



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

**PARTICIPACIÓN DE CS21 DE ESCHERICHIA COLI ENTEROTOXIGÉNICA  
FMU073332 EN LA COLONIZACIÓN IN VIVO E IN VITRO**

**TESIS**  
**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**  
**DOCTOR EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**  
**GERARDO ERBEY RODEA MONTEALEGRE**

**ASESORES DE TESIS**  
**DR. CARLOS ALBERTO ESLAVA CAMPOS**  
**FACULTAD DE MEDICINA**

**ESTA TESIS SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DEL DR. JUAN  
XICOHTENCATL CORTES BAJO SU SUPERVISIÓN**

**MÉXICO, JULIO DE 2019**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **LUGAR DE REALIZACIÓN.**

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Investigación en Bacteriología Intestinal del Hospital infantil de México “Federico Gómez”.

## **FINANCIAMIENTOS Y APOYOS ECONÓMICOS.**

Para la realización del trabajo se utilizó el apoyo financiero de fondos federales proyectos HIM/2015/034 y HIM/2016/028.

Agradecimiento especial al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada con número de becario 272718 para la realización del proyecto.

Agradecimiento al programa de doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM.

Agradecimiento a la unidad de posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM.

Agradecimiento al Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM.

## Contenido

ABREVIATURAS .....	VI
Resumen .....	9
Abstract .....	10
Introducción General.....	11
Características microbiológicas generales de <i>Escherichia coli</i> .....	12
Diversidad de <i>Escherichia coli</i> .....	13
Grupos patógenos de <i>Escherichia coli</i> .....	14
<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica (ETEC).....	15
Factores de Virulencia de <i>Escherichia coli</i> enterotoxigenica (ETEC) .....	17
Enterotoxinas de <i>Escherichia coli</i> .....	17
Adherencia y colonización de ETEC.....	19
Clasificación de los CFA.....	20
Prevalencia de los CFA de ETEC .....	20
CS21 de ETEC .....	22
Planteamiento del problema .....	24
Justificación.....	25
Hipótesis .....	26
Objetivo General.....	26
Objetivos Particulares .....	26
Capítulo I .....	27
Antecedentes.....	27
ETEC CS21 positivos y multirresistentes aislados de niños con diarrea, están asociados con auto agregación y adherencia.....	28
<i>Introducción</i> .....	28
<i>Objetivo</i> .....	29
<i>Resultados</i> .....	29
<i>Discusión</i> .....	30
<i>Conclusión</i> .....	32
Efectos de la mutación de <i>Ing</i> en la expresión de LngA, procesamiento y ensamblaje de CS21 en la cepa E9034A de <i>Escherichia coli</i> Enterotoxigénica. 33	
<i>Introducción</i> . .....	33
<i>Objetivo</i> .....	35
<i>Resultados</i> .....	35

<i>Discusión</i> .....	36
<i>Conclusión</i> .....	39
<b>Secuencia Genómica de la cepa FMU073332 de <i>Escherichia coli</i></b>	
<b>Enterotoxigénica</b> .....	39
<i>Introducción</i> .....	39
<i>Objetivo</i> .....	40
<i>Discusión</i> .....	41
<i>Conclusión</i> .....	42
<b>Capítulo II</b> .....	43
<b>Estudio <i>in vivo</i> de la función biológica de CS21</b> .....	43
<b>Procedimientos Experimentales</b> .....	45
<b>Cepas bacterianas, plásmidos y cultivo de tejido</b> .....	45
<b>Tabla 1. Material biológico utilizado</b> .....	46
<b>Tabla 2. Plásmidos utilizados y/o generados en este estudio</b> .....	47
<b>Transformación y purificación de ácidos nucleicos</b> .....	47
<b>Construcción del vector pRMK</b> .....	48
<b>Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en este estudio</b> .....	49
<b>Mutación de IngR y aislamiento del operon Ing</b> .....	49
<b>Ensayos de adherencia</b> .....	50
<b>Visualización de la emisión de la bioluminiscencia</b> .....	50
<b>Ensayos de colonización IN VIVO</b> .....	51
<b>Ensayos de bioluminiscencia in vitro, in vivo y ex vivo</b> .....	51
<b>Resultados</b> .....	52
<b>Selección de cepas clínicas de ETEC</b> .....	52
<b>Construcción de vector para ensayos de bioluminiscencia</b> .....	53
<b>Figura 1. Esquema de la construcción del vector pRMK</b> .....	53
<b>Figura 2. Imagen del corrimiento electroforético del amplicón de 400 pb (región promotora de <i>dnak</i>)</b> .....	54
<b>Figura 3. Imagen del corrimiento electroforético de los fragmentos con los que se realizó la fusión transcripcional.</b> .....	55
<b>Figura 4. Imagen del corrimiento electroforético de los fragmentos con los que se realizó la clonación del promotor de <i>dnak</i> y <i>luc</i> en el vector pBR322.</b> .....	56
<b>Figura 5. Imagen del corrimiento electroforético del vector pRMK.</b> .....	57

El vector pRMK confiere el fenotipo bioluminiscente a <i>E. coli</i> .....	58
.....	58
Figura 6. Selección de transformantes con fenotipo bioluminiscente. ....	58
Figura 7. El vector pRMK confiere el fenotipo bioluminiscente a <i>E. coli</i> K-12 en medio sólido. ....	59
Figura 8. El vector pRMK confiere el fenotipo bioluminiscente a <i>E. coli</i> K-12 en medio líquido .....	60
Duración de la bioluminiscencia.....	61
Figura 9. La emisión de bioluminiscencia se genera desde las primeras etapas del crecimiento bacteriano. ....	61
Figura 10. La emisión de bioluminiscencia es detectable durante varias horas.....	62
Amplificación del operón <i>Ing</i> .....	62
Figura 11. Imagen del corrimiento electroforético del amplicón <i>Ing</i> de 13 kb. ....	63
ETEC FMU073332 presenta niveles de adherencia elevado .....	64
Figura 12. ETEC FMU073332 presenta mayor nivel de adherencia en comparación con <i>E. coli</i> K-12.....	64
Figura 12. ETEC FMU073332 presenta mayor nivel de adherencia en comparación con <i>E. coli</i> K-12.....	64
Infección in vivo de ratones BALB/c con ETEC FMU073332.....	65
Figura 13. <i>E. coli</i> K-12 pRMK emite señal bioluminiscente detectable <i>in vivo</i> . ....	66
Figura 14. ETEC FMU073332 tarda más tiempo en ser eliminada de tracto gastrointestinal de roedor en comparación con <i>E. coli</i> K-12.. ....	67
ETEC FMU073332 se adhiere por más tiempo al tracto gastrointestinal que <i>E. coli</i> K-12.....	67
Figura 15. Seguimiento <i>in vivo</i> de la señal bioluminiscente de <i>E. coli</i> K-12 pRMK durante el paso en el tracto gastro intestinal del ratón. ....	68
Seguimiento de la infección en tejidos de ratones BALB/c con bioluminiscencia .....	68
Figura 16. Seguimiento <i>ex vivo</i> de la señal bioluminiscente de <i>E. coli</i> K-12 pRMK durante el paso en el tracto gastro intestinal del ratón. ....	69
El tiempo de eliminación de <i>E. coli</i> K-12 se retrasa cuando la cepa codifica CS21 .....	69

**Figura 17. *E. coli* K-12 pEcoFMU073332b *IngR::Km* tarda más tiempo en ser eliminada de tracto gastrointestinal del roedor en comparación con *E. coli* K-12. S..... 70**

**Discusión ..... 71**

**Conclusión ..... 80**

**Bibliografía..... 81**

## ABREVIATURAS

<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>ETEC</b>	<i>Escherichia coli</i> entero toxigénica
<b>CS21</b>	Antígeno de superficie de <i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica, <i>sinónimo: longus</i>
<b>ETEC FMU073332</b>	Cepa clínica de la colección del Laboratorio de patogenicidad UNAM
<b><i>Km::IngR</i></b>	Interrupción de <i>IngR</i> por el gen de resistencia al antibiótico kanamicina
<b>BALB/c</b>	Cepa de ratones albinos consanguínea
<b>pRMK</b>	Región promotora de <i>dnak</i> clonada en vector pBR322
<b>pRMK/luc</b>	Fusión del promotor de <i>dnak</i> y <i>luc</i> en el vector pBR322
<b>pEcoFMU073332b</b>	Megaplásmido de 47,563 pb de ETEC FMU073332
<b>CF's</b>	Factores de colonización
<b>TGI</b>	Tracto Gastro Intestinal
<b>EPEC</b>	<i>Escherichia coli</i> entero patogénica
<b>EHEC</b>	<i>Escherichia coli</i> entero hemorrágica



<b>DAEC</b>	<i>Escherichia coli</i> difuso adherente
<b>EIEC</b>	<i>Escherichia coli</i> entero invasiva
<b>EAEC</b>	<i>Escherichia coli</i> entero agregativa
<b>TE</b>	Enterotoxina termo-estable
<b>TL</b>	Enterotoxina termo-sensible
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>CFA´s</b>	Factores de colonización antigénicos
<b>CS´s</b>	Antígenos de superficie de coli
<b>PCF´s</b>	Factores de colonización putativos
<b>°C</b>	Grados centígrados
<b>µm</b>	Micrómetro
<b>µl</b>	Microlitro
<b>ORF</b>	Marco de lectura abierto
<b>Kb</b>	Kilobases
<b>Pb</b>	Par de bases
<b>LB</b>	Luria Bertani
<b>PPLO</b>	Pleuro pneumonia like organism (Por sus siglas en ingles)

<b>v/v</b>	Volumen/Volumen
<b>Rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>HT-29</b>	Células de adenocarcinoma colon grado II humanas
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Por sus siglas en ingles)
<b>UFC</b>	Unidades formadoras de colonias
<b>UI</b>	Unidades internacionales
<b>Abs</b>	Absorbancia
<b>URL</b>	Unidades relativas de luz

## Resumen

**Introducción:** La diarrea sigue siendo un problema de salud pública en los países en desarrollo. *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) es un importante agente etiológico de la diarrea en niños menores de cinco años y de la diarrea del viajero en adultos principalmente en países en desarrollo. La adherencia y colonización del tracto intestinal es primordial en la patogénesis de la diarrea asociada con ETEC y de manera consecuente, el principal blanco para implementar sistemas para su prevención. Los factores de colonización, como CS21, son estructuras que permiten la adhesión bacteriana. Algunas de estas estructuras han sido ampliamente estudiadas; sin embargo, la participación de CS21 en la colonización de ETEC *in vivo* es desconocida.

**Objetivo:** Evaluar la participación de la fimbria CS21 en la adherencia y colonización de ETEC *in vivo*.

**Metodología:** El promotor del gen *dnak* se fusionó con el gen de la luciferasa *luc* y se obtuvo el vector pRMK. pRMK se movilizó en cepas de *E. coli* K-12 y ETEC FMU073332 aislada de un caso clínico. Se aisló pEcoFMU073332b *IngR :: km* y se introdujo la cepa *E. coli* K-12. Para evaluar su eficiencia, se cuantificó la duración e intensidad de las emisiones lumínicas en las cepas seleccionadas. Para el modelo animal se utilizaron ratones BALB/c tratados con estreptomicina que se infectaron por vía gástrica, la eliminación de las bacterias se siguió por cinco días al evaluar la emisión de luz de los ratones infectados.

**Resultados:** Se observó que *E. coli* K-12 pRMK emitió bioluminiscencia mientras que la cepa de *E. coli* K-12 sin el vector pRMK no emitió imagen luminosa. La emisión de luz se cuantificó a través del tiempo, al respecto se observó la emisión de luz desde el tiempo 0 hasta las 12 h. Los ratones BALB/c tratados con estreptomicina se inocularon gástricamente con ETEC FMU073332 pRMK o cepas de *E. coli* K-12 pRMK (control), El paso y eliminación de bacterias a través del tracto gastrointestinal se definió por la cuenta de UFC (Unidades Formadoras de Colonias) en las heces de los ratones. La permanencia de ETEC FMU073332 pRMKluc en el intestino de los ratones medida por el tiempo de eliminación, duró más tiempo que lo observado en la cepa de *E. coli* K-12 control. El mismo ensayo con la cepa *E. coli* K-12 pEcoFMU073332b *IngR :: km* mostró retardo de 12 h en la salida de la bacteria comparado con lo observado en ETEC FMU073332 pRMK. Al evaluar la señal bioluminiscente de ETEC FMU073332 pRMK se observó emisión de luz desde el inicio al tiempo de inoculación y se mantuvo hasta 5 días después. Al observar imágenes *ex vivo* se identificó en el íleon la señal bioluminiscente emitida por ETEC FMU073332.

**Conclusión:** Con el vector pRMK se pudo realizar el rastreo por señal bioluminiscente de diferentes cepas de *E. coli* en su paso a través del tejido animal. ETEC FMU073332 pRMK mostró un paso más lento a través del tracto intestinal, lo que permite suponer que coloniza más eficazmente que las cepas de *E. coli* no patógena. El estudio confirma que CS21 es responsable en gran medida de las propiedades adhesivas mostradas por *E. coli* no patogénica y a su vez muestra los primeros estudios *in vivo* referentes a la colonización del intestino de ratones por cepas ETEC.

## Abstract

**Introduction:** Diarrhea remains as a public health problem in developing countries. Enterotoxigenic *Escherichia coli* is an important etiologic agent of children diarrhea under five years of age and traveler's diarrhea in adults worldwide. Intestinal tract colonization might be considered the most important step in ETEC pathogenesis and a potential point for prevention. Colonization factors, like CS21, are structures that enable bacterial adhesion. Some of these structures have been largely studied; however, CS21 participation in ETEC colonization *in vivo* is unknown.

**Objective:** to study the biologic activity of CS21 putative colonization factor of ETEC under *in vivo* conditions.

**Methodology:** The housekeeping *dnak* promoter was fused with luciferase *luc* and obtained the pRMK vector. pRMK was mobilized into nonpathogenic *E. coli* and ETEC strains. The pEcoFMU073332b *IngR :: km* plasmid was isolated and was introduced into the *E. coli* K-12 strain. Light emission durability and intensity by strains was quantified. BALB/c mice were intra gastrically infected and bacterial shedding monitored up to five days. Light emission from infected mice with *E. coli* strains was captured. Intestines were removed from esophagus to rectum and were placed in a dark chamber to capture light emission.

**Results:** *E. coli* K-12 pRMK was bioluminescent; in contrast *E. coli* K-12 control strain did not emit intrinsic bioluminescence. Highest light emission was measured at 1.9 absorbance (9 h) of bacterial growth. Light emission was quantified through time; light was emitted from time 0 up to 12 h. Streptomycin treated BALB/c mice were gastrically inoculated with ETEC FMU073332 pRMK or *E. coli* K-12 pRMK (control) strains, bacterial passage was determined by bacterial shedding in mice feces. ETEC FMU073332 pRMK/*luc* shedding started and stopped after control strain, indicating that mice intestine passage by ETEC FMU073332 pRMK lasted longer than control. *E. coli* K-12 pEcoFMU073332b *IngR::km* phenotype was affected, shedding of this bacterium was displaced in time, 12 h in the initiation of its shedding and 24 h when shedding stop. Bioluminescent signal of ETEC FMU073332 pRMK was captured from inoculation time to 5 day after inoculation. *Ex vivo* imaging allowed to locate the bioluminescent signal emitted by ETEC FMU073332 at the mouse ileum.

**Conclusion:** The pRMK fully allows *E. coli* tracking by bioluminescent signal through animal tissue. ETEC showed delayed passage through mice intestinal tract. It is assumed that ETEC transiently colonized more efficiently mice intestinal tract than non-pathogenic *E. coli*. CS21 is responsible for the adhesive properties displayed by *E. coli* K-12. Here we report the first insight of ETEC colonization through mice intestine and ETEC *in vivo* tracking.

## Introducción General

“Todos los problemas prácticos relacionados con las enfermedades infecciosas serán resueltas para el final de la segunda guerra mundial” -Sir McFarland Burnett.

Las medidas de control y prevención habían reducido la incidencia de muchas enfermedades infecciosas, y en conjunto con la identificación de nuevos antibióticos se logró el manejo de nuevos problemas, lo antes declarado por Sir McFarland Burnett parecía una realidad (*Brachman, 2003*).

### ***Escherichia coli***

Theodor Escherich fue quién identificó y describió en 1885 una bacteria a la que inicialmente se llamó *Bacterium coli commune* var neopolitanum. Debido a que la aisló de las heces de niños con diarrea, propuso la participación de este microorganismo como agente causal del padecimiento. Sin embargo, debido a que la bacteria también era aislada de niños sanos, se descartó su participación en la patogénesis del padecimiento (*Escherich, 1885*). Tuvo que transcurrir más de medio siglo, para que en 1940 la bacteria fuera reconocida como patógeno intestinal, lo anterior surge cuando Bray (1945) genera la hipótesis de la existencia de subtipos de *E. coli* que podrían explicar la diarrea infantil de etiología desconocida. En México en el mismo lapso de tiempo (1945), Varela inició la búsqueda sistemática de estas bacterias en niños con diarrea, fue así que en 1946 identificó un microorganismo aislado de un niño que murió de diarrea en el hospital Infantil de México. A la cepa descrita por Varela, Aguirre y Carrillo se le nombró *Escherichia coli-gomez*, más tarde en 1952 Olarte y Varela encontraron que *E. coli*

0111:B4, *E. coli neapolitanum* y *E. coli-gomez*, eran idénticos (Olarde, 1959). Fue Neter quién utilizando un esquema de tipificación con sueros para identificar antígenos de la bacteria (O:H) propuesto por Kauffmann, probó la hipótesis de Bray. Este autor reportó que ciertas serovariedades de *E. coli* presentaban asociación con diarrea en niños (Neter, 1955), el papel de *E. coli* en la etiología de las diarreas fue confirmado por Levin y cols al desafiar voluntarios con la bacteria (Levine, 1978).

### **Características microbiológicas generales de *Escherichia coli***

*E. coli* es una bacteria Gram negativa no esporulada, anaerobio facultativo, habitante del intestino y heces de animales de sangre caliente y reptiles (Conway, 1995). Es un microorganismo relevante ya que junto con más de 500 especies bacterianas convive en simbiosis con el hospedero y constituye la microbiota intestinal del tracto digestivo (Ashida, 2011). *E. coli* se encuentra en el intestino grueso, especialmente en el ciego y el colon, reside en la capa de moco que cubre las células epiteliales del tracto intestinal lo que representa un nicho ecológico nutricional al cual la bacteria se adaptó por su alto contenido de carbohidratos, metabolito requerido para la adquisición de energía (Souza, 2001; Chang, 2004).

En el hospedero existe una gran diversidad de clonas de *E. coli*, lo anterior se debe a factores como el tamaño del cuerpo, la morfología del intestino, los hábitos alimentarios, tiempo de retención digestiva, así como el resto de microorganismos integrantes de la microbiota (Tenailon, et al.,2010). *E. coli* es

una de las primeras especies bacterianas que colonizan el intestino durante la infancia, pocas horas después del nacimiento. Las cepas iniciales pueden originarse de la biota fecal materna alcanzando una densidad mayor a  $10^9$  UFC por gramo de heces antes de la expansión de las bacterias anaerobias (Rodríguez-Angeles, 2002). Después de los dos años de edad la densidad de bacterias se estabiliza y permanece en concentraciones de aproximadamente  $10^8$  UFC, para posteriormente disminuir gradualmente. La relación entre *E. coli* y el hospedero, podría ser definida como comensalismo ya que la bacteria provee beneficios como es el interferir en la colonización por microorganismos patógenos, elaborar compuestos como vitamina K y enzimas necesarios para el buen funcionamiento del organismo (enterobactina), por su parte la bacteria recibe nutrientes importantes para su sobrevivencia (Rodríguez-Ángeles, 2002).

### **Diversidad de *Escherichia coli***

La plasticidad del genoma de *E. coli* le ha permitido evolucionar de tal forma que además de existir las variedades que viven como parte de la biota del intestino, han aparecido clonas virulentas algunas de las cuales colonizan el tracto digestivo y otras más que adquirieron la capacidad de establecerse fuera de este aparato. Las propiedades de virulencia, que ha desarrollado la bacteria, se deben a la adquisición horizontal de elementos genéticos móviles como son los plásmidos, islas de patogenicidad, y/o virus de bacterias conocidos como fagos (Tenaillon et al., 2010).

