

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL.
ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
POSGRADO EN BIOMEDICINA Y BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR

Búsqueda de marcadores de islas de patogenicidad en cepas de *Aeromonas* spp. de origen clínico y ambiental.



TESIS
QUE COMO UNO DE LOS REQUISITOS
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA
Y BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR
P R E S E N T A:
QBP. JUAN MANUEL RUÍZ RUÍZ

MÉXICO D. F.

FEBRERO DE 2010

PRESENTACIÓN

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Bacteriología Médica del Departamento de Microbiología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional; bajo la asesoría de la Dra. en C. Graciela Castro Escarpulli y de la Dra. en C. Ma. Guadalupe Aguilera Arreola.

Como parte del proyecto titulado: Biopelícula, *quórum sensing*, isla de patogenicidad, resistencia antimicrobiana en *Aeromonas* spp. Claves SIP 20090729 y 201000252.

Dentro del programa: Diagnóstico Bacteriológico y Molecular de Bacterias de Interés Médico. Claves SIP 948 y 1079.

Durante la realización de la maestría el alumno fue apoyado por:

Beca de maestría del Sistema Nacional de Becas del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) durante el periodo Enero de 2008 a Diciembre de 2009 con el número de registro: 216240.

Beca de maestría del Programa de Formación de Investigadores (PIFI) de la Secretaría de Investigación y Posgrado (SIP), durante el periodo Enero de 2008 a Diciembre de 2009 en los proyectos SIP: 20080522 y 20091187.

DEDICATORIA.

Sin temor a equivocarme, esta es la sección más difícil de escribir en una tesis sin importar el grado académico al cual aspire el alumno; ya que los recuerdos y sentimientos se agolpan de repente en la mente y es complejo plasmar en el papel lo que el corazón grita; la pasión se desborda y es inevitable no sentir un nudo en la garganta o una lágrima correr por la mejilla.

Esta vez quiero dedicar mi trabajo y mi esfuerzo a los maestros que he tenido en mis 25 años de trayectoria en este mundo, como lo menciona el Dhamapadha o las enseñanzas de Buda:

*Aquel que no daña a ningún ser, débil o fuerte,
Aquel que no mata ni es causa de muerte; a ése
Le llamaremos Maestro.*

*Aquel que ama entre los que odian, aquel que
Vive en paz entre los violentos, aquel que no codicia
Nada entre los ambiciosos; a ése le llamaremos Maestro.*

*Aquel que solo tiene para todos palabras gentiles,
Instructivas y veraces, que en su hablar no ofende a nadie;
A ése le llamaremos Maestro.*

Mi principal maestro: Dios Padre al cual le debo todo cuanto tengo, soy y seré. A su hijo Jesús que nos enseña a morir con los brazos abiertos y a perdonar y amar al prójimo.

A mi mamá María que me formó y deformó... y a pesar de mi edad me seguirá viendo como su niño; aunque no sea el consentido. JEJEJE. A mi padre con su ejemplo en la distancia y el exilio. A mi abuela Cache que me crió y a la cual le destrocé los nervios y el hígado con mis juegos y travesuras infantiles que hasta la fecha sigo haciendo. A la memoria de mis abuelos, que los quiero y nunca olvido en especial a mi Abue Alfredo sustituto paterno y ejemplo de rectitud y cariño. A mi tía Yola por ser la tercera mamá al mando de la nave. A mis hermanos Diana y José, con los que juego, peleo, discuto y comparto todos los momentos; algún día nos tocará a nosotros tomar las riendas de una familia y confié en que los valores que nos inculcaron nos sacaran adelante, confié mucho en ustedes y los quiero mucho.

A mis directoras de tesis, la Dra. Graciela y la Dra. Guadalupe que dieron posada a un desconocido que un día cayó en su laboratorio y que quedó cautivado con la grandeza y calidez humana de estas dos honorables personas. Sé que nunca borraré de su mente los "agravios" cometidos hacia su persona, pero créanme cuando les digo que es un placer convivir y conocer nuevos lugares con ustedes. Gracias por sus enseñanzas y dirección en este trabajo, sin embargo, no les daré su abrazo, porque así siempre tendré un pretexto para regresar al laboratorio.

A los maestros del laboratorio de Bacteriología Médica como la Dra. Silvia Giono, el Dr. Ramón Arteaga o el maestro Tomás cuyo apoyo incondicional y desinteresado y su crítica constructiva enriquecen a todos los alumnos que tenemos el privilegio de trabajar en el laboratorio. Honor a quien honor merece... muchas gracias.

A los sinodales que integran el comité tutorial: Dr. Rogelio Maldonado, Dr. Jorge Cerna, Dr. Miguel Ángel Ibañez y Dr. Ernesto Alarcón gracias por su valioso tiempo dedicado a la revisión, el análisis y la crítica de este trabajo. Su valiosa experiencia enriquece el trabajo de los alumnos de posgrado.

A los compañeros y amigos del laboratorio como Faby, Cecy, Carlos, Erika, Cinthia, Ingrid (mi alumna que espero no se deforme con mis vicios; soy un buen ejemplo de lo que no es un buen alumno), Lina Colombia, Arturo Sama (proveedor de anime y de libros intensos, gracias por las horas de platica constructiva), Rosita Chan y un largo pero no despectivo etcétera que abarca a 50 alumnos que en algún momento llegamos a compartir el espacio. Gracias por hacer llevadero y amena mi estancia y sobre todo gracias por los convivios y pachangas. Aunque no lo crean, los extrañaré. Finalmente quiero mencionar a Chayo; la obligada comensal de las tardes, gurú de las secreciones, apoyo en los congresos y proveedora de artículos y canciones; no tengo palabras para agradecerte el apoyo incondicional y sobre todo... gracias por engordar conmigo.

A los amigos de la licenciatura que aún perduran, como Irma Hermione, alias la niña fago. Gracias por las escapadas y momentos de ocio. Dios te bendiga.

A los nuevos amigos y compañeros del posgrado como el tocayo veracruzano Juan Alberto, Andrés, Esteban, Lina, Irma E. y José Luis M a pesar de su trauma y rencor contra los que estamos reclusos en un nivel inferior; llegará el momento en el que podré igualarte en estatus, influencias y conocimiento, más nunca en estatura. JAJAJA.

A JD, EA y EC que siempre están detrás de mi decisiones y operaciones. GRACIAS, de todo corazón. Ni el dinero de todo el mundo alcanza para pagarles todo lo que me han dado; que Dios los bendiga y espero que no claudiquen es sus propósitos. Y recuerden: Dale, dale, dale... a tu buen compadre....

A mis tíos, primos y familiares que en ocasiones me ven como el científico loco o el bicho raro de la familia. Gracias por el apoyo incondicional sobre todo en los momentos difíciles por los cuales hemos atravesado. Nunca debemos desanimarnos por las lágrimas, el miedo o el rencor... todo es posible si Dios está con nosotros; recuerden que llegará el día en el que la felicidad será eterna.

Agradezco también a las personitas que en este momento omití y les ruego disculpen esta descortesía y pésima memoria.

Espero que disfruten este trabajo tanto como yo lo hice durante 2 años.

CONTENIDO

	Página
Índice de cuadros.	xi
Índice de figuras.	xiii
Resumen.	xv
Abstract.	xvi
1. INTRODUCCIÓN.	1
1.1. Características del género <i>Aeromonas</i> .	1
1.1.1. Microbiología.	1
1.1.2. Clasificación.	2
1.1.3. Ecología.	2
1.1.4. Patogenicidad.	3
1.1.5. Vías de transmisión.	3
1.1.6. Epidemiología.	4
1.1.7. Mecanismos de patogenicidad.	5
1.2. Sistemas de Secreción.	6
1.2.1. Sistema de secreción tipo IV (SSTIV).	7
1.3. Islas genómicas.	11
1.3.1. Islas de patogenicidad.	12
1.3.2. Detección de las islas de patogenicidad.	15
1.3.3. Isla de Patogenicidad <i>cag</i> -PAI de <i>Helicobacter pylori</i> .	17
1.3.3.1. Gen <i>cagA</i> .	18
1.3.3.2. Gen <i>cagE</i> .	19
2. ANTECEDENTES.	20
3. JUSTIFICACIÓN.	24
4. HIPÓTESIS.	25
5. OBJETIVO GENERAL.	26
5.1. Objetivos Particulares.	26
6. MATERIAL Y MÉTODOS.	27
6.1. Descongelación, recuperación y pruebas de viabilidad y pureza de las cepas de <i>Aeromonas</i> spp.	28

6.2.	Conservación de las cepas.	28
6.3.	Extracción de DNA.	28
6.3.1.	InstaGene Matrix.	28
6.3.2.	Método de choque térmico.	29
6.4.	Estandarización de la PCR para la amplificación del gen <i>cagE</i> .	30
6.4.1.	Mezcla de reacción.	30
6.4.2.	Condiciones de amplificación.	31
6.4.3.	PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).	31
6.4.4.	Electroforesis de los productos de PCR.	31
6.4.5.	Purificación y secuenciación de los productos de PCR.	32
6.5.	Estandarización de la PCR para la amplificación del gen <i>tfc16</i> de <i>H. influenzae</i> en cepas de <i>Aeromonas</i> spp.	33
6.5.1.	Mezcla de reacción.	33
6.5.2.	Condiciones de amplificación.	34
6.5.3.	PCR.	34
6.5.4.	Electroforesis de los productos de PCR.	34
6.5.5.	Secuenciación de los productos de PCR.	34
6.6.	Estandarización de la PCR para la amplificación de los genes <i>virB2</i> , <i>virB9</i> y <i>virB11</i> .	35
6.6.1.	Diseño de los iniciadores.	35
6.6.2.	Mezcla de reacción.	35
6.6.3.	Condiciones de amplificación.	36
6.6.4.	PCR.	36
6.6.5.	Electroforesis de los productos de PCR.	36
6.6.6.	Secuenciación de los productos de PCR.	36
6.7.	Estudio Bioinformático de marcadores de islas de patogenicidad	37
6.7.1.	Análisis bioinformático de la proteína CagE.	37
6.7.2.	Búsqueda de marcadores de islas de patogenicidad mediante el programa IslandPath.	38
7.	RESULTADOS.	39
7.1.	Recuperación de las Cepas de <i>Aeromonas</i> spp.	39

7.2. Extracción de DNA.	41
7.3. Determinación del gen <i>cagE</i> de <i>H. pylori</i> .	41
7.3.1. Estandarización de la PCR en cepas de <i>Aeromonas</i> spp.	41
7.3.2. PCR para la amplificación del gen <i>cagE</i> .	44
7.3.3. Secuenciación de los productos de PCR.	46
7.4. Determinación del gen <i>tfc16</i> de <i>H. influenzae</i> en cepas de <i>Aeromonas</i> spp.	47
7.4.1. Estandarización de la PCR en cepas de <i>Aeromonas</i> spp.	47
7.4.2. PCR para la amplificación del gen <i>tfc16</i> de <i>H. influenzae</i> en cepas de <i>Aeromonas</i> spp.	50
7.4.3. Secuenciación de los productos de PCR.	51
7.5. Determinación de los genes <i>virB2</i> , <i>virB9</i> y <i>virB11</i> del sistema de secreción tipo IV.	52
7.5.1. Diseño de los iniciadores.	52
7.5.2. Estandarización de la PCR para los genes <i>virB</i> .	54
7.5.3. PCR para la amplificación de los genes <i>virB</i> en cepas de <i>Aeromonas</i> spp.	58
7.5.4. Secuenciación de los productos de PCR.	60
7.6. Análisis global de resultados.	62
7.7. Estudios bioinformáticos.	63
7.7.1. Estudio bioinformático de la proteína CagE.	63
7.7.2. Búsqueda de marcadores de islas de patogenicidad mediante el programa IslandPath.	66
8. DISCUSIÓN.	70
9. CONCLUSIONES.	80
10. PERSPECTIVAS.	81
11. PRODUCTOS OBTENIDOS.	82
12. REFERENCIAS.	83
13. APÉNDICE.	92

