



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



INSTITUTO DE CIENCIAS

CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS

POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA

**ESTUDIO DE PROTEASAS QUE DEGRADAN
PROTEÍNAS SÉRICAS HUMANAS EN CEPAS DE
BACTERIAS GRAM NEGATIVAS RESISTENTES A
ANTIMICROBIANOS.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)

PRESENTA:

M. C. P. SALUSTIO NÁJERA HERNÁNDEZ. CVU: 1488

ASESORES DE TESIS:

D. C. CANDELARIO VÁZQUEZ CRUZ. CVU: 33878

D. C. ERASMO NEGRETE ABASCAL. CVU: 15045

RECONOCIMIENTOS Y AGRADECIMIENTOS

Institucionales:

Instituto de Salud del Estado de Chiapas.

Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas del Instituto de Ciencias de la BUAP.

A mis asesores:

Dr. Candelario Vázquez Cruz, quien como mi asesor principal me dio el privilegio y oportunidad de compartirme toda su experiencia y conocimiento.

Dr. Erasmo Negrete Abascal, como co-asesor siempre atento a mi formación doctoral y concediéndome sus consejos científicos inestimables y oportunos.

Dra. Ma. Patricia G. Sánchez Alonso, por su generosidad científica y aporte en todo el proceso de revisión de esta tesis.

Dr. Luís Javier Martínez Morales, por su apoyo incondicional como maestro y persona, encontrando en él siempre el consejo apropiado.

Dr. José Antonio Munive Hernández, por la confianza que me tuvo para continuar y concluir con este proyecto.

Dr. Eduardo Gómez Conde, por su invaluable apoyo y dedicación para la revisión y conclusión de esta tesis.

A mi familia, por estar siempre presente:

A mis padres: Prof. Salustio, Profa. Nelly.

Mis herman@s: Profa. Vianey, Profa. Mariana y Mtro. Derecho Abraham.

Mi esposa: Rachel Gil Messano.

Mis hijos: Gabriel Adiel y Fernando Adiel.

A todos mis compañeros y amigos de laboratorio, que de ellos me llevo los momentos compartidos de aprendizaje mutuo.

A la vida misma, que no la cambiaría por nada...

A la mente Maestra, al Arquitecto del universo, Creador de la naturaleza...

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	iv
ABREVIATURAS	viii
RESUMEN	ix
INTRODUCCIÓN	1
Generalidades de las proteasas.	2
Inmunoglobulinas y albúmina sérica humana.	7
Proteasas en microorganismos patógenos para el ser humano.	10
<i>Escherichia coli</i> de origen extraintestinal y su relación con las proteasas.	11
Plásmidos asociados con factores de virulencia y resistencia a betalactámicos.	13
Evidencias de degradación de proteínas por bacterias patogénicas de interés veterinario.	15
JUSTIFICACIÓN	19
OBJETIVOS	20
ESQUEMA DE TRABAJO	21
MATERIALES Y MÉTODOS	22
Proteínas y reactivos	22
1. Obtención de las muestras bacterianas.	22
2. Sensibilidad a los antimicrobianos.	23
3. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento.	23
4. Prueba de actividad proteolítica en placas de agar LB/sustrato.	24
5. Obtención de concentrados proteicos celulares y del sobrenadante (CPS).	24
6. Evaluación por electroforesis de la capacidad de degradación de las cepas clínicas empleando BSA (Albúmina Sérica Bovina) como sustrato.	25

7. Degradación de IgA, IgG y HSA por los aislados clínicos y de animales en SDS-PAGE.	25
8. Degradación de IgA, IgG y HSA por las cepas clínicas en presencia de cloranfenicol como inhibidor de la síntesis de proteínas.	26
9. Efecto del EDTA y CaCl ₂ en la degradación de IgA, IgG y HSA por las cepas clínicas.	26
10. Efecto de la glucosa en la actividad proteolítica de las cepas clínicas.	26
11. Efecto de inhibidores de proteasas, proteasas de otras bacterias, urea, Tritón X-100 en las actividades proteolíticas secretadas (APS) de los aislados bacterianos clínicos en SDS-PAGE al 10% y en zimogramas.	27
12. APS de los aislados clínicos en zimogramas.	28
13. Efecto del EDTA y CaCl ₂ en la APS de la cepa de <i>E. coli</i> 137 en zimogramas.	28
14. Efecto del pH y temperatura en la APS de <i>E. coli</i> 137 en zimogramas.	28
15. Cinética de acumulación de la actividad de las proteasas secretadas en algunos aislados de origen clínico en zimogramas.	29
16. Preparación de células competentes <i>E. coli</i> DH5 α .	29
17. Extracción de DNA plasmídico.	29
18. Transformación de células competentes <i>E. coli</i> DH5 α mediante choque térmico.	30
19. Determinación del patotipo de <i>E. coli</i> por Southern blot.	31
20. Secuenciación del genoma de la cepa clínica <i>E. coli</i> 137.	31
RESULTADOS	33
DISCUSIÓN	66
CONCLUSIONES	78
PERSPECTIVAS	79
BIBLIOGRAFÍA	80
APÉNDICE	98

Artículo:

Draft Genome Sequence of *Escherichia coli* Strain SN137, a Bacterium with Extracellular Proteolytic Activity on Immunoglobulins and Persistence in Human Tissue Blood.

102

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

TABLA	FIGURA	TÍTULO	PÁGINA
	Figura 1	Representación esquemática del mecanismo catalítico de las proteasas.	6
	Figura 2	Inmunoglobulina.	8
	Figura 3	Origen anatómico humano de los aislados.	34
	Figura 4	Porcentaje de especies de aislados clínicos obtenidos.	35
	Figura 5	Sitios de obtención de las <i>E. coli</i> y frecuencia de aislamiento.	36
	Figura 6	Clasificación de las <i>E. coli</i> de acuerdo a su origen.	36
	Figura 7	Actividad proteolítica de las cepas de origen clínico sobre IgG.	40
	Figura 8	Aislados bacterianos de cabeza de pollos incubados con IgG y HSA.	41
	Figura 9	Evaluación de la actividad proteolítica de dos cepas en presencia o ausencia de β -mercaptoetanol (BME).	42
	Figura 10	Efecto de la concentración de sustrato sobre la probable actividad proteolítica de dos cepas bacterianas.	42
	Figura 11	Actividad proteolítica de los aislados clínicos sobre IgG.	44
	Figura 12	Separación de proteínas por electroforesis de los	

	sobrenadantes de cultivos bacterianos.	44
Figura 13	Actividad proteolítica de los aislados clínicos sobre HSA.	45
Figura 14	Actividad proteolítica de la cepa 137 de <i>E. coli</i> .	46
Figura 15	Efecto del cloranfenicol sobre la actividad proteolítica de los aislados clínicos con el sustrato IgG.	47
Figura 16	Efecto del EDTA o CaCl ₂ en la actividad proteolítica de los aislados clínicos.	48
Figura 17	Efecto de la glucosa en la actividad proteolítica de los aislados clínicos sobre IgG.	49
Figura 18	Actividad de la glucosa en la actividad proteolítica de los aislados clínicos sobre HSA.	49
Figura 19	Efecto de inhibidores de proteasas sobre la actividad proteolítica de los CPS de la cepa 137 de <i>E. coli</i> .	50
Figura 20	APS de la cepa 137 (<i>E. coli</i>) en zimograma.	51
Figura 21	APS de la cepa 137 de <i>E. coli</i> en presencia de proteasas de otras <i>E. coli</i> e inhibidores de proteasas, en zimograma.	51
Figura 22	Actividad proteolítica de las <i>E. coli</i> de origen extraintestinal	

	sobre IgG y HSA.	53
Figura 23	APS de cepas de origen clínico productoras de proteasas para IgG e IgA.	53
Figura 24	APS de la cepa 137 de <i>E. coli</i> en presencia de EDTA y CaCl ₂ .	56
Figura 25	Actividad proteolítica de <i>E. coli</i> 137 en diferentes pH's y temperaturas.	57
Figura 26	Variación de la actividad enzimática en las cepas 124, 137 y 144 de <i>E. coli</i> productoras de proteasas respecto al tiempo.	58
Figura 27	Perfil electroforético de los plásmidos obtenidos de bacterias aisladas de cabezas de pollo.	59
Figura 28	Perfil electroforético de plásmidos obtenidos de aislados clínicos.	61
Figura 29	Filograma de proteínas PBP, betalactamasas, endopeptidasas, proteasas y proteínas con actividad miscelánea relacionadas con la biosíntesis de pared celular en <i>E. coli</i> cepa 137.	104
Tabla 1	Clasificación de las proteasas.	4
Tabla 2	Características principales de las inmunoglobulinas.	9
Tabla 3	Factores de virulencia y actividades asociadas con las vesículas de membrana externa.	13

Tabla 4	Relación de los aislados, origen y sensibilidad a la ampicilina.	34
Tabla 5	Distribución de los aislados clínicos y el sitio de obtención.	35
Tabla 6	Relación y número de los aislados clínicos.	36
Tabla 7	Sitios anatómicos de obtención de las <i>E. coli</i> .	36
Tabla 8	Distribución de las <i>E. coli</i> de acuerdo a su sitio de origen.	36
Tabla 9	Relación de cepas, sitio de obtención y resistencia o sensibilidad a 33 antimicrobianos.	38
Tabla 10	Actividad proteolítica en placas.	39
Tabla 11	Listado de cepas de origen clínico, sensibilidad y sustratos que degradan.	55
Tabla 12	Listado de cepas de origen clínico, sensibilidad, extracción de plásmidos y transformación.	60
Tabla 13	Listado de secuencias de las sondas empleadas en el diagnóstico de <i>E. coli</i> por Southern blot.	63
Tabla 14	Discriminación de la actividad proteolítica y presencia del gen <i>pet</i> , <i>tic</i> y <i>tsh</i> .	65

ABREVIATURAS

- aa** – Aminoácidos.
- Ac** – Anticuerpos.
- Ampr** – Ampicilina resistente.
- APEC** - *Escherichia coli* patógena aviar.
- APS**- Actividad proteolítica secretada
- BCIP** - 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato.
- BHI** – Infusión de cerebro y corazón.
- BME** – β -Mercaptoetanol.
- BSA** - Albumina sérica bovina.
- CaCl₂** - Cloruro de calcio.
- CPS** – Concentrado Proteico del Sobrenadante
- DNA** - Ácido desoxirribonucleico.
- DO** - Densidad óptica.
- EDTA** - Ácido etilendiaminotetraacético.
- EGTA** - Ácido etilenglicoltetraacético.
- ETEC** - *Escherichia coli* entero toxigénica.
- ExPEC** - *Escherichia coli* patógena extraintestinal.
- Fab** - Fracción de unión del anticuerpo.
- Fc** - Fracción cristalizable del anticuerpo.
- HCl** - Ácido clorhídrico.
- HSA** - Albúmina sérica humana.
- IgA** - Inmunoglobulina A.
- IgG** - Inmunoglobulina G.
- InPEC** - *Escherichia coli* patógena intestinal.
- kDa** - Kilodalton.
- LB** - Luria Bertani (agar o caldo).
- mM** - Milimolar
- NBT** - Nitroazul de tetrazolio.
- OMV** - Vesículas de membrana externa.
- Pet** – Plasmid-encoded toxin.
- Pic** – Protease Involved in intestinal colonization.
- PCR** - Reacción en cadena de la polimerasa.
- SDS-PAGE** - Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico.
- TSH** - Temperature-sensitive hemagglutinin.
- UFC** – Unidad Formadora de Colonias.
- Wt** – Silvestre.

RESUMEN

Las proteasas están ampliamente distribuidas en la naturaleza y llevan a cabo una gran variedad de procesos biológicos como la degradación, recambio y procesamiento de proteínas. Estas enzimas existen como diferentes moléculas en todas las células: microorganismos, plantas, animales y seres humanos, pero están sujetas a procesos específicos de control de expresión y de actividad bioquímica.

Algunas proteasas son consideradas factores de virulencia de microorganismos, porque participan en el desarrollo de la enfermedad infecciosa, tal es el caso del patógeno *Neisseria gonorrhoeae* que contiene una proteasa que coadyuva a la evasión de la respuesta inmune. En este trabajo se quiso saber si en *Escherichia coli* algunas proteasas secretadas tuvieran relación genética con el fenotipo de resistencia a betalactámicos, con base en que algunas proteasas y betalactamasas pertenecen a la misma familia de proteínas. Para ello se aislaron 40 cepas bacterianas de origen animal y 37 de origen clínico; en estos últimos aislados se observó que más del 65% de las cepas expresaban proteasas que degradan inmunoglobulinas humanas, y también HSA, principal proteína transportadora en el plasma; las proteasas observadas en estas bacterias tienen pesos moleculares que oscilan entre 25 y 200 kDa.

Una cepa *E. coli* SN137, aislada de un hemocultivo de un paciente ambulatorio con datos clínicos de infección no localizada, expresa una proteasa de alto peso molecular (160 kDa) que degrada IgA e IgG y HSA. La actividad enzimática fue activa en pHs entre 5.6 - 9.5 y temperaturas de 28 a 55°C, indicando amplia estabilidad enzimática. La bacteria en medio de cultivo líquido mostró evidente actividad proteolítica a las 24 h, que se prolongó hasta las 36 h, para disminuir posteriormente.

La actividad proteolítica de SN137 no se afectó por la presencia de inhibidores de proteasas, o por la adición de proteasas exógenas; y parece estar asociada a ácidos nucleicos. La identidad de esta(s) proteína(s) no pudo ser determinada(s), sin embargo, no está relacionada con las proteínas codificadas por los genes *pet*, *pic* y *tsh*, proteasas expresadas por diversos patotipos de *E. coli*; tampoco los plásmidos contenidos por esta cepa parecen codificar proteasas, ya que la transformación de *E. coli* DH5 α con ellos no indujo actividad proteolítica; además, el estudio del patotipo de SN137 a través de Southern blot indicó que la bacteria es no patógena para el ser humano.

La secuenciación del genoma de la *E. coli* 137 y el ensamblado de sus secuencias (reads), permitió llevar a cabo una comparación tipo MLST y deducir que éste microorganismo es del tipo APEC, y que su genoma contiene genes que codifican para proteasas e inhibidores de proteasas. Este trabajo muestra la capacidad de colonización de *E. coli* al tejido hemático, un entorno distinto al que típicamente habita, en el que quizás con ayuda de las proteasas aquí descritas evada eficazmente la respuesta inmune rica en IgG. Estas cepas pueden ser adicionalmente peligrosas por el daño que producirían al hidrolizar la HSA, que es una proteína de transporte importante para el ser humano y muy importante en el tratamiento de pacientes con infecciones sistémicas.

Palabras claves: ExPEC, proteasas, inmunoglobulinas y albúmina sérica humanas, APEC.

INTRODUCCIÓN

Algunas proteínas con secuencias aminoacídicas y estructuras tridimensionales diferentes pueden tener la misma función, este es el caso de las proteasas, cuyos pesos varían desde 14 hasta 212 kDa, en *Myxobacter* sp y *Lactobacillus delbruenkii* respectivamente (Rao *et al.*, 1998). Adicionalmente, en las bacterias existe una familia de enzimas relacionadas filogenéticamente cuya función y estructura puede diferir, aquí se mencionan tres grupos importantes (por función) para este proyecto: A) las transpeptidasas (una clase de proteasas), B) las proteínas de unión a penicilina (PBP-penicillin-binding-protein) y C) las betalactamasas (Bush *et al.*, 1995). Las proteínas que se unen a penicilina (PBP) son susceptibles de ligar derivados de la penicilina y con ello se inhibe su actividad enzimática, impidiendo la biosíntesis de péptido glicano; este es el caso de las bacterias susceptibles a los betalactámicos. Respecto al otro grupo, las betalactamasas contribuyen al fenotipo de resistencia a los betalactámicos de las bacterias, estas son enzimas que destruyen los antibióticos betalactámicos y de estas enzimas se conoce una gran variedad; estas evolucionaron de las PBPs. La función bioquímica natural de las PBPs y las betalactamasas es construir el péptido glicano durante el crecimiento bacteriano, por un proceso conocido como transpeptidación, en el cual está implícita la actividad de endopeptidasa (D-ala D-ala, o LD) (Coudron *et al.*, 2000; Winokur *et al.*, 2001). Experimentalmente por mutagénesis dirigida, en un modelo heterólogo de *E. coli*, se redujo la actividad de una betalactamasa de *Streptococcus pneumoniae* y simultáneamente se incrementó su actividad de proteasa. En otro experimento para la búsqueda de genes que codificaran proteasas como factores de virulencia en *P. multocida*, usando a *E. coli* DH5 α como modelo de expresión heteróloga, se observó que las transformantes con el plásmido pBluescript II KS (-) incrementaban la actividad de proteasa (Luna-Rivero 2003). Estos datos sugerían una actividad de proteasa inespecífica ligada al vector de clonación cuyo gen de selección es la betalactamasa. Las dos evidencias sugieren una relación importante entre las actividades enzimáticas de betalactamasas y proteasas, por lo que es importante

saber si las proteasas que degradan inmunoglobulinas también son betalactamasas. Para abordar esta hipótesis se eligió la bacteria *E. coli* por ser el modelo microbiano mejor comprendido, y se propuso investigar la capacidad productora de proteasas (IgG específica) en aislados resistentes a betalactámicos e identificar el posible gen o la probable proteasa implicada en ello.

Generalidades de las Proteasas.

La proteólisis es una actividad importante en varios procesos biológicos, que incluyen degradación, recambio y procesamiento de proteínas; además de la defensa contra patógenos (Runeberg-Roos *et al.*, 1994). Esta proteólisis es llevada a cabo por proteasas o peptidasas, una clase de enzimas que ocupan una posición importante con respecto a sus aplicaciones tanto en los campos comerciales como fisiológicos. Las enzimas proteolíticas catalizan el corte de uniones peptídicas en otras proteínas; por lo tanto, son consideradas enzimas degradativas que hidrolizan a las proteínas (Rao *et al.*, 1998).

Existen proteasas que son producidas por las plantas (papaína, bromelaina, queratinasas y ficina) (Rao *et al.*, 1998); las de origen animal, que son de las más conocidas (tripsina pancreática, quimotripsina, pepsina y renina) (Boyer 1971; Hoffman 1974) y las proteasas que tienen origen bacteriano, fúngico, viral o parasitario (Rao *et al.*, 1998, McKerrow *et al.*, 2006).

La importancia de las proteasas, radica en que ejecutan una amplia variedad de funciones fisiológicas complejas como en los procesos metabólicos y funciones regulatorias. Además, su papel es preponderante y crítico en procesos fisiológicos como catabolismo de proteínas, coagulación sanguínea, crecimiento celular y migración, arreglo de tejidos, morfogénesis, inflamación, crecimiento tumoral y metástasis, activación de zimógenos, liberación de hormonas y proteínas precursoras de péptidos activos farmacológicamente y transporte de proteínas secretadas a través de la membrana (Rao *et al.*, 1998). De manera general se

sabe que las proteasas extracelulares catalizan la hidrólisis de proteínas grandes a moléculas pequeñas para su subsecuente absorción por la célula, mientras que las proteasas intracelulares, tienen un papel crítico en la regulación del metabolismo (Rao *et al.*, 1998, Ganesan *et al.*, 2010).

La JCBN (*Joint Commission on Biochemical Nomenclature*) que integra a la IUPAC-IUBMB (*International Union of Pure and Applied Chemistry - International Union of Biochemistry and Molecular Biology*) y la NC-IUBMB, (*Nomenclature Committee of IUBMB*), ha clasificado de manera general a las enzimas como:

EC 1 oxidoreductases
EC 2 transferases
EC 3 hydrolases
EC 4 lyases
EC 5 isomerases
EC 6 ligases

De las cuales las hidrolasas (EC 3), que son de interés para este proyecto, a su vez se subclasifican de la siguiente manera:

EC 3.1	Acting on ester bonds
EC 3.2	Glycosylases
EC 3.3	Acting on ether bonds
EC 3.4	Acting on peptide bonds (Peptidases)
EC 3.5	Acting on carbon-nitrogen bonds, other than peptide bonds
EC 3.6	Acting on acid anhydrides
EC 3.7	Acting on carbon-carbon bonds
EC 3.8	Acting on halide bonds
EC 3.9	Acting on phosphorus-nitrogen bonds
EC 3.10	Acting on sulfur-nitrogen bonds
EC 3.11	Acting on carbon-phosphorus bonds
EC 3.12	Acting on sulfur-sulfur bonds
EC 3.13	Acting on carbon-sulfur Bonds

En el grupo EC 3.4, se incluyen todas las proteasas; de manera general se reconocen dos subclases de proteasas: las exopeptidasas (EC 3.4.11-19) y las endopeptidasas (EC 3.4.21-24 y EC 3.4.99) (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación General de las Proteasas.

CLASIF.	NÚMERO	NOMBRE	CANT. (2011)	ACCIÓN
	EC 3.4	Acción sobre los enlaces peptídicos (Peptidasas)		
EXOPEPTIDASAS	EC 3.4.11	Aminopeptidasas	21	Actúan sobre el N-terminal, liberando 1 residuo de aa
	EC 3.4.13	Dipeptidasas	12	Actúan sobre el N-terminal, liberando 2 residuos de aa
	EC 3.4.14	Dipeptidyl-peptidasas and tripeptidyl-peptidasas	8	Actúan sobre el N-terminal, liberando 2 o 3 residuos de aa
	EC 3.4.15	Peptidyl-dipeptidasas	4	Actúa sobre el C-terminal, libera 1 dipéptido
	EC 3.4.16	Serine-type carboxypeptidasas	4	En base a su mecanismo catalítico. Actúan sobre el C-terminal, liberando 1 aa.
	EC 3.4.17	Metallo-carboxypeptidasas	20	
	EC 3.4.18	Cysteine-type carboxypeptidasas	1	
	EC 3.4.19	Omega peptidasas	9	Remueven residuos terminales que están substituidos, ciclados o unidos por uniones isopeptídicas
SUBTOTAL			79	
ENDOPEPTIDASAS	EC 3.4.21	Serine endopeptidasas	98	Residuo serina en el sitio activo
	EC 3.4.22	Cysteine endopeptidasas	58	Residuo cisteína en el sitio activo
	EC 3.4.23	Aspartic endopeptidasas	40	Residuo aspártico (2) en el sitio activo
	EC 3.4.24	Metalloendopeptidasas	81	Requieren la presencia de un ion metálico (Zn, Co, Mn, Mg)
	EC 3.4.25	Threonine endopeptidasas	2	Residuo de treonina en el sitio activo, en lugar de serina
	EC 3.4.99	Endopeptidasas of unknown catalytic mechanism	0	
SUBTOTAL			279	
TOTAL			358	

Las exopeptidasas actúan únicamente cerca de los extremos de las cadenas polipeptídicas, en el extremo N-terminal; si liberan un residuo de aminoácido son llamadas aminopeptidasas (EC 3.4.11), o si liberan un dipéptido o tripéptido son llamadas dipeptidil-peptidasa o tripeptidil-peptidasa respectivamente (EC 3.4.14). Las exopeptidasas que actúan sobre el C-terminal y liberan un residuo de aminoácido son llamadas carboxipeptidasas (EC 3.4.16-18) o si liberan un dipéptido: peptidil-dipeptidasa (EC 3.4.15).

Las carboxipeptidasas se clasifican en 3 grupos con base en su mecanismo catalítico: las serin-carboxipeptidasas (EC 3.4.16), las metalocarboxipeptidasas (EC 3.4.17) y las cisteín-carboxipeptidasas (EC 3.4.18). Otras exopeptidasas son específicas para dipeptidos (dipeptidasas EC 3.4.13) o remueven residuos terminales que son substituidos, ciclados o unidos por uniones isopeptídicas (omega-peptidasas, EC 3.4.19).

Las endopeptidasas son divididas en subclases sobre la base de su mecanismo catalítico: serin-endopeptidasas (EC 3.4.21), cisteín-endopeptidasa (EC 3.4.22), aspártico-endopeptidasa (EC 3.4.23), metalo-endopeptidasa (3.4.24) y treonin-endopeptidasa (EC 3.4.25). Las endopeptidasas que no pudieron ser clasificadas en algunas de las subclases 3.4.21-25, son listadas en la subclase EC 3.4.99.

Generalmente una endopeptidasa hidroliza cadenas peptídicas de cualquier longitud, sin embargo, existe un grupo de endopeptidasas que actúan de manera óptima sobre sustratos o péptidos pequeñas, estas enzimas son llamadas oligopeptidasas (Barrett *et al.*, 2001; <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme>, fecha de consulta: 25 junio 2018).

Se puede observar en la Tabla 1, que la mayor cantidad de proteasas está en el grupo de las endopeptidasas, es decir 279, que equivalen al 78%, y las exopeptidasas son 79; estas 279 endopeptidasas están distribuidas en tan solo 5 subclases, en relación a las 8 subclases de las exopeptidasas.

El mecanismo catalítico de las proteasas incluye la formación de un intermediario covalente, denominado acil-enzima, este intermediario es resultado del ataque nucleofílico del grupo tiol que está presente en el sitio activo de la enzima sobre el carbono carbonílico de la unión éster o amida del sustrato unido a la enzima.

Existe primero una asociación, unión no covalente de la enzima libre y del sustrato, formando con ello el complejo de Michaelis. Posteriormente se lleva a

cabo la acilación de la enzima, con formación y liberación de un primer producto de la enzima ($R'NH_2$), que contiene ahora un nuevo extremo amino terminal. A continuación, el complejo acil-enzima reacciona con una molécula de agua para formar el segundo producto o paso de deacilación. Cuando este producto es liberado se produce la regeneración de la enzima libre. Sin embargo, se cree que existan varios estados de transición: formación de intermediarios tetraédricos transitorios (THI1 y THI2), y cuatro estados de transición (TS1, TS2, TS3 y TS4) que separan el complejo de Michaelis, la acil-enzima y el complejo enzima-producto de los dos intermediarios tetraédricos (Figura 1). Una de las características más importantes de las proteasas es su alta especificidad. El hecho de que un enlace peptídico sea hidrolizado o no por una proteasa depende de varios factores, entre ellos la secuencia de aminoácidos alrededor del enlace, ya que la mayoría reconocen aminoácidos o secuencias específicas. Otro requisito para que tenga lugar la hidrólisis es la accesibilidad estérica del enlace y se han de considerar también las condiciones físico-químicas del medio, dado que las proteasas presentan un rendimiento óptimo a determinadas condiciones de pH, fuerza iónica, temperatura y presencia de factores orgánicos y/o metálicos (Rao *et al.*, 1998; <https://www.ebi.ac.uk/merops/>, fecha de consulta: 25 junio 2018).

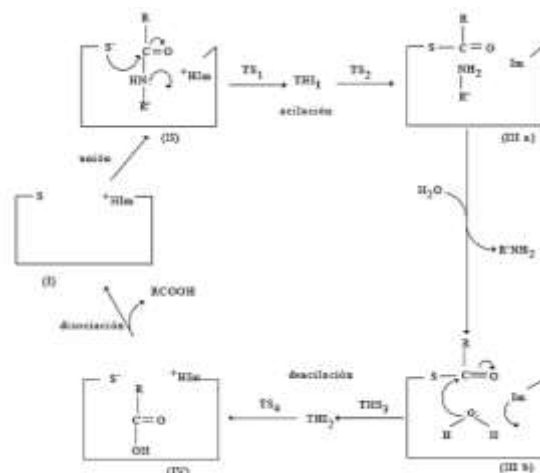


Figura 1. Representación esquemática de los diferentes pasos y de los intermediarios y estados de transición putativos involucrados en el mecanismo de reacción propuesto para la hidrólisis de un sustrato amídico por una peptidasa cisteínica. S-: grupo sulfhidrilo disociado de la cisteína; +HIm: grupo imidazólico disociado de la histidina. Tomado de Aislamiento, purificación y caracterización de las endopeptidasas cisteínicas presentes en frutos de *Pseudananas macrodentes* (Morr.) Harms (*Bromeliaceae*). Adriana Brullo. 2003.

Inmunoglobulinas y albúmina sérica humana.

Una parte importante en nuestro mecanismo de defensa son las inmunoglobulinas (Ig) o anticuerpos (Ac), estos forman parte de la inmunidad humoral y son producidos por los linfocitos B. Los Ac pueden encontrarse en la membrana de los linfocitos o ser secretadas en forma soluble y distribuirse en el suero y líquidos tisulares. En suero corresponden aproximadamente al 15% de las proteínas séricas y las IgG (Inmunoglobulina G) son la fracción más numerosa (Kindt *et al.*, 2007).

Las inmunoglobulinas son glicoproteínas producidas por las células del sistema inmune en respuesta a sustancias que son reconocidas como extrañas por el cuerpo humano, llamados antígenos, a los cuáles se unen específicamente, ya que estos inducen su formación. Existen cinco clases básicas de inmunoglobulinas que, agrupadas de mayor a menor concentración en el suero de un adulto normal, son: IgG, IgA, IgM, IgD e IgE. Las 5 diferentes clases de inmunoglobulinas realizan diferentes funciones en el sistema inmune. La IgA e IgG son de las más abundantes, la IgG corresponde al 80% de las inmunoglobulinas en el suero y junto con las demás forman el 15% del total de las proteínas séricas (Kindt *et al.*, 2007).

De manera general las inmunoglobulinas activan el complemento, facilitan la fagocitosis, median en el proceso de opsonización, atraviesan las membranas del organismo como la placenta, neutralizan microorganismos y toxinas. (Kindt *et al.*, 2007, Janeway *et al.*, 2008, Chames *et al.*, 2009, Contreras y Pereira 2009, Ganesan, *et al.*, 2010).

Mientras que IgG es la más abundante en el suero, la IgA es predominante en secreciones externas y mucosas, es la que previene la adherencia de los patógenos a las células de las mucosas e inhibe la colonización bacteriana o la infección viral (Kindt *et al.*, 2007).

Cuando las inmunoglobulinas son digeridas enzimáticamente con papaína se obtienen 3 fragmentos. Dos idénticos llamados Fab (Fracción AntiBody); cada fragmento Fab contiene la zona de la molécula responsable de la unión al antígeno. Un Fab está constituido por la mitad aminoterminal de una cadena pesada unida a la cadena ligera. Y un fragmento Fc (Fracción Cristalizable), formado por las dos mitades carboxiterminales de las cadenas pesadas. Con pepsina se consigue un fragmento bivalente (que reconoce dos antígenos), llamado F(ab)2 (fracción Fab doble) y dos péptidos grandes llamados pFc', así como pequeños fragmentos peptídicos que derivan de la zona de la molécula situada entre F(ab)2 y pFc' (Figura 2).

