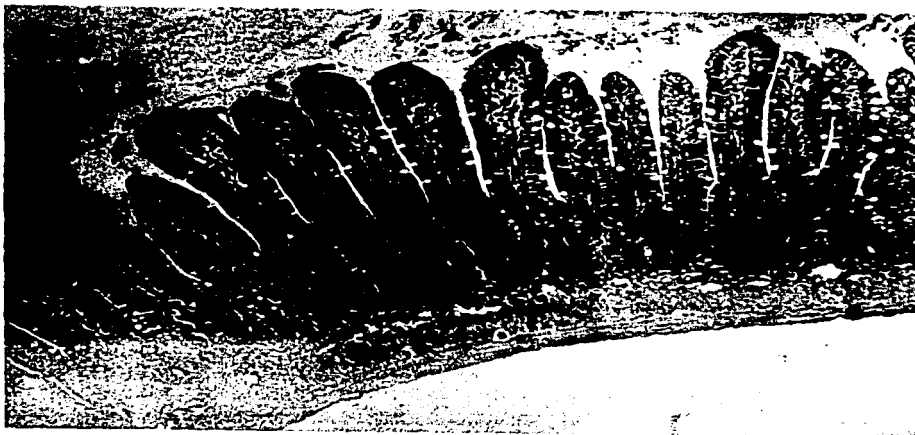


Figura 20.- Corte de intestino de rata (duodeno) inoculada con  $3 \times 10^{10}$  bacterias vivas de la cepa no adherente 30651; incubada por 6 horas. Las vellosidades intestinales se observan conservadas sin alteraciones. Teñido con hematoxilina-eosina. (10 X).

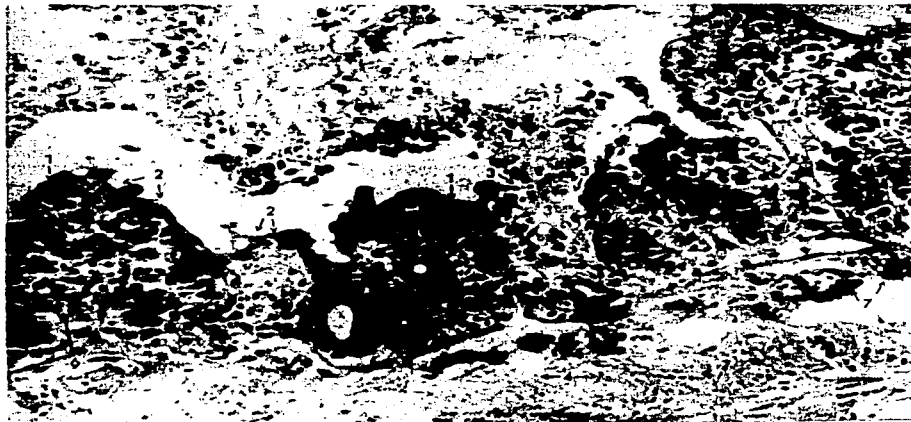


Figura 21.- Corte de intestino de rata (duodeno) inoculada con 100  $\mu$ g de proteínas de 116 y 108 kDa (obtenidas en el pico I de la cromatografía en Q-Sepharose). Se observa acortamiento de las vellosidades intestinales (1), necrosis del epitelio (2), úlceras (3), edema (4), la presencia de un exudado fibrinopurulento (5), inflamación (infiltrado celular [6]) y hemorragia extensa en la mucosa, muscular y serosa (7). Teñido con hematoxilina-eosina. (40 X).