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadros	Páginas
1. Islas de patogenicidad presentes en bacterias Gram negativas.	15
2. Iniciadores empleados para la amplificación del gen <i>cagE</i> de <i>H. pylori</i> en <i>Aeromonas</i> spp.	30
3. Mezcla de reacción para la PCR del gen <i>cagE</i> .	30
4. Condiciones de amplificación para la PCR del gen <i>cagE</i> .	31
5. Iniciadores empleado para la amplificación del gen <i>tfc16</i> en <i>Aeromonas</i> spp.	33
6. Mezcla de reacción para la PCR del gen <i>tfc16</i> en <i>Aeromonas</i> spp.	33
7. Condiciones de amplificación para la PCR del gen <i>tfc16</i> en <i>Aeromonas</i> spp.	34
8. Mezcla de reacción para la PCR de los genes <i>virB2</i> , <i>virB9</i> y <i>virB11</i> .	35
9. Condiciones de amplificación para la PCR de los genes <i>virB2</i> , <i>virB9</i> y <i>virB11</i> .	36
10. Identidad y origen de aislamiento de las cepas de <i>Aeromonas</i> spp. recuperadas y empleadas en el presente trabajo.	40
11. Cepas de referencia de <i>Aeromonas</i> spp. recuperadas.	40
12. Mezcla de reacción estandarizada para la amplificación del gen <i>cagE</i> en cepas de <i>Aeromonas</i> spp.	43
13. Condiciones de amplificación estandarizadas para la PCR del gen <i>cagE</i> .	44
14. Secuencia del gen <i>cagE</i> de la cepa <i>A. bestiarum</i> AhA4.	47
15. Condiciones de amplificación estandarizadas para la PCR del gen <i>tfc16</i> en cepas de <i>Aeromonas</i> spp.	49
16. Secuencia del gen <i>tfc16</i> de la cepa de <i>A. bestiarum</i> AhA4.	52
17. Mezcla de reacción estandarizada para la PCR múltiple de los genes <i>virB2</i> , <i>virB9</i> y <i>virB11</i> .	58
18. Condiciones de amplificación estandarizadas para la PCR múltiple de los genes <i>virB2</i> , <i>virB9</i> y <i>virB11</i> .	58
19. Secuencias de los genes <i>virB</i> amplificados por PCR en la cepa <i>A. caviae</i> 5.2.	61

20. Distribución de los genes marcadores de PAI's determinados en este estudio.	63
21. Microorganismos incluidos y longitud de la secuencia de su proteína homóloga a CagE.	64
22. Puntuaciones obtenidas para los alineamientos de proteínas.	65
23. Análisis del genóforo de <i>H. pylori</i> ATCC 700392 el programa IslandPath.	67
24. Análisis del genóforo de <i>A. hydrophila</i> ATCC 7966 por el programa IslandPath.	68
25. Análisis de genóforo de <i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> A449 por el programa IslandPath.	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Páginas
1. Sistemas de secreción de microorganismos Gram negativos.	7
2. Componentes del sistema de secreción tipo IV (SSTIV) de <i>Helicobacter pylori</i> .	9
3. Componentes ensamblados de sistema de secreción tipo IV (SSTIV).	10
4. Isla de patogenicidad <i>cag</i> -PAI de <i>Helicobacter pylori</i> .	17
5. Sistemas de secreción tipo IV de diversos microorganismos.	18
6. Diagrama de la organización genética del SSTIII de <i>A. hydrophila</i> , <i>Y. pestis</i> y <i>P. aeruginosa</i> .	20
7. Comparación del operón AcTra contra otros SSTIV homólogos.	22
8. Esquema general de trabajo	27
9. Morfología colonial de las cepas de <i>A. hydrophila</i> sobre gelosa casoy después de 24 h de incubación a 37°C.	39
10. Electroferograma del DNA genómico de las cepas de <i>Aeromonas</i> spp.	41
11. Electroferograma de la amplificación del gen <i>cagE</i> (350 pb) bajo las condiciones estandarizadas por González en 2006.	42
12. Electroferograma de la estandarización de la PCR del gen <i>cagE</i> (350 pb).	43
13. Electroferograma de amplificación del gen <i>cagE</i> (350 pb) mediante PCR, en cepas ambientales de <i>Aeromonas</i> spp. (Extracción por InstaGene Matrix).	45
14. Electroferograma de amplificación del gen <i>cagE</i> (350 pb) mediante PCR, en cepas ambientales de <i>Aeromonas</i> spp. (Extracción por choque térmico).	45
15. Presencia del gen <i>cagE</i> de <i>H. pylori</i> en cepas de origen clínico y ambiental de <i>Aeromonas</i> spp.	46
16. Electroferograma de los productos de PCR del gen <i>cagE</i> purificados.	46
17. Alineamiento obtenido en el programa BLASTn de la secuencia del gen <i>cagE</i> en la cepa <i>A. bestiarum</i> AhA4 con la base de datos del Gene Bank.	47
18. Electroferograma de la estandarización de la PCR del gen <i>tfc16</i> (277 pb) en cepas de <i>Aeromonas</i> spp.	48
19. Estandarización de temperatura del gen <i>tfc16</i> en cepas de <i>Aeromonas</i> spp.	49
20. Electroferograma de amplificación del gen <i>tfc16</i> de 277 pb en cepas ambientales de <i>Aeromonas</i> spp.	50
21. Presencia del gen <i>tfc16</i> de <i>H.influenzae</i> homólogo a <i>virB4</i> en cepas de origen clínico y ambiental de <i>Aeromonas</i> spp.	51

22. Electroferograma de los productos de PCR del gen <i>tf16</i> purificados	51
23. Alineamiento obtenido en el programa BLASTn de la secuencia del gen <i>tfc16</i> en la cepa <i>A. bestiarum</i> AhA4 con la base de datos del Gene Bank.	52
24. Diseño y análisis del iniciador para el gen <i>virB2</i>	53
25. Diseño y análisis del iniciador para el gen <i>virB9</i>	53
26. Diseño y análisis del iniciador para el gen <i>virB11</i>	54
27. Electroferograma de los productos de amplificación de los genes <i>virB</i> en la cepa transformante de <i>E. coli</i> J53 con el plásmido <i>pFBAOT6</i> .	54
28. Electroferograma de la PCR múltiple para los genes <i>virB</i> en la cepa transformante de <i>E. coli</i> J53 con el plásmido <i>pFBAOT6</i> .	55
29. Electroferograma del gradiente de temperatura para la PCR múltiple de los genes <i>virB</i> en la cepa transformante de <i>E. coli</i> J53 con el plásmido <i>pFBAOT6</i> .	56
30. Electroferograma del gradiente de concentración de MgCl ₂ para la PCR múltiple de los genes <i>virB</i> en la cepa transformante de <i>E. coli</i> J53 con el plásmido <i>pFBAOT6</i> .	57
31. Electroferograma de amplificación de los genes <i>virB</i> en cepas de origen clínico de <i>Aeromonas</i> spp.	59
32. Electroferograma de amplificación de los genes <i>virB</i> en cepas de origen ambiental de <i>Aeromonas</i> spp.	59
33. Determinación de los genes <i>virB</i> del SSTIV por PCR en cepas de origen clínico y ambiental de <i>Aeromonas</i> spp.	60
34. Electroferograma de los productos de PCR de los genes <i>virB</i> del SSTIV en la cepa de <i>A. caviae</i> 5.2.	60
35. Alineamiento obtenido en el programa BLASTn de la secuencia de los genes <i>virB2</i> (A), <i>virB9</i> (B) y <i>virB11</i> (C) del SSTIV de la cepa de <i>A. caviae</i> 5.2 con la base de datos del Gene Bank.	61
36. Análisis global de la frecuencia obtenida por PCR de los genes marcadores de PAI's en cepas de origen clínico de <i>Aeromonas</i> spp.	62
37. Análisis global de la frecuencia obtenida por PCR de los genes marcadores de PAI's en cepas de origen ambiental de <i>Aeromonas</i> spp.	63
38. Modelo de la subunidad A de la proteína <i>cagE</i> obtenida de SwissProt.	65
39. Evaluación de los modelos evolutivos para la reconstrucción del fenograma.	65
40. Fenograma obtenido para las ATPasas homólogas a la proteína <i>CagE</i> .	66

RESUMEN

El género *Aeromonas* se asocia a enfermedades gastrointestinales y extraintestinales, con alta incidencia en el medio ambiente. El mecanismo de patogenicidad se considera multifactorial abarcando toxinas y sistemas de secreción tipo II, III, IV y VI. Sin embargo, éste no se encuentra totalmente elucidado. Se ha descrito la presencia de los genes marcadores de la isla de patogenicidad de *Helicobacter pylori* como *cagA* y *cagE* en cepas ambientales de *Aeromonas* spp. los cuales fueron transferidos horizontalmente.

El objetivo del presente trabajo fue investigar la presencia de islas de patogenicidad en cepas de *Aeromonas* spp. de origen ambiental y clínico aisladas en México.

En este estudio, se incluyeron 63 aislamientos clínicos del estado de Hidalgo, 41 cepas de origen ambiental y 14 cepas de referencia de *Aeromonas* spp. Para todos los ensayos moleculares se utilizó como control positivo la cepa de *H. pylori* ATCC 43504, *Haemophilus influenzae* ATCC 33930 y *E. coli* J53 con el plásmido *pFBAOT6*, y como testigo negativo la cepa de *E. coli* K12. Se determinó la presencia de las ATPasas *tfc16* (*H. influenzae*) y *cagE* (*H. pylori*) mediante PCR utilizando los iniciadores propuestos por Ikenoue y cols. y por Espinoza respectivamente. Los amplicones de los genes *tfc16* (277 pb) y *cagE* (350 pb) de las cepas de referencia y de la cepa *A. bestiarum* AhA4 se purificaron mediante el kit Pure Link (Invitrogen) y se secuenciaron con el sistema ABI PRISM 3100, la secuencia consenso se analizó en el programa BLAST del NCBI. Se diseñaron iniciadores específicos para la amplificación de los genes *virB2*, *virB9* y *virB11* del sistema de secreción tipo IV con secuencias plasmídicas de *Aeromonas* spp. y se estandarizó una PCR múltiple. Los amplicones obtenidos fueron secuenciados y analizados bioinformáticamente usando la misma estrategia que con los genes anteriores.

Empleando la PCR se determinó que 23/41 cepas ambientales presentaban un amplicón de 350 pb correspondiente al gen *cagE*. El resultado del BLAST de la secuencia consenso de la cepa *A. bestiarum* AhA4 presentó 78% de similitud para el gen *cagE*. Los 63 aislamientos clínicos del estado de Hidalgo y las 10 cepas de referencia de *Aeromonas* spp. no presentaron el gen *cagE*. Para el gen *tfc16* 14/41 cepas de origen ambiental presentaron un amplicón de 277 pb cuya similitud es del 100% con respecto al mismo gen reportado en la isla genómica de *H. influenzae*. El diseño de los iniciadores para los genes *virB2*, *virB9* y *virB11* obtenidos con el programa Primer 3 y DNAMAN v 3.0 no presentaron parámetros fisicoquímicos erróneos y son específicos, al realizar estudios “*in silico*” para secuencias de los plásmidos *pRA3* y *pFBAOT6* que codifican para SSTIV y resistencia a antibióticos en *Aeromonas* spp. Se estandarizó una PCR múltiple con 3 genes marcadores *virB2* de 114 pb, *virB9* de 278 pb y *virB11* de 200 pb. Se determinó que 14/104 cepas de origen ambiental y clínico de *Aeromonas* spp. poseen el gen *virB2*, mientras que 56/104 presentan el gen *virB9* y finalmente en 67/104 cepas se detectó el gen *virB11*. Se seleccionaron 8 cepas de origen ambiental y 3 de origen clínico que son candidatos para la búsqueda de una isla de patogenicidad y su posible caracterización en estudios posteriores.

