

UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE POSTGRADO



**Caracterización de los perfiles de proteínas de membrana externa  
de cepas de *Escherichia coli* adherente invasivas (ECAIs)  
obtenidas desde pacientes con Enfermedad de Crohn**

**Waleska Lisette Saitz Rojas**

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN MICROBIOLOGÍA**

**Director de Tesis: Dr. Roberto Vidal Álvarez**

**2016**

**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE POSTGRADO**

**INFORME DE APROBACIÓN TESIS DE MAGÍSTER**

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Magister presentada por la candidata

**WALESKA LISETTE SAITZ ROJAS**

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de **Magíster en Microbiología** en Examen de Defensa de Tesis rendido el día 27 de Abril del 2016.

**Prof. Dr. Roberto Vidal A.**  
Director de Tesis  
Programa de Microbiología y Micología, ICBM  
Facultad de Medicina, Universidad de Chile

**COMISIÓN INFORMANTE DE TESIS**

**PROF. DR. OSCAR LEÓN D.**

**PROF. DR. MIGUEL O'RYAN G.**

**PROF. DRA. SANDRA AMPUERO LI.**

**PROF. DRA. MARIA TERESA ULLOA F.**  
Presidenta Comisión de Examen

*Tesis dedicada con mucho cariño a toda mi familia, principalmente a mis padres,  
hermano y sobre todo a mi yeyita, quien a pesar de ya no estar físicamente  
entre nosotros, de seguro me acompaña desde donde esté.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Llegado el momento de finalizar mi tesis es imposible no mencionar y agradecer a todos aquellos que con sus consejos, apoyo y cariño, me ayudaron en la realización de este trabajo. En primer lugar, agradecer a cada uno de mis compañeros de laboratorio, y a su vez amigos, por todo el apoyo entregado en este proceso tanto en lo académico como en lo personal. También agradecer a los Dres. Felipe del Canto y Juan Carlos Salazar por sus consejos en cada instancia de reunión y por la disponibilidad para ayudarme a resolver las distintas inquietudes que fueron surgiendo. En este punto, agradecer también a cada uno de los integrantes de la comisión evaluadora, quienes con sus consejos y correcciones ayudaron a dar forma y finalizar este trabajo de tesis.

Agradezco particularmente a mi tutor, Dr. Roberto Vidal, quien además de ser un gran guía en lo que respecta a la parte académica, también me brindó su apoyo, ayuda y comprensión en momentos muy difíciles a nivel personal, sin lo cual posiblemente no hubiese logrado llevar a término este trabajo.

Agradecer además a mis amigas de la vida y mi familia por todo el ánimo, comprensión y preocupación, sobre todo en los momentos más difíciles. A pesar de la distancia que muchas veces nos separó, nunca deje de sentir esa palabra de apoyo de mis padres y abuelos, deseándome siempre lo mejor. Además, tuve la suerte de tener a mi lado en gran parte de este proceso a mi tía Jacque, Belén y Galev, a quienes les doy infinitas gracias por su compañía y apoyo. Finalmente, agradecer de forma especial a mis padres Mario y Judith por todo lo que han hecho por mí, indudablemente gran parte de este logro es por ustedes. Gracias de todo corazón por su esfuerzo, cariño y apoyo incondicional.

## ABREVIATURAS

2D-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida bidimensional

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

CEACAM-6: Molécula de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario 6.

DAEC: *E. coli* adherente difusa

DEC: *E. coli* diarreogénicas

DMEM: medio Eagle modificado de Dulbecco

DTT: Dithiothreitol

EC: Enfermedad de Crohn

EAEC: *E. coli* enteroagregativa

ECAI: *E. coli* adherente invasiva

EHEC: *E. coli* enterohemorrágica

EIEC: *E. coli* enteoroïnvasiva

EPEC: *E. coli* enteropatogénica

ETEC: *E. coli* enterotoxigénica

ExPEC: *E. coli* patogénica extraintestinal

HMDM: Macrófagos derivados de monocitos humanos

IEF: Isoelectroenfoque

IPG: gradientes de pH inmovilizados

MALDI-TOF/TOF: Ionización por desorción láser asistida por una matriz - Analizador de tiempo de vuelo en tándem.

MOI: Multiplicidad de infección

MR: Multi-resistente (a antibióticos)

NMEC: *E. coli* asociada a meningitis neonatal

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PFGE: Electroforesis en gel de campo pulsado

PME: Proteína de membrana externa

PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

PP: Placa de Peyer

R: Resistente (a antibióticos)

S: Sensible (a antibióticos)

SBF: Suero bovino fetal

SDS: Dodecil sulfato de sodio

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio

SNPs: Polimorfismo de un solo nucleótido

STEC: *E. coli* productora de shigatoxina

TNF- : Factor de necrosis tumoral

UFC: Unidad formadora de colonia

UPEC: *E. coli* uropatogénica

h: hora

kV: kilo voltio

L: litro

M: molar

mA: miliamperio

min: minuto

mg: miligramo

mL: mililitro

mM: milimolar

s: segundo

pb: pares de bases

V: Voltio

$\mu$ A: microamperio

$\mu$ g: microgramo

$\mu$ L: microlitro

$^{\circ}$ C: grado Celcius

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS.....	i
ABREVIATURAS.....	ii
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
ÍNDICE DE TABLAS.....	viii
RESUMEN.....	ix
ABSTRACT.....	x
INTRODUCCIÓN.....	1-10
ECAIs: Un nuevo patotipo de <i>E. coli</i> .....	1
Asociación entre <i>E. coli</i> y EC.....	2
Mecanismos de patogenicidad de ECAI.....	3
Factores de virulencia de ECAIs.....	6
Búsqueda de marcadores de virulencia y proteínas de membrana externa (PMEs).....	9
HIPÓTESIS.....	11
OBJETIVOS.....	11-12
METODOLOGÍA.....	13-22
Cepas Bacterianas.....	13
Ensayos de adhesión a células epiteliales Caco-2.....	15
Ensayos de invasión a células epiteliales Caco-2.....	16
Sobrevida y replicación en macrófagos RAW 264.7.....	17
Extracción de PMEs de cepas ECAIs.....	17

Separación de PME <span>s</span> mediante electroforesis bidimensional (2D-PAGE) .....	18
Análisis de geles 2D-PAGE y selección de <i>spots</i> de interés .....	20
Identificación de proteínas mediante MALDITOF/TOF .....	20
Análisis bioinformático de las PME <span>s</span> identificadas en cepas ECAI <span>s</span> .....	20
Análisis filogenéticos de cepas ECAI <span>s</span> y <i>E. coli</i> comensales .....	21
Diseño de partidores para PCR y detección de genes identificados en ECAI <span>s</span> en una colección de cepas comensales.....	21
RESULTADOS .....	24-41
Antecedentes de las cepas de <i>E. coli</i> provenientes de pacientes con EC utilizadas en este estudio .....	24
Caracterización de cepas de <i>E. coli</i> obtenidas desde paciente con EC y definición de ECAI .....	26
Comparación de los perfiles de PME <span>s</span> de cepas ECAI <span>s</span> y la cepa comensal <i>E. coli</i> HS .....	30
Búsqueda de las PME <span>s</span> de interés en ECAI <span>s</span> de referencia y <i>E. coli</i> comensales depositadas en bases de datos .....	36
Frecuencia de los genes que codifican las PME <span>s</span> de interés en una colección de cepas de <i>E. coli</i> .....	38
DISCUSIÓN.....	42-49
REFERENCIAS.....	50-64

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Mecanismo de patogenicidad propuesto para ECAI.....	5
<b>Figura 2.</b> Variabilidad genética de cepas de <i>E. coli</i> obtenidas desde pacientes con EC y selección de las 16 cepas utilizadas en este estudio.....	14
<b>Figura 3.</b> Variabilidad genética de las 16 cepas de <i>E. coli</i> obtenidas desde pacientes con EC utilizadas ente estudio.....	25
<b>Figura 4.</b> Determinación de la capacidad de adherencia e invasión de cepas de <i>E. coli</i> obtenidas desde pacientes con EC.....	27
<b>Figura 5.</b> Perfiles de PMEs obtenidos mediante 2D-PAGEs de las cepas ECAI.....	32-33
<b>Figura 6.</b> Selección de <i>spots</i> que están presentes en cepas ECAIs y ausentes en la cepa comensal <i>E. coli</i> HS.....	34
<b>Figura 7.</b> Análisis filogenético basado en SNPs de cepas ECAIs y cepas de <i>E. coli</i> comensales, realizado a partir de los genomas disponibles en bases de datos.....	39

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Factores de virulencia de cepas ECAIs.....	7-8
<b>Tabla 2.</b> Partidores utilizados para amplificar los genes que codifican las PME's identificadas en cepas ECAIs mediante PCR.....	22
<b>Tabla 3.</b> Caracterización de las cepas de <i>E. coli</i> provenientes de paciente con EC en cuanto a su capacidad de replicar y sobrevivir en el interior de macrófagos RAW 264.7.....	29
<b>Tabla 4.</b> Caracterización de aislados definidos como ECAI provenientes de individuos con EC.....	30
<b>Tabla 5.</b> Proteínas identificadas mediante MALDI-TOF/TOF correspondientes a aquellos spots presentes en >70% de las cepas ECAIs y ausentes en la cepa comensal <i>E. coli</i> HS.....	35
<b>Tabla 6.</b> Frecuencia de la presencia de las 16 PME's identificadas por MALDI-TOF/TOF en las 7 cepas ECAI caracterizadas en este estudio.....	36
<b>Tabla 7.</b> Presencia de las 16 PME's de interés en cepas ECAIs y <i>E. coli</i> comensales basado en el análisis de secuencias de sus genomas completos depositados en GenBank mediante BLASTp.....	38
<b>Tabla 8.</b> Detección de los genes que codifican para las PME's de interés en las 7 cepas ECAI y 8 aislados de <i>E. coli</i> comensales mediante PCR.....	41
<b>Tabla 9.</b> Detección de los genes que codifican para las 4 PME's de interés en 9 cepas no-ECAI mediante PCR.....	41

## RESUMEN

*E. coli* adherente invasiva (ECAI) es un patotipo que se ha asociado fuertemente con la etiopatogenia de la Enfermedad de Crohn (EC), pero su rol no está bien definido. Los principales mecanismos de patogenicidad descritos para ECAI son: i) capacidad de adherirse a células epiteliales, ii) invadir células epiteliales, y iii) sobrevivir en el interior de macrófagos. Sin embargo, se han descrito pocas proteínas que participen directamente en tales procesos, y la mayoría se ha evaluado sólo en la cepa ECAI LF82. En este contexto es importante el estudio de proteínas de membrana externa (PMEs), ya que al estar involucradas en la interacción bacteria-hospedero, pueden aportar al entendimiento de las propiedades de ECAI. El objetivo de este trabajo fue identificar PMEs características de ECAIs, ausentes en la cepa comensal de referencia *E. coli* HS y cuyos genes no fuesen detectables en otras cepas comensales de *E. coli*. Para ello se caracterizaron como ECAIs aislados de *E. coli* provenientes de pacientes con EC, evaluando su capacidad de adherirse e invadir células Caco-2 y sobrevivir en macrófagos RAW 264.7. Luego, se analizaron mediante 2D-PAGEs los extractos de PMEs de estas cepas y se creó un gel virtual que reuniera >70% de los *spots* presentes en las cepas analizadas. Este gel se comparó con el de la cepa comensal *E. coli* HS, enviando a identificar mediante MALDI-TOF/TOF aquellos *spots* característicos de ECAIs y ausentes en la cepa *E. coli* HS. Además, mediante BLASTp y PCR se determinó la presencia de los genes que codifican dichas proteínas en otras cepas ECAIs y comensales. Se identificaron 4 PMEs características de ECAIs (71-100%) y poco frecuentes en *E. coli* comensales (13%): ChuA, OmpT, FitA y EefC/NodT. También se encontró en los extractos de PMEs de las cepas ECAI a la proteína citoplasmática EF-Tu, la cual se ha asociado con mecanismos de adhesión de otros patógenos. Se proyecta realizar estudios relacionados con la función de estas PMEs y su rol en mecanismos de patogenicidad del patotipo ECAI.

## ABSTRACT

Invasive adherent *E. coli* (AIEC) is a pathotype strongly associated with the pathogenesis of Crohn's Disease (CD), albeit with a yet unclear role. The main pathogenic mechanisms described for AIEC are: i) adherence to epithelial cells; ii) invasion of epithelial cells, and iii) survival in macrophages. Few proteins have been described to participate directly in these processes, most of which have been evaluated only in the AIEC LF82 reference strain. Studying outer membrane proteins (OMPs) is important because they participate in host-bacteria interactions and increasing knowledge on their role in pathogenic and adaptation mechanism may help to better understand the properties of AIEC. The objective of this study was to identify OMPs characteristic of AIEC, absent in the *E. coli* HS reference strain, with genes undetectable in other commensal *E. coli* strains. We characterized AIEC strains isolated from patients with CD and determined their capacity to adhere and invade Caco-2 cells and survive in RAW 264.7 macrophages. We then analyzed OMPs extract from these strains by 2D-PAGE and created a virtual gel including >70% of the spots generated by AIEC strains. This gel was compared to gel containing spots of the *E. coli* HS commensal strain, further analyzing by MALDI-TOF/TOF spots present in AIEC and absent in *E. coli* HS. In addition, we determined the presence of the genes encoding for these proteins in other AIECs and commensal strains using BLASTp and PCR. We identified 4 OMPs common in AIEC strains (71-100%) and infrequent in commensal strains (13%): ChuA, OmpT, FitA and EefC/NodT. In addition, we found the cytoplasmic protein EF-Tu in OMPs extract from AIECs, which has been associated with adherence mechanism of other pathogens. Future studies are planned to determine the specific function of these OMP and their role in pathogenicity of AIEC.

## INTRODUCCIÓN

### **ECAIs: Un nuevo patotipo de *Echerichia coli***

*E. coli* es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, predominante a nivel de la microbiota intestinal y en heces de seres humanos. La relación entre *E. coli* y su hospedero está definida como comensalismo, pero cabe mencionar que su presencia también favorece al hospedero, ayudando a mantener la homeostasis intestinal y a prevenir la colonización por parte de patógenos (mutualismo) (Vollaard y Clasener, 1994; Hudault y col., 2001; Tenailon y col., 2010).

Las cepas comensales de *E. coli* rara vez causan daño en su hospedero, excepto en individuos inmunocomprometidos o cuya barrera intestinal está dañada. Sin embargo, con el tiempo estas cepas han perdido o adquirido elementos genéticos móviles (plásmidos de virulencia, fagos y/o islas de patogenicidad) dando origen a distintos patotipos o subgrupos de *E. coli* que pueden causar enfermedad, utilizando para ello un conjunto de factores de virulencia en común (Ahmed y col., 2008). Estos patotipos, de acuerdo al tipo de síndrome clínico que producen en seres humanos, se dividen actualmente en: i) *E. coli* diarreogénicos (DEC), que comprende a aquellas cepas de *E. coli* que causan enfermedades entéricas/diarreicas, que incluye a *E. coli* enteoroïnvasiva (EIEC), enterotoxigénica (ETEC), enterohemorrágica (EHEC), enteropatogénica (EPEC), enteroagregativa (EAEC) y adherente difusa (DAEC) (Nataro y Kaper, 1998), y ii) *E. coli* extraintestinales (ExPEC), que comprende cepas de *E. coli* uropatogénicas (UPEC) asociadas con infecciones urinarias, a cepas de *E. coli* responsables de cuadros de meningitis neonatal (NMEC), y a otros patotipos de *E. coli* no bien definidos que se asocian con cuadros de sepsis (Russo y Johnson, 2000).

Además de los patotipos clásicos de *E. coli* ya mencionados, en el año 1999 se sumó un nuevo grupo denominado *E. coli* adherente invasiva (ECAI). Los primeros aislados de estas

cepas se obtuvieron a partir de biopsias intestinales de pacientes con enfermedad de Crohn (EC) y su nombre proviene de una de las primeras características observadas en estas cepas, su capacidad de adherirse e invadir células epiteliales intestinales (Darfeuille-Michaud y col., 1998; Boudeau y col., 1999). Si bien el carácter fenotípico de adherencia e invasión no es suficiente para distinguir el patotipo ECAI de los otros patotipos de *E. coli* (Dupont y col., 1971; Venkatesan y col., 1989; Donnenberg y col., 1989; Elsinghorst y Kopecko, 1992; Oelschlaeger y col., 1994; Benjamin y col., 1995; Jouve y col., 1998), lo que hace la diferencia, es que la capacidad de invasión de ECAI no se asocia con determinantes genéticos clásicos de invasividad de cepas DEC, como *IpaC* que codifica para una invasina de EIEC o el gen *tia*, que codifica para una proteína involucrada en el proceso de invasión de cepas de ETEC. Además, otro rasgo característico de ECAI es su asociación con EC, a diferencia de los patotipos DEC que se asocian con cuadros de diarrea aguda en individuos sin una condición predisponente (Boudeau y col., 1999).

### **Asociación entre *E. coli* y EC**

La EC es un síndrome de origen multifactorial, en el que participan factores genéticos, inmunológicos y externos como la microbiota normal (Podolsky, 2002). Esta enfermedad se caracteriza por la inflamación crónica de distintos sectores del tracto gastrointestinal, a menudo va acompañada por la formación de granulomas y por otras características, como la presencia de úlceras, abscesos, fístulas y/o estenosis (Hendrickson y col., 2002; Satsangi y col., 2006). Entre las observaciones que avalan la asociación entre *E. coli* y EC están: i) estudios serológicos que muestran que los títulos de anticuerpos contra *E. coli* son más altos en pacientes con EC que en individuos control (sin enfermedades inflamatorias intestinales) (Tabaqchali y col., 1978); ii) detección de ADN de *E. coli* en alrededor del 80% de las

microdisecciones de granulomas de pacientes con EC (Ryan y col., 2004), y iii) mayor presencia de *E. coli* en macrófagos de la lámina propia de estos pacientes (25/35, 71 %) que en la de individuos sanos (0/18, 0%) (Elliott y col., 2015). Además, al caracterizar cepas de *E. coli* aisladas desde biopsias de pacientes con EC se observó una mayor prevalencia de cepas ECAI comparada con individuos sin enfermedad inflamatoria intestinal, con valores que varían de un estudio a otro (por ej., 36,4% v/s 6%, o un 51,9% v/s 16.7%, respectivamente) (Darfeuille Michaud y col., 2004, Martinez-Medina y col., 2009a). Si bien el rol de ECAI en la iniciación o cronicidad de esta enfermedad no está bien definido, se cree que podrían generar un estímulo antigénico constante que propiciaría la inflamación crónica y el desarrollo de granulomas (Darfeuille Michaud y col., 2004),

Cabe mencionar que las cepas ECAI también han sido aisladas desde otros mamíferos (perros y bovinos) con cuadros de colitis granulomatosa y mastitis bovina (Dogan y col., 2006; Manchester y col., 2013).