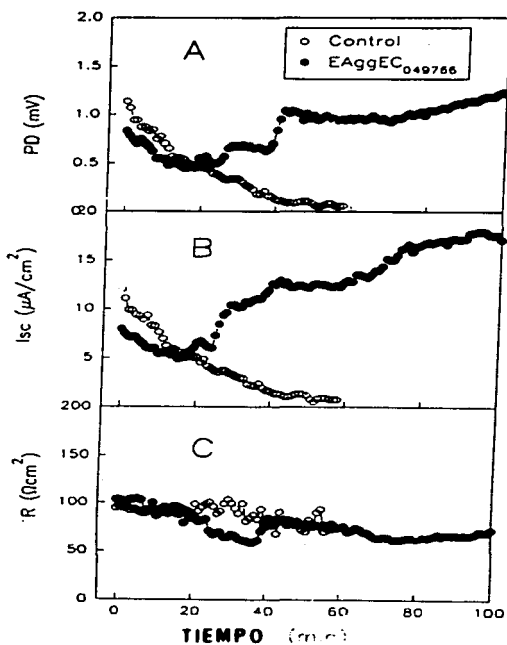
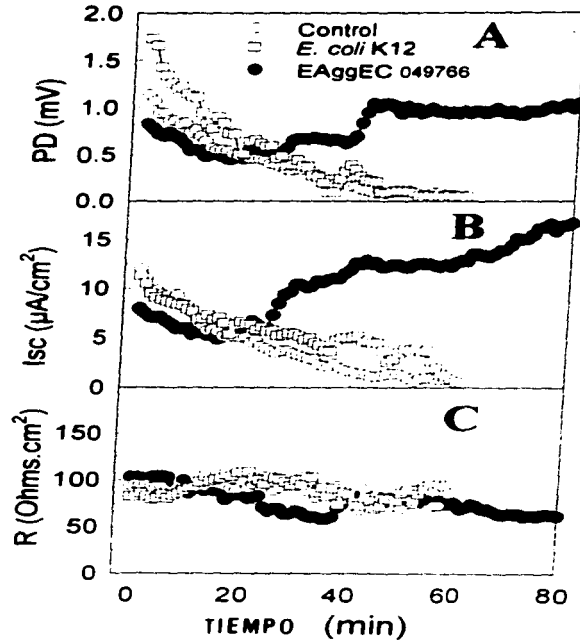


Figura 22.- Propiedades eléctrica del yeyuno de rata medidas en cámaras de Ussing, después de inocular  $25 \mu\text{g}$  de las proteínas de 116 y 108 kDa obtenidas en la fracción I en Q-Sepharose (cepa EAggEC 49766). Se observa incremento de la diferencia de potencial [PD] (A) y de la corriente de corto circuito [I<sub>sc</sub>] (B), sin alteración de la resistencia [R] (C).



**Figura 23.-** Propiedades eléctrica del yeyuno de rata medidas en cámaras de Ussing, después de inocular 25 µg de proteínas de 116 y 108 kDa de la cepa EAggEC 49766, y del precipitado total de la cepa K12. Para la cepa 49766 se observa incremento de la diferencia de potencial [PD] (A) y de la corriente de corto circuito [Isc] (B), sin alteración de la resistencia [R] (C), mientras que para la cepa K12 los valores de PD y Isc se inhiben (A y B)

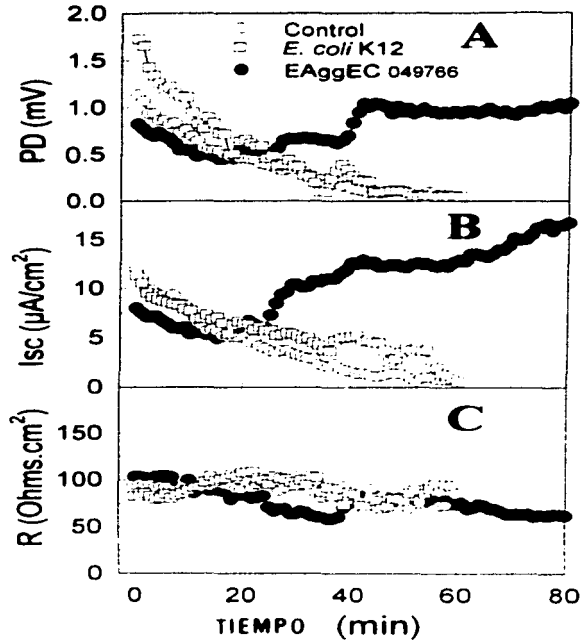
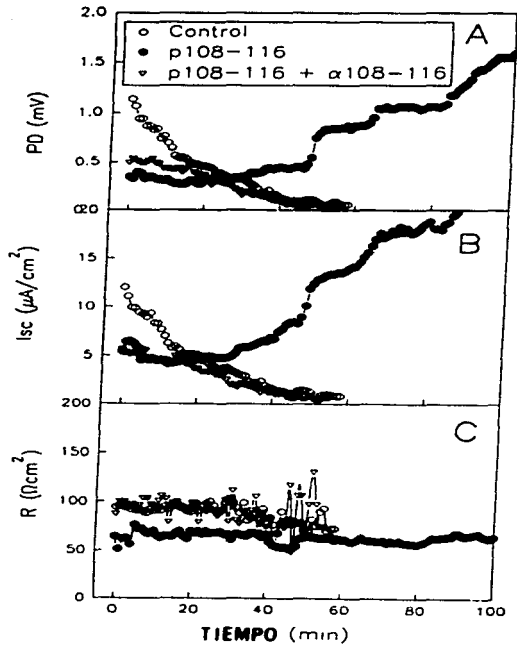
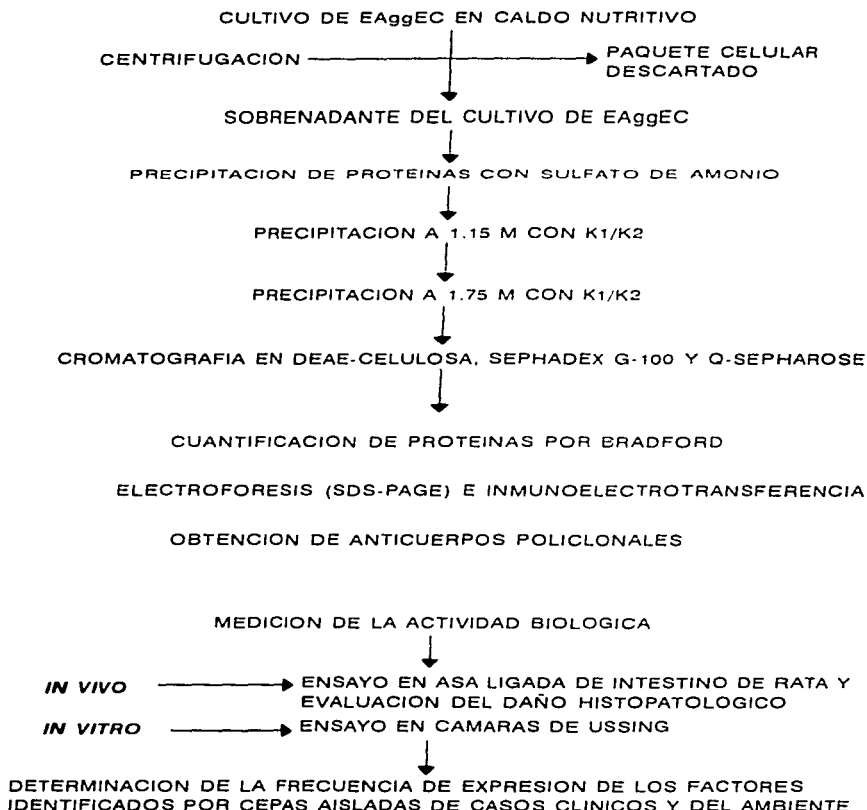