Debido a que los genes *cagE* y *cagA* se han identificado como marcadores de *cag*-PAI en *H. pylori*, su presencia en cepas ambientales de *Aeromonas* spp. podría ser indicativo de la presencia de islas de patogenicidad en este género.

ABSTRACT

Aeromonas is a genus that contains Gram-negative rod shaped facultative anaerobic bacterias. They are widely distributed through nature and are considered as important fish pathogens and other cold and warm-blooded animals. For several years, the significance of this genus as a human diarrhea-causing agent was controversial; some studies demonstrated that the pathogenic mechanism of *Aeromonas* species is multifactorial because of many virulence factors are involved. Previously, we described the presence of a Pathogenicity Island (*cagA* and *cagE*) from *Helicobacter pylori* in *Aeromonas* spp. and demonstrated its horizontal transfer between the genera.

The aim of this study was to investigate the presence of pathogenicity islands in environmental and clinical strains of *Aeromonas* spp. isolated in Mexico.

This study includes 63 clinical isolates from Hidalgo, 41 strains of environmental origin and 14 reference strains of *Aeromonas* spp., and *H. pylori* ATCC 43504, *Haemophilus influenzae* ATCC 33930 and *E. coli* J53 strains with *pFBAOT6* plasmid were used as a positive control. *E. coli* K12 strain was used as a negative control. The presence of *tfc16* ATPases (*H. influenzae*) and *cagE* (*H. pylori*) was determined by PCR using the primers proposed by Ikenoue and Espinoza-Mellado in 2001 and 2009 respectively. The amplicons of the *tfc16* gene (277 bp) and *cagE* (350 bp) from reference strains and the *A. bestiarum* AhA4 strain were purified using Pure Link kit (Invitrogen) and sequenced with the ABI PRISM 3100, the consensus sequence was analyzed in the program NCBI-BLAST. Specific primers were designed for amplification of *virB2*, *virB9* and *virB11* genes of type IV secretion system with plasmid sequences of *Aeromonas* spp. and a multiplex PCR standardized. The amplicons obtained was sequenced and analyzed using bioinformatics with the same strategy as the previous genes.

A total of 23/41 from environmental strains showed an amplicon of 350 bp for the *cagE* gene by PCR. BLASTn analysis showed a 78% similarity to the *cagE* gene of *A. bestiarum* AhA4. 63 clinical isolates of the state of Hidalgo and 10 reference strains of *Aeromonas* spp. didn't present the *cagE* gene. For *tfc16* gene, 14/41 strains of environmental origin showed an amplicon of 277 bp its similarity was of 100% from the same gene reported in the genomic island of *H. influenzae*. The multiplex PCR with 3 marker genes *virB2* of 114 bp, *virB9* of 278 bp and 200 bp *virB11* was standardized using the primers designed by the program Primer 3 and DNAM v 3.0. With this technique we determined that 14/56, 56/104 and 67/104 strains from environmental sources and clinical *Aeromonas* spp. possess the *virB2*, *virB9* and *virB11* genes, respectively. Finally, we selected 8 strains of environmental origin and 3 of clinical origin for future studies of the presence of pathogenicity islands in the genus *Aeromonas*.

In conclusion the presence of *cagA* and *cagE* genes in *Aeromonas* spp. could be an indicator of pathogenicity islands in this genus and recombination processes between these and *H. pylori* genera.

1. INTRODUCCIÓN.

En México, las condiciones socioeconómicas de los habitantes favorece que los problemas gastrointestinales sean una de las enfermedades más frecuentes, éstas afectan principalmente a la población infantil (Castro-Escarpulli y cols., 2002). De hecho, la Secretaría de Salud (SS) reporta, hasta la semana 51 del 2009, 5,437,299 casos de problemas gastrointestinales en la población en general, de los cuales 2,492,311 corresponden a casos cuyo agente etiológico no pudo ser definido (URL 3).

Los agentes etiológicos causantes de enfermedades gastrointestinales son: en primer lugar virus, luego bacterias y finalmente parásitos. Los géneros bacterianos clásicos causantes de diarreas son: *Salmonella*, *Shigella*, algunos serotipos de *Escherichia coli* y *Campylobacter jejuni*. Sin embargo, en los últimos años se ha agregado a la lista de agentes etiológicos al género *Aeromonas*, el cual se considera un patógeno causante de infecciones intraintraestinales y extraintestinales en México con un mecanismo de patogenicidad multifactorial que no ha sido descrito en su totalidad (Castro-Escarpulli y cols., 2002).

1.1. Características del género *Aeromonas*.

1.1.1. Microbiología.

El género *Aeromonas* incluye bacilos cortos Gram negativos con extremos redondeados, miden de 0.3 a 1.0 μm de ancho por 1.0 a 3.5 μm de longitud y pueden encontrarse en cadenas cortas o en pares, son anaerobios facultativos, oxidasa y catalasa positivos (Altwegg y Geiss, 1989); no son halófilos, toleran 3% de NaCl pero no 6%. Su temperatura óptima de crecimiento varía entre 22°C y 37°C, sin embargo, pueden crecer de 0°C hasta 45°C. Estas bacterias crecen de manera óptima a un intervalo de pH de 4.5 a 9.0. Algunas especies son patógenas para el hombre, otras para los peces, y unas más para otros vertebrados e invertebrados (Martín-Carnahan y Joseph, 2005).

1.1.2. Clasificación.

Actualmente el género *Aeromonas* se encuentra clasificado dentro de la familia *Aeromonadaceae*. Con base a datos fenotípicos y genotípicos, la taxonomía del género ha cambiado radicalmente en los últimos años; las especies bioquímicamente distintas se refieren como fenoespecies mientras que los grupos de hibridación con base a la hibridación del DNA total se denominan genoespecies o especies genómicas (HGs). La clasificación de este género incluye 17 grupos de hibridación (Martin-Carnahan y Joseph, 2005).

1.1.3. Ecología.

Este género bacteriano es considerado autóctono del medio acuático, ampliamente distribuido en hábitats naturales como suelo, agua potable, aguas negras, aguas contaminadas, ríos, lagos y mares. Este hecho es significativo, ya que se han descrito varios casos de infecciones primarias o secundarias de heridas superficiales o cutáneas después del contacto con agua contaminada (Castro-Escarpulli y cols., 2002). Así mismo, se ha aislado en aguas potables cloradas o no cloradas e incluso en aguas embotelladas. La mayoría de los sistemas de tratamiento de agua potable son capaces de reducir la concentración de *Aeromonas* por debajo de 1UFC/ 100 mL, no obstante, cuando los niveles de materia orgánica aumentan disminuye la concentración de radicales libres de cloro y este género puede crecer e incluso colonizar los sistemas de abastecimiento, formando una biopelícula. En el agua tratada, pueden llegar a alcanzar concentraciones de 10^3 UFC/100 mL (Castro-Escarpulli y cols., 2002).

Algunos miembros del género se aíslan de alimentos como: productos cárnicos, pescado, mariscos, alimentos preparados, productos de pastelería, verduras, leche y derivados lácteos por lo que algunos autores consideran que *Aeromonas* debería incluirse en la lista de microorganismos que pueden actuar como agentes causantes de toxoinfecciones alimentarias (Castro-Escarpulli y cols., 2002).

1.1.4. Patogenicidad.

Los miembros del género *Aeromonas* se consideran enteropatógenos y causantes de infecciones cutáneas y diseminadas. Las principales formas clínicas que este microorganismo presenta son: diarrea secretoria, diarrea disentérica, diarrea colérica, diarrea crónica y diarrea del viajero, en muchos de estos casos no se tienen suficientes datos clínicos y microbiológicos que nos ayuden a definir el poder virulento de las diferentes especies del género; a pesar de ello se le puede considerar como un patógeno primario de enfermedad humana (Castro-Escarpulli, 2002; Figueras y cols., 2000).

Las infecciones extraintestinales que son ocasionadas por *Aeromonas* spp. en un principio se limitaron a infecciones de heridas superficiales por contacto con el medio acuático en pacientes inmunosuprimidos, no obstante, ahora se incluyen enfermedades como: síndrome urémico hemolítico, sepsis asociadas a quemaduras, epiglotitis, endocarditis, peritonitis, meningitis, osteomielitis, colitis, mionecrosis gaseosa, neumonía, e infección respiratoria y bacteriemia (Castro- Escarpulli y cols., 2002; Figueras y cols., 2000).

1.1.5. Vías de transmisión.

Aeromonas spp. se encuentra en una gran variedad de ambientes donde pueden persistir y reproducirse manteniendo sus propiedades de virulencia (toxicidad y capacidad invasiva a células eucariotas), considerando a este ambiente como un reservorio importante para estos microorganismos; así como de fuentes naturales, predominantemente en aguas dulces, agua de alcantarillado y aguas contaminadas; también ha sido aislada de animales de sangre fría como anfibios, peces y reptiles, inclusive se ha llegado a aislar de muestras de agua de piscinas y de mar. Dada su presencia en suministros de reserva y distribución de agua potable antes y después de ser tratada con cloro y a que no se encuentra relacionada con los coliformes; se puede considerar que el agua es uno de los principales vehículos para adquirir una

infección por *Aeromonas*. Así mismo se ha encontrado incidencia de este género en el ambiente hospitalario donde es una fuente importante de infección (Castro-Escarpulli y cols., 2002).

1.1.6. Epidemiología.

En México, los estudios para determinar la incidencia de este género son escasos, entre estos destacan los realizados por Rebollo y Escamilla en 1984, quienes aislaron *Aeromonas* spp. con una frecuencia del 7.7% en casos de diarrea aguda en niños menores de 2 años y en un 7% en adultos. Estudios posteriores, realizados por ellos mismos en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas encontraron que el 5.7% de los aislamientos procedían de niños menores de 5 años con diarrea de larga evolución. Las tres especies aisladas predominantemente de muestras clínicas son: *A. hydrophila*, *A. caviae* y *A. veronii* bv. sobria las cuales se han involucrado en un amplio espectro de infecciones sistémicas y gastrointestinales. Mientras que *A. bestiarum*, *A. salmonicida*, *A. veronii* bv. veronii, *A. jandaei*, *A. schubertii*, *A. trota* y *A. media*, se aíslan con menos frecuencia de muestras clínicas, el resto de las especies se han recuperado sólo de fuentes ambientales y se consideran especies no patógenas (Castro-Escarpulli y cols., 2005).

Por otro lado, en el Laboratorio Estatal de Salud Pública de Hidalgo (LESPH) encontraron como patógeno único a *Aeromonas* en el 2.1% de 22,747 hisopos rectales obtenidos de población con diarrea. Siendo el grupo etario con mayor frecuencia de aislamiento el de niños de 1 a 3, años seguidos de la población de niños de 4 a 10 años. La frecuencia de aislamientos clínicos de estas especies varía según el área geográfica estudiada, ya que en las cepas aisladas en el estado de Hidalgo (n = 68), *A. caviae* (42.6%) fue la especie más prevalente seguida por *A. hydrophila* (36.8%) y *A. veronii* bv. sobria (19.1%) (Alor, 2000); mientras que en las cepas aisladas de la ciudad de México (n = 42) *A. veronii* bv. sobria (31%) ocupa el primer lugar, seguida de *A. hydrophila* (29%) y *A. caviae* (17%), contrariamente a lo

encontrado en España, donde *A. hydrophila* es la menos aislada de entre estas tres especies (Janda, 2001; Chacón y cols., 2003; Castro-Escarpulli y cols., 2005).