### **Mecanismos de patogenicidad de ECAI.**

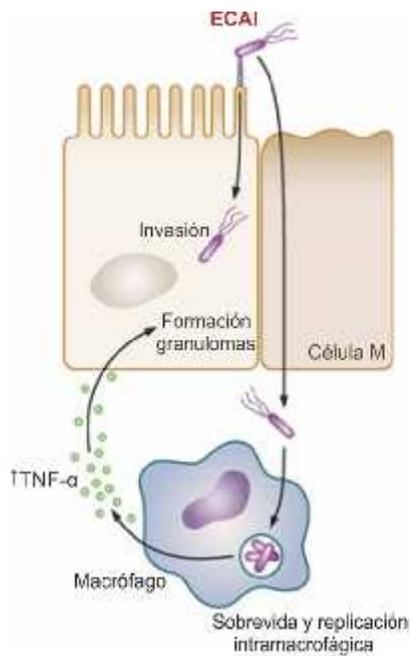
Como ya se mencionó, una de las primeras características descritas para el patotipo ECAI, fue su capacidad de adherir e invadir células epiteliales. Particularmente, ECAI LF82 (aislada por Darfeuille-Michaud desde una biopsia ileal de un paciente con EC) es una de las cepas de referencia mejor caracterizada y tiene la capacidad de adherir e invadir una amplia variedad de células epiteliales intestinales *in vitro*. Sumado a lo anterior, en el sitio de contacto entre la bacteria y la superficie de la célula epitelial se induce la elongación de microvellosidades que favorecen su ingreso a la célula a través de un mecanismo tipo macropinocitosis, dependiente de la participación de microtúbulos y filamentos de actina (Boudeau y col., 1999). Una vez en el interior de la célula, ECAI se escapa de la vacuola

endocítica y se replica libremente en el citoplasma, donde sobrevive durante 24 h o más sin dañar a la célula (Boudeau y col., 1999; Darfeuille Michaud y col., 2004). Las cepas ECAI además modulan los niveles de microARNs en las células epiteliales reduciendo la expresión de proteínas relacionadas con el proceso de autofagia, lo que favorecería la replicación bacteriana (Nguyen y col., 2014). Adicionalmente, la cepa ECAI LF82 es capaz de translocarse a través de células M, en un modelo *in vitro*, con una elevada interacción con Placas de Peyer (PPs) de origen murino y humano, por lo que se ha propuesto que otro modo que utilizan estas cepas para atravesar el epitelio intestinal podría ser a través de las células M presentes en las PPs (Chassaing y col., 2011). Las cepas ECAIs alteran la integridad de la barrera intestinal en modelos *in vitro*, induciendo la desorganización de F-actina, disrupción de uniones estrechas, afectando la proteína ZO-1 y E-caderinas asociadas a uniones adherentes del epitelio, todo lo cual podría favorecer su capacidad para diseminarse a través del intestino del hospedero (Sasaki y col., 2007; Wine y col., 2009).

Las cepas ECAI sobreviven y se replican en el interior de macrófagos, incluyendo la línea celular murina J774-A1, macrófagos peritoneales murinos y macrófagos derivados de monocitos humanos (HMDM). Una vez fagocitadas, las cepas ECAIs inducen la fusión de los fagosomas hasta desarrollar una gran vacuola donde pueden sobrevivir y replicarse por un largo periodo de tiempo. Lo anterior, sin producir muerte celular o daño aparente en las células fagocíticas, induciendo además la secreción de altas cantidades de factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) (Glasser y col., 2001). Esta característica diferencia a las cepas ECAI de los otros patotipos de DEC, los cuales tienen efectos citotóxicos en macrófagos murinos J774-A1 (Lai y col., 1999). Además, se ha reportado que la cepa ECAI LF82 es capaz de inducir agregación celular similar a los granulomas observados en EC, formados principalmente por macrófagos con algunos linfocitos a su alrededor. Lo descrito anteriormente permite proponer que las cepas

ECAI tendrían la capacidad de asociarse y atravesar la barrera epitelial, sobrevivir en el interior de macrófagos, inducir un fuerte proceso inflamatorio y generar la formación de granulomas (**Figura 1**) (Meconi y col., 2007).

Otra característica asociada a este patotipo, y posiblemente relacionada con su patogenicidad, es el desarrollo de *biofilms*. Las cepas de ECAI tienen una mayor capacidad para formar *biofilms* que otras cepas no-ECAI aisladas desde la mucosa intestinal, lo que podría darles una ventaja durante la colonización del intestino (Martinez-Medina y col., 2009b). Además, en el caso particular de la cepa NRG857c (una de las cepas de referencia de ECAI), se ha observado una elevada resistencia a  $\alpha$  y defensinas y otros péptidos catiónicos, lo que también favorecería el proceso de colonización intestinal (McPhee y col., 2014).



**Figura 1.** Mecanismo de patogenicidad propuesto para ECAI. Las cepas ECAI colonizan y atraviesan el epitelio intestinal, pueden translocar a través de células M y sobrevivir por largos periodos de tiempo en macrófagos presentes en la lámina propia, en donde generan un estímulo constante que favorece el desarrollo de un fuerte proceso inflamatorio, y posiblemente, la formación de granulomas.

(Imagen modificada de Croxen y col., 2013)

## Factores de virulencia de ECAIs

Los factores de virulencia que participan en los mecanismos de patogenicidad de ECAI aún son poco conocidos. Como ya se mencionó, estas cepas se caracterizan por la ausencia de los determinantes genéticos clásicos de invasividad de cepas DEC. Sin embargo, estas cepas son filogenéticamente cercanas y comparten varios genes de virulencia con cepas de ExPEC, a pesar de que difieren en sus mecanismos de patogenicidad (Martinez-Medina y col., 2009a; Nash y col., 2010). Los factores de virulencia relacionados con las cepas ExPEC que se han encontrado con mayor frecuencia en cepas ECAI son *fimH*, *papC* e *iucD* (Martinez-Medina y col., 2009a; De la fuente y col., 2014). Sin embargo, sólo se ha demostrado que variantes de FimH tienen un rol en la patogenicidad de ECAI (Boudeau et al., 2001; Barnich y col., 2007) (**Tabla 1**). Las cepas ECAI también poseen factores de virulencia característicos de *Enterobacteriaceae*, como aquellos descritos en *Salmonella* (*ratA*), *Yersinia* (*pMT1*, *fyuA*, *irp-1* e *irp-2*) y *Vibrio* (*hcp*), los que sin embargo, se han detectados con una frecuencia variable entre distintos aislados clínicos de ECAI (Baumgart y col., 2007). A esto se suma una gran variedad de posibles factores de virulencia postulados tras completarse la secuencia del genoma de la cepa LF82, y de otras cepas de referencia de ECAI, como NRG857c y HM605 (Miquel y col., 2010; Nash y col., 2010; Clarke y col., 2011). Sin embargo, el conocimiento sobre factores de virulencia y los mecanismos de patogenicidad asociados con ECAI es aún incipiente. A la fecha sólo ha sido posible demostrar el rol patogénico de algunas de estas proteínas en el mecanismo de patogenicidad de este patotipo, basándose en estudios desarrollados en su mayoría sólo en la cepa LF82. Además, gran parte de estos factores de virulencia están asociados indirectamente con la patogenicidad de ECAI, por ej., afectando la formación de vesículas de membrana externa (donde juega un rol importante *ompA*), la

formación del flagelo o del pili tipo I, estructuras que si interactúan con el hospedero, contribuyendo directamente a la patogenicidad de ECAI (**Tabla 1**). Por otro lado, es importante hacer notar que estas cepas son altamente heterogéneas a nivel genético, lo que limita el estudio de factores de virulencia utilizando sólo una cepa como modelo, ya que es difícil definir si estos elementos son característicos del patotipo o son específicos de una cepa en particular (Martinez-Medina y col., 2009a; Martinez-Medina y Garcia-Gil, 2014). Además, hasta la fecha no se ha identificado ningún gen que sea exclusivo de este patotipo, y que permita diferenciar ECAIs de otros patotipos intestinales o extraintestinales de *E. coli* (Smith y col., 2013).

**Tabla 1.** Factores de virulencia de cepas ECAIs.

Proteína	Función	Referencia
ArlC	Proteasa de la familia de las omptinas. Confiere resistencia a péptidos catiónicos en la cepa NRG857c.	McPhee y col., 2014
DsbA	Oxidoreductasa periplásmica asociada indirectamente con la capacidad de adhesión e invasión a células epiteliales y sobrevida en macrófagos de la cepa LF82.	Bringer y col., 2007
FimH	Adhesina del pili tipo I, cuyas variantes están involucradas en la adhesión de las cepas ECAIs al epitelio intestinal de pacientes con EC. Se une al receptor CEACAM-6, el cual es sobre-expresado en pacientes con EC.	Barnich y col., 2007 Boudeau et al., 2001
FliA	Factor sigma involucrado en la síntesis del pili tipo 1 y flagelo, por lo que su mutación afecta la capacidad de adhesión e invasión de LF82.	Claret y col., 2007
FliC	Flagelina, aparte de otorgarles movilidad a estas cepas, potencia la respuesta inmune intestinal y el desarrollo de colitis en ratones, mediada por la cepa LF82.	Carvalho y col., 2008

HtrA	Chaperona periplásmica asociada con la sobrevivencia de LF82 en el interior de macrófagos. Posiblemente afecta el plegamiento de proteínas asociadas con virulencia que aún se desconocen.	Barnich y col., 2005
IbeA	Invasina que se asocia con la capacidad de NRG857c para invadir células epiteliales y sobrevivir en macrófagos. Mecanismo no determinado.	Cieza y col., 2015
Lpf	Fimbria involucrada en el proceso de translocación de LF82 a través de las células M presentes en las PPs.	Chassaing y col., 2011
NlpI	Lipoproteína involucrada indirectamente en la capacidad de LF82 para adherirse e invadir células epiteliales intestinales.	Barnich y col., 2003
OmpA	Proteína presente en la membrana externa y en vesículas de membrana externa. Está involucrada en la capacidad de LF82 para invadir células epiteliales, utilizando como receptor a GP96.	Rolhion y col., 2010
OmpC	PME cuya ausencia afecta de forma indirecta la capacidad de adhesión e invasión de la cepa LF82.	Rolhion y col., 2007
Vat	Proteasa asociada con la capacidad de la cepa LF82 para colonizar la mucosa intestinal. Necesaria para la degradación de mucina.	Gibold y col., 2015
YfgL	Lipoproteína asociada indirectamente con la capacidad de invasión de la cepa LF82 a células epiteliales, afectando la formación de vesículas de membrana externa.	Rolhion et al., 2005

## **Búsqueda de marcadores de virulencia y proteínas de membrana externa (PMEs)**

La mayor parte de los factores de virulencia mencionados en la **Tabla 1** se identificaron a partir del análisis de una librería de mutantes de la cepa LF82 obtenidas mediante la inserción del transposón Tn5*phoA*, las cuales exhibieron una menor capacidad de invadir células epiteliales (Boudeau y col., 2001). Otros factores de virulencia se identificaron haciendo una analogía con lo observado en otras cepas patógenas de *E. coli* o *S. Typhimurium*, como es el caso de OmpA, Lpf e IbeA (Rolhion y col., 2010; Chassaing y col., 2011; Cieza y col., 2015). Sin embargo, como se dijo anteriormente, aún falta mucho conocimiento al respecto, y es en este contexto en el que se enmarca este trabajo, el cual a diferencia de los análisis mencionados, se enfoca en el estudio de PMEs de cepas ECAI. La importancia de estas proteínas radica en que al estar expuestas en la superficie bacteriana normalmente están involucradas en la interacción con el medio que las rodea, participando en procesos tales como la adaptación a nuevos nichos, la captura de hierro, dar respuesta a la falta de nutrientes, la resistencia a sales biliares, entre otros cambios. Estas proteínas también tienen un rol en mecanismos de patogenicidad, como la resistencia a péptidos antimicrobianos, al tratamiento con antibióticos, a la actividad bactericida del complemento y en otros procesos, como adhesión, invasión y sobrevivencia intracelular (Koebnik y col., 2000; Lin y col., 2002). Específicamente, lo que se propone en este estudio es caracterizar PMEs de cepas ECAIs, buscando proteínas presentes en este patotipo y ausentes en cepas de *E. coli* comensales. Esta comparación entre ECAI y cepas comensales se basa en que generalmente las características patogénicas y los diferentes síntomas clínicos causados por distintos patotipos de *E. coli* son un reflejo de la presencia de proteínas codificadas por diferentes conjuntos de genes asociados con virulencia que están presentes en ciertos patotipos y ausentes en aislados comensales (Dobrindt y col., 2003). Además, cabe mencionar que en este estudio se utilizarán varias cepas ECAI, no sólo cepas de

referencia, con el objetivo de obtener información relacionada con el patotipo de manera general y no la caracterización de una sola cepa. Es así como a través de esta comparación se pretende identificar PMEs que pudiesen estar relacionadas con la patogenicidad de ECAI, ayudando a entender mejor los mecanismos ya descritos para este patotipo o aportando información sobre posibles nuevas características, y que incluso podrían llegar a servir como blanco terapéutico.

## **HIPÓTESIS**

Las cepas de *E. coli* adherente invasivas (ECAIs) obtenidas desde pacientes con EC sintetizan proteínas de membrana externa (PMEs) características, ausentes en la cepa comensal de referencia *E. coli* HS, y codificadas en genes que no se detectan en otras cepas comensales de *E. coli*.

## **OBJETIVO GENERAL**

Identificar PMEs que estén presentes en más del 70% de las cepas ECAIs obtenidas desde pacientes con EC y ausentes en la cepa *E. coli* HS, corroborando la ausencia de los genes que codifican estas proteínas en una colección de cepas comensales de *E. coli*.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Caracterizar aislados de *E. coli* obtenidos desde pacientes con EC de acuerdo a la definición de ECAI.
  - a) Caracterizar las cepas de *E. coli* obtenidas desde pacientes con EC con relación a su capacidad de adherencia e invasión *in vitro* de células Caco-2.
  - b) Caracterizar las cepas de *E. coli* obtenidas desde pacientes con EC en cuanto a su capacidad de sobrevivir y replicarse en el interior de macrófagos RAW 264.7.
  
2. Identificar PMEs presentes en cepas ECAIs y ausentes en la cepa comensal *E. coli* HS.
  - a) Caracterizar los perfiles de PMEs de las cepas de ECAIs y de la cepa comensal de referencia *E. coli* HS.
  - b) Comparar los perfiles de PMEs de estas cepas y seleccionar aquellos *spots* característicos de las cepas ECAIs y ausentes en *E. coli* HS.
  - c) Identificar mediante MALDI-TOF/TOF aquellas PMEs presentes en >70% de los aislados de ECAIs y ausentes en *E. coli* HS.

**3.** Determinar la frecuencia de los genes que codifican las PME's identificadas en el Objetivo 2, en cepas de referencia y aislados clínicos de ECAI, y cepas comensales de *E.coli*.