Figura 23.- Propiedades eléctrica del yeyuno de rata medidas en cámaras de Ussing, después de inocular  $25 \mu\text{g}$  de proteínas de 116 y 108 kDa de la cepa EAggEC 49766, y del precipitado total de la cepa K12. Para la cepa 49766 se observa incremento de la diferencia de potencial (PD) (A) y de la corriente de corto circuito [Isc] (B), sin alteración de la resistencia [R] (C), mientras que para la cepa K12 los valores de PD y Isc se inhiben (A y B)



**Figura 24.-** Propiedades eléctrica del yeyuno de rata medida en cámaras de Ussing, que muestra la respuesta neutralizante de anticuerpos obtenidos contra las fracciones proteicas de 116 y 108 kDa. Los anticuerpos inhiben el incremento de la diferencia de potencial (PD) (A) y de la corriente de corto circuito (Isc) (B), inducido por las proteínas de 116-108 kDa. La resistencia eléctrica [R] permaneció constante (C).

# METODOLOGIA



**Diagrama 1.- Estrategias utilizadas para la obtención, purificación, ensayo de la actividad biológica y frecuencia de expresión de las proteínas identificadas como factores de virulencia de cepas EAggEC.**

## OBTENCION DE PROTEINAS TOTALES A PARTIR DE LOS SOBRENADANTES DE LOS CULTIVOS DE CEPAS EAggEC

PREINOCULO DE EAggEC EN CALDO NUTRITIVO A 37°C POR 4 HRS  
EN AGITACION CONTINUA A 150 RPM

CULTIVO EN CALDO NUTRITIVO A 37°C POR 18 HORAS  
EN AGITACION CONTINUA A 150 RPM

CENTRIFUGACION A 12,000 g X 30 MIN A 4°C

PAQUETE CELULAR  
DESCARTADO

PROTEINAS DE SOBRENADANTE DEL CULTIVO PRECIPITADAS CON  
SULFATO DE AMONIO AL 75% DE SATURACION X 18 HRS A 4°C

CENTRIFUGACION A 13,000 g x 30 MIN A 4°C

SOBRENADANTE  
DESCARTADO

PRECIPITADO RESUSPENDIDO Y DIALIZADO CONTRA  
AMORTIGUADOR DE FOSFATOS DE SODIO 0.07M pH 8.0

**Diagrama 2.- Proceso de obtención de proteínas totales secretadas por cepas EAggEC. Las proteínas son obtenidas mediante la precipitación con sulfato de amonio.**