Desde el punto de vista geográfico, la presencia de *Aeromonas* en heces asociada a sintomatología diarreica oscila entre el 80% en Canadá y el 0.18% en Dinamarca, siendo otros países documentados Perú (54.2%), Tailandia (18 - 31%), Japón (11.1%), Australia (11%) e Inglaterra (11%). Estos procesos entéricos se dan en todos los grupos de edad, aunque la población infantil es la más afectada, en particular niños con una edad inferior a los 2 años. A pesar de todo, el poder enteropatógeno de estos microorganismos todavía permanece en controversia debido a que no se han documentado grandes brotes epidémicos y, a nivel experimental, no se dispone de un modelo animal adecuado para reproducir la sintomatología diarreica observada en el ser humano (Castro-Escarpulli y cols. 2005).

1.1.7. Mecanismos de patogenicidad.

Existen estudios en los que se han descrito la producción de una serie de factores que se encuentran asociados con la virulencia de las especies de *Aeromonas*, sin embargo, el mecanismo exacto de virulencia y el papel de cada uno de los factores descritos no se ha establecido claramente. Se ha observado que la virulencia, en este género, es dependiente de la cepa bacteriana, de la ruta de infección y el animal utilizado como modelo (Yu y cols., 2005); sin embargo; algunos de los principales factores de virulencia son: la cápsula, la capa S, las fimbrias y otras adhesinas no filamentosas, el lipopolisacárido, el sistema flagelar polar y lateral, los sideróforos, la secreción de otras exotoxinas y enzimas extracelulares tales como proteasas, lipasas y desoxirribonucleasas (Burr y cols., 2003a; Castro-Escarpulli y cols., 2002).

Se han descrito en algunas cepas de *Aeromonas* spp. sistemas de secreción de tipo II, III, IV y VI (Khajanchi y cols., 2009; Suarez y cols., 2010), encargados del transporte de moléculas efectoras, generalmente de naturaleza proteica, desde el

citoplasma de la bacteria hacia el medio externo o bien directamente a la célula hospedera, estas moléculas poseen diversas actividades que contribuyen a la patogenicidad del microorganismo causando lesiones directas al tejido o mediante la activación proteolítica de toxinas potenciando la invasión; también pueden contribuir al establecimiento de la infección ayudando a superar las defensas del huésped, mediante inactivación del complemento y proporcionando nutrientes para la proliferación celular (Burr y cols., 2003b; Cambronne y Roy, 2006).

1.2. Sistemas de secreción.

Las bacterias secretan un gran número de proteínas al medio extracelular entre las que se incluye toxinas, adhesinas y diversas enzimas hidrolíticas que se requieren en diversos aspectos del ciclo de vida bacteriano, por ejemplo, la biogénesis de organelos, la adquisición de nutrientes y la expresión de factores de virulencia (González-Pedrajo y Dreyfus, 2003).

La secreción de proteínas en bacterias es un área de investigación que ha sido extensamente estudiada en las últimas dos décadas. La mayor parte del trabajo se ha desarrollado en las bacterias Gram-negativas, en las que las proteínas a translocarse tienen que atravesar dos barreras lipídicas separadas por el espacio periplásmico y la capa de peptidoglicano. Por su parte, en las bacterias Gram positivas la secreción de proteínas hacia el exterior celular requiere del transporte a través de una sola membrana (González-Pedrajo y Dreyfus; 2003).

A pesar del número, la diversidad y la amplia variedad de funciones que desempeñan las proteínas secretadas como proteólisis, hemólisis, citotoxicidad, reacciones de fosforilación, entre otras; éstas son translocadas utilizando un número limitado de mecanismos. Los sistemas de secreción son clasificados dentro de siete grupos, llamados tipo I, II, III, IV, V o autotransportadores y los recientemente descritos tipo VI y VII (Henderson y Nataro, 2001; Tseng y cols., 2009). Dicha clasificación se basa en la naturaleza molecular de las maquinarias de transporte y las reacciones que éstas catalizan (figura 1).

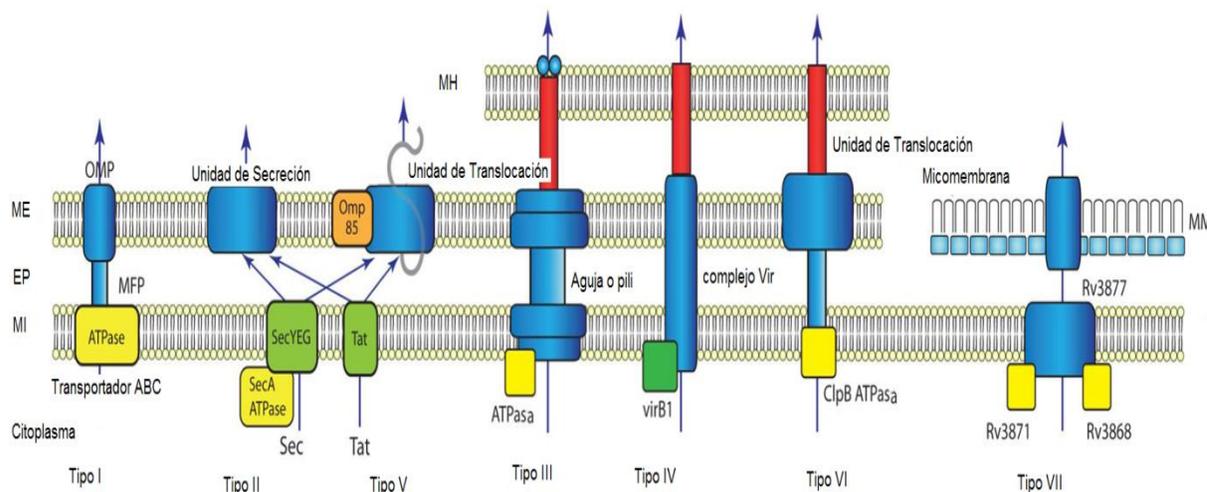


Figura 1. Sistemas de secreción de microorganismos Gram negativos.

Se muestra un esquema simplificado de los 7 sistemas de secreción conocidos. MH: membrana del hospedero. ME: membrana externa. EP: espacio periplásmico. MI: membrana interna MM: micromembrana. MFP: Proteína de fusión de membrana. OMP: Proteína de membrana externa. ATPasas y chaperonas se muestran en amarillo. Modificado de Tseng y cols., 2009.

Estos 7 grupos se pueden aún subdividir en dos grandes grupos dependiendo del mecanismo que se utilice para el transporte a través de la membrana plasmática. Las vías Sec-dependientes, que utilizan el sistema de secreción denominado Sec, en el que las proteínas a secretarse presentan una secuencia señal o péptido líder en el extremo amino terminal; y las Sec-independientes en las que los sustratos se pueden translocar directamente desde el citosol hasta el exterior celular sin que exista un intermediario periplásmico, o una secuencia señal en el amino terminal (González-Pedrajo y Dreyfus, 2003; Kostakioti y cols., 2005).

1.2.1. Sistema de secreción tipo IV (SSTIV)

El SSTIV es una vía homóloga a los sistemas de conjugación y al sistema VirB de *Agrobacterium tumefaciens* que facilitan la translocación de DNA. Este sistema es un transportador versátil que secreta tanto ácidos nucleicos como proteínas por la vía sec-independiente. Se han identificado sistemas homólogos al sistema VirB en diferentes patógenos como, *Helicobacter pylori*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Brucella suis* entre otros; los cuales pueden estar

codificados en islas genómicas o de patogenicidad u otros elementos móviles tales como plásmidos. La exportación de la toxina pertussis producida por *Bordetella pertussis* se lleva a cabo a través de esta vía, sin embargo, este proceso es el único sec-dependiente dentro de los SSTIV ya que posee un intermediario periplásmico (González-Pedrajo y Dreyfus, 2003; Kostakioti y cols., 2005; Tseng y cols., 2009).

El SSTIV puede subdividirse en tres familias: la mayor subfamilia, la integran los sistemas de conjugación, que se encuentran en la mayoría de las especies de bacterias Gram negativas y Gram positivas. Estos sistemas pueden transferir DNA entre microorganismos de diversas especies poco o muy relacionados filogenéticamente y algunos incluso poseen mecanismos de transferencia entre hongos, plantas o células humanas. La conjugación contribuye a la diversificación de los genóforos bacterianos y por tanto, a la mejor adaptación del microorganismo a los cambios ambientales. La segunda subfamilia la componen los sistemas de captación y liberación de DNA, cuya función es independiente del contacto con una célula diana, hasta el momento se han descrito dos especies de microorganismos con estos sistemas de captación de material genético: *H. pylori* (*ComB*) y *Campylobacter jejuni* (*Cjp/VirB*) y solo un sistema de liberación en *Neisseria gonorrhoeae* (plásmido *F-Tra like*). Al igual que con la maquinaria de conjugación, este sistema puede promover el intercambio genético y por lo tanto también es un potencial mecanismo para la transferencia de los rasgos de supervivencia durante la infección por estos patógenos (Cascales y Christie, 2003).

La tercera subfamilia se conoce como sistema de secreción de moléculas efectoras, la cual es indispensable en los mecanismos de infección de muchos microorganismos patógenos de plantas o animales. Este sistema consiste de 12 componentes denominados VirB1 a VirB11 y VirD4, que transfieren el complejo proteína ó DNA en un solo paso desde el citoplasma hasta la célula eucariota a través del pilus-T. La noción general aceptada para esta vía es que no requiere de intermediarios periplásmicos, por lo que la secreción es Sec-independiente (Cascales y Christie, 2003; González-Pedrajo y Dreyfus, 2003).

Dentro del sistema VirB (figura 2), existen componentes asociados a la membrana interna (VirB4, VirB11 y VirD4) que son ATPasas que forman canales para la translocación del sustrato o proveer energía para el ensamblaje de la maquinaria del SSTIV. De esta forma, los cambios conformacionales inducidos por la hidrólisis del ATP podrían transducir la información del citoplasma hacia las subunidades extracitoplásmicas. Otros componentes como VirB8, VirB9 y VirB10 forman un núcleo periplásmico que constituye un canal de translocación. VirB6 atraviesa la membrana interna por lo que se sugiere que este componente forma, en asociación con las ATPasas, el canal citoplásmico. Por otro lado, están los componentes del pilus VirB2 (que es la principal proteína estructural), VirB5 y VirB7 que están asociados a dicha estructura. La proteína VirB1 tiene un motivo que está presente en las transglucosilasas líticas, por lo que se propone que puede lisar la capa de peptidoglicano durante el ensamblaje del transportador (González-Pedrajo y Dreyfus, 2003).