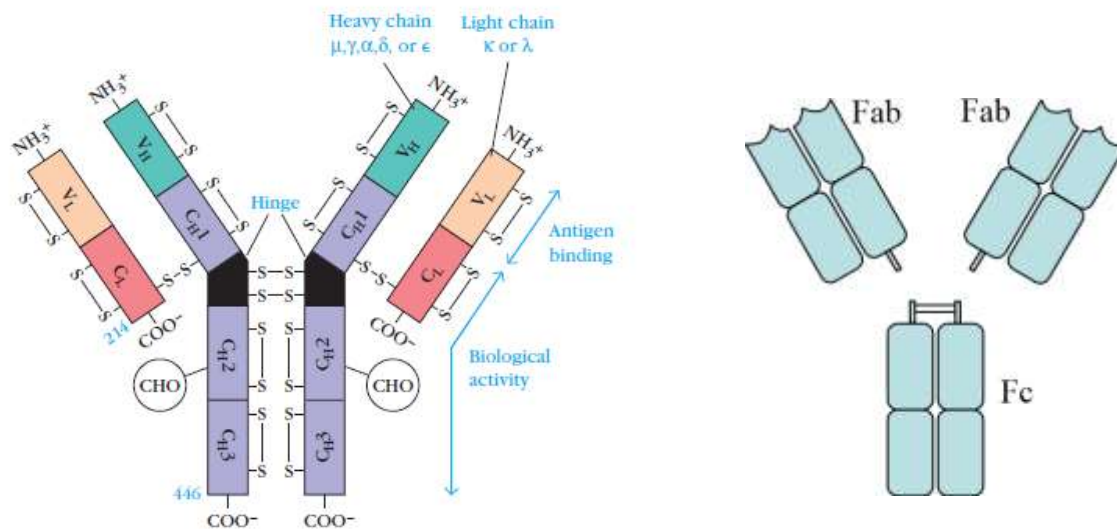


Figura 2. Inmunoglobulina. Tomado de Kuby Immunology, 6th ed. 2007 y Janeway *et al.*, 2001.

En la Tabla 2 se resumen las principales características de las Inmunoglobulinas, resaltando que la zona de la bisagra en algunas inmunoglobulinas es sensible a enzimas proteolíticas.

Tabla 2. Características principales de las Inmunoglobulinas.

Ac	SUBTIPO	ESTRUCTURA	FUNCIÓN PRINCIPAL	PESO (kDa)	[SÉRICA] %	[SÉRICA] mg/dl	VIDA MEDIA (días)	ZONA DE LA BISAGRA SENSIBLE A ENZIMAS PROTEOLÍTICAS
IgA	IgA1	Monómero	Inmunidad de mucosas	160-180	5	200	6-8	+++
	IgA2	Dímero		385				
IgD	---	Monómero	Diferenciación linfocitaria y ligando en la inmunoregulación	184	<1	3	3	+++
IgE	---	Monómero	Respuesta a parásitos	188	<1	0.05	2	-
IgG	IgG1	Monómero	Respuesta secundaria a patógenos. Inmunidad neonatal	145-165	85	1200	23-30	+++
	IgG2							
	IgG3							
	IgG4							
IgM	---	Pentámero	Respuesta primaria a patógenos	970	5-10	120	5-10	-

En lo que respecta a la albúmina sérica humana (HSA), es la proteína más abundante en el suero humano (30-50 g/l) (Kenanova *et al.*, 2010; Llewellyn *et al.*, 2010); tiende a unirse reversiblemente a una variedad abundante de ligandos para su transporte en el organismo como: aminoácidos, cationes divalentes, ácidos grasos, ácidos lipoteicoicos y proteínas bacterianas como las de *Streptococcus* y de otros microorganismos (Dik *et al.*, 2005; Llewellyn *et al.*, 2010). La HSA tiene dominios o sitios de unión a diferentes medicamentos, por lo que es una proteína importante en el transporte de éstos (Sugio *et al.*, 1999, Wosikowski *et al.*, 2003). En el área médica es útil como marcador de la función hepática de la respuesta de fase aguda de la sepsis e intoxicaciones (Soriani *et al.*, 1994; Maes *et al.*, 1999; Dik *et al.*, 2005; Llewellyn *et al.*, 2010), y posee un efecto expansivo del plasma (Halperin M, Goldstein, 1994; Hamdan, 2004).

Proteasas en microorganismos patógenos para el ser humano.

Como se ha señalado en el apartado anterior, las proteasas son fisiológicamente necesarias para todos los organismos, tanto superiores como inferiores; para los microorganismos, son indispensables para el mantenimiento propio y para su supervivencia en diferentes medios. Con respecto a las bacterias que son patógenas de humanos, su virulencia se encuentra relacionada a la secreción de proteasas extracelulares, por ejemplo, se ha reportado que *Pseudomonas aeruginosa* genera una proteasa (elastasa) que interactúa con las elastinas de neutrófilos aumentando el daño tisular en patologías como la fibrosis quística pulmonar, además rompe la transferrina y la lactoferrina, proteínas que limitan la disponibilidad del hierro para microorganismos patógenos, haciéndolo más disponible para los sideróforos bacterianos, y de esta manera inicia el daño pulmonar (Britigan *et al.*, 1993); *Legionella pneumophila* produce una metaloproteasa que inactiva IL-2 (interleucina 2) entre otras citocinas, además de degradar receptores de superficie de linfocitos; de esta manera provoca alteraciones en la respuesta inflamatoria (Mintz *et al.*, 1993). *Serratia marcescens* expresa una proteasa que inactiva el inhibidor C1 del complemento, produciendo una activación de la cascada del complemento (Molla *et al.*, 1989). *Helicobacter pylori* produce una metaloproteasa dependiente de zinc que se expresa en la superficie de la bacteria causando la proteólisis en una variedad de proteínas del hospedero y contribuyendo a la patología gástrica (Windle y Kelleher, 1997). *Staphylococcus epidermidis*, expresa varios tipos de proteasas, una de ellas es una metaloproteasa que hidroliza caseína y elastina, y es la responsable del daño a los tejidos (Teufel y Götz, 1993). De la misma manera, *Streptococcus* del grupo A producen proteasas que degradan el tejido del hospedero (Ashbaugh y Wessels, 2001). Adicionalmente hay un grupo de patógenos que colonizan las superficies de las mucosas que producen un grupo heterogéneo de endopeptidasas extracelulares, que hidrolizan específicamente a la IgA1; son las proteasas de la familia de inmunoglobulina A1 (IgA1), producidas por *Neisseria gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y

Streptococcus pneumoniae (Hedges *et al.*, 1998); dentro de este grupo también se encuentra *Porphyromonas gingivalis* que produce proteasas que degradan colágeno, el complemento, IgA e IgG (Imamura *et al.*, 1994). También *Proteus mirabilis* expresa una proteasa que degrada la cadena pesada de la IgA1, IgA2 e IgG, además de gelatina y caseína (Loomes *et al.*, 1992). *Pasteurella multocida*, microorganismo que afecta a diferentes organismos incluidas aves de corral, secreta metaloproteasas que degradan IgA e IgG humanas, así como de otras especies (Pouedras *et al.*, 1992, Negrete-Abascal *et al.*, 1999); otra bacteria que también degrada IgA e IgG humanas es *Serratia marcescens* (Molla *et al.*, 1988).

***Escherichia coli* (*E. coli*) de origen extraintestinal (ExPEC) y su relación con las proteasas.**

Una bacteria comensal en el intestino que llega a causar procesos infecciosos en el humano es *E. coli*. Esta bacteria es adquirida tanto en la comunidad como en hospitales (Picard *et al.*, 1999). Esta bacteria se clasifica en i) comensal no patógena, ii) patógena intestinal (InPEC) o iii) patógena extraintestinal (ExPEC) (Russo y Johnson, 2000; Pitout, 2012). En relación a su origen filogenético, las *E. coli* se clasifican en cuatro grupos: A, B1, B2 y D (Márquez *et al.*, 2018; Clermont *et al.*, 2000); previamente se ha reportado que los aislados causantes de infecciones extraintestinales (ExPEC), incluyendo las infecciones urinarias y la sepsis, derivan principalmente del grupo B2 y en menor proporción del grupo D, mientras que la *E. coli* comensal e InPEC derivan de los grupos A y B1 (Márquez *et al.*, 2018; Gaschignard *et al.*, 2017; Cordoni *et al.*, 2016; Toval *et al.*, 2014; Germon *et al.*, 2005; Picard *et al.*, 1999). Las ExPEC pueden causar infecciones del tracto urinario, neumonía, meningitis, infecciones intraabdominales, infecciones en tejidos blandos, osteomielitis y sepsis. Todas ellas enfermedades que son de alto impacto en salud pública por su alta incidencia, morbi-mortalidad y altos costos de tratamiento (Russo y Johnson, 2000, 2003). Las ExPEC provocan daño porque poseen factores de virulencia que les permiten evadir las defensas del hospedero, escapar del tracto entérico y entrar a nichos libres de competencia

microbiana, donde aprovechan los recursos del hospedero que son limitantes para los microorganismos comensales, con ello logran alterar la fisiología normal del hospedero y persistir en el medio ambiente (Donnenberg y Whittam, 2001; Johnson y Russo, 2002; Johnson *et al.*, 2003).

Algunos factores de virulencia de las ExPEC están relacionados con la adquisición de nutrientes, como proteasas y sideróforos; otros son herramientas que provocan daño, como toxinas, hemolisinas, adhesinas; y otros más contribuyen a la evasión de la respuesta inmune como cápsulas y lipopolisacáridos (Russo y Johnson, 2003; Johnson *et al.*, 2005; Soto, 2006). Puntualmente, uno de los factores de virulencia importantes menos estudiados son las proteasas secretadas que degradan inmunoglobulinas (Kornfeld y Plaut, 1981; Pouedras *et al.*, 1992; Miyoshi y Shinoda, 2000).

Se ha descrito que las ExPEC que infectan vías urinarias hidrolizan IgA de mieloma, pero no IgG, IgM o IgA secretora (Milazzo y Delisle, 1984); en otra investigación se reportaron cepas de *E. coli* aisladas de tracto respiratorio con capacidad de degradar IgA secretora, mientras que cepas aisladas de tejidos diferentes al tracto respiratorio, no la degradaron (Diebel *et al.*, 2004). En un trabajo más reciente no se observó degradación de IgA, IgA secretora e IgG por diferentes ExPEC (Russo y Carlino-MacDonald, 2008). En las bacterias, la capacidad de hidrolizar inmunoglobulinas puede asociarse a caracteres codificados por plásmidos R que pueden contener factores de virulencia (Eslava *et al.*, 1998; Fricke *et al.*, 2008; Johnson y Nolan, 2009). Incluso un marcador de resistencia a betalactámicos se relaciona con la actividad de proteasa, propia de las proteínas que unen la penicilina (Godfrey *et al.*, 1981; Ghosh *et al.*, 1998; Peimbert y Segovia, 2003). La expresión de factores de virulencia puede modificarse por señales ambientales que le indican a un microorganismo cuándo y dónde expresarlos, ya que esto requiere un gasto metabólico importante para el patógeno. Por lo tanto, los factores se presentan de acuerdo a las necesidades de la bacteria y a las condiciones del medio ambiente, por ejemplo, los factores

ambientales y la composición del medio de cultivo pueden influir en la secreción de las proteínas de los microorganismos (Kornfeld y Plaut, 1981; Kuo *et al.*, 2016).

Otro factor importante en procesos infecciosos, relacionados a proteasas y degradación de proteínas humanas es la producción de vesículas de membrana externa (OMV-Outer Membrane Vesicles), estas OMV están constituidas por segmentos de la membrana externa de la bacteria que se forman y liberan durante su crecimiento (Muralinath *et al.*, 2011). Las OMV's de *E. coli* y otras bacterias que contienen toxinas y proteasas interactúan con células bacterianas y de mamíferos (Ellis y Kuehn, 2010), tal es el caso de las OMV's de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) (Roy *et al.*, 2011) (Tabla 3).

Tabla 3. Factores de virulencia y actividades asociadas con las vesículas de membrana externa. (Ellis y Kuehn, 2010).

Especie	Factores de virulencia asociados a vesículas	Actividad asociada a virulencia
ExPEC	Alpha-hemolisina, CDT, OMP que se unen a hierro y hemina	Hemolítica, causa descamación celular
ETEC	LT (heat-labile enterotoxin)	Actividades enterotóxicas y vacuolizantes
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Proteasas	Actividades enzimáticas
<i>Legionella pneumophila</i>	Proteasas	Actividades proteolíticas
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	Proteasas	Actividad proteolítica

Plásmidos asociados con factores de virulencia y resistencia a betalactámicos.

En la mayoría de las bacterias, además del genoma, existe información genética en forma de elementos extracromosomales o plásmidos. Éstos son el componente más dinámico del genoma bacteriano, ya que son fácilmente movilizables entre cepas de la misma o diferente especie, por tanto, tienen un papel importante en la

supervivencia bacteriana en diferentes ambientes. En algunos microorganismos la presencia de plásmidos se ha asociado con su capacidad de colonizar diferentes hospederos (Loeza *et al.*, 2004).

En plásmidos de bacterias se puede encontrar información para asimilar azúcares (lactosa, sacarosa), para producir colicinas (substancias que matan a posibles competidores de la misma especie), resistencias a antibióticos y a metales pesados, la nodulación de raíces de leguminosas, inmunidad contra fagos y genes que codifican para intercambio genético, fimbrias relacionadas con la patogénesis y toxinas (Madigan *et al.*, 2000, Souza *et al.*, 2001). Los plásmidos son frecuentes en *E. coli* aunque no son indispensables para su supervivencia y pueden constituir un porcentaje elevado de su genoma, por ejemplo, en un estudio en esta bacteria se describieron 390 diferentes plásmidos del tipo F, en el 15% de la muestra estudiada (Boyd *et al.*, 1996), aunque ese número cada vez es mas grande (Johnson y Nolan 2009; Yamashita *et al.*, 2014).

En varias bacterias se ha puesto de manifiesto que el metabolismo proteolítico de la célula se afecta por la presencia de este material genético extracromosomal, el cual puede codificar funciones degradativas de proteínas; tal es el caso de los genes de proteasas en plásmidos como *tsh*; este último es un gen en *E. coli* que codifica para una hemaglutinina, y que es homólogo de los genes *iga* de *H. influenzae* y del gen de proteasa contra IgA1 humana de *N. gonorrhoeae* (Provence y Curtiss, 1994). También la proteasa Hbp, que se ha caracterizado en *E. coli*, interactúa con la hemoglobina humana, degradándola y posteriormente se une a los grupos hemos liberados (Otto, *et al.*, 1998). Otra proteína homóloga a Tsh es SepA, que es una proteína extracelular en *S. flexneri* que le permite a la bacteria invadir los tejidos del hospedero y también posee actividad proteolítica del tipo de serín-proteasa (Benjelloum-Touimi *et al.*, 1995). Otra serin-proteasa es la proteína Pic de *E. coli* enteroagregativa (EAEC), y de *S. flexneri*, que promueve la colonización en presencia de mucina (Harrington *et al.*, 2009). También la toxina Pet de las EAEC, codificada por plásmidos, le permite invadir a las células

epiteliales (Navarro-García *et al.*, 2001). Finalmente, la serin-proteasa extracelular EspP de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), reduce las actividades de los factores de la coagulación, disminuyendo la amplitud del coágulo e incrementando la lisis celular (Kuo *et al.*, 2016).

En ninguno de los casos citados arriba se ha asociado la actividad proteolítica con la presencia de genes que codifiquen betalactamasas. Aunque, es frecuente obtener bacterias silvestres con fenotipos de resistencia a los betalactámicos y que los genes de esta resistencia radiquen en los plásmidos (Briñas *et al.*, 2002; Mirzaagha *et al.*, 2011). La única evidencia débil al respecto en bacterias de laboratorio que mejoran su actividad proteolítica por una betalactamasa fue obtenida por Luna-Rivero en 2003, la evaluación de esta evidencia parece obligada para validar o descartar la posible hipótesis de la asociación de alguna actividad proteolítica con la actividad de betalactamasas.

Evidencias de degradación de proteínas por bacterias patogénicas de interés veterinario.

La Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) desde el año 2000 ha postulado que el cuidado de la salud humana y animal tiene una vertiente única englobada en un programa mundial denominado “UNA SOLA SALUD”. Algunas investigaciones a nivel nacional en este contexto han sido hechas por investigadores mexicanos, incluyendo a algunos de la BUAP y la UNAM. En 1999, Negrete y cols. estudiaron la capacidad de *Pasteurella multocida* para secretar peptidasas al medio de cultivo y caracterizaron 5 aislados provenientes: 1 de gallina, 1 de bovino, 1 de oveja y 2 de cerdo. Encontraron que todos los aislados secretaban peptidasas en un amplio rango de masa molecular, y con un patrón de actividad proteolítica similar entre las distintas muestras del mismo aislado, pero diferente entre los aislados de los distintos animales estudiados, sugiriendo que el hospedero pudiera estar regulando su expresión.

Estas peptidasas fueron activas en un amplio rango de pH y catalogadas como metalo-peptidasas ya que su actividad fue totalmente inhibida en presencia de los agentes quelantes EDTA y EGTA, pero no en presencia de inhibidores de Serin o Cistein-peptidasas y restaurada la actividad por calcio. Además, estas proteasas fueron capaces de degradar IgG (Negrete *et al.*, 1999).

Para avanzar en la investigación sobre el papel de las peptidasas extracelulares en la patogenicidad inducida por *P. multocida*, se llevó a cabo un proyecto de tesis en el 2003 (Luna-Rivero) con la finalidad de obtener una clona con actividad proteolítica estable *in vitro* en un sistema heterólogo, obteniéndose la clona NL478 que mostró gran actividad proteolítica en *E. coli* al ser probada en diversos sustratos como caseína, gelatina, hemoglobina bovina, hemoglobina porcina y hemoglobina de humanos; dicha clona mostró actividad en un amplio rango de pH desde 5.4 hasta 10, conservándose una mayor actividad entre 7 y 9. Dicha clona expresaba una metalo-peptidasa estable hasta 50° C con una diferencia de tamaño entre la actividad proteolítica secretada y la observada intracelularmente (50 y 126 kDa respectivamente) y conservando su estabilidad *in vitro*.

Los atributos descritos de la clona NL478, resaltan la importancia que pudieran tener las proteasas como factores de virulencia en *P. multocida*; la actividad proteolítica a diferentes valores de pH (5-10) podría proporcionarle al microorganismo la facilidad de sobrevivir en diferentes condiciones ambientales; ya que si la peptidasa mantiene su actividad en el rango mencionado sería capaz de evadir la respuesta inmune y posiblemente ser activa en los tejidos del hospedero sin importar las alteraciones de pH producidas de la liberación del contenido de las células del tejido afectado.

Con respecto a la estabilidad térmica, la peptidasa sería capaz de mantener su actividad en la temperatura normal del cuerpo e incluso durante el aumento de esta en un proceso infeccioso o respuesta inflamatoria. Las metalo-peptidasas dependientes de zinc y calcio, también se han reportado en bacterias patógenas

importantes como *Haemophilus*, *Streptococcus* (Uwe *et al.*, 2001) y *Pseudomonas* (Britigan *et al.*, 1993).

En *P. multocida* PM70, se ha descrito la presencia de la peptidasa PqqL, la cual es una enzima/proteasa metal-dependiente perteneciente a la familia M16; diferentes metaloendopeptidasas de esta familia no se les conoce una función específica. Esta enzima se localiza en la membrana interna o espacio periplásmico y está implicada en el transporte y unión a proteínas. La presencia del gen que codifica para esta metalopeptidasa ha sido detectada en algunas bacterias Gram negativas como *E. coli* y *Shigella spp.*, y en miembros de la familia *Pasteurellaceae* como *Actinobacillus spp.* y *Haemophilus spp.* en los cuales puede fungir como factor de virulencia (Takaya *et al.*, 2003).

En 2006, caracterizando las secuencias involucradas en la secreción de peptidasas en *P. multocida*, Juárez Escalante, demostró la actividad proteolítica de los genes *pqqL* y *lon* en un sistema heterólogo; el gen *pqqL* no mostró gran actividad proteolítica secretable, mientras que el gen *lon* contribuye a producir una actividad preoteolítica secretable, la cual fue más evidente después de 48 horas de crecimiento de la bacteria.

En base a las observaciones mencionadas resultaba interesante probar y proponer la existencia de peptidasas codificadas en los plásmidos de algunas bacterias, ya que algunas presentan fenotipos proteolíticos variables, como sería el esperado para caracteres asociados a elementos genéticos móviles.

Precisamente al comenzar la búsqueda de proteasas codificadas en plásmidos se encontró un plásmido de 15 kb aproximadamente en la cepa OV de *P. multocida* aislada de cerdo y se comenzó a estudiar. El plásmido se cortó con la enzima EcoRI y se obtuvieron 4 fragmentos con tamaños aproximados de 7, 4, 2 y 1.5 kb, los cuales fueron clonados en *E. coli*.

Al analizar la actividad proteolítica codificada por dichos fragmentos sobre caseína, se observó que el fragmento de 7 kb expresaba la actividad proteolítica. Dicho fragmento podía ser digerido en dos fragmentos de 3 y 4 kb, conservando el último fragmento al gen responsable de la actividad proteolítica (Zavaleta, 2007; Juárez, 2006). Adicionalmente, en estos experimentos se observó un fondo más alto de actividad proteolítica en las bacterias *E. coli* DH5 α transformadas con el vector pBluescript II KS(-) respecto a las no transformadas. En este experimento el único gen posiblemente asociado a proteasas fue el gen que codifica la betalactamasa. Sin embargo, no se profundizó más en este fenómeno que complicó el escrutinio de genes que codifican proteasas.

JUSTIFICACIÓN

La adquisición de plásmidos permite a las bacterias obtener genes que contribuyen a su virulencia, como los que codifican para peptidasas, toxinas, adhesinas y resistencia a antibióticos, entre otros. Estos genes ayudan a la bacteria patógena a adaptarse a un nuevo ambiente en el hospedero, durante la colonización y la invasión de los tejidos y órganos. Este proceso patogénico provoca daño tisular al hospedero, el cual es más severo por la presencia de resistencia a los antimicrobianos porque es invulnerable al tratamiento curativo. En este contexto, la degradación de inmunoglobulinas por proteasas bacterianas y las betalactamasas de las bacterias resistentes a betalactámicos, pueden tener una relación bioquímica y filogenética, porque las betalactamasas tienen al menos actividad de endopeptidasa D-ala D-ala. Sin embargo, es poco conocida la asociación de genes plasmídicos de resistencia a betalactámicos de cepas de origen clínico, con la posible expresión de actividad proteolítica extracelular, y aunque en *E. coli* que es una de las bacterias mejor conocidas, se ha reportado que, sólo un muy bajo porcentaje de cepas producen una probable proteasa de IgG. Por tanto, en este trabajo se propuso encontrar una relación entre betalactamasas de origen plasmídico y proteasas, en un grupo de bacterias resistentes a betalactámicos productoras de proteasas contra proteínas séricas incluyendo inmunoglobulinas. Para cumplir este propósito se hicieron estudios bioquímicos que dieran certeza de la actividad proteolítica secretable, estudios genéticos de transferencia de plásmidos que limpiarán el fondo genético bacteriano y un estudio genómico que ayudará a profundizar en la genética encriptada de una bacteria con los dos fenotipos problema de esta investigación; proteasas secretadas y resistencia a betalactámicos.

OBJETIVOS

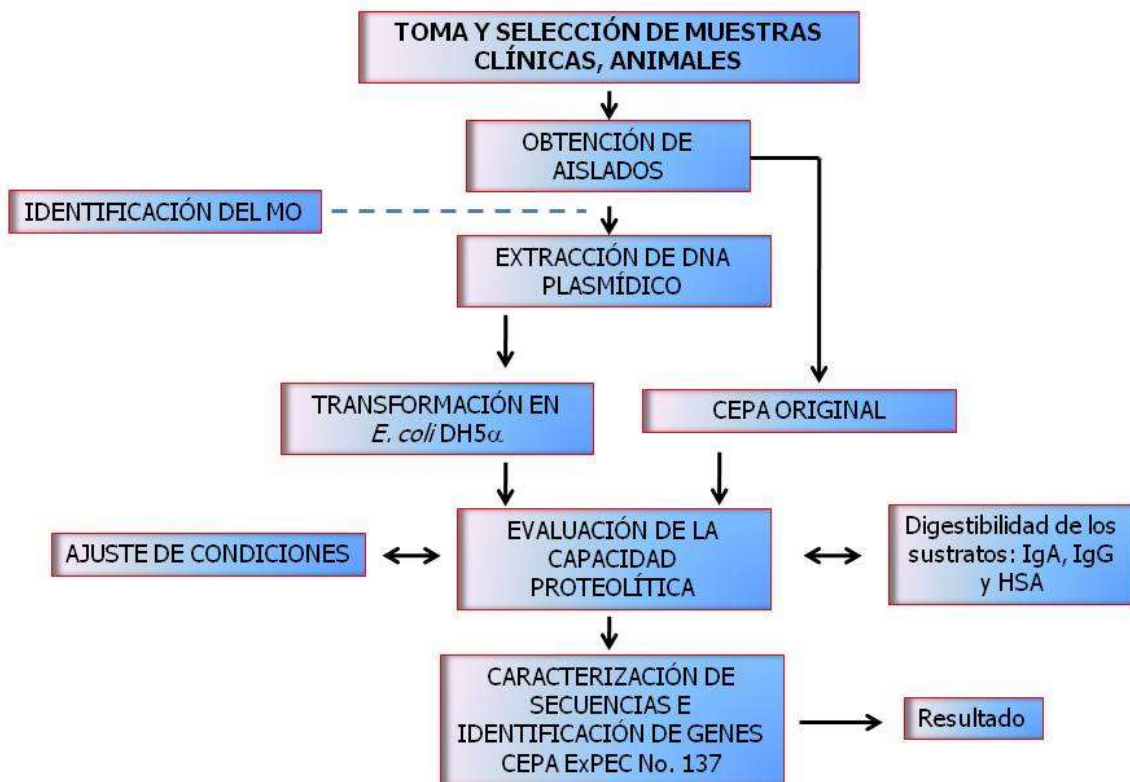
OBJETIVO GENERAL

Analizar la producción de proteasas que degradan proteínas séricas humanas en cepas de bacterias resistentes a antimicrobianos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Aislar bacterias que sean resistentes a antimicrobianos (preferentemente a betalactámicos) de casos clínicos humanos y de alimentos frescos.
2. Identificar a los microorganismos aislados mediante pruebas bioquímicas y PCR.
3. Seleccionar bacterias resistentes a antibióticos betalactámicos.
4. Evaluar la capacidad de degradación proteolítica de las cepas seleccionadas sobre los sustratos de IgA, IgG y HSA.
5. Transformar genéticamente a *E. coli* DH5 α con los plásmidos obtenidos de los microorganismos aislados de los casos clínicos.
6. Evaluar la capacidad de degradación proteolítica en extractos protéicos nativos de las cepas originales y de las transformantes de *E. coli*.
7. Secuenciar el genoma de una cepa hiperproteolítica seleccionada (ExPEC 137), e identificar *in silico* los genes relacionados con proteólisis.

ESQUEMA DE TRABAJO



MATERIALES Y MÉTODOS

Proteínas y reactivos:

Para la evaluación de la actividad proteolítica se tuvieron como sustratos a IgA, IgG y a HSA. Se utilizó una solución de IgA secretora con 1.6 mg/ml (Sigma-Aldrich® Co. LLC). La IgG fue de una solución inyectable de Inmunoglobulina G humana normal con 160 mg/ml, de la marca Beriglobina® P (Aventis Behring GmbH), en tanto que la albúmina sérica humana fue de una solución inyectable al 20% de la marca Probialbumin® (Octapharma S. A. de C. V.). Las proteínas fueron diluidas de acuerdo a las concentraciones requeridas para cada experimento con agua inyectable estéril (PiSA® Farmacéutica). Las diluciones 1:100 se expresan de la siguiente forma: para IgG 10 µg/6 µl, para HSA o BSA 10 µg/5 µl y para IgA 10 µg/6.25 µl, utilizándose estas diluciones en todos los experimentos realizados. Los inhibidores de proteasas que se utilizaron fueron de “Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets in glass vials” (Roche®), que reporta las siguientes concentraciones y fuente de las proteasas Chymotrypsin, 1.5 µg/ml (Serine); Thermolysin, 0.8 µg/ml (Metallo); Papain, 1 mg/ml (Cysteine); Pronase, 1.5 µg/ml (Mixture); Pancreatic extract, 1.5 µg/ml (Mixture) y Trypsin, 0.002 µg/ml (Serine); para su uso se siguieron las indicaciones del fabricante. Se utilizó también Cloranfenicol solución de 5 mg/ml de la marca Cloramfeni ofteno (Sophia®).

1. Obtención de las muestras bacterianas:

Los aislados bacterianos se obtuvieron de dos fuentes: de origen animal y de origen humano. Los aislados de origen animal se obtuvieron de 4 cabezas de pollo recién sacrificados en un mercado público de la ciudad de Puebla, que se trasladaron inmediatamente al laboratorio para su manipulación en área estéril. A través de un hisopo estéril se realizó un raspado leve de la superficie profunda de orofaringe (paladar superior).

Los aislados de origen humano se obtuvieron en un período de 3 meses (mayo – julio/2011), de pacientes ambulatorios no hospitalizados, sin restricción de edad y

sexo, quienes acudieron a un laboratorio particular en la ciudad de Puebla, para la realización de estudios bacteriológicos. Estos aislados provenían de diferentes sitios anatómicos: urocultivo, hemocultivo, coprocultivo, absceso de piel, herida quirúrgica, exudado faríngeo, exudado vaginal, exudado uretral y secreción bronquial.

2. Sensibilidad a los antimicrobianos:

La sensibilidad de los aislamientos clínicos a los antimicrobianos se determinó mediante el método de Kirby-Baüer que mide la susceptibilidad bacteriana frente a fármacos específicos que difunden en agar (CLSI, 2009). Para esta prueba se utilizaron 33 antibióticos: 4 Aminoglucósidos (Amikacina, Gentamicina, Netilmicina y Tobramicina); 15 antibióticos betalactámicos: Imipenem (Carbapenémico), Cefalotina (Cefalosporina de 1ª. generación), Cefuroxima (Cefalosporina de 2ª. generación), Cefotaxima, Ceftazidima y Ceftriaxona (Cefalosporinas de 3ª. generación), Cefepime (Cefalosporina de 4ª. generación), Amoxicilina/Ácido clavulánico (del grupo de inhibidores betalactámicos), Aztreonam (Monobactámico), Ampicilina, Carbenicilina, Dicloxacilina, Oxacilina, Penicilina y Ticarcilina (del grupo de las Penicilinas); además se utilizó 1 antibiótico Glicopéptido (Vancomicina), 2 macrólidos (Azitromicina y Eritromicina), 5 del grupo de las Quinolonas (Ciprofloxacino, Gatifloxacino, Levofloxacino, Norfloxacino y Ofloxacino); también se emplearon el Trimetoprim con Sulfametoxazol (Sulfonamida), Tetraciclina, Cloranfenicol, Lincomicina, Nitrofurantoína y Rifampicina (Brunton *et al.*, 2011). La sensibilidad a los antimicrobianos de los aislamientos obtenidos de las cabezas de pollo no se determinó.

3. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento:

Las bacterias fueron sembradas y aisladas por estría cruzada; los aislados de origen animal fueron sembrados en placas de Petri con medio LB (Luria Bertani) con ampicilina a una concentración de 100 µg/ml y en placas con Gelosa y sangre de carnero al 5%, incubándose toda la noche a 37° C.

Las bacterias de origen clínico fueron sembradas en placas de Agar McConckey para identificar las bacterias lactosa positivas y de Gelosa-sangre para observar la posible producción de hemólisis. La identificación de género y especie se realizó únicamente en los aislados de origen clínico por tinción de Gram y con pruebas bioquímicas de uso rutinario en el laboratorio clínico: Citrato, Fenilalanina, LIA (Lisina Hierro Agar), MRVP (Rojo de Metilo-Voges Proskauer), MIO (Movilidad Indol Ornitina), OF (Agar Oxidación/Fermentación entérica) (Agar Oxidación), utilización de lactosa, producción de oxidasa y de catalasa, TSI (Agar Hierro Triple Azúcar) y urea. Las bacterias que fueron resistentes a betalactámicos se sembraron rutinariamente en placas de Petri con agar LB adicionado con 100 µg/ml de ampicilina (Barrow y Feltham, 2004; Mac Faddin, 2003).

4. Prueba de actividad proteolítica en placas de agar LB/sustrato:

La determinación de la actividad proteolítica de las cepas, se realizó por la observación de halos de hidrólisis en placas de LB con caseína al 1%. Las colonias bacterianas se sembraron por estría en placas de LB/Ampicilina/caseína al 1% y se incubaron a 37° C por 24, 48 o 72 h. Una vez transcurrido el tiempo de incubación las colonias crecidas fueron retiradas del agar con ayuda de un hisopo. Las placas fueron tratadas con buffer Tris-HCl 50 mM pH 7.5 durante 24 h. El exceso de buffer fue desechado y se agregó ácido acético al 10% durante 1 h para facilitar la captación del colorante azul de Coomassie, posteriormente se desechó el exceso de ácido acético y las placas se tiñeron toda la noche con azul Coomassie al 1% para contrastar los halos de hidrólisis.

5. Obtención de concentrados proteicos celulares y del sobrenadante (CPS):

Para obtener los concentrados celulares y proteicos, las bacterias se cultivaron en tubos Falcon® de 50 ml con 10 ml de LB-ampicilina (100 µg/ml) y con agitación constante a 37° C por 24 h. La suspensión bacteriana se centrifugó a 3600 rpm/15 minutos para concentrar el paquete celular. El paquete celular se resuspendió en 1.5 ml de Tris-HCl 50 mM pH 7.5, para hacer un escrutinio en SDS-PAGE de la actividad proteolítica. Mientras que para analizar la actividad proteica retenida en

los sobrenadantes, a estos se le agregaron 2 volúmenes de metanol frío y se le dejó en refrigeración toda la noche a 4° C para obtener la APS. La mezcla con metanol se centrifugó a 3600 rpm/15 minutos y el precipitado proteico se resuspendió con 100 µl de Tris-HCl 50 mM pH 7.5 para su posterior evaluación en zimogramas o SDS-PAGE. El contenido de CPS era de 20 µg de proteína.

6. Evaluación por electroforesis de la capacidad de degradación de las cepas clínicas empleando BSA (Albúmina Sérica Bovina) como sustrato:

De un paquete celular de cada cepa crecida (paso 5) fue resuspendida con 1.5 ml Tris-HCl 50 mM pH 7.5, se tomaron 20 µl, que fueron transferidos a un tubo Ependorff®, a los cuales se les agregó 10 µg BSA en solución (ver apartado de Proteínas y reactivos), y se dejó incubando a temperatura ambiente por 30 min. Posteriormente se centrifugó a 13000 rpm/5 minutos, se retiró el sobrenadante y se reconstituyó el paquete celular con 50 µl Tris-HCl 50 mM pH 7.5, se repitió este procedimiento una vez más, y finalmente el paquete celular se resuspendió en 20 µl Tris-HCl 50 mM pH 7.5 y se le agregaron 10 µg de BSA, se dejó incubando por 3 h a 37° C. Posteriormente se centrifugó a 13000 rpm/15 minutos. Se descartaron los paquetes celulares, los sobrenadantes sin desnaturalizar por calor fueron separados por electroforesis, en un gel tipo SDS-PAGE (SDS al 1%-PAGE al 10%) a 90 V. Los geles fueron teñidos con Coomassie-blue R-250 para observar las bandas de proteínas (Sambrook y Rusell 2001). Los procedimientos electroforéticos fueron realizados a las mismas condiciones a lo largo de todo el desarrollo de esta tesis.

7. Degradación de IgA, IgG y HSA por los aislados clínicos y de animales en SDS-PAGE:

Con los paquetes celulares se hizo el escrutinio de actividad proteolítica empleando 20 µl que contenían aproximadamente 1×10^5 UFC en Tris-HCl 50 mM pH 7.5 y con 2.5, 5, 10 o 20 µg de sustrato (IgA, IgG o HSA) (Ver el apartado Proteínas y reactivos). La mezcla se incubó a 37° C durante 3, 12, 24 o 72 h sin

agitación y se centrifugó a 13000 rpm/15 minutos. Los productos del sobrenadante se analizaron sin desnaturalizar por calor en SDS-PAGE al 10% (Sambrook y Rusell 2001; Negrete-Abascal *et al.*, 1994, 2004).

8. Degradación de IgA, IgG y HSA por las cepas clínicas en presencia de cloranfenicol como inhibidor de la síntesis de proteínas:

Se tomaron 750 μ l del paquete celular resuspendido con Tris-HCl 50 mM pH 7.5, a los cuales se les agregó Cloranfenicol en solución (20 μ g/ml), y se dejó incubando a temperatura ambiente por 2 h. Otros 750 μ l se dejaron a temperatura ambiente como control. Las suspensiones bacterianas se centrifugaron a 13000 rpm/5 minutos, se retiró el sobrenadante y se volvió a resuspender el paquete celular con 750 μ l de Tris-HCl 50 mM pH 7.5. Se tomaron 20 μ l de cada suspensión celular en un Ependorff[®], se agregaron 10 μ g de IgG y se incubó por 3 h a 37° C sin agitación. Posteriormente se centrifugaron a 13000 rpm/15 minutos. Se recuperaron los sobrenadantes, y sin desnaturalizar por calor, fueron separados electroforéticamente en presencia de SDS. (Sambrook y Rusell 2001). Como control negativo la proteína IgG fue incubada sola el mismo tiempo.

9. Efecto del EDTA y CaCl₂ en la degradación de IgA, IgG y HSA por las cepas clínicas:

Para la determinación de esta actividad, se tomaron 20 μ l de la suspensión celular obtenida en el paso 5 y se depositó en un Ependorff[®] al que se le agregaron 10 μ g de IgG humana (o bien IgA o HSA) y EDTA 20 mM (1.6 μ l) o CaCl₂ 10 mM (4 μ l), se incubaron por 3 h a 37° C. Se centrifugó a 13000 rpm/15 minutos, se descartó el paquete celular y el sobrenadante sin desnaturalización térmica fue sometido a electroforesis en presencia de SDS (Sambrook y Rusell 2001).

10. Efecto de la glucosa en la actividad proteolítica de las cepas clínicas:

Del paquete celular del paso 5, se tomaron 20 μ l en un Ependorff[®] y se le agregaron 2.5 μ g de IgG o HSA (Ver el apartado de Proteínas y reactivos), la

mezcla se incubó por 3-24 h a 37° C en buffer neutro (Tris-HCl 50 mM pH 7.5) con glucosa al 5%. Posteriormente se centrifugó a 13000 rpm/15 minutos. Se descartó el paquete celular y el sobrenadante, sin desnaturalizar térmicamente, fue separado por electroforesis en presencia de SDS. (Sambrook y Rusell 2001).

11. Efecto de inhibidores de proteasas, proteasas de otras bacterias, urea y Tritón X-100 en las actividades proteolíticas secretadas (APS) de los aislados bacterianos clínicos en SDS-PAGE al 10% y en zimogramas:

Para la determinación de esta actividad se tomaron alícuotas de 20 µl del pool de proteínas secretadas precipitadas de las cepas en estudio, correspondientes a aproximadamente 20 µg de proteína y se incubaron con 10 µl de la mezcla de inhibidores de proteasas por 10 min, otra alícuota de 20 µl se incubó con urea 8M pH 7.4 el mismo lapso de tiempo; además se hicieron mezclas de 20 µg de proteína del precipitado proteico con 5 µg de IgA o IgG más Tritón X-100 al 0.1%, en un volumen de 20 µl; otras alícuotas fueron mezcladas entre el precipitado proteico, el sustrato y sin Tritón X-100. Se evaluaron también los sustratos (5 µg de IgA o IgG) con Tritón X-100 al 0.1%, como control. Todas las mezclas con Tritón X-100 fueron incubadas 24 h a 37° C. Posteriormente se analizó la actividad proteolítica residual por SDS-PAGE (Sambrook y Rusell 2001).

Por otro lado, se incubaron las APS con urea 8 M pH 7.4 y con inhibidores de proteasas. Se hicieron mezclas de CPS de diferentes bacterias. Las mezclas, conteniendo 20 µg de proteína, fueron separadas por electroforesis, en zimogramas con IgG o HSA al 0.02%. Las muestras no fueron calentadas ni tratadas con agentes reductores. Los geles con las proteínas separadas se incubaron en Tritón X-100 al 2.5% durante 2 h a temperatura ambiente en agitación suave y constante, cambiando la solución de Tritón X-100 a la hora. Posteriormente los geles fueron incubados durante toda la noche en Tris-HCl 50 mM pH 7.5 a 37° C sin agitación. Finalmente fueron teñidos como se describió

previamente a fin de observar las zonas blancas de actividad proteolítica (Sambrook y Rusell 2001; Negrete-Abascal *et al.*, 1994, 2004).

12. APS de los aislados clínicos en zimogramas:

De los CPS se tomó una muestra de 20 μ l (20 μ g) y se separó por electroforesis a 90 V en geles tipo SDS-PAGE al 10%, co-polimerizado con IgA, IgG o HSA al 0.02%. Las muestras no fueron calentadas ni tratadas con agentes reductores. Los geles con las proteínas separadas se procesaron como se describió previamente a fin de observar las zonas blancas de actividad proteolítica (Sambrook y Rusell 2001; Negrete-Abascal *et al.*, 1994, 2004).

13. Efecto del EDTA y CaCl₂ en la APS de la cepa *E. coli* 137 en zimogramas:

Del precipitado proteico se tomaron alícuotas 20 μ l (20 μ g) a las que se le agregaron EDTA 20 mM o CaCl₂ 10 mM y se dejó incubar por 30 minutos; a otras alícuotas similares del precipitado proteico no se les añadió ningún reactivo (controles); se tomaron de todas las mezclas 20 μ l y se separaron por electroforesis, sin desnaturalizar por calor, en un zimograma con IgG o HSA al 0.02%. Los geles fueron incubados durante toda la noche en Tris-HCl 50 mM pH 7.5 a 37°C en presencia o no de EDTA 20 mM o CaCl₂ 10 mM, dependiendo si se habían incubado o no con estos reactivos previamente (Sambrook y Rusell 2001; Negrete-Abascal *et al.*, 1999, 2004).

14. Efecto del pH y temperatura en la APS de *E. coli* 137 en zimogramas:

Veinte μ l del precipitado proteico (20 μ g) se separaron por electroforesis, sin desnaturalizar por calor, en un zimograma con IgG o HSA al 0.02%. Después el gel se incubó durante toda la noche en Acetato de Sodio 50 mM (pH de 5.6), MOPS 50 mM (pH 6.5), o bien en Tris-HCl 50 mM pHs 7.5, 8.5 o 9.5 a 37° C; también se incubaron los geles durante toda la noche en Tris-HCl 50 mM pH 7.5, a 28, 37, 45, 50 y 55° C. (Sambrook y Rusell 2001; Negrete-Abascal *et al.*, 1999, 2004).

15. Cinética de acumulación de la actividad de las proteasas secretadas en algunos aislados de origen clínico en zimogramas:

Para conocer el momento en que la actividad proteolítica del cultivo bacteriano era máxima, se concentraron las proteínas secretadas de cultivos de 12, 24, 36, 48 y 60 h poscultivo y el concentrado del sobrenadante se congeló a -20° C hasta hacer los experimentos correspondientes. Se ajustó a una concentración de 1 mg/ml de proteína cada muestra y se tomaron alícuotas de 20 µl del concentrado sin desnaturalizar para separarse por electroforesis, en zimograma con IgG o HSA al 0.02%. (Sambrook y Rusell 2001; Negrete-Abascal *et al.*, 1994, 2004).

16. Preparación de células competentes *E. coli* DH5α:

Se prepararon células competentes de *E. coli* DH5α por el método de Hanahan, (1983); o de Sambrook y Rusell (2001). Se sembró un pre-cultivo de *E. coli* DH5α en 5 ml caldo LB sin antibiótico; se incubó durante 24 h a 37° C con agitación constante (aereación). Dos ml del pre-cultivo se inocularon en un matraz nefelométrico que contenía 200 ml de medio LB, el cual se incubó con agitación constante durante 2.5 h a 37° C hasta que el cultivo alcanzó la D.O. de 0.5 a 550 nm. La suspensión celular se transfirió a botellas de policarbonato y se centrifugó a 12000 rpm/10 min a 4° C. El sobrenadante fué desechado y la pastilla se resuspendió con 10 ml del Regulador I y se mantuvo en hielo durante 15 min. Las células fueron concentradas por centrifugación a 12000 rpm/10 min y a 4° C. El sobrenadante se desechó y las células fueron resuspendidas en 2 ml de solución Reguladora II. La suspensión celular fue dividida en alícuotas de 200 µl en tubos Ependorff® nuevos y se mantuvo en congelación a -70° C hasta su uso. (Ver Apéndice: Reguladores para la obtención de células competentes)

17. Extracción de DNA plasmídico:

La extracción y purificación del DNA plasmídico se realizó a través del método de lisis alcalina de Birnboim (Birnboim y Doly 1979; Sambrook y Rusell 2001). Se inoculó una colonia de las cepas de *E. coli* en 5 ml de caldo LB con ampicilina 100 µg/ml y se incubó toda la noche a 37° C en aereación. Se tomó 1.5 ml de la

suspensión celular en un tubo Ependorff® y se centrifugó a 13000 rpm/5 minutos. Se desechó el sobrenadante y se agregaron 100 µl de solución Birnboim I, se homogeneizó hasta resuspender por completo el paquete celular; en seguida se añadieron 200 µl de la solución Birnboim II preparada al momento y se homogeneizó; se adicionaron 150 µl de la solución de Birnboim III y se mezcló. Se incubó a 4° C durante 5 min y se centrifugó a 13000 rpm/15 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo Ependorff® nuevo y se agregaron dos volúmenes de etanol absoluto, se mantuvo precipitando a -20° C durante 30 minutos, después se centrifugó a 13000 rpm/5 min. El sobrenadante fue decantado y la pastilla se lavó con 200 µl etanol al 70%, se eliminó el exceso de alcohol y se esperó que la pastilla seca; finalmente se resuspendió en 100 µl de agua destilada estéril y se analizó por electroforesis en geles de agarosa al 0.8% en TBE (Ver Apéndice: Método de lisis alcalina/Soluciones)

18. Transformación de células competentes *E. coli* DH5α mediante choque térmico:

La transformación se llevó a cabo siguiendo la técnica reportada por Hanahan (1983), (Sambrook y Rusell 2001). De las células competentes se tomó una alícuota de 100 µl en un Ependorff® nuevo y se le adicionó entre 10-100 ng de DNA plasmídico de las cepas en estudio, después de mezclarse se incubaron a 4° C durante 30 min, y se sometieron a choque térmico a 37° C durante 10 min. Las bacterias fueron reactivadas agregando 500 µl de caldo LB sin antibiótico, se homogeneizó la mezcla y se incubó por 2 h a 37° C. La suspensión bacteriana se centrifugó a 3000 rpm/10 segundos y se desechó el sobrenadante. El paquete celular se resuspendió en 100 µl de caldo LB sin antibiótico y se espatularon en placas de Petri con agar LB adicionado con 100 µg/ml de ampicilina. Las colonias emergentes se observaron entre las 18 y 36 h de incubación, las colonias transformantes fueron seleccionadas, se cultivaron en LB-Amp (100 µg/ml) y de éstas después se extrajo DNA plasmídico. El DNA se analizó por electroforesis en geles de agarosa al 0.8% en TBE corroborando la transformación.

19. Determinación del patotipo de *E. coli* 137 por Southern blot:

La identificación de la *E. coli* 137 se llevó a cabo por Southern blot (Schultsz *et al.*, 1994; Rademaker *et al.*, 1992). Las sondas utilizadas contenían fragmentos de DNA que formaban parte de los genes que codifican para algún factor de virulencia (Tabla 13). Las secuencias están escritas en la dirección 5' a 3', y fueron marcadas no radiactivamente con digoxigenina. La hibridación se realizó utilizando la solución de Church y Gilbert (PNAS, 1984), con cada una de las sondas por separado. Para revelar la hibridación se usó un anticuerpo (antidigoxigenina) conjugado a la enzima fosfatasa alcalina (Sigma Chemical Co., St. Louis. Mo.). Para el desarrollo de la reacción enzimática se utilizaron BCIP y NBT (Tenover, 1988; Begum *et al.*, 1993; Giono *et al.*, 1994; Cortés-Ortíz *et al.*, 2002; Rodríguez-Ángeles, 2002).

20. Secuenciación del genoma de la cepa clínica *E. coli* 137:

Para la extracción del DNAg (DNA genómico), que se envió a secuenciar, se utilizaron cultivos en 15 ml de LB sin antibiótico, de la cepa *E. coli* 137, el paquete se cosechó por centrifugación y se resuspendió en regulador de lisis (50 mM Tris, 50 mM EDTA, 1 M NaCl, pH 8) y 100 µg de lisozima. Se hizo una incubación por 30 minutos a 37°C. Con una solución del 20% de sarcosinato de sodio, se ajustó la concentración al 1% del tensoactivo y se agitó por inversión durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se agregaron 0.1 volúmenes de 3 M de acetato de sodio pH 7 y un volumen de fenol saturado con Tris 50mM a pH 8. La mezcla se agitó durante 5 minutos y se centrifugó a 12000 rpm. Se separó la fase acuosa y se extrajo una vez más con fenol y se lavó dos veces más con cloroformo. La solución de DNA fue tratada con dos volúmenes de etanol frío, se mezcló y se incubó a -20°C durante 15 minutos. El DNA se precipitó por centrifugación a 12000 rpm, se descartó el sobrenadante y el DNA se secó a temperatura ambiente. El DNA se resuspendió en 250 µl de agua y se almacenó a -70°C hasta que se envió al proceso de secuenciación de nucleótidos. (Rojas-Ruiz *et al.*, 2015). El DNA de alto peso molecular fue purificado y con el apoyo del Laboratorio Nacional para la Genética de la Biodiversidad del CINVESTAV Campus Irapuato, México, el DNA

fue procesado para identificar la secuencia nucleotídica. La secuencia de DNA se obtuvo usando el equipo GS FLX 454 technology from Roche (Branford, CT, USA) y fue corroborado por MiSeq system (Illumina, San Diego, CA, USA).

RESULTADOS

Aislamiento de bacterias resistentes a la ampicilina (betalactámico) de casos clínicos humanos y de alimentos frescos:

Se obtuvieron 40 aislados de la flora microbiana del tejido profundo de la orofaringe (paladar superior) de las 4 cabezas de pollo (Tabla 4). Los aislados fueron elegidos de acuerdo a las diferentes morfologías que presentaron sus colonias en agar Mac Conkey y gelosa sangre como: el tamaño (mayor o menor a 1 mm), de forma circular o irregular, de bordes lacerados o lobulados, elevación convexa o plana, de textura lisa o mucoide, blanca o hialina, opaca o translúcida. Las bacterias fueron sembradas por estría cruzada en placas de agar LB que contenía ampicilina (100 µg/ml) y en placas con Gelosa sangre de carnero al 5% para determinar si tenían carácter hemolítico. En 7 aislados sembrados en placas de Gelosa-sangre, se notó la presencia de halos alrededor de las colonias, estos halos no sobrepasaban los 2 mm de ancho.

En relación a los aislados clínicos, se obtuvieron 37 cepas bacterianas de pacientes ambulatorios en un período de 3 meses, de mayo a julio del 2011 (Tabla 4). La biotipificación de las bacterias de origen clínico se hizo mediante tinción de Gram y pruebas bioquímicas. Adicionalmente las bacterias fueron sembradas por estría cruzada en placas de agar LB que contenía ampicilina (100 µg/ml) porque la mayoría fueron resistentes a este antibiótico y en placas con Gelosa-sangre para determinar si tenían carácter hemolítico, pero este fue negativo para todas. De las 37 cepas que se aislaron de 9 sitios anatómicos diferentes, 11 fueron obtenidas de urocultivo (29.7%), 7 de hemocultivos (18.9%), 5 de coprocultivos (13.5%), 4 de absceso de piel (10.8%), 3 de heridas quirúrgicas y 3 de exudado faríngeo (8.1%), 2 de exudado vaginal (5.4%) y 1 de exudado uretral y 1 de secreción bronquial (2.7%) (Figura 3, Tabla 5). Las cepas obtenidas fueron 20 de *E. coli* (54%), 5 de *Klebsiella pneumoniae* (13.5%), 3 de *Staphylococcus aureus* (8.1%), 2 de *Proteus penneri* (5.4%), y 1 (2.7%) de *Citrobacter amalonaticus*, *C. diversus*, *K. oxytoca*, *P. mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* y *Shigella flexneri*. La

bacteria mayormente aislada fue *E. coli* (54%), seguida de *K. pneumoniae* (13%) (Figura 4, Tabla 6). De las *E. coli* aisladas, el 80% (16) fueron de origen extraintestinal y el 20% (4) correspondió a origen intestinal (Figura 5 y 6, Tabla 7 y 8).

Tabla 4. Relación de los aislados obtenidos, origen y sensibilidad a la ampicilina.

Origen de los aislados	Total	Resistentes a Ampicilina	%	Sensibles a Ampicilina	%
Animal (Cabezas de pollo)	40	40	100	0	0
Humano (Pacientes no hospitalizados)	37	35	95	2	5
Total	77	75	97	2	3

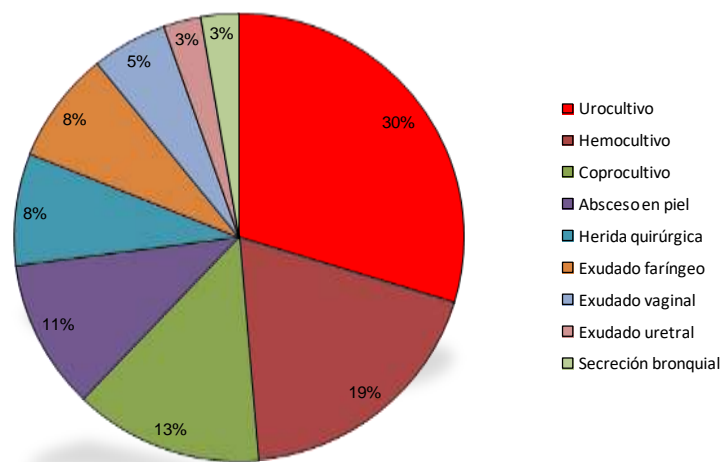


Figura 3. Origen anatómico humano de los aislados clínicos.

Tabla 5. Distribución de los aislados clínicos y el sitio de obtención.

No. Prog.	Sitios de obtención	No. de cepas	<i>E. coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Proteus penneri</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Citrobacter diversus</i>	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	<i>Shigella flexneri</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Serratia marcescens</i>
1	Urocultivo	11	8			1			1		1		
2	Hemocultivo	7	4	1			1	1					
3	Coprocultivo	5	4							1			
4	Absceso en piel	4	1	1	1							1	
5	Herida quirúrgica	3	1		2								
6	Exudado faríngeo	3		2									1
7	Exudado vaginal	2	2										
8	Exudado uretral	1				1							
9	Secreción bronquial	1		1									
TOTAL		37	20	5	3	2	1	1	1	1	1	1	1

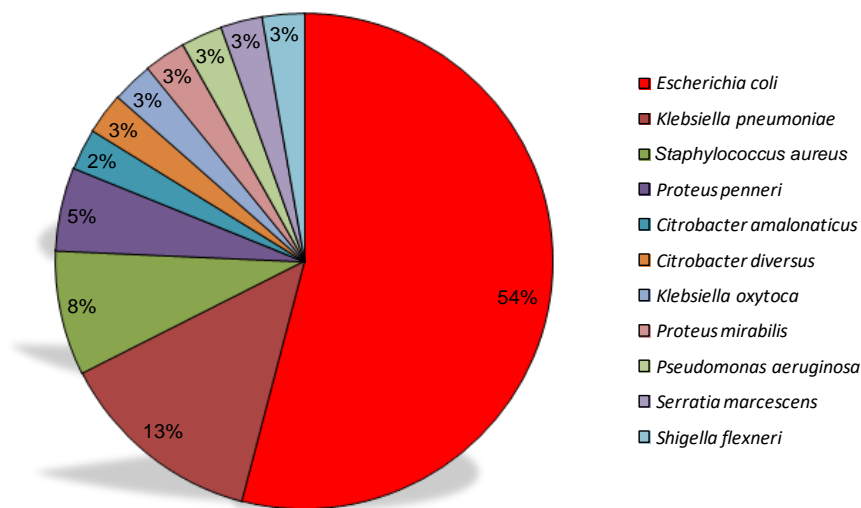


Figura 4. Porcentaje de especies de aislados clínicos obtenidos.

Tabla 6. Relación y número de los aislados clínicos.

Bacteria	No. de cepas
<i>Escherichia coli</i>	20
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5
<i>Staphylococcus aureus</i>	3
<i>Proteus penneri</i>	2
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	1
<i>Citrobacter diversus</i>	1
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1
<i>Proteus mirabilis</i>	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1
<i>Serratia marcescens</i>	1
<i>Shigella flexneri</i>	1
TOTAL	37

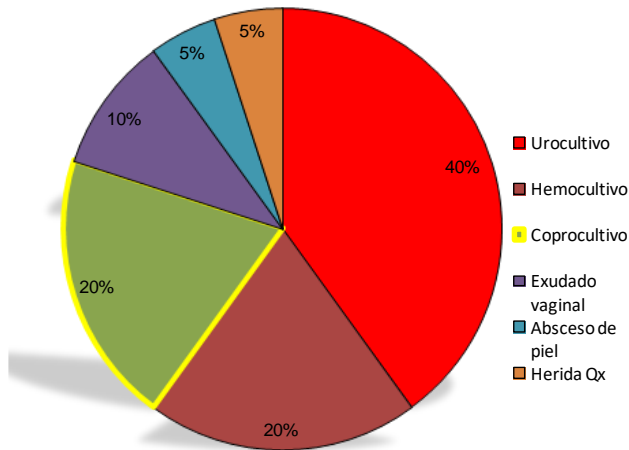


Figura 5. Sitios de obtención de las *E. coli* y frecuencia de aislamiento.

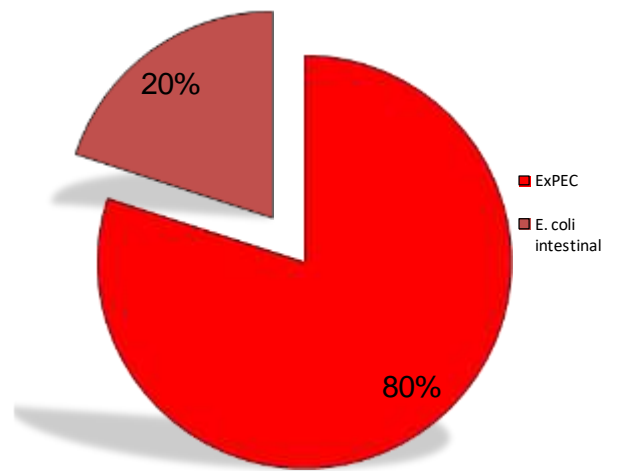


Figura 6. Clasificación de las *E. coli* de acuerdo a su origen: intestinal y extraintestinal.

Tabla 7. Sitios anatómicos de obtención de las *E. coli*.

No. Prog.	Sitios de obtención de las <i>E. coli</i>	No. de aislados
1	Urocultivo	8
2	Hemocultivo	4
3	Coprocultivo	4
4	Exudado vaginal	2
5	Absceso de piel	1
6	Herida quirúrgica	1
TOTAL		20

Tabla 8. Distribución de las *E. coli* de acuerdo a su sitio de origen

No. Prog.	<i>E. coli</i>	No. de aislados
1	Intestinal	4
2	Extraintestinal (ExPEC)	16
TOTAL		20

Sensibilidad a antimicrobianos:

En relación a la sensibilidad a los antimicrobianos de los aislados obtenidos de las cabezas de pollos, los 40 aislados crecieron en placas de agar LB con ampicilina, por tanto, el 100% de los aislados fue resistente a ampicilina.

En cuanto a los aislados clínicos, la susceptibilidad de estas cepas a los antimicrobianos fue determinada por el método de difusión en agar (CLSI, 2009) y se observó que el 95% de los aislados fueron resistentes a Ampicilina (35 aislados). Le siguen en incidencia de resistencia, la Cefalotina con 49% de resistencia, Trimetoprim-Sulfametoxazol con 38%, Amoxicilina/Ac. Clavulánico, Carbenicilina y Ciprofloxacino con 32%, Nitrofurantoína con 30%, Norfloxacino con el 24% de resistencia, Gentamicina con 22%, Cloranfenicol y Cefotaxima con 19%, Gatifloxacino con 16%, Amikacina, Lincomicina, Oxacilina y Ticarcilina con 14%, Ceftriaxona, Netilmicina, Rifampicina y Vancomicina con 11%, Azitromicina, Cefuroxima, Levofloxacino, Ofloxacino y Tobramicina con el 8%, Ceftazidima con 5%, Aztreonam, Dicloxacilina y Penicilina con 3% y no se observó resistencia a los 4 siguientes antibióticos: Cefepime, Eritromicina, Imipenem y Tetraciclina.

Se observó además, que el 86% de las bacterias (32) se pueden considerar como multirresistentes porque presentaron resistencia a dos o más antibióticos (López-Pueyoa *et al.*, 2011; Siegel *et al.*, 2006); es notable que la cepa No. 96 (*E. coli*) aislada de un urocultivo, es la que presenta resistencia a un mayor número de antibióticos (14 antibióticos de 33 evaluados); las cepas No. 124, 129 y 131 (*E. coli*), presentan resistencia a 12 antibióticos, la cepa No. 98 (*E. coli*) a 11 antibióticos, la No. 133 y la 141 (*E. coli*) a 10 antibióticos; las demás cepas tienen resistencia a menos de 10 antibióticos. Solo las cepas No. 145 y 147, ambas *E. coli*, no presentaron resistencia (Tabla 9).