A partir de 1945 cuando Bray reporta la participación de *E. coli* en la etiología de cuadros de diarrea en niños, hecho que fue confirmado en México por un grupo de investigadores del Hospital Infantil conformado por Varela G., Aguirre A. y Carrillo J. (1946) quienes reportan una cepa designada como *Escherichia coli* Gómez, se inicia a nivel mundial una etapa de crecimiento explosivo en el estudio de la bacteria en el cual han participado un gran número de investigadores mexicanos. Como ha sido referido, con el empleo de la serología, se pudo definir que existían variedades intestinales patógenas y no patógenas de la bacteria, sin embargo, el mismo T. Escherich señaló que este microorganismo era responsable de las infecciones de vías urinarias de niños y niñas lo que vislumbró la existencia de variedades responsables de infecciones extraintestinales.

### **Grupos patógenos de *Escherichia coli***

Con el propósito de ubicar a las variedades patógenas de *E. coli* éstas se han incluido en ocho grupos patógenos o patotípos, dos que pueden colonizar estructuras fuera del intestino por lo que se han denominado *E. coli* extraintestinales (ExPEC) grupo que incluye las cepas de *E. coli* uropatógena (UPEC) y las que producen meningitis neonatal (NMEC). Con relación a las variedades que afectan el tracto digestivo, se han reportado seis diferentes que se conocen como *E. coli* productoras de diarrea (DEC por sus siglas en inglés). Las cepas DEC se clasifican de acuerdo con su mecanismo de patogenicidad y al cuadro clínico que producen integrando los patotipos: *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterotoxigenica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli*



enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) y *E. coli* de adherencia difusa (DAEC) (Kaper et al., 2004). En el año 2011 se presentó en el continente europeo, un brote de diarrea con cuadros de colitis hemorrágica y casos de Síndrome Urémico Hemolítico, asociados con una cepa con características de los grupos EAEC y EHEC. Por su comportamiento híbrido se le asignó el nombre de *E. coli* enteroagregativohemorrágica (EAHEC), sin embargo, al momento no se han reportado nuevos brotes producidos por cepas similares.

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

*E. coli* enterotoxigénica es el patotipo más aislado de las cepas de *E. coli* que producen diarrea pediátrica; ETEC causa un estimado de 1.4 millones de muertes a nivel mundial. La infección por ETEC es una causa de diarrea en niños menores de 2 años en países en vías de desarrollo (Qadri et al., 2005). Un estudio realizado por Wenneras et al. (2004), muestra que la incidencia en niños menores de 1 año es de 69 millones de episodios diarreicos por año, mientras que en niños de 1-4 años se registraron 210 millones de casos de diarrea por año (Wenneras et al., 2004). La diarrea en niños menores de 2 años se puede exacerbar o provocar malnutrición y potencialmente conducir a un reducido crecimiento físico e incluso afectar el desarrollo cognitivo (Petri et al., 2008).

En adultos mayores, ETEC es responsable del 25% de los casos de diarrea los cuales pueden experimentar deshidratación severa. La diarrea ocasionada por este patógeno se asemeja a la diarrea causada por *Vibrio cholerae*, además, afecta a los viajeros que se desplazan a países en vías de desarrollo, en los

cuales ETEC es endémica. Los casos alcanzan un pico en su incidencia en las estaciones de humedad y calor (*Niehaus et al., 2002; Nicklasson, 2012*). Las enfermedades diarreicas causadas por esta bacteria están asociadas principalmente a la ingesta de alimentos y agua contaminada con heces humanas y de animales (*Acha y Szyfres, 2001*). La dosis infectiva se ha estimado que va de  $10^6$  a  $10^{10}$  unidades formadoras de colonias (UFC) con un periodo de incubación de 14 a 50 horas (*Nieto et al., 1996*). Debido a los reservorios y el mecanismo de contagio, la infección asintomática por ETEC es común en individuos de todas las edades, lo que provee un reservorio para ciclos de infección y reinfección, lo que genera un problema de salud pública (*Qadri et al., 2005; Wenneras et al., 2004; Lozano et al., 2013*).

México posee un sistema de vigilancia epidemiológica deficiente en cuanto a agentes causales de diarrea se refiere, generando un desconocimiento de la magnitud real de esta enfermedad y de dichos agentes. La Secretaría de Salud cuenta con una clasificación denominada “Infecciones intestinales por otros organismos y las mal definidas”, la cual comprende las categorías de la ICD (*International Classification of Diseases, WHO, 2010*) A04, A08-A09 (Exceptuando A08.0), entre las cuales se encuentran agrupadas variantes patogénicas de *E. coli* como ETEC.

Las investigaciones realizadas en el presente siglo han mostrado que en México ETEC es el patotipo más común detrás de EAEC. En estudios donde no se busca la presencia del patotipo enteroagregativo, ETEC ocupa el primer lugar en incidencia (*Velázquez-Castillo, 2001; Paniagua et al., 2002*). Los estudios epidemiológicos referentes a *E. coli* causantes de diarrea en México y otros países

en desarrollo, se realizan en niños, por lo que son pocos los estudios en adultos y éstos en general se suelen enfocar a diarreas del viajero (*Navarro y Estrada-García, 2010*).

### **Factores de Virulencia de *Escherichia coli* enterotoxigenica (ETEC)**

Este patogruppo ocasiona cuadros de diarrea secretora caracterizados por abundante secreción del fluido intestinal (*Hodges y Gill, 2010*), afecta a niños menores con consecuencias fatales y a individuos que viajan de países industrializados a otros en vías de desarrollo, por lo que a este síndrome se le conoce como diarrea del viajero. La virulencia atribuida a ETEC, incluye la adherencia al epitelio intestinal por factores de colonización (CFA) y la elaboración de enterotoxinas de tipo termo lábil (TL) y termo estable (TE).

### **Enterotoxinas de *Escherichia coli***

La toxina termolábil (TL) de elevado peso molecular (85 000 a 90 000 daltones) tiene una estructura muy similar a la toxina del cólera y al igual que en ésta, el sitio primario de unión es el monosialogangliósido GM-1. Al unirse a las células de la mucosa intestinal e internalizarse induce ribosilación del ADP y estimula la producción de adenilato ciclasa e incrementa los niveles de AMPc con una cinética similar a la que induce la toxina del cólera, el evento se relaciona con la salida de  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$  y agua que persiste durante horas después de que la toxina se fijó al receptor celular. Se conocen dos variedades de la toxina TLI y TLII que

no cruzan antigénicamente, la primera es expresada por cepas de *E. coli* aisladas de animales y humanos, sin embargo, la TLII raramente se identifica en bacterias aisladas de humanos. TLI es una toxina del grupo AB compuesta por las subunidades A (dimérica) con actividad de enzima y B (pentamérica) que se une a gangliosidos GM1 (Tauschek, 2001). La toxina termoestable (TE), tiene un peso molecular bajo (2 000 daltones), presenta un principio de acción rápido y no se une a los gangliósidos de la membrana celular de la pared (Yamanaka, 1997). En su estado natural no es antigénica, actúa por estimulación de la guanilato ciclasa con la acumulación de GMPc en células de la mucosa. Los niveles intracelulares elevados de guanil ciclasa dan lugar a la secreción de cloruros por las células de las criptas de forma similar a la toxina colérica, pero la TE no altera la reabsorción de cloruro de sodio neutro por el borde en cepillo de la vellosidad intestinal. El efecto fisiológico de la TE también incluye aumento del movimiento de líquidos de la sangre hacia el intestino, lo que da como resultado una diarrea semilíquida que puede ser indistinguible de la diarrea producida por *Vibrio cholerae*. Algunas cepas de ETEC pueden presentar otros factores de virulencia como la enterotoxina termo estable EAST1 (Entero Agregative Stable Toxin) y EatA una serin proteasa autosecretada por enterobacterias (SPATE) que rompe catepsina G acelerando la salida de fluido. Otro factor de virulencia es CylA una citotoxina formadora de poro (Sjörling, 2006).

## Adherencia y colonización de ETEC

Las cepas ETEC presentan diferentes clases de fimbrias, unas denominadas fimbrias tipo 1 (F1) cuyo receptor es un manosido por lo que se conocen como manosa sensibles, éstas son similares a las que presentan otros tipos de *E. coli* no enterotoxigénicos. Otro grupo de fimbrias resistente a la manosa se encuentra presente en el 70 % de las cepas de ETEC, en las cepas de origen animal se denominan como antígenos K y se reconocen los antígenos K88 (F2), k99 (F3) K987 (F4). En humanos, los factores antigénicos de colonización (CFA por sus siglas en inglés) han sido más estudiados, de ellos se han descrito CFA/I, CFA/II, E8775 y PCFO59 (Wolf, 1998).

Las fimbrias o pilis que se asemejan a pelos o mechones son extruidas de la superficie de ETEC, están conformadas por miles de repetidos de una sola o de varias subunidades (Schilling, 2010; Girón, 1997). Se ha observado que en ausencia de estas estructuras, la actividad de las toxinas es deficiente e incluso retarda la aparición de la diarrea (Mouricout, 1990; Gomez-Duarte, 1999; Girón, 1997).

Los CFA (factores de colonización antigénicos) pueden ser pilis peritricos o polares (Girón, 1997), antígenos superficiales de coli (CS's) y factores de colonización hipotéticos (PCF's) que son menos prevalentes (Gómez-Duarte, 1999; Girón, 1997). Estas estructuras se han identificado después de crecer ETEC a 37 °C en agar CFA (Gosh, 1993) como pilis peritricos de 1-5 µm de longitud, pudiendo estar codificados en plásmidos o no (Gutiérrez-Cázares, 2000; Gómez-

*Duarte, 1999; Girón, 1997*) y pueden estar asociados con las toxinas TE o TL (*Gómez-Duarte, 1999; Giron, 1997*).

## **Clasificación de los CFA**

Los CFA se subdividen de acuerdo a sus características morfológicas, funcionales, serológicas y bioquímicas (*Gómez-Duarte, 1999; Girón, 1997; Madhavan y Sakellaris, 2015*), existen tres diferencias morfológicas principales: los que son rígidos y con forma de barra, los que tienen forma de barras flexibles y forman mechones y los que forman estructuras delgadas y flexibles en forma de cables (*Nataro, 1998*).

Se han descrito diversos tipos de antígenos fimbriales para las cepas de ETEC aisladas de humanos (*Svennerholm, 1990*). Más de 22 CFA se han reconocido en ETEC que infectan a humanos (*Pichel, 2002*), los CFA principales son proteínas fimbriales o fibrilares, aunque algunos CFA no son de estructura fimbrial (*Qadri, 2005*).

## **Prevalencia de los CFA de ETEC**

Los CFA más comunes son: CFA/I, y los antígenos de superficie de *E. coli* (CS) CS1, CS2, CS3, CS4, CS5, CS6, CS7, CS14, CS17 y CS21. La prevalencia de los CFA en ETEC varía de acuerdo con el área geográfica (*Girón, 1997; Wolf, 1998; Nishimura, 2002*). Aproximadamente el 75% de las cepas de ETEC expresan CFA/I, CFA/II o CFA/IV, sin embargo, 30-50% de las cepas de ETEC

expresan algún CFA no descrito. Esto puede estar relacionado con la ausencia quizá de CFA o nuestra incapacidad para detectar todos los tipos de CFA. Los factores de colonización K88 y K99 expresados por ETEC de origen animal son diferentes a los expresados por aislados de ETEC de humanos, lo que muestra especificidad de especie (*Qadri et al., 2005; Caron, 1989; Girón, 1995*). En estudios previos se ha demostrado que cuando se infectan animales con cepas ETEC que no expresan CS1, CS2 o ningún factor CS, raramente desarrollan diarrea (*Svennerholm, 1990*).

Los factores de colonización mejor caracterizados son los CFA/I, CFA/II, CFA/III y CFA/IV (*Svennerholm, 1990; Giron, 1997*) y los demás son considerados como factores de colonización hipotéticos (PCF's) (*Taniguchi, 2000*). Los CFA son usualmente fimbrias que median la hemaglutinación manosa-resistente (MRHA) de diferentes especies de eritrocitos. CFA/I parece ser un antígeno homogéneo y es el prototipo de la fimbria rígida en forma de barra compuesta de una sola proteína ensamblada en forma de una hélice apretada (*Nataro, 1998*), CFA/II y CFA/IV han mostrado estar compuestos de más de un componente antigénico (*Svennerholm, 1990*). CFA/II está compuesto por los antígenos asociados a la superficie (CS) CS1, CS2 y CS3 mientras que CAF/IV está compuesto por CS4, CS5 y CS6 (*Svennerholm, 1990*). Los tres componentes CS de CFA/II son inmunogénicos y despiertan diferentes respuestas inmunológicas (*Svennerholm, 1990*) y está formado por la estructura flexible CS3 o en asociación con las unidades en forma de barra CS1 y CS2 (*Nataro, 1998*).

En México la prevalencia de los CFA en las cepas de ETEC se comporta con una tendencia similar para CFA/I, CFA/II y CFA/IV (*Gutiérrez-Cázares, 2000*). En

México y en el mundo los aislados clínicos con mayor prevalencia en CFA/I se han encontrado relacionados con la toxina TE, siendo también los que más se asocian con diarrea (*Isidean et al., 2011*).

## **CS21 de ETEC**

Girón en 1995, reporta un pili en ETEC no observado previamente, inicialmente se denominó “longus” por su notable longitud característica de 20  $\mu\text{m}$  o más. CS21 presenta una estructura semiflexible y polar; una característica particular de CS21 es su localización en la célula bacteriana similar a TCP de *V. cholerae* y BFP de EPEC, a diferencia de CFA/III su homólogo más cercano que se distribuye peritricamente (*Girón, 1997; Girón, 1994*). Se estableció que el gen *IngA* codifica para la subunidad estructural mayor o pilina, el filamento de CS21 está compuesto de miles de repetidos de la subunidad LngA de 22 kDa (*Quadri, 2000; Gómez-Duarte, 1999; Girón, 1997; Girón, 1995; Pichel, 2002*). CS21 se clasifica en la familia de los pili tipo 4 b (T4Pb); por la organización de los genes relacionados con su regulación y ensamblado, además de pertenecer a un enteropatógeno Gram negativo (*Girón, 1995; Roux, 2010*). Se estima que *IngA* se encuentra en 10 a 30% de las cepas de ETEC (*Gomez-Duarte, 2007; Gómez-Duarte, 1999*). Por otro lado la presencia de CS21 se ha asociado tanto con cepas productoras de los CFA conocidos, como con cepas que no poseen estas estructuras, sugiriendo su distribución amplia en las cepas de ETEC (*Gutiérrez-Cázares, 2000; Girón, 1997; Giron, 1994*). CS21 se expresa en conjunto con diferentes CFA y se ha encontrado una máxima relación con CFA/II, seguido de



CFA/I y CFA/IV (Gómez-Duarte, 1999), sugiriendo una participación importante en la adhesión o como un CFA accesorio que contribuye a las características adhesivas de ETEC (Qadri, 2000).

Se supone que la expresión de CS21 puede estar relacionada con la expresión de TE y TL, se ha observado que CS21 y TE y CS21, TL y TE se expresan en 48% y 52% de las cepas respectivamente (Qadri, 2001; Nishimura, 2002). La alta asociación entre la toxina TE y CS21, sugiere que los genes que codifican para ambas estructuras podrían estar localizados en el mismo plásmido o que los plásmidos que codifican a ambos son compatibles y pueden coexistir en ETEC (Qadri, 2000, Gómez-Duarte, 1999, Girón, 1997, Girón, 1994). Estudios realizados en México, refieren la presencia de *IngA* en cepas de aislados clínicos, después de la evaluación de 264 aislados de *E. coli*, 31% contenían genes para las enterotoxinas TL y TE y en 36% de estas se identificó la presencia de *IngA* (Gutiérrez-Cázares, 2000).

De acuerdo con los estudios *in vitro* realizados para identificar la función de CS21, se ha observado que podría estar involucrado en la movilidad tipo twitching, lo cual podría permitir el acercamiento de ETEC a través de la mucosa intestinal a su célula blanco. Por otro lado, estudios en donde se midió la adherencia de ETEC a varias líneas celulares del tracto gastrointestinal (TGI) como las células CaCo-2, T-84, HT-29 (adenocarcinoma colorectal humano) y a líneas celulares que no pertenecen al TGI como HEp-2 (carcinoma hepatocelular humano) y HeLa (adenocarcinoma cervico uterino humano), demostraron que la cepa prototipo ETEC E9034A *IngA*<sup>+</sup> presenta mayores valores de adherencia con células intestinales que con células no intestinales bajo condiciones permisivas para la expresión de

CS21. Asimismo, se midieron los niveles de adherencia de una cepa mutante ETEC E9034A *IngA*<sup>-</sup>, se encontró que solo hubo reducción en los niveles de adherencia hacia las células del TGI. Estos resultados plantean que CS21 puede estar mediando la adherencia a células del TGI (*Mazariego-Espinoza et al., 2010*).

## **Planteamiento del problema**

Las infecciones del tracto gastrointestinal, después de las infecciones del tracto respiratorio, son la segunda causa de enfermedad en niños a nivel mundial. Debido a su impacto en la salud infantil, representa un problema de salud pública primordialmente en países en vías de desarrollo. Dentro de los agentes causales, las bacterias son de gran impacto en la etiología de las enfermedades gastrointestinales. Uno de los principales agentes etiológicos de tipo bacteriano es ETEC, sin embargo, no obstante que estas poseen una gran variedad de factores asociados a la colonización, al momento no se conoce con exactitud cómo se realiza este evento, por lo que no se han podido definir estrategias para prevenir la infección y controlar la enfermedad que produce. Ante ello resulta de interés analizar y evaluar los posibles componentes en ETEC, que contribuyen a la colonización del intestino y proponer el diseño de sistemas que controlen la colonización de la bacteria y la producción de diarrea.

## Justificación

Buscar alternativas que ayuden a la prevención y control de las infecciones intestinales y en particular las que afectan a niños pequeños, es de gran prioridad en países como el nuestro. Estudios preliminares señalan a CS21 como una estructura que se encuentra en cepas obtenidas de aislados clínicos y con una frecuencia importante relacionada con la producción de las toxinas TE y TL. Al mismo tiempo en ensayos *in vitro* se ha establecido la relación entre cepas *IngA*<sup>+</sup> y la adherencia a células en cultivo. Sin embargo, no existen estudios que demuestren la participación de CS21 en la colonización del intestino en modelos animales, ante ello la relevancia de implementar un modelo que permita evaluar la capacidad de cepas ETEC *IngA*<sup>+</sup> para colonizar el intestino y confirmar de manera contundente su participación en el proceso infeccioso. De obtenerse resultados positivos se podrán proponer estrategias para el desarrollo de vacunas que contribuyan a prevenir la colonización por ETEC causante de la enfermedad diarreica infecciosa en niños y adultos en México y en el mundo.

## Hipótesis

La fimbria CS21 es un componente de gran importancia en la adherencia y colonización de ETEC en el intestino en un modelo *in vivo*.

## Objetivo General

Evaluar la participación de la fimbria CS21 en la adherencia y colonización de ETEC *in vivo*.

## Objetivos Particulares

- 1) Realizar la fusión transcripcional de la región promotora de *dnak* con el gen que codifica para luciferasa.
- 2) Cuantificar la emisión y duración de la señal bioluminiscente generada por la fusión transcripcional *dnak-luc*.
- 3) Comparar el paso de *E. coli* K-12 no patogénica y *E. coli* K-12 pEcoFMU073332b *km::lngR* (p73332 *km::lngR*) y ETEC a través del tracto gastro intestinal de ratones BALB/c.
- 4) Seguir en tiempo real por bioluminiscencia la colonización de ETEC y *E. coli* K-12 de ratones BALB/c.
- 5) Identificar *ex vivo* la zona intestinal que coloniza ETEC y *E. coli* K-12 en ratones BALB/c.

# Capítulo I

## Antecedentes

## **ETEC CS21 positivos y multirresistentes aislados de niños con diarrea, están asociados con auto agregación y adherencia.**

### ***Introducción***

La prevalencia de los factores de virulencia de ETEC varía según el área geográfica descrita (*Von Mentzer et al., 2014*). Está reportado que CS21 es uno de los CFAs más prevalentes a nivel mundial (*Isidean et al., 2011*), en México la información respecto de la prevalencia de CS21 y su asociación con otros factores de virulencia clásicos como las toxinas TE y TL y no clásicos, es limitada (*Gutiérrez-Cázares, 2000*).

Inicialmente se consideró que las cepas ETEC habían emergido de una *E. coli* comensal que adquirió genes para expresión de las toxinas TE, TL o ambas y además de algún CFA. Esta idea propone que potencialmente cualquier *E. coli* comensal se puede convertir en patógena (*Crossman et al., 2010*). Ante ello, se planteó que las toxinas TE y TL y los CFs podrían estar codificados en los mismos plásmidos, sin embargo, un estudio realizado por *Von Mentzer et al* (2014) quienes realizaron el análisis genómico de más de 300 cepas en un lapso de más de 10 años, observaron que no todas las cepas de ETEC presentan genes que codifican para ambas toxinas y existen combinaciones específicas entre CFAs. Interesantemente algunas combinaciones de CFAs no son encontradas, permitiendo separar a las cepas de acuerdo al tipo de toxina y a la combinación de CFAs que codifican.