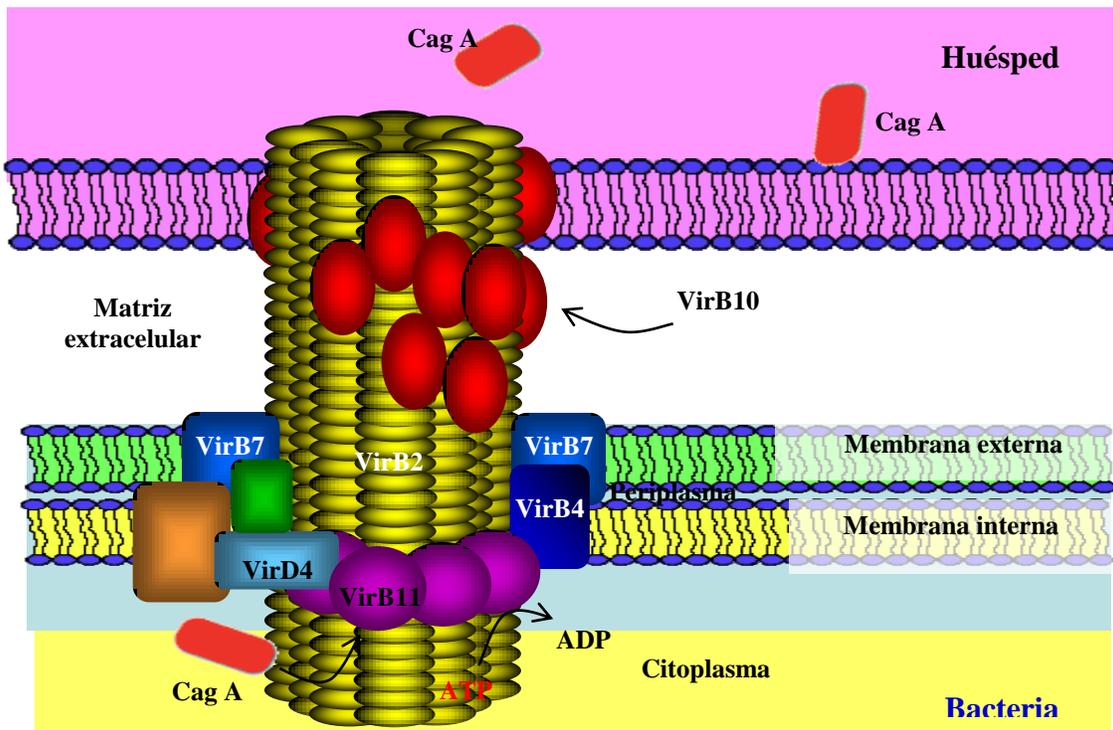


Figura 2. Componentes del sistema de secreción tipo IV (SSTIV) de *Helicobacter pylori*.

Tomado de Baez-Arias, 2007.

En el SSTIV, VirB4 es la proteína más grande, sus homólogos son altamente conservados en estos sistemas y es esencial para la virulencia (Yuan y cols., 2005). Las tres ATPasas (VirB4, VirB11 y VirD) interactúan físicamente y se ha propuesto que regulan el transporte inicial de los sustratos (figura 3). Por su parte, VirB4 tiene un rol energético y estructural en la translocación de sustratos (Draper y cols., 2006). El gen *traC/virB4* sigue siendo el único componente de este sistema universalmente conservado tanto en bacterias Gram negativas como Gram positivas (Juhas y cols., 2008).

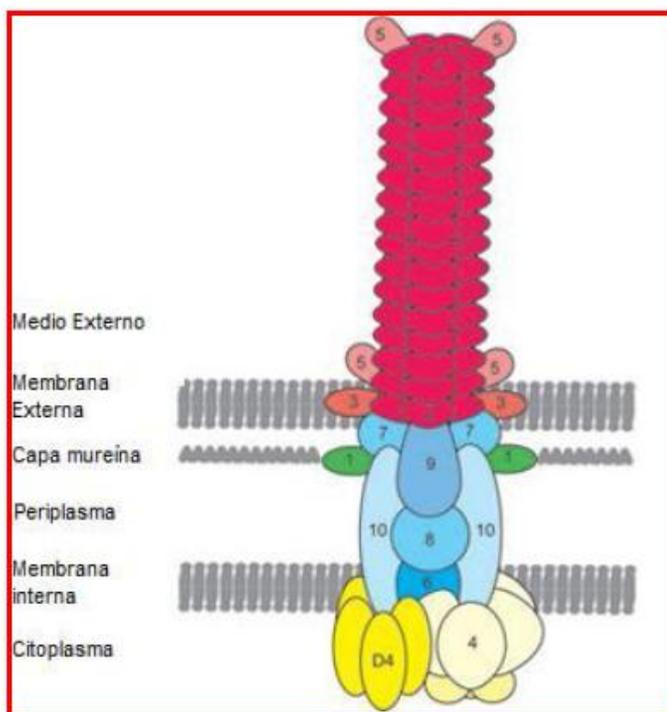


Figura 3. Componentes ensamblados del sistema de secreción tipo IV (SSTIV).

El sistema consiste en 11 proteínas VirB: (VirB1 a VirB11) y VirD4. Código de color: amarillo: nucleósidos trifosfatos que proveen la energía para la transferencia; azul: componentes del canal transmembranal; rojo: componentes del pilus; verde: transglicosilasas líticas responsables de la degradación de la barrera de mureína (peptidoglicano) en el sitio de ensamblaje (Tomado de Juhas y cols., 2008).

De las 24 proteínas totales del SSTIV, 7 exhiben homología con componentes conocidos de este sistema en otros microorganismos; como la proteína TraX (plásmido F), PilL (plásmido pKLC102), TraD (plásmido F), TraB (plásmido F), TraC/VirB4 (plásmido F), TraG (plásmido F) y PiIT (*Legionella pneumophila* cepa

Philadelphia) (Juhas y cols., 2007). La homología entre ellas, supone la idea de que hay algunas islas genómicas que pueden tener una estructura similar con un origen común o compartido (Mohd-Zain y cols., 2004).

Los SSTIV son importantes en un número significativo de patógenos para humanos, como: *B. pertussis*, *Bartonella* spp., *L. pneumophila*, *Brucella* spp. y *H. pylori* (Kostakioti y cols., 2005; Dehio, 2008). En *H. pylori*, este sistema está codificado por la isla de patogenicidad *cag* y pertenece al grupo de los translocadores de efectores de los SSTIV, ya que inyecta la oncoproteína citotóxica CagA a la célula hospedera (Nagai y Roy, 2003; Couturier y cols., 2006; Kwok y cols., 2007; Backert y Selbach, 2008); dado que los genes que codifican para este sistema están presentes en regiones amplias de DNA, se sugiere que la adquisición de éstos fue por una isla de patogenicidad (Christie y Vogel, 2000; Cascales y Christie, 2003; Schmidt y Hensel, 2004).

1.3. Islas genómicas.

La información recogida durante los últimos años por secuenciación y anotación de genomas ha demostrado que, además de los genes constitutivos para las funciones esenciales del metabolismo, existen un número variable de genes accesorios adquiridos por transferencia horizontal que codifican rasgos adaptativos que pueden ser benéficos en determinadas circunstancias para las bacterias en el medio ambiente (Hacker y cols., 1997; Schmidt y Hensel, 2004).

Muchos de los bloques de genes accesorios adquiridos por transferencia horizontal son reconocidos como islas genómicas (GEIS). Las islas genómicas suelen ser definidas como segmentos de DNA bien caracterizado entre cepas estrechamente relacionadas, su formación contribuye a la diversificación y la adaptación de los microorganismos a las presiones de selección de su medio (Juhas y cols., 2009).

En las islas genómicas se encuentran codificados genes estructurales, de resistencia, de secreción, de simbiosis, de patogenicidad, entre otros. Están constituidas por elementos móviles que pueden encontrarse insertados en el genoma bacteriano y clasificarse con base en las características conferidas (Hacker y cols., 1997; Hacker y Carniel, 2001). La difusión de la resistencia a los antibióticos, la formación de las vías catabólicas y la presencia de genes de virulencia son algunos ejemplos de este tipo de ventajas evolutivas codificadas por islas genómicas (Juhas y cols., 2009).

1.3.1. Islas de patogenicidad.

La patogenicidad de un microorganismo involucra la expresión de un gran número de productos genéticos. En la célula se deben expresar los genes cuyos productos son requeridos para los procesos fisiológicos básicos, pero además, otras clases de genes relacionados con la virulencia, que se encuentran sólo en cepas patógenas, y sus productos juegan un rol específico en el mecanismo de patogenicidad (Groisman y Ochman, 1996). Algunos patógenos probablemente evolucionaron por la adquisición de largas unidades de información genética, que le confieren la habilidad de colonizar nuevos nichos. En general, estos bloques de DNA se encuentran en plásmidos o bacteriófagos, sin embargo, muchos también se pueden encontrar en los cromosomas bacterianos o en unidades específicas llamadas islas de patogenicidad (Fernández y cols., 2004).

Las islas de patogenicidad o PAI's por sus siglas en inglés "Pathogenicity islands"; son un subgrupo de islas genómicas, las cuales consisten en regiones cromosomales que contienen genes asociados a la virulencia, siendo elementos genéticos móviles, pueden ser transferidos de manera horizontal entre diferentes especies o géneros; con frecuencia esta transferencia permite al receptor que se vuelva patógeno (Hacker y cols., 1997; Hacker y Kaper, 2000). Las PAI's se pueden encontrar en bacterias patógenas Gram positivas y Gram negativas compartiendo características en común (Hacker y Kaper, 2000; Gal-Mor y Finlay, 2006):

- Codifican para uno o más factores de virulencia, como pueden ser invasinas, adhesinas, sistemas de adquisición del hierro, toxinas, sistemas de evasión de la respuesta inmune y sistemas de secreción tipo III (SSTIII) y sistema de secreción tipo IV (SSTIV).
- Se presentan en cepas de bacterias patógenas de manera consistente pero de manera variable en las bacterias no patógenas.
- Ocupan regiones genómicas largas, o bien, pueden formar parte de fagos y/o plásmidos.
- La mayoría de las islas de patogenicidad van desde 10 hasta 200 Kb o más, sin embargo, se han descrito isletas de patogenicidad que van de 1 a 10 kb.
- La introducción de estas largas piezas de DNA puede transferirse por vía horizontal a nuevos hospederos.
- Forman distintas unidades genéticas que generalmente están flanqueadas por secuencias repetidas directas perfectas o imperfectas de entre 16 y 20 pb las cuales fueron probablemente generadas durante la inserción de bacteriófagos, plásmidos o transposones en el genoma.
- Están asociadas con genes de tRNA y/o secuencias de inserción siendo estos los lugares donde se integran.
- Están presentes otras características de elementos genéticos móviles, incluyendo orígenes de replicación de plásmidos y transposones o genes de fagos, tales como recombinasas o integrasas.
- Contienen genes móviles crípticos.
- Son inestables, con una tasa de pérdida espontánea muy alta.

- Estos elementos se han encontrado en varios organismos patógenos que tienen la capacidad de causar daño no solo a humanos, sino también a las plantas y a los animales.
- Las regiones de DNA que constituyen a las PAI's difieren en el contenido de G-C reflejando también una diferencia en el uso de codones (Hacker y cols., 1997; Fernández y cols., 2004; Gal-Mor y Finlay, 2006).

La integración de los fagos o transposones ocurre en sitios específicos en el genoma, por lo tanto las islas no se insertan al azar. Las PAI's de bacterias Gram negativas con frecuencia se localizan hacia la región 5' de los genes que codifican los RNA de transferencia, posiblemente porque los loci de tRNA se conocen como sitios blancos de integración de varios fagos y plásmidos (Fernández y cols., 2004; Gal-Mor y Finlay 2006).

No hay una identificación clara de la fuente original de las islas de patogenicidad y en muchos casos, el donante pudo ser un organismo no cultivable o extinto. El origen de algunos factores de virulencia ha podido establecerse buscando genes relacionados que se encuentran en cepas no patogénicas. Por ejemplo, los sistemas SSTIII y SSTIV que se encuentran en patógenos Gram negativos son homólogos a la maquinaria para exportar y ensamblar los flagelos o los pili. También se ha sugerido, que algunos genes de eucariotas han sido incorporados en las PAI's bacterianas (Fernández y cols., 2004). Un ejemplo es la proteína efectora YopH, la cual es una tirosina fosfatasa secretada por *Yersinia*, que es similar a la tirosina fosfatasa de eucariotas (Guan y Dixon, 1990).