Tabla 9. Relación de cepas, sitio de obtención y resistencia o sensibilidad a 33 antimicrobianos.

No. prog.	No. de cepa	Bacteria	Sitio de obtención	No. de antibióticos a los que es resistente	No. de antibióticos a los que tiene una susceptibilidad intermedia
1	96	<i>Escherichia coli</i>	Urocultivo	14	3
2	124	<i>Escherichia coli</i>	Absceso piel	12	1
3	129	<i>Escherichia coli</i>	Urocultivo	12	1
4	131	<i>Escherichia coli</i>	Hemocultivo	12	2
5	98	<i>Escherichia coli</i>	Urocultivo	11	3
6	133	<i>Escherichia coli</i>	Urocultivo	10	0
7	141	<i>Escherichia coli</i>	Exudado vaginal	10	1
8	125	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Absceso piel	9	1
9	94	<i>Escherichia coli</i>	Urocultivo	8	2
10	122	<i>Escherichia coli</i>	Coprocultivo	7	3
11	134	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Hemocultivo	7	1
12	116	<i>Serratia marcescens</i>	Exudado faríngeo	6	0
13	132	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Exudado faríngeo	6	1
14	136	<i>Staphylococcus aureus</i>	Absceso piel	6	6
15	138	<i>Staphylococcus aureus</i>	Herida quirúrgica	6	1
16	140	<i>Escherichia coli</i>	Coprocultivo	6	4
17	144	<i>Escherichia coli</i>	Hemocultivo	6	0
18	112	<i>Proteus penneri</i>	Exudado uretral	5	3
19	118	<i>Escherichia coli</i>	Exudado Vaginal	5	1
20	139	<i>Escherichia coli</i>	Urocultivo	5	2
21	148	<i>Citrobacter diversus</i>	Hemocultivo	5	4
22	137	<i>Escherichia coli</i>	Hemocultivo	4	3
23	143	<i>Proteus mirabilis</i>	Absceso piel	4	3
24	146	<i>Proteus penneri</i>	Urocultivo	4	0
25	149	<i>Shigella flexneri</i>	Coprocultivo	4	0
26	95	<i>Escherichia coli</i>	Urocultivo	3	0
27	97	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	Urocultivo	3	3
28	130	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Sec. bronquial	3	1
29	142	<i>Escherichia coli</i>	Coprocultivo	3	1
30	150	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Hemocultivo	3	0
31	151	<i>Escherichia coli</i>	Hemocultivo	3	0
32	135	<i>Stafilococos aureus</i>	Herida quirúrgica	2	2
33	93	<i>Escherichia coli</i>	Urocultivo	1	1
34	114	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Urocultivo	1	0
35	123	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Exudado faríngeo	1	0
36	147	<i>Escherichia coli</i>	Coprocultivo	0	1
37	145	<i>Escherichia coli</i>	Herida quirúrgica	0	0

Actividad proteolítica de las cepas bacterianas en placas con agar LB/Ampicilina/Caseína:

Para determinar la actividad proteolítica de las cepas, éstas se sembraron por estría cruzada en placas de Petri con LB/Ampicilina/Caseína y se incubaron 24, 48 y 72 h. Se tomaron 12 aislados de origen animal y 10 clonas del mismo grupo transformadas mediante choque térmico; de la misma manera, se tomaron 5 aislados de origen clínico con 4 clonas transformantes del mismo grupo; se agregaron a este experimento *B. thuringiensis*, *E. coli* (pBluescript II KS(-)) y *E. coli* DH5 α . No se observaron halos de degradación en ninguna de las cepas sembradas, sólo coloración en *E. coli* DH5 α (KS-) y *E. coli* DH5 α (Tabla 10).

Tabla 10. Actividad proteolítica en placas con LB/Ampicilina/Caseína.

CEPAS	24 h	48 h	72 h
Cepas de origen animal: 12	-	-	-
Cepas de origen animal transformadas: 10	-	-	-
Cepas de origen clínico: 5	-	-	-
Cepas de origen clínico transformadas: 4	-	-	-
<i>B. thuringiensis</i>	-	-	-
<i>E. coli</i> DH5 α (pBluescript II KS(-))	-	*	*
<i>E. coli</i> DH5 α	-	-	*

* Precipitación de proteínas

Degradación de inmunoglobulinas por las cepas clínicas en presencia de BSA en SDS-PAGE al 10%:

En este experimento se observó un patrón de degradación de la IgG muy similar por las diferentes cepas ensayadas (Figura 7A). Asimismo, se observó una disminución de la actividad proteolítica de manera significativa, con la presencia de BSA (Figura 7 B). Esto sugiere una probable interferencia de la BSA hacia el sustrato IgG.

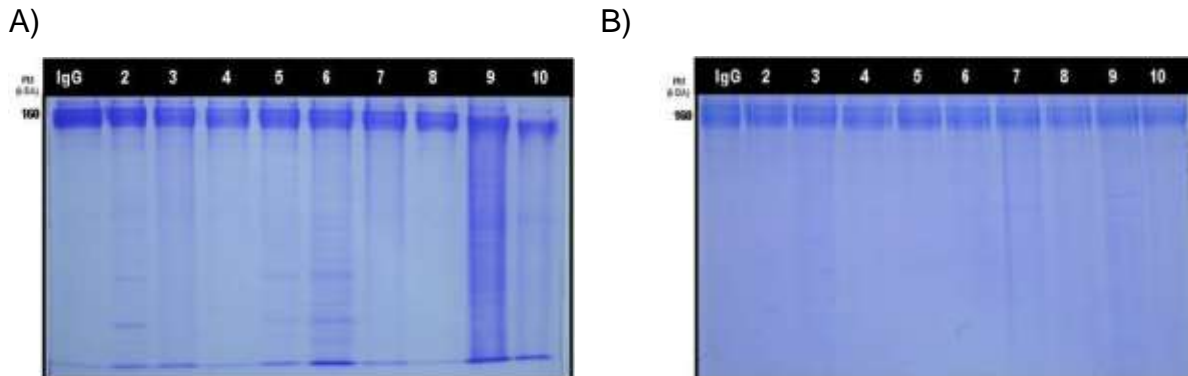


Figura 7. Actividad proteolítica de las cepas de origen clínico sobre IgG. SDS-PAGE al 10% donde se observa la fragmentación de la IgG por acción de las cepas de origen clínico. Efecto de paquetes celulares sobre 10 µg de IgG (A) y efecto sobre 10 µg de IgG con incubación previa de 30 min con BSA 30 (B). **A)** carril: IgG (control); 2: *E. coli* DH5 α ; 3: cepa 97 (*C. amalonaticus*); 4: cepa 112 (*P. penneri*); 5: cepa 114 (*K. oxytoca*); 6: cepa 122 (*E. coli*); 7: cepa 131 (*E. coli*); 8: cepa 132 (*K. pneumoniae*); 9: cepa 134 (*P. aeruginosa*); 10: cepa 137 (*E. coli*). **B)** Evaluación de la actividad proteolítica sobre IgG de paquetes celulares sobre tratados con 10 µg de BSA, carril: IgG (control). Las figuras A y B tienen el mismo orden de muestras.

Degradación de IgA, IgG y HSA por los aislados bacterianos clínicos y de animales y de los CPS: visualización por medio de SDS-PAGE al 10%:

Inicialmente se hizo un escrutinio para detectar la actividad proteolítica de las cepas en corto tiempo, con los 40 aislados obtenidos de las cabezas de pollo, la prueba de degradación de IgG y de HSA se realizó incubando las proteínas durante 3 h a 37° C. De los aislados No. 3, 4 y 7 que se incubaron con IgG, se observó una degradación parcial con la aparición de una banda de aproximadamente 25 kDa, sin embargo, también se observaron múltiples bandas con los aislados No. 9, 10, 12, 14, 15, 16, 21, 24, 28, 31, 32, 33 y 37. Con los aislados No. 14, 21, 35, 39, 44 y 46 que se incubaron con HSA, también se observaron bandas, indicando la actividad proteolítica (Figura 8 se presentan algunos). Las clonas transformantes no presentaron ninguna actividad de degradación en IgG o HSA.

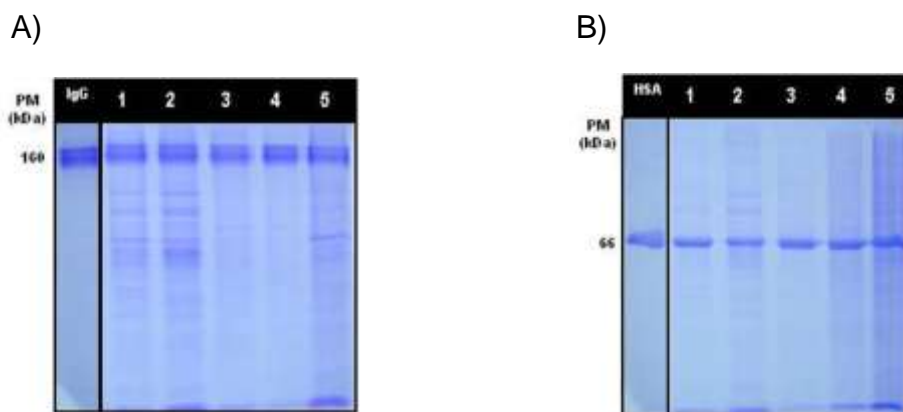


Figura 8. Paquetes celulares de aislados de cabeza de pollo incubados con IgG y HSA. Efecto de paquetes celulares sobre 2.5 μg de IgG y HSA por 3 h a 37° C: análisis en SDS-PAGE al 10%. **A)** Efecto sobre igG. Carriles: IgG=2.5 μg ; 1: aislado 14; 2: aislado 21; 3: aislado 24; 4: aislado 44; 5: aislado 46. **B)** Efecto sobre HSA. Carril: HSA=2.5 μg . El orden de las muestras es el mismo en las figuras A y B.

También se realizó en los aislados clínicos la evaluación de la actividad proteolítica a diferentes concentraciones de UFC incubándolas con IgG y con BME; en el caso de la cepa No. 133 (*E. coli*), en presencia de 20 μg de IgG y durante 90 minutos de incubación, se observó degradación desde 5×10^3 a 1×10^6 de UFC. En ausencia de BME, la degradación de la inmunoglobulina fue menor. La degradación de IgG generó bandas de 100, 50 y 25 kDa, así como otras bandas de menor intensidad (Figura 9 A). A las mismas condiciones, la cepa No. 132 (*K. pneumoniae*) degradó también IgG en presencia del BME desde 5×10^3 a 1×10^6 de UFC, pero en su ausencia la degradación fue menor (Figura 9 B). Tomando en cuenta que la degradación se empezó a obtener a partir de 1×10^5 UFC, se utilizó esta concentración de células y se probaron diferentes concentraciones de IgG (1, 2.5, 5, 10, 20, 30 y 40 μg), con y sin BME y se aumentó el tiempo de incubación a 3 h. En ambas cepas y en ausencia de BME, el sustrato está presente, en el caso de la cepa No. 133 (*E. coli*) se observaron vestigios de IgG humana (160 kDa) en concentraciones de 20, 30 y 40 μg . En el caso de la cepa No. 132 (*K. pneumoniae*), se apreciaron cantidades de menos de 10 μg en estas mismas concentraciones; indicando que *E. coli*, tiene mayor capacidad de degradación que *K. pneumoniae*. En presencia del reductor, ambas

cepas tuvieron el mismo comportamiento, hay degradación parcial en todas las concentraciones de IgG, pero no logran una degradación total (Figura 10).

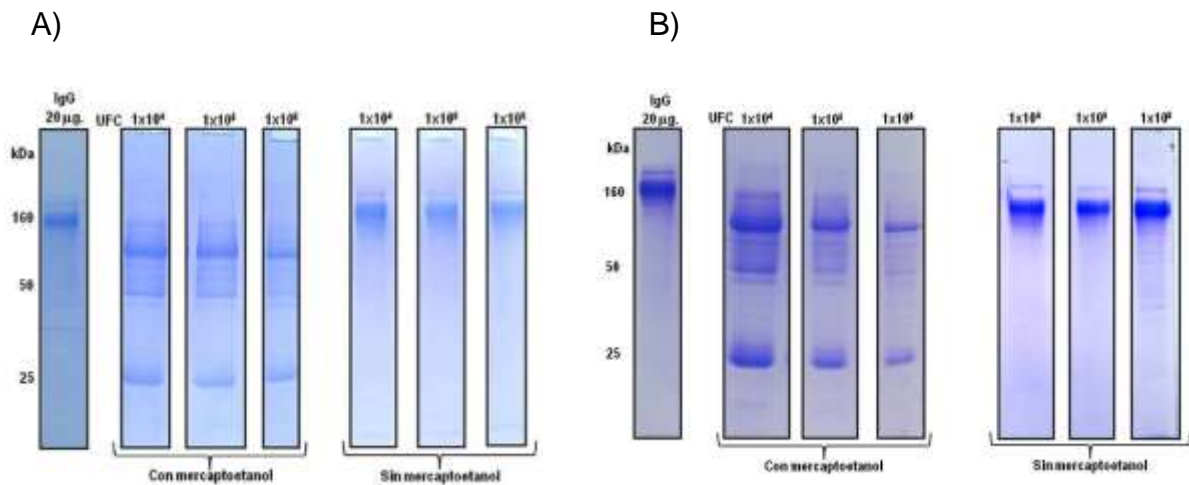


Figura 9. Evaluación de la actividad proteolítica de dos cepas en presencia o ausencia de β -mercaptoetanol (BME). Análisis en SDS-PAGE al 10%; **A)** Los paquetes celulares de la cepa 133 (*E. coli*) o **B)** de la cepa 132 (*K. pneumoniae*), se incubaron por 3 h con 20 μ g IgG a diferentes concentraciones de UFC (indicadas en la parte superior), la posición del marcador de peso molecular se indica a la izquierda.

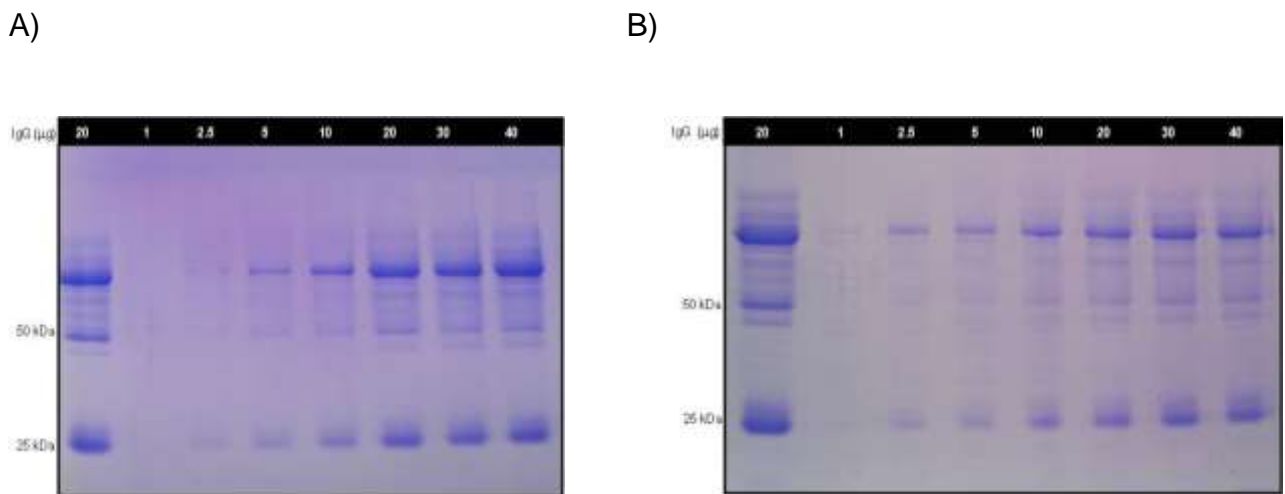


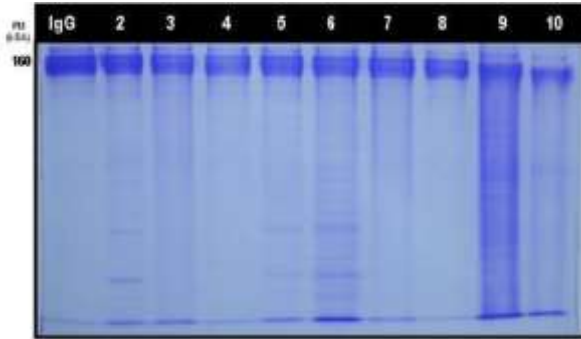
Figura 10. Efecto de la concentración de sustrato sobre la probable actividad proteolítica de dos cepas bacterianas. Evaluación en SDS-PAGE al 10% de la actividad proteolítica de los paquetes celulares, en presencia de BME, de la cepa 133, *E. coli* (**A**) o la cepa 132, *K. pneumoniae* (**B**). Un paquete de 6×10^6 UFC de cada cepa, se incubó durante 3 h con diferentes concentraciones de IgG (1, 2.5, 5, 10, 20, 30 y 40 μ g).

En este escrutinio inicial para detectar la actividad proteolítica de las cepas en corto tiempo, se probaron los sustratos IgG o HSA con los paquetes celulares bacterianos, en un buffer a pH neutro (Tris-HCl 50 mM pH 7.5) durante 3 h a 37° C y luego se analizaron por SDS-PAGE al 10%. De esta manera se observó que IgG

fue degradada parcialmente por varias cepas: 97 (*C. amalonaticus*), 112 (*P. penneri*), 114 (*K. oxytoca*), 116 (*S. marcescens*), 134 (*P. aeruginosa*), 123, 125, 130, 132 (*K. pneumoniae*), 93, 94, 95, 96, 122, 124, 129, 131, 133, 137, 139, 144, 145 y 151 (*E. coli*) observándose una disminución de la intensidad con respecto a IgG usada como control (Figura 11 A). La HSA también fue degradada parcialmente por las mismas cepas, además de la cepa 141 de *E. coli*, pero no por las cepas 97, 112, 114, 122, 131 y 132 (Figura 13). Un caso muy notorio es el de la cepa No. 137 (*E. coli*) que degradó a la HSA y produjo al menos 5 bandas de menor peso al de 66 kDa.

Por otro lado, cuando se separaron las proteínas del sobrenadante (no precipitado con metanol) por SDS-PAGE al 10%, y previamente incubado con IgG por 3 h a 37° C para detectar alguna actividad proteolítica se observó una menor cantidad de IgG en varios carriles con respecto al control, sobre todo en los carriles 8, 9 y 10 (Figura 11 B), pero no una desaparición de IgG. Además, el sobrenadante solo, sin ningún otro reactivo, incubado el mismo tiempo y a la misma temperatura, tampoco presentó actividad proteolítica o presencia de bandas (Figura 12 A). Los precipitados celulares también fueron incubados sin el sustrato (IgG) por 3 h y a 37° C, y tampoco se observó la presencia de bandas, como se discutirá adelante, esto puede ser debido a probablemente estar al límite de detección por la tinción con el colorante (Figura 12 B).

A)



B)

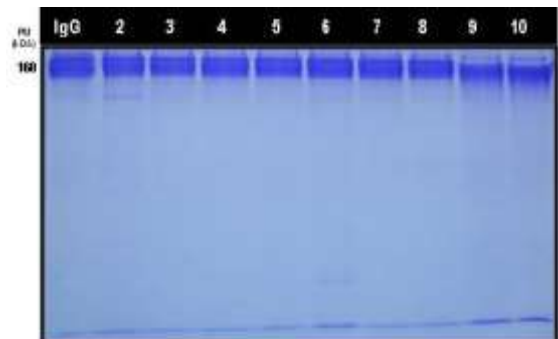


Figura 11. Actividad proteolítica de los aislados clínicos sobre IgG (10 ug). Análisis en SDS-PAGE al 10%, de la actividad de los paquetes celulares (A) y sobrenadantes (B) sin concentrar, de las cepas de origen clínico incubados 3 h a 37° C. **A)** actividad proteolítica de los paquetes celulares; carril: IgG (control); 2: *E. coli* DH5 α ; 3: cepa 97 (*C. amalonaticus*); 4: cepa 112 (*P. penneri*); 5: cepa 114 (*K. oxytoca*); 6: cepa 122 (*E. coli*); 7: cepa 131 (*E. coli*); 8: cepa 132 (*K. pneumoniae*); 9: cepa 134 (*P. aeruginosa*); 10: cepa 137 (*E. coli*). **B)** Orden y cepas igual que en (A).

A)

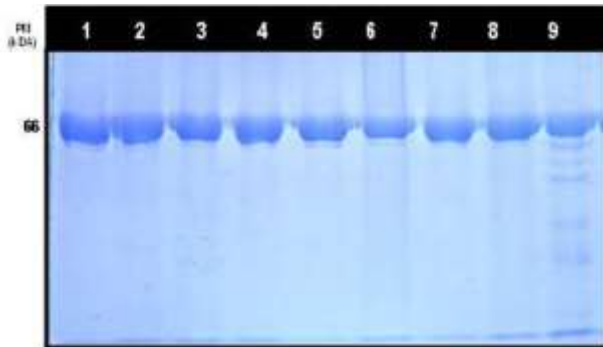


B)



Figura 12. Separación de proteínas por electroforesis de los sobrenadantes de cultivos bacterianos. (A)- sin precipitar, y (B)- concentrados proteicos del sobrenadante de las cepas de origen clínico. Análisis en SDS-PAGE al 10%, proteínas incubadas durante 3 h a 37 C. **A)** Carril: IgG (control)=10 μ g; 2: *E. coli* DH5 α ; 3: cepa 97 (*C. amalonaticus*); 4: cepa 112 (*P. penneri*); 5: cepa 114 (*K. oxytoca*); 6: cepa 122 (*E. coli*); 7: cepa 131 (*E. coli*); 8: cepa 132 (*K. pneumoniae*); 9: cepa 134 (*P. aeruginosa*); 10: cepa 137 (*E. coli*). **B)** Concentrados proteicos de sobrenadante con el mismo orden de muestras de la figura A.

A)



B)

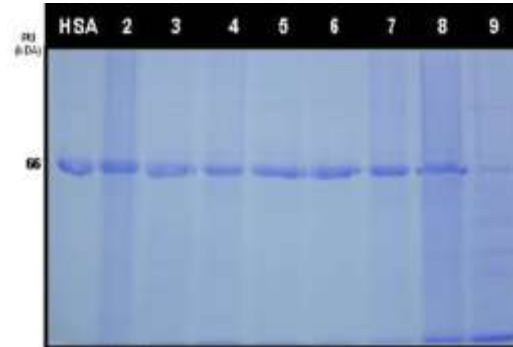


Figura 13. Actividad proteolítica de los aislados clínicos sobre HSA. Efecto de los paquetes celulares sobre 10 µg (A) o 2.5 µg (B) de HSA después de la incubación por 3 h a 37° C, análisis en SDS-PAGE al 10%. **A)** carril: 1: HSA (control)=10 µg; 2: *E. coli* DH5α; 3: cepa 97 (*C. amalonaticus*); 4: cepa 112 (*P. penneri*); 5: cepa 114 (*K. oxytoca*); 6: cepa 122 (*E. coli*); 7: cepa 131 (*E. coli*); 8: cepa 132 (*K. pneumoniae*); 9: cepa 137 (*E. coli*). **B)** carril: 1: HSA (control)=2.5 µg; el orden de las muestras es el mismo que el de la figura (A).

Como durante el ensayo se observó que las proteasas de las cepas 137 y 151 eran muy activas, se investigó la cinética de degradación del sustrato, empleando sólo las proteínas precipitadas con metanol del sobrenadante del cultivo bacteriano. Las proteasas secretadas por la cepa No. 137, degradaron parcialmente la HSA a las 3 h y su degradación fue total a las 24 h (Figura 14 B). Con respecto a IgG, se observó una degradación parcial a las 24 h y una degradación total a las 72 h (Figura 14 A). En la degradación parcial de IgG que se obtuvo a las 24 h, se pudieron observar dos bandas de proteína, una de tamaño similar a la proteína sin tratar (IgG-160 kDa) y una banda adicional de menor tamaño (140 kDa aproximadamente) (Figura 14 A). La banda pequeña fue analizada por espectrometría de masas y el resultado mostró que se trataba de la región constante de la cadena pesada de IgG. Una degradación más activa de la HSA con respecto a IgG fue también observada a las 24 h con las proteasas secretadas por la cepa No. 151 (Figura 14 C).

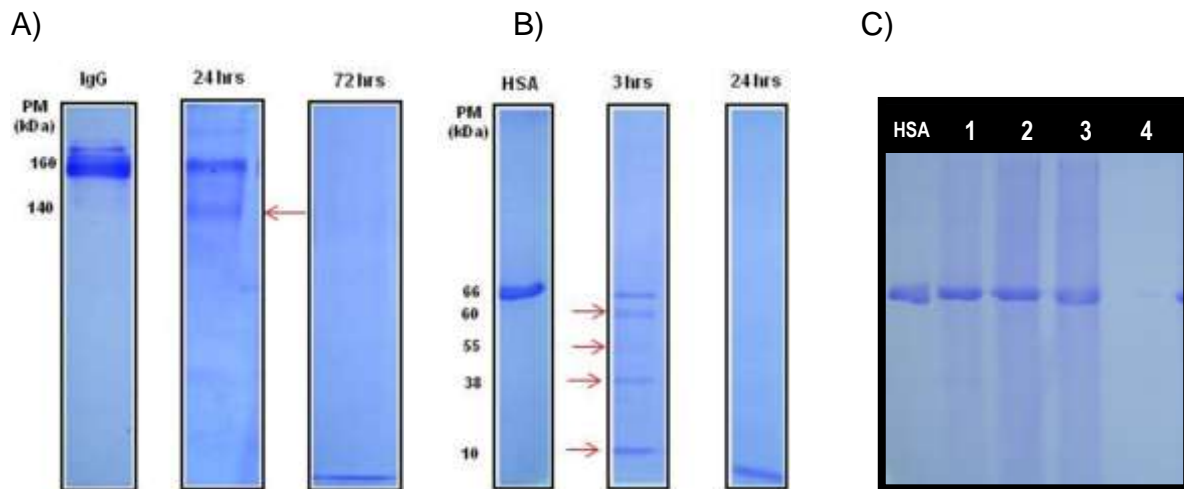


Figura 14. Actividad proteolítica de la cepa 137 de *E. coli*. Análisis en SDS-PAGE al 10% de la actividad proteolítica de las proteínas precipitadas con metanol (CPS) de *E. coli* 137 en A) y B). **A)** Degradación de IgG a las 24 o 72 h de incubación a 37°C. carril: IgG (control). Flecha: banda de aproximadamente 140 kDa. **B)** Degradación proteolítica de HSA a las 3 o 24 h. Flechas: digestión parcial de la HSA. **C)** Degradación proteolítica de HSA a las 24 h por diferentes cepas; HSA: control; 1: cepa 142 (*E. coli*); 2: cepa 144 (*K. oxytoca*); 3: cepa 149 (*E. coli*); 4: cepa 151 (*E. coli*).

Degradación de IgG por cepas clínicas en presencia de un inhibidor de la síntesis de proteínas de bacterias (Cloranfenicol) en SDS-PAGE al 10%:

Para determinar la capacidad de degradación de las cepas clínicas en presencia de un antibiótico, se tomaron los paquetes celulares de las cepas, y se incubaron por 2 h con Cloranfenicol en solución (20 $\mu\text{g/ml}$) y después con 10 μg de IgG durante 3 h. En un control sin incubación con cloranfenicol, se observó la presencia de bandas de degradación de diversos tamaños en los carriles correspondientes a las cepas No. 97, 114, 122, 131, 134 y 137 (Figura 15); en tanto que después de incubación con cloranfenicol, no se observaron esas bandas. Sin embargo, no ocurrió así con las cepas No. 134 y 137 (carriles 9 y 10 respectivamente), pues aún fue posible ver una discreta degradación y bandas tenues (Figura 15).

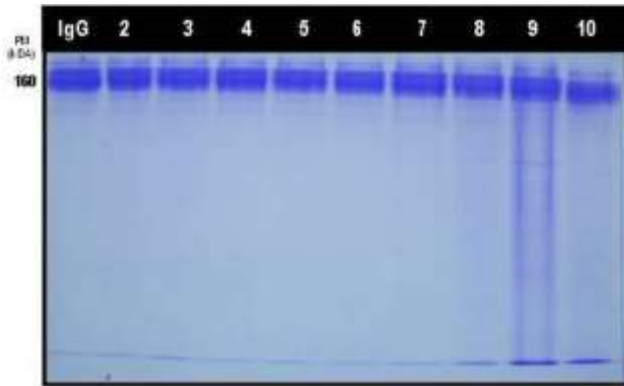


Figura 15. Efecto del cloranfenicol sobre la actividad proteolítica de los aislados clínicos con el sustrato IgG. Análisis en SDS-PAGE al 10%, Carril: IgG (control)=10 µg; 2: *E. coli* DH5α; 3: cepa 97 (*C. amalonaticus*); 4: cepa 112 (*P. penneri*); 5: cepa 114 (*K. oxytoca*); 6: cepa 122 (*E. coli*); 7: cepa 131 (*E. coli*); 8: cepa 132 (*K. pneumoniae*); 9: cepa 134 (*P. aeruginosa*); 10: cepa 137 (*E. coli*).

Efecto del EDTA y CaCl₂ en la degradación proteolítica de IgG por las cepas clínicas:

Para este experimento y los siguientes se eligieron las cepas con una mayor producción de proteasas; en este caso se tomaron los paquetes celulares de las cepas No. 114 (*K. oxytoca* en carriles 2 y 7 de la figura 16), 122 (*E. coli* carriles 3 y 8), 131 (*E. coli* en carriles 4 y 9) y 134 (*P. aeruginosa* en carriles 5 y 10), que en experimentos anteriores mostraron ser capaces de degradar los sustratos de IgA, IgG y HSA con formación de bandas tenues de proteína en geles de SDS-PAGE. Al incubar los paquetes celulares adicionados de EDTA o CaCl₂, a 20 y 10 mM respectivamente; se notó la presencia de bandas de degradación con las cepas No. 114, 122 y 131 en presencia de EDTA, aunque más claramente en el carril 5 de la cepa No. 134, este carril muestra la presencia de muchas bandas tenues de 20-150 kDa. La adición de CaCl₂ 10 mM, generó únicamente un barrido o zona de degradación sin bandas con las cepas No. 131 y 134 (Figura 16).