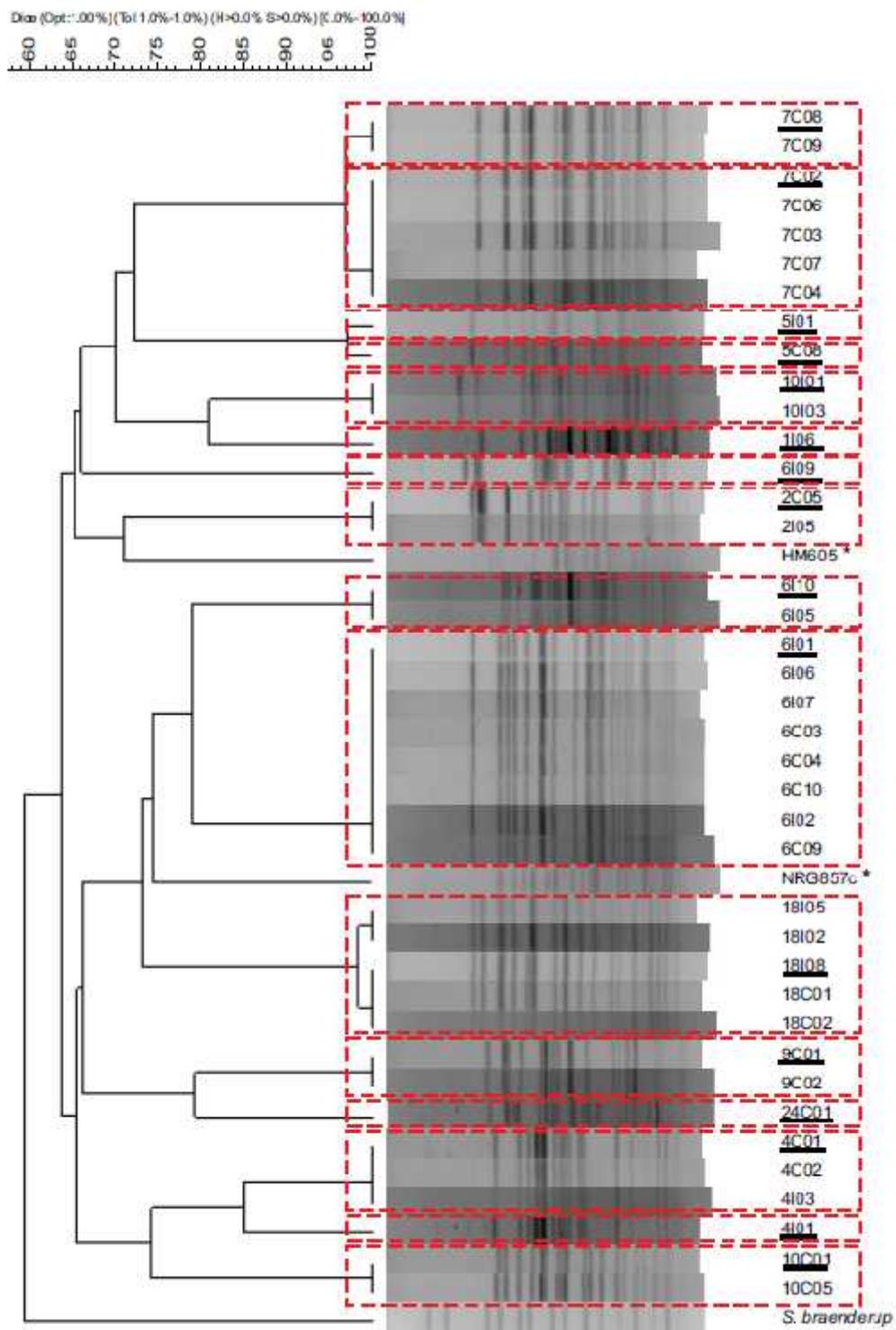
a) Determinar mediante bioinformática la presencia de las secuencias de las PME's de interés en genomas de *E. coli* comensales y ECAIs disponibles en bases de datos.

b) Determinar mediante PCR la presencia de los genes que codifican para las PME's de interés en una colección de cepas comensales de *E.coli*

## METODOLOGÍA

### Cepas Bacterianas

En este estudio se incluyeron 16 cepas de *E. coli* obtenidas desde biopsias intestinales de pacientes con EC, cedidas amablemente por el Dr. Ramón Rosselló-Móra (Instituto Mediterráneo de estudios avanzados-CSIC, Mallorca). Las biopsias se obtuvieron desde pacientes de distinto sexo, edad (nacidos entre los años 1983 y 2011) y diferentes características histopatológicas. La nomenclatura para cada cepa es la siguiente: la primera cifra corresponde al número asociado al paciente desde se obtuvo la muestra, luego “C” o “I” para indicar si la biopsia proviene de colón o ileón, respectivamente, y finalmente, una cifra que corresponde al número de aislado. Cabe mencionar que antes de aislar estas cepas, las biopsias fueron sometidas a un tratamiento con 100 µg/mL de gentamicina para eliminar aquellos microorganismos que se encontraban en la zona extracelular y así favorecer el aislamiento de bacterias invasivas. Las 16 cepas fueron seleccionadas a partir de un análisis de clonalidad mediante electroforesis de campo pulsado (PFGE) de una colección de 39 aislados provenientes de pacientes Españoles con EC, seleccionando una cepa bacteriana por cada clado genéticamente relacionado (>97% de similitud) (**Figura 2**). En este estudio además se incluyeron las cepas de referencia ECAI HM605 (Clarke y col., 2011) y NRG857c (Nash y col., 2010), que se utilizaron como control positivo para los ensayos de sobrevivencia en macrófagos, y adhesión e invasión a células Caco-2, y como control negativo se utilizó la cepa de laboratorio *E. coli* HB101 (Boyer y Roulland-Dussoix, 1969). Por otra parte, para comparar los perfiles de PME de las cepas caracterizadas como ECAIs, se utilizó la cepa comensal *E. coli* HS (Dupont y col., 1971). Para determinar la presencia o ausencia de los genes que codifican para las PME identificadas en ECAIs se utilizó una colección de 8 cepas comensales de *E. coli* disponibles en el laboratorio (Montero y col., 2014).



**Figura 2.** Variabilidad genética de cepas de *E. coli* obtenidas desde pacientes con EC y selección de las 16 cepas utilizadas en este estudio. El dendrograma fue obtenido a partir del análisis los patrones de macrodigestión *XbaI*-PFGE utilizando el algoritmo UPGMA y el índice DICE de similitud (software

Gel Compare II). Las cepas analizadas incluyen 39 aislados clínicos de *E. coli* de pacientes diagnosticados con EC y las cepas de referencia de ECAI HM605 y NRG857c. En recuadros rojos se indican los grupos de cepas altamente relacionadas a nivel genético, con un índice de similitud mayor al 97% (recuadros rojos). Cada cepa seleccionada esta subrayada en negro. (Datos obtenidos de Unidad de Investigación, Waleska Saitz)

### **Ensayos de adhesión a células epiteliales Caco-2**

Para caracterizar las cepas de *E. coli* obtenidas desde paciente con EC como ECAI, lo primero que se evaluó fue su capacidad de adherirse e invadir a células epiteliales (Darfeuille-Michaud y col., 1998; Boudeau y col., 1999), utilizando como modelo de estudio las células epiteliales Caco-2 (línea celular derivada de adenocarcinoma de colon).

El ensayo de adhesión se realizó de acuerdo a un protocolo previamente establecido (De la Fuente y col., 2014). Brevemente, las células Caco-2 se cultivaron en placas de 24 pocillos en medio DMEM alto en glucosa (glucosa 4500 mg/L, L-glutamina 4.0 mM y piruvato de sodio 110 mg/L) (HyClone) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 1% de solución antibiótico/antimicótico (Pen/Strep/Fungizone, HyClone) hasta tener alrededor de  $5 \times 10^5$  células por pocillo. Luego el cultivo celular fue lavado con PBS 1X e infectado con una suspensión bacteriana utilizando una multiplicidad de infección (MOI) de 10. Esta suspensión bacteriana se realizó a partir del cultivo de las cepas de *E. coli* durante 20 h sin agitación en medio DMEM bajo en glucosa (glucosa 1000 mg/L, L-glutamina 4.0 mM y piruvato de sodio 110 mg/L) (HyClone), desde donde se tomó una alícuota con  $5 \times 10^6$  bacterias aprox. la que fue inoculada en medio DMEM alto en glucosa (glucosa 4500 mg/L, L-glutamina 4.0 mM y piruvato de sodio 110 mg/L) (HyClone), con el que finalmente se infectaron las células Caco-2. Además, se realizó un recuento de bacterias a tiempo 0 realizando una dilución seriada de

inoculo inicial, las cuales fueron sembradas en placas con agar LB, contando las unidades formadoras de colonia (UFCs) en la dilución donde fue posible. Las células infectadas se incubaron por 30 min a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>, luego las células fueron lavadas tres veces con PBS 1X, para eliminar las bacterias no adheridas. Posteriormente fueron lisadas utilizando Triton X-100 al 0,1% durante 15 min, se realizaron diluciones seriadas y se determinó el número de UFCs recuperadas desde los lisados en placas con agar LB. El resultado final se expresó como el porcentaje de bacterias adheridas con respecto al número inicial de bacterias. Cada ensayo fue realizado por triplicado.

### **Ensayos de invasión a células epiteliales Caco-2**

La capacidad de invasión de los aislados de *E. coli* fue evaluada mediante un ensayo de protección a amikacina, modificado de Rosa y col., 2001, en el cual la infección de las células se realizó de la misma forma que en el ensayo de adhesión previamente descrito. Luego, las células infectadas se incubaron por 3 h a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>, posteriormente las células fueron lavadas tres veces con PBS 1X, y se les agregó medio DMEM alto en glucosa (glucosa 4500 mg/L, L-glutamina 4.0 mM y piruvato de sodio 110 mg/L) (HyClone) y amikacina 100 µg/mL (Sigma). Los cultivos celulares infectados se incubaron durante 1 h a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>, para eliminar aquellas bacterias no invasivas. Posteriormente, las células fueron lisadas utilizando Tritón X-100 al 0,1% durante 15 min, luego se realizaron diluciones seriadas a partir de los lisados, las cuales fueron sembradas en placas con agar LB para realizar el recuento de UFCs. El porcentaje de invasión se expresó como el porcentaje de UFCs recuperadas tras el tratamiento con amikacina con respecto a las UFC del inoculo bacteriano inicial. Cada ensayo fue realizado por triplicado.

### **Sobrevida y replicación en macrófagos RAW 264.7**

Otra de las características de las cepas de ECAIs es la capacidad de sobrevivir y replicarse en el interior de macrófagos (Glasser y col., 2001), lo cual se evaluó utilizando como modelo macrófagos murinos RAW264.7. La infección de estas células se llevó a cabo del mismo modo descrito en el ensayo de adhesión. Las células infectadas fueron incubadas durante 2 h a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>, tras lo cual se realizaron tres lavados con PBS 1X, y se les agregó medio DMEM alto en glucosa (glucosa 4500 mg/L, L-glutamina 4.0 mM y piruvato de sodio 110 mg/L) (HyClone) con amikacina 100 µg/mL (Sigma) (para eliminar aquellas bacterias que no fueron fagocitadas) (modificado de Rosa y col., 2001), incubando los macrófagos infectados a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> durante 1, 3 y 24 h. Posteriormente, estos macrófagos infectados fueron lisados utilizando Tritón X-100 al 0,1% durante 25 min. Luego, se realizaron diluciones seriadas a partir de estos lisados, las cuales fueron sembradas en placas con agar LB para realizar el conteo de las UFCs fagocitadas en los diferentes tiempos de incubación. El porcentaje de sobrevida se expresó como las UFCs recuperadas después del tratamiento con amikacina a las 3 y 24 h, con respecto a las UFCs recuperadas al tiempo inicial (1 h tras el tratamiento con amikacina). El ensayo fue realizado por triplicado.

### **Extracción de PMEs de cepas ECAIs**

Para comparar los perfiles de PMEs de las cepas caracterizadas como ECAIs primero se procedió a extraer estas proteínas mediante una modificación del protocolo de Rivas y col. (2008), establecido previamente en el laboratorio. Brevemente, se realizaron cultivos de 600 mL de cada cepa ECAI en medio DMEM bajo en glucosa (glucosa 1000 mg/L, L-glutamina 4.0 mM y piruvato de sodio 110 mg/L) (HyClone) a 37 °C, sin agitación, durante 18 h, tiempo tras el cual se les dio un shock de 90 min con sales biliares al 2%, para favorecer la expresión de

factores de virulencia (Chassaing y col., 2012). Luego, estos cultivos bacterianos fueron centrifugados a 9000 x g por 10 min a 4°C. El *pellet* de células bacterianas fue lavado y resuspendido en Tris 10 mM pH 8, tras lo cual se les añadió 50 µL de fluoruro de fenilmetilsulfonilo 100 mM (PMSF) (Calbiochem) y 50 µL de un cóctel de inhibidor de proteasas (Calbiochem). Posteriormente, la mezcla fue sonicada (Ultrasonic homogenizer modelo 3000MP, Biologics Inc) durante 40 ciclos por 30 s, con intervalos de 30 s, en hielo. Luego se centrifugó a 12.000 x g por 30 min para remover restos celulares, pasando el sobrenadante por una membrana de acetato de celulosa (poro 0,22µm). A continuación, se agregaron 250 µL de RNAsa (Sigma-aldrich) y 250 µL de DNAsa (Sigma-aldrich), se incubó a temperatura ambiente por 20 min para eliminar ácidos nucleicos, tras lo cual se centrifugó a 12.000 x g por 10 min a 4°C. La membrana citoplasmática fue solubilizada añadiendo Sarkosyl (N-lauroyl sarcosine) al 2% al sobrenadante e incubando inicialmente por 30 min a temperatura ambiente, y luego durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, la suspensión fue centrifugada a 20500 x g por 1 h, el *pellet* fue resuspendido en agua miliQ con PMSF al 1%, y fue centrifugado nuevamente a 20500g por 30 min, eliminando el sobrenadante y dejando el *pellet* lo más seco posible. El *pellet* final (el cual está enriquecido con PMEs) fue resuspendido en 200-250 µL de agua miliQ con PMSF al 1%. La estimación de la concentración de proteínas se realizó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976).

### **Separación de PMEs mediante electroforesis bidimensional (2D-PAGE).**

Una vez obtenidas las PMEs, estas fueron separadas mediante 2D-PAGE de acuerdo al protocolo previamente descrito por Montero y col., 2014 y las indicaciones del manual *2-D Electrophoresis Principles and Methods* (GE Healthcare). Este procedimiento consta principalmente de dos etapas: isoelectroenfoque (IEF), que permite separar las proteínas de

acuerdo a su punto isoeléctrico, y SDS-PAGE, que permite separarlas de acuerdo a su peso molecular. Para el IEF o primera dimensión se utilizaron strips de 13 cm con un rango de pH de 4 a 7 (GE Healthcare), los que fueron incubados durante 16 h a temperatura ambiente con una solución de rehidratación, conteniendo los extractos de PMEs (250 µl de solución de rehidratación DeStreak [GE Healthcare], buffer IPG de pH 4 a 7 1% [GE Healthcare], 10 mM dithiothreitol [DTT], y 250 µg de PMEs). Con los *strips* rehidratados se realizó el IEF utilizando el sistema Ettan IPGphor3 (GE Healthcare) a una temperatura de 20°C con un límite de 50 µA/*strip* de acuerdo al siguiente programa: 200 V por 1 h, 500 V por 1 h, 1,000-V en gradiente por 1 h, 8,000-V en gradiente por 3 h y 30 min, y finalmente, 8,000 V hasta alcanzar los 20 kV h, permitiendo que las proteínas alcancen su posición final en el gradiente de pH de acuerdo a su punto isoeléctrico.

Antes de realizar el SDS-PAGE, los *strips* fueron equilibrados durante 15 min en 3 mL de buffer I (Tris-HCl 50 mM pH 8.8, urea 6 M, glycerol 30%, peso/vol, SDS 2% peso/vol, DTT 10 mg/mL), luego durante 15 min en 3 mL de buffer II (Tris-HCl 50 mM pH 8.8, urea 6 M, glycerol 30%, peso/vol, SDS 2% peso/vol e iodoacetamida 25 mg/mL), y finalmente, durante 15 min en Buffer de corrida de proteínas 1X (0.025M Tris, 0.192M glicina, 0.1% SDS).

La segunda dimensión o SDS-PAGE, se realizó en la cámara SE 600 Ruby *Standard Dual Cool vertical unit* (Amersham Biosciences, GE Healthcare), utilizando geles de poliacrilamida al 12%. La electroforesis se realizó de acuerdo al siguiente programa: primero a 5 mA/gel por 20 min, y luego 15 mA/gel por 9 h. Los geles fueron teñidos con Coomassie brilliant blue G-250 (Bio-Rad, USA).

### **Análisis de geles 2D-PAGE y selección de *spots* de interés.**

Las imágenes de los geles 2D-PAGEs fueron analizadas utilizando el software BioNumerics 2D (v6.6; Applied-Maths). Para poder comparar los perfiles de PME de las cepas ECAIs con el de la cepa comensal *E. coli* HS, se diseñó un gel sintético o virtual en la sección “*Matching gel 2D type*”, donde se pueden agregar o quitar *spots* del gel que se utiliza como referencia, que en este caso fue el de la cepa ECAI 18I08. En el gel sintético se dejaron aquellos *spots* que estaban representados en más de un 70% (por lo menos 5/7) de las cepas ECAIs estudiadas. Luego este gel se contrastó con el de la cepa *E. coli* HS, utilizando la imagen ya disponible en la base de datos del laboratorio (Montero y col., 2014). Los *spots* que se enviaron a identificar fueron aquellos que estaban presentes en más de un 70% de las cepas ECAIs estudiadas, y ausentes en la cepa comensal *E. coli* HS.

### **Identificación de proteínas mediante MALDITOF/TOF**

Para determinar a qué proteínas correspondían los *spots* de interés, estos fueron cortados a partir de un gel 2D-PAGE y enviados para ser identificados mediante MALDITOF/TOF en la Universidad de Texas (Galvestone, USA).

### **Análisis bioinformático de las PMEs identificadas en cepas ECAIs.**

Con el fin de evaluar la presencia de las PMEs identificadas en más del 70% de las cepas ECAIs caracterizadas en este estudio en otras cepas ECAIs y *E. coli* comensales, se hizo una búsqueda bioinformática mediante BLASTp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Este programa realiza un alineamiento de las secuencias aminoacídicas de las PMEs evaluadas con secuencias de proteínas disponibles en NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Este análisis se realizó considerando las secuencias aminoacídicas de las cepas de referencia ECAI LF82 (NC\_011993.1), NRG857c (NC\_017634.1), HM605 (CADZ01000001 a CADZ01000154),

UM146 (NC\_017632.1), 541-1 (NZ\_AJWR01000001 a NZ\_AJWR01000383), 541-15 (NZ\_AJWQ01000001 a NZ\_AJWQ01000301) y 576-1 (NZ\_AJWS01000001 a NZ\_AJWS01000507) y cepas comensales de *E. coli* IAI1 (NC\_011741.1), ED1a (NC\_011745.1) y SE11 (AP009240.1), incluyendo además, la cepa *E. coli* HS (NC\_009800.1), para corroborar lo obtenido mediante la comparación de las imágenes de los geles bidimensionales. Esta comparación bioinformática más un análisis filogenético (descrito posteriormente) sumado a la información del grupo filogenético al que pertenece cada una de estas cepas (A, B1, B2 o D), permitieron seleccionar aquellas PMEs que resultaron ser más frecuentes en un grupo cepas ECAIs respecto de las cepas de *E. coli* comensales. Considerando que el número de genomas de *E. coli* comensales disponibles en bases de datos es escaso, se consideraron como poco frecuentes a aquellos genes que a lo más estaban presentes en uno de los cuatro genomas de cepas comensales de *E. coli* depositados en bases de datos.

### **Análisis filogenéticos de cepas ECAIs y *E. coli* comensales**

Las relaciones filogenéticas de las cepas ECAIs y *E. coli* comensales utilizadas en el análisis bioinformático anterior fueron evaluadas utilizando el programa CSI Phylogeny 1.1 (Call SNPs & Infer Phylogeny) <https://cge.cbs.dtu.dk/services/CSIPhylogeny/>.