Las PAI's reportadas en bacterias Gram positivas usualmente no encajan en la definición clásica de PAI's, ya que pueden no estar flanqueadas por sitios especiales de unión, o con marcadores de inserción tales como; repeticiones directas o genes de tRNA, lo que hace más difícil su detección (Fernández y cols., 2004).

En el cuadro 1 se muestran algunos ejemplos de islas de patogenicidad en microorganismos Gram negativos:

Cuadro 1. Islas de patogenicidad presentes en bacterias Gram negativas.

<i>Factores de virulencia</i>	<i>Ejemplos</i>	<i>PAI's</i>
Factores de adherencia	<i>Escherichia coli</i> uropatogénica	LEE
	<i>Vibrio cholerae</i>	VP1
	<i>Listeria</i> spp.	LIPI-1
Toxinas	<i>Escherichia coli</i> uropatogénica	PAI II
Sistema de adquisición de hierro	<i>Escherichia coli</i> uropatogénica	LEE
	<i>Shigella flexneri</i>	SHI-2
	<i>Yersinia</i> spp.	HPI
Invasión	<i>Escherichia coli</i> diarrogénica	HPI
	<i>Salmonella</i> spp.	SP-1
	<i>Shigella</i> spp.	LIPI-1
Sistema de secreción tipo II	<i>Escherichia coli</i> diarrogénica	HPI
	<i>Salmonella</i> spp.	SP-1
	<i>Shigella</i> spp.	Shi1
	<i>Yersinia</i> spp.	Hrp
Sistema de secreción tipo IV	<i>Helicobacter pylori</i>	cag
	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	t-DNA

Modificado de Hacker y Kaper, 2000; Fernández y cols., 2004; Figueroa y Verdugo, 2005

El origen y organización de las PAI's, ha sido motivo de discusión; se cree que comienza con la integración de plásmidos, fagos o transposones; conjugativos o cointegrados en genes específicos preferentemente en el cromosoma y que son mantenidos por el microorganismo por transferencia vertical. Las islas mejor descritas han sido aquellas que se encuentran en cepas de *E. coli* que causan una serie de infecciones intestinales y extraintestinales y que codifican para una gran variedad de factores de virulencia (Hacker y cols., 1997).

1.3.2. Detección de las islas de patogenicidad.

La disponibilidad de datos sobre genomas y las propiedades de distintas islas provee de métodos eficaces para la búsqueda e identificación de las PAI's. La secuenciación de genomas de bacterias ha permitido conocer la estructura y las propiedades del genóforo bacteriano y la detección de la información genética

adquirida horizontalmente. Se han utilizado varios enfoques para identificar a las islas genómicas de manera informática en los genomas secuenciados (García-Vallve y cols., 2000; Gal-Mor y Finlay, 2006). Una metodología común implica la identificación de regiones que contienen composición atípica en comparación con el resto del genoma del organismo, como el contenido de G+C atípico, y el uso de codones diferentes. Aunque este enfoque es relativamente sencillo y simple, puede no detectar los más antiguos eventos de transferencia horizontal debido a la integración y evolución de las secuencias adquiridas con el paso del tiempo, o bien regiones que fueron adquiridos a partir de organismos con similares composiciones de G-C en sus secuencias (Hsiao y cols., 2003). Un enfoque diferente que se puede utilizar es la búsqueda de genes con funciones que se asocian a menudo con transferencia horizontal de genes tales como integrasas, transposasas, secuencias fágicas, genes con similitud filogenéticamente inusual de especies distantes o secuencias flanqueadas por tRNA's. Una tercer estrategia es la comparación directa del genoma de especies relacionadas para la identificación de las regiones únicas (García-Vallve y cols.,2000; Hsiao y cols., 2003; Gal-Mor y cols., 2006).

Se han creado diversas herramientas informáticas para facilitar "*in silico*" la detección de las potenciales islas de patogenicidad en los genomas secuenciados (URL 4). Estas herramientas incluyen programas como "IslandPath", una aplicación que integra múltiples funciones de las PAI's, tales como composición atípica de G+C y genes asociados a la transferencia horizontal de genes (Hsiao y cols., 2003) o bien la base de datos para genes transferidos horizontalmente "HGT-DB" (del inglés Horizontal Gene Transfer-Data Bank), la cual consiste en una colección de genomas secuenciados en línea, que basa su búsqueda en parámetros similares a IslandPath, sin embargo, los algoritmos y sistema de puntuación son más estrictos por lo que solo aparecen proteínas que potencialmente son transferidas horizontalmente (García-Vallve y cols.,2000).

Al contrario que en los análisis Bioinformáticos un protocolo que no requiere de una secuencia preliminar incluye la comparación del genoma por hibridación

Los análisis de secuencias nucleótidas de *cag*-PAI, han demostrado que ocho de sus genes son homólogos con genes de operones presentes en otras especies de bacterias, tales como: *B. pertussis*, *A. tumefaciens*, *E. coli*, *L. pneumophila*, *Rickettsia prowazekii* y *B. suis* que codifican para una familia de proteínas transportadoras que conforman el sistema de secreción tipo IV (figura 5) (Christie y Vogel, 2000; Rincón, 2005). Además, *cag*-PAI está asociada con el incremento de la virulencia de las cepas de *H. pylori* contribuyendo de esta forma a una respuesta inflamatoria más severa en la mucosa del hospedero, para su detección *in vitro* se han propuesto los genes marcadores *cagA* y más recientemente *cagE* (Bach y cols., 2002).

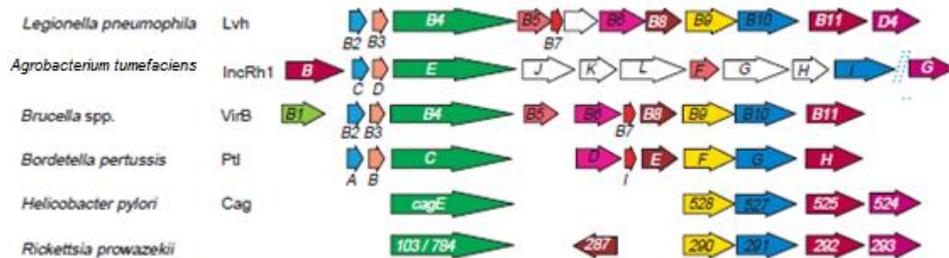


Figura 5. Sistemas de secreción tipo IV de diversos microorganismos.

Las proteínas homólogas se muestran con un código de color diferente; en verde se muestran las proteínas con función de ATPasa homólogas a CagE de *H. pylori* (Tomado de Christie y Vogel, 2000).

1.3.3.1. Gen *cagA*.

análisis de nucleótidos del gen *cagA*, ha mostrado que la región 5' está altamente conservada mientras que en la región 3' del gen presenta un número variable de secuencias repetidas, que al transcribirse determina el tamaño de la proteína Cag A (Rota y cols., 2001).

1.3.3.2. Gen *cagE*.

El gen *cagE* se describió por primera vez en 1995 (Tummuru y cols., 1995; Censini y cols., 1996) el cual es homólogo (26% identidad y 50% similitud) con el gen *ptlC* de *B. pertussis* cuyos productos de traducción participan en la inducción de IL-8 por las células epiteliales. El gen *cagE* se propuso como marcador de virulencia y de la *cag*-PAI intacta (Owen y cols., 2001; Hsu y cols., 2002) se ha asociado con el desarrollo de la úlcera duodenal en la población infantil (Day y cols., 2000) posee actividad de ATPasa del sistema de secreción tipo IV de *H. pylori* considerándose la proteína más conservada entre el SSTIV de otros microorganismos relacionados (Ikenoue y cols., 2001).

Así mismo se han identificado cuatro proteínas efectoras del SSTIII en *A. salmonicida* (AexT, AopP, AopO y AopH) (Dacanay y cols. 2006), y una en las cepas de *A. hydrophila* AH-3 (AexT) y *A. hydrophila* SSU (AexT-like o AexU). La proteína AexT es una toxina bifuncional homóloga de los efectores bifuncionales, ExoT/ExoS de *P. aeruginosa*, mostrando actividad ADP-ribosiltransferasa y GAP (del inglés, *GTPase activating protein*). AopP es miembro de la familia YopJ, un grupo de proteínas efectoras del SSTIII que interfiere con vías de señalización de proteínas quinasa activadas por mitógeno (MAPK) y/o con el factor nuclear kappa B (NF-κB). Las funciones biológicas de AopO y AopH se desconocen; sin embargo, son homólogos de las proteínas efectoras YopO y YopH de *Y. enterocolitica* respectivamente (Burr y cols., 2003a; Burr y cols., 2003b; Dacanay y cols., 2006; Stuber y cols., 2003).

Algunos estudios muestran que el sistema de secreción tipo IV (SSTIV), posee un papel central en las interacciones hospedero-parásito; Rangrez y cols. (2006) demostraron, por secuenciación y análisis bioinformático, la existencia y organización de un sistema de secreción tipo IV (SSTIV) codificado en el plásmido *pAc3249A* de aproximadamente 30 kb en *Aeromonas culicicola*. El operón completo de este sistema de secreción de 11,061 pb se designó como *AcTra* y codifica para 12 marcos abiertos de lectura (proteínas TraA-TraK), el orden y orientación de los genes son similares a otras bacterias como *A. caviae*, *A. tumefaciens* y *E. coli* (figura 7). Se determinó que las proteínas que poseen actividades fundamentales en el SSTIV de *A. culicicola* son: TraC, TraH y TraJ homólogas a VirB2, VirB9 y VirB11 de *A. caviae* y forman la estructura del pili, una proteína requerida para la actividad del canal o biogénesis del pili y una ATPasa respectivamente (Rangrez y cols., 2006).

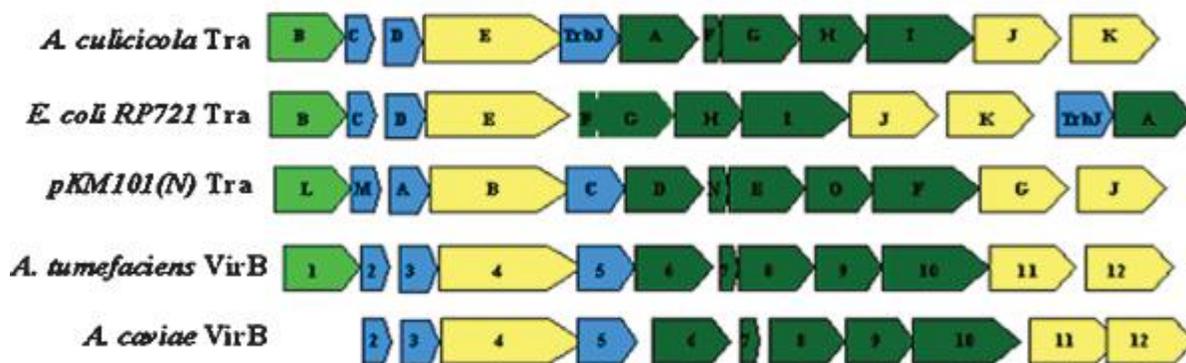


Figura 7. Comparación del operón AcTra contra otros SSTIV homólogos.