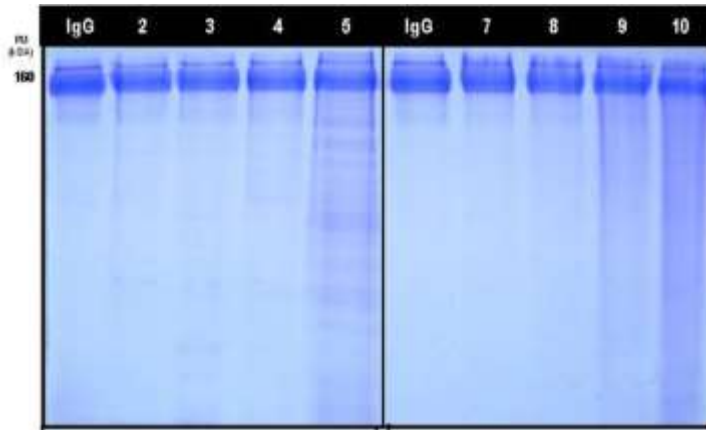


Figura 16. Efecto de EDTA y CaCl₂ en la actividad proteolítica de los aislados clínicos. Evaluación de la actividad proteolítica sobre IgG (10 ug) en presencia de 20 mM EDTA (carriles 2-5) o 10 mM CaCl₂ (carriles 7-10) incubados durante 3 h a 37 °C. Carril: IgG control; 2 y 7: cepa 114 (*K. oxytoca*); 3 y 8: cepa 122 (*E. coli*); 4 y 9: cepa 131 (*E. coli*); 5 y 10: cepa 134 (*P. aeruginosa*).

Efecto de la glucosa en la actividad proteolítica de las cepas clínicas:

Para este experimento, se usaron las cepas 98, 118, 131, 137, (*E. coli*), 114 (*K. oxytoca*) y 132 (*K. pneumoniae*); los resultados muestran que algunas cepas degradaron el sustrato sin dejar bandas aparentes de menor peso al sustrato (IgG-160 kDa, HSA-66 kDa), la cepa No. 137 fue la única que presentó bandas de degradación y también disminución de la banda del sustrato, no así con las demás cepas, que mantienen remanentes del sustrato. En la Figura 17 se aprecia una disminución de la intensidad de la banda que correspondía al sustrato. En relación al sustrato HSA, las cepas presentaron una importante degradación de la banda de 66 kDa a las 24 h, sin embargo, la cepa No. 137, produjo una degradación total (Figura 18).

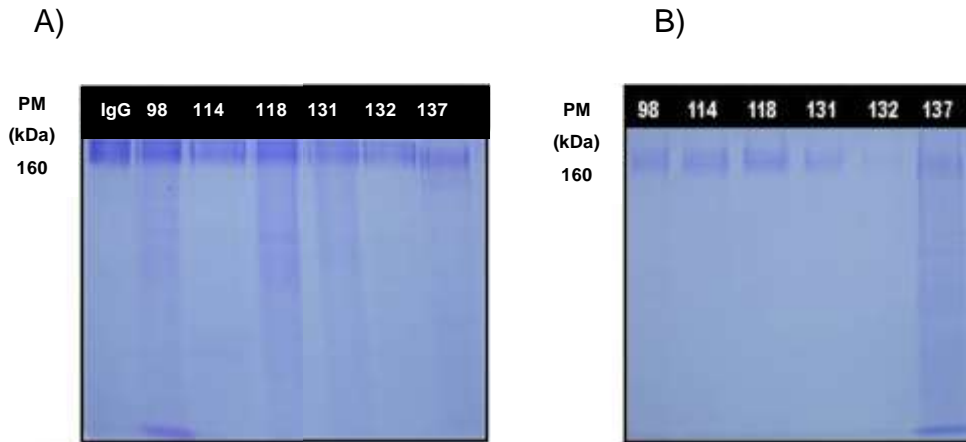


Figura 17. Efecto de la glucosa en la actividad proteolítica de los aislados clínicos sobre IgG. Actividad proteolítica de paquetes celulares sobre IgG (2.5 ug, (A)) o IgG más glucosa al 5% (B). Las cepas de origen clínico se incubaron a 37° C durante 3 h. carril: IgG control; 98: *E. coli*; 114: *K. oxytoca*; 118: *E. coli*; 131: *E. coli*; 132: *K. pneumoniae*; 137: *E. coli*. **B)** Los números corresponden a las mismas cepas que en el panel A).

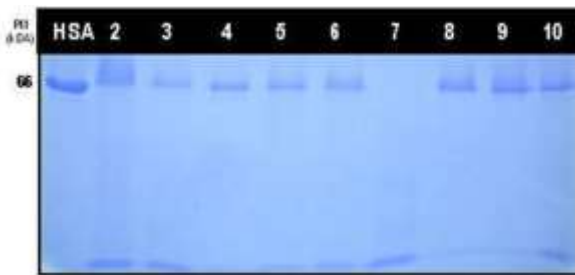


Figura 18. Efecto de la glucosa en la actividad proteolítica de los aislados de origen clínico sobre HSA. Actividad proteolítica de paquetes celulares sobre 2.5 ug de HSA más glucosa al 5%, incubándose a 37° C por 3 h. Carril: HSA (control); 2: cepa 98 (*E. coli*); 3: cepa 114 (*K. oxytoca*); 4: cepa 118 (*E. coli*); 5: cepa 131 (*E. coli*); 6: cepa 132 (*K. pneumoniae*); 7: cepa 137 (*E. coli*); 8: cepa 142 (*E. coli*); 9: cepa 144 (*K. oxytoca*); 10: cepa 149 (*E. coli*).

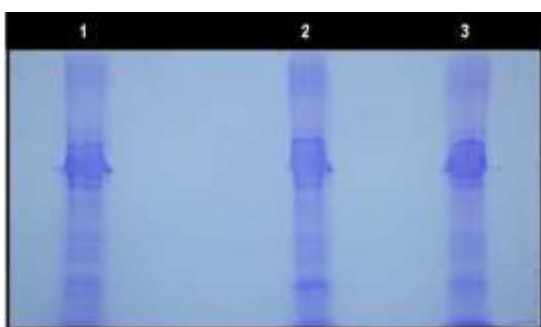
Efecto de la presencia de inhibidores de proteasas, proteasas de otras bacterias, urea y Tritón X-100 en la degradación de IgG por la capacidad degradativa o inhibición proteolítica de los CPS de los aislados bacterianos clínicos en SDS-PAGE al 10% y en zimogramas:

Con el fin de poder obtener una banda de aproximadamente entre 120 - 160 kDa y que corresponde al peso de una proteasa con actividad sobre varios sustratos expresada por la cepa 137; se tomaron alícuotas de 20 µl (20 µg de proteína) de los CPS concentrados de la cepa No. 137, y se incubaron con urea 8 M pH 7.4 o inhibidores de proteasas, con la finalidad de observar esa proteína inactiva. Las

muestras se separaron por electroforesis en SDS-PAGE al 10% y en zimogramas, en estos últimos se observó actividad proteolítica a pesar de la presencia de urea e inhibidores de proteasas (Figura 20), pero en el gel teñido de SDS-PAGE al 10% no se pudo observar la banda en cuestión (Figura 19 A). La incubación del precipitado proteico de la cepa No. 137 con IgA e IgG durante 24 h a 37° C en presencia de Tritón X-100 al 0.1%, no produjo degradación alguna (Figura 19 B).

Asimismo, la presencia de los inhibidores de proteasas no afectó la actividad proteolítica de las cepas No. 95 y 137 en zimogramas. Sin embargo, disminuyó un poco la actividad proteolítica de las cepas No. 124 y 129 e inhibió completamente la actividad de la cepa No. 94 (Figura 21). Al mezclar los CPS de las cepas No. 94/137, 95/137 y 144/137, para evaluar la competencia o sinergia en la degradación del sustrato, la actividad se mantuvo, pero la actividad de la cepa No. 137, disminuyó en relación al control. La actividad de las proteasas de las cepas No. 94, 95, 124, 129 y 144 se vió abatida por la presencia de los inhibidores de proteasas (Figura 21).

A)



B)

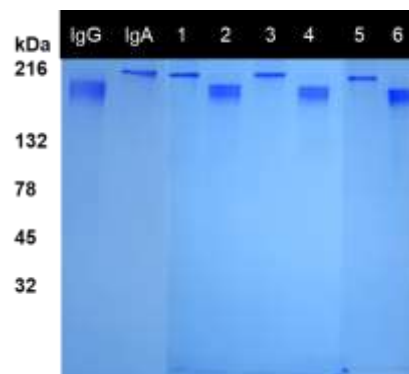


Figura 19. Efecto de inhibidores de proteasas sobre la actividad proteolítica de los CPS de la cepa 137 de *E. coli*. Análisis hecho en presencia de urea e inhibidores de proteasas en la muestra separada en SDS-PAGE al 10%. **A)** carril 1: CPS más urea 8 M pH 7.4; carril 2: CPS más inhibidores de proteasas; carril 3: CPS. **B)** Carril 1: CPS más 5 μ g de IgA; 2: CPS más 5 μ g de IgG; 3: CPS más 5 μ g de IgA y Tritón X-100 al 0.1%; 4: CPS más 5 μ g de IgG y Tritón X-100 al 0.1%; 5: 5 μ g de IgA y Tritón X-100 al 0.1%; 6: 5 μ g de IgG y Tritón X-100 al 0.1%.

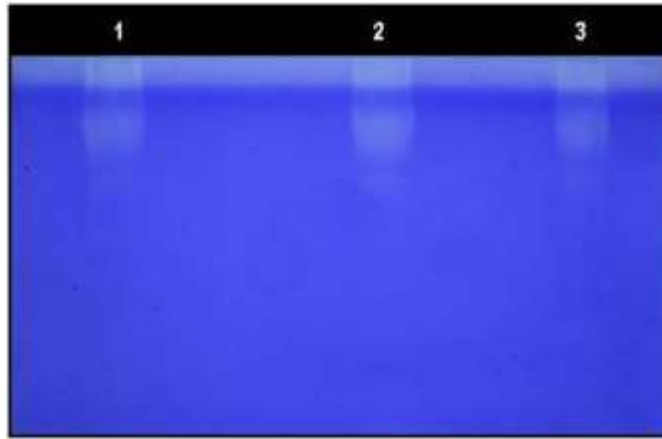


Figura 20. APS de la cepa 137 (*E. coli*) en zimograma. APS como zimograma con IgG al 0.02%. Carril 1: CPS mas urea 8 M pH 7.4; carril 2: CPS mas inhibidores de proteasas; carril 3: CPS - control.

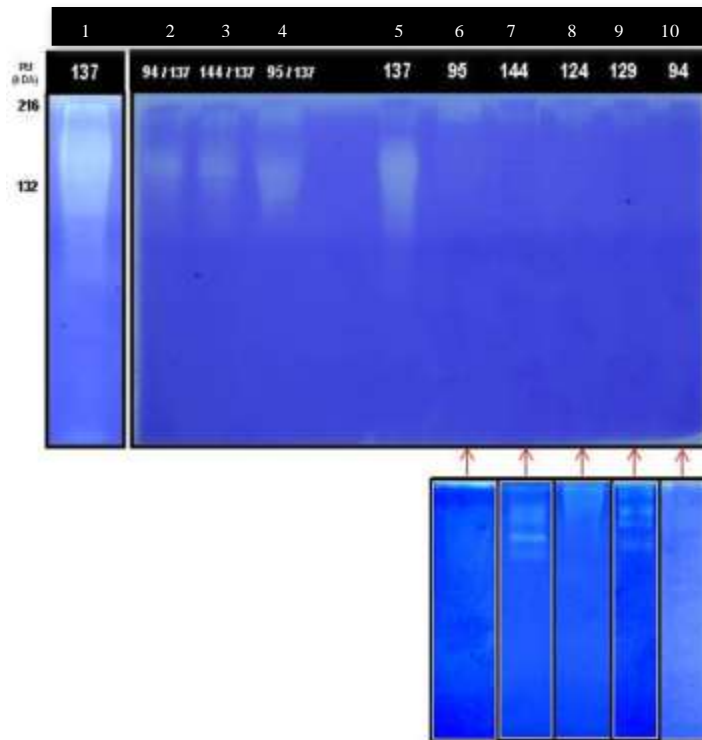


Figura 21. APS de la cepa 137 de *E. coli* en presencia de proteasas de otras *E. coli* e inhibidores de proteasas, en zimograma. Geles de sustrato con IgG al 0.02%. Las mezclas fueron incubadas por 24 h a 37° C. Carril 1: precipitado proteico de la cepa 137 - control; APS de las cepas carril 2: 94 y 137; carril 3: cepas 144 y 137; carril 4: cepas 95 y 137; carriles 5-10 contienen inhibidores de proteínas: cepas 137, 95, 144, 124, 129 y 94. Los carriles de abajo (flechas) corresponden a las APS en los zimogramas con las cepas 137, 95, 144, 124, 129 y 94, pero sin inhibidores de proteasas.

Capacidad de degradación de IgA, IgG y HSA de los CPS de los aislados bacterianos clínicos en zimogramas:

Con el fin de evaluar la actividad proteolítica de las bacterias en estudio, se llevó a cabo la concentración de los CPS de todas las cepas, excepto en las Gram positivas (*S. aureus*). La estrategia de investigación dio como resultado que las cepas No. 94, 95, 122, 124, 129, 131, 133, 137, 141, 142, 144, 151 (*E. coli*), 123, 130, 132, 150 (*K. pneumoniae*), 97 (*C. amalonaticus*), 112 (*P. penneri*), 116 (*S. marcescens*), 134 (*P. aeruginosa*), 143 (*P. mirabilis*), 146 (*P. penneri*), y 149 (*S. flexneri*), presentaron actividad proteolítica en el gel co-polimerizado con IgG, correspondiendo al 68% de las cepas estudiadas (23 de 34 expresaron proteasas) (Figuras 22 y 23 A). HSA fue degradada por las mismas cepas excepto por las cepas 97, 112, 116, 122, 123, 130, 143, 146 y 150. La IgA fue degradada por las cepas 94, 95, 124, 129, 131, 133, 137, 141, 144 y 151 (*E. coli*) (Figura 23 B). Del total de las 34 cepas clínicas que se usaron en este estudio, 23 presentaron actividad proteolítica (68%), de las cuales 12 (52%) eran *E. coli*, y de estas 10 (83%) eran *E. coli* de origen extraintestinal (ExPEC).

Todas las cepas arriba mencionadas, presentaron en mayor o menor grado actividad proteolítica contra los sustratos utilizados (IgA, IgG y HSA), presentando bandas o zonas de degradación que van desde 20 a más de 200 kDa, siendo las proteasas de más de 150 kDa las que mayormente predominaron en estas cepas. En este estudio resaltó la actividad de la cepa No. 137, que presentó una zona intensa y amplia de degradación entre 110-160 kDa con los 3 sustratos. La cepa *E. coli* DH5 α , fue también evaluada, pero no presentó ningún tipo de actividad proteolítica (Figuras 22, 23, y Tabla 11).

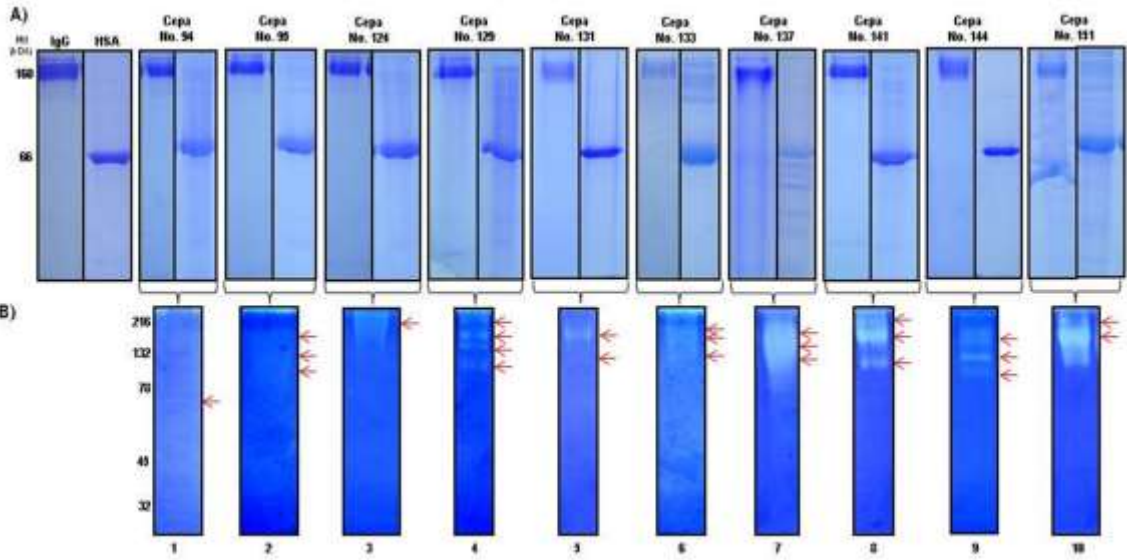


Figura 22. Actividad proteolítica de las *E. coli* de origen extraintestinal sobre IgG y HSA.

A) Análisis en SDS-PAGE al 10% de IgG o HSA tratada con células de las cepas que tuvieron actividad proteolítica en los zimogramas. Por cada cepa se muestran los dos sustratos, carril izquierdo IgG y carril derecho HSA. Controles IgG: (2.5 µg); HSA: (2.5 µg). **B)** Actividad proteolítica secretada (APS) en zimogramas con IgG o HSA al 0.02%, que corresponden a los geles de la sección A). Carril 1: cepa 94, 2: cepa 95, 3: cepa 124, 4: cepa 129, 5: cepa 131, 6: cepa 133, 7: cepa 137, 8: cepa 141, 9: cepa 144, 10: cepa 151, Las flechas marcan las áreas de actividad proteolítica visualizadas en el zimograma.

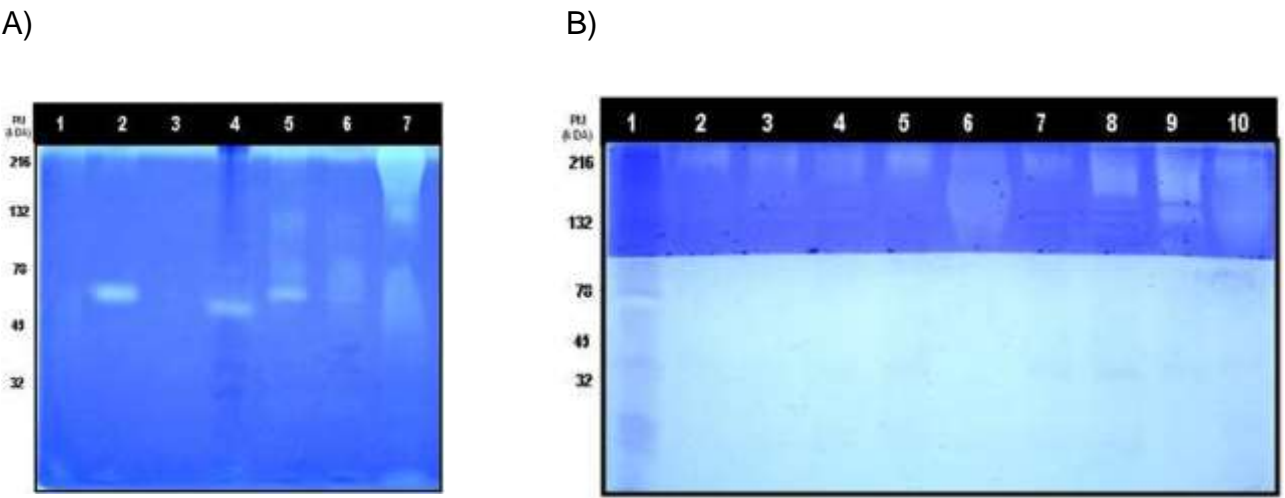


Figura 23. APS de cepas de origen clínico productoras de proteasas para IgG e IgA. Zimogramas con geles con sustrato al 0.02%. **A)** sustrato IgG, carril 1: cepa 97 (*C. amalonaticus*); 2: cepa 112 (*P. penneri*); 3: cepa 114 (*K. oxytoca*); 4: cepa 116 (*S. marcescens*); 5: cepa 122 (*E. coli*); 6: cepa 123 (*K. pneumoniae*); 7: cepa 130 (*K. pneumoniae*). **B)** Sustrato IgA, todas las cepas son *E. coli*; carril 1: cepa 94; 2: 95; 3: 124; 4: 129; 5: 133; 6: 137; 7: 141; 8: 144; 9: 151; 10: 137.

En el presente estudio (primer muestreo), se aislaron 20 *E. coli* de origen clínico, de las cuales 16 eran ExPEC y 4 InPEC. De estas cepas, 10 ExPEC y 2 InPEC presentaron actividad proteolítica. De las 10 ExPEC, 4 fueron obtenidas de hemocultivo, lo que sugiere que estas proteasas les podrían permitir la evasión de la respuesta inmune al degradar inmunoglobulinas en el tejido sanguíneo.

Como una forma de corroborar los resultados obtenidos con las *E. coli* ensayadas se realizaron dos muestreos adicionales (resultados no mostrados), para obtener más ExPEC's. En el segundo ensayo se evaluaron 28 cepas de ExPEC (donadas por el laboratorio de Hemolab, Puebla) y su actividad enzimática sobre IgG fue evaluada en zimogramas; 18 cepas fueron positivas (68%). El perfil enzimático de los zimogramas fue variado en cada una de las cepas, se observaron halos hidrolíticos en pesos moleculares que oscilan entre los 60 y 250 KDa. En el tercer muestreo se obtuvieron 31 aislados de enterobacterias de pacientes portadores, de las cuales 18 (54.5% de las cepas) fueron positivas a la prueba de escrutinio con el sustrato IgG en zimograma. También se observó que hay una gran variabilidad en cuanto a los pesos moleculares de las proteasas que hidrolizan IgG, debido a que se presentan en la mayoría bandas de actividad proteolítica de bajo y mediano peso molecular, que van desde 16 hasta de 60 KDa; también se observaron proteasas de alto peso molecular, en el rango de 161-250 KDa. Ninguna proteasa fue parecida a la proteasa de la cepa 137, por su intensidad y actividad en geles de sustrato.

Ya que las cepas ExPEC eran las que principalmente expresaban actividades proteolíticas, se pensó que estas actividades eran propias de un grupo patogénico por lo que se realizó un cuarto muestreo en cepas no ExPEC; estas cepas fueron evaluadas en zimogramas con IgG.

Se obtuvieron 60 cepas, 30 de las cuales fueron de origen alimentario y las otras 30 de origen intestinal. Los grupos de cepas fueron evaluadas de manera independiente, para el caso de las de origen alimentario, sólo 4 (13%) de las 30 cepas presentaron proteasas que degradaron IgG. En el caso de las cepas de origen intestinal, se observó que sólo 5 (17%) de las 30 muestras analizadas presentan actividad proteolítica.

Tabla 11. Listado de las cepas de origen clínico y su sensibilidad a los antimicrobianos, sitio anatómico de origen y sustratos que degradan.

No. prog.	No. de cepa	Bacteria	No. de antibióticos a los que es resistente	Sitio de obtención	Sustratos		
					IgG	IgA	HSA
1	93	<i>Escherichia coli</i>	1	Urocultivo	-		-
2	94	<i>Escherichia coli</i>	8	Urocultivo	+	+	+
3	95	<i>Escherichia coli</i>	3	Urocultivo	+	+	+
4	96	<i>Escherichia coli</i>	14	Urocultivo	-		-
5	97	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	3	Urocultivo	+		
6	98	<i>Escherichia coli</i>	11	Urocultivo	-		-
7	112	<i>Proteus penneri</i>	5	Ex. uretral	+		
8	114	<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	Urocultivo	-		
9	116	<i>Serratia marcescens</i>	6	Ex. faringeo	+		
10	118	<i>Escherichia coli</i>	5	Ex. Vaginal	-		-
11	122	<i>Escherichia coli</i>	7	Coprocultivo	+		
12	123	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	Ex. faringeo	+		
13	124	<i>Escherichia coli</i>	12	Absceso piel	+	+	+
14	125	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	9	Absceso piel	-		-
15	129	<i>Escherichia coli</i>	12	Urocultivo	+	+	+
16	130	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3	Sec. bronquial	+		
17	131	<i>Escherichia coli</i>	12	Hemocultivo	+	+	+
18	132	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	Ex. faringeo	+		+
19	133	<i>Escherichia coli</i>	10	Urocultivo	+	+	+
20	134	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7	Hemocultivo	+		+
21	135	<i>Stafilococos aureus</i>	2	Her. Quirur.			
22	136	<i>Stafilococos aureus</i>	6	Absceso piel			
23	137	<i>Escherichia coli</i>	4	Hemocultivo	+	+	+
24	138	<i>Stafilococos aureus</i>	6	Her. Quirur.			
25	139	<i>Escherichia coli</i>	5	Urocultivo	-		-
26	140	<i>Escherichia coli</i>	6	Coprocultivo	-		
27	141	<i>Escherichia coli</i>	10	Ex. vaginal	+	+	+
28	142	<i>Escherichia coli</i>	3	Coprocultivo	+		+
29	143	<i>Proteus mirabilis</i>	4	Absceso piel	+		
30	144	<i>Escherichia coli</i>	6	Hemocultivo	+	+	+
31	145	<i>Escherichia coli</i>	0	Her. Quirur.	-		-
32	146	<i>Proteus penneri</i>	4	Urocultivo	+		
33	147	<i>Escherichia coli</i>	0	Coprocultivo	-		-
34	148	<i>Citrobacter diversus</i>	5	Hemocultivo	-		
35	149	<i>Shigella flexneri</i>	4	Coprocultivo	+		+
36	150	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3	Hemocultivo	+		
37	151	<i>Escherichia coli</i>	3	Hemocultivo	+	+	+

Primer muestreo. ((+) y color rojo) actividad proteolítica ((-) y color amarillo) sin actividad proteolítica.

En zimogramas con IgG se observaron proteasas de bajo peso molecular de 20, 25, 37 y hasta de 60 KDa en las cepas de origen alimentario. También se observaron proteasas de alto peso molecular, entre 100-150 KDa, en una cepa de origen intestinal (resultados no mostrados). Estos resultados nos permiten concluir que las cepas ExPEC podrían contener información genética que codifica para proteasas diferentes a las de otras *E. coli*.

Efecto del EDTA y CaCl₂ en la APS de la cepa 137 (*E. coli*) en zimogramas:

Debido a que la mayoría de las proteasas descritas en organismos patogénicos son metaloproteasas, la APS de la cepa 137 se incubó con EDTA o CaCl₂, para tratar de inhibir completamente su actividad. Sin embargo, en presencia de estos dos reactivos y en diferentes condiciones de uso (incubando directamente APS con EDTA o CaCl₂ como se describe en el apartado 9 de Materiales y métodos, o bien incubando los geles con estos reactivos), se observó degradación proteolítica tanto de IgG como de HSA. La actividad proteolítica se apreció un poco más, en el gel que se incubó toda la noche con EDTA 20 mM, sugiriendo la presencia de al menos dos tipos de proteasas, las metaloproteasas y las no metaloproteasas, siendo tal vez las más activas las últimas ya que se ha descrito que algunas serán proteasas se ven inhibidas por la presencia de cationes divalentes (Figura 24).

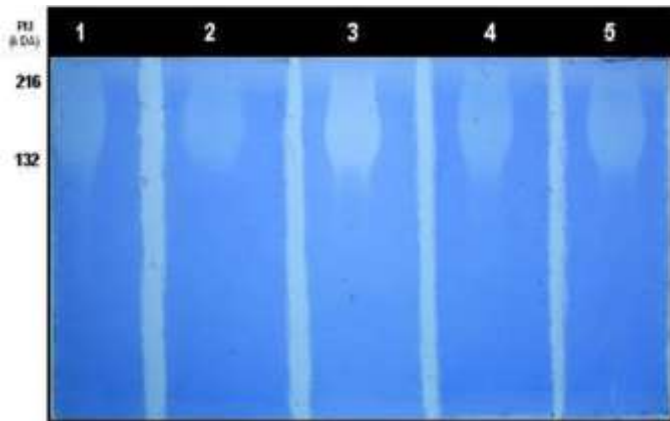


Figura 24. APS de la cepa 137 de *E. coli* en presencia de EDTA y CaCl₂. Zimograma con IgG al 0.02%, incubados a 37° C durante 18 h en buffer Tris-HCl 50 mM pH 7.5. Carril 1: control; 2: gel incubado en CaCl₂ 10 mM 3: gel incubado en EDTA 20 mM; 4: incubación de la APS en CaCl₂ 10 mM por 30 min; 5: incubación de la APS en EDTA 20 mM por 30 min.

Actividad proteolítica de la APS de la cepa *E. coli* 137 a diferente pH y temperaturas en zimogramas:

Para tratar de caracterizar a esta proteasa, en zimogramas con IgG, como se describe en el apartado No. 14 de Materiales y métodos, conteniendo muestras de la cepa 137 fueron incubados a pH de 5.6, 6.5, 7.5, 8.5 y 9.5 y temperaturas de

28, 37, 45, 50 y 55° C. La actividad proteolítica se mantuvo activa en todos los puntos de pH ensayados en el estudio (Figura 25 A); así como también en todos los tratamientos térmicos, disminuyendo un poco a 28°C (Figura 25 B). El pH y temperatura ideal para la actividad de esta proteasa es de 7.5 y 37° C, respectivamente.

A)

B)

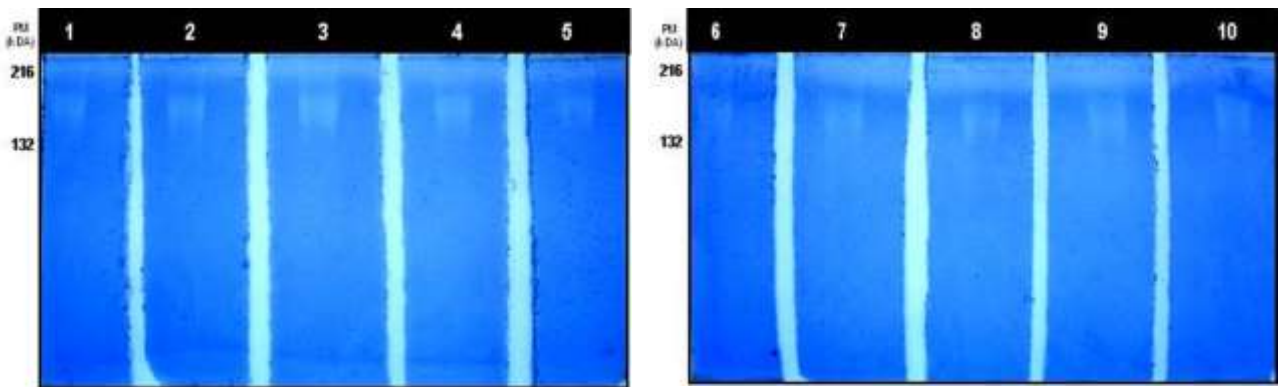


Figura 25. Actividad proteolítica de *E. coli* 137 en diferentes pH's y temperaturas. Zimogramas con geles de sustrato que contienen IgG al 0.02%. **A)** Geles incubados a 37° C por 18 h, carril 1: pH 5.6 (CH₃COONa); 2: pH 6.5 (MOPS 50 mM); 3: pH 7.5 (Tris-HCl 50 mM); 4: pH 8.5 (Tris-HCl 50 mM); 5: pH 9.5 (Tris-HCl 50 mM) **B)** Geles incubados en Tris-HCl 50 mM pH 7.5 por 18 h; carril 6: 28° C; 7: 37° C; 8: 45° C; 9: 50° C; 10: 55° C.