## **Objetivo**

Realizar la caracterización genotípica y fenotípica de una colección de cepas ETEC *IngA*<sup>+</sup> y evaluar si estos atributos están relacionados con la patogénesis.

## **Resultados**

Los genotipos más frecuentes identificados fueron: *st*<sup>+</sup>/*It*<sup>+</sup> con 30.76%; *It*<sup>+</sup> 30.36%; *st*<sup>+</sup> 11.33%; *It*<sup>+</sup>/*IngA*<sup>+</sup> 7.69% y *st*<sup>+</sup>/*It*<sup>+</sup>/*IngA*<sup>+</sup> con 5.26%. El gen *IngA* fue amplificado en un 25.10% de los aislados y fue asociado con: *It*<sup>+</sup> 33.87%, *st*<sup>+</sup>/*It*<sup>+</sup> 33.87%, *st*<sup>+</sup> 19.35%, *cfal*<sup>+</sup> 17.74%, *cs3*<sup>+</sup> 6.45%, *cs1*<sup>+</sup> 1.61%, y *cofA*<sup>+</sup> 1.61%. La asociación de *IngA* con *It*<sup>+</sup> en aislados de Bangladesh fue 36% y solo el 25% en aislados mexicanos. Los serotipos más prevalentes fueron: O128ac:H12 en 19.35%, O78:H12 y O6:H16 con 11.29%.

Una observación interesante fue que 96.77% de los aislados mostraron resistencia al menos a un antibiótico. La asociación de la multi-resistencia con algunos genotipo fue: 28.20% de *IngA*<sup>+</sup>/*st*<sup>+</sup>/*It*<sup>+</sup>; 25.64% a *IngA*<sup>+</sup>/*It*<sup>+</sup>; 15.38% a *IngA*<sup>+</sup>/*st*<sup>+</sup>; 12.82% a *IngA*<sup>+</sup>; 12.82% a *IngA*<sup>+</sup>/*It*<sup>+</sup>/*st*<sup>+</sup>/*cfal*<sup>+</sup>; y 5.12% a *IngA*<sup>+</sup>/*st*<sup>+</sup>/*cfal*<sup>+</sup>.

La auto adherencia fue visualizada en 48.38% de los aislados. De las cepas ETEC *IngA*<sup>+</sup>, 83.87% formaron biofilm. El aislado clínico ETEC FMU073332 O6:H6 *It*<sup>+</sup>, *st*<sup>+</sup>, *cs3*<sup>+</sup>, y *IngA*<sup>+</sup> fue seleccionada para estudiar la participación de CS21 en la adherencia a células HT-29. Este aislado clínico expresa *IngA* y fue clasificado como altamente adherente ( $8.48 \times 10^6$  CFU/ml).

La comparación en la reducción de los niveles de adherencia entre las cepas ETEC wild-type (E9034A y FMU73332) y sus mutantes isogénicas correspondientes (E9034A\_*IngA* and FMU73332\_*IngA*) indicaron: Una reducción del 98% con la cepa ETEC FMU73332 comparado con una reducción del 77% ETECE 9034A.

## ***Discusión***

En el estudio se demuestra que la prevalencia de *IngA* en la colección de cepas aisladas en México es del 50%, este resultado es mayor que la observada en los aislados de Bangladesh. El genotipo que fue amplificado más frecuente en los aislados analizados en este estudio fue el *st<sup>+</sup>/lt<sup>+</sup>* (30.76%), en comparación con lo previamente reportado por Guerra et al (2014). Sin embargo una revisión sistemática realizada por Isidean (2011), reporta una distribución global de *st<sup>+</sup>/lt<sup>+</sup>* de 33% en aislados clínicos de ETEC, datos similares a los encontrados en este estudio. La frecuencia del gen *IngA* entre los aislados clínicos de ETEC puede variar entre un 8.5 y un 50% en diferentes países (Girón et al., 1995; Gutierrez-Cazarez et al., 2000; Nishimura et al., 2002; Pichel et al., 2002; Guerra et al., 2014). Mientras que en este estudio el gen *IngA* fue amplificado en un 25% de los aislados, una menor asociación se encontró entre *IngA* con *st<sup>+</sup>*, *st<sup>+</sup>/lt<sup>+</sup>*, y *lt<sup>+</sup>*, esto difiere de lo encontrado por Nishimura et al (2002).

La frecuencia reportada hasta la fecha de aislados de ETEC multirresistentes es de 46.4% (Zeighami et al., 2014). En este estudio 65% de los aislados de ETEC positivos a *IngA*, fueron multirresistentes a diferentes



antibióticos. Los aislados de ETEC fueron multirresistentes y productores de la proteína LngA, lo que provee a la bacteria ventajas en su patogenia y colonización. CS21 induce la formación de microcolonias, movilidad tipo twitching, adherencia a células y autoagregación (*Clavijo et al., 2010; Mazariego-Espinosa et al., 2010*).

El 83.87% de los aislados de ETEC son formadores de biofilm a las 24 h. Liaqat and Sakellaris (2012), describieron que todos los aislados de ETEC analizados eran formadores de biofilm después de 60h (*Liaqat and Sakellaris, 2012*). La mayoría de los aislados de ETEC fueron formadores moderados de biofilm y no se encontró relación alguna con la producción de CS21.

Con los resultados se seleccionó la cepa ETEC FMU073332 (*Cravioto et al., 1990*) aislada en México de un niño con diarrea, a partir de esta se obtuvieron mutantes en el gen *IngA* y se realizaron ensayos de adherencia *in vitro* con células intestinales humanas HT-29, los resultados se compararon contra los obtenidos en una mutante en *IngA* de la cepa prototipo ETEC E9034A.

La generación de la mutante en *IngA* se realizó por recombinación homóloga, intercambiando *IngA* por el gen de resistencia a kanamicina en la cepa prototipo ETEC E9034A y en la cepa clínica ETEC FMU073332. Esta mutación en el gen que codifica para la subunidad mayor de CS21 nos permitió saber si el comportamiento es similar tras la mutación de *IngA* en cepas prototipo y aislados de la comunidad.

Se observó que algunas cepas clínicas como ETEC FMU073332 presentan valores más altos de adherencia a líneas intestinales humanas, en comparación con los valores observados para la cepa tipo ETEC E9034A y por el contrario, la

disminución de la adherencia es mayor cuando se mutó *IngA* en FMU073332. Esta discrepancia en los niveles de adherencia tras mutar *IngA* nos hace suponer que CS21 presenta diferencias estructurales, y estas diferencias pudiesen influir en diferencias en la adherencia o que existen otras estructuras presentes en algunas cepas y ausentes en otras (Rodríguez *et al*, 2017). Los resultados del trabajo muestran que en México existe alta prevalencia de *IngA* en la población de ETEC y su relación indirecta con otros factores clásicos y no clásicos, además de otros fenómenos como auto agregación, formación de bio película y resistencia a antibióticos. Esto nos permite suponer la probable participación de la fimbria CS21 en la patogenicidad de ETEC.

## **Conclusión**

1. *IngA* es uno de los genes más prevalentes en la colección de cepas estudiadas.
2. Se observó que *IngA* está asociado con CFA/I y CFA/II.
3. La mutación de *IngA* en la cepa ETEC FMU073332 genera una disminución mayor en la adherencia a células HT-29 que la mutación de *IngA* en la cepa tipo ETEC E9034A.

Los resultados previos mostraron que *IngA* es un gene que se presenta con prevalencia alta en cepas ETEC aisladas de cuadros clínicos de diarrea en países en desarrollo, además se identificó que se relaciona con la expresión de los factores de colonización CFA/I y CFA/II y que al realizar la mutación del gene

disminuye la capacidad de adherencia de la cepa ETEC FMU073332 aislada de un caso clínico de un niño mexicano.

Dado lo anterior el siguiente paso consistió en evaluar el efecto de la mutación de *IngA* sobre la expresión de la fimbria CS21.

## **Efectos de la mutación de *Ing* en la expresión de *LngA*, procesamiento y ensamblaje de CS21 en la cepa E9034A de *Escherichia coli* Enterotoxigénica**

### ***Introducción.***

La colonización del intestino por cepas ETEC esta mediada en parte por adhesinas presentes en la superficie bacteriana, este paso inicial es un punto crítico en el establecimiento de la infección y representa un blanco en la potencial intervención para prevenir infecciones. Se ha descrito para ETEC una gran variedad de CFs con características antigénicas diferentes, además de su composición, estructura y función. La mayoría de los CFs son pili (fimbrias) o estructuras fibrosas relacionadas, mientras que otras adhesinas son simplemente proteínas de membrana carentes de alguna estructura macromolecular (*Mahvadan y Sakellaris, 2015*).

Los pili tipo 4 son estructuras alargadas que sobresalen de la envoltura bacteriana hacia el espacio extracelular, que se han asociado con la capacidad de la bacteria para colonizar el epitelio intestinal. Estos apéndices están ampliamente

diseminados y se han identificado en una gran variedad de patógenos bacterianos. Los filamentos de los pili están conformados por subunidades de pilina oligomerizadas y ensambladas por una maquinaria celular que se cree evolucionó a partir del sistema de secreción tipo II. A diferencia de otras familias de fimbrias cuya función principal es la adherencia, los pili tipo 4 participan con diversas funciones en la patogenicidad bacteriana ya que contribuyen a la movilidad por el proceso tipo twitching, favorecen la agregación celular, formación de micro colonias, desarrollo de bio película y captación de ADN. Dentro de esta familia existe una subdivisión con base en las características de la pilina, por lo que se clasifican en a y b (*Roux et al., 2012*).

La fimbria CS21 pertenece a la familia de los pili tipo 4 b, 11 genes organizados en un operón participan en la expresión del pili. Dentro de este clúster de genes se encuentran genes reguladores de la expresión de la fimbria (*IngR* y *IngS*), los genes *IngA, B, C, D, E, F, G, H, I, J, P* están relacionados con la expresión, el procesamiento y ensamblaje de CS21. Lo anterior se dedujo por la homología que presenta CS21 con TCP (*Vibrio cholerae*) y BFP (*Escherichia coli enteropatógena*), así como pilis tipo 4 de otros entero patógenos. Sin embargo, CS8 de ETEC, su homólogo más cercano, presenta características diferentes como es su distribución peritrica y su longitud que es considerablemente menor, al respecto CS21 es polar y alcanza longitudes de hasta 21 micras. Hasta el momento no hay estudios sobre la función de otros genes que están en el operón *Ing* de CS21. Por tal motivo es que se decidió analizar la función de cada gen

indirectamente generando mutantes y observando el efecto que tenía cada una de estas sobre la adherencia o presencia/ausencia de CS21.

## **Objetivo**

Evaluar el efecto de la delección de seis genes *Ing* (*IngA*, *IngB*, *IngC*, *IngD*, *IngH* y *IngP*) relacionados con el ensamblaje de CS21 en la cepa E9034A.

## **Resultados**

La proteína LngA es la pilina y la subunidad mayor de CS21, presenta una homología con pilinas de otros pilis tipo IV. Su localización extracelular fue predicha y demostrada experimentalmente. La localización de LngC fue predicha en la membrana externa, como su homólogo CofC. LngD es una proteína putativa multimérica con una localización predicha membranal. LngP es homólogo a: CofJ, TcpJ y BfpP, las cuales son peptidasas de sus propias pilinas (CofA, TcpA y BfpA, respectivamente). LngH es una proteína de unión a nucleótidos con localización en la membrana interna.

La delección de los genes *IngA*, *IngB*, *IngC*, *IngD*, *IngH*, o *IngP* afecta la autoagregación, además, abole el ensamblaje de CS21 en la cepa ETEC E9034A, y la adherencia a células HT-29 se redujo en un 90%.

LngP es la prepilin peptidasa de LngA. Existen otras prepilin peptidasas que pueden procesar a LngA pero con menor eficiencia.

La proteína LngB se localiza en la punta de CS21, es la pilina menor y está encargada de iniciar el ensamblaje de CS21. Su mutación no afecta la expresión de LngA y su procesamiento, sin embargo, si afecta el ensamblaje de CS21.

## ***Discusión***

La expresión de pili tipo 4 parece tener una participación importante en patogenicidad de enterobacterias como BFP de EPEC y TCP de *V. cholerae*. Todos los pili tipo 4 reportados pertenecen a la clase b y presentan sus genes estructurados en un operón, lo anterior plantea que la procedencia de este grupo de pili ha sido por transferencia horizontal y que pueden movilizarse si se presentan las condiciones adecuadas. Aunque existe homología entre los miembros de la familia de los pili tipo 4 b, se ha identificado que presentan diferencias en cuanto a distribución, longitud y función (*Guevara et al., 2013; Roux, 2010*).

La organización genética de CS21 es casi idéntica a CS8, sin embargo, su distribución en la bacteria es diferente, ya que CS21 se encuentra ensamblado en un polo de la bacteria, CS8 se localiza rodeando la superficie de la bacteria. Con respecto a la longitud es diferente en ambas estructuras, pues mientras CS21 es flexible y puede alcanzar hasta 20 o más micras de longitud, CS8 es corto y rígido. En el caso de BFP de EPEC se ha reportado que el filamento se retrae, sin embargo, no hay datos que indiquen que CS21 se retraiga para acercarse a la célula bacteriana una vez que se ha unido a la célula eucariota (*Hwang et al., 2003*).

El presente estudio sobre la participación de los diferentes genes del operón de CS21, permitió identificar que los genes (*IngB*, *IngC*, *IngD*, *IngH*, o *IngP*) están relacionados directamente con el ensamble de la fimbria. Análisis de la localización subcelular e información experimental demuestran que LngA, BfpA y TcpA son proteínas ancladas a la membrana interna de la célula (*Taylor et al., 1987; Girón et al., 1991, 1994*).

Las prepilinas requieren ser procesadas por una prepilin peptidasa antes de su translocación y oligomerización (*Hobbs y Mattick, 1993; Strom y Lory, 1993*). Al analizar el efecto de las mutaciones en la cepa ETEC E9034A, se observó que la adherencia a células intestinales en cultivo disminuye. En el caso del gen que codifica para la peptidasa, que es la enzima que procesa la prepilina, se encontró que el procesamiento se sigue realizando después de mutar el gen *IngP*. En este estudio se demostró que *IngP* codifica para la prepilin peptidasa y en su ausencia se reduce el procesamiento de la proteína LngA. Sin embargo la delección del gen *IngP* no abole por completo el procesamiento de LngA. Esta información sugiere la presencia de otras prepilin peptidasas que son capaces de procesar la proteína LngA en la cepa E9034A. Se ha demostrado que existen más de 30 genes en *E. coli* K-12 homólogos a genes relacionados con la vía general de secreción, involucrados en la secreción del aparato del pili tipo IV, incluidos los genes que codifican para las prepilin peptidasas *gspO* y *pppA* (*Francetic y Pugsley, 1996; Francetic et al., 1998; Pugsley y Francetic, 1998*).

La mutación de *IngB* no afectó la expresión de LngA o su procesamiento, sin embargo, si abole el ensamblaje de CS21 y la sobre expresión de LngB

incrementa la longitud de CS21. Contrario a lo que describe Kolappan et al. (2015), donde muestra que la sobre expresión de LngB no afecta el ensamblaje de CS21. Adicionalmente, demuestra que es posible que LngB inicie y controle el crecimiento de CS8 (Kolappan et al., 2015). La proteína LngB es la subunidad menor de CS21, por análisis bioinformáticos mostró homología con CofB, por otro lado imágenes por microscopía electrónica sugieren que es extracelular y que se encuentra en la punta de CS21.

Se propone que LngA inmadura expresada en la mutante E9034A  $\Delta$ *IngD*, causa una inactivación alostérica de la función de LngP debido a la acumulación de LngA en el periplasma en la ausencia de LngD, que es la posible secretina de membrana externa. La presencia de LngA no procesada en la mutante en el gen *IngC* sugiere que LngC puede estar involucrada en la estabilidad de LngD o en su correcta localización. TcpQ la proteína homóloga de LngC se requiere para la estabilidad de TcpC (secretina de TCP) (Bose y Taylor, 2005).

El ensamblaje de CS21 requiere de una maquinaria delicada que participa en la regulación, procesamiento y transporte de *IngA*, y en su mayoría no puede ser sustituida por otras proteínas, salvo el caso de la peptidasa. Por otro lado, no ha sido explorada la regulación de CS21 y ni bajo qué condiciones se expresa, y tampoco si es que su regulación está asociada a la expresión de las toxinas TE y TL así como la de otros CFs.



## **Conclusión**

1. La mutación de la prepilin peptidasa de CS21 *IngP* disminuye, pero no abole el procesamiento de LngA.
2. La delección de los genes *IngA*, *IngB*, *IngC*, *IngD*, *IngH* y *IngP* provocan reducción significativa en la adherencia a células HT-29.
3. La mutación de *IngB* no afecta la expresión de LngA ni su procesamiento, sin embargo, la sobreexpresión de LngB incrementa la longitud de CS21.

Para conocer la organización del genoma de la cepa ETEC FMU073332 *Ing+* aislada de un niño mexicano con diarrea, se decidió realizar la secuencia del genoma de la misma.

## **Secuencia Genómica de la cepa FMU073332 de *Escherichia coli* Enterotoxigénica.**

### **Introducción**

El grupo ETEC se ha relacionado con cuadros de diarrea en niños y en la diarrea llamada del viajero que se presenta en adultos que viajan a países en desarrollo, en los cuales la bacteria es endémica. La patogénesis de la diarrea se debe a la capacidad de ETEC de expresar diferentes CF y enterotoxinas, por otro lado, la bacteria puede expresar una gran variedad de antígenos somáticos situación que la diversifica más. Ante ello es importante conocer la composición

del genoma de las bacterias principalmente de aquellas aisladas de casos clínicos, con los que se podrán realizar estudios filogenéticos que puedan explicar la adquisición de genes relacionados con la virulencia (*Von Mentzer et al., 2014*).

### **Objetivo**

Describir el genoma de la cepa FMU073332 de *Escherichia coli* Enterotoxigénica.

## **Discusión**

ETEC FMU073332 es una cepa aislada de una niña con diarrea que en un estudio previo (*Cravioto et al., 1990*), se identificó que presenta los genes que codifican para CS21. En esta cepa cuando se mutó el gen *IngA* que codifica para la subunidad mayor de CS21, el porcentaje de adherencia a células intestinales humanas HT-29 se redujo en mayor medida; en comparación con el porcentaje observados en la cepa prototipo ETEC E9034A también mutada en el gen *IngA*.

ETEC FMU03332 se caracteriza por presentar valores elevados de adherencia a células intestinales humanas, además de no presentar multiresistencia a antibióticos. La cepa además codifica para los factores de virulencia clásicos y no clásicos de ETEC, y presenta una variante de *IngA*. Los resultados de la secuenciación de su genoma, no dieron información referente sobre si las toxinas están codificadas en el mismo plásmido que CS21, u otros CFA.

Sin embargo, mostró características genéticas interesantes como fue el hecho de que posee genes que codifican para ST y LT, además del antígeno CS3, y otros factores de virulencia no clásicos como *etpA* y *tibA*..

## **Conclusión**

1. La cepa FMU073332 codifica para los genes clásicos de virulencia *eltA*, *eltB*, *sta2*, *cstH* y *IngA*.
2. La cepa FMU073332 codifica para los genes no clásicos de virulencia *etpA* y *etpB*.
3. La cepa alberga 4 plásmidos; pEcoFMU073332a (5,538 pb), pEcoFMU073332b (47,563 pb), pEcoFMU073332c (113, 343 pb) y pEcoFMU073332d (137, 665 pb).
4. Los genes que codifican para la toxina LT, para serina proteasa auto transportadora, la subunidad mayor de CFAlII y la toxina ST están codificados en el plásmido pEcoFMU073332d.
5. El gen que codifica para la subunidad mayor de CS21, *IngA*, se encuentra localizado en el plásmido pEcoFMU073332b.

# Capítulo II

**Estudio *in vivo* de la función biológica de CS21**

## Introducción

El tracto gastrointestinal (TGI) es el nicho de un elevado número de especies de bacterias que conforman la microbiota intestinal, esta comunidad bacteriana es benéfica, al contribuir con la biosíntesis de diferentes metabolitos. Aunque, es conocido el efecto benéfico que tienen algunos de los integrantes de la microbiota intestinal como es el caso de *Escherichia coli*, durante su proceso evolutivo esta bacteria ha sufrido cambios en su genoma, hecho que ha conducido a su diversificación y a la emergencia de clonas que han desarrollado propiedades que les permiten infectar, colonizar y causar daño al tejido del TGI (*Stetcher et al., 2010*).