Los diferentes colores indican la probable función o localización de la proteína. Verde claro: acetil-transglicosilasa. Azul: componentes de ensamblaje del pilus, Amarillo: ATPasas. Verde oscuro: proteínas que forman los componentes básicos. Tomado de: Rangrez y cols., 2006

Así mismo, Rhodes y cols., en 2004 y Kulinska y cols., en 2008 demostraron la presencia de este SSTIV en los plásmidos *pFBAOT6* de *A. caviae* HGB5 cepa de origen clínico y *pRA3* de *A. hydrophila* respectivamente, estos elementos móviles pertenecen a la familia *IncU* que además del SSTIV poseen genes de resistencia a antibióticos como tetraciclina y ampicilina. No existen reportes en la literatura de cepas de *Aeromonas* spp. que posean sistema de secreción tipo IV codificado en el cromosoma.

A pesar de los hallazgos antes descritos, aún no se ha demostrado la presencia de una isla de patogenicidad en este género, sin embargo; Datta y cols. en 2003 demostraron mediante PCR e hibridación en fase sólida (Colony Blot), la presencia del gen *cagA*-like de *H. pylori*, en cepas de origen ambiental de *Aeromonas* spp. obtenidas de muestras de agua de lagos en Calcuta, India. La secuenciación de los productos de PCR reveló un 97 a 98% de similitud del gen *cagA*-like de cepas de *Aeromonas* spp. ambientales contra aislamientos clínicos de *H. pylori* de la misma localidad. Por otro lado, Alvarado-Hernández (2007) demostró la presencia del gen *cagA*, por PCR e hibridación en fase sólida (Dot Blot), en 20/116 (17.24%) cepas de origen ambiental de *Aeromonas* spp. (80% de pescado congelado y 20% de muestras de agua de fuentes Españolas) las cuales correspondían a las especies *A. bestiarum*, *A. veronii* bv. sobria y *A. salmonicida*.

El segundo indicio de la posibilidad de que exista una isla genómica en el género *Aeromonas* lo aportan recientemente Tabei y cols. en 2009. Ellos reportaron una isla para la glicosilación de flagelina y la biosíntesis del antígeno lipopolisacárido O (LPS-O) en *A. caviae* Sch3N. Esta isla parece haber sido adquirida horizontalmente, ya que está flanqueada por elementos de inserción, con un contenido menor de G+C que el promedio del resto del genoma. La mayoría de los productos génicos codificados por la isla son ortólogos de proteínas que han mostrado estar implicados en estas rutas biosintéticas tanto en *C. jejuni* como en *H. pylori*.

Analizando los datos anteriores y aprovechando la diversidad de la cepoteca del grupo de trabajo de *Aeromonas* spp. del laboratorio de Bacteriología Médica, se decidió establecer una estrategia molecular para la búsqueda de islas de patogenicidad mediante genes marcadores de PAI's descritos en otros géneros bacterianos, así como de los principales genes que dan funcionalidad al sistema de secreción tipo IV.

3. JUSTIFICACIÓN

El mecanismo de patogenicidad del género *Aeromonas* es considerado como complejo y multifactorial y no se encuentra totalmente elucidado. Por lo tanto, la determinación de la presencia genes de secreción tipo IV (SSTIV), marcadores de *cag*-PAI de *H. pylori*, como los genes *cagA* y *cagE*, en cepas de *Aeromonas* spp. de origen clínico y ambiental aportará evidencia para sugerir la presencia de una isla de patogenicidad y su relación con el mecanismo de patogenicidad de este microorganismo.

4. HIPÓTESIS

Si las cepas de *Aeromonas* spp. de origen clínico y ambiental presentan los marcadores buscados **entonces** podremos sugerir la presencia de islas de patogenicidad en este género bacteriano.

5. OBJETIVO GENERAL

Investigar la presencia de una isla de patogenicidad en cepas de origen ambiental y clínico del género *Aeromonas* spp.

5.1 Objetivos particulares.

- Detectar la presencia de marcadores de cag-PAI, como los genes *cagE* y *cagA*, en cepas de *Aeromonas* spp. de origen clínico y ambiental mediante PCR.
- Detectar la presencia de la ATPasa *tfc16* de *H. influenzae* homóloga a *virB4* en cepas de *Aeromonas* spp. de origen clínico y ambiental mediante PCR.
- Realizar la búsqueda de los genes *virB2*, *virB9* y *virB11*, marcadores de la presencia de un sistema de secreción tipo IV; en cepas de *Aeromonas* spp. de origen clínico y ambiental mediante PCR.
- Determinar la frecuencia de los genes marcadores de PAI's y establecer las cepas candidato a la búsqueda de PAI's.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

Se estudiaron 118 cepas del género *Aeromonas* que forman parte del cepario del grupo de investigación de *Aeromonas* del laboratorio de Bacteriología Médica de la ENCB – IPN; 63 cepas provienen de casos de diarrea y gastroenteritis del estado de Hidalgo, 41 más de origen ambiental distribuidas de la siguiente manera: 16 fueron aisladas de pescado congelado, 4 provienen de agua de fuentes públicas en España y 21 cepas provienen de muestras de agua de playas de Veracruz. Así mismo se incluyeron 14 cepas de referencia. Todas las cepas trabajadas han sido identificadas y caracterizadas por métodos moleculares en trabajos previos (Aguilera-Arreola, 2002; Alor, 2000; Alvarado-Hernández, 2007; Castro-Escarpulli, 2002). La figura 8 muestra el esquema general de trabajo.

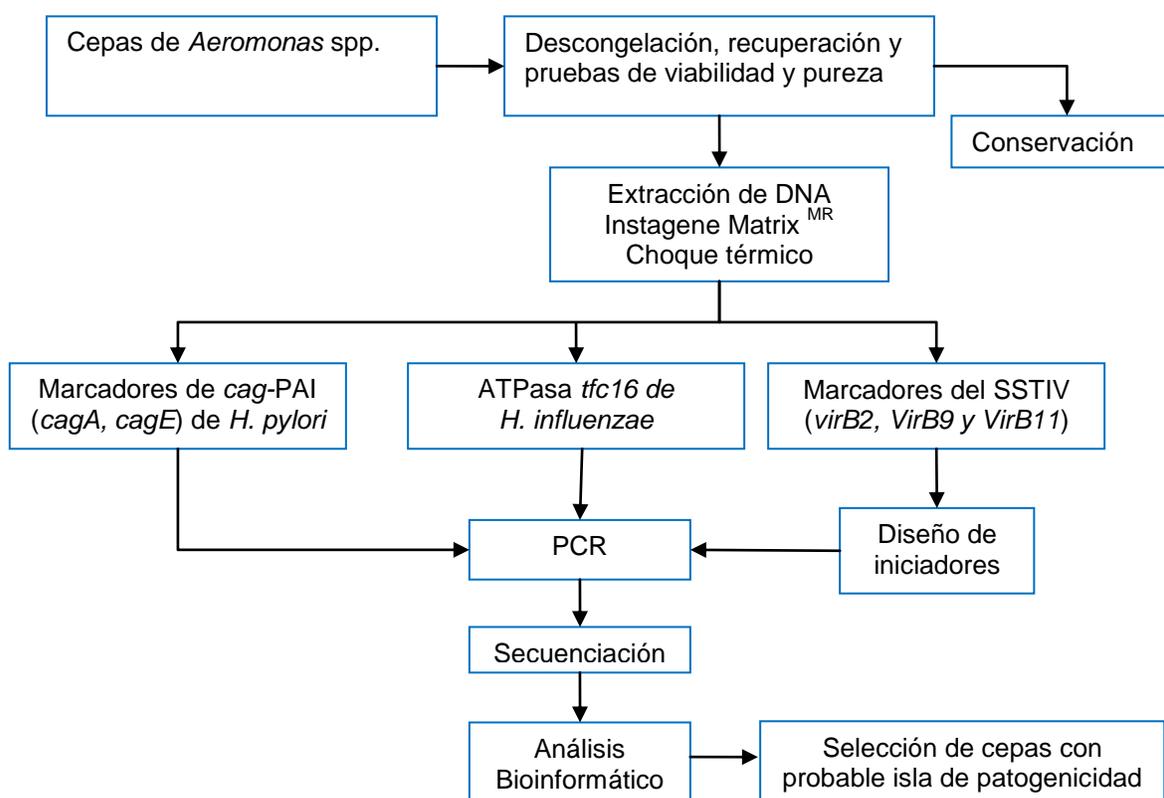


Figura 8. Esquema general de trabajo

6.1. Descongelación, recuperación y pruebas de viabilidad y pureza de las cepas de *Aeromonas* spp. (Alvarado-Hernández, 2007)

Las cepas conservadas en congelación a -70°C en caldo Todd Hewitt con 40% de glicerol; fueron recuperadas mediante la siguiente estrategia:

1. Se raspó el congelado y se sembró por estría cruzada en placas de gelosa Casoy.
2. Las placas se incubaron a 28°C durante 24 a 48 h para cepas de origen ambiental y a 37°C durante 24 h para cepas de origen clínico.
3. Se revisaron las placas y se observó el desarrollo bacteriano.
4. Se comprobó la pureza de la cepa mediante una tinción de Gram y se realizaron pruebas de oxidasa y catalasa.
5. Se seleccionaron las colonias que correspondan a la morfología típica de *Aeromonas* spp.

6.2. Conservación de las cepas. (Alvarado-Hernández, 2007)

Las cepas recuperadas se guardaron durante el desarrollo del presente trabajo en microtubos con medio de mantenimiento a mediano plazo.

6.3. Extracción de DNA.

Para la extracción de DNA se emplearon dos métodos que a continuación se describen:

6.3.1. InstanGene Matrix^{MR} (Alvarado-Hernández, 2007)

1. Se adicionó 1000 µL de agua inyectable en un microtubo de 1.5 mL estéril.
2. Se colocaron de 2 a 3 colonias del cultivo puro y se mezcló con el agua en vórtex por 10 s a velocidad media.
3. Se centrifugaron los tubos en una microcentrífuga a 12 000 x g a 4°C durante 1 min.
4. Se eliminó el sobrenadante.

5. Se le adicionó 200 μL de la matriz de purificación InstaGene Matrix^{MR}.
6. Se incubaron los tubos durante 20 min a 56°C y se mezcló durante 10 s en vórtex a velocidad máxima.
7. Se colocaron los microtubos en un baño de agua hirviendo durante 8 min.
8. Se mezclaron durante 10 s en vórtex a velocidad máxima.
9. Se centrifugó a 12 000 x g a 4°C durante 3 min, la fase acuosa (150 μL) se pasó con una micropipeta a un microtubo nuevo de 600 μL .
10. Se guardó el DNA a – 20°C hasta su uso.

6.3.2. Método de choque térmico (Ruiz-Ruiz, 2007)

1. Se adicionaron 200 μL de agua bidestilada estéril en un microtubo de 600 μL esterilizado por calor húmedo.
2. Se colocaron de 3 a 5 colonias del cultivo puro con asa calibrada roja y se mezcló en vortex a velocidad media.
3. Los tubos se sometieron a calentamiento en baño de agua hirviendo durante 15 a 20 min.
4. Se colocaron inmediatamente en baño de hielo por 15 min o bien congelar a - 20°C hasta su uso.

La concentración y pureza del DNA genómico de cada una de las cepas, se evaluó espectrofotométricamente a una absorbencia de 260 nm, teniendo en cuenta que un valor de DO = 1 equivale a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de DNA. Para observar la integridad del DNA se preparó un gel de agarosa al 0.8% con regulador Tris Acetato EDTA 1X (TAE) y bromuro de etidio (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). En cada pozo del gel se depositaron 8 μL de muestra y 2 μL de regulador de carga tipo IV. El gel se sometió a electroforesis a 70 v durante 90 m con regulador TAE 1X en cámara de electroforesis y se observó en un digitalizador de geles con luz UV (Eagle eye).