Cinética de actividad de las proteasas de los aislados de origen clínico en zimogramas:

Ya que algunas cepas presentan baja actividad proteolítica en ensayos de 24 h, se quiso conocer si a diferentes tiempos de incubación la actividad proteolítica variaba, por lo que se eligieron 3 cepas para este ensayo: la No. 124 obtenida de absceso de piel con resistencia a 12 antibióticos que presentaba una actividad proteolítica de 200 kDa, la No. 137 de hemocultivo con resistencia a 4 antibióticos que produce una actividad proteolítica de 160 kDa y la No. 144 de hemocultivo con resistencia a 6 antibióticos que produce tres bandas de actividad. La comparación se hizo evaluando la actividad de las proteínas extracelulares concentradas desde

las 12 hasta las 60 h de cultivo, almacenando las proteasas a -20°C , hasta hacer el zimograma comparativo con todas las muestras de la misma cepa.

En la cepa No. 124, a las 24 h hay expresión de actividad proteolítica escasa que se vuelve notoria a las 36 h y sigue incrementándose hasta las 60 h. En la cepa No. 137, a las 24 h ya hay una zona de degradación clara, que se intensifica a las 36 h y posteriormente disminuye (Figura 26). En la cepa No. 144 a las 12 h se visualizan tres bandas tenues de degradación de aproximadamente 100, 130 y 160 kDa; sin embargo, a las 24 h, es franca la disminución de la expresión de la peptidasa de 130 kDa que desaparece por completo a las 48 h, lo contrario sucede con la banda de 160 kDa, que su mayor expresión es a las 24 h y posteriormente disminuye, manteniéndose aún a las 60 h (Figura 26). En base a estos resultados se puede concluir que la actividad proteolítica, es variable en el tiempo, y también que estas proteasas presentan una estabilidad variable.

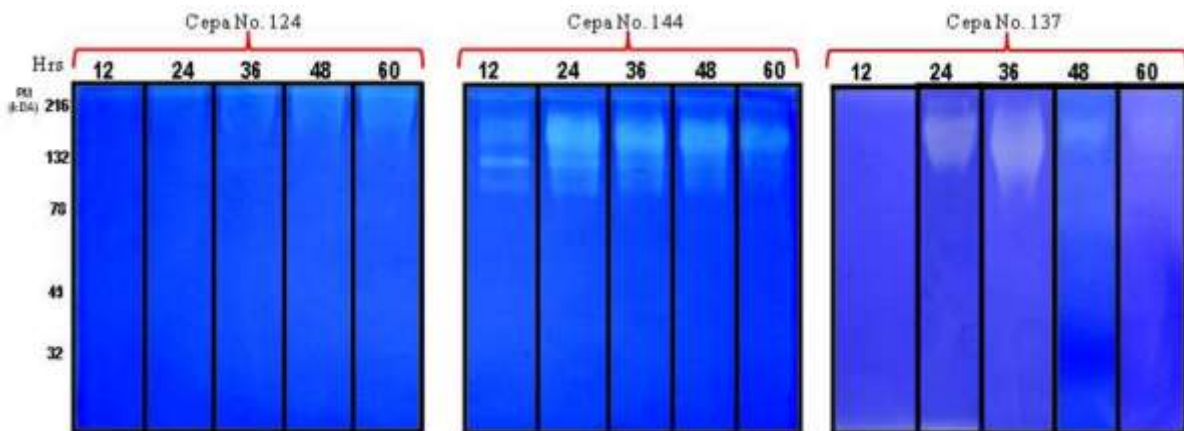


Figura 26. Variación de la actividad enzimática en las cepas 124, 137 y 144 de *E. coli* productoras de proteasas respecto al tiempo. Zimogramas en geles de sustrato co-polimerizados con IgG al 0.02%.

Extracción de DNA plasmídico y transformación de células competentes *E. coli* DH5 α mediante choque térmico:

Con el fin de determinar si las actividades proteolíticas observadas en las diferentes cepas estaban codificadas en plásmidos, se aislaron plásmidos de los 40 aislados obtenidos de las cabezas de pollo; estos aislados todos, excepto el aislado 50, presentaron plásmidos de entre 1000 y 12500 pb.

Los plásmidos obtenidos de estos 39 aislados fueron usados para transformar células competentes de *E. coli* DH5 α con 22 plásmidos diferentes (55%), las transformantes se crecieron en placas de medio LB con ampicilina (100 μ g/ml); la eficiencia de transformación fue de aproximadamente 1×10^4 transformantes por microgramo de DNA. Las placas contenían aproximadamente 50 clonas transformantes. Para los plásmidos de las cepas 46, 48 y 55 la frecuencia de transformación fue tan alta como la de pBluescript II KS(-), generando una cantidad incontable de transformantes. Las clonas fueron circulares, puntiformes, blancas, no translúcidas y de textura lisa. Los 22 plásmidos diferentes, oscilan entre 4000 a 12500 pb en su forma circular covalentemente cerrada (Figura 27).

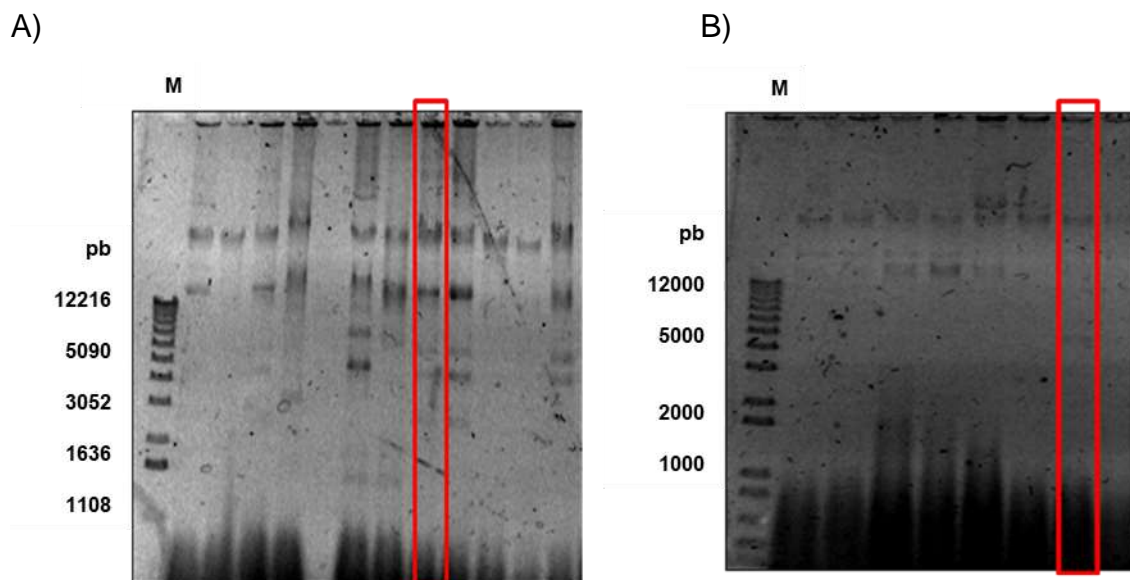


Figura 27. Perfil electroforético de los plásmidos obtenidos de bacterias aisladas de cabezas de pollo. **A)** Patrones electroforéticos de algunos plásmidos obtenidos por el método de Birnboim. **B)** Extracción del DNA plasmídico de algunas clonas transformadas con DNA de muestras observadas en la figura A. El cuadro en rojo en B) corresponde al DNA plasmídico de la cepa en cuadro rojo en A). M: Marcador de peso molecular (pb-pares de bases).

Por otro lado, de los 37 aislados clínicos, se decidió trabajar sólo con bacterias Gram negativas. Se descartaron los 3 aislados de *S. aureus* (135, 136 y 138) Las cepas No. 143 y 146 (*P. mirabilis* y *P. penneri*) respectivamente y de las cepas No. 130 y 148 (*K. pneumoniae* y *C. diversus*) de las que no se pudieron extraer los plásmidos. Las restantes 30 cepas a las que se les extrajeron los plásmidos, corresponde al 88% de los aislados (Tabla 12).

Tabla 12. Listado de las cepas de origen clínico y su sensibilidad a los antimicrobianos, sitio anatómico de origen y extracción de plásmido.

No. prog.	No. de cepa	Bacteria	No. de antibioticos a los que es resistente	Sitio de obtencion	Extracción de plásmido	Transformación
1	93	<i>Escherichia coli</i>	1	Urocultivo	+	+
2	94	<i>Escherichia coli</i>	8	Urocultivo	+	+
3	95	<i>Escherichia coli</i>	3	Urocultivo	+	+
4	96	<i>Escherichia coli</i>	14	Urocultivo	+	+
5	97	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	3	Urocultivo	+	+
6	98	<i>Escherichia coli</i>	11	Urocultivo	+	+
7	112	<i>Proteus penneri</i>	5	Ex. uretral	+	+
8	114	<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	Urocultivo	+	-
9	116	<i>Serratia marcescens</i>	6	Ex. faringeo	+	+
10	118	<i>Escherichia coli</i>	5	Ex. Vaginal	+	+
11	122	<i>Escherichia coli</i>	7	Coprocultivo	+	-
12	123	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	Ex. faringeo	+	-
13	124	<i>Escherichia coli</i>	12	Absceso piel	+	+
14	125	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	9	Absceso piel	+	-
15	129	<i>Escherichia coli</i>	12	Urocultivo	+	-
16	130	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3	Sec. bronquial	-	-
17	131	<i>Escherichia coli</i>	12	Hemocultivo	+	-
18	132	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	Ex. faringeo	+	-
19	133	<i>Escherichia coli</i>	10	Urocultivo	+	-
20	134	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7	Hemocultivo	+	-
21	135	<i>Stafilococos aureus</i>	2	Her. Quirur.		
22	136	<i>Stafilococos aureus</i>	6	Absceso piel		
23	137	<i>Escherichia coli</i>	4	Hemocultivo	+	+
24	138	<i>Stafilococos aureus</i>	6	Her. Quirur.		
25	139	<i>Escherichia coli</i>	5	Urocultivo	+	+
26	140	<i>Escherichia coli</i>	6	Coprocultivo	+	-
27	141	<i>Escherichia coli</i>	10	Ex. vaginal	+	-
28	142	<i>Escherichia coli</i>	3	Coprocultivo	+	+
29	143	<i>Proteus mirabilis</i>	4	Absceso piel		
30	144	<i>Escherichia coli</i>	6	Hemocultivo	+	+
31	145	<i>Escherichia coli</i>	0	Her. Quirur.	+	-
32	146	<i>Proteus penneri</i>	4	Urocultivo		
33	147	<i>Escherichia coli</i>	0	Coprocultivo	+	-
34	148	<i>Citrobacter diversus</i>	5	Hemocultivo	-	-
35	149	<i>Shigella flexneri</i>	4	Coprocultivo	+	-
36	150	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3	Hemocultivo	+	-
37	151	<i>Escherichia coli</i>	3	Hemocultivo	+	-

(+) Transformación y (-) no transformación de *E. coli* DH5 α .

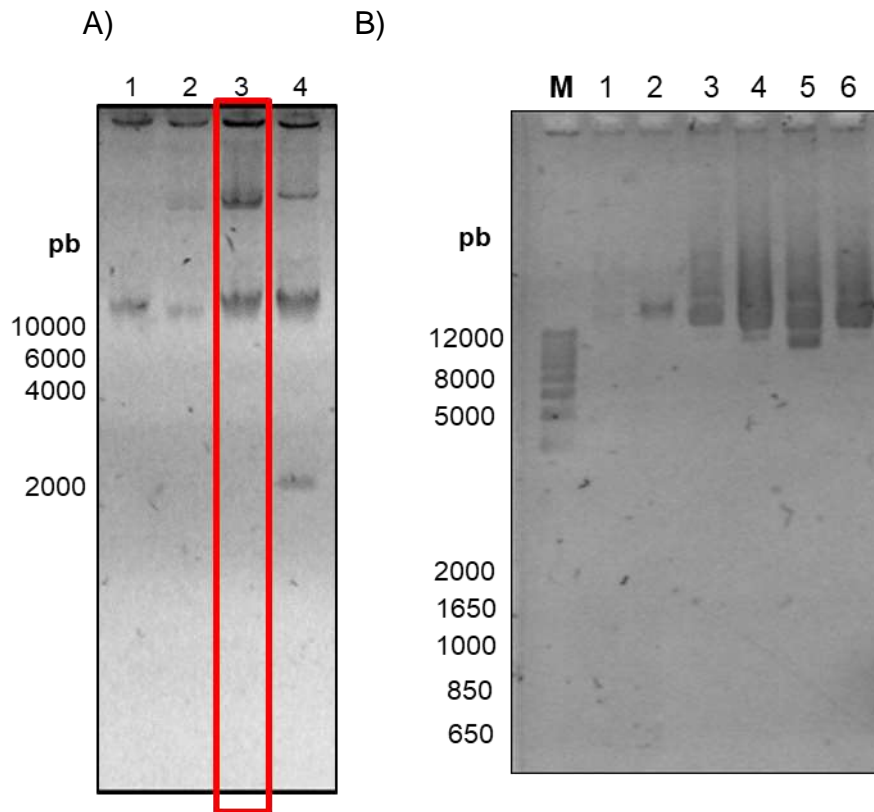


Figura 28. Perfil de plásmidos de tres aislados bacterianos con resistencia a antimicrobianos y de las transformantes 137Ec. **A)** Análisis de los plásmidos extraídos de cepas silvestres de *E. coli* (Ec) Ampr, por el método de Birnboim y separados en gel de agarosa al 0.8%; el orden de las cepas por carril es: 1: 140Ec (coprocultivo); 2: 141Ec (exudado vaginal); 3: 137Ec (hemocultivo); y 4: 144Ec (hemocultivo). **B)** Transformantes Ampr, de la cepa DH5 α obtenidas con DNA plasmídico de la cepa 137Ec (cuadro rojo en A); el orden de las cepas por carril es: M- Marcador de peso molecular (pb-pares de bases); 1: DH5 α ; 2: 137Ec wt; 3: 137Ec191P; 4: 137Ec194Pa; 5: 137Ec194Pb; 6: 137Ec195S. Los carriles 3-5 corresponden a transformantes independientes de un primer experimento de transformación. El carril 6 corresponde a una transformante obtenida con DNA de 137EC191P (re-transformación).

Se extrajo el DNA plasmídico de la cepa clínica No. 137 (*E. coli*), por el método de lisis alcalina de Birnboim obteniendo un plásmido de aproximadamente 12000 pb. El plásmido obtenido fue usado para transformar *E. coli* DH5 α competentes mediante choque térmico; con este método se obtuvieron clonas transformantes que crecieron en LB con ampicilina 100 μ g/ml; se obtuvieron aproximadamente 50 clonas/placa por experimento de transformación y contenían el plásmido de 12000 pb; en la Figura 28, se muestran algunas plásmidos. Estas clonas no presentaron la actividad proteolítica expresada por la cepa clínica 137.

En resumen, se pudo hacer la transformación de *E. coli* DH5 α por choque térmico con DNA plasmídico de 14 cepas: 11 *E. coli* (No. 93, 94, 95, 96, 98, 118, 124, 137, 139, 142, 144), 1 de *C. amalonaticus* (97), 1 de *P. penneri* (112) y 1 de *S. marcescens* (116); estas clonas transformantes tampoco presentaron actividad proteolítica, como ocurrió cuando se usó el plásmido de la cepa clínica No. 137. Del total de preparados de plásmidos de *E. coli* (20), 11 se pudieron transformar, lo que representa el 79% (Tabla 12). A pesar de la eficiencia de transformación por estos plásmidos, no se pudo observar actividad proteolítica alguna con ellos, por lo que se podría concluir que dichas actividades proteolíticas no están asociadas a plásmidos.

19. Determinación de patotipo de *E. coli* por Southern blot:

La caracterización de la cepa de *E. coli* 137, se realizó con el apoyo del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE). La identificación de genes que codifican para factores de virulencia característicos de las cepas patógenas de *E. coli* y de importancia clínica y epidemiológica que están asociadas a brotes se hizo por hibridación tipo Southern blot utilizando las siguientes sondas: para ETEC (*E. coli* enterotoxigénica) los factores de virulencia buscados fueron las toxinas STI y LT, toxinas termo-estable y termo-lábil respectivamente; para EHEC (*E. coli* enterohemorrágica) fueron *eae* (gen cromosomal para la intimina); STX1 y STX2 (Toxinas Shiga); para EIEC (*E. coli* enteroinvasiva), *ial* (Fragmento asociado a invasividad) y para EPEC (*E. coli* enteropatógena), EAF y BFP (Factor de adherencia y pili, respectivamente). Sin embargo, el DNA de la cepa 137 no hibridó con ninguna de las sondas, por tanto, *E. coli* 137 fue clasificada como NO PATÓGENA o negativa a los grupos: ETEC, EIEC, EPEC y EHEC con la metodología estandarizada del InDRE (Tabla 13).

Tabla 13. Listado de las secuencias de las sondas empleadas en el diagnóstico de *E. coli* por Southern blot.

TIPO DE <i>E. coli</i>	FACTOR DE VIRULENCIA	SECUENCIAS DE OLIGONUCLEÓTIDOS USADAS COMO SONDAS
ETEC	STI	GCTGTGAATTGTGTTGTAATCC
		GCTGTGAACTTTGTTGTAATCC
EHEC (O:157 - verotoxina)	LT	GCGAGAGGAACACAAACCGG
	<i>eae</i>	ACTGAAAGCAAGCGGTGGTG
	STX1	GATGATCTCAGTTGGGCGTTC
EIEC	STX2	TCTGAAACTGCTCCTGTGTA
	<i>ial</i>	CCATCTATTAGAATACCTGTG
EPEC	EAF	TATGGGGACCATGTATTATCA
	BFP	GCTACGGTGTTAATATCTCTGGCG

Las secuencias están escritas en la dirección 5' a 3'. ST: Toxina termo-estable. LT: Toxina termo-lábil. *eae*: gen cromosomal que codifica para la proteína de membrana externa (OMP) de 94 kDa (Intimina), expresión regulada por genes plasmídicos. STX: Toxina shiga. *ial*: Fragmento del locus asociado a invasividad presente en el plásmido plnv. EAF: Factor de adherencia de EPEC. BFP: pilus

Ya que la cepa 137 de *E. coli* mostró una actividad proteolítica sobresaliente sobre BSA, HSA, IgG e IgA; es estable por tiempos prolongados de cultivo y a tratamientos térmicos más allá de la temperatura corporal, no fue inhibida por diferentes inhibidores de proteasas y no parece estar relacionada con las proteínas codificadas por los genes *pet*, *pic* y *tsh*, proteasas expresadas por diversos patotipos de *E. coli* (Tabla 14); se decidió secuenciar su genoma, con el fin de identificar una secuencia que codificase para una proteasa diferente a las ya descritas y definir un tipo filogenético al que esta *E. coli* pertenece.

Con la metodología de secuenciación masiva empleada, se logró una cobertura de al menos 32 veces (32X) del genoma de *E. coli* 137. Las secuencias cortas fueron filtradas con base en su confiabilidad, denominada calidad y se ensamblaron por medio del programa MIRA 4 (Chevreux B., 2005). El análisis de las secuencias obtenidas generó 172 contigs (Secuencias ensambladas por consensos conservados), y la suma de nucleótidos permitió predecir un genoma de 4.96 Mb.

El análisis de esta secuencia, comparada con la base de datos de los genomas de *E. coli* indica que es una cepa que pertenece al grupo D. Por medio de un análisis por MLST (Multilocus Sequence Typing) de secuencias genómicas, en la cepa 137

se identificó una clase de secuencias tipo 3005 (ST3005) pero con una variación en el marcador *fumC*. De estos resultados se concluye que la cepa clínica *E. coli* 137 es una APEC (*E. coli* patógena aviar) que infectó a humanos. El MLST involucra la amplificación por PCR y secuenciación de 5-10 loci de aproximadamente 500 pb de longitud, cada secuencia tiene asignada un locus único o número alélico; y a cada combinación de variante de locus se le asigna un número de secuencia tipo, el cual se utiliza para clasificar a este grupo de secuencias o secuencias tipo (Inouye *et al.*, 2012). En este caso, la secuencia tipo 3005, fue también reportada en una *E. coli* multirresistente aislada de tracto urinario de caninos (Wagner *et al.*, 2014).

En el genoma está presente un plásmido F (Factor de Fertilidad) y una parte importante de la isla de patogenicidad SRL-E 99-9324 (GenBank accession number KT777641) que también ha sido descrita en diferentes cepas de *Shigella* sp. y que está relacionada a genes de resistencia a antimicrobianos. Además, se identificaron los genes que codifican para PilA, curli, y la fimbria Bfp.

También presenta genes que le confieren resistencia a mercurio, sulfas, tetraciclina y antibióticos betalactámicos en un fragmento posiblemente de plásmido, confirmando de esta manera su carácter de multirresistente mediado por plasmido y que llevó a cabo la transformación de *E. coli* DH5 α . También fueron identificados genes para los sistemas de secreción tipo II, III y VI, que están relacionados a virulencia e inyección de moléculas efectoras en el hospedero. Por otra parte, esta cepa tiene genes que codifican para proteasas e inhibidores de proteasas, tales como la alpha-2-macroglobulina y genes que codifican componentes asociados con la invasión celular y resistencia sérica, por lo tanto, se explica su capacidad para infectar tejido sanguíneo.

Tabla 14. Discriminación y comparación de la actividad proteolítica y presencia de los genes *pet*, *pic*, *tsh* en algunas cepas de origen clínico, alimentos y la SN-137 (Modificado de Trujillo *et al.*, 2015).

Cepa	Origen de la cepa	Actividad proteolítica	Amplificación del gen		
			<i>pet</i>	<i>pic</i>	<i>tsh</i>
SN-137	Clínica (hemocultivo)	+	-	-	-
ETM6	Alimentos	-	-	-	+
ETM8	Alimentos	+	-	-	-
ETM13	Alimentos	+	-	-	-
ETM16	Alimentos	+	-	-	+
ETM17	Alimentos	-	-	-	+
ETM33	Clínica (intestinal)	-	-	-	+
ETM35	Clínica (intestinal)	+	+	-	+
ETM42	Clínica (intestinal)	+	+	-	-
ETM47	Clínica (intestinal)	+	-	-	+
ETM53	Clínica (intestinal)	-	+	-	-
E4	Clínica (vaginal)	+	+	-	-
E26	Clínica (urocultivo)	-	+	-	-
E10	Clínica (esperma)	+	+	-	-
E5	Clínica (ojos)	-	+	-	-

DISCUSIÓN

La actividad proteolítica de las bacterias es necesaria para la obtención de nutrientes simples como aminoácidos, vitaminas o iones a partir de sustratos complejos, para destruir moléculas con efecto antibacteriano, para penetrar sustratos de materiales relativamente sólidos como tejidos de diversas plantas o animales, así como para controlar el metabolismo primario interno de biosíntesis a fin de llevar a cabo la multiplicación celular (Rao *et al.*, 1998). Entre las proteasas y otros subgrupos de proteínas relacionadas filogenéticamente están las betalactamasas y las ligantes de penicilina, que incluso se ha probado experimentalmente que se puede evolucionar del grupo de proteínas ligantes de penicilina a proteasas; estas proteínas de unión a penicilina son importantes para las bacterias porque rehacen la pared celular bacteriana (Hirai *et al.*, 2011; Edo *et al.*, 2017; Leclercq *et al.*, 2017).

Para hacer más completo el universo conocido de las proteasas se conocen algunas que son factores de virulencia codificados en elementos genéticos móviles como plásmidos (Provence y Curtiss, 1994; Otto, *et al.*, 1998; Harrington *et al.*, 2009; Navarro-Garía *et al.*, 2001; Kuo *et al.*, 2016), al igual que se ve en problemas epidemiológicos con los genes de resistencia a los betalactámicos. Con este escenario se planteo conocer la relación, presencia de plásmidos con resistencia a betalactámicos y el posible metabolismo proteolítico de bacterias Gram negativas, principalmente. Con ello también se podría conocer ciertas frecuencias en la abundancia de proteasas en bacterias potencialmente patogénicas y si estas pertenecían al grupo S6 como factor de virulencia. Como se discute adelante, algunas proteasas expresadas en bacterias Gram negativas, y en particular, abundantes en *E. coli*, se desconoce su identidad y los genes que las codifican. Estas proteasas podrían contribuir en la virulencia de estos microorganismos y las que parecen no tener relación con betalactamasas de acuerdo a los resultados obtenidos empleando la estrategia utilizada en esta investigación.

En este trabajo, se encontró que bacterias resistentes a antibióticos producen proteasas que degradan proteínas séricas humanas, tales como las IgA, IgG, HSA o BSA. Estos resultados son semejantes a los de otros autores que mostraron que diferentes cepas de *P. multocida* tienen la capacidad de producir enzimas extracelulares que cortan IgA e IgG humana (Pouedras *et al.*, 1992, Negrete-Abascal *et al.*, 1994, 1999). Actividades semejantes se han demostrado en los patógenos *Neisseria gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *A. pleuropneumoniae*, *H. influenzae* y *S. pneumoniae* que hidrolizan específicamente a la IgA1 (Hedges *et al.*, 1998). *P. gingivalis* y *S. marcescens* también producen proteasas que degradan IgA e IgG (Imamura *et al.*, 1994; Molla *et al.*, 1988), en tanto que *P. mirabilis* produce una proteasa que degrada la cadena pesada de la IgA1, IgA2 e IgG (Loomes *et al.*, 1992).

Una diferencia del presente estudio con los resultados de otros autores que investigaron la capacidad de degradación de las proteasas expresadas en cepas de *E. coli* del tipo ExPEC, radica en la frecuencia del fenotipo de proteasa degradante de IgA; fenotipo que aquí se correlaciona también con la actividad degradativa de IgG y HSA. Milazzo y Delisle, aislaron 73 cepas de *E. coli* de pacientes con infección de vías urinarias y 10 (14%) hidrolizaron IgA de mieloma, pero no IgG, IgM o IgA secretora humanas (Milazzo y Delisle, 1984); en otro estudio Diebel *et al.*, reportan que 9 cepas (27.27%) de 33 *E. coli* aisladas de tracto respiratorio eran capaces de cortar IgA secretora mientras que 7 cepas de *E. coli* obtenidas de fuera del tracto respiratorio no degradaron la IgA secretora (Diebel *et al.*, 2004). En otro estudio de Russo y Carlino-MacDonald, evaluaron 33 cepas ExPEC y ninguna fue capaz de degradar IgA, IgA secretora o IgG, concluyendo que los hallazgos en su estudio apoyan el concepto que las cepas de *E. coli* que causan infección fuera del tracto urinario, no poseen peptidasas que corten inmunoglobulinas humanas del tipo de IgA1, IgA2, IgA secretora o IgG (Russo y Carlino-MacDonald, 2008).

De los pocos estudios relacionados a las ExPEC y la expresión de peptidasas, nosotros logramos observar con el método de zimogramas, que 10 (62.5%) de las 16 ExPEC, degradaron IgA e IgG humanas y HSA (Tabla 11); otros autores como Milazzo y Delisle, obtuvieron un bajo porcentaje 14% (10/73) de *E. coli* que hidrolizaban la IgA de mieloma, pero no IgG, IgM o IgA secretora humanas (Milazzo y Delisle, 1984), en tanto que Diebel *et al.*, reportaron el 27.3% (9/33) de fenotipo proteolítico sobre IgA secretora (Diebel *et al.*, 2004). El resultado de este proyecto es 2.3 veces mas alto que el de Diebel y casi 4.5 veces mayor que el de Milazzo, estas diferencias podrían deberse al método empleado en el escrutinio del fenotipo proteolítico y quizás de la temporalidad de los cultivos bacterianos como se menciona mas adelante.

En relación al sitio de origen de los aislados de ExPEC, un aislado de herida quirúrgica no presentó actividad proteolítica, por lo que probablemente podría tratarse de una contaminación de la herida. Se obtuvieron 8 aislados de urocultivo y 4 (50%) de ellos tuvieron actividad proteolítica. Un aislado de exudado vaginal, uno de absceso de piel y 4 de hemocultivos, en total 6 (100%) tuvieron capacidad proteolítica. Los datos indican que las cepas obtenidas de 4 diferentes sitios anatómicos presentaron actividad proteolítica contra IgA, IgG humanas y HSA (Urocultivo, Exudado vaginal, Absceso de piel y Hemocultivo) (Tabla 11). Los aislados proteasa positivos obtenidos por Milazzo y Delisle, fueron de pacientes con infección de vías urinarias (Milazzo y Delisle, 1984); los aislados de *E. coli* obtenidos por Diebel *et al.*, que tuvieron actividad proteolítica fueron del tracto respiratorio (Diebel *et al.*, 2004); en tanto que Russo y Carlino-MacDonald, evaluaron 33 cepas tipo ExPEC obtenidas de diferentes muestras humanas (Sangre, esputo, heridas, abscesos, fluido peritoneal, fluido cerebro-espinal, fluido pleural y orina), pero ninguna fue capaz de degradar IgA, IgA secretora o IgG humanas. (Russo y Carlino-MacDonald, 2008). Entre las explicaciones mas probables a los resultados de los últimos autores citados, están que posiblemente hayan evaluado cultivos muy jóvenes o demasiado envejecidos, o que el medio de cultivo haya interferido. Otra explicación metodológica muy probable es que ellos

buscaban específicamente una actividad enzimática sobre la región bisagra de las inmunoglobulinas, por lo que otras actividades quizás pudieron ser ignoradas o considerada como fallos en el procedimiento de valoración proteolítica, por salir del “modelo reconocido” de proteasas del tipo IgA de varias bacterias inactivantes de inmunoglobulinas.

En cuanto al método de evaluación proteolítica, pareciera ser muy simple porque no se determina con precisión el tipo de proteasa, pero es suficiente para poner de manifiesto la actividad proteolítica y con ello entender las variaciones de actividad reportadas en cuatro trabajos de investigación incluidos el presente. En nuestro análisis se concluye que las fuentes de variación de la valoración dependen del tiempo de cultivo de cada cepa y de la estabilidad de la proteasa-peptidasa producida por las ExPEC (Figura 26). Adicionalmente los extractos de cultivo o sobrenadantes concentrados podrían contribuir en esta actividad; y el uso de zimogramas permite identificar el tamaño molecular de la peptidasa y la magnitud de la degradación del sustrato con base en el área blanca después de teñir todo el gel con azul de Coomassie.