El tránsito de las bacterias por el tracto gastrointestinal se ve alterado por el paso de fluidos y el movimiento peristáltico, las bacterias utilizan apéndices proteicos para poder adherirse a las superficies del TGI. Los apéndices usualmente son fimbrias que permiten a las bacterias adherirse, para posteriormente reproducirse y así colonizar la superficie del epitelio intestinal. La adhesión de una fimbria al epitelio de TGI está basada en la interacción fimbria-receptor, esta interacción permite a las bacterias reconocer un sitio específico con condiciones favorables para su establecimiento (*Ghoshal, 2012*).

Las bacterias pueden codificar en su genoma para una o varias fimbrias, la expresión de cada fimbria va a depender de las señales presentes a través del TGI. Se propone que las bacterias siguen una ruta hasta el sitio en donde se establecen para finalmente realizar sus funciones (*Edwards y Puente, 1998*).

El uso de la bioluminiscencia (BLI) se ha extendido rápidamente para el estudio de la patogénesis bacteriana, ya que facilita la visualización y permite cuantificar la interacción patógeno-hospedero en animales vivos (*Hutchens y Lurken, 2007, Rhee et al., 2011*). Con la BLI se pueden observar en tiempo real las infecciones *in vivo*, proveyendo información temporal y espacial con respecto a las bacterias marcadas y sus actividades metabólicas o patogénicas (*Jawhara y Mordon, 2004, Coombes y Robey, 2010*).

La bioluminiscencia es un proceso enzimático, en donde la enzima luciferasa produce luz visible en la presencia de un sustrato específico, oxígeno y una fuente de energía (*Wiles et al., 2009*). La luciferasa ha sido extensamente utilizada para monitorear la infección de ratones vivos por diversos patógenos (*Contag et al., 2012, Kuklin et al., 2003, Gonzalez et al., 2012, Torres et al., 2012*).

## **Procedimientos Experimentales**

### ***Cepas bacterianas, plásmidos y cultivo de tejido***

Las bacterias empleadas en el estudio (tabla 1) se conservaron a -70 °C en caldo Luria-Bertani (LB) (Dibico, Distrito Federal, México) y en medio de cultivo PPLO (Pleuro pneumonia like organism) (Difco, Le pont de Claix, France) con 20% de glicerol (v/v). Para recuperar a los microorganismos éstos se cultivaron en placas de Petri con medio LB agar o en LB líquido y se incubaron a 37 °C. La inducción de la expresión de CS21, se realizó en medio PPLO líquido para

posteriormente incubar a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>. En los casos en que era necesario se adicionaron antibióticos en las siguientes concentraciones; ampicilina 100 µg/ml (Sigma, Missouri, USA), Kanamicina 50 µg/ml (Amresco LLC, Ohio, USA).

Tabla 1. Material biológico utilizado

Cepa	Características	Referencia
ETEC FMU073332/ ETEC 73332	Serotipo O6:H16, clinical isolate, <i>cstH</i> <sup>+</sup> , <i>IngA</i> <sup>+</sup> , <i>eltA</i> <sup>+</sup> , <i>stA</i> <sup>+</sup>	Cravioto et al. 1990
ETEC FMU073332 $\Delta$ <i>IngR</i>	Serotipo O6:H16, clinical isolate, <i>cstH</i> <sup>+</sup> , <i>IngA</i> <sup>+</sup> , <i>eltA</i> <sup>+</sup> , <i>stA</i> <sup>+</sup> $\Delta$ <i>IngR</i>	Datos no publicados
<i>E.coli</i> K-12	<i>E. coli</i> B F <i>ompT gal dcm lon hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) [malB<sup>+</sup>]<sub>K-12</sub>(<math>\lambda</math><sup>S</sup>)</i>	Sambrook et al. 1989
<i>E.coli</i> K-12 pGEM- <i>luc</i>	<i>E. coli</i> B F <i>ompT gal dcm lon hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) [malB<sup>+</sup>]<sub>K-12</sub>(<math>\lambda</math><sup>S</sup>) <i>luc amp</i></i>	Rodea et al. 2017
<i>E. coli</i> K-12 pRMK	<i>E. coli</i> B F <i>ompT gal dcm lon hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) [malB<sup>+</sup>]<sub>K-12</sub>(<math>\lambda</math><sup>S</sup>) <i>dnak luc amp</i></i>	Rodea et al. 2017
<i>E.coli</i> K-12 <i>IngRB</i>	<i>E. coli</i> B F <i>ompT gal dcm lon hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) [malB<sup>+</sup>]<sub>K-12</sub>(<math>\lambda</math><sup>S</sup>) pJET 1.2 <i>IngS IngR IngT IngA IngB amp</i></i>	Este trabajo
<i>E.coli</i> K-12 <i>IngRH</i>	<i>E. coli</i> B F <i>ompT gal dcm lon hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) [malB<sup>+</sup>]<sub>K-12</sub>(<math>\lambda</math><sup>S</sup>) pTopoXL <i>IngS IngR IngT IngA IngB IngC IngD IngE IngF IngH km</i></i>	Este trabajo
<i>E. coli</i> K-12 pEcoFMU073332b	<i>E. coli</i> B F- <i>ompT gal dcm lon hsdSB(rB-mB-) [malB+]K-12</i> ( $\lambda$ <sup>S</sup> ) pEcoEMU073332b $\Delta$ <i>IngR km</i>	Este trabajo



Tabla 2. Plásmidos utilizados y/o generados en este estudio

Plásmido	Características	Referencia
pGEM- <i>luc</i>	<i>amp luc lac</i>	Promega®
pGEM- <i>luc-dnak</i>	<i>amp luc lac dnak</i> (promotor)	Rodea et al. 2017
pBR322	<i>amp rop TcR</i>	Bolivar, 1977
pRM <i>kluc</i>	<i>Amp, rop, dnak</i> (promotor), <i>luc</i>	Rodea et al. 2017
pEcoEMU073332b $\Delta$ <i>IngR</i>	plásmido aislado de ETEC FMU073332 $\Delta$ <i>IngR</i> ( <i>IngS</i> $\Delta$ <i>IngR</i> <i>IngT IngA IngB IngC IngD IngE IngF IngH IngI IngJ IngP</i> )	Este trabajo

### ***Transformación y purificación de ácidos nucleicos.***

La movilización del DNA en *E. coli* K-12 fue realizada por electroporación (BMC Harvard Apparatus; MA, USA) a 1800V. La reacción en cadena de la polimerasa se realizó con PCR Master Mix (Promega; WI, USA) o con Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen, California, USA) en un termociclador Verity de 96 pozos (Thermofisher Scientifics; MA, USA). La purificación de los fragmentos digeridos fue realizada con el DNA Clean & Concentrator™ (Zymo Research; CA, USA). La electroforesis de DNA fue realizada en geles de agarosa al 1% con amortiguador 1x TAE (Tris, Ácido Acético, EDTA), el DNA se tiñó con bromuro de etidio y se analizó con un BIORAD Chemi Doc® (Bio-Rad Laboratories; CA, USA).

## ***Construcción del vector pRMK***

Se amplificó una región de 400 pb río arriba del codón de inicio del gen *dnak*, con sitios de restricción inducidos BamHI y HindIII (Tabla 3). El gen reportero *luc* que codifica para la enzima luciferasa, fue obtenido del vector pGEM®-luc plasmid (Promega; WI, USA). Se realizó la digestión con las enzimas BamHI y HindIII del vector y de la región de 400 pb, posteriormente ambos fragmentos fueron ligados con la T4 Dna ligasa (ThermoFisher; MA, USA) y transformados en *E. coli* K-12. Las clonas fueron seleccionadas con 100 µg/mL de ampicilina en placas de agar, se realizó un escrutinio de las clonas en búsqueda de la región promotora de *dnak* por PCR.

Se digirió la región promotora de *dnak* ligada a *luc* con las enzimas BamHI y Sall (Promega; WI, USA), por otro lado se digirió el vector pBR322 con las mismas enzimas, ambos fragmentos fueron ligados para generar el vector pRMK. Se electroporó a *E. coli* K-12 con la ligación resultante, las clonas generadas se seleccionaron positiva y negativamente con ampicilina y tetraciclina respectivamente (100 µg/mL) y por PCR. Se utilizó Luciferina (VivoGlo™ Luciferin, in Vivo Grade) (Promega; WI, USA) como el sustrato para luciferasa y poder seleccionar a las *E. coli* K-12 recombinantes que presentaran el fenotipo bioluminiscente.

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en este estudio

Oligonucleótido	Secuencia	Producto (bp)
LngRp D LngPHisR	5'-CTTGAATTCGCTGTTGTTTCATTTATTATCCTG-3' 5'-GATGTCGACGAGCTCTATAGATATTTAAATCTCTAT-3'	Operon <i>Ing</i> 13 Kb
cs3 con D cs3 con R	5'-GGACTCATCAGCCACTTAC-3' 5'-CAATGTGACTAGCAGTGTGGC-3'	<i>cstH</i> (700 bp)
sta con D sta con R	5'-GTGGCTGCGTTACGTCATTG-3' 5'-CCTAGTCATCCTGCCATCC-3'	<i>estA</i> (150 bp)
eltab con D eltab con R	5'-GCTCAGTCATGTATCTCATTAG-3' 5'-CCATGATTCAATGTACACC-3'	<i>eltA</i> (250 bp)
IngR con D IngR con R	5'-CAAGGACAGGCAATGAACTG-3' 5'-CACACCAAATCCTCTTACC-3'	<i>IngR</i> (440 bp)
IngS con D IngS con R	5'-ATTCGCAGATTATATTTTCATACTG-3' 5'-AACAACGAAGGCATAATGCGT-3'	<i>IngS</i> (1063 bp)
IngA con D IngA con R	5'-GATGCTTATCAACGTGATGG-3' 5'-CGCCAGAAATGTTATTACGC-3'	<i>IngA</i> (671 bp)
IngR mut D IngR mut R	GCATCATAAAAAAAAAACGGATGGACAGAACATCCGTATTTTCATTTTTTAATTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC AATTCAGTATTTTCATAAAGGCGGAGGGGGTAATGTTAAACTGCCTCTTAAACATATGAATATCCTCCTTAG	<i>IngR::km</i> (1500 bp)
promdnakD promdnakR	AGGAagCTtTTAGTGGGAAGAGG GGTGGATCCCAATTATTTTACCCATC	<i>dnaK</i> región promotora (400 bp)

### ***Mutación de IngR y aislamiento del operon Ing***

Se generó una mutante del gen *IngR* de la cepa ETEC FMU073332 con el protocolo de inactivación de un paso descrito por Datsenko y Wanner en el 2000 (*Datsenko y Wanner, 2000*). El Dna genómico de ETEC FMU073332 *IngR::km* fue aislado con el Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, USA). Se electroporaron alícuotas de 5 µl (500 ng) de DNA genómico en *E. coli* K-12. Se realizó amplificación por PCR para determinar la presencia-ausencia de los genes de virulencia clásicos de las toxinas TE y TL; *estA*, *eltA*, así como de factores de virulencia no clásicos como CS3 (Tabla 3).

## ***Ensayos de adherencia***

El ensayo se modificó del procedimiento descrito por Cravioto *et al.* 1979. Las células HT-29 se cultivaron toda la noche a 37 °C en medio DMEM (Gibco) con 5% de CO<sub>2</sub> en una placa de poliestireno de 24-pozos (Corning, New York, USA). Las células HT-29 se lavaron 3 veces con PBS 1x, y se les agregó medio DMEM alta glucosa. La monocapa de células fue infectada con 10 µl (1 x10<sup>8</sup> UFC) de un cultivo de toda la noche de bacterias y posteriormente fue incubado durante 4 horas a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub>. Después de la incubación, las bacterias no adheridas fueron eliminadas con lavados de PBS 1x. Las bacterias adheridas a las células HT-29 fueron incubadas por 10 min con 1ml de 0.1% de Triton X-100 (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden), y mecánicamente removida, alícuotas de cada muestra (100 µl) fueron diluidas en 900 µl de PBS 1x estéril. Muestras de 10 µl fueron sembradas por goteo en agar LB y cultivadas toda la noche a 37 °C.

## ***Visualización de la emisión de la bioluminiscencia***

Se inoculó un matraz de vidrio de 250 mL con *E.coli* pRMK a una absorbancia final de 0.05. El matraz se incubó a 250 rpm a 37 °C, el cultivo bacteriano fue medido cada hora para determinar la absorbancia, se colocaron alícuotas en placas de 96-pozos de poliestireno. Se adicionaron 50 µL (15 µg/ µL) (Focault *et al.* 2010) de luciferina a cada pozo. La bioluminiscencia de cada pozo fue capturada con un Fusion FX (Vilber Lourmat; SU, Germany) y analizado con el software FusionCapt FX7 (Vilber Lourmat; SU, Germany).

## ***Ensayos de colonización IN VIVO***

Para eliminar la microbiota intestinal se administró 1 ml de estreptomicina (20 mg/ml) vía oral a ratones BALB/c. Los roedores tratados fueron inoculados por vía intragástrica con  $1 \times 10^8$  UFC de las cepas recombinantes o silvestres, diluidas en buffer de carbonatos [0.1 M] pH 9. La materia fecal fue recolectada y homogeneizada en PBS 1x frío, se realizaron diluciones seriadas con PBS 1x y estos fueron sembradas por goteo en agar McConkey, el análisis fue realizado con el programa GraphPad Prism utilizando la prueba t-student.

## ***Ensayos de bioluminiscencia in vitro, in vivo y ex vivo***

Para los ensayos *in vitro*, se distribuyeron 200  $\mu$ L de luciferina (15 ng/  $\mu$ L) en placas de agar LB. Las cepas bacterianas pRMK positivas fueron cultivadas con medio LB con Luciferina durante toda la noche a 37 °C. Los ensayos *in vitro* se realizaron en placas de poliestireno de 96-pozos, las cepas se crecieron durante toda la noche en medio LB a 37 °C, una alícuota de 100  $\mu$ L de cada cepa fue colocada individualmente en cada pozo con 50  $\mu$ L (15 ng/  $\mu$ L) de luciferina. Las placas de agar y las placas de poliestireno de 96-pozos fueron analizadas con la aplicación de bioluminiscencia del Fusion FX (Vilber Lourmat; SU, Germany). La emisión de las muestras fue capturada durante 2-10 minutos. El procedimiento con los animales se llevó a cabo bajo los lineamientos del comité de ética del Hospital Infantil de México “Federico Gómez”. Antes de la inoculación con bacterias, se administraron por vía intraperitoneal 200  $\mu$ L (15 ng/  $\mu$ L) de Luciferina a ratones BALB/c de 4 semanas tratados con estreptomicina como se menciona con

anterioridad. Los animales fueron anestesiados con Ketamina/acepromacina administrando una dosis de 0.3 unidades internacionales (UI) (100 mg/Kg-2.5 mg/Kg) por peso, el intestino de los roedores fue disectado completo y colocado en PBS 1x frío para lavar e inmediatamente analizado con el Fusion FX. Las figuras de los roedores, placas de Petri, y placas de poliestireno, se presentan como imágenes de pseudo colores, donde se indica intensidad de luz (siendo el rojo el color más intenso y el azul el menos intenso). La imagen de colores se sobrepuso sobre la imagen de referencia en escala de grises. La señal esta expresada en el número total de fotones emitidos por segundo (fotones/s). Las imágenes fueron capturadas y analizadas con un Fusion FX (Vilber Lourmat; SU, Germany).

## **Resultados**

### ***Selección de cepas clínicas de ETEC***

A partir de los resultados obtenidos previamente en el laboratorio de bacteriología intestinal (*Cruz-Cordoba et al., 2014*), se seleccionó la cepa ETEC FMU073332, ésta presentó altos niveles de adherencia en ensayos con células intestinales HT29 en comparación con los observados en la cepa tipo ETEC E9034A. Como ya fue referida, la mutante de FMU073332 en el gen *IngA*, mostró disminución importante de la adherencia cuando se comparó con la observada con la cepa tipo ETEC E9034A también mutada en el gen *IngA*.

## Construcción de vector para ensayos de bioluminiscencia

Los genes reporteros permiten seguir la actividad de un gen o un organismo identificando la señal generada por el gen reportero. Se construyó el vector pRMK, para poder estudiar en un roedor la infección con cepas ETEC. El vector pRMK se construyó con el gen *luc* proveniente del vector comercial, pGEM-*luc*, de la región promotora del gen *dnak* de *E. coli* y del vector pBR322 (Figura 1).

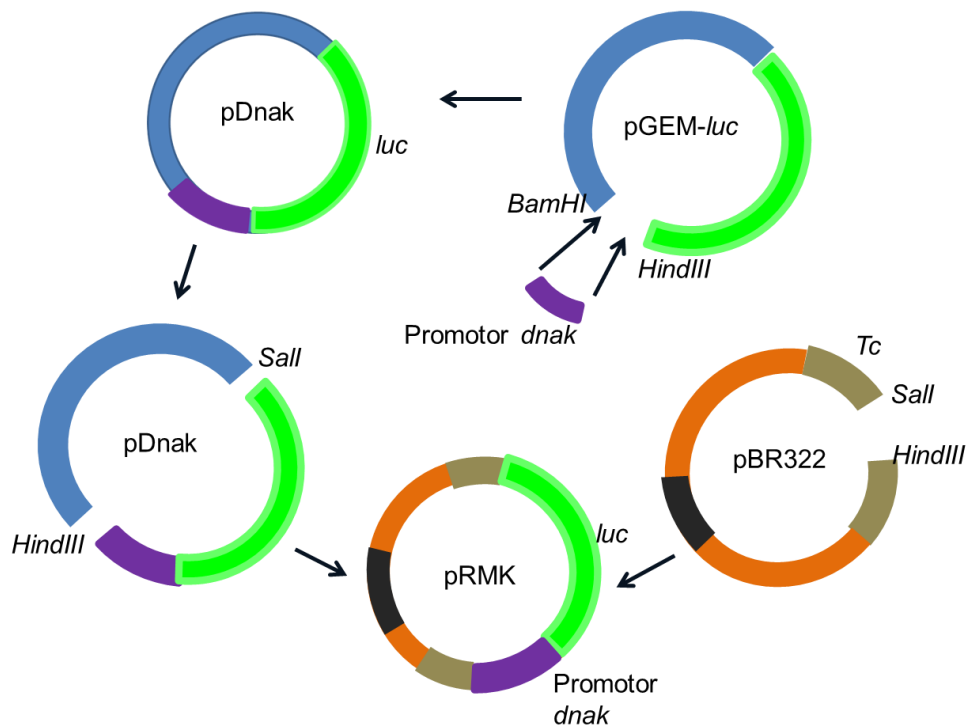


Figura 1. Esquema de la construcción del vector pRMK. Se fusionó la región promotora el gen *dnak* con el gen *luc* en el vector pGem-*luc*, se subclonó la región promotora más el gen *luc* en el vector pBR322, interrumpiendo el gen de resistencia a la tetraciclina codificada en el vector pBR322

Se amplificó la región promotora de *dnak* (Figura 2), posteriormente se digirió el producto del amplificado con las enzimas de restricción BamHI y HindIII, y se clonó en fase con el gen *luc* del vector pGEM-*luc* (Figura 3).