### **Diseño de partidores para PCR y detección de genes identificados en ECAIs en una colección de cepas comensales de *E. coli*.**

Considerando que sólo hay 4 genomas de cepas de *E. coli* comensales disponibles en bases de datos (HS, ED1a, IAI1 y SE11), al análisis bioinformático se sumó la detección de los genes que codifican para las PMEs de las ECAIs aquí caracterizadas en una colección de 8 cepas comensales de *E. coli* disponibles en el laboratorio (Montero y col., 2014), mediante PCR. Por otro lado, para comprobar la presencia de los genes que codifican para las PMEs de

interés (identificadas por MALDI-TOF/TOF) en las cepas ECAIs caracterizadas en este estudio y en aquellas cepas de *E. coli* obtenidas desde pacientes con EC que no cumplen con la definición de ECAI (no-ECAIs), también fueron analizadas mediante PCR. Con este fin, se diseñaron partidores utilizando PrimerBLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) que amplifican los genes que codifican para las proteínas de interés: ChuA, FitA, EefC/NodT, NmpC, IrpC, OmpT y un potencial receptor de hierro (abreviado en este trabajo como Lgc) (**Tabla 2**). Estos partidores se diseñaron usando como base las secuencias nucleotídicas de los genes que codifican para las PME de interés presentes en ECAI NRG857c, con excepción de *lgc*, para el que se utilizó como base el gen de la cepa ECAI 541-1. Además, para diseñar estos partidores se consideraron como base las regiones conservadas entre genes homólogos a los evaluados en este estudio. La reacción de PCR se realizó utilizando la GoTaq polimerasa (Promega) de acuerdo a las instrucciones de fábrica. Las condiciones de PCR utilizadas fueron las siguientes (se indica con un número el programa correspondiente en la **Tabla 2**):

Programa 1: 5 min a 94°C seguidos de 30 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 60°C y 2 min a 72°C, con una extensión final de 8 min a 72°C.

Programa 2: 5 min a 94°C seguidos de 30 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 60°C y 1 min 10 seg a 72°C, con una extensión final de 8 min a 72°C.

Programa 3: 5 min a 94°C seguidos de 30 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 60°C y 1 min a 72°C, con una extensión final de 6 min a 72°C.

**Tabla 2.** Partidores utilizados para amplificar los genes que codifican las PMEs identificadas en cepas ECAIs mediante PCR.

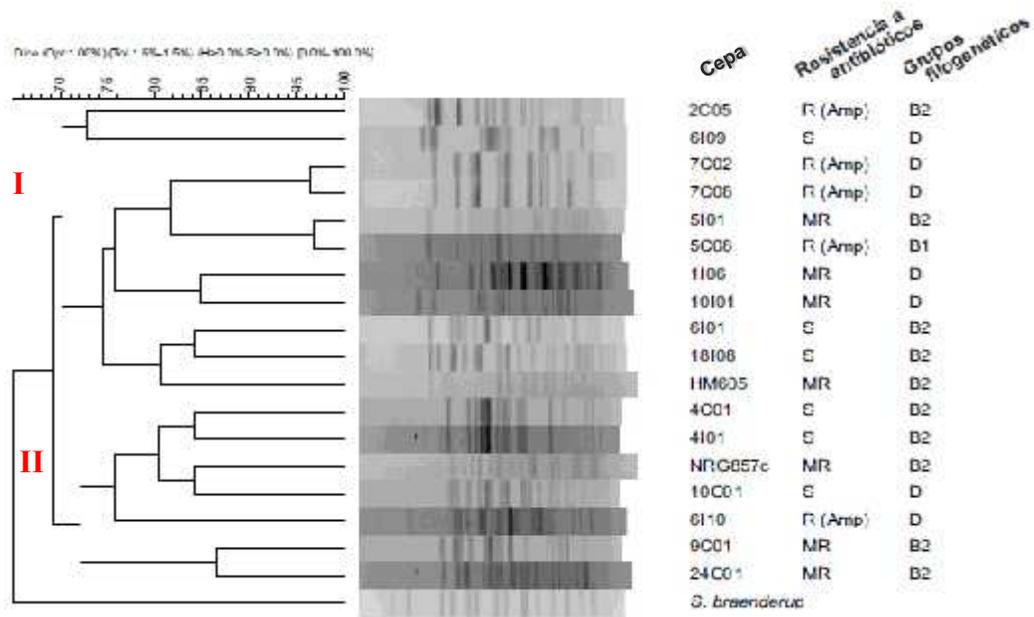
PMEs	Secuencia partidor (5'-3')	Tm (°C)	Amplificación (pb)	Control (+)	Referencia
ChuA <sup>3</sup>	GACGAACCAACGGTCAGGAT TGCCGCCAGTACCAAAGACA	59	279	NRG 857c	Clermont y col., 2000
FitA <sup>1</sup>	ATCCCGCAGGTGGTCAATAC GGCATCGGCAACGAAATAGC	60	1758	NRG 857c	Este estudio
EefC/NodT <sup>2</sup>	TTGAGTGCGGGATGTGTCTC CCGTCAACACGGTCAGGTAA	60	1225	NRG 857c	Este estudio
NmpC <sup>3</sup>	ACTGATGGCGATGTCTGCTC ACGCACCCAAGTCTTTTCCT	62	863	NRG 857c	Este estudio
IrpC <sup>1</sup>	ATCAGCCAACAACGTCTCGT GCGTATCAATCACGCCGTTT	60	1622	NRG 857c	Este estudio
OmpT <sup>3</sup>	GCCTGCACCATTTTGTCTGT TCCTGACAACCCCTATTGCG	59	878	NRG 857c	Este estudio
Lgc <sup>1</sup>	ACAGCAGGCTGGGAAGAATC TGCTGTACGGTAGCGTTTGT	60	1539	EDL933	Este estudio

<sup>1,2,3</sup> Numero del programa de amplificación por PCR utilizado.

## RESULTADOS

### **Antecedentes de las cepas de *E. coli* provenientes de pacientes con EC utilizadas en este estudio.**

Las cepas de *E. coli* utilizadas en este estudio fueron previamente caracterizadas en cuanto a la presencia de genes característicos de patotipos DEC, variabilidad genética, resistencia a antibióticos y grupos filogenéticos (Unidad de investigación, Waleska Saitz). Ninguno de los 16 aislados de *E. coli* poseen genes característicos de otras cepas DEC, como *ipaH*, *virF*, *stx* y *eae*. Tal como se observa en la **Figura 3**, el dendrograma permite distinguir dos grupos con una alta variabilidad genética (I y II con un >69% de similitud), y en términos generales al interior de cada grupo todas la mayoría de las cepas exhiben porcentajes superiores 80%, con excepción de las cepas 5I01, 5C08, 7C02 y la 7C08, que superan el 95%. Además, en cuanto a la resistencia a antibióticos, 5/16 cepas son multiresistentes, 5/16 son resistentes a ampicilina y 6/16 son sensibles a todos los antibióticos evaluados. Por otra parte, en cuanto a los grupos filogenéticos, B2 (50%) y D (43%) son los más prevalentes en este grupo de cepas, los cuales también son frecuentes en las cepas ExPEC más virulentas (Bingen y col., 1998; Picard y col., 1999; Johnson y Stell, 2000).



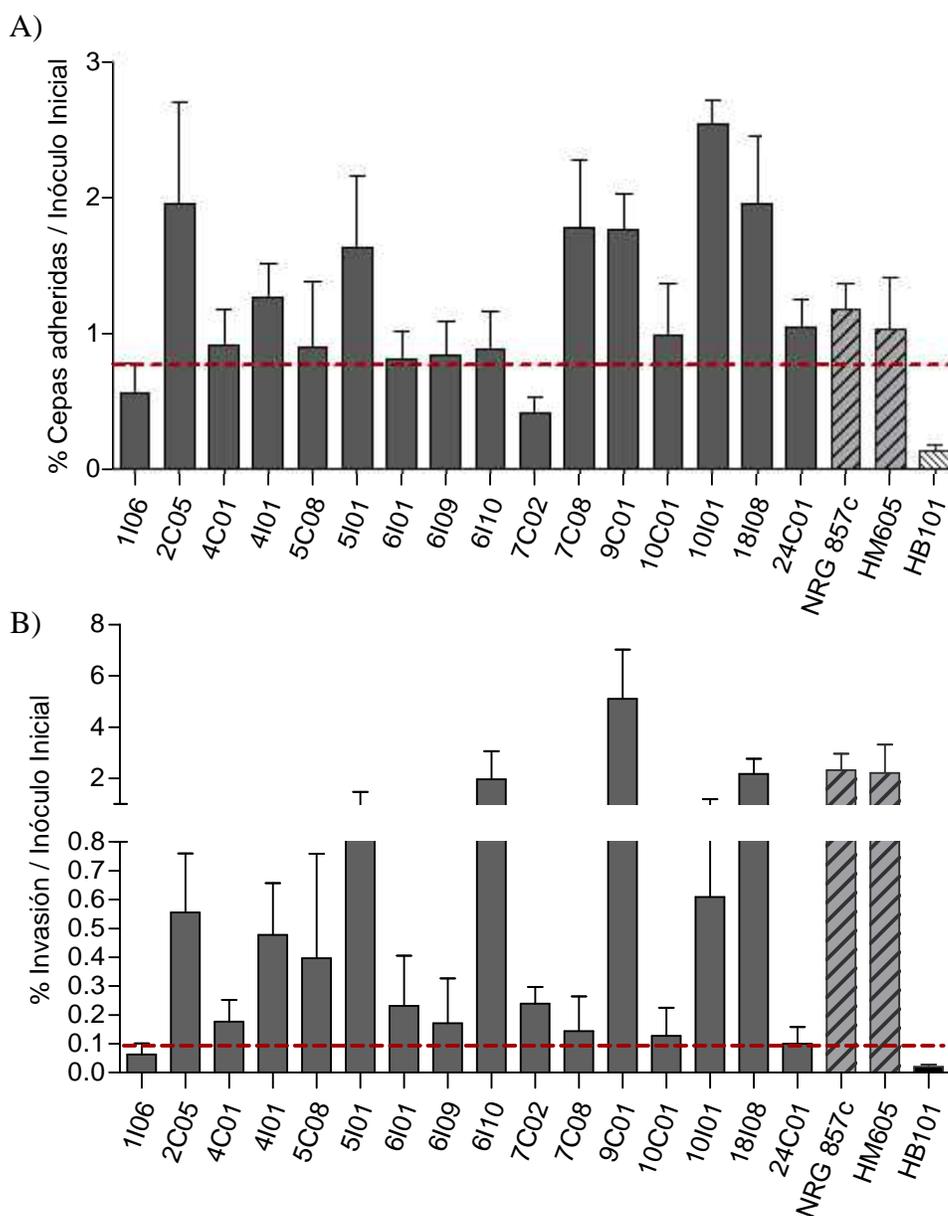
**Figura 3.** Variabilidad genética de las 16 cepas de *E. coli* obtenidas desde pacientes con EC utilizadas en este estudio. El dendrograma fue obtenido a partir del análisis los patrones de macrodigestión *Xba*I-PFGE utilizando el algoritmo UPGMA y el índice DICE de similitud (software Gel Compare II). Se indican los grupos filogenéticos, resistencia a antibióticos de estas cepas y los dos principales grupos (I y II) con una variabilidad genética de ~69%. También se incluyen las cepas de referencia de ECAI HM605 y NRG857c. Se evaluó la resistencia de las cepas de *E. coli* a 8 antibióticos (gentamicina, ciprofloxacino, cloranfenicol, cefotaxima, ampicilina, cefepima, trimetoprim-sulfametoxazol y ácido nalidíxico). S: Sensible; R: Resistente; MR: Multi-resistente (cepa con resistencia a más de un antibiótico).

## **Caracterización de cepas de *E. coli* obtenidas desde paciente con EC y definición de ECAI**

La caracterización de los 16 aislados clínicos de *E. coli* provenientes de pacientes con EC se realizó evaluando las tres características principales correspondientes al patotipo ECAI: i) su capacidad de adherirse a células epiteliales, ii) su capacidad de invadir células epiteliales y iii) su capacidad de replicar y sobrevivir en el interior de macrófagos (Darfeuille-Michaud y col., 2004).

i) Capacidad de adherencia: Primero se evaluó la capacidad de adherencia de los aislados clínicos de *E. coli* a células epiteliales Caco-2. Se consideraron adherentes aquellas cepas que exhibieron un porcentaje superior a 0,8 %, valor previamente descrito para la caracterización de cepas ECAIs (Lebba y col., 2012). Este valor es más de 5 veces superior al de la cepa utilizada como control negativo *E.coli* HB101 (~0,14 %). De las 16 cepas ensayadas, 14 son adherentes y sólo dos cepas, 1I06 y 7C02, fueron consideradas no adherentes. Por el contrario, destacaron por su capacidad de adherencia las cepas 2C05, 10I01 y 18I08 (>1.9%) (**Figura 4**).

ii) Capacidad de invadir: Paralelamente, se evaluó la capacidad de los aislados clínicos de *E. coli* para invadir células epiteliales Caco-2. Se consideraron como invasivas a aquellas cepas que exhiben un porcentaje de invasión a células Caco-2 superior a 0,1%, límite previamente establecido para la caracterización de cepas ECAIs (Darfeuille-Michaud y col., 2004). Se observó que 15 de las 16 cepas provenientes de pacientes con EC tienen la capacidad de invadir células epiteliales. La cepa cuyo porcentaje de invasión se encuentra por debajo del límite establecido es la 1I06, mientras que las cepas 6I10, 9C01 y 18I01 tienen los porcentajes de invasión más altos (>2%) (**Figura 4**).



**Figura 4.** Determinación de la capacidad de A) adherencia y B) invasión de cepas de *E. coli* obtenidas desde pacientes con EC. Ambos ensayos fueron realizados en cultivos celulares Caco-2, empleando un MOI=10. Línea roja segmentada indica el valor límite para considerar las cepas como adherentes o invasivas, respectivamente. ■ Cepas de *E. coli* aisladas de biopsias intestinales de pacientes con EC, ▨ Cepas de referencia de ECAIs, ▤ *E. coli* HB101 (control negativo). Cada experimento fue realizado en triplicado.

iii) Replicación y sobrevida en Macrófagos RAW 264.7: La tercera de las características necesarias para definir una cepa de *E. coli* como ECAI, es su capacidad de sobrevivir y/o replicarse en el interior de macrófagos, lo que fue evaluado utilizando la línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7. La mayoría de las cepas muestran un porcentaje de sobrevida en macrófagos mayor al de la cepa utilizada como control negativo *E. coli* HB101, la cual fue eliminada 24 h después del tratamiento con amikacina. Se consideró como límite de sobrevida los valores exhibidos por las cepas de referencia de ECAI NRG857c y HM605, criterio de acuerdo al cual 7 cepas sobreviven en el interior de los macrófagos RAW264.7 (**Tabla 3**). Entre estas cepas, 4C01 y 4I01 destacan en relación a su capacidad de replicación en macrófagos, ya que la cantidad de bacterias recuperadas a las 24 h es superior a la recuperada a 1 h post tratamiento antibiótico. Por otra parte, cabe mencionar que si bien todas las cepas muestran valores variables de sobrevida en los macrófagos RAW264.7, en general se observa que hay una disminución de la cantidad de bacterias que se recuperan del interior de los macrófagos entre las 3 y las 24 h, incluidas las cepas referencia de ECAI.

**Tabla 3.** Caracterización de las cepas de *E. coli* provenientes de paciente con EC en cuanto a su capacidad de replicar y sobrevivir en el interior de macrófagos RAW 264.7.

	Cepa	% 3 h (*)		% 24 h (*)	
Cepas de individuos EC	1I06	292,0	± 78,0	6,9	± 0,5
	2C05	143,0	± 11,9	3,3	± 1,0
	4C01	679,8	± 108,5	409,8	± 71,7
	4I01	606,8	± 104,5	127,3	± 21,1
	5C08	124,3	± 15,2	16,3	± 4,4
	5I01	168,7	± 10,5	83,8	± 16,6
	6I01	45,1	± 39,1	5,1	± 4,1
	6I09	110,7	± 9,9	27,0	± 10,6
	6I10	8,4	± 1,0	1,0	± 0,3
	7C02	737,0	± 148,6	5,7	± 1,3
	7C08	128,7	± 23,8	3,0	± 1,9
	9C01	250,7	± 44,1	59,8	± 12,4
	10C01	50,6	± 4,6	9,0	± 3,9
	10I01	88,7	± 6,2	30,0	± 7,0
	18I08	83,2	± 16,8	45,1	± 7,7
		24C01	119,2	± 9,5	0,003
Cepas de referencia ECAI	NRG 857c	74,3	± 5,2	31,3	± 5,2
	HM605	58,3	± 9,7	22,9	± 4,4
Control negativo	HB101	29,7	± 7,1	0,0	± 0,0

\* Porcentaje de cepas recuperadas a las 3 y 24 h post tratamiento con amikacina (100 µg/mL) en relación a la cantidad de bacterias que ingresaron inicialmente (1 h post tratamiento con amikacina). Se destacan en gris aquellas cepas que sobreviven en macrófagos de acuerdo al criterio utilizado como referencia (igual o superior a los valores exhibidos por las cepas NRG857c y HM605).

De acuerdo a los resultados de adherencia e invasión de células epiteliales y sobrevida en macrófagos de la caracterización anterior, de las 16 cepas provenientes de pacientes con EC cumplen con los criterios para ser consideradas ECAIs las cepas 4C01, 4I01, 5I01, 6I09, 9C01, 10I01 y 18I08 (**Tabla 4**).