El tiempo de incubación de los cultivos es muy importante para observar una clara actividad proteolítica, como se mostró para las cepas 124, 137 y 144 (Figura 26), porque esto ilustra muy claramente la diferencia entre positividad y negatividad en actividad proteolítica en función del tiempo y esta variable podría explicar por qué reportan resultados negativos de degradación en el grupo de Russo y Carlino-MacDonald. El resultado de expresión-producción de la peptidasa, es mas claramente observado haciendo extracción y precipitación de las proteínas a diferentes tiempos (12, 24, 36, 48 y 60 h de crecimiento bacteriano), siendo el resultado dependiente de la cepa, es decir del fondo genético, con lo cual podría existir mayor concordancia con otras investigaciones de expresión de la proteasa (Russo y Carlino-MacDonald, 2008). Esto tiene repercusiones en el momento de hacer una recuperación de mayores cantidades de la proteasa para hacer la caracterización bioquímica de la enzima.

Pouedras desde 1992, reportó que las peptidasas de cepas de *P. multocida* cortaban las cadenas pesadas de IgA e IgG fuera de la región bisagra diferenciándose de las peptidasas de bacterias que cortan en la región bisagra (Pouedras *et al.*, 1992). En este trabajo se observó una degradación parcial de IgG con el precipitado proteico de la cepa clínica No. 137, que fue visible a las 24 h, mostrando una banda de 160 kDa correspondiente a IgG completa y otra, producto de degradación, de 140 kDa aproximadamente, indicando con ello que el sitio de corte es fuera de la región bisagra (Figura 14-A). La banda pequeña fue analizada por espectrometría de masas y el resultado mostró que se trataba de la región constante de la cadena pesada de IgG. De la misma manera, con HSA (66 kDa), se presentaron bandas que indicaban la degradación parcial de la proteína (Figura 14-B). Esto sugiere que las bacterias ExPEC, aparte de evadir la respuesta inmune, al degradar inmunoglobulinas, también afectan al humano, al degradar a la HSA, proteína importante en el torrente circulatorio porque es la “transportadora” de una variedad abundante de ligandos como aminoácidos, cationes divalentes, ácidos grasos, ácidos lipoteicoicos y medicamentos (Sugio *et al.*, 1999). La degradación de inmunoglobulinas por proteasas secretadas por las bacterias patógenas es un mecanismo bien conocido de evasión del sistema inmune (Maeda *et al.*, 1989; Molla *et al.*, 1988; Kornfeld y Plaut, 1981), además de que se convierten en una fuente de aminoácidos para diferentes microorganismos (Jansen *et al.*, 1995). Aquí también se muestra que probablemente la HSA, podría ser utilizada como fuente de aminoácidos; por lo que el trabajo aquí presentado es quizás el primero que proporciona evidencias de utilización de HSA como sustrato de proteasa y probable alimento bacteriano.

Para este trabajo era importante distinguir o asociar tres características genéticas: (a) la presencia de plásmidos, (b) la resistencia a los betalactámicos y (c) la producción de proteasas. Este razonamiento era importante de probar porque cada vez es mas frecuente la aparición de resistencia a betalactámicos entre las bacterias patogénicas; si las bacterias patogénicas producen proteasas habría alguna probabilidad de que estas también estuvieran relacionadas a la presencia

de plásmidos. Otra opción de localizar una función proteolítica en plásmidos se ha relacionado con las proteasas Pic, Pet y Tsh.

En el sector médico es frecuente catalogar a *E. coli* como una bacteria poco relevante en enfermedades extraintestinales. Esto es importante de reconsiderar ya que la adquisición de resistencia a antibióticos por *E. coli*, quizás se acompañe por un incremento de la virulencia (Johnson y Russo, 2002). Con los resultados de esta investigación no se puede asegurar esto último, en parte porque los aislados fueron de origen clínico y el tamaño de la muestra es relativamente pequeña; sin embargo, nuestros datos muestran que independientemente de la cantidad de antibióticos a los que sean resistentes las ExPEC, la actividad proteolítica no está inherentemente ligada a la resistencia. Se desconoce si existe alguna tendencia en la aparición de la anterior correlación, si hay relaciones causales entre la resistencia y virulencia, por ejemplo, si la adquisición de resistencia conduce a la ganancia o pérdida de factores de virulencia, o si cepas que son intrínsecamente más o menos virulentas es más probable que se vuelvan resistentes (Johnson *et al.*, 2003), este tema continúa en debate por varios autores.

Un tema importante para el sector médico es si el conocimiento de los patrones de resistencia a antibióticos en un área geográfica determinada y la formulación de una apropiada política de antibióticos hospitalaria y comunitaria, permitirá un control de estas infecciones. Es también muy importante conocer el patrón de susceptibilidad a antibióticos de *E. coli* para que de esta manera se puedan seleccionar los antibióticos adecuados para el apropiado tratamiento de las infecciones que puede causar (Sharma *et al.*, 2007). En años recientes se han descrito una serie de patotipos de *E. coli* que causan distintas enfermedades, por el potencial de adquirir elementos genéticos móviles que podrían contener además factores de virulencia y con ello se ha aumentando su diversidad (Ochman *et al.*, 2000).

En este trabajo se observó que la cepa 96 de *E. coli* con resistencia a una mayor cantidad de antibióticos (14), no degrada IgG o HSA. La cepa 131 (*E. coli*), que fue resistente a 12 antibióticos, degrada IgG y HSA, pero la cepa clínica No. 137 (*E. coli*) con resistencia a 4 antibióticos, tiene una capacidad de degradación de IgA, IgG y HSA, mayor que todas (Tabla 11). Estos resultados podrían sugerir que a mayor resistencia a diferentes antimicrobianos, podrían poseer menor cantidad de otros factores de virulencia, como las proteasas.

Por estudios de Southern blot se concluyó que la cepa No. 137 es una *E. coli* no patógena al humano, pero que tiene un factor de virulencia que la hace patógena y le permiten estar en sangre, un medio diferente al entérico. Por consiguiente, la *E. coli* puede ser vista como una especie que evoluciona rápidamente, y que puede ser acelerada su evolución por la selección que hace el ser humano con los tratamientos de antimicrobianos; así, es probable que *E. coli* sea cada vez mas capaz de generar nuevas variantes patógenas que pueden anular los mecanismos de protección del hospedero, traduciéndose en características patogénicas nuevas, producto de esos factores de virulencia (Donnenberg y Whittam, 2001), como *P. multocida*, microorganismo que afecta a diferentes organismos incluidas aves de corral, secreta metaloproteasas que degradan IgA e IgG humanas, así como de otras especies (Pouedras *et al.*, 1992, Negrete-Abascal *et al.*, 1999). Otros autores han reportado que la resistencia a varios antibióticos está estrechamente asociada con la reducción en virulencia (Johnson *et al.*, 2004). Los resultados obtenidos en el presente trabajo concuerdan con esa hipótesis, sin embargo, habrá que seguir valorando la problemática con más trabajo epidemiológico.

En relación a la transformación genética de *E. coli* DH5 α con los plásmidos provenientes de los aislados silvestres para determinar si podían co-transferir la resistencia a los betalactámicos y la capacidad de degradación proteolítica. Nuestros resultados registran que, aunque se lograron transformar *E. coli* competentes con 14 plásmidos, del 41% de los aislados clínicos (Tabla 12), las

cepas transformadas fueron resistentes a ampicilina, pero no expresaron ninguna actividad proteolítica. Posiblemente la actividad proteolítica no reside en el plásmido que codifica la resistencia a ampicilina y estos factores pueden estar ausentes en DH5 α . Este apartado de la investigación es importante porque se conoce que la transferencia horizontal de genes puede aumentar la adaptabilidad de los microorganismos, entre estos genes están los involucrados en la expresión de peptidasas que se pueden encontrar en el cromosoma y/o en los plásmidos de las bacterias. Por ejemplo, para algunas cepas de *E. coli* y *Shigella* spp, se han descrito varias peptidasas secretadas, cuyos genes se localizan en plásmidos (Henderson *et al.*, 2004); tal es el caso de los genes de peptidasas Tsh (Provence y Curtiss, 1994), y Hbp de *E. coli* (Otto *et al.*, 1998); así como las proteasas Iga de *H. influenzae* y SepA de *S. flexneri* (Benjelloum-Touimi *et al.*, 1995).

En el grupo de bacterias obtenidas de muestras de infecciones humanas extraintestinales con resistencia a los antimicrobianos, sin correlación entre los fenotipos de expresión de betalactamasas y la producción de proteasas, pero con un porcentaje alto de positividad a las proteasas, surge un fenotipo sobresaliente para una cepa de *E. coli* (No. 137), nos indujo a conocer algunas características bioquímicas de la proteasa de esta cepa, conocer más acerca de su genotipo patogénico por metodologías convencionales y averiguar si algunas funciones conocidas de proteasas como Pic, Pet y Tsh estuvieran contenidas en esta interesante cepa de *E. coli*. Es importante aclarar que a la par de esta investigación se ampliaron los muestreos a otros nichos ecológicos de *E. coli* y se diseñaron pruebas moleculares que permitieron hacer más robusto el análisis molecular de la cepa 137 de *E. coli*.

En relación a la caracterización de las proteasas de *E. coli* 137, se ha reportado que las peptidasas de *A. pleuroneumoniae* son inhibidas por la presencia de agentes quelantes como el EDTA y EGTA (Negrete Abascal *et al.*, 1994, 1999); las de la cepa 137 no fueron inhibidas con EDTA o EGTA, probablemente porque no son metalopeptidasas (Serin-peptidasas, Cistein-peptidasas, o Treonina-

peptidasas). También se ha reportado un incremento en la actividad proteolítica cuando fueron agregados el calcio o zinc (Negrete-Abascal *et al.*, 1999); que estabilizan la molécula de la peptidasa (Coolbear *et al.*, 1992; Wasylewski *et al.*, 1986). Esto último no fue observado en la cepa 137 (Figura 24). Los resultados sugieren que estas bacterias podrían estar produciendo una metalopeptidasa pero en muy poca cantidad. Adicionalmente, se han reportado proteasas bacterianas que son activas en un amplio rango de pH y a diferentes temperaturas; como las de *A. pleuropneumoniae*, *A. suis* y *P. multocida* (Negrete-Abascal *et al.*, 1994, 1999), y *P. gingivalis* (McDermitt *et al.*, 1998); esto es importante para el microorganismo porque le facilita la supervivencia en diferentes condiciones medioambientales (Negrete-Abascal *et al.*, 1999). En este estudio, las proteasas de la cepa 137 se mantuvieron activas en un rango amplio de temperatura, de 28 a 55° C, y en un pH entre 5.6 y 9.5; observando máxima actividad a pH 7.5 y temperatura de 37°C, e inactivación total por ebullición durante 5 minutos (Figura 25). Las muestras almacenadas a -20° C perdían en ocasiones la actividad proteolítica a las 24 h, indicando que algunas proteasas son muy sensibles a temperaturas extremas o a llevar a cabo autoproteólisis.

La actividad proteolítica se mantuvo en presencia BME, destacando con ello su resistencia a este compuesto químico e implicando que los grupos –SH están probablemente ausentes del sitio catalítico de la proteína o no son importantes para su función o estructura; tampoco se afectó por la incubación con urea sugiriendo que la proteasa es un monómero y tampoco se inhibió por un coctel de inhibidores de proteasas o por la presencia de otras proteasas bacterianas (Figuras 19, 20 y 21). Todas estas características sugieren que la cepa 137 de *E. coli* tiene una actividad enzimática muy útil para si misma y que posiblemente sea un posible factor de virulencia de alto riesgo para el humano. En reportes previos ya se ha descrito una función de tipo SPATE (Serine Protease Autotransporter of the *Enterobacteriaceae*) para bacterias entéricas, pero esta no se ha confirmado para las *E. coli* de tipo ExPEC (Eslava *et al.*, 1998; Johnson y Nolan 2009).

La proteasa estable de la cepa clínica No. 137, tiene actividad proteolítica con tamaño de 160 kDa. Considerando como posibilidad de relación de esta proteasa, a las proteasas de alto peso molecular tipo SPATE, que forman parte de la familia de las serin-proteasas S6, como la Pet de 140 kDa, Pic de 146 kDa y Tsh de 148 kDa; se pensó que quizás la proteasa de 137 estaría relacionada con éstas por el tamaño y quizás porque entre ellas existe un dominio catalítico parecido al de las proteasas que hidrolizan a la IgA (Dautin, 2010). La búsqueda de dominios conservados para péptido señal y sitio catalítico en los genes *pet*, *pic* y *tsh* no rindió resultados para la cepa 137, lo que sugiere que estos no son los responsables de la actividad proteolítica de esta (Tabla 14) (Escobar, 2014). Sin embargo, el análisis realizado al complejo de las proteasas “S6 like” de esta cepa mediante espectrometría de masas en la base de NCBI y por BLAST indicó la presencia de genes codificando para varias proteasas (Peptidasa membranal N, Carboxipeptidasa, Proteasa Htpx entre otras) y también un inhibidor de proteasas (YbbK) (Trujillo, 2015). La presencia de este inhibidor podría explicar por qué en condiciones del SDS-PAGE, al separar por electroforesis al inhibidor de las proteasas se presenta la actividad proteolítica; y que también, la biosíntesis del inhibidor le permita a la bacteria sobrevivir sin autohidrolizarse, o bien secretar los inhibidores para inactivar a las proteasas del hospedero (Rao *et al.*, 1998). Como se ha demostrado en un par de estudios con cepas de *E. coli* de diferentes orígenes, algunas de ellas presentan actividad proteolítica sobre el sustrato de IgG sin la presencia de los genes *pet*, *pic* y *tsh*; Otras cepas fueron positivas para la presencia del gen *pet* o *tsh* o ambos, y producían o no actividad proteolítica sobre el sustrato de IgG (Escobar, 2014; Trujillo, 2015), por lo tanto, no existe una relación consistente entre la presencia y ausencia de estos genes con la actividad proteolítica de las bacterias estudiadas.

Específicamente la cepa No. 137 debe contener genes de proteasa no descritos y su proteasa es desconocida, y no están relacionadas con Pic, Pet o Tsh (Tabla 14). Previamente se demostró que la proteasa de la cepa clínica No. 137 es un complejo DNA-Proteína que puede estar co-migrando en el gel (Escobar, 2014),

con actividad proteolítica sobre diversas proteínas humanas. A la fecha no se conoce reporte alguno de proteasas en ExPEC asociadas a DNA, con actividad y estabilidad proteolítica en diferentes condiciones. La expresión de este tipo de proteínas podría ser útil para la evasión de la respuesta inmune (Mushin *et al.*, 1980; Kornfeld y Plaut, 1981), así como para obtener nutrientes esenciales como los aminoácidos (Jansen *et al.*, 1995).

E. coli es un enteropatógeno, sin embargo, se ha demostrado su capacidad para colonizar tejidos extraintestinales; esta habilidad se sugiere es dependiente de factores de virulencia que le ayudan en su supervivencia en condiciones adversas las cuales están presentes en sitios fuera del intestino (Russo y Johnson, 2000; Johnson y Russo, 2002; Johnson *et al.*, 2003). La secuenciación del genoma reveló que la cepa clínica No. 137 de *E. coli*, es una APEC que infecta a humanos perteneciente al grupo filogenético D. En los humanos las cepas que mayormente se aíslan son las del grupo A (40.5%), seguidas por las cepas del grupo B2 (25.5%) y las de los grupos B1 y D son las menos frecuentes (17% para cada una) (Bergthorsson y Ochman, 1998; Duriez *et al.*, 2001). Las APEC son una de las tres variantes que tienen las ExPEC junto a la UPEC (*E. coli* uropatógena) y la *E. coli* que produce meningitis en neonatos (NMEC) (Pitout, 2012); estas principalmente se clasifican en los grupos B2 y A (Cordoni *et al.*, 2016); siendo el grupo B2 el principal implicado en las infecciones extraintestinales (Germon *et al.*, 2005; Gaschignard *et al.*, 2017); sin embargo, hay otros estudios que determinan que un alto porcentaje de APEC pertenece al grupo filogenético B1, grupo del que derivan principalmente cepas de *E. coli* comensales y patógenas intestinales (Márquez *et al.*, 2018).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo confirman que el origen filogenético de los aislados de APEC es diverso, fortaleciendo los hallazgos sobre la evolución de patógenos a través de la adquisición de genes de virulencia mediante la vía horizontal (Márquez *et al.*, 2018).

La cepa clínica No. 137, como APEC, seguramente posee factores de virulencia que le permite evadir las defensas del hospedero y entrar a nichos libres de

competencia microbiana, donde aprovechan los recursos del hospedero que son limitantes para los microorganismos comensales, con ello logran alterar la fisiología normal del hospedero y persistir en ese medio ambiente (Donnenberg y Whittam, 2001; Johnson y Russo, 2002; Johnson *et al.*, 2003).

La obtención de esos factores de virulencia los pudo haber obtenido en forma de elementos extracromosomales o plásmidos. Éstos son el componente más dinámico del genoma bacteriano, ya que son fácilmente movilizables entre cepas de la misma o diferente especie, por tanto, tienen un papel importante en la supervivencia bacteriana en diferentes ambientes. En algunos microorganismos la presencia de plásmidos se ha asociado con su capacidad de colonizar diferentes hospederos (Loeza *et al.*, 2004).

En cuanto a su contenido de factores de virulencia, se identificó la existencia de genes que le confieren resistencia a mercurio, sulfas, tetraciclina y antibióticos betalactámicos, confirmando su carácter de multirresistencia. También, tiene genes que codifican para proteasas e inhibidores de proteasas, tales como la alpha-2-macroglobulina y genes que codifican componentes asociados con la invasión celular y resistencia sérica, con lo que se explica su capacidad para infectar tejido sanguíneo.

Las APEC representan un riesgo de zoonosis (Zhu Ge *et al.*, 2014; Mitchell *et al.*, 2015; LeStrange *et al.*, 2017), porque algunas ExPEC de origen humano y de aves comparten fondos filogenéticos similares y algunos genes de virulencia (Maluta *et al.*, 2014; Zhu Ge *et al.*, 2014). Por comparación de genes presentes en contigs se sabe que algunas secuencias genómicas de APEC son muy similares a las presentes en UPEC (LeStrange *et al.*, 2017) y a *E. coli* asociada a meningitis en neonatos (NMEC) (Mellata, 2013); esto está apoyado por la capacidad de APEC de producir meningitis (Tivendale *et al.*, 2010).

CONCLUSIONES

1. En este estudio se demostró que un alto número o proporción de ExPEC, más del 60% de las cepas bacterianas, producen proteasas que degradan inmunoglobulinas y albúmina sérica humana.
2. Más del 90% de las cepas estudiadas presentan resistencia a por lo menos un betalactámico. Se encontró además que las cepas más susceptibles presentan mayor actividad proteolítica.
4. La cepa clínica No. 137, es una cepa clasificada como APEC con capacidad de producir bacteriemia y proteasas que degradan diversas moléculas de importancia fisiológica como IgA, IgG, HSA y BSA.
5. La cepa APEC 137 produce una proteasa estable de alto peso molecular asociada con DNA, que se observa con su máxima expresión a las 36 h de cultivo; esta proteína es una proteasa diferente a las S6 ampliamente descritas de otros patotipos de *E. coli*.
6. En este trabajo se halló un rasgo poco frecuente, de cepas de *E. coli* de otros nichos (APEC), produciendo infecciones en tejido hemático y sistema nervioso central en neonatos.

PERSPECTIVAS

1. Purificar y caracterizar la proteasa de 160 kDa producida por la cepa APEC 137.
2. Caracterizar el complejo Proteasa-DNA.
3. Continuar investigando las funciones de este complejo Proteasa-DNA como factor de virulencia y/o mecanismo de patogenicidad
4. Investigar la incidencia o frecuencia de infecciones por APEC en humanos y la presencia del complejo Proteasa-DNA.

BIBLIOGRAFÍA

Ashbaugh, D. C. & R. M. Wessels, 2001. Absence of a cysteine protease effect on bacterial virulence in two murine models of human invasive group A Streptococcal infection. *Infection and Immunity*. 69:6683-6688.

Barrett, A. J., N. D. Rawlings & E. A. O'Brien, 2001. The MEROPS database as a protease information system. *Journal of Structural Biology*. 134:95-102.

Barrow, G. I. & R. K. A. Feltham, 2004. *Cowan & Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria*. 3rd edition. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press.

Begum, D., N. A. Strockbine, E. G. Sowerr & M. P. Jackson, 1993. Evaluation of a technique for identification of Shiga-like toxin producing *Escherichia coli* by using polymerase chain reaction and digoxigenin-labeled probes. *Journal of Clinical Microbiology*. 31:3153-3156.

Benjelloun-Touimi, Z., P. J. Sansonetti & C. Parsot, 1995. SepA, the major extracellular protein of *Shigella flexneri*: autonomous secretion and involvement in tissue invasion. *Molecular Microbiology*. 17:123-135.

Bergthorsson, U. & H. Ochman, 1998. Distribution of chromosome length variation in natural isolates of *Escherichia coli*. *Molecular Biology and Evolution*. 15:6-16.

Birnboim, H. C. & J. Doly, 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*. 7:1513-1523.

Boyd, E. F., C. W. Hill, S. M. Rich & D. L. Hartl, 1996. Mosaic Structure of Plasmids from Natural Populations of *Escherichia coli*. *Genetics*. 143:1091-1100.

Boyer, P. D., 1971. The enzymes, 3rd ed. Academic Press, Incorporated, New York, N.Y.

Briñas, L., M. Zaragoza, Y. Sáenz, F. Ruiz-Larrea & C. Torres, 2002. Beta-lactamases in ampicillin-resistant *Escherichia coli* isolates from foods, humans and healthy animals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 46:3156-3163.

Britigan, B., M. Hayek, B. Doebbeling & F. R. Fick, 1993. Transferrin and Lactoferrin Undergo Proteolytic Cleavage in the *Pseudomonas aeruginosa* Infected Lung of Patients with Cystic Fibrosis. *Infection and Immunity*. 61:5094-5055.

Bruno, A., 2003. Tesis de doctorado: Aislamiento, purificación y caracterización de las endopeptidasas cisteínicas presentes en frutos de *Pseudananas macrodentes* (Morr.) Harms (*Bromeliaceae*). Departamento de Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

Brunton, L., B. Chabner & B. Knollman, 2011. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 12th ed. McGraw-Hill. Yale, USA.

Bush, K., G. A. Jacoby, A. A. Medeiros, 1995. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 39:1211-1233.

Contreras, R. M. A. y M. M. E. Pereira, 2009. Terapia con Inmunoglobulina Endovenosa: mecanismos de acción, usos e indicaciones. *Revista Chilena de Reumatología*. 25:124-129.

Coolbear, T., J. M. Whittaker & R. M. Daniel, 1992. The effect of metal ions on the activity and thermostability of the extracellular proteinase from a thermophilic *Bacillus*, strain EA. *Biochemical Journal*. 287:367-374.

Cordoni, G., M. J. Woodward, H. Wu, M. Alanazi, T. Wallis & R. M. La Ragione, 2016. Comparative genomics of European Avian Pathogenic *E. coli* (APEC). *BioMed Central Genomics*. 17:960.

Cortés-Ortíz, I. A., G. Rodríguez-Ángeles, E. A. Moreno-Escobar, J. M. Tenorio-Lara, B. P. Torres-Mazadiego y E. Montiel-Vázquez, 2002. Brote causado por *Escherichia coli* en Chalco, México. *Salud Pública de México*. 44:297-302.

Coudron, P. E., E. Moland & K. Thomson, 2000. Occurrence and detection of AmpC beta-lactamases among *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus mirabilis* isolates at a Veterans Medical Center. *Journal of Clinical Microbiology*. 38:1791-1796.

Chames, P., M. E. Van Regenmortel & D. Baty, 2009. Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future. *British Journal of Pharmacology*. 157:220–233.

Chevreur, B., 2005. MIRA: an automated genome and EST assembler. PhD dissertation. Heidelberg University, Heidelberg, Germany.

Church, G. M. & W. Gilbert, 1984. Genomic sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 7:1991-1995.

Clermont, O., S. Bonacorsi & E. Bingen, 2000. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Applied and Environmental Microbiology*. 66:4555-4558.

Picard, B., J. S. Garcia, S. Gouriou, P. Duriez, N. Brahimi, *et al.*, 1999. The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. *Infection and Immunity*. 67:546-553.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2009. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test. Approved Standard 10th Ed. Wayne, Pennsylvania, USA.

Dautin, N., 2010. Serine Protease Autotransporters of *Enterobacteriaceae* (SPATEs): Biogenesis and Function. *Toxins*. 2:1179-1206.

Diebel, L. N., D. M. Liberati, A. E. Baylor, W. J. Brown & J. Devlin, 2004. Immunoglobulin A protease is a virulence factor for Gramnegative pneumonia. *Surgery*. 136:937–943.

Dik, M. G., C. Jonker, C. E. Hack, J. H. Smit, H. C. Comijs & P. Eikelenboom, 2005. Serum inflammatory proteins and cognitive decline in older persons. *Neurology*. 64:1371–1377.

Donnenberg, M. S. & T. S. Whittman, 2001. Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Investigation*. 107:539-548.

Duriez, P., O. Clermont, S. Bonacorsi, E. Bingen, A. Chaventré, J. Elion, P. Picard & E. Denamur, 2001. Commensal *Escherichia coli* isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human populations. *Microbiology* 147:1671-1676.

Edoo, Z., M. Arthur & J. E. Hugonnet, 2017. Reversible inactivation of a peptidoglycan transpeptidase by a β -lactam antibiotic mediated by β -lactam-ring recyclization in the enzyme active site. *Nature, Scientific Reports*. 7:9136.

Ellis, T. N. & M. J. Kuehn, 2010. Virulence and Immunomodulatory Roles of Bacterial Outer Membrane Vesicles. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 74:81-94.

Escobar, M. E., 2014. Tesis de Maestría: Diseño de un sistema de estudio de proteasas S6 en bacterias gram negativas patógenas. Centro de Investigaciones Microbiológicas. B.U.A.P., México.

Eslava, C., F. Navarro-García, J. R. Czezulín, I. R. Henderson, A. Cravioto & J. P. Nataro, 1998. Pet, an autotransporter enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*. 66:3155-3163.

Fricke, W. F., M. S. Wright, A. H. Lindell, D. M. Harkins, C. Baker-Austin, J. Ravel & R. Stepanauskas, 2008. Insights into the environmental resistance gene pool from the genome sequence of the multidrug-resistant environmental isolate *Escherichia coli* SMS-3-5. *Journal of Bacteriology*. 190:6779-6794.

Ganesan, R., C. Eigenbrot & D. Kirchhofer, 2010. Structural and mechanistic insight into how antibodies inhibit serine proteases. *Biochemical Journal*. 430:179–189.

Gaschignard, J., G. Geslain, C. Mallet, M. Lorrot, N. Blot, M. Alison & S. Bonacorsi, 2017. Spondylodiscitis in a healthy 12-year-old girl with Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) bacteraemia. *BioMed Central Infectious Diseases*. 17:380.

Germon, P., Y. Chen, L. He, J. E. Blanco, A. Bree, C. Schouler, S. Huang & M. Moulin-Schouleur, 2005. *ibeA*, a virulence factor of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology*. 151:1179-1186.

Ghosh, A. S., A. K. Kar & M. Kundu, 1998. Alterations in high molecular mass penicillin-binding protein 1 associated with β -lactam resistance in *Shigella dysenteriae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 248:669-672.

Godfrey, A. J., L. E. Bryan & H. R. Rabin, 1981. β -lactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with modified penicillin-binding proteins emerging during fibrosis treatment. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 19:705-711.

Giono, S., G. Rodríguez-Angeles, M. J. Rodríguez y J. L. Valdespino, 1994. Identificación de enterotoxinas y citotoxinas de *Escherichia coli* por cultivo de células Vero e hibridación en fase sólida (Colony blot). *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 36:231-241.

Halperin, M., & M. Goldstein, 1994. *Fluid, electrolyte and acid-base physiology: chapter 6 sodium and water physiology*. 2nd ed. Walter Burns Saunders Company.

Hamdan, G. S., 2004. Comparación entre albúmina y solución salina, en la resucitación en la terapia intensiva, Estudio SAFE. *Revista de Medicina Crítica y Terapia Intensiva*. 1:30-31.

Hanahan, D., 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*. 166:557-80.

Harrington, S. M., J. Sheikh, I.R. Henderson, F. Ruiz-Perez, P.S. Cohen & J.P. Nataro, 2009. The Pic Protease of Enteroaggregative *Escherichia coli* Promotes Intestinal Colonization and Growth in the Presence of Mucin. *Infection and Immunity*. 77:2465-2473.

Hedges, S. R., M. S. Mayo, L. Kalman, J. Mestecky, E. W. Hook & M. W. Russell, 1998. Evaluation of Immunoglobulin A1 (IgA1) Protease and IgA1 Protease-Inhibitory Activity in Human Female Genital Infection with *Neisseria gonorrhoeae*. *Infection and Immunity*. 12:5826-5832.

Henderson, I. R., F. Navarro-García, M. Desvaux, R. C. Fernandez & D. Ala'Aldeen, 2004. Type V Protein Secretion Pathway: the Autotransporter Story. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 68:692–744.

Hirai, Y., S. Takahata, K. Yamada, T. Ida & K. Maebashi, 2011. Correlation of the antimicrobial activity of ME1036 with its binding affinities to the penicillin-binding proteins from *Streptococcus pneumoniae* strains. *The Journal of Antibiotics*. 64:741–746.

Hoffman, T., 1974. Food related enzymes. *Advances in Chemistry Series*. 136:146–185.

Imamura, T., R. N. Pike, J. Potempa & J. Travis, 1994. Pathogenesis of periodontitis: a major arginine-specific cysteine proteinase from *Porphyromonas gingivalis* induces vascular permeability enhancement through activation of the kallikrein/kinin pathway. *Journal of Clinical Investigation*. 94:361-367.

Inouye, M., T. C. Conway, J. Zobel & K. E. Holt, 2012. Short read sequence typing (SRST): multi-locus sequence types from short reads. *BioMed Central Genomics*. 13:338.

Janeway, C., K. P. Murphy, P. Travers & M. Walport, 2008. *Janeway's Immunobiology*. 7th ed. Garland Science.

Jansen, H. J., D. Grenier & J. S. Van der Hoeven, 1995. Characterization of immunoglobulin G-degrading proteases of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. *Oral Microbiology and Immunology*. 10:138-45.

Johnson, J. R., A. Gajewski, A. J. Lesse & T. A. Russo, 2003. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* as a cause of invasive non-urinary infections. *Journal of Clinical Microbiology*. 41:5798–802.

Johnson, J. R. & T. A. Russo, 2002. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: “The other bad *E. coli*.” *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 139:155-162.

Johnson, J. R., A. Gajewski, A. J. Lesse & T. A. Russo, 2003. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* as a cause of invasive non-urinary infections. *Journal of Clinical Microbiology*. 41:5798–802.

Johnson, J. R., M. A. Kuskowski, A. Gajewski, D. F. Sahn & J. A. Karlowsky, 2004. Virulence Characteristics and Phylogenetic Background of Multidrug-Resistant and Antimicrobial-Susceptible Clinical Isolates of *Escherichia coli* from across the United States, 2000–2001. *The Journal of Infectious Diseases*. 190:1739–1744.