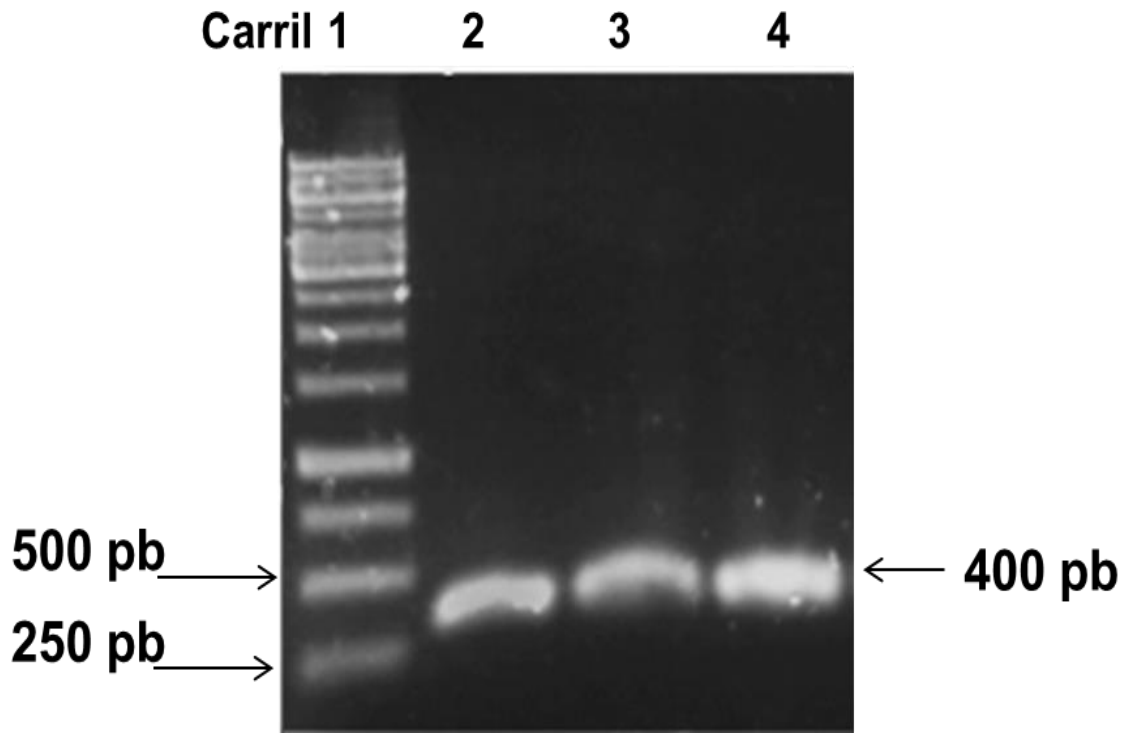


Figura 2. Imagen del corrimiento electroforético del amplicón de 400 pb (región promotora de *dnak*). Carril 1) Marcador de peso molecular. Temperaturas, Carril 2) 57.5 °C, Carril 3) 58.5 °C, Carril 4) 59.7 °C.



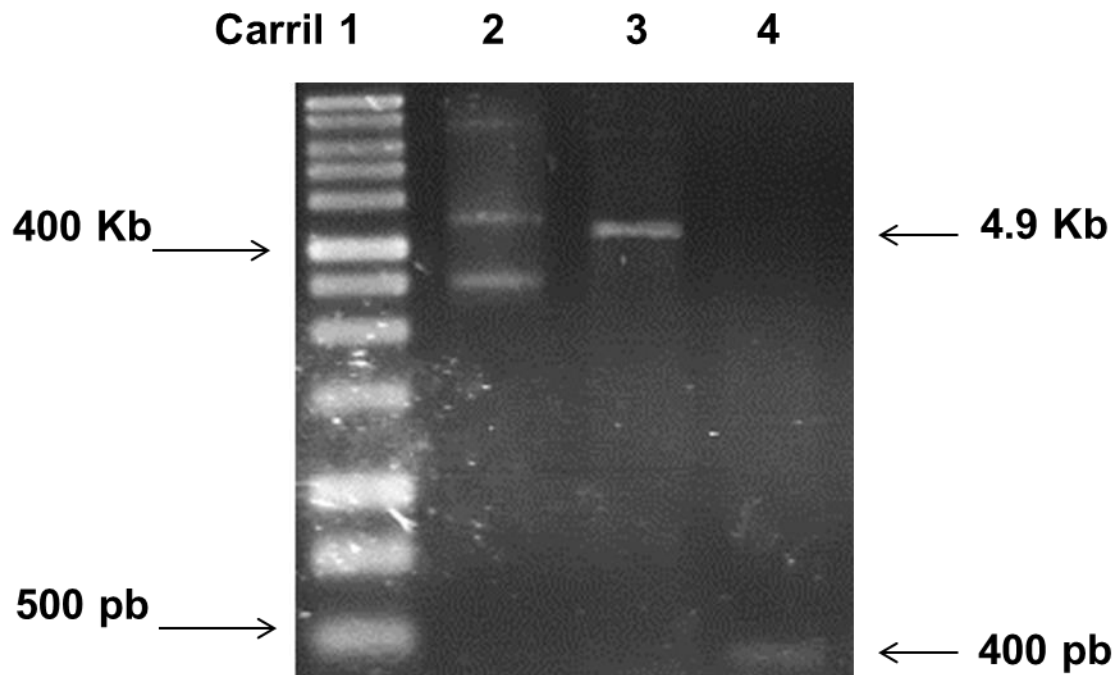


Figura 3. Imagen del corrimiento electroforético de los fragmentos con los que se realizó la fusión transcripcional. Carril 1) Marcador de peso molecular, Carril 2) Plásmido pGEM-*luc*, Carril 3) Plásmido pGEM-*luc* digerido, Carril 4) Región promotora de *dnak*.

De esta construcción se digirió el vector pGEM-*luc-dnak* con las enzimas HindIII y Sall, y se liberó el fragmento *dnak-lu*. Este fragmento se clonó en el vector pBR322 interrumpiendo el gen de resistencia a tetraciclina (Figura 4).

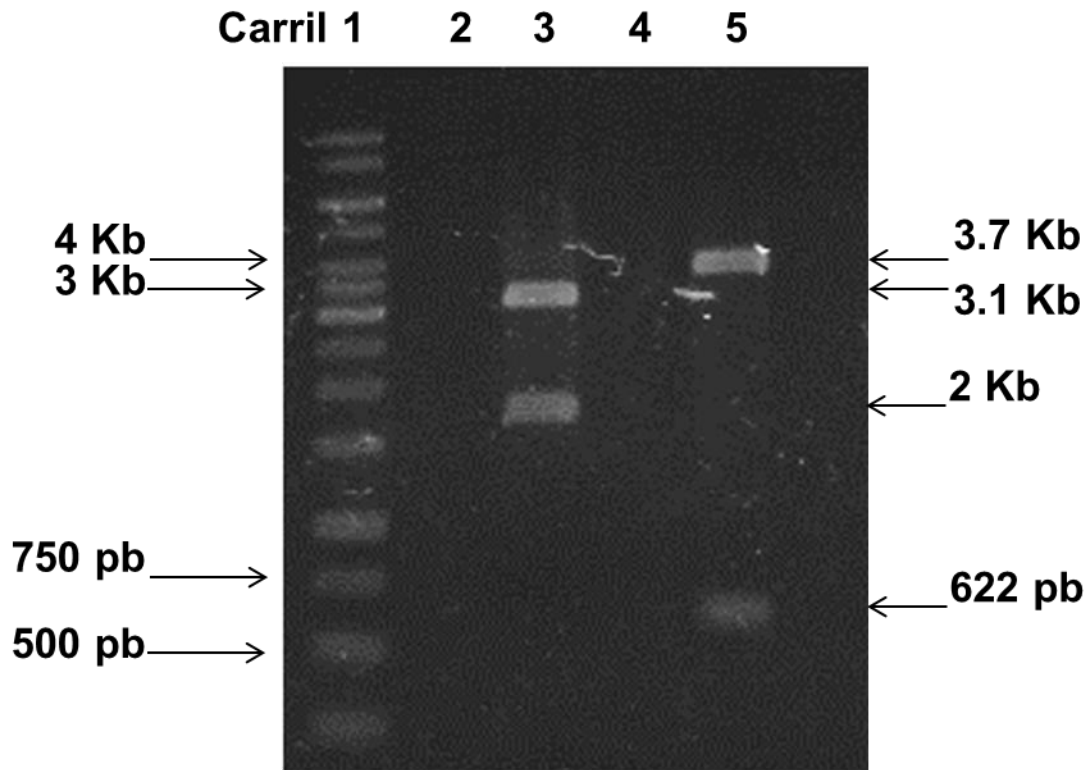


Figura 4. Imagen del corrimiento electroforético de los fragmentos con los que se realizó la clonación del promotor de *dnak* y *luc* en el vector pBR322. Carril 1) Marcador de peso molecular, Carril 2) Vacío, Carril 3) Plásmido pGEM-*dnak-luc* digerido, Carril 4) Vacío, Carril 5) Plásmido pBR322 digerido.

El vector obtenido se digirió con las enzimas HindIII, BamHI y Sall para liberar los tres fragmentos clonados y comprobar que el promotor de *dnak* es clonado en fase con *luc* (Figura 5).

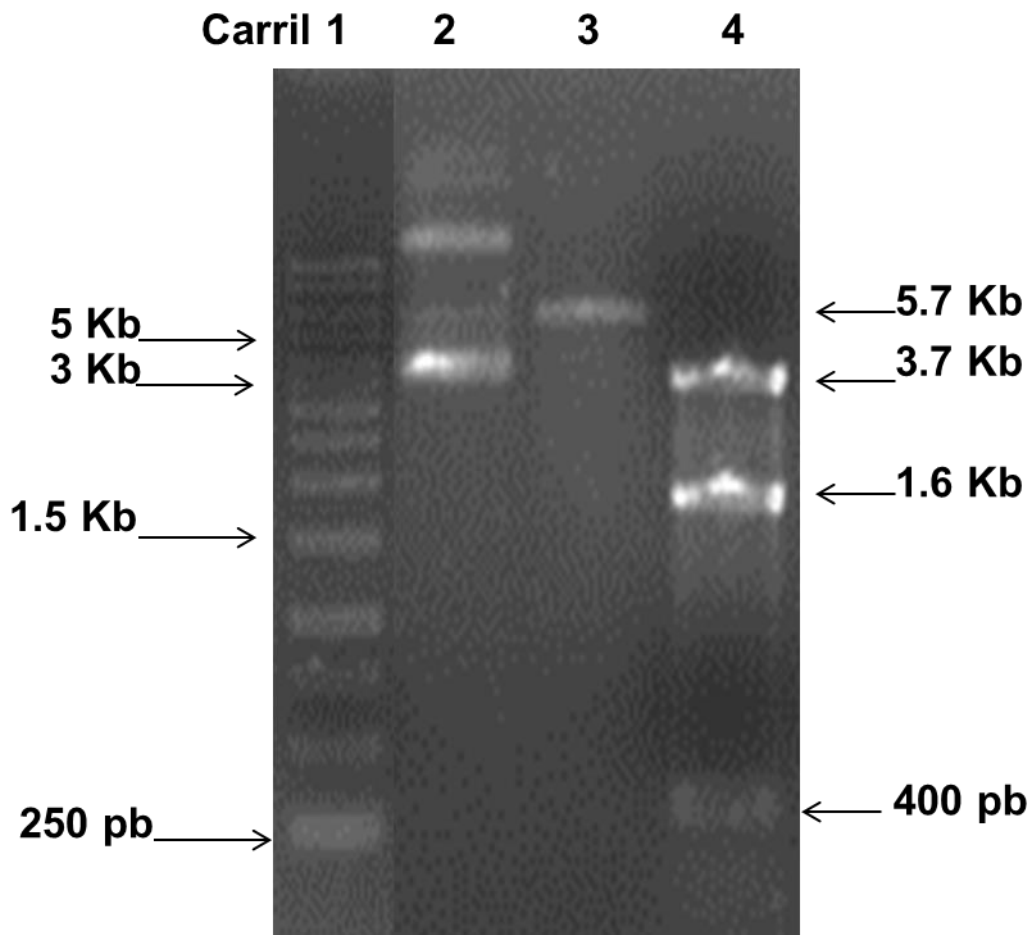


Figura 5. Imagen del corrimiento electroforético del vector pRMK. Carril 1) Marcador de peso molecular, Carril 2) Vector pRMK sin digerir, Carril 3) Vector pRMK digerido con HindIII, Carril 4) Vector pRMK digerido con Hind III, BamHI y Sall.

***El vector pRMK confiere el fenotipo bioluminiscente a E. coli.***

Las cepas *E. coli* K-12 electroporadas con el vector pRMK fueron seleccionadas gracias al fenotipo bioluminiscente que confiere el gen de la luciferasa; *luc* (Figura 6).

***E. coli* K-12 pRMK**

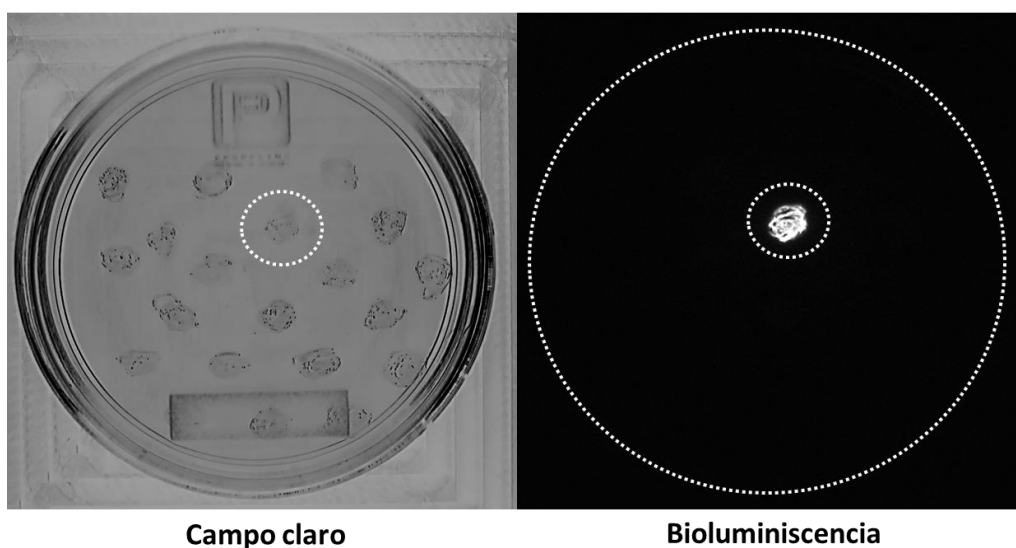


Figura 6. Selección de transformantes con fenotipo bioluminiscente. Imagen de la placa de Petri en donde se cultivaron las transformantes de *E. coli* K-12 electroporadas con el vector pRMK. Campo claro. Imagen tomada con luz visible (invertida). Bioluminiscencia. Imagen tomada en oscuridad para detectar la señal de luz emitida por la bacteria bioluminiscente.

La cepa *E. coli* K-12 no presenta un fenotipo bioluminiscente intrínseco (Figura 7), sin embargo, cuando se transforma con el vector pRMK las colonias cultivadas de *E. coli* K-12 presentan el fenotipo de bioluminiscencia.

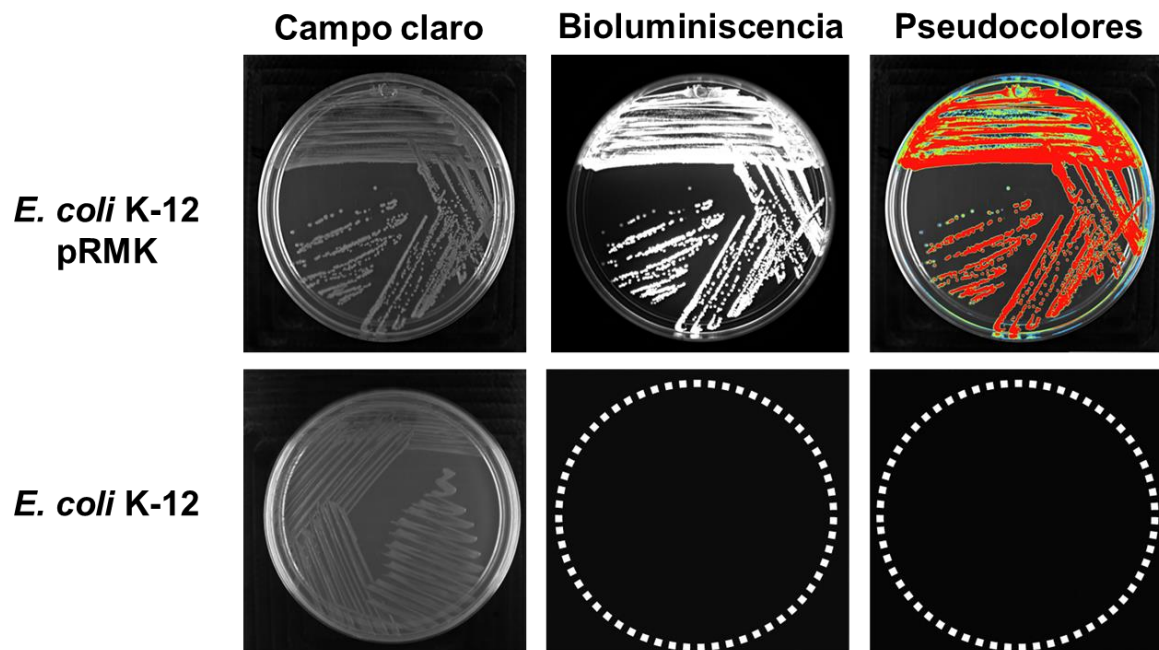


Figura 7. El vector pRMK confiere el fenotipo bioluminiscente a *E. coli* K-12 en medio sólido. Imágenes de la placa de Petri en donde se cultivó *E. coli* pRMK y *E. coli* K-12. Campo claro, imagen tomada con luz visible. Bioluminiscencia, imagen tomada en oscuridad para detectar la señal de luz emitida por la bacteria bioluminiscente. Pseudocolores, interpretación de la intensidad de la luz (rojo=más intenso, azul=menos intenso).

De la misma manera se demuestra que el fenotipo de bioluminiscencia no se presenta exclusivamente cuando *E. coli* K-12 pRMK es cultivada en agar sólido, sino que también se puede observar bioluminiscencia de la cepa cuando es cultivada en medio líquido (Figura 8).

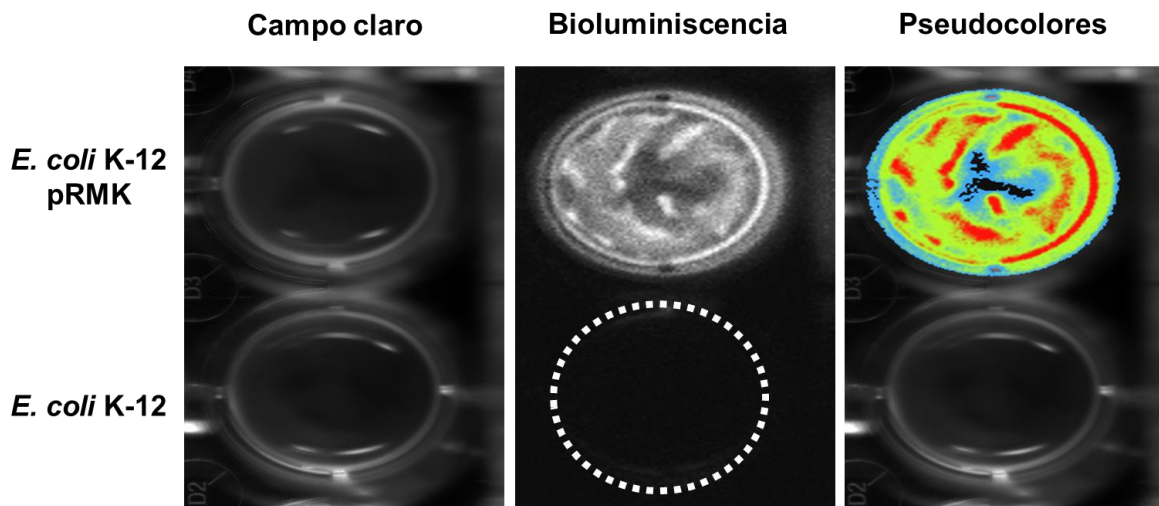


Figura 8. El vector pRMK confiere el fenotipo bioluminiscente a *E. coli* K-12 en medio líquido. Imágenes de la placa de Petri en donde se sembró *E. coli* K-12 pRMK y *E. coli* K-12. Campo claro, imagen tomada con luz visible. Bioluminiscencia, imagen tomada en oscuridad para detectar la señal de luz emitida por la bacteria bioluminiscente. Pseudocolores, interpretación de la intensidad de la luz (rojo=más intenso, azul=menos intenso).

## Duración de la bioluminiscencia

El fenómeno de la bioluminiscencia depende de diversos factores, como la concentración del sustrato, ATP y oxígeno. Para los posteriores ensayos, se pudo definir en qué momento de la curva de crecimiento de *E. coli* se generaba mayor bioluminiscencia, y a partir de este punto cuanto es que tardaba en desaparecer la bioluminiscencia. Se observó que la emisión de luz se generaba a partir de 0.0129 de absorbancia (abs) (1.146 unidades relativas de luz, URL), fue a las 9 horas de crecimiento (1.9 abs) que se encontró el pico de generación de bioluminiscencia (3.9 URL) in vitro (Figura 9).