**Tabla 4.** Caracterización de aislados definidos como ECAI provenientes de individuos con EC

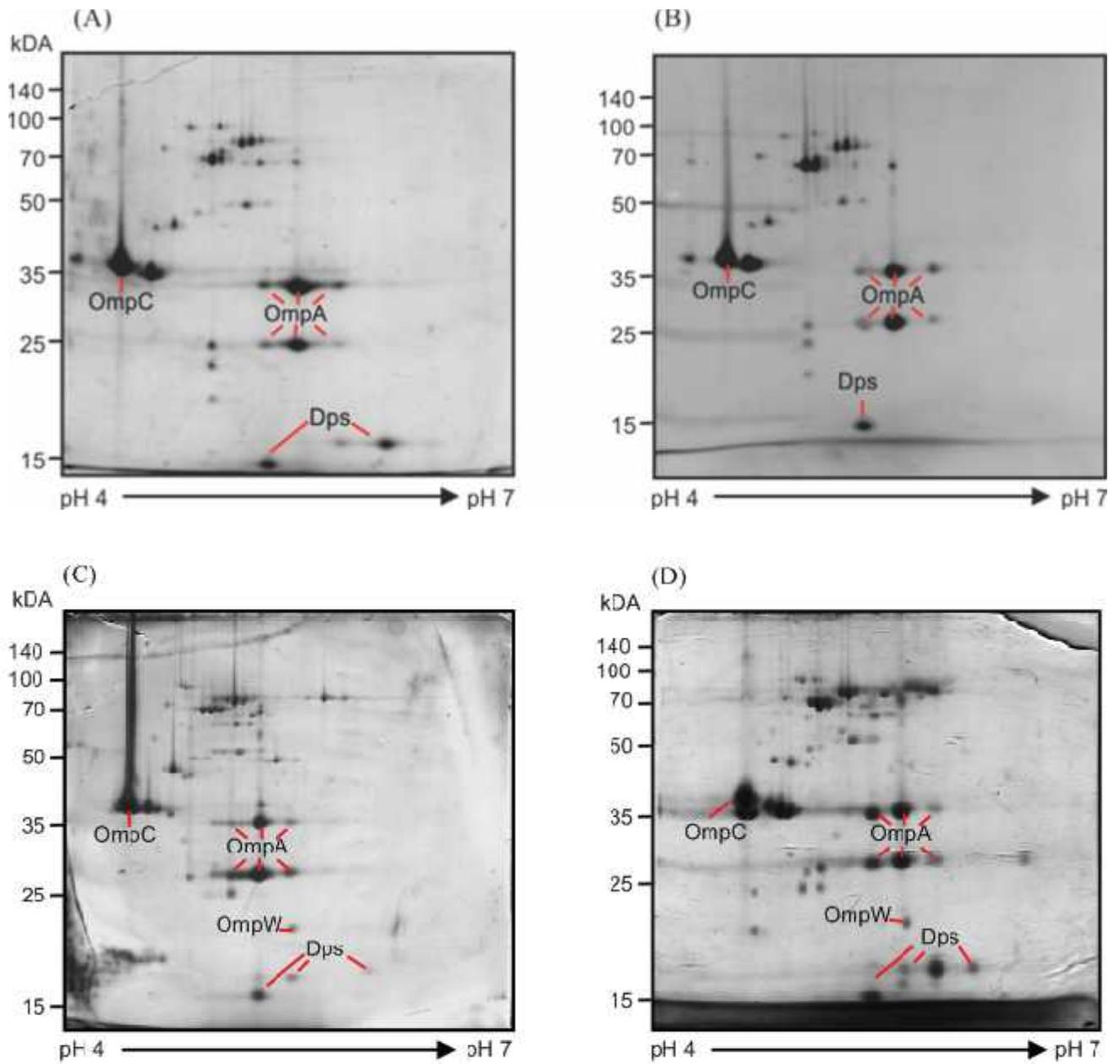
Cepa	Adhesión a Caco-2	Invasión a Caco-2	Sobrevida en Raw264.7
1I06	-	-	-
2C05	+	+	-
4C01	+	+	+
4I01	+	+	+
5C08	+	+	-
5I01	+	+	+
6I01	+	+	-
6I09	+	+	+
6I10	+	+	-
7C02	-	+	-
7C08	+	+	-
9C01	+	+	+
10C01	+	+	-
10I01	+	+	+
18I08	+	+	+
24C01	+	-	-

\*Se destacan en gris las cepas consideradas ECAIs, de acuerdo a los criterios utilizados en este estudio.

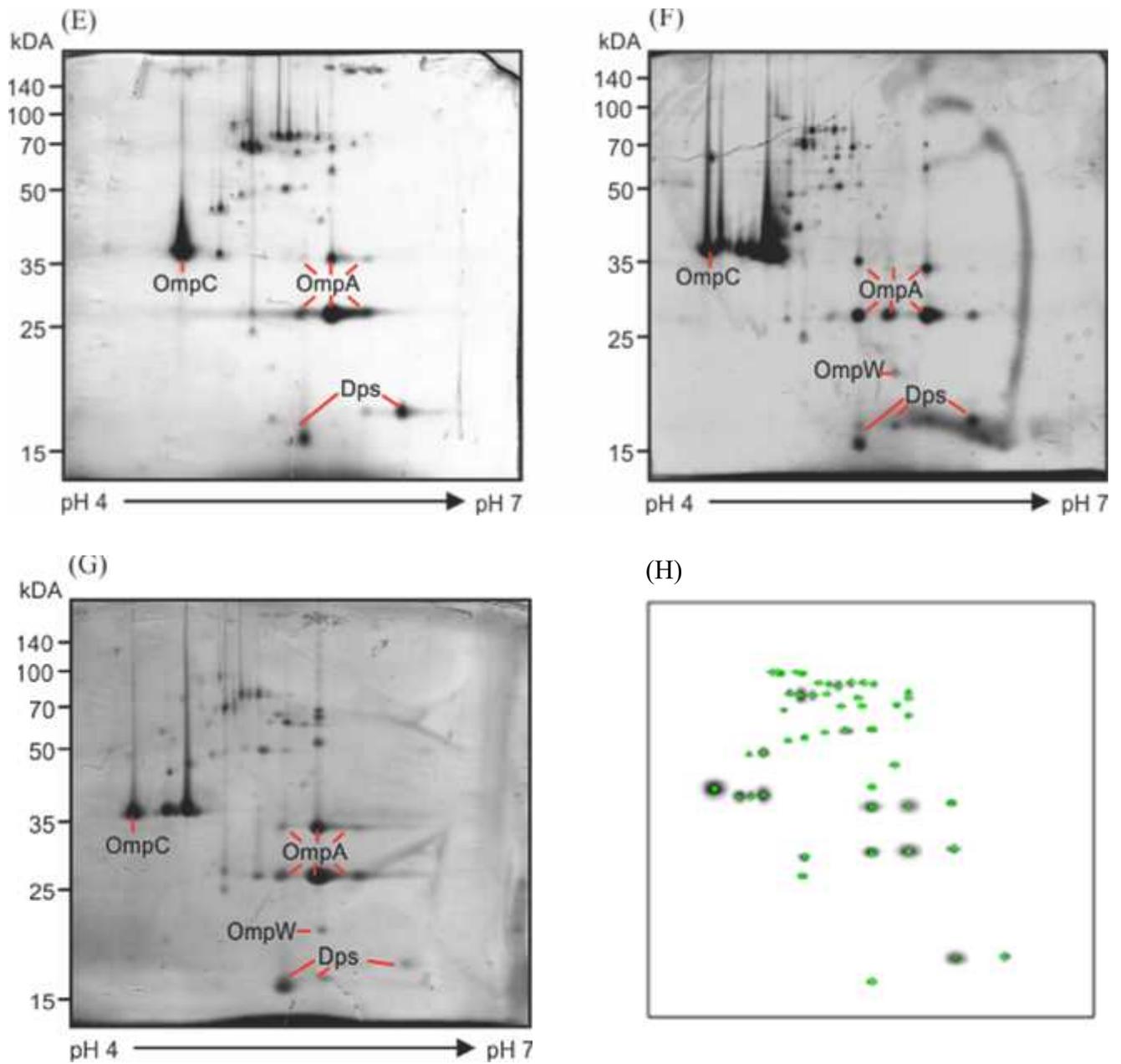
### Comparación de los perfiles de PME de cepas ECAIs y la cepa comensal *E. coli* HS.

Los perfiles de PME de cada cepa caracterizada como ECAI (Tabla 4) fueron obtenidos separando estas proteínas mediante electroforesis bidimensional (2D-PAGE) (**Figura 5**). A partir de sus perfiles de PME se diseñó un perfil electroforético 2D-PAGE virtual (*in silico*) con aquellos *spots* observables en más de un 70% de las cepas ECAIs estudiadas (**Figura 5**). La imagen de este gel virtual se superpuso con la imagen 2D-PAGE de la cepa comensal *E. coli* HS, ya disponible en el laboratorio (Montero y col., 2014). A partir de la superposición de estos geles se seleccionaron 24 *spots* que estaban presentes en más de un 70% de las cepas ECAIs y ausentes en la cepa comensal *E. coli* HS (**Figura 6**). Estos *spots* fueron

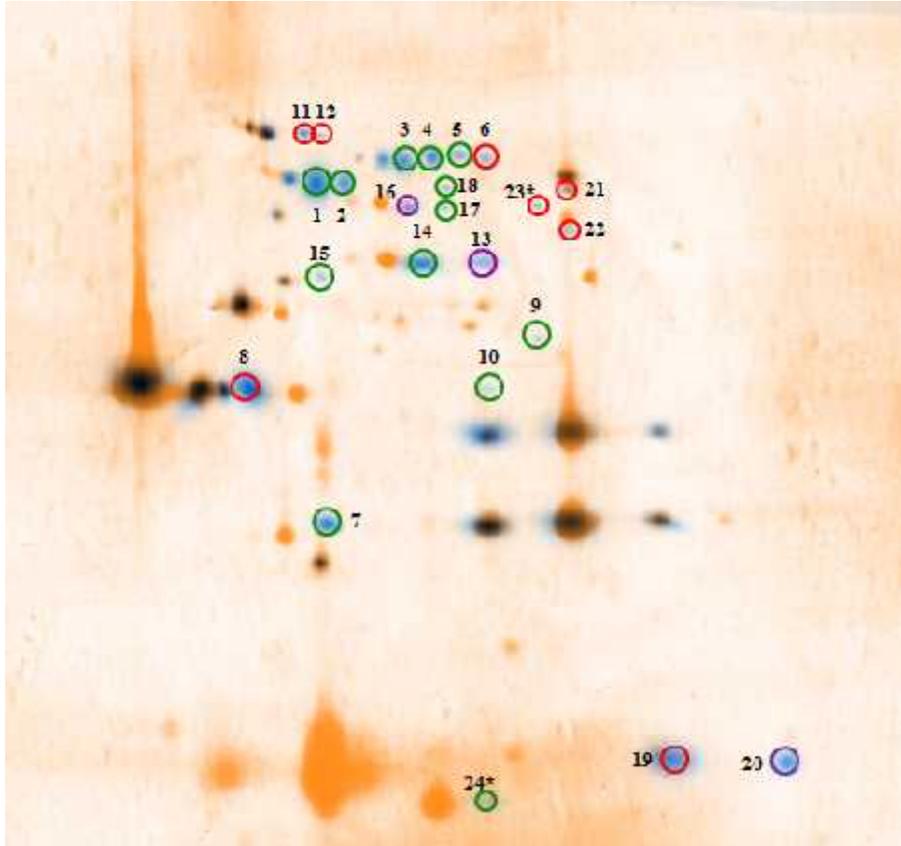
enviados a identificar mediante espectrometría de masa MALDI-TOF/TOF. Los *e-value* de 2 de los 24 *spots* no fueron significativos (*e-values* de 2,5 y 12,5) por lo que fueron descartados, mientras 6 *spots* se correspondieron a las proteínas OmpA, FepA, LptD, BtuB, TolC y Dps, para las cuales se observó más de una isoforma, considerando sólo una de ellas (**Tabla 5**). Finalmente, se caracterizaron 16 *spots*, cada uno de ellos asociado a una proteína bacteriana diferente, y la mayoría de ellas con funciones relacionadas con la captación de hierro y porinas (**Tabla 5**). De acuerdo a la comparación de los geles 2D-PAGEs, estas 16 PMEs tienen una frecuencia de entre un 71 y un 100% en las cepas ECAIs caracterizadas en este estudio (**Tabla 6**) y no estarían presentes en la fracción de membrana externa de la cepa comensal *E. coli* HS. Sin embargo, como ya se mencionó, el gel 2D-PAGE disponible en el laboratorio de la cepa *E. coli* HS fue realizado en condiciones de cultivo diferentes a los de las cepas ECAI, lo que podría afectar los niveles de expresión de ciertas proteínas incluidas las ya mencionadas. Considerando que esta diferencia podría generar errores, se decidió enfocar el estudio sólo en aquellas PMEs cuyos genes codificantes estuviesen ausentes en la cepa comensal *E. coli* HS. Este análisis se realizó mediante bioinformática, incluyendo además otras cepas ECAI y comensales cuyos genomas están disponibles en bases de datos.



**Figura 5.** Perfiles de PME's obtenidos mediante 2D-PAGEs de las cepas ECAI A) 4I01, B) 4C01, C) 5I01, D) 6I09 (Continúa).



**Figura 5. (Continuación)** Perfiles de PME obtenidos mediante 2D-PAGEs de las cepas ECAI E) 9C01, F) 10I01 y G) 18I08. H) Gel virtual diseñado utilizando el software BioNumerics a partir de los *spots* presentes en mas de un 70% de las cepas ECAI caracterizadas. Se utilizó un rango de pH de 4 a 7 y geles de poliacrilamida al 12%. Se indican algunas proteínas cuyo patrón de desplazamiento en 2D-PAGEs es conocido (OmpA, OmpC, OmpW y Dps).



**Figura 6.** Selección de *spots* que están presentes en cepas ECAIs y ausentes en la cepa comensal *E.coli* HS. Se observa la imagen superpuesta del gel virtual de cepas ECAIs con el de la cepa *E. coli* HS. Se observan en azul los *spots* de cepas ECAIs (gel virtual) y en naranja *spots* de las cepa *E.coli* HS. Encerrados en círculos verdes se señalan los *spots* asociados al 100% (7/7), en círculos morados aquellos cuya presencia fue cercana al 86% (6/7) y en rojo aquellos cercanos al 71% (5/7) de presencia en las cepas ECAI. Con asterisco se indican aquellos *spots* que se enviaron a identificar pero arrojaron resultados con *e-values* no significativos. Los análisis de las imágenes de los 2D-PAGE fueron realizados con el software BioNumerics.

**Tabla 5.** Proteínas identificadas mediante MALDI-TOF/TOF correspondientes a aquellos *spots* presentes >70% de las cepas ECAIs y ausentes en la cepa comensal *E. coli* HS.

Función	Nro. <i>Spot</i>	Proteína	Descripción	<i>E-value</i>
Captación de Hierro	1	ChuA	Receptor de grupos hemo/hierro	1,58114E-92
	2	CirA	Receptor de sideróforos, colicinas y microcinas.	1,25594E-36
	3	FitA	Receptor de hierro-ferricromo	1,25594E-79
	4, 5	FepA	Receptor de ferrienterobactina	5E-50 6,29463E-55
	6	Lgc*	Canal regulado por ligando (Potencial receptor de hierro)	3,97164E-21
	18	IrpC	Receptor Yersiniabactina/pesticina	1,58114E-54 3,15479E-36
Porinas	10	OmpT	Proteasa, proteína de membrana externa	6,29463E-44
	8	NmpC	Proteína de membrana externa	3,15479E-77
	21, 22	OmpA	Proteína de membrana externa	7,92447E-61 1,25594E-67
	13	EefC/ NodT	Canal de membrana externa	3,97164E-56
	14, 15	TolC	Proteína de membrana externa	3,15479E-20
Canal específico	16,17	BtuB	Transportador de vitamina B12	3,15479E-17
Respuesta a estrés	19, 20	Dps	Proteína de protección del DNA	9,97631E-72 8,34568 E-60
Otros	11, 12	LptD	Proteína del complejo de ensamblaje del LPS	9,97631E-53 3,15479E-05
	7	Tsx	Receptor de nucleósidos, fago T6 y colicina K	1,58114E-28
	9	EF-Tu	Factor de Elongación Tu	3,15479E-23

\*Abreviación propuesta en este trabajo para mencionar una determinada proteína.

**Tabla 6.** Frecuencia de la presencia de las 16 PMEs identificadas por MALDI-TOF/TOF en las 7 cepas ECAI caracterizadas en este estudio.

Cepas ECAI	PMEs															
	ChuA	CirA	FitA	FepA	LgC	IrpC	OmpT	NmpC	OmpA	EefC/	TolC	BtuB	Dps	LptD	Tsx	EF-Tu
4C01	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+
4I01	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+
5C01	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
6I09	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9C01	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10C01	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
18I08	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Frecuencia (%)</b>	100	100	100	100	71	100	100	71	71	86	100	100	86	71	100	100

### Búsqueda de las PMEs de interés en ECAIs de referencia y *E. coli* comensales depositadas en bases de datos

Las secuencias aminoacídicas de las 16 PMEs identificadas fueron contrastadas mediante BLASTp con la base de datos de proteínas disponible en NCBI, considerando en ella sólo secuencias de cepas ECAIs y *E. coli* comensales (incluida *E. coli* HS). A partir de los resultados de este análisis se seleccionaron 7 proteínas de las 16 identificadas previamente: ChuA, IrpC, NmpC, OmpT, FitA, EefC/NodT y Lgc (**Tabla 7**). Una de las razones para su selección fue la ausencia de secuencias aminoacídicas correspondientes a estas 7 proteínas en *E. coli* HS. Las 9 proteínas restantes si bien no se detectaron en el 2D-PAGE de esta cepa, se