Johnson, J. R., M. A. Kuskowski, T. T. O’Byrne, R. Colodner & R. Raz, 2005. Virulence genotype and phylogenetic origin in relation to antibiotic resistance profile among *Escherichia coli* urine sample isolates from Israeli women with acute uncomplicated cystitis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 49:26–31.

Johnson, T. J. & L. K. Nolan, 2009. Pathogenomics of the Virulence Plasmids of *Escherichia coli*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 73:750-774.

Juárez, E. M., 2006. Tesis de Maestría: Caracterización de secuencias involucradas en la secreción de proteasas en *Pasteurella multocida*. Centro de Investigaciones Microbiológicas. B.U.A.P., México.

Kenanova, V. E., T. Olafsen, F. B. Salazar, L. E. Williams, S. Knowles & A. M. Wu, 2010. Tuning the serum persistence of human serum albumin domain III: diabody fusion proteins. *Protein Engineering Design and Selection*. 23:789–798.

Kindt, T. J., R. A. Goldsby & B. A. Osborne, 2007. *Kuby Immunology*, 6th ed. William H. Freeman & Company. New York.

Kornfeld, S. J. & A. G. Plaut, 1981. Secretory immunity and the bacterial IgA proteases. *Reviews of infectious diseases*. 3:521–534.

Kuo, K. H. M., S. Khan, M. L. Rand, H. S. Mian, E. Brnjac, L. E. Sandercock, *et al.*, 2016. EspP, an Extracellular Serine Protease from Enterohemorrhagic *E. coli*, Reduces Coagulation Factor Activities, Reduces Clot Strength, and Promotes Clot Lysis. *Public Library of Science ONE*. 11:e0149830. doi:10.1371/journal.pone.0149830.

Leclercq, S., A. Derouaux, S. Olatunji, C. Fraipont, A. J. F. Egan, W. Vollmer, E. Breukink & M. Terrak, 2017. Interplay between Penicillin-binding proteins and SEDS proteins promotes bacterial cell wall synthesis. *Nature, Scientific Reports*. 7:43306.

LeStrange, K., S. M. Markland, D. G. Hoover, M. Sharma & K. E. Kniel, 2017. An evaluation of the virulence and adherence properties of avian pathogenic *Escherichia coli*. *One Health* 4:22–26.

Loeza, L. P. D., J. J. Valdez A., V. M. Baizabal A. y J. E. López, 2004. Mecanismos de replicación de los plásmidos bacterianos. *Revista de Educación Bioquímica*. 23: 79:86.

López-Pueyo, M. J., F. Barcenilla-Gaiteb, R. Amaya-Villar, y J. Garnacho-Monteroc, 2011. Multirresistencia antibiótica en unidades de críticos. *Medicina Intensiva*. 35:41-53.

Loomes, L., B. Senior & M. Kerr, 1992. Proteinases of *Proteus* spp.: purification, properties, and detection in urine of infected patients. *Infection and Immunity*. 60:2267-2273.

Llewellyn, D. J., K. M. Langa, R. P. Friedland & L. A. Lang, 2010. Serum Albumin Concentration and Cognitive Impairment. *Current Alzheimer Research*. 7:91–96.

Luna-Rivero, M. N., 2003. Tesis de Maestría: Clonación del gen y caracterización parcial de una proteasa de *Pasteurella multocida*. Centro de Investigaciones Microbiológicas. B.U.A.P., México.

Maluta, R. P., C. M. Logue, M. R. T. Casas, T. Meng, E. A. L. Guastalli, *et al.*, 2014. Overlapped Sequence Types (STs) and Serogroups of Avian Pathogenic (APEC) and Human Extra-Intestinal Pathogenic (ExPEC) *Escherichia coli* Isolated in Brazil. *Public Library of Science ONE* 9:e105016. doi:10.1371/journal.pone.0105016.

Márquez, L. V. H., P. P. Miranda, L. E. Vidales, *et al.*, 2018. Genes de virulencia y grupo filogenético en aislados de *Escherichia coli* patogénica aviar. *Archivos de Medicina*. 14:1-2.

McDermid, A. S., A. S. McKee & P. D. Marsh, 1998. Effect of environmental pH on enzyme activity and growth of *Bacteroides gingivalis* w50. *Infection and Immunity*. 56:1096-1100.

McKerrow, J. H., C. Caffrey, B. Kelly, P. Loke & M. Sajid, 2006. Proteases in parasitic diseases. *Annual Review of Pathology*. 1:497-536.

Maeda, H., A. Molla & T. Akaike, 1989. Inactivation of various proteinase inhibitors and the complement system in human plasma by the 56-kilodalton proteinase from *Serratia marcescens*. *Infection and Immunity*. 57:1868-1871.

Maes, M., N. DeVos, A. Wauters, P. Demedts, V. W. Maurits & H. Neels, 1999. Inflammatory markers in younger vs elderly normal volunteers and in patients with Alzheimer's disease. *Journal of Psychiatric Research*. 33:397–405.

Mac Faddin, J. F., 2003. Pruebas Bioquímicas para la identificación de Bacterias de importancia clínica. 3ra. Ed. Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana.

Madigan, M. T., J. M. Martinko & J. Parker, 2000. Brock Biology of microorganisms. 9th ed. Prentice Hall. USA.

Mellata, M., 2013. Human and Avian Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*: Infections, Zoonotic Risks, and Antibiotic Resistance Trends. Foodborne Pathogens and Disease. 10:1533.

Milazzo, F. H. & G. J. Delisle, 1984. Immunoglobulin A proteases in gram-negative bacteria isolated from human urinary tract infections. Infection and Immunity. 43:11–13.

Mintz, C., R. Miller, N. Gutgsell & T. Malek, 1993. *Legionella pneumophila* protease inactivates interleukin-2 and cleaves CD4 on human T cells. Infection and Immunity. 61:3416-3421.

Mirzaagha, P., M. Louie, R. Sharma, L. J. Yanke, E. Topp & T. A. McAllister, 2011. Distribution and characterization of ampicillin-and tetracycline-resistant *Escherichia coli* from feedlot cattle fed subtherapeutic antimicrobials. BioMed Central Microbiology 11:78.

Mitchell, N. M., J. R. Johnson, B. Johnston, R. Curtiss & M. Mellata, 2015. Zoonotic potential of *Escherichia coli* isolates from retail chicken meat products and eggs. Applied and Environmental Microbiology. 81:1177–1187.

Miyoshi, S. & S. Shinoda, 2000. Microbial metalloproteases and pathogenesis. Microbes and Infection. 2:91-98.

Molla, A., T. Akaike & H. Maeda, 1989. Inactivation of various proteinase inhibitors and the complement system in human plasma by the 56-kilodalton proteinase from *Serratia marcescens*. *Infection and Immunity*. 57:1868-1871.

Molla, A., T. Kagimoto & H. Maeda, 1988. Cleavage of Immunoglobulin G (IgG) and IgA around the Hinge Region by Proteases from *Serratia marcescens*. *Infection and Immunity*. 56:916-920.

Muralinath, M., M. J. Kuehn, K. L. Roland & R. Curtiss III, 2011. Immunization with *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium-Derived Outer Membrane Vesicles Delivering the Pneumococcal Protein PspA Confers Protection against Challenge with *Streptococcus pneumoniae*. *Infection and Immunity*. 79:887-894.

Mushin, R., Y. Weisman, & N. Singer, 1980. *Pasteurella haemolytica* found in respiratory tract of fowl. *Avian Diseases*. 24:162-168.

Navarro-García, F., A. Canizales-Roman, J. Luna, C. Sears & J.P. Nataro, 2001. Plasmid-Encoded Toxin of Enteroaggregative *Escherichia coli* is Internalized by Epithelial Cells. *Infection and Immunity*. 69:1053-1060.

Negrete-Abascal, E., V. R. Tenorio, J. J. Serrano, C. Garcia & M. de la Garza, 1994. Secreted Proteases from *Actinobacillus pleuropneumoniae* Serotype 1 Degrade Porcine Gelatin, Hemoglobin and Immunoglobulin A. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 58:83-86.

Negrete-Abascal, E., V. R. Tenorio & M. de la Garza, 1999. Secretion of proteases from *Pasteurella multocida* isolates. *Current Microbiology*. 38:64-67.

Negrete-Abascal, E., P. S. Vaca, G. Paniagua, A. Pérez-Méndez, J. Ibarra-Caballero, V. Pérez-Márquez & V. R. Tenorio, 2004. Metalloproteases secreted by *Actinobacillus suis*. *Current Microbiology*. 49:55-58.

Ochman, H., J. G. Lawrence & E. A. Groisman, 2000. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature*. 18:299-304.

Otto, B. R., S. J. Van Dooren, J. H. Nuijens, J. Luirink, & B. Oudega, 1998. Characterization of a hemoglobin protease secreted by the pathogenic *Escherichia coli* strain EB1. *Journal of Experimental Medicine*. 188:1091-1103.

Peimbert, M. & L. Segovia, 2003. Evolutionary engineering of a β -lactamase activity on a D-Ala D-Ala transpeptidase fold. *Protein Engineering*. 16:27–35.

Picard, B., J. S. García, S. Gouriou, P. Duriez, N. Brahimi, E. Bingen, J. Elion & E. Denamur, 1999. The Link between Phylogeny and Virulence in *Escherichia coli* Extraintestinal Infection. *Infection and Immunity*. 67:546-553.

Pitout, J. D. D., 2012. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: a combination of virulence with antibiotic resistance. *Frontiers in microbiology*. 3:9.

Pouedras, P., P. M. Andre, P. Y. Donnio & J. L. Avril, 1992. Cleavage of Immunoglobulin A1, A2 and G by Proteases from clinical isolates of *Pasteurella multocida*. *Journal of Medical Microbiology*. 37:128-132.

Provence, D. L., & R. Curtiss III, 1994. Isolation and characterization of a gene involved in hemagglutination by an avian-pathogenic *Escherichia coli* strain. *Infection and Immunity*. 62:1369-1380.

Rademaker, C. M., J. J. H. M. Wolfhagen, M. Jansza, M. Oteman, A. Flutt, J. H. Glerum, *et al.*, 1992. Digoxigenin labeled DNA probes for rapid detection of enterotoxigenic, enteropathogenic and vero cytotoxin producing *Escherichia coli* in fecal samples. *Journal of Microbiological Methods*. 15:121-127.

Rao, M. B., A. P. Tanksale, M. S. Ghatge, & V. V. Deshpande, 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62:597-635.

Rodríguez-Ángeles, G., 2002. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pública de México*. 44:464-475.

Rojas-Ruiz, N. E., E. Sansinenea-Royano, M. L. Cedillo-Ramirez, R. Marsch-Moreno, P. Sanchez-Alonso & C. Vazquez-Cruz, 2015. Analysis of *Bacillus thuringiensis* population dynamics and its interaction with *Pseudomonas fluorescens* in soil. *Jundishapur Journal of Microbiology*. 8:e27953. doi:10.5812/jjm.27953.

Roy, K., D. J. Hamilton, G. P. Munson & J. M. Fleckenstein, 2011. Outer Membrane Vesicles Induce Immune Responses to Virulence Proteins and Protect against Colonization by Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Clinical and Vaccine Immunology*. 18:1803-1808.

Runeberg-Roos, P., J. Kervinen, V. Kovaleva, N. V. Raikhel & S. Cal, 1994. The Aspartic Proteinase of Barley is a Vacuolar Enzyme That Processes Probarley Lectin in Vitro. *Plant Physiology*. 105:321-329.

Russo, T. A., & J. R. Johnson, 2000. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli* ExPEC. *Journal of infectious diseases*. 181:1753-1754.

Russo, T. A. & J. R. Johnson, 2003. Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes and Infection* 5:449–456.

Russo, T. A., & U. Carlino-MacDonald, 2008. Extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli* do not possess active IgA1, IgA2, sIgA or IgG proteases. Federation of European Microbiological Societies, Immunology and Medical Microbiology. 53:65–71.

Sambrook, J. & D. W. Russell, 2001. Molecular cloning. A Laboratory manual. Third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY. USA.

Schultsz, C., G. J. Pool, R. Ketel, B. De Wever, P. Speelman & J. Dankert, 1994. Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* in stool samples by using nonradioactively labeled oligonucleotide DNA probes and PCR. Journal of Clinical Microbiology. 32:2393-2397.

Sharma, S., G. K. Bhat & S. Shenoy, 2007. Virulence factors and drug resistance in *Escherichia coli* isolated from extraintestinal infections. Indian Journal of Medical Microbiology. 25:369-73.

Siegel, J. D., E. Rhinehart, M. Jackson & L. Chiarello, 2006. Management of multidrug-resistant organisms in health care settings. American journal of infection control. 35:165-193.

Soriani, M., D. Pietraforte & M. Minetti, 1994. Antioxidant potential of anaerobic human plasma: role of serum albumin and thiols as scavengers of carbon radicals. Archives of Biochemistry and Biophysics. 312:180–188.

Soto, S. M., 2006. Expresión de factores de virulencia en cepas extraintestinales de *Escherichia coli*. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 24:479-80.

Souza, V., A. Castillo, M. Rocha, L. Sander, C. Silva y L. E. Eguiarte, 2001. Ecología Evolutiva de *Escherichia coli*. Interciencia. 26:1-14.

Sugio, S., A. Kashima, S. Mochizuki, M. Noda & K. Kobayashi, 1999. Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution. *Protein Engineering*. 12:439-446.

Takaya, A., M. Suzuki, H. Matsui, T. Tomoyasu, H. Sashinami, A. Nakane, & T. Yamamoto. 2003. Lon, a Stress-Induced ATP-Dependent Protease, Is Critically Important for Systemic *Salmonella enteric* Serovar Typhimurium Infection of Mice. *Infection and Immunity*. 71:690-696.

Tenover, F. C., 1988. Diagnostic deoxyribonucleic acid probes for infectious diseases. *Clinical Microbiology Reviews*. 1:82-101.

Teufel, P. & F. Götz, 1993. Characterization of an extracellular metalloprotease with elastase activity from *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Bacteriology*. 175:4218-4222.

Tivendale, K. A., C. M. Logue, S. Kariyawasam, D. Jordan, A. Hussein, G. Li, Y. Wannemuehler & L. K. Nolan, 2010. Avian-Pathogenic *Escherichia coli* Strains Are Similar to Neonatal Meningitis *E. coli* Strains and Are Able To Cause Meningitis in the Rat Model of Human Disease. *Infection and Immunity*. 78:3412-3419.

Toval, F., C. D. Köhler, U. Vogel, F. Wagenlehner, A. Mellmann, A. Fruth, *et al.*, 2014. Characterization of *Escherichia coli* isolates from hospital inpatients or outpatients with urinary tract infection. *Journal of Clinical Microbiology*. 52:407-418.

Trujillo, M. M., 2015. Tesis de Maestría: Identificación del inhibidor de la actividad proteolítica extracelular en *Escherichia coli* SN137. Centro de Investigaciones Microbiológicas. B.U.A.P., México.

Uwe, M., R. Zobotke, M. Mäder & N. Roland, 2001. Regulation of Matrix Metalloproteinase Expression in Endothelial Cells by Heat-Inactivated *Streptococcus pneumoniae*. *Infection and Immunity*. 69:1914-1916.

Wagner, S., L. G. David & A. A. Sally, 2014. Multidrug-resistant *Escherichia coli* from canine urinary tract infections tend to have commensal phylotypes, lower prevalence of virulence determinants and ampC-replicons. *Veterinary Microbiology*. 169:171-178.

Wasylewski, Z., W. Stryjewsky, A. Wasniowska, J. Potempa & K. Baran, 1986. Effect of calcium binding on conformational changes of staphylococcal metalloproteinase measured by means of intrinsic protein fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta*. 871:177-181.

Windle, H. & D. Kelleher, 1997. Identification and characterization of a metalloprotease activity from *Helicobacter pylori*. *Infection and Immunity*. 65:3132-3137.

Winokur, P. I., D. I. Vonstein, I. J. Hoffman, E. K. Uhlenhopp & G. V. Doern, 2001. Evidence for transfer of CMY-2 AmpC β -lactamase plasmids between *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates from food animals and humans. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 45:2716-2722.

Wosikowski, K., E. Biedermann, B. Rattel, N. Breiter, P. Jank, R. Loser, G. Jansen & G. J. Peters, 2003. In vitro and in vivo antitumor activity of methotrexate conjugated to human serum albumin in human cancer cells. *Clinical Cancer Research*. 9:1917-1926.

Yamashita, A., T. Sekizuka & M. Kuroda, 2014. Characterization of Antimicrobial Resistance Dissemination across Plasmid Communities Classified by Network Analysis. *Pathogens*. 3:356–376.

Zavaleta, M. R. M., 2007. Tesis de Maestría: Búsqueda de secuencias de proteasas putativas de *Pasteurella multocida*. Centro de Investigaciones Microbiológicas. B.U.A.P., México.

Zhu Ge, X., J. Jiang, Z. Pan, L. Hu, S. Wang, *et al.*, 2014. Comparative Genomic Analysis Shows That Avian Pathogenic *Escherichia coli* Isolate IMT5155 (O2:K1:H5; ST Complex 95, ST140) Shares Close Relationship with ST95 APEC O1:K1 and Human ExPEC O18:K1 Strains. Public Library of Science ONE 9:e112048. doi:10.1371/journal.pone.0112048.

APÉNDICE

MEDIOS DE CULTIVO

AGAR LB (Luria Bertani)

Para 1000 ml de agua destilada:

NaCl	10 gr
Extracto de levadura	5 gr
Peptona de caseína	10 gr
Agar bacteriológico	16 gr

Disolver los ingredientes en agua destilada y llevar a pH 7. Esterilizar a 15 lb durante 15 min.

CALDO LB (Luria Bertani)

Para 1000 ml de agua destilada:

NaCl	10 gr
Extracto de levadura	5 gr
Peptona de caseína	10 gr

Disolver los ingredientes en agua destilada y llevar a pH 7. Esterilizar a 15 lb durante 15 min.

AGAR BHI (Infusión Cerebro Corazón)

Para 1000 ml de agua destilada:

BHI	37 gr
Agar bacteriológico	16 gr

Disolver los ingredientes en agua destilada y llevar a pH 7. Esterilizar a 15 lb durante 15 min.

CALDO BHI (Infusión Cerebro Corazón)

Para 1000 ml de agua destilada:

BHI 37 gr

Disolver los ingredientes en agua destilada y llevar a pH 7. Esterilizar a 15 lb durante 15 min.

SOLUCIONES

LISIS ALCALINA

BIRNBOIM I

Glucosa	50 mM	0.05 M
Tris-HCl pH 8	25 mM	0.025 M
EDTA	10 mM	0.01 M

BIRNBOIM II

Para 1000 µl de solución:

Agua estéril PISA	850 µl
NaOH 10N	100 µl
SDS 20%	50 µl

La solución deberá prepararse minutos antes de ser utilizada y debe quedar al 0.2 N de NaOH con respecto al SDS 1%.

BIRNBOIM III

Acetato de Potasio	50 mM	60 ml
Ácido acético glacial		11.5 ml
Agua destilada		28.5 ml

La solución deberá quedar 5 M con respecto al potasio y 3 M con respecto al ácido acético glacial.

REGULADORES PARA LA TRANSFORMACIÓN POR CLORURO DE RUBIDIO

REGULADOR I

RbCl	100 mM	
MnCl ₂	45 mM	
Acetato de potasio	88 mM	pH 5.8/0.2 M Ácido acético
CaCl ₂	10 mM	
LiCl	0.5 mM	
Glicerol	15%	

REGULADOR II

MOPS	10 mM
CaCl ₂	15 mM
RbCl	10 mM
Glicerol	15%

ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

Buffer Tris-HCl	0.6 gr
Agua destilada	100 ml
Ajustar pH con HCl	

Gel separador	20 ml
Agua destilada	7.9 ml
Acrilamida al 30%	6.7 ml
Tris-HCl 1.5 M (pH 8.8)	5.0 ml
SDS 10%	200 µl
APS	200 µl
TEMED	16 µl

Gel concentrador	4 ml
Agua destilada	2.7 ml
Acrilamida al 30%	670 μ l
Tris-HCl 1.5 M (pH 6.8)	500 μ l
SDS 10%	40 μ l
APS	40 μ l
TEMED	6 μ l

Buffer de muestra

Azul de bromofenol	0.02 gr
Glicerol	0.2 ml
Agua	

Colorante azul de Coomassie

Coomassie blue R-250	0.125 gr
Metanol	200 ml
Ácido acetic	35 ml
Agua destilada cbp	500 ml

Solución de desteñidor

Metanol	200 ml
Ácido acetic	35 ml
Agua destilada cbp	500 ml

Buffer de sonicación

Fosfato de sodio	50 mM (pH 8)
NaCl	300 mM



Draft Genome Sequence of *Escherichia coli* Strain SN137, a Bacterium with Extracellular Proteolytic Activity on Immunoglobulins and Persistence in Human Tissue Blood

Salustio Najera-Hernandez,^a Maria Patricia Sanchez-Alonso,^a Estela Anastacio-Marcelino,^a Erasmo Negrete-Abascal,^b Candelario Vazquez-Cruz^a

^aCentro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, Puebla, Mexico

^bCarrera de Biología, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM, Tlalneapantla, Estado de México, Mexico

ABSTRACT The draft genome sequence of *Escherichia coli* strain SN137 is reported here. The genome comprises 172 contigs, corresponding to 4.9 Mb with 50% G+C content, and contains several genes related to pathogenicity that explain its survival in human hematic tissue.

Escherichia coli lineages are important components of the human and animal microbiomes (1–3). This bacterium is a part of human beings their entire life and is indispensable for optimal intestinal function (4–7). However, there are genetic variants that contain virulence genes, so these bacteria can be intestinal pathogens in humans and other mammals (8, 9). Additionally, extraintestinal *E. coli* pathogens have been described and are designated with the acronym ExPEC (extraintestinal pathogenic *E. coli*) (10, 11). The different virulence factors constituting the arsenal of a pathogen, including proteases, inactivating immunoglobulins, and other homeostatic molecules, are important in the microbiome-host homeostasis breakdown (12).

This work reports the genome sequence of an *E. coli* strain (SN137) obtained from a human blood culture that was resistant to four different antimicrobials and that presented high proteolytic activity against bovine serum albumin and human IgG and IgA.

Total genomic DNA from *E. coli* SN137 was obtained by lysozyme digestion and phenol extraction (13). Purified high-molecular-weight DNA was processed to identify the nucleotide sequence in the Laboratorio Nacional para la Genética de la Biodiversidad del CINVESTAV Campus Irapuato, Mexico. Sequence DNA was obtained using GS FLX 454 technology from Roche (Branford, CT, USA) and corroborated by the MiSeq system (Illumina, San Diego, CA, USA).

The genome sequence using 454 technology provided 32-fold coverage. The reads were filtered by quality and assembled with Mira 4 software (14), obtaining 172 contigs that were used to piece together a 4.96-Mb genome. The reconstituted genes indicated that the strain belongs to the D molecular phylogroup. A multilocus sequence type (MLST) analysis of this strain classified it as sequence type 3005 (ST3005) but with variation in the *fumC* marker. From these results, it was concluded that *E. coli* SN137 is an avian pathogenic *E. coli* (APEC) infecting humans. In the genome sequence, we identified the F fertility factor and an important part of the pathogenicity island (GenBank accession number KT777641) described in different *Shigella* sp. strains. Additionally, genes were identified that encode PiliA, curli, and Bfp fimbria and encode for resistance to mercury, sulfas, tetracycline, and β -lactam antibiotics, confirming its multiresistance. Type II, III, and VI secretion systems related to virulence and injection of effector molecules into host cells were identified. Moreover, this strain has genes

Received 21 November 2017; Accepted 29 November 2017; Published 18 January 2018

Citation Najera-Hernández S, Sanchez-Alonso MP, Anastacio-Marcelino E, Negrete-Abascal E, Vazquez-Cruz C. 2018. Draft genome sequence of *Escherichia coli* strain SN137, a bacterium with extracellular proteolytic activity on immunoglobulins and persistence in human tissue blood. *Genome Announc* 6:e01455-17. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01455-17>.

Copyright © 2018 Najera-Hernandez et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.

Address correspondence to Candelario Vazquez-Cruz, ecobacilos@yahoo.com.

encoding proteases and protease inhibitors, such as alpha-2-macroglobulin, and genes encoding components associated with cell invasion and serum resistance, which explains the capability of *E. coli* SN137 to infect tissue blood.

Accession number(s). This whole-genome shotgun project has been deposited at DDBJ/EMBL/GenBank under the accession number [NKYO0000000](https://doi.org/10.1093/nar/nky000). The version described in this paper is the first version, NKYO01000000.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was financially supported through grants from the National Council of Science and Technology, CONACyT, Mexico (grant CB-2015-01-259209), SEP-Red Mod-
 elos microbianos de importancia agrobiotecnológica.

S.N.-H. is the current Secretaria de Salud, Chiapas, Mexico.

We thank Guillermo Horta Valerdi for technical assistance.

REFERENCES

1. Souza V, Rocha M, Valera A, Eguarte LE. 1999. Genetic structure of natural populations of *Escherichia coli* in wild hosts on different continents. *Appl Environ Microbiol* 65:3373–3385.
2. Marteau P, Pochart P, Doré J, Béra-Maillet C, Bernalier A, Corthier G. 2001. Comparative study of bacterial groups within the human cecal and fecal microbiota. *Appl Environ Microbiol* 67:4939–4942. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.10.4939-4942.2001>.
3. Guamer F, Malagelada J-R. 2003. Gut flora in health and disease. *Lancet* 361:512–519. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)12489-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)12489-0).
4. Rajilić-Stojanović M, Maathuis A, Heilig HGJ, Venema K, de Vos WM, Smidt H. 2010. Evaluating the microbial diversity of an *in vitro* model of the human large intestine by phylogenetic microarray analysis. *Microbiology* 156:3270–3281. <https://doi.org/10.1099/mic.0.042044-0>.
5. Murgas Torrazza R, Neu J. 2011. The developing intestinal microbiome and its relationship to health and disease in the neonate. *J Perinatol* 31(Suppl 1):S29–S34. <https://doi.org/10.1038/jp.2010.172>.
6. Gordon DM, O'Brien CL, Pavli P. 2015. *Escherichia coli* diversity in the lower intestinal tract of humans. *Environ Microbiol Rep* 7:642–648. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12300>.
7. Lloyd-Price J, Abu-Ali G, Huttenhower C. 2016. The healthy human microbiome. *Genome Med* 8:51. <https://doi.org/10.1186/s13073-016-0307-y>.
8. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2:123–140. <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>.
9. Rasko DA, Rosovitz MJ, Myers GS, Mongodin EF, Fricke WF, Gajer P, Crabtree J, Sebahia M, Thomson NR, Chaudhuri R, Henderson IR, Sparrandio V, Ravel J. 2008. The pangenome structure of *Escherichia coli*: comparative genomic analysis of *E. coli* commensal and pathogenic isolates. *J Bacteriol* 190:6881–6893. <https://doi.org/10.1128/JB.00619-08>.
10. Le Gall T, Clermont O, Gouriou S, Picard B, Nassif X, Denamur E, Tenailon O. 2007. Extraintestinal virulence is a coincidental by-product of commensalism in B2 phylogenetic group *Escherichia coli* strains. *Mol Biol Evol* 24:2373–2384. <https://doi.org/10.1093/molbev/msm172>.
11. Köhler CD, Dobrindt U. 2011. What defines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*? *Int J Med Microbiol* 301:642–647. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2011.09.006>.
12. Ruiz-Perez F, Nataro JP. 2014. Bacterial serine proteases secreted by the autotransporter pathway: classification, specificity, and role in virulence. *Cell Mol Life Sci* 71:745–770. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1355-8>.
13. Rojas-Ruiz NE, Sansinenea-Royano E, Cedillo-Ramirez ML, Marsch-Moreno R, Sanchez-Alonso P, Vazquez-Cruz C. 2015. Analysis of *Bacillus thuringiensis* population dynamics and its interaction with *Pseudomonas fluorescens* in soil. *Jundishapur J Microbiol* 8:e27953. <https://doi.org/10.5812/jjm.27953>.
14. Chevreux B. 2005. MIRA: an automated genome and EST assembler. PhD dissertation. Heidelberg University, Heidelberg, Germany.

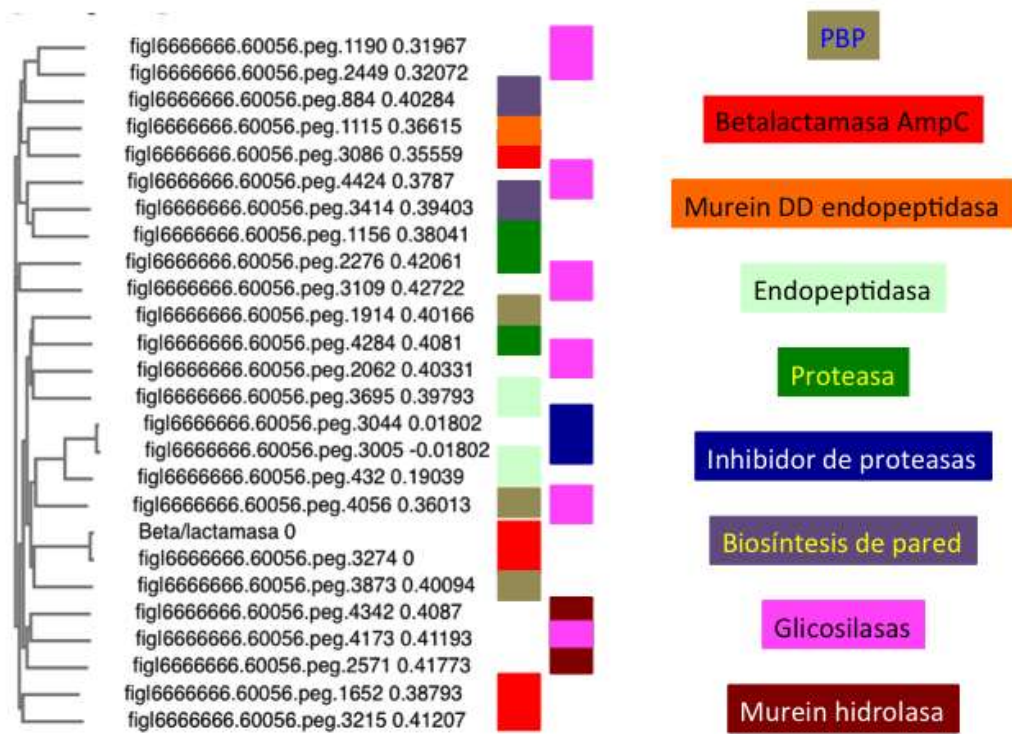


Figura 29. Filograma de proteínas PBP, betalactamasas, endopeptidasas, proteasas y proteínas con actividad miscelánea relacionadas con la biosíntesis de pared celular en *E. coli* cepa 137.