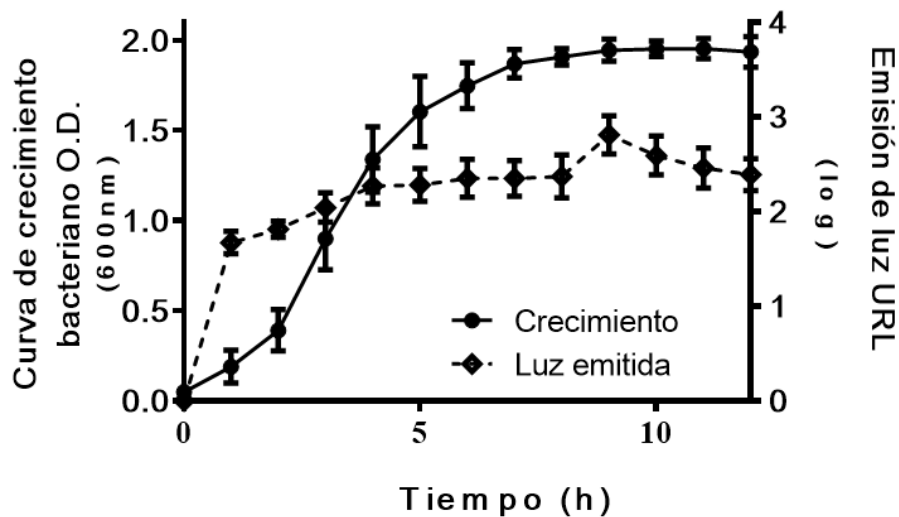


Figura 9. La emisión de bioluminiscencia se genera desde las primeras etapas del crecimiento bacteriano. El valor máximo de emisión de luz se observó a las 9h con un valor de 3.9 URL. Eje x, tiempo en horas, eje y izq, valores del crecimiento bacteriano medido en ABS (D.O. 600 nm), eje y der, emisión de luz medido en unidades relativas de luz (URL).

El pico de 1.9 abs, 9 hrs fue seleccionado para medir la duración de la bioluminiscencia. La mayor intensidad de emisión ocurrió de 0 a 6 horas (3.901-2.496 URL), después de este tiempo la bioluminiscencia empieza a disminuir significativamente (Figura 10).

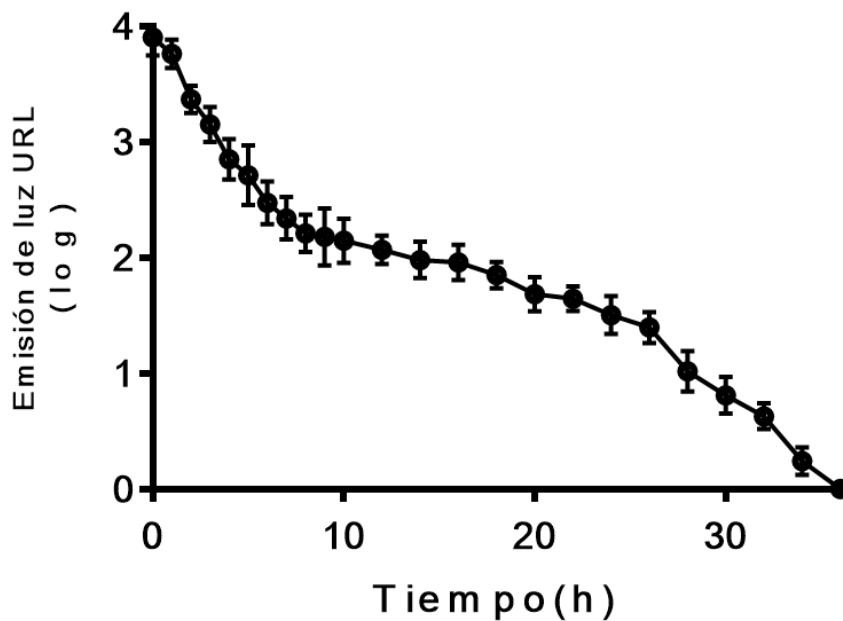


Figura 10. La emisión de bioluminiscencia es detectable durante varias horas. El valor máximo fue de 3.9 URL, a partir de ese tiempo la detección disminuyó cada hora.

### ***Amplificación del operón *Ing****

Los genes relacionados con la biogénesis de los pili tipo IVb están organizados en operones, estos operones están flanqueados por secuencias de inserción (SI). Esta reportada la secuencia del operón completo para CS21 en la



base de datos de NCBI para la cepa ETEC E9034A, su peso aproximado tomando en cuenta todos los genes, es de 13 Kb. Para determinar si la cepa ETEC FMU 73332 cuenta con el operon completo se amplificó el operón *Ing*. Se diseñaron los iniciadores para amplificar desde *IngR* hasta *IngP* (Tabla 3), el resultado mostró un amplificado de aproximadamente 13 Kb (Figura 11).

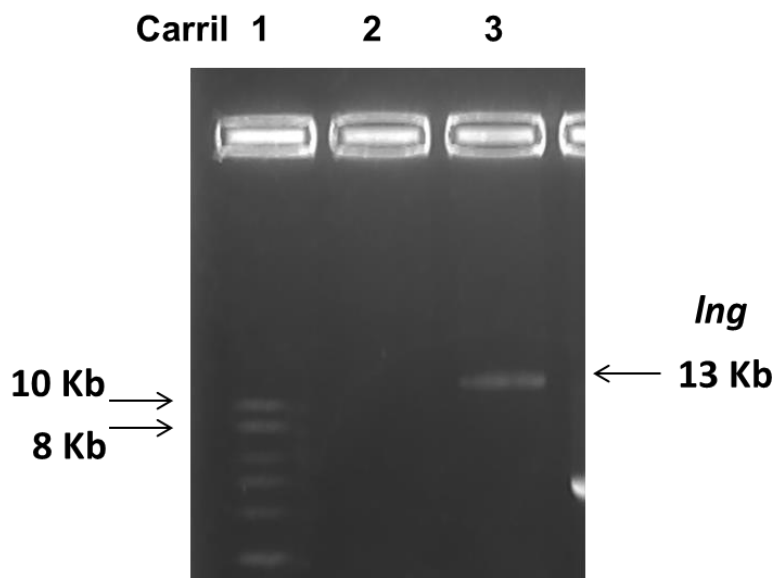


Figura 11. Imagen del corrimiento electroforético del amplicón *Ing* de 13 kb. Carril 1) Marcador de peso molecular, Carril 2) Amplicón *IngR-p* (2 mM MgCl<sub>2</sub>). Carril 3) Amplicón *IngR-P* (4 mM MgCl<sub>2</sub>). Se utilizó la cepa clínica ETEC FMU 073332 para la amplificación del operón.

## ***ETEC FMU073332 presenta niveles de adherencia elevado***

CS21 es un filamento largo que está asociado con la adherencia entre ETEC y las células epiteliales intestinales. Una vez que se identificó que LngA está presente en las cepas recombinantes se midieron los niveles de adherencia de cada una de las cepas. La cepa ETEC FMU073332 presenta niveles de adherencia elevados por lo que se considera como altamente adherente, por otro lado la cepa silvestre *E. coli* K-12 presenta niveles de adherencia bajos (Figura 12).

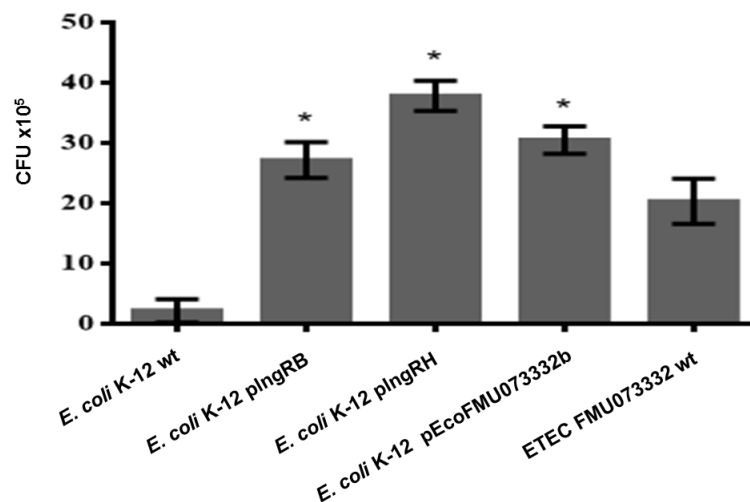
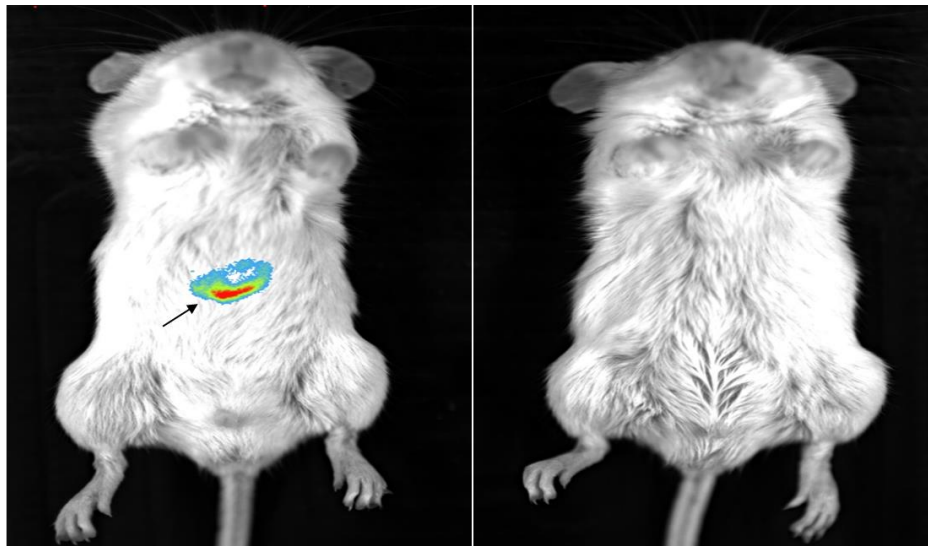


Figura 12. ETEC FMU073332 presenta mayor nivel de adherencia en comparación con *E. coli* K-12. Se midieron los niveles de adherencia a células intestinales HT-29, se observa que la cepa ETEC FMU073332 se adhiere más que la cepa no patogénica *E. coli* K-12. Eje Y, unidades formadoras de colonias, eje X, cepas de *E. coli*. El asterisco indica la diferencia significativa ( $p \geq 0.005$ ) cuando se comparan las cepas recombinantes de *E. coli* K-12 contra *E. coli* silvestre.

## ***Infección in vivo de ratones BALB/c con ETEC FMU073332***

El uso de bioluminiscencia en los modelos animales nos permite observar y entender el comportamiento de un fenómeno en tiempo real. Una vez conocido que el vector confiere el fenotipo de bioluminiscencia, el tiempo de cultivo y duración de la señal bioluminiscente, se realizaron las pruebas con roedores. El cultivo de las cepas se realizó en las condiciones antes mencionadas, y posteriormente se realizó la inoculación intraperitoneal. Esta reportado para otros sistemas que el pelo del animal es un impedimento el cual disminuye la cantidad de bioluminiscencia capturada. Para nuestro ensayo, se utilizaron roedores con el pelo intacto, se observó que la fimbria CS21 promueve la adhesión por el tracto gastrointestinal del roedor.

*E. coli* K-12 con el vector pBR322 no genera bioluminiscencia de fondo, así como cualquier otro tejido del animal. La cepa *E. coli* K-12 pRMK, genera señal bioluminiscente la cual es capaz de ser identificada (Figura 13).



***E. coli* K-12  
pRMK**

***E. coli* K-12  
pBR322**

Figura 13. *E. coli* K-12 pRMK emite señal bioluminiscente detectable *in vivo*. Imágenes de dos roedores inoculados con las cepas *E. coli* K-12 pRMK y *E. coli* K-12 pBR322 respectivamente. Señal bioluminiscente marcada con flecha negra.

Se llevó a cabo el monitoreo del paso por el tracto gastrointestinal de las cepas en estudio, se realizó un seguimiento de la cepa de ETEC FMU073332 silvestre y de *E. coli* K-12, se observó que la primera en identificarse en la materia fecal del roedor fue *E. coli* K-12, se encontró a las 10 horas y posterior a 5 días, en concentraciones muy bajas. En el caso de ETEC FMU073332 empezó a ser excretada hasta las 22 horas en niveles de  $10^6$  UFC y continuó después de 5 días con niveles de  $8.3 \times 10^6$  UFC (Figura 14).

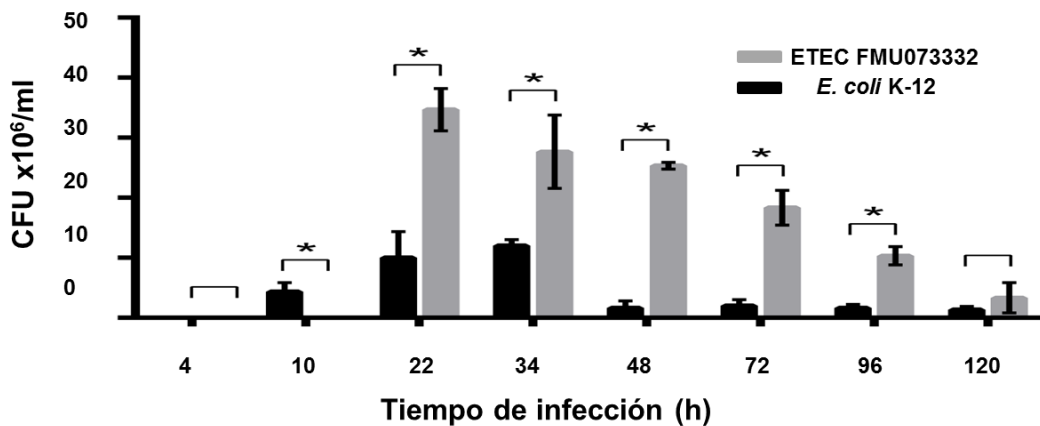


Figura 14. ETEC FMU073332 tarda más tiempo en ser eliminada de tracto gastrointestinal de roedor en comparación con *E. coli* K-12. Se midió el tiempo de eliminación y las UFC de ETEC FMU073332 a través de la infección del intestino del roedor y se comparó con la cepa no patogénica *E. coli* K-12. Eje Y, unidades formadoras de colonias (CFU), eje X, tiempo de infección en horas. El asterisco indica la diferencia significativa ( $p \geq 0.005$ ) cuando se comparan las cepas recombinantes de *E. coli* K-12 contra *E. coli* silvestre.

### ***ETEC FMU073332 se adhiere por más tiempo al tracto gastrointestinal que E. coli K-12***

El estudio del paso de las bacterias a través del tracto gastrointestinal puede hacernos entender la dinámica de la colonización de patógenos como ETEC. En el sitio de administración se observa la carga bacteriana en el tiempo 0 después de la inoculación (Figura 15), después de 48 horas de la inoculación gástrica la señal de bioluminiscencia se desplaza hacia la dirección del intestino delgado.

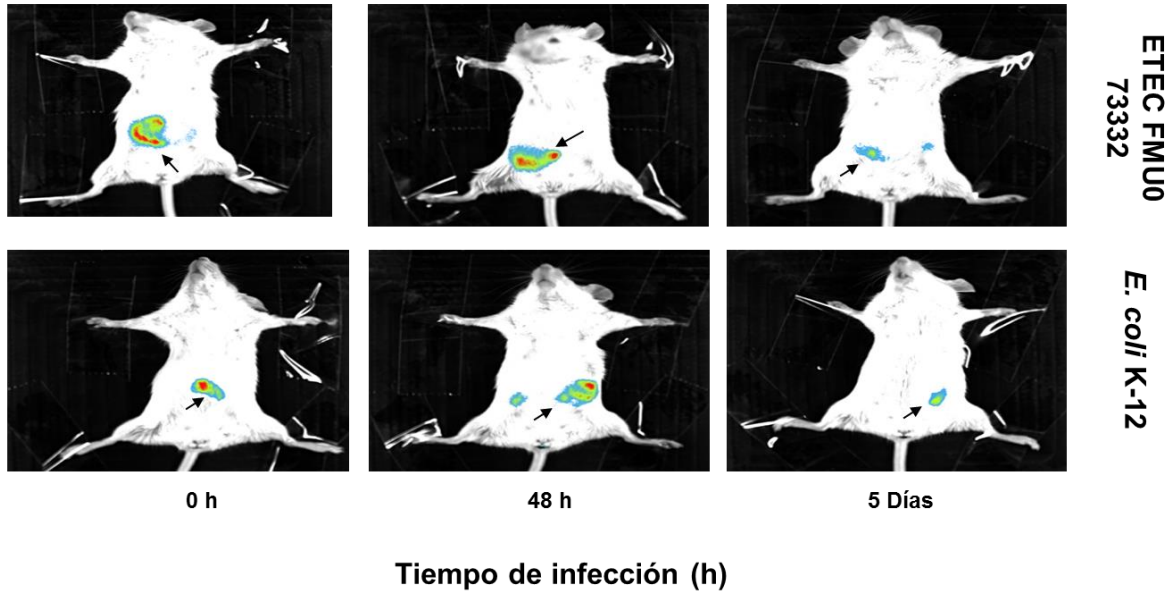


Figura 15. Seguimiento *in vivo* de la señal bioluminiscente de *E. coli* K-12 pRMK durante el paso en el tracto gastro intestinal del ratón. Imágenes de dos roedores inoculados con las cepas *E. coli* K-12 pRMK y *E. coli* K-12 pBR322 respectivamente. La captura de la señal bioluminiscente se realizó al momento de inoculación (0 h), y tras 48 h y 5 días después de la infección. Señal bioluminiscente marcada con flecha negra.

### ***Seguimiento de la infección en tejidos de ratones BALB/c con bioluminiscencia***

Se disecaron los intestinos de roedores infectados con ETEC FMU073332 y *E. coli* K-12 en diferentes tiempos transcurridos de la infección. Después de 48 horas ETEC FMU073332 se encuentra localizada en la región proximal del ileo del roedor, aproximadamente 6 cm del ceco, *E. coli* K-12 se localizó en el ciego y colon proximal (Figura 16).

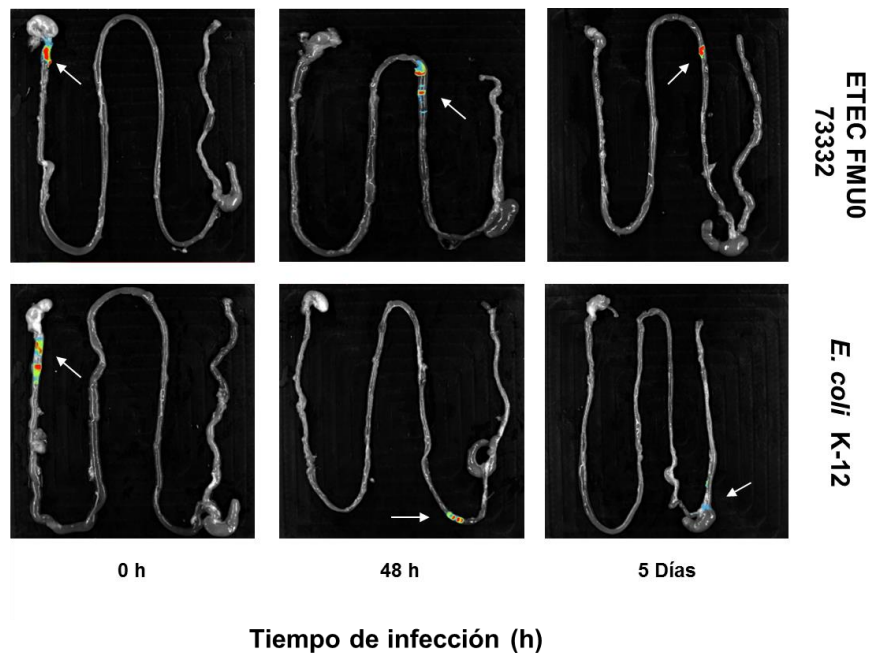


Figura 16. Seguimiento *ex vivo* de la señal bioluminiscente de *E. coli* K-12 pRMK durante el paso en el tracto gastro intestinal del ratón.

Imágenes de roedores inoculados con la cepa *E. coli* K-12 pRMK y *E. coli* K-12 pBR322 respectivamente. La captura de la señal bioluminiscente se realizó al momento de inoculación (0h), y tras 48h y 5 días de infección. Señal bioluminiscente marcada con flecha blanca. Señal bioluminiscente representada en pseudo colores.

### ***El tiempo de eliminación de E. coli K-12 se retrasa cuando la cepa codifica CS21***

La cepa *E. coli* K-12 se transformó con el plásmido p73332 *IngR::Km*, y se utilizó para infectar roedores BALB/c. La eliminación de esta cepa empieza 12 horas después de lo observado con la cepa *E. coli* K-12, los niveles de UFC son similares entre ambas cepas, sin embargo, es interesante observar que el retraso en la eliminación es mayor (Figura 17).