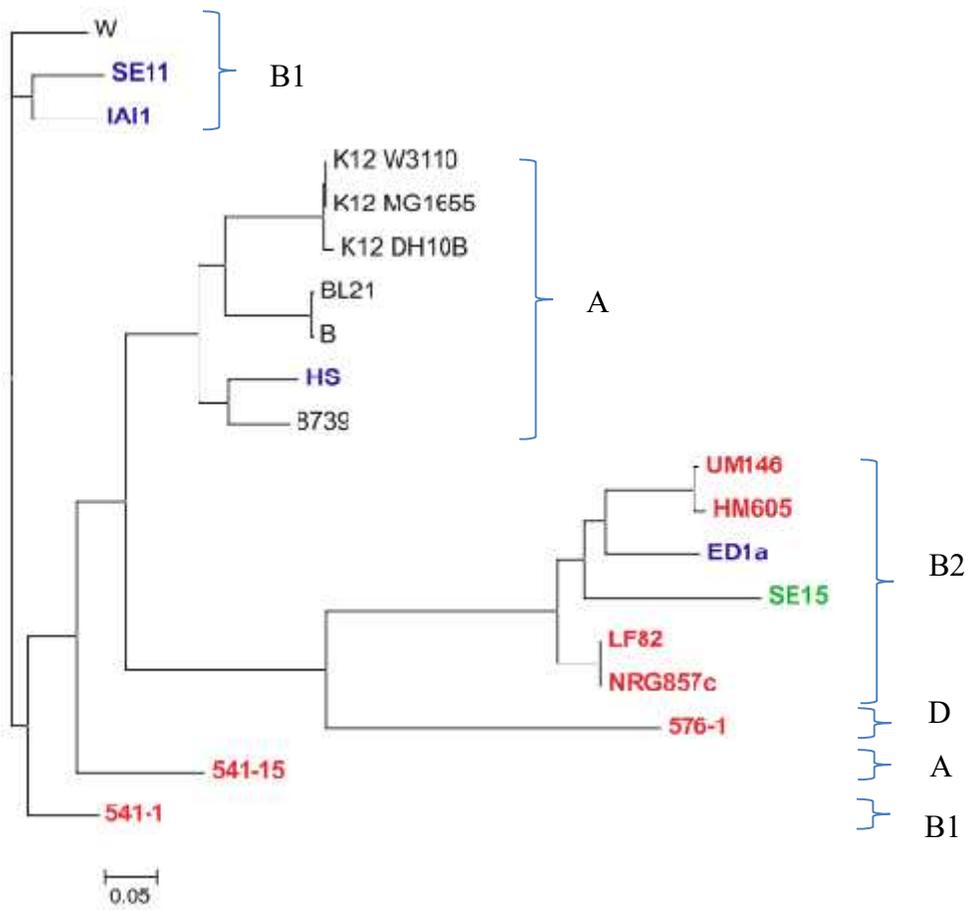
descartaron al encontrarse mediante el análisis bioinformático a nivel genético. Por otra parte, en las cepas ECAIs se observó que 6 de las 7 PMEs (ChuA, IrpC, NmpC, OmpT, FitA y EefC/NodT) son frecuentes en NRG857c, LF82, HM605 y UM146, y están ausentes en 541-1, 541-15 y 576-1, mientras que Lgc estaba presente en representantes de ambos grupos de cepas (UM146, 541-1 y 541-15) (**Tabla 7**). Además, en el caso de las otras cepas comensales, estas proteínas resultaron ser poco frecuentes, salvo en la cepa ED1a, la cual tiene 4 de las 7 proteínas de interés (**Tabla 7**). Sin embargo, al hacer un análisis filogenético de SNPs (**Figura 7**) se observa que las cepas comensales y ECAIs quedan separados en grupos filogenéticos distintos, con excepción de la cepa ED1a. Esta cepa está más relacionada evolutivamente con cepas ECAIs y pertenece al filogrupo B2, a diferencia de gran parte de las cepas comensales de *E. coli* (Bingen y col., 1998). En este grupo también se encuentra la cepa de *E. coli* SE15, la cual es considerada comensal a nivel intestinal pero patógena a nivel extraintestinal (Johnson y col., 2014), lo que lleva a discutir la definición de cepa comensal más adelante. Además, en el árbol filogenético se puede observar que las cepas ECAIs, donde son frecuentes las 6 de las PMEs analizadas, pertenecen al filogrupo B2 y están poco relacionadas filogenéticamente con otras cepas definidas como ECAI, cepas 541-1, 541-15 y 576-1 (**Figura 7**). Se observa que además, entre las cepas ECAI se puede ver que las cepas 541-1 y 541-15 quedan separadas y con una mayor distancia del resto de las cepas ECAIs.

Además, nuestros resultados mostraron que EF-Tu estaba presente en la fracción de PMEs de cepas ECAIs, y ausentes en la cepa comensal *E. coli* HS, aun cuando a nivel genético es esperable que esté en todas las cepas analizadas (**Tabla 7**). Lo anterior es interesante, ya que también se ha detectado la presencia de EF-Tu en la superficie de otros patógenos, aspecto que será discutido en extenso.

**Tabla 7.** Presencia de las 16 PMEs de interés en cepas ECAIs y *E. coli* comensales basado en el análisis de secuencias de sus genomas completos depositados en GenBank mediante BLASTp.

Proteína	Código GenBank	ECAIs						<i>E. coli</i> Comensales						
		LF82	HM605	NRG857c	UM146	541-1	541-15	576-1	%	HS	IAIIa	EDIIa	SEII	%
Receptor de grupos hemo/hierro ChuA	CAP77956.1	+	+	+	+	-	-	+	71,4	-	-	+	-	25
Receptor de sideróforos, colicinas, microcinas CirA	CAP76657.1	+	+	+	+	+	+	-	85,7	+	+	+	+	100
Receptor de hierro-ferricromo, FitA	CAP77503.1	+	+	+	+	-	-	-	57,1	-	-	+	-	25
Receptor de ferrienterobactina FepA	CAP75084.1	+	+	+	+	+	+	+	100	+	+	+	+	100
Receptor de nucleósidos, fago T6 y colicina K	CAP74945.1	+	+	+	+	+	+	+	100	+	+	+	+	100
Proteína de Membrana externa NmpC	CAP75656.1	+	-	+	+	-	-	-	42,8	-	-	-	+	25
Proteína del complejo de ensamblaje del LPS LptD	CAP74626.1	+	+	+	+	+	+	+	100	+	+	+	+	100
Proteína de membrana externa TolC	CAP77509.1	+	+	+	+	+	+	+	100	+	+	+	+	100
Canal de membrana externa EefC/NodT	CAP75839.1	+	+	+	+	-	-	-	57,1	-	-	+	-	25
Transportador de vitamina B12 BtuB	CAP78431.1	+	+	+	+	+	+	+	100	+	+	-	+	80
Receptor Yersiniabactina/pesticina IrpC	CAP76464.1	+	+	+	+	-	+	+	85,7	-	-	+	-	25
Proteasa OmpT	CAP75065.1	+	+	+	+	-	-	-	57,1	-	-	-	+	25
Factor de elongación Tu EF-Tu	CAP77791.1	+	+	+	+	+	+	+	100	+	+	+	+	100
Potencial receptor de hierro Lgc	ADN70802.1	-	-	-	+	+	+	-	42,8	-	-	-	-	0
Proteína asociada a la protección del ADN Dps	CAP75282.1	+	+	+	+	+	+	+	100	+	+	+	+	100
Proteína de membrana externa OmpA	CAP75420.1	+	+	+	+	+	+	+	100	+	+	+	+	100

Se resaltan en gris aquellas proteínas que fueron más frecuentes en cepas ECAI que en cepas comensales de *E.coli*, cuyos genomas están disponibles en bases de datos.



**Figura 7.** Análisis filogenético basado en SNPs de cepas ECAI y cepas de *E. coli* comensales, realizado a partir de los genomas disponibles en bases de datos. Se indican los grupos filogenéticos al que pertenece cada cepa. Además, se destacan con rojo las cepas ECAIs, en azul las cepas comensales de *E. coli* y en verde a *E. coli* SE15. Análisis realizado con CSI phylogeny.

## **Frecuencia de los genes que codifican para las PMEs de interés en una colección de cepas de *E. coli*.**

Se evaluó la presencia de los genes que codifican para las 7 PMEs seleccionadas en una colección de cepas *E. coli*, correspondiente a: 8 cepas comensales (Montero y col., 2014), 7 cepas ECAIs (de este trabajo), y 9 cepas de *E. coli* que de acuerdo a los criterios fenotípicos utilizados en este estudio no fueron consideradas ECAI (no-ECAI).

Los resultados obtenidos mediante PCR presentan algunas diferencias con respecto a lo esperado de acuerdo al análisis de los 2D-PAGEs. Se esperaba que EefC/NodT estuviese en un 86% (6/7) de las cepas ECAI y se encontró en un 71% (5/7), y se esperaba que Lgc estuviese presente en un 71% (5/7) de las cepas y fue detectado sólo en un 42% (3/7) (**Tabla 8**).

Finalmente, sumando este análisis, se pudieron identificar 4 genes que codifican para PMEs que son características de cepas ECAIs y poco frecuentes en cepas de *E. coli* comensales (**Tabla 8**): OmpT, ChuA, EefC/NodT y FitA. Por otra parte, Lgc resultó ser poco frecuente entre las cepas ECAIs evaluadas (3/7), y los genes que codifican para NmpC e IrpC son frecuentes en varias de las cepas comensales analizadas, por lo que fueron descartadas. Además, cabe mencionar que en aquellas cepas no-ECAIs aisladas de pacientes con EC se observó que la frecuencia de estos genes es inferior a un 50%, con excepción de *chuA*, cuya frecuencia es de un 89% (**Tabla 9**). Particularmente, en las cepas 1I06, 2C05, 5C08, y 10C01 se detectó la presencia de sólo uno de los genes evaluados (*chuA* u *ompT*). Por el contrario, en las cepas 6I01 y 24C01, se detectaron todos los genes evaluados, al igual que ocurrió en varias de las cepas caracterizadas como ECAI (**Tabla 8**).

**Tabla 8.** Detección de los genes que codifican para las PME de interés en las 7 cepas ECAI y 8 aislados de *E. coli* comensales mediante PCR.

		FitA	IrpC	OmpT	ChuA	EefC/NodT	NmpC	Lgc
ECAIs	4C01	+	+	+	+	+	-	-
	4I01	+	+	+	+	+	-	-
	5I01	-	+	+	+	-	+	+
	6I09	+	+	+	+	+	+	+
	9C01	+	+	+	+	+	+	+
	10I01	-	+	+	+	-	+	-
	18I08	+	+	+	+	+	+	-
Frecuencia		5/7 (71%)	7/7 (100%)	7/7 (100%)	7/7 (100%)	5/7 (71%)	5/7 (71%)	3/7 (43%)
Cepas comensales de <i>E. coli</i>	Cepa 1	-	-	-	-	-	-	-
	Cepa 2	-	-	-	-	-	-	-
	Cepa 3	+	+	+	+	+	+	-
	Cepa 4	-	-	-	-	-	-	-
	Cepa 5	-	+	-	-	-	+	-
	Cepa 6	-	+	-	-	-	+	-
	Cepa 7	-	+	-	-	-	+	-
	Cepa 8	-	+	-	-	-	+	-
Frecuencia		1/8 (13%)	5/8 (55%)	1/8 (13%)	1/8 (13%)	1/8 (13%)	5/8 (55%)	0/8 (0%)

**Tabla 9.** Detección de los genes que codifican para las 4 PME de interés en 9 cepas no-ECAIs mediante PCR.

		FitA	OmpT	ChuA	EefC/NodT
Cepas no-ECAIs	1I06	-	-	+	-
	2C05	-	-	+	-
	5C08	-	+	-	-
	6I01	+	+	+	+
	6I10	-	+	+	-
	7C02	+	-	+	+
	7C08	+	-	+	+
	10C01	-	-	+	-
	24C01	+	+	+	+
Frecuencia		4/9 (44%)	4/9 (44%)	8/9 (89%)	4/9 (44%)

## DISCUSIÓN

El objetivo de este estudio fue determinar PMEs características de cepas ECAI y ausentes en la cepa comensal *E.coli* HS, verificando además, que los genes que codifican para estas proteínas estuviesen ausentes en cepas comensales de *E. coli*. Las cepas ECAIs se obtuvieron a partir de la caracterización de cepas de *E. coli* provenientes de individuos con EC, utilizando los criterios que definen a este patotipo: i) capacidad de adherir a células epiteliales, ii) invadir células epiteliales, y iii) sobrevivir o replicar en el interior de macrófagos (Darfeuille-Michaud y col., 2004). Gran parte de las cepas de *E. coli* evaluadas (14/16) adhieren e invaden células epiteliales Caco-2 (Figura 4), lo que no es extraño considerando que el método mediante el cual se obtuvieron favorece el aislamiento de bacterias invasivas (De la Fuente y col., 2014). Sin embargo, sólo 7/16 de estas cepas sobreviven en el interior de macrófagos murinos RAW 264.7 (Tabla 3). El criterio normalmente establecido para considerar que una cepa ECAI sobrevive o replica en el interior de macrófagos es que a las 24 h post antibiótico se recupere desde el interior de los macrófagos una cantidad igual o mayor de bacterias que a 1 h post antibiótico (Glasser y col., 2001; Conte y col., 2014). No obstante, en los macrófagos RAW 264.7 las cepas ECAIs utilizadas como control positivo, NRG857c y HM605, exhibieron valores inferiores a lo señalado, de modo que se establecieron los porcentajes de sobrevivencia de estas cepas como valor límite (De la Fuente y col., 2014). Si bien este método fue suficiente para identificar 7 cepas de *E. coli* que sobreviven en el interior de RAW 264.7, pudiera haber diferencias si el ensayo se realiza en otras líneas celulares de macrófagos donde las cepas descartadas (que adhieren e invaden células epiteliales) podrían exhibir porcentajes mayores a los observados en RAW 264.7. Con base en lo anterior, solo las cepas 4C01, 4I01, 5I01, 6I09, 9C01, 10I01 y 18I08 fueron consideradas ECAI, ya que además

de sobrevivir en macrófagos RAW 264.7 de acuerdo a los límites señalados, tienen la capacidad de adherir e invadir células epiteliales.

Las PMEs representativas de estas 7 cepas ECAIs se identificaron a partir de la comparación de un 2D-PAGE virtual, en el cual estaban presentes los *spots* característicos de los perfiles de PMEs de cada cepa, versus el gel de la cepa comensal *E. coli* HS, disponible en el laboratorio (Montero y col., 2014). Tras la comparación de estos geles, se seleccionaron 24 *spots*, los cuales se enviaron a espectrometría de masa MALDI-TOF/TOF, logrando identificar 16 proteínas que estaban presentes en más del 70% de las cepas ECAIs y posiblemente ausentes en la cepa *E. coli* HS. Cabe mencionar que el 2D-PAGE de la cepa *E. coli* HS fue obtenido a partir de un cultivo realizado en condiciones distintas a los de las cepas ECAIs (LB sin sales biliares). Esta diferencia en los medios de cultivo puede tener como consecuencia que algunos genes no se expresen o lo hagan en un nivel insuficiente como para que las proteínas sintetizadas sean detectadas mediante un 2D-PAGE, alterando la comparación de los geles. También hay que tener en cuenta que la identificación de proteínas mediante MALDI-TOF/TOF se realiza comparando las masas de un conjunto de péptidos (obtenidos a partir de la digestión de la proteína blanco) con masas teóricas derivadas de base de datos de proteínas, no es un método de secuenciación como tal, por lo que tiene cierto grado de error (Mann y col., 2001). Considerando lo anterior, fue necesario corroborar la información obtenida mediante este análisis comparativo, utilizando para ello análisis bioinformáticos y detección mediante PCR de los genes que codifican para estas PMEs.

El posterior análisis bioinformático permitió seleccionar 7 de las 16 proteínas identificadas: ChuA, IrpC, NmpC, OmpT, FitA, Lgc y EefC/NodT. Estas proteínas se seleccionaron porque los genes que las codifican resultaron ser frecuentes en un grupo particular de ECAIs, están ausentes en *E. coli* HS y son poco frecuentes en otras cepas

comensales de *E.coli*, cuyos genomas están disponibles en bases de datos (Tabla 7). Es importante hacer notar que a diferencia de lo propuesto en la hipótesis, estas PMEs (con excepción de Lgc) no son características de todas las ECAIs, sin embargo se asocian a un grupo particular de estas cepas (LF82, NRG857c, HM605 y UM146), las cuales están relacionadas filogenéticamente y pertenecen al filogrupo B2 (Figura 7). Cabe destacar que se ha observado que las cepas de *E. coli* pertenecientes al filogrupo B2 y D son altamente prevalentes en individuos con enfermedades inflamatorias intestinales (Kotlowski y col., 2007), y además, como ya se mencionó anteriormente, se asocian con una mayor virulencia de las cepas ExPEC (Bingen y col., 1998; Picard y col., 1999; Johnson y Stell, 2000). Además, se encontró que los genes que codifican para estas PMEs resultaron ser poco frecuentes en cepas comensales de *E. coli*, y no totalmente ausentes como se esperaba. En este contexto, destaca la cepa considerada comensal, *E. coli* ED1a, en la cual se encontraron 4/7 proteínas evaluadas. Sin embargo, el análisis filogenético realizado, muestra que esta cepa es mucho más cercana filogenéticamente a cepas ECAIs, que a otras cepas comensales, perteneciendo al filogrupo B2. En este grupo filogenético también se encuentra la cepa *E. coli* SE15 (Figura 7), la cual fue aislada desde un individuo sano, e inicialmente, definida como cepa comensal perteneciente al filogrupo B2 (Toh y col., 2010). Sin embargo, esta cepa resultó ser virulenta en un modelo de sepsis murina, matando a 6 de 10 ratones evaluados (Johnson y col., 2014), de modo que si bien a nivel intestinal no causa daño y se comporta como comensal en un individuo sano, si podría ser considerada una ExPEC y causar daño en individuos con alteraciones de su inmunidad innata como ocurre en pacientes con EC, por cuanto no es de extrañar la presencia de genes asociados con virulencia en cepas comensales de individuos sanos. Esto lleva a cuestionar la forma de definir una cepa “comensal”, ya que en general se trata de cepas aisladas de heces de individuos sanos (sin cuadros de diarrea), sin embargo, comúnmente no se considera la

posibilidad de que se trate de un patógeno extraintestinal. Más aún, se ha reportado que las cepas ExPEC utilizan como reservorio la microbiota intestinal, teniendo una prevalencia en aislados fecales de alrededor del 10% (Erjavec y Žgur-Bertok, 2015). Con base en lo anterior, se sugiere que la idea inicial de encontrar proteínas características de ECAIs y totalmente ausentes en cepas de *E. coli* comensales era un tanto ambiciosa, considerando que alguna de las cepas así definidas, podrían tener genes asociados con patogenicidad, y actuar como comensales solo a nivel intestinal.

Posteriormente, considerando que hay pocos genomas de cepas de *E. coli* comensales disponibles en bases de datos (HS, ED1a, SE11 e IAI1), se caracterizó mediante PCR la presencia de los genes que codifican para las 7 PMES de interés, en un colección de cepas de *E. coli* disponibles en el laboratorio. El resultado de esta caracterización permitió observar que 4 PMEs están ampliamente distribuidas entre las cepas de ECAI: ChuA, OmpT, FitA y EefC/NodT, y que los genes que codifican para estas proteínas resultaron ser poco frecuentes en la colección cepas de *E. coli* comensales (Tabla 7). Por el contrario, Lgc se observó con escasa frecuencia entre las cepas de ECAI, pudiendo ser parte de mecanismos asociados a cepas particulares y no una característica ampliamente difundida en este patotipo. A su vez, IrpC y NmpC están ampliamente distribuidos en cepas ECAIs, pero también estaban presentes en varias de las cepas comensales (lo que no implica necesariamente su síntesis proteica). Por otra parte, cabe mencionar que las pequeñas diferencias observadas entre los 2D-PAGEs y los resultados obtenidos mediante PCR en cuanto a la frecuencia de Lgc y EefC/NodT en ECAIs, pudieron darse principalmente por errores propios de la técnica de comparación de los geles bidimensionales, como por ej., la presencia de *spots* con un perfil electroforético muy similar.