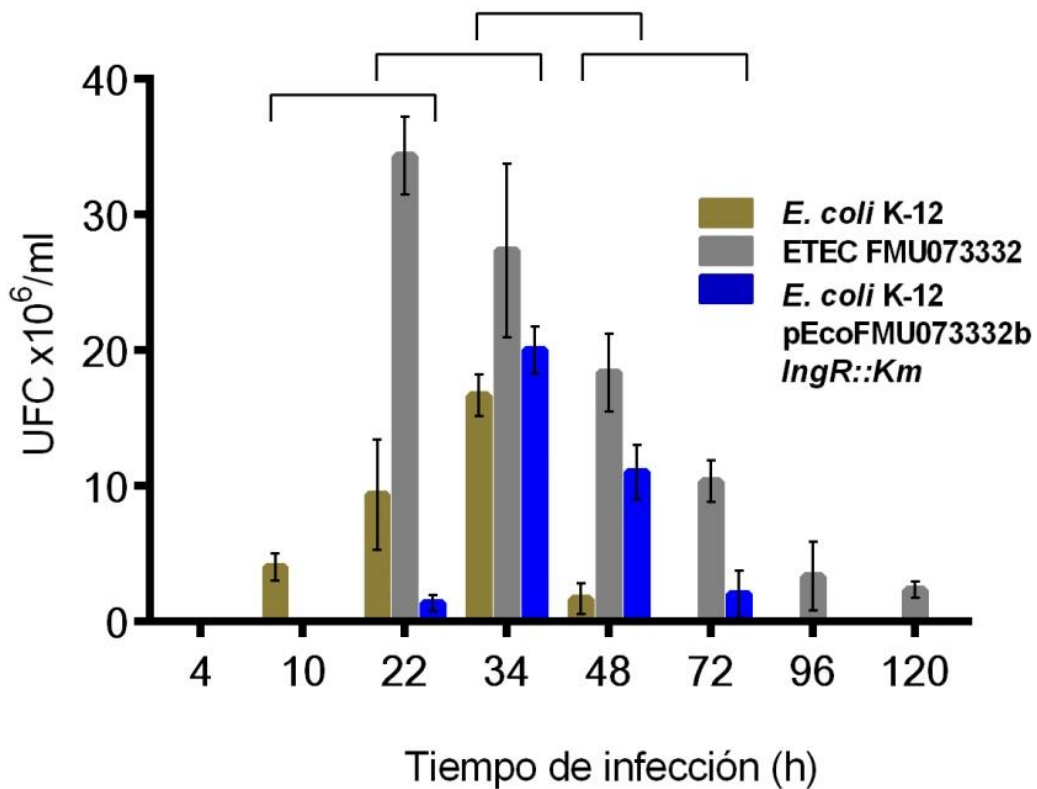


Figura 17. *E. coli* K-12 pEcoFMU073332b *IngR::Km* tarda más tiempo en ser eliminada del TGI del roedor en comparación con *E. coli* K-12. Se infectaron ratones BALB/c con las cepas *E. coli* K-12, ETEC FMU073332, *E. coli* K-12 pEcoFMU073332b *IngR::km*. Se midieron las UFC cada 12 horas, se observa que la cepa *E. coli* K-12 con el plásmido pEcoFMU073332b *IngR::km* tarda 12 horas más en salir del TGI, en comparación con la cepa *E. coli* K-12 sin el plásmido pEcoFMU073332b *IngR::km*.



## Discusión

Actualmente, no existe algún lugar en el que las enfermedades infecciosas no representen un problema de salud y sea causa importante de muerte. Aunque, el número de muertes causadas por patógenos y parásitos está disminuyendo esto ocurre muy lentamente. En 1990, se estimó que 16 millones de personas murieron a causa de enfermedades infecciosas, en 2010, el número de muertes disminuyó a 15 millones de personas. La OMS predice que para el año 2050 un total de 13 millones de muertes serán por causa de enfermedades infecciosas. El número de muertes por los agentes infecciosos, solo son relacionadas con unos cuantos patógenos; de los más de 1400 agentes patógenos y parásitos reconocidos para el humano, dos terceras partes de las infecciones son ocasionadas por 20 especies, principalmente bacterias y virus (*Woolhouse y Gowtage-Sequeira, 2005*).

A partir del año 2000 se incrementó casi en 5 veces la inversión (27 billones de dólares en 2010) por parte de países industrializados, para atender problemas en salud a nivel mundial principalmente en VIH/SIDA, malaria y tuberculosis. Ante ello surge la pregunta ¿por qué el control de las enfermedades infecciosas no ha sido más exitoso? Las respuestas son varias, una se relaciona con el desarrollo de tecnología efectiva, otra más se enfoca al comportamiento de los microorganismos principalmente con relación a la resistencia múltiple hacia los antibióticos que cada vez es más importante. Aunque, el desarrollo de nuevos antimicrobianos pudiera ser la solución, la industria farmacéutica ya no quiere invertir en dicho rubro por lo

que en los últimos 50 años solo se han generado dos nuevas clases de antibacterianos (Cole, 2014, Lewis, 2012). Ante esta situación en el 2017 la OMS hizo un llamado para que se propongan alternativas para el control y tratamiento de las diversas enfermedades infecciosas.

Las diarreas de etiología infecciosa representan un problema de salud pública que afecta principalmente a la población en los extremos de la edad (niños y ancianos). El padecimiento es prevenible y de fácil tratamiento, sin embargo, el hecho de que afecta a las poblaciones económicamente desprotegidas ocasiona que siga ocasionando daños a la salud que afectan el crecimiento y desarrollo integral de los niños y, aunque en menor medida, continúa como una causa importante de muerte en infantes.

*Escherichia coli* enterotoxigénica es un patógeno de gran impacto clínico y epidemiológico, aunque, se tiene conocimiento de algunos de los mecanismos a través de los cuales se establece y ocasiona la enfermedad en el hospedero, aún existen vacíos que permitan explicar por completo su patogenicidad.

Con el propósito de entender la participación del factor de colonización CS21, en este trabajo se implementó un modelo animal que permitió identificar la su participación durante la infección. Para ello se desarrolló un vector que confiere un fenotipo bioluminiscente a las cepas *E. coli* K-12 y ETEC FMU073332. Los resultados mostraron que ETEC FMU073332 permanece más tiempo en el intestino del roedor que *E. coli* K-12. En el trabajo se concluyó que el plásmido pEcoFMU073332b contribuye a incrementar el tiempo de eliminación del TGI *E.*

*coli* K-12 cuando la cepa *E. coli* K-12 es transformada con el referido plásmido. Con estos resultados se puede inferir que el plásmido pEcoFMU073332b que codifica para CS21 le confiere la capacidad para modificar la colonización de una cepa no adherente como lo es *E. coli* K-12 y probablemente CS21 este participando/mediando el proceso. Otro aspecto importante del plásmido pEcoFMU073332b, es que puede utilizarse en estudios para identificar como pueden estar participando diferentes factores de virulencia de ETEC durante la infección *in vivo* de un roedor.

Durante la infección por cualquier patógeno es importante definir el tiempo de incubación antes de que se presente la sintomatología. Existen sistemas que permiten la generación de bioluminiscencia como *luxCDABE*, en donde se clona el operón completo o se inserta en el cromosoma bacteriano, sin embargo, se ha reportado la generación de estrés metabólico (*Jawhara y Mordon, 2004*). Utilizar un sistema que no genere estrés metabólico es de gran utilidad para estudiar uno o más factores de virulencia en cepas recombinantes.

La enzima luciferasa, codificada por el gen *luc*, genera luz visible descarboxilando al sustrato luciferina en presencia de ATP y oxígeno (*Jawhara y Mordon, 2004*). Para controlar la expresión del gen *luc* se utilizó a la región promotora del gen *dnak*. La proteína DnaK está involucrada en la división del cromosoma bacteriano, así como en la participación de la respuesta celular al estrés. DnaK es una proteína constitutiva presente en *E. coli*. (*McCarty y Walker 1994*), considerando lo anterior es que se utilizó la región promotora de *dnak* para promover la expresión constitutiva del gen *luc* durante las condiciones *in vitro* e *in*

*vivo*. Los resultados obtenidos mostraron que la fusión de la región promotora de *dnak* al gen *luc* permite la emisión de bioluminiscencia a la cepa receptora del plásmido pRMK. La duración de la infección por ETEC en roedores no está reportada, por consiguiente, que la señal bioluminiscente fuese detectable desde las primeras horas de la infección nos permitiría monitorear el paso de ETEC a través del TGI del roedor. Inicialmente se incubó el cultivo bacteriano crecido durante toda la noche con el sustrato luciferina durante 1 h, y se observó la señal bioluminiscente. Al evaluar tiempos menores de incubación se observó que el tiempo de incubación con la luciferina puede ser reducido a 5 minutos con señales bioluminiscentes aproximadamente similares.

Una vez determinado el tiempo de incubación con el sustrato, se buscó la fase del crecimiento bacteriano a la cual se generaba la señal inicial de bioluminiscencia, así como la mayor intensidad de la señal. Debido a que se fusionó el gen *luc* con la región promotora del gen constitutivo *dnak*, suponíamos que la señal bioluminiscente estaría presente desde las etapas iniciales del crecimiento. Los resultados obtenidos confirmaron nuestra suposición ya que se identificó que la emisión de bioluminiscencia empieza en las etapas iniciales del crecimiento de *E. coli* K-12 pRMK a 0.129 de abs durante la primera hora. La curva de crecimiento mostró el punto en que se observaba la máxima emisión de la señal bioluminiscente, el pico de emisión se midió a una abs de 1.9, después de 9 horas de crecimiento, aproximadamente en la fase exponencial tardía de la curva de crecimiento. Los resultados mencionados muestran indirectamente que la región promotora de *dnak* induce la expresión del gen *luc* en condiciones

normales de crecimiento y se observa la actividad de la luciferasa en condiciones *in vitro*. Los ensayos de bioluminiscencia *in vitro* nos permitieron medir la duración de la emisión durante el tiempo, encontramos que los minutos iniciales son esenciales para la emisión de luz. A partir de este punto la emisión de la luz empieza a disminuir cada hora.

El tejido intestinal del ratón está cubierto con tejido, conectivo, muscular, piel y pelo, este recubrimiento representa una dificultad para la exposición de la luz y captura de las imágenes (*Doyle et al., 2004*). Al respecto se ha reportado que para la captura de la señal bioluminiscente en algunos modelos de infección con *Yersinia* y *Staphylococcus* es necesario retirar el pelo de los roedores (*Kuklin et al., 2003, González et al., 2012*). En el caso de nuestro estudio se observó que con el sistema que utilizamos la remoción del pelo del animal no es necesaria, ya que la señal bioluminiscente es suficientemente intensa para ser capturada por tiempos prolongados.

Las características bioquímicas y los factores de virulencia implicados en la infectividad hacia el huésped, definen si una cepa bacteriana puede o no colonizar el tracto intestinal (*Bernier-Fébrreau et al., 2004*). Las cepas que carecen de los factores de virulencia esenciales son eliminadas por tiempos significativamente más cortos comparadas con las cepas virulentas (*Mundy et al., 2006*). El paso y los eventos desarrollados por ETEC FMU073332 a través del TGI del roedor, se compararon con lo obtenido con la cepa *E. coli* K-12 no adherente. Los resultados observados mostraron que la eliminación de la cepa ETEC FMU073332 empieza a las 22 horas con  $34.6 \times 10^6$  UFC después de la inoculación gástrica. Fue

interesante observar que la eliminación no es constante a través del tiempo; a las 34 horas ( $27.6 \times 10^6$  UFC), 48 horas ( $25.3 \times 10^6$  UFC), 72 horas ( $25.3 \times 10^6$  UFC), 96 horas ( $10.3 \times 10^6$  UFC) y disminuye hasta llegar a  $8.3 \times 10^6$  a las 120 h. El mismo análisis con *E. coli* K-12 mostró cuentas menores  $4.6 \times 10^6$  a partir de las 10 h, aunque, con niveles de  $1.8 \times 10^6$  UFC a las 120 h que se encuentran en el mismo intervalo que los obtenidos con ETEC FMU073332. Un hecho interesante en los resultados, es que tanto en ETEC FMU073332 como *E. coli* K-12 no se incrementa la población bacteriana, lo que sugiere que los requerimientos nutricionales en el TGI del roedor no son los adecuados para la división del microorganismo (Wadolkoski et al., 1990). Sin embargo, ETEC FMU073332 se mantiene adherida al tracto intestinal por más tiempo, lo que pudiera estar relacionado con su capacidad para expresar CS21, que como fue referido previamente (Saldaña-Ahuactzi et al., 2016) es un factor de colonización asociado con la adherencia *in vitro* a células intestinales HT-29.

El tiempo de detección de la bioluminiscencia observado a través del tejido intestinal con la cepa ETEC FMU073332 fue más lento que el de *E. coli* K-12, en estudios similares con los patotipos de *E. coli* enteropatogénica, y *E. coli* enterohemorrágica, se refiere que la llegada de las bacterias al intestino grueso y ciego se presenta en pocas horas (Rhee et al., 2011) tal y como se observó en *E. coli* K-12. El tiempo prolongado de eliminación de ETEC FMU073332 se definió al observar el desplazamiento de la señal por la zona abdominal cada hora posterior a la infección. Tal situación sugiere que ETEC FMU073332 puede estar retenida en el intestino, probablemente adherida transitoriamente por las estructuras

relacionadas con la adherencia como es el caso de CS21. Allen y colaboradores (2006) reportaron que la cepa de ETEC H10407 coloniza el íleon del ratón, la captura de imágenes *ex vivo* nos permitieron observar la señal de bioluminiscencia en el íleon proximal del ratón 5 días después de la infección, lo que confirma lo observado con otras cepas ETEC y sugiere que ETEC FMU073332 coloniza el íleon del ratón (Allen et al., 2006).

Como previamente fue manifestado ETEC FMU073332 es una cepa altamente adherente, sensible a antibióticos (Cruz-Cordova et al., 2014) y que posee los plásmidos: pEcoFMU073332a (5,538 pb), pEcoFMU073332b (47,563 pb), pEcoFMU073332c (113,343 pb), y pEcoFMU073332d (137,665 pb). Al respecto es importante mencionar que en uno de los mencionados plásmidos (pEcoFMU073332d), se localizan los genes que codifican para la toxina TL (*eltA* y *eltB*); la serina proteasa auto transportadora secretada (*eatA*); la subunidad mayor de la fimbria CS3 (*cstH*) y la enterotoxina termoestable TE (*sta2*), el conjunto de estos elementos le confiere una capacidad de virulencia mayor a esta cepa obtenida de un aislamiento clínico (Saldaña-Ahuactzi et al., 2017).

Otro aspecto relevante de ETEC FMU073332 es que su genoma codifica para el operón completo que codifica CS21, los genes de este operón se localizan en el plásmido pEcoFMU073332b (Saldaña-Ahuactzi et al., 2017). Es conocido que ETEC FMU073332 es altamente adherente (Cruz-Cordova et al., 2014) y que *E. coli* K-12 es una cepa no adherente (Subramanian et al., 2008). Cabe destacar que al evaluar el nivel de adherencia *in vitro* a células HT-29 de la cepa *E. coli* K-12 a la que le fue transferido el plásmido pEcoFMU073332b *km::IngR* (p73332

*km::lngR*), el potencial adherente de la cepa se incrementó en niveles significativos. Es probable que CS21 y algún otro componente de la bacteria codificado en el plásmido estén mediando la adherencia en la bacteria.

Al comparar los tiempos de eliminación de las cepas ETEC FMU073332 y *E. coli* K-12 con la cepa *E. coli* K-12 pEcoFMU073332b *km::lngR* (p73332 *km::lngR*), podemos observar que el tiempo en donde se presenta la eliminación de *E. coli* K-12 pEcoFMU073332b *km::lngR* (p73332 *km::lngR*) se recorre hasta las 22 h posterior a la inoculación de la cepa ( $1.3 \times 10^6$  UFC) y se termina hasta las 72 h ( $2 \times 10^6$  UFC). El inicio de su eliminación se retrasa 12 h y el término de la eliminación se retarda 24 h comparado con la cepa *E. coli* K-12 vacía, lo cual es significativo. Esto significa que la presencia de CS21 en el plásmido pEcoFMU073332b tiene un efecto en la eliminación de la cepa *E. coli* K-12 no patogénica, ya que de acuerdo con lo publicado por Saldaña-Ahuactzi en el 2017, además de CS21 no existe ningún otro CFA codificado en el plásmido pEcoFMU073332b. En esta cepa el CFA CS3 está codificado en el plásmido pEcoFMU073332d (137 Kb), por consiguiente es posible que CS21 confiera adhesión y por consiguiente el retraso en la eliminación entre *E. coli* K-12 y *E. coli* K-12 pEcoFMU073332b.

Con esta información podemos sugerir que ETEC FMU073332 posee estructuras que le ayudan a colonizar el tracto intestinal del ratón. Sin embargo, no debemos pasar por alto que se piensa que aún existen CFAs no reportados y que pudiesen estar codificados en el genoma de ETEC. En el genoma reportado por Saldaña-Ahuactzi en el 2017 se pudo determinar el número de plásmidos para la



cepa ETEC FMU073332 y que CS21 no se encuentra codificado con las toxinas u otro CFA, sin embargo, no se realizó la búsqueda de otros posibles CFA.

Con base en lo que observamos en este estudio, será posible realizar más adelante ensayos en donde se podrá determinar la función que desempeña cada factor de colonización de ETEC individualmente o cooperativamente en la colonización del TGI.

## Conclusión

El plásmido pRMK permite realizar el seguimiento de *E. coli* por medio de una señal bioluminiscente.

ETEC FMU073332 exhibe un paso más lento por el tracto gastrointestinal de ratón, en comparación con la cepa de *E. coli* K12 no patogénica.

Se puede asumir que ETEC FMU073332 coloniza transitoriamente el tracto gastrointestinal de ratón más eficientemente que *E. coli* K12 no patogénica.

CS21 es la estructura responsable de las propiedades adherentes mostradas por *E. coli* K-12 pEcoFMU073332b.

CS21 ya no debe ser considerado como un factor de colonización putativo y si como un CFA de ETEC.

## Bibliografía

1. Brachman P. Infectious diseases-past, present, and future.. International Journal of Epidemiology. 2003; 32(5): 684-686.
2. Escherich T. Die darmbakterien des neugeborenen und sauglings. Fortshr Med. 1885; 3:5-15-522,47-54.
3. Olarte J. El papel de los colis patógenos en las enteritis del hombre. 1959. Gaceta Médica de Mexico. 1959; 89(4): 291-301.
4. Neter E, Westphal O, Luderitz O, Gino R. M. Gorzynski, E. A. Demonstration of antibodies agains enteropathogenic Escehrichia coli in sera of children of various ages. Pediatrics. 1955; 16(6): 801-808.
5. Levine M. M, Bergquist E. J, Nalin D. R, Waterman D. H, Hornick R. B, Young, C. R, Sotman S. Escherichia coli strains that cause diarrhea but do not produce heat-labile or heat-stable enterotoxins and are non-invasive. Lancet. 1978; 1(8074):1119-1122.
6. Conway P. L. Microbial ecology of the human large intestine. In: Gibson GR, Macfarlane GT, editors. Human colonic bacteria: role in nutrition, physiology and pathology. Boca Raton, Fl.: CRC Press: 1995. 1-24.
7. Ashida H, Ogawa M, Kim M, Mimuro H, Sasakawa C. Bacteria and host interactions in the gut epithelial barrier. Nature Chemical Biology. 2012; 8: 36-45.
8. Souza V, Rocha M, Valera A, Eguiarte L. E. Genetic Structure of Natural Populations of Escherichia coli in Wild Hosts on Diferent Continents. Applied and Environmental Microbiology. . 1999; 65(8): 3373-3385.
9. Chang D. E, Smalley D. J, Tucker D. L, Leatham M. P, Norris W. E, Stevenson S. J, Anderson A.B, Grissom J. E, Laux D. C, Cohen P. S, Conway T. Carbon nutrition of Escherichia coli in the mouse intestine. Proc Natl Acad Sci USA. 2004; 76(3): 1143–1152
10. Tenailon O, Skurnik D, Picard B, Denamur E. The population genetics of commensal Escherichia coli, Nature. 2010; 8: 207- 217.
11. Rodríguez A. G. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de Escherichia coli. Salud pública de México. 2002; 44(5): 464-475.