Además de la alta frecuencia de estas 4 proteínas en las cepas ECAI (ChuA, OmpT, FitA y EefC/NodT), existen otras razones que las hacen un blanco de estudio interesante,

principalmente en lo que se refiere a su posible relación con la patogenicidad de este patotipo. Por una parte, se ha visto que el gen *chuA* está ampliamente distribuido entre las cepas patógenas de *E. coli* y comparte una alta homología con el gen *shuA* descrito en *Shigella dysenteriae* tipo 1. Este gen codifica para una PME responsable de la captación de complejos hierro-hemo (Mills y Payne, 1997; Torres y Payne, 1997) y su posible participación en patogenicidad se ha evaluado en varias cepas bacterianas. Se ha reportado que contribuye con la infección renal producida por cepas UPEC en un modelo murino de pielonefritis (Torres y col., 2001), sin embargo, parece no ser esencial para la invasión o multiplicación de *S. dysenteriae* dentro de células Henle (Mills y Payne, 1997) y no contribuye a la bacteriemia de cepas NMEC (Nègre y col., 2004), sugiriéndose que su presencia sólo se relaciona con otorgar una ventaja adaptativa en estas cepas. En el caso de las cepas ECAI se ha visto que existe una correlación entre la presencia de ChuA y la capacidad de sobrevivir en macrófagos, por lo que se ha postulado su posible participación en tal proceso (Dogan y col., 2014). Además, de acuerdo a datos obtenidos en el laboratorio, ChuA es una proteína inmunogénica, ya que es reconocida por el suero de pacientes con EC (datos no publicados), por lo que es interesante evaluar a futuro si la inmunización con esta proteína genera protección contra cepas ECAIs.

Por otra parte, OmpT es una proteasa miembro de la familia de las omptinas, las cuales tienen funciones variadas y se ha reportado que muchas de ellas tienen un importante rol en patogénesis bacteriana (Kukkonen y Korhonen, 2004). Entre otras cosas, se ha reportado que OmpT degrada la protamina, péptido antimicrobiano presente en espermatozoides de diferentes especies animales (Stumpe y col., 1998). En cepas de *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC) y enteropatogénicas (EPEC) se ha visto que OmpT contribuye a la degradación del péptido antimicrobiano LL-37 promoviendo la sobrevivencia de estas cepas (Thomassin y col., 2012). Por su parte en UPEC, OmpT está asociado con el proceso de adhesión, invasión e inflamación,

umentando los niveles de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-8 (He y col., 2015). En la cepa NMEC *E. coli* K1 se ha reportado que OmpT media la adhesión de manera independiente de su actividad proteolítica (Wan y col., 2014). Además, se ha visto que la alteración de la expresión del gen *ompT* en EHEC afecta la formación, tamaño, composición lipídica y proteica de las vesículas de membrana externa secretadas (Premjani y col., 2014). Teniendo todo esto en consideración, es que se proyecta evaluar más adelante el rol de OmpT en los mecanismos de patogenicidad descritos para las cepas ECAIs.

Del EefC/NodT (el canal de membrana externa) y FitA (potencial receptor de hierro-ferricromo) la información es más reducida. El canal de membrana externa, tiene un 100% de identidad con un canal de la familia NodT o con EefC. NodT descrito en *Rhizobium leguminosarum* se relaciona con una familia de PMEs que incluyen TolC, PrtF, CyaE y AprF, involucrados en la secreción de proteínas (Rivilla y col., 1995). Mientras que EefC, se ha descrito como parte de un sistema de eflujo asociado con la resistencia a quinolonas (Fricke y col., 2008). Para FitA no se ha encontrado información bibliográfica, salvo que posee dominios proteicos correspondientes a un receptor de hierro ferricromo, por lo que en el caso de ambos se necesitan realizar ensayos para esclarecer su función y posteriormente evaluar si esto tiene alguna relación con las características propias de las cepas ECAI.

Finalmente, a estas 4 proteínas se suma el factor de elongación EF-Tu. Tal como se mencionó anteriormente, no se realizó la detección mediante PCR del gen que codifica esta proteína en la colección de cepas comensales de *E. coli* porque se trata de un gen esencial y hasta ahora se conoce que todo organismo bacteriano lo posee. EF-Tu se ha descrito tradicionalmente como una proteína citoplasmática que participa en el proceso de elongación durante la biosíntesis proteica (Arai y col., 1972). Sin embargo, a pesar de no poseer un péptido señal ni dominios transmembrana que permitan su translocación a la membrana externa, se ha

identificado en la superficie de diferentes patógenos. La primera vez que se detectó EF-Tu en la membrana externa bacteriana fue en cepas mutantes de *E. coli* resistentes a estreptomicina. En este trabajo se postula que EF-Tu llegaría hasta la membrana externa a través de sitios de adhesión entre esta membrana y la membrana citoplasmática, sin embargo esto no se comprobó, e incluso la existencia de esos sitios de adhesión es controversial (Dombou y col., 1981, Ruiz y col., 2006), y hasta la fecha no se tiene claro como ocurre este proceso. Entre las bacterias en las que se ha detectado EF-Tu en la superficie se encuentran: *Staphylococcus aureus*, en donde se detectó junto a otras proteínas que estarían relacionadas con la formación de *biofilms* (Brady y col., 2006); *Pseudomonas aeruginosa*, donde está involucrado con la evasión del sistema del complemento (Kunert y col., 2007); *Burkholderia pseudomallei*, donde se ha detectado en vesículas de membrana externa y es inmunogénica durante una infección en un modelo murino (Nieves y col., 2010); y *Acinetobacter baumannii* y *Mycobacterium avium* Subsp. *Paratuberculosis*, donde tendría un rol como adhesina, uniéndose a fibronectina (Dallo y col., 2012; Viale y col., 2014). Además, en un estudio realizado en el laboratorio se confirmó mediante inmuno-electromicroscopia que la presencia de EF-Tu en la membrana externa de la cepa *E. coli* HS es escasa en comparación a la cepa patógena STEC EDL933 (O157;H7) (datos no publicados), en la cual también se detectó la presencia de EF-Tu en la membrana externa (Montero y col., 2014). Es por esto que también se proyecta evaluar a futuro si EF-Tu tiene algún rol en la patogenia de ECAI, principalmente en el proceso de adhesión celular o unión a fibronectina.

Finalmente, cabe mencionar que además de evaluar el rol que pudiese tener cada una de estas proteínas en los mecanismos ya mencionados que se asocian con ECAI, creemos que los genes *E* que codifican para las PMES identificadas (ChuA, EefC/NodT, OmpT y FitA) podrían

servir como marcadores para realizar una caracterización preliminar de la presencia de ECAI en aislados desde biopsias en individuos con enfermedad de Crohn.

## REFERENCIAS

**Ahmed, N.;** Dobrindt, U.; Hacker, J.; Hasnain, S.E. “Genomic fluidity and pathogenic bacteria: applications in diagnostics, epidemiology and intervention”. *Nat. Rev. Microbiol.* 6: 387–394, 2008.

**Arai, K.I.;** Kawakita, M.; Kaziro, Y. “Studies on polypeptide elongation factors from *Escherichia coli* II. Purification of factors Tu-guanosine diphosphate, Ts, and Tu-Ts, and crystallization of Tu-guanosine diphosphate and Tu-Ts”. *J. Biol. Chem.* 247(21): 7029-7037, 1972.

**Barnich, N.;** Boudeau, J.; Claret, L.; Darfeuille-Michaud, A. “Regulatory and functional co-operation of flagella and type 1 pili in adhesive and invasive abilities of AIEC strain LF82 isolated from a patient with Crohn's disease”. *Mol. microbiol.* 48(3): 781-794, 2003.

**Barnich, N.;** Glasser, A.; Bardot, O.; Darfeuille-michaud, A. “HtrA stress protein is involved in intramacrophagic replication of adherent and invasive *Escherichia coli* strain LF82 isolated from a patient with Crohn's disease”. *Infect. Immun.* 73(2): 712-721, 2005.

**Barnich, N.;** Carvalho, F.; Glasser, A.; Darcha, C.; Jantscheff, P.; Allez, M.; Peeters, H.; Bommelaer, G.; Desreumaux, P.; Colombel, J.; Darfeuille-Michaud, A. “CEACAM6 acts as a receptor for adherent-invasive *E. coli*, supporting ileal mucosa colonization in Crohn disease”. *J. Clin. Invest.* 117: 1566–1574, 2007.

**Baumgart, M.;** Dogan, B.; Rishniw, M.; Weitzman, G.; Bosworth, B.; Yantiss, R.; Orsi, R.; Wiedmann, M.; McDonough, P.; Kim, S.; Berg, D.; Schukken, Y.; Scherl, E.; Simpson, K. “Culture independent analysis of ileal mucosa reveals a selective increase in invasive *Escherichia coli* of novel phylogeny relative to depletion of Clostridiales in Crohn's disease involving the ileum”. *ISME J.* 1(5): 403-418, 2007.

**Benjamin, P.;** Federman, M.; Wanke, C.A. “Characterization of an invasive phenotype associated with enteroaggregative *Escherichia coli*”. *Infect. Immun.* 63: 3417–3421, 1995.

**Bingen, E.;** Picard, B.; Brahim, N.; Mathy, S.; Desjardins, P.; Elion, J.; Denamur, E. “Phylogenetic analysis of *Escherichia coli* strains causing neonatal meningitis suggests horizontal gene transfer from a predominant pool of highly virulent B2 group strain”. *J. Infect. Dis.* 177: 642-650, 1998.

**Boudeau, J.;** Glasser, A.; Masseret, E.; Joly, B.; Darfeuille-Michaud, A. “Invasive Ability of an *Escherichia coli* Strain Isolated from the Ileal Mucosa of a Patient with Crohn’s Disease”. *Infect. Immun.* 67(9): 4499-4509, 1999.

**Boudeau, J.;** Barnich, N.; Darfeuille-Michaud, A. “Type 1 pili-mediated adherence of *Escherichia coli* strain LF82 isolated from Crohn’s disease is involved in bacterial invasion of intestinal epithelial cells”. *Mol. Microbiol.* 39: 1272–1284, 2001.

**Boyer, H.W. y Roulland-Dussoix, D.** “A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*”. *J. Mol. Biol.* 41: 459–472, 1969.

**Bradford, M. M.** (1976) “A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding”. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254.

**Brady, R.A.;** Leid, J.G.; Camper, A.K.; Costerton, J.W.; Shirtliff, M.E. “Identification of *Staphylococcus aureus* proteins recognized by the antibody-mediated immune response to a biofilm infection”. *Infect. Immun.* 74(6), 3415-3426, 2006.

**Bringer, M.;** Barnich, N.; Glasser, A.; Bardot, O.; Darfeuille-Michaud A. “HtrA stress protein is involved in intramacrophagic replication of adherent and invasive *Escherichia coli* strain LF82 isolated from a patient with Crohn’s disease”. *Infect Immun.* 73(2): 712–721, 2005.

**Bringer, M.;** Rolhion, N.; Glasser, A.; Darfeuille-Michaud, A. “The oxidoreductase DsbA plays a key role in the ability of the Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* strain LF82 to resist macrophage killing”. *J. Bacteriol.*, 189: 4860-4871, 2007.

**Carvalho, F.A.;** Barnich, N.; Sauvanet, P.; Darcha, C.; Gelot, A.; Darfeuille-michaud, A. “Crohn’s disease-associated *Escherichia coli* LF82 aggravates colitis in injured mouse colon via signaling by Flagellin”. *Inflamm. Bowel Dis.* 14(8): 1051–1060, 2008.

**Chassaing B.;** Rolhion, N.; de Vallée, A.; Salim, S.; Prorok-Hamon, M., Neut, C.; Campbell, B.; Söderholm, J.; Hugot, J.; Colombel, J.; Darfeuille-Michaud, A. “Crohn disease associated adherent-invasive *E. coli* bacteria target mouse and human Peyer patches via long polar fimbriae”. *J. Clin. Invest.*, 121: 966-975, 2011.

**Chassaing, B.;** Etienne-mesmin, L.; Bonnet, R.; Darfeuille-michaud, A. “Bile salts induce long polar fimbriae expression favouring Crohn’s disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* interaction with Peyer’s patches”. *Environ. Microbiol.*, 15: 355–371, 2012.

**Cieza, R.J.;** Hu, J.; Ross, B.N.; Sbrana, E.; Torres, A.G. “The IbeA invasin of adherent-invasive *Escherichia coli* mediates interaction with intestinal epithelia and macrophages”. *Infect. Immun.* 83(5): 1904-1918, 2015.

**Claret, L.;** Miquel, S.; Vieille, N.; Ryjenkov, D.A.; Gomelsky, M.; Darfeuille-Michaud, A. “The flagellar sigma factor FliA regulates adhesion and invasion of Crohn disease-associated

*Escherichia coli* via a cyclic dimeric GMP-dependent pathway”. *J. Biol. Chem.* 282(46): 33275-33283, 2007.

**Clarke, D.;** Chaudhuri, R.; Martin, H.; Campbell, B.; Rhodes, J.; Constantinidou, C.; Pallen, M.; Loman, N.; Cunningham, A.; Browning, D.; Henderson, I. “Complete genome sequence of the Crohn’s disease-associated adherent–invasive *Escherichia coli* strain HM605”. *J. Bacteriol.* 193(17): 4540, 2011.

**Clermont, O.;** Bonacorsi, S.; Bingen, E. “Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group”. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(10): 4555-4558, 2000.

**Conte, M.P.;** Longhi, C.; Marazzato, M.; Conte, A.L.; Aleandri, M.; Lepanto, M.S.; Zagaglia, C.; Nicoletti, M.; Aloï, M.; Totino, V.; Palamara, A.T.; Schippa, S. “Adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC) in pediatric Crohn’s disease patients: phenotypic and genetic pathogenic features”. *BMC Res. Notes* 7(1): 748, 2014.

**Croxen, M.A.;** Law, R.J.; Scholz, R.; Keeney, K.M.; Wlodarska, M.; Finlay, B.B. “Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*”. *Clin. Microbiol. Rev.* 26: 822–880, 2013.

**Dallo, S.F.;** Zhang, B.; Denno, J.; Hong, S.; Tsai, A.; Haskins, W.; Weitao, T. “Association of *Acinetobacter baumannii* EF-Tu with cell surface, outer membrane vesicles, and fibronectin”. *Scientific World J.* 2012.

**Darfeuille-Michaud, A.;** Neut, C.; Barnich, N.; Lederman, E.; Di Martino, P.; Desreumaux, P.; Gambiez, L.; Joly, B.; Cortot, A.; Colombel, J. “Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease”. *Gastroenterol.* 115:1405–1413, 1998.

**Darfeuille-Michaud, A.;** Boudeau, J.; Bulois, P.; Neut, C.; Glasser, A.L., Barnich, N. “High prevalence of adherent–invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn’s disease”. *Gastroenterol.* 127(2): 412–421, 2004.

**De la Fuente, M.;** Franchi, L.; Araya, D.; Díaz-Jiménez, D.; Olivares, M.; Álvarez-Lobos, M.; Golenbock, D.; González, M.J.; López-Kostner, F.; Quera, R.; Núñez, G.; Vidal, R.; Hermoso, M.A. “*Escherichia coli* isolates from inflammatory bowel diseases patients survive in macrophages and activate NLRP3 inflammasome”. *Int. J. Med. Microbiol.* 304: 384-392, 2014.

**Dobrindt, U.;** Agerer, F.; Michaelis, K.; Janka, A.; Buchrieser, C.; Samuelson, M.; Svanborg, C.; Gottschalk, G.; Karch, H.; Hacker, J. “Analysis of genome plasticity in pathogenic and commensal *Escherichia coli* isolates by use of DNA arrays”. *J. Bacteriol.* 185(6): 1831-1840, 2003.

**Dogan, B.;** Klaessig, S.; Rishniw, M.; Goldstein, R.E.; Klaessig, S.; McDonough, P.L.; Berg, D.E. “Adherent and invasive *Escherichia coli* are associated with persistent bovine mastitis”. *Vet. Microbiol.* 116(4): 270–282, 2006.

**Dogan, B.;** Suzuki, H.; Herlekar, D.; Sartor, R.B.; Campbell, B.J.; Roberts, C.L.; Stewart, K.; Scherl, E.; Araz, Y.; Bitar, P.; Lefébure, T.; Chandler, B.; Schukken, Y.; Stanhope, M.; Simpson, K.W. “Inflammation-associated adherent-invasive *Escherichia coli* are enriched in pathways for use of propanediol and iron and M-cell translocation”. *Inflamm. Bowel Dis.* 20(11): 1919-1932, 2014.

**Dombou, M.;** Bhide, S.V; Mizushima, S. “Appearance of Elongation Factor Tu in the Outer Membrane of Sucrose-Dependent Spectinomycin-Resistant Mutants of *Escherichia coli*”. *FEBS J.* 113(2), 397-403, 1981.

**Donnenberg, M.S.;** Donohue-Rolfe, A.; Keusch, G.T. “Epithelial cell invasion: an overlooked property of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) associated with the EPEC adherence factor”. *J. Infect. Dis.* 160: 452–459, 1989.

**Dupont, H.L.;** Formal, S.B.; Hornick, R.B.; Snyder, M.J.; Libonati, J.P.; Sheahan, D.G.; Labrec, E.H.; Kalas, J.P. “Pathogenesis of *Escherichia coli* diarrhea”. *N. Engl. J. Med.* 285: 1-9, 1971.