12. Kaper J. B, Nataro J. P, Mobley H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature*. 2004; 2: 123- 140.
13. Qadri F, Svennerholm A. M, Faruque A. S, Sack R. B. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in Developing Countries: Epidemiology, Microbiology, Clinical Features, Treatment and Prevention. *Clin. Microbiol. Rev.* 2005; 18(3): 465-483.
14. Qadri F, Girón J. A, Helander A, Begum Y. A, Asaduzzaman M, Xicohtencatl-Cortes J, Negrete E, Albert M. J. Human Antibody Response to Longus Type IV Pilus and Study of Its Prevalence among Enterotoxigenic *Escherichia coli* in Bangladesh by Using Monoclonal Antibodies. *The Journal of Infectious Diseases*. 2000; 181: 2071-2071.
15. Wenneras C, Erling V. Prevalence of Enterotoxigenic *Escherichia coli*-associated diarrhoea and carrier state in the developing world. *J Health Popul Nutr.* 2004; 22(4): 370-82.
16. Petri W. A. Jr, Miller M, Binder H. J, Levine M. M, Dillingham R, Guerrant R. L. Enteric Infections, diarrhea, and their impact on functions and development. *J Clin Invest.* 2008; 118(4): 1277-1290.
17. Niehaus M. D, Moore S. R, Patrick P. D, Derr L. L, Lorntz B, Lima A. A, Guerrant R. L. Early childhood diarrhea is associated with diminished cognitive function 4 to 7 years later in children in a northeast Brazilian shantytown. *Am J Trop Med Hyg.* 2002; 66(5): 590-603.
18. Nicklasson M, Sjoling A, von Mentzer A, Qadri F, Svennerholm A. M. Expression of Colonization Factor CS5 of Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) Is Enhanced In Vivo and by the Bile Component Na Glycocholate Hydrate. *PloS One.* 2012; 7(4):1-9.
19. Acha P. N, Szyfres B. *Bacterioses and mycoses*. 2001. (3 ed). Edition Pan American Health Organization, Washington, D.C.
20. Nieto J, Bailey M, Hugues C, Koronakis V. Suppression of transcription polarity in the *Escherichia coli* hemolysin operon by a short upstream element shared by polysaccharide and transfer determinants. *Mol. Microbiol.* 1996; 19: 705-713.
21. Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, Abraham J, Adair T, Aggarwal , Ahn S.Y, Alvarado M, Anderson H.R, Anderson L.M,

Andrews K.G, Atkinson C, Baddour L.M, Barker-Collo S, Bartels D.H, Bell M. L, Benjamin E. J, Bennett D, Bhalla K, Bikbov B, Bin Abdulhak A, Birbeck G, Blyth F, Bolliger I, Boufous S, Bucello C, Burch M, Burney P, Carapetis J, Chen H, Chou D, Chugh S. S, Coffeng L. E, Colan S. D, Colquhoun S, Colson K. E, Condon J, Connor M. D, Cooper L.T, Corriere M, Cortinovis M, De Vacarro K. C, Couser W, Cowie B. C, Criqui M. H, Cross M, Dabhadkar K. C, Dahodwala N, De Leo D, Degenhardt L, Delossantos A, Denenberg J, Des Jarlais D.C, Dharmaratne S.D, Dorsey E.R, Driscoll T, Duber H, Ebel B, Erwin P. J, Espindola P, Ezzati M, Feigin V, Flaxman A. D, Forouzanfar M. H, Fowkes F. G, Franklin R, Fransen M, Freeman M. K, Gabriel S. E, Gakidou E, Gaspari F, Gillum R. F, Gonzalez-Medina D, Halasa Y. A, Haring D, Harrison J. E, Havmoeller R, Hay R. J, Hoen B, Hotez P. J, Hoy D, Jacobsen K. H, James S. L, Jasrasaria R, Jayaraman S, Johns N, Karthikeyan G, Kassebaum N, Keren A, Khoo J. P, Knowlton L.M, Kobusingye O, Koranteng A, Krishnamurthi R, Lipnick M, Lipshultz S.E, Ohno S. L. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 2013; 380, 2095-2128.

22. WHO. 2010. International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems 10th revision (ICD-10) Version for 2010. [Online]. Disponible en: <http://apps.who.int/classifications/icd10/browse/2010/en#/1>.
23. Velázquez-Castillo F. R, Castellanos V. A, Luna G. G, Bustamante C. M. E, Gómez D. A, Cedillo R. R, Torres J, Muñoz H. O. "Importancia de los agentes virales como causa de diarrea grave en los niños menores de cinco años de edad que requieran hospitalización y factores de riesgo asociados". En: García PMC, Reyes MH, Viniegra VL. *Las múltiples facetas de la investigación en salud: Proyectos estratégicos del Instituto Mexicano del Seguro Social*. México. 2001; 133-152.
24. Panigua G. L, Monroy E, García G. Two or more enteropathogens associated with diarrhoea in mexican childre,. *Am Clin Microbiol Antimicrob* 2002; 6: 17-24
25. Navarro A, Estrada G. T. Epidemiology of Diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes in Mexico, past and present. En: *Pathogenic Escherichia coli in Latin America, 2010*; Torres AG (ed). USA, Texas. Bentham eBooks.
26. Hodges K, Gill R. Infectious diarrhea: Cellular and molecular mechanisms. *Gut Microbes*. 2010; (1): 4-21.
27. Tauschek M, Gorrell R. J, Strugnell R. A, Robins-Browne R. M. Identification of a protein secretory pathway for the secretion of heat-labile enterotoxin by an enterotoxigenic strain of *Escherichia coli*. *PNAS*. 2004; 99(10): 1066-7071.

28. Yamanaka H, Nomura T, Fuji Y, Okamoto. Extracellular Secretion of *Escherichia coli* Heat-Stable Enterotoxin I across the Outer Membrane. *Journal of Bacteriology*. 1997; 179(11): 3383- 3390.
29. Sjörling. In vivo expression of the heat stable (estA) and heat labile (eltB) toxin genes of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). *Microbes and Infection*. 2006; 2797- 2802.
30. Wolf M. K. Occurrence, distribution, and associations of O and H serogroups, colonization factor antigens, and toxins of Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*. 1997; 10(4): 569-584.
31. Schilling J. Transcriptional Activation of the tad Type IVb Pilus Operon by PypB in *Yersinia enterocolitica*, *Journal of Bacteriology*. 2010; 192(14): p. 3809- 3821.
32. Girón J. A. Longus pilus of enterotoxigenic *Escherichia coli* and its relatedness to other type-4 pili- a minireview. *Gene*. 1997; 39- 43.
33. Gomez-Duarte O, Chattopadhyay S, Weissman S. J, Giron J. A, Kaper J. B, Sokurenko, E. V. Genetic Diversity of the Gene Cluster Encoding Longus, a Type IV Pilus of Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 2007; 189(24): 9145- 9149.
34. Gomez-Duarte O, Ruiz-Tagle A, Gómez D. C, Viboud G. I, Jarvis K. G, Kaper J. B, Girón J. A. Identification of lngA, the structural gene of longus type IV pilus of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Microbiology*. 1999; 145: 1809- 1816.
35. Mouricout M. Glycoprotein glycans that inhibit adhesion of *Escherichia coli* mediated by K99 fimbriae: treatment of experimental colibacillosis. *Infect. Immun*. 1990; 58(1): 98- 106.
36. Ghosh A. R. Evaluation of Conventional Media for Detection of Colonization Factor Antigens of Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology*. 1993; 31(8): 2163- 2166.
37. Gutiérrez-Cázares. Identification of Enterotoxigenic *Escherichia coli* Harboring Longus Type IV Pilus Gene by DNA Amplification. *J. Clin. Microbiol*. 2000; 38(5): 1767- 1771.

38. Madhavan T. P, Sakellaris H. Colonization factors of enterotoxigenic *Escherichia coli*. 2015; 90:155-197.
39. Nataro J. P, Kaper J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*. 1998; 11(1): 142-201.
40. Svennerholm A. M. Roles of different coli surface antigens of colonization factor antigen II in colonization by and protective immunogenicity of enterotoxigenic *Escherichia coli* in rabbits. *Infect. Immun*. 1990; 58(2): 341-346.
41. Pichel M. G, Binsztein N, Qadri F, Girón J. A. Type IV Long Pilus of Enterotoxigenic *Escherichia coli*: Occurrence and Association with Toxin Types and Colonization Factors among Strains Isolated in Argentina. *Journal of Clinical Microbiology*. 2002; 40(2): 694-697.
42. Nishimura L. Prevalence of Enterotoxigenic *Escherichia coli* Strains Harboring the Longus Pilus Gene in Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*. 2002; 40(7): 2606- 2608.
43. Caron, J., Coffield, L. M. y Scott, J. R. A plasmid-encoded regulatory gene *rns*, required for expression of the CS1 and AS2 adhesins of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1989; 86: 963- 967.
44. Girón J. A. Longus pilus of enterotoxigenic *Escherichia coli* and its relatedness to other type-4 pili- a minireview. *Gene*. 1997; 39- 43.
45. Girón J. A. Prevalence and association of the longus pilus structural gene (*IngA*) with colonization factor antigens, enterotoxin types, and serotypes of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*. 1995; 63(10): 4195- 4198.
46. Taniguchi T. Gene Cluster for Assembly of Pilus Colonization Factor Antigen III of Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun*. 2001; 69(9): 5864- 5873.
47. Isidean S. D, Riddle M. S, Savarino S. J, Porter C. K. A systematic review of ETEC epidemiology focusing on colonization factor and toxin expression. *Vaccine*. 2011; 29(37): 6167-78.
48. Girón J. A, Myron M, Kaper J. B, Longus; a long pilus ultrastructure produced by human enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*. 1994; 12(1): 71- 82.

49. Roux N, Spagnolo J, Bentzmann S. Neglected but amazingly diverse type IVb pili. *Research in Microbiology*, 2012; 163: 659- 673.
50. Mazariego-Espinoza K. Longus a Type IV Pilus of Enterotoxigenic *Escherichia coli*, Is Involved in Adherence to Intestinal Epithelial Cells. *Journal of Bacteriology*. 2010; 192(11): 2791- 2800.
51. Von Mentzer A, Thomas R. C, Lothar H. W, Torsten S, Atsushi I, Thomson N. R, Rasko D. A, Joffre E, Corander J, Pickard D, Wiklund G, Svennerholm A-M, Sjoling A, Dougan G. Identification of Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) clades with long-term global distribution. *Nature Genetics*. 2014; 46(12):1321-1326.
52. Cross A, S. What is a virulence factor? *Critical Care*. 2008;12:196. 1-2.
53. Guerra J. A, Romero-Herazo Y. C, Arzuza O, Gomez-Duarte O. G. Phenotypic and genotypic characterization of enterotoxigenic *Escherichia coli* clinical isolates from Northern Colombia, South America. *Biomed Res. Int.* 2014: 1-11.
54. Zeighami H, Haghi F, Hajjahmadi F, Kashefieh M, Memariani M. Multidrug resistant enterotoxigenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* isolated from children with diarrhea. *J. Chemother.* 2014; 27(3): 152-155.
55. Clavijo A. P, Bai J, Gomez-Duarte, O. G. The Longus type IV pilus of enterotoxigenic *Escherichiacoli* (ETEC) mediates bacterial self-aggregation and protection from antimicrobial agents. *Microb. Pathog.* 2010; 48: 230–238.
56. Liaqat I, Sakellaris H. Biofilm formation and binding specificities of CFA/I, CFA/II and CS2 adhesions of enterotoxigenic *Escherichia coli* and Cfa e-R181A mutant. *Braz. J. Microbiol.* 2012; 43: 969–980.
57. Cravioto A, Reyes R. E, Trujillo F, Uribe F, Navarro A, De La Roca J. M, Hernández J. M, Pérez G, Vázquez V. Risk of diarrhea during the first year of life associated with initial and subsequent colonization by specific enteropathogens. *Am J Epidemiol.* 1990;131: 886 –904.
58. Guevara C. P, Luiz W. B, Sierra A, Cruz C, Qadri F, Kaushik R. S. Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) CS21 pilus contributes to adhesion to intestinal cells and to pathogenesis under *in vivo* conditions. *Microbiology*. 2013; 159(8): 1725–1735.



59. Hwang J, Bieber D, Ramer S. W, Cheng-Yen W, Schoolnik G. K. Structural and Topographical Studies of The Type IV Bundle-Forming Pilus Assembly Complex of Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Journal Bacteriology*. 2003; 185 (22): 6695-6701
60. Taylor R. K, Miller V. L, Furlong D. B, Mekalanos J. J. Use of *phoA* gene fusions to identify a pilus colonization factor coordinately regulated with cholera toxin. *Proc. Natl .Acad. Sci. U.S.A.* 1987; 84: 2833–2837.
61. Hobbs M, Mattick J. S. Common components in the assembly of type 4 fimbriae, DNA transfer systems, filamentous phage and protein secretion apparatus: a general system for the formation of surface associated protein complexes. *Mol. Microbiol.* 1993; 10: 233 -243.
62. Strom M. S, Lory S. Structure-function and biogenesis of the type IV pili. *Annu. Rev. Microbiol.* 1993; 47: 565–596.
63. Francetic O, Lory S, Pugsley A. P. A second prepilin peptidase gene in *Escherichia coli* K-12. *Mol. Microbiol.* 1998; 27: 763–775.
64. Francetic O, Pugsley A. P. The cryptic general secretory pathway (*gsp*) operon of *Escherichia coli* K-12 encodes functional proteins. *J. Bacteriol.* 1996; 178: 3544–3549.
65. Pugsley A. P, Francetic O. Protein secretion in *Escherichia coli* K-12: dead or alive? *Cell. Mol. Life Sci.* 1998; 54: 347–352.
66. Kolappan S, Ng D, Yang G, Harn T, Craig L. Crystal Structure of the Minor Pilin Cof B, the Initiator of CFA/III Pilus Assembly in Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 290, 25805–25818. doi:10.1074/jbc.M115.676106.
67. Bose N, Taylor R. K. Identification of a TcpC-TcpQ outer membrane complex involved in the biogenesis of the toxin-coregulated pilus of *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 2005; 187: 2225–2232.
68. Stetcher B, Denzler R, Maier L, Bernet F, Sanders M. J, Pickard D. J, Barthel M, Westendorf A. M, Krogfelt K. A, Walker, A. W, Ackerman, M, Dobrindt U, Thomson N. R, Hardt W-D. Gut inflammation can boost horizontal gene transfer between pathogenic and commensal enterobacteriaceae. *PNAS*. 2010; 109(4): 1269-1274.

69. Ghoshal U. C, Shukla R, Gwee K-A, Ng S. C, Quigley E. M. M. The gut microbiota and irritable bowel syndrome: friend of foe? *International Journal of Inflammation*. 2012; 1-13.
70. Edwards A. R, Puente J. L. Fimbrial expression in enteric bacteria: a critical step in intestinal pathogenesis. *Trends in Microbiology*. 1998; 6(7): 282.
71. Hutchens M, Lurken G. D. Applications of bioluminescence imaging to the study of infectious diseases. *Cell. Microbiol*. 2007; 9: 2315–2322.
72. Rhee K. J, Cheng H, Harris A, Morin C, Kaper J. B, Hecht G. A. Determination of spatial and temporal colonization of enteropathogenic *E. coli* and enterohemorrhagic *E. coli* in mice using bioluminescent in vivo imaging. *Gut Microbes*. 2011; 2(1): 34-41.
73. Jawhara S, Mordon S. In vivo imaging of bioluminescent *Escherichia coli* in a cutaneous wound infection model for evaluation of an antibiotic therapy. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2004; 48: 3436–3441.
74. Coombes J. L, Robey E. A. Dynamic imaging of host-pathogen interactions in vivo. *Nat. Rev. Immunol*. 2010; 10: 353–364.
75. Wiles S, Robertson B. D, Frankel G, Kerton A. Bioluminescent monitoring of in vivo colonization and clearance dynamics by lightemitting bacteria. *Methods Mol. Biol*. 2009; 574: 137–153.
76. Contag C. H, Contag P. R, Mulling J. I, Spilman S. D, Stevenson D. K, Benaron D. A. Photonic detection of bacterial pathogens in living hosts. *Mol. Microbiol*. 1995; 18: 593–603.
77. Kuklin N. A, Pancari G. D, Tobery T. W, Cope L, Jackson J, Gill C. Real-time monitoring of bacterial infection in vivo development of bioluminescent staphylococcal foreign-body and deep-thighwound mouse infection models. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2003; 47: 2740–2748.
78. Gonzalez R. J, Weening E. H, Frothingham R, Sempowski G. D, Miller V. L. Bioluminescence imaging to track bacterial dissemination of *Yersinia pestis* using different routes of infection in mice. *BMC Microbiol*. 2012; 12(147): 1-12.
79. Torres A. G, Cieza R. J, Rojas-Lopez M, Blumentritt C. A, Souza C. S, Johnston R. K. In vivo bioluminescence imaging of *Escherichia coli*

O104:H4 and role of aerobactin during colonization of a mouse model of infection. *BMC Microbiol.* 2012; 12 (112): 1-11.

80. Datsenko K, A. Wanner B, L. One-step inactivation of chromosomal genes *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *PNAS.* 2000; 97(12): 6640-6645.
81. Cruz-Cordova A, Espinosa-Mazariego K, Ochoa S A, Saldaña Z, Rodea G. E, Cazares-Dominguez V, Rodriguez-Ramirez V, Eslava- Campos C. A, Navarro-Ocaña A, Arellano-Galindo J, Hernandez-Castro R, Gomez-Duarte O. G, Qadri F, Xicohtencatl-Cortes J. CS21 positive multidrug-resistant ETEC clinical isolates from children with diarrhea are associated with self-aggregation, and adherence. *Frontiers in Microbiology.* 2014; 5(709): 1-10.
82. Woolhouse M. E, Gowtage-Sequeria S. Host range and emerging and reemerging pathogens. *Emerg. Infect. Dis.* 2005; 11: 1842–1847.
83. Cole S. T. Who will develop new antibacterial agents? *Phil. Trans. R. Soc. B* 2014; 369: 1-7.
84. Lewis K. Antibiotics: recover the lost art of drug discovery. *Nature.* 2012; 485: 439–440.
85. McCarty J. S, Walker G. C. DnaK mutants defective in ATPase activity are defective in negative regulation of the heat shock response: expression of mutant DnaK proteins results in filamentation. *J. Bacteriol.* 1994; 176: 764–780.
86. Foucault M. L, Thomas L, Goussard S, Branchini B. R, Grillot-Courvalin C. In vivo bioluminescence imaging for the study of intestinal colonization by *Escherichia coli* in mice. *Appl. Environ. Microbiol.* 2010; 76: 264–274.
87. Doyle T. C, Burns S. M, Contag C. H. In vivo bioluminescence imaging for integrated studies of infection. *Cell. Microbiol.* 2004; 6: 303–317.
88. Myhal M. L, Laux D. C, Cohen P. S. Relative colonizing abilities of human fecal and K12 strains of *Escherichia coli* in the large intestines of streptomycin-treated mice. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 1982; 1: 186–192.
89. Bernier-Fébreau C, Du Merle L, Turlin E, Labas V, Ordonez J, Gilles A. M. Use of deosyribose by intestinal and extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains: a metabolic adaptation involved in competitiveness. *Infect. Immun.* 2004; 72: 6151–6156.
90. Bhinder G, Stahl M, Sham H. P, Crowley S. M, Morampudi V, Dalwadi U. Intestinal epithelium-specific MyD88 signaling impacts host susceptibility to

infectious colitis by promoting protective goblet cell and antimicrobial responses. *Infect. Immun.* 2014; 82: 3753–3763.

91. Mundy R, Girard F, Fitzgerald A. J, Frankel, G. Comparison of colonization dynamics and pathology of mice infected with enteropathogenic *Escherichia coli*, enterohaemorrhagic *E. coli* and *Citrobacter rodentium*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2006; 265: 126–132.
92. Allen K. P, Randolph M. M, Fleckestein J. M. Importance of heat-labile enterotoxin in colonization of the adult mouse small intestine by human enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. *Infect. Immun.* 2006; 74: 869–875.
93. Saldaña-Ahuactzi Z, Rodea G. E, Cruz-Córdova A, Rodríguez-Ramírez V, Espinosa-Mazariego K, González-Montalvo M. A, Ochoa S. A, González-Pedrajo B, Eslava-Campos C, López-Villegas E. O, Hernández-Castro R, Arellano-Galindo J, Patiño-López G, Xicohtencatl-Cortes J. Effects of *Ing* Mutations on *LngA* Expression, Processing, and CS21 Assembly in Enterotoxigenic *Escherichia coli* E9034A. *Frontiers in Microbiology.* 2016; 7(1201): 1-19.
94. Wadolkowski E. A, Burris J. A, O’Brien A. Mouse Model for Colonization and Disease Caused by Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infection and Immunity.* 1990; 58(8): 2438-2445.
95. Saldaña-Ahuactzi Z, Cruz-Córdova A, Rodea G. E, Porta H, Navarro-Ocaña A, Eslava-Campos C. Genome sequence of Enterotoxigenic *Escherichia coli* strain FMU073332. *Genome Announc.* 2017; 5(8): 1-2.