**Elliott, T.R.;** Rayment, N.B.; Hudspith, B.; Hands, R.E.; Taylor, K.; Parkes, G.C.; Prescott, N.J.; Petrovska, L.; Hermon-Taylor, J.; Brostoff, J.; Boussioutas, A.; Mathew, C.G.; Bustin, S.A.; Sanderson, J.D. “Lamina propria macrophage phenotypes in relation to *Escherichia coli* in Crohn's disease”. *BMC Gastroenterol.* Jul 3; 15-75, 2015.

**Elsinghorst E.A. y Kopecko D.J.** “Molecular cloning of epithelial cell invasion determinants from enterotoxigenic *Escherichia coli*”. *Infect. Immun.* 60: 2409–2417, 1992.

**Erjavec, M. S., & Žgur-Bertok, D.** “Virulence potential for extraintestinal infections among commensal *Escherichia coli* isolated from healthy humans—the Trojan horse within our gut”. *FEMS Microbial. Lett.* 362(5): fnu061, 2015.

**Fricke, W.F.;** Wright, M.S.; Lindell, A.H.; Harkins, D.M.; Baker-Austin, C.; Ravel, J.; Stepanauskas, R. “Insights into the environmental resistance gene pool from the genome sequence of the multidrug-resistant environmental isolate *Escherichia coli* SMS-3-5”. *J. Bacteriol.* 190(20): 6779-6794, 2008.

**Gibold, L.;** Garenaux, E.; Dalmaso, G.; Gallucci, C.; Cia, D.; Mottet-Auselo, B.; Faïs, T.; Darfeuille-Michaud, A.; Nguyen, H.; Barnich, N.; Bonnet, R.; Delmas, J. “The Vat-AIEC

protease promotes crossing of the intestinal mucus layer by Crohn's disease-associated *Escherichia coli*". *Cell. Microbiol.* 1462-5822, 2015.

**Glasser, A.;** Boudeau, J.; Barnich, N.; Perruchot, M.; Colombel, J.; Darfeuille-Michaud, A. "Adherent invasive *Escherichia coli* strains from patients with Crohn's disease survive and replicate within macrophages without inducing host cell death". *Infect. Immun.* 69(9): 5529-5537, 2001.

**He, X.L.;** Wang, Q.; Peng, L.; Qu, Y.R.; Puthiyakunnon, S.; Liu, X.L.; Hui, C.Y.; Boddu, S.; Cao, H.; Huang, S.H. "Role of uropathogenic *Escherichia coli* outer membrane protein T in pathogenesis of urinary tract infection". *Pathog. Dis.* 73(3), 2015.

**Hendrickson, B.;** Gokhale, R.; Cho, J. "Clinical aspects and pathophysiology of inflammatory bowel disease". *Clin. Microbiol. Rev.* 15(1): 79-94, 2002.

**Hudault, S.;** Guignot, J.; y Servin, A.L. "*Escherichia coli* strains colonising the gastrointestinal tract protect germfree mice against *Salmonella typhimurium* infection". *Gut.* 49: 47–55, 2001.

**Johnson, J.R. y Stell, A.L.** "Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise". *J. Infect. Dis.* 181: 261–272, 2000.

**Johnson, J.R.;** Clermont, O.; Johnston, B.; Clabots, C.; Tchesnokova, V.; Sokurenko, E.; Junka, A.; Maczynskaf, B.; Denamur, E. "Rapid and specific detection, molecular epidemiology, and experimental virulence of the O16 subgroup within *Escherichia coli* sequence type 131". *J. Clin. Microbiol.* 52(5): 1358-1365, 2014.

**Jouve, M.;** Garcia, M.I.; Courcoux, P.; Labigne, A.; Gounon, P.; Le Bouguenec, C. “Adhesion to and invasion of HeLa cells by pathogenic *Escherichia coli* carrying the *afa-3* gene cluster are mediated by the AfaE and AfaD proteins, respectively”. *Infect. Immun.* 65: 4082–4089, 1998.

**Lai, X.H.;** Xu, J.G.; Melgar, S.; Uhlin, B.E. “An apoptotic response by J774 macrophage cells is common upon infection with diarrheagenic *Escherichia coli*”. *FEMS Microbiol. Lett.* 172: 9–34, 1999.

**Koebnik, R.;** Locher, P.; Van Gelder, P. “Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell”. *Mol. Microbiol.* 37: 239–253, 2000.

**Kotlowski, R.;** Bernstein, C.N.; Sepehri, S.; Krause, D.O. “High prevalence of *Escherichia coli* belonging to the B2+D phylogenetic group in inflammatory bowel disease”. *Gut* 56(5): 669–675 (2007).

**Kukkonen, M. y Korhonen, T.K.** “The ompT family of enterobacterial surface proteases/adhesins: from housekeeping in *Escherichia coli* to systemic spread of *Yersinia pestis*”. *Int. J. Med. Microbiol.* 294(1): 7–14, 2004.

**Kunert, A.;** Losse, J.; Gruszyn, C.; Hühn, M.; Kaendler, K.; Mikkat, S.; Volke, D.; Moellmann, U. (2007). “Immune evasion of the human pathogen *Pseudomonas aeruginosa*: elongation factor Tuf is a factor H and plasminogen binding protein”. *J. Immunol.* 179(5): 2979–2988, 2007.

**Lebba, V.;** Conte, M.P.; Lepanto, M.S.; Di Nardo, G.; Santangelo, F.; Aloï, M.; Schippa, S. “Microevolution in *fimH* gene of mucosa-associated *Escherichia coli* strains isolated from pediatric patients with inflammatory bowel disease”. *Infect. Immun.* 80(4): 1408–1417, 2012.

**Lin, J.;** Huang, S.; Zhang, Q. “Outer membrane proteins: key players for bacterial adaptation in host niches”. *Microb. Infect.* 4(3): 325-331, 2002.

**Manchester, A.C.;** Hill, S.; Sabatino, B.; Armentano, R.; Carroll, M.; Kessler, B.; Miller, M.; Dogan, B.; McDonough, S.P.; Simpson, K.W. “Association between granulomatous colitis in French Bulldogs and invasive *Escherichia coli* and response to fluoroquinolone antimicrobials”. *J. Vet. Intern. Med.* 27(1): 56–61, 2013.

**Mann, M.;** Hendrickson, R.C.; Pandey, A. “Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry”. *Annu. Rev. Biochem.* 70(1): 437-473, 2001.

**Martinez-Medina, M.;** Aldeguer, X.; Lopez-Siles, M.; González-Huix, F.; López-Oliu, C.; Dahbi, G.; Blanco, J.; Blanco, J.; Garcia-Gil, L.; Darfeuille-Michaud, A. “Molecular diversity of *Escherichia coli* in the human gut: new ecological evidence supporting the role of adherent-invasive *E. coli* (AIEC) in Crohn's disease”. *Inflamm. Bowel Dis.* 15(6): 872-882, 2009a.

**Martinez-Medina, M.;** Naves, P.; Blanco, J.; Aldeguer, X.; Blanco, J.E.; Blanco, M.; Ponte, C.; Soriano, F.; Darfeuille-Michaud, A.; Garcia-Gil, L.J. “Biofilm formation as a novel phenotypic feature of adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC)”. *BMC Microbiol.* 9, 202, 2009b.

**Martinez-Medina, M. y Garcia-Gil, L.J.** “*Escherichia coli* in chronic inflammatory bowel diseases: An update on adherent invasive *Escherichia coli* pathogenicity”. *World J. Gastrointest. Pathophysiol.* 5(3): 213, 2014.

**McPhee, J.B.;** Small, C.L.; Reid-Yu, S.A.; Brannon, J.R.; Le Moual, H.; Coombes, B.K. “Host defense peptide resistance contributes to colonization and maximal intestinal pathology by

Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli*". *Infect. Immun.* 82(8): 3383-3393, 2014.

**Meconi, S.;** Vercellone A.; Levillain, F.; Payre, B.; Al Saati, T.; Capilla, F.; Desreumaux, P.; Darfeuille-Michaud, A.; Altare, F. "Adherent-invasive *Escherichia coli* isolated from Crohn's disease patients induce granulomas in vitro". *Cell Microbiol.* 9: 1252–1261, 2007.

**Mills, M. y Payne, S.M.** "Identification of *shuA*, the gene encoding the heme receptor of *Shigella dysenteriae*, and analysis of invasion and intracellular multiplication of a *shuA* mutant". *Infect. Immun.* 65(12): 5358-5363, 1997.

**Miquel, S.;** Peyretailade, E.; Claret, L.; De Vallée, A.; Dossat, C.; Vacherie, B.; Zineb, E.; Segurens, B.; Barbe, V.; Sauvanet, P.; Neut, C.; Colombel, J.; Medigue, C.; Mojica, F.; Peyret, P.; Bonnet, R.; Darfeuille-Michaud, A. "Complete genome sequence of Crohn's disease-associated adherent-invasive *E. coli* strain LF82". *PloS one.* 5(9): e12714, 2010.

**Montero, D.;** Orellana, P.; Gutiérrez, D.; Araya, D.; Salazar, J.C.; Prado, V.; Oñate, A.; del Canto, F.; Vidal, R. "Immunoproteomic analysis to identify Shiga toxin–producing *Escherichia coli* outer membrane proteins expressed during human infection". *Infect Immun.* 82(11): 4767-77, 2014.

**Nash, J.H.;** Villegas, A.; Kropinski, A.; Aguilar-Valenzuela, R.; Konczy, P.; Mascarenhas, M.; Ziebell, K.; Torres, A.; Karmali, M.; Coombes, K. "Genome sequence of adherent–invasive *Escherichia coli* and comparative genomic analysis with other *E. coli* pathotypes". *BMC Genomics* 11: 667, 2010.

**Nataro, J.P. y Kaper, J.B.** "Diarrheagenic *Escherichia coli*". *Clin. Microbiol. Rev.* 11: 142–201, 1998.

**Nègre, V.L.;** Bonacorsi, S.; Schubert, S.; Bidet, P.; Nassif, X.; Bingen, E. “The siderophore receptor IroN, but not the high-pathogenicity island or the hemin receptor ChuA, contributes to the bacteremic step of *Escherichia coli* neonatal meningitis”. *Infect. Immun.* 72(2): 1216-1220, 2004.

**Nguyen, H.T.;** Dalmasso, G.; Müller, S.; Carrière, J.; Seibold, F.; Darfeuille–Michaud, A. “Crohn’s Disease–Associated Adherent Invasive *Escherichia coli* Modulate Levels of microRNAs in Intestinal Epithelial Cells to Reduce Autophagy”. *Gastroenterol.* 146(2), 508-519, 2014.

**Nieves, W.;** Heang, J.; Asakrah, S.; Höner zu Bentrup, K.; Roy, C. J.; Morici, L.A. “Immunospecific responses to bacterial elongation factor Tu during *Burkholderia* infection and immunization”. *PLoS One.* 5(12), e14361, 2010.

**Oelschlaeger, T.A.;** Barrett, T.J.; Kopecko D.J. “Some structures and processes of human epithelial cells involved in uptake of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 strains”. *Infect. Immun.* 62: 5142–5150, 1994.

**Picard, B.,** Garcia, J.S.; Gouriou, S.; Duriez, P.; Brahimi, N.; Bingen, E.; Elion, J.; Denamur, E. “The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection”. *Infect. Immun.* 67:546–553, 1999.

**Podolsky, D.** “Inflammatory bowel disease”. *N. Engl. J. Med.* 347: 417-429, 2002.

**Premjani, V.;** Tilley, D.; Gruenheid, S.; Le Moual, H.; Samis, J.A. “Enterohemorrhagic *Escherichia coli* OmpT regulates outer membrane vesicle biogenesis”. *FEMS Microbiol. Lett.* 355(2): 185-192, 2014.

**Rivas, L.;** Fegan, N.; Dykes, G.A. “Expression and putative roles in attachment of outer membrane proteins of *Escherichia coli* O157 from planktonic and sessile culture”. *Foodborne Pathog. Dis.* 5: 155–164, 2008.

**Rivilla, R.;** Sutton, J.M.; Downie, J.A. “*Rhizobium leguminosarum* NodT is related to a family of outer-membrane transport proteins that includes TolC, PrtF, CyaE and AprF”. *Gene* 161(1): 27-31, 1995.

**Rolhion, N.;** Barnich, N.; Claret, L.; Darfeuille-Michaud, A. “Strong decrease in invasive ability and outer membrane vesicle release in Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* strain LF82 with the *yfgL* gene deleted”. *J. Bacteriol.* 187(7): 2286-2296, 2005.

**Rolhion, N.;** Carvalho, F.; Darfeuille-Michaud, A. “OmpC and the sigma(E) regulatory pathway are involved in adhesion and invasion of the Crohn's disease-associated *Escherichia coli* strain LF82”. *Mol. Microbiol.* 63:1684–1700, 2007.

**Rolhion, N.;** Barnich, N.; Bringer, M.; Glasser, A.; Ranc, J.; Hébuterne, X.; Hofman, P.; Darfeuille-Michaud, A. “Abnormally expressed ER stress response chaperone Gp96 in CD favours adherent-invasive *Escherichia coli* invasion”. *Gut*, 59(10): 1355-62, 2010.

**Rosa, A.;** Vieira, M.; Tibana, A.; Gomes, T.; Andrade, J. “Interactions of *Escherichia coli* of non-EPEC serogroups that carry *eae* and lack EAF and *stx* gene sequences with undifferentiated and differentiated intestinal human Caco-2 cells”. *FEMS Microbiol. Lett.* 200: 117-122, 2001.

**Ruiz, N.;** Kahne, D.; Silhavy, T.J. “Advances in understanding bacterial outer-membrane biogenesis”. *Nat. Rev. Microbiol.* 4(1): 57-66, 2006.

**Russo, T.A. y Johnson, J.R.** “Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC”. *J. Infect. Dis.* 181: 1753–1754, 2000.

**Ryan, P.;** Kelly, R.; Lee, G.; Path, F.; Collins, J.; O’Sullivan, G.; O’Connell, J. “Bacterial DNA within Granulomas of Patients with Crohn’s Disease-detection by Laser Capture Microdissection and PCR”. *Am. J. Gastroenterol.* 99: 1539–43, 2004.

**Sasaki, M.;** Sitaraman, S.; Babbin, B.; Gerner-Smidt, P.; Ribot, E.M.; Garrett, N.; Alpern, J.; Akyildiz, A.; Theiss, A.L.; Nusrat, A.; Klapproth, M.A. “Invasive *Escherichia coli* are a feature of Crohn's disease”. *Lab. Invest.* 87(10): 1042-1054, 2007.

**Satsangi, J.;** Silverberg, M.; Vermeire, S.; Colombel J. “The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications”. *Gut.* 55(6): 749-753, 2006.

**Smith, E.J.;** Thompson, A.P.; O’Driscoll, A.; Clarke, D.J. “Pathogenesis of adherent-invasive *Escherichia coli*”. *Future microbiol.* 8(10): 1289-1300, 2013.

**Stumpe, S.;** Schmid, R.; Stephens, D.L.; Georgiou, G.; Bakker, E.P. “Identification of OmpT as the protease that hydrolyzes the antimicrobial peptide protamine before it enters growing cells of *Escherichia coli*”. *J. Bacteriol.* 180(15): 4002-4006, 1998.

**Tabaqchali, S.;** O’donoghue, D.P.; Bettelheim, K.A. “*Escherichia coli* antibodies in patients with inflammatory bowel disease”. *Gut,* 19(2): 108-113, 1978.

**Tenaillon, O.;** Skurnik, D.; Picard, B.; Denamur, E. “The population genetics of commensal *Escherichia coli*”. *Nat. Rev. Microbiol.* 8(3): 207-217, 2010.

**Thomassin, J.L.;** Brannon, J.R.; Gibbs, B.F.; Gruenheid, S.; Le Moual, H. “OmpT outer membrane proteases of enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* contribute differently to the degradation of human LL-37”. *Infect. Immun.* 80(2): 483-492, 2012.

**Toh, H.;** Oshima, K.; Toyoda, A.; Ogura, Y.; Ooka, T.; Sasamoto, H.; Park, S.; Iyoda, S.; Kurokawa, K.; Morita, H.; Itoh, K.; Taylor, T.D.; Hayashi, T.; Hattori, M. “Complete genome sequence of the wild-type commensal *Escherichia coli* strain SE15, belonging to phylogenetic group B2”. *J. Bacteriol.* 192: 1165–1166, 2010.

**Torres, A.G. y Payne, S. M.** “Haem iron-transport system in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7”. *Mol. Microbiol.* 23(4): 825-833, 1997.

**Torres, A.G.;** Redford, P.; Welch, R.A.; Payne, S.M. “TonB-dependent systems of uropathogenic *Escherichia coli*: aerobactin and heme transport and TonB are required for virulence in the mouse”. *Infect. Immun.* 69(10), 6179-6185, 2001.

**Venkatesan, M.M.;** Buysse, J.M.; Kopecko, D.J. “Use of *Shigella flexneri ipaC* and *ipaH* gene sequences for the general identification of *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli*”. *J. Clin. Microbiol.* 27:2687-2691, 1989.

**Viale, M.N.;** Echeverria-Valencia, G.; Romasanta, P.; Mon, M.L.; Fernandez, M.; Malchiodi, E.; Santangelo, M.D. “Description of a novel adhesin of *Mycobacterium avium* Subsp. *paratuberculosis*”. *Biomed Res. Int.* 2014.

**Vollaard, E.J. y Clasener, H.A.** “Colonization resistance”. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38: 409–414, 1994.

**Wan, L.;** Guo, Y.; Hui, C.Y.; Liu, X.L.; Zhang, W.B.; Cao, H.; Cao, H. “The surface protease OmpT serves as *Escherichia coli* K1 adhesion in binding to human brain micro vascular endothelial cells”. *Pak. J. Pharm. Sci.* 27(3 Suppl): 617-624, 2014.

**Wine, E.;** Ossa J.C.; Gray-Owen, S.D.; Sherman, P.M. “Adherent-invasive *Escherichia coli*, strain LF82 disrupts apical junctional complexes in polarized epithelia”. *BMC Microbiol.* 9:180, 2009.

**Ying, T.;** Wang, H.; Li, M.; Wang, J.; Wang, J.; Shi, Z.; Feng, E.; Liu, X.; Su, G.; Wei, K.; Zhang, X.; Huang, P.; Huang, L. “Immunoproteomics of outer membrane proteins and extracellular proteins of *Shigella flexneri* 2a 2457T”. *Proteomics*, 5(18): 4777-4793, 2005.