6.4. Estandarización de la PCR para la amplificación del gen *cagE* (Ikenoue y cols., 2001; González, 2006)

La búsqueda del gen *cagE* por PCR se llevó a cabo usando los iniciadores propuestos por Ikenoue y cols. (2001) y las condiciones de reacción descritas por González (2006). La secuencia de los iniciadores se muestra en el cuadro 2. Se utilizó como testigo positivo el DNA de la cepa tipo de *H. pylori* ATCC 43504 y como control negativo el DNA de la cepa *E. coli* K12.

Cuadro 2: Iniciadores empleados para la amplificación del gen *cagE* de *H. pylori* en *Aeromonas* spp.

<i>Gen</i>	<i>Iniciador</i>	<i>Secuencia 5' --- 3'</i>	<i>Talla molecular del amplicón (pb)</i>
<i>cagE</i>	F1	GCG ATT GTT ATT GTG CTT GTA G	350
	R1	GAA GTG GTT AAA AAT CAA TGC CCC	

Tomado de: Ikenoue y cols., 2001.

6.4.1. Mezcla de reacción (González, 2006)

La mezcla de reacción se realizó en un microtubo con capacidad para 0.2 mL, agregándose los reactivos como se muestra en el cuadro 3.

Cuadro 3: Mezcla de reacción para la PCR del gen *cagE*.

<i>Mezcla de reacción</i>	<i>Concentración inicial</i>	<i>Concentración final</i>	<i>Cantidades de reactivos (µL)</i>
H ₂ O	-	-	15.8
Regulador	10 X	1 X	2.5
MgCl ₂	50 mM	3 mM	1.5
dNTP's	10 mM	0.8 mM	2.0
Iniciador F1	15 pM	0.6 pM	1
Iniciador R1	15 pM	0.6 pM	1
<i>Taq</i> Pol (Invitrogen)	5 UI/µL	1 UI/µL	0.2

Modificado de: González, 2006.

Se adicionó 1.0 μL de DNA molde a una concentración de 80 ng/mL de cada una de las cepas a probar. Se incluyó el DNA de cepas testigo negativas así como un testigo de reactivos al cual no se le adicionó DNA.

6.4.2. Condiciones de amplificación^(González, 2006).

Las condiciones de reacción iniciales se presentan en el cuadro 4.

Cuadro 4: Condiciones de amplificación para la PCR del gen *cagE*.

<i>Fase</i>	<i>Tiempo (min)</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Número de Ciclos</i>
Desnaturalización Inicial	10:00	94	1
Desnaturalización	1:00	94	35
Alineamiento	1:00	57	
Extensión	1:00	72	
Extensión Final	10:00	72	1

Tomado de: González, 2006

6.4.3. PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

Cada uno de los tubos de reacción fue homogeneizado y colocado en un termociclador marca Biometra modelo T-Gradient y se corrió el programa correspondiente.

6.4.4. Electroforesis de los productos de PCR^(González, 2006).

1. Se preparó un gel al 2% de agarosa con regulador TAE 1X con bromuro de etidio (0.5 $\mu\text{g/mL}$).
2. En cada pozo del gel se depositaron 8 μL de muestra y 2 μL de regulador de carga tipo IV.
3. Se utilizó como marcador de talla molecular Ladder de 100 pb a 1000 pb (Invitrogen).
4. El gel se sometió a electroforesis a un voltaje de 70 v durante 90 min con regulador TAE 1X en una cámara de electroforesis.
5. El gel se observó en un digitalizador de geles con luz U.V

6.4.5. Purificación y secuenciación de los productos de PCR

1. Se separaron los productos de PCR por electroforesis como se indica en el apartado 6.4.4.
2. La banda correspondiente al amplicón deseado se cortó del gel de agarosa usando un bisturí limpio.
3. Se procedió a realizar la extracción del DNA de la matriz del gel usando el kit Pure Link Quick Gel Extraction (Invitrogen) para lo cual se colocó el fragmento de gel en un microtubo de 1.5 mL nuevo y estéril.
4. Se pesó el fragmento del gel y se le adicionó 30 μ L del regulador de solubilización (GS1) por cada 10 mg de agarosa.
5. Se incubó el tubo a 50°C por 15 min, agitando en vórtex a máxima velocidad cada 3 min.
6. Cuando el gel se disolvió totalmente se incubó nuevamente a 50°C por 5 min.
7. Se colocó la mezcla total en una columna de extracción montada sobre un microtubo de 1.5 mL nuevo y estéril y se centrifugó a 12 000 x g por 1 min.
8. Se descartó el filtrado y se lavó la columna con 500 μ L del regulador de solubilización (GS1) incubando a temperatura ambiente por 1 min.
9. Se centrifugó a 12 000 x g por 1 min y se desechó el filtrado.
10. Se adicionó 700 μ L del regulador de lavado (W9) a la columna y se incubó a temperatura ambiente por 5 min.
11. Se centrifugó a 12 000 x g por 1 min y se desechó el filtrado.
12. Se colocó la columna en un microtubo nuevo y estéril y se adicionó 20 μ L de regulador Tris EDTA (TE) previamente calentado a 70°C exactamente en el centro de la pastilla dentro de la columna. Se incubó a temperatura ambiente por 1 min.
13. Se centrifugó a 12 000 x g por 2 min y se almacenó el DNA purificado a -20°C hasta su uso.
14. Se preparó la mezcla para secuenciación de manera individual para ambos iniciadores y se secuenció en el aparato ABI PRISM 3100.

6.5. Estandarización de la PCR para la amplificación del gen *tfc16* de *H. influenzae* en cepas de *Aeromonas* spp. (Espinoza-Mellado, 2009)

La búsqueda del gen *tfc16* de *H. influenzae* homólogo al gen *virB4* de *A. caviae* se realizó mediante PCR usando los iniciadores y las condiciones de reacción estandarizadas por Espinoza-Mellado (2009). La secuencia de los iniciadores se muestra en el cuadro 5. Para la amplificación del gen se utilizó como testigo positivo el DNA de la cepa de *H. influenzae* ATCC 33930 y como control negativo el DNA de la cepa de *E. coli* K12.

Cuadro 5: Iniciadores empleados para la amplificación del gen *tfc16* en *Aeromonas* spp.

<i>Gen</i>	<i>Iniciador</i>	<i>Secuencia 5' --- 3'</i>	<i>Talla molecular del amplicón (pb)</i>
<i>tfc16</i>	F1	TGT AAG AGG GAA AGA CGA TCA AG	277
	R1	CAC CGC GGT TAA AAT AGG TG	

Tomado de: Espinoza-Mellado, 2009.

6.5.1. Mezcla de reacción. (Espinoza-Mellado, 2009)

La mezcla de reacción se realizó en un microtubo con capacidad para 0.2 mL, agregándose los reactivos mostrados en el cuadro 6.

Cuadro 6: Mezcla de reacción para la PCR del gen *tfc16* en *Aeromonas* spp.

<i>Mezcla de reacción</i>	<i>Concentración inicial</i>	<i>Concentración final</i>	<i>Cantidades de reactivos (µL)</i>
H ₂ O	-	-	14.8
Regulador	10 X	1 X	2.5
MgCl ₂	50 mM	4.0 mM	2.0
dNTP's	2 mM	0.2 mM	2.5
Iniciador V4F	10 pM	0.4 pM	1
Iniciador V4R	10 pM	0.4 pM	1
<i>Taq</i> Pol (Invitrogen)	5 UI/µL	1 UI/µL	0.2

Tomado de: Espinoza-Mellado, 2009.

Se adicionó 1.0 µL de DNA molde a una concentración de 80 ng/mL de cada una de las cepas a probar. Se incluyó el DNA de cepas testigo negativas así como un testigo de reactivos al cual no se le adicionó DNA.

6.5.2. Condiciones de amplificación.

Las condiciones de reacción iniciales se presentan en el cuadro 7:

Cuadro 7: Condiciones de amplificación para la PCR del gen *tcf16* en *Aeromonas* spp.

<i>Fases</i>	<i>Tiempo (min)</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Número de Ciclos</i>
Desnaturalización Inicial	7:00	94	1
Desnaturalización	1:00	94	
Alineamiento	1:00	60	30
Extensión	1:00	72	
Extensión Final	7:00	72	1

Tomado de: Espinoza-Mellado, 2009.

6.5.3. PCR

Cada uno de los tubos de reacción fue homogeneizado y colocado en un termociclador marca Biometra y se corrió el programa seleccionado.

6.5.4. Electroforesis de los productos de PCR.

Se realizó según lo indicado en el apartado 6.4.4.

6.5.5. Secuenciación de los productos de PCR.

Se realizó según lo indicado en el apartado 6.4.5. Se seleccionó la cepa de *A. bestiarum* AhA4 y como testigo positivo a *H. influenzae* ATCC 33930.

6.6. Estandarización de la PCR para la amplificación de los genes *virB2*, *virB9* y *virB11*.

Para la amplificación de estos genes se empleó el DNA de la cepa transformante de *E. coli* J53 con el plásmido *pFBAOT6* de *A. caviae* proporcionado por el Dr. Glenn Rhodes del Centre for Ecology and Hydrology en Lancaster, Inglaterra como testigo positivo y el DNA de la cepa de *E. coli* K12 como testigo negativo.

6.6.1. Diseño de los iniciadores.

Las secuencias de DNA plasmídico de los genes *virB2*, *virB9*, *virB11*; se obtuvieron de la base de datos del genbank del Nacional Center for Biotechnology (NCBI). Con estas secuencias se realizaron alineamientos empleando el programa CLUSTAL W. Los iniciadores se diseñaron usando el programa Primer 3 y DNAMAN. Se determinaron parámetros fisicoquímicos como %G-C y %T-A, T_m, complementaridad entre todos los iniciadores y formación de estructuras secundarias, con el objetivo de estandarizar una PCR múltiple.

6.6.2. Mezcla de reacción.

La mezcla de reacción se realizó en un microtubo con capacidad para 0.2 mL, agregándose los reactivos mostrados en el cuadro 8.

Cuadro 8: Mezcla de reacción para la PCR de los genes *virB2*, *virB9* y *virB11*.

<i>Mezcla de reacción</i>	<i>Concentración Inicial</i>	<i>Concentración final</i>	<i>Cantidades de reactivos (μL)</i>
H ₂ O	-	-	13.7
Regulador	10 X	1 X	2.5
MgCl ₂	50 mM	3.0 mM	1.5
dNTP's	2 mM	0.16 mM	2.0
Iniciador V2, V9 ó V11F	0.1 μM	6 nM	1.5
Iniciador V2, V9 ó V11R	0.1 μM	6 nM	1.5
<i>Taq</i> Pol (Invitrogen)	5 UI/μL	1.5 UI/μL	0.3

Se adicionó 2.0 μ L de DNA molde a una concentración de 80 ng/mL de cada una de las cepas a probar. Se incluyó el DNA de cepas testigo negativas así como un testigo de reactivos al cual no se le adicionó DNA.

6.6.3. Condiciones de amplificación.

Las condiciones de reacción iniciales se presentan en el cuadro 9:

Cuadro 9: Condiciones de amplificación para la PCR de los genes *virB2*, *virB9* y *virB11*.

<i>Fases</i>	<i>Tiempo (min)</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Número de Ciclos</i>
Desnaturalización Inicial	7:00	94	1
Desnaturalización	1:00	94	35
Alineamiento	1:00	52	
Extensión	1:00	72	
Extensión Final	7:00	72	1

6.6.4. PCR

Cada uno de los tubos de reacción fue homogeneizado y colocado en un termociclador marca Biometra y se corrió el programa seleccionado.

6.6.5. Electroforesis de productos de PCR.

Se realizó según lo indicado en el apartado 6.4.4.

6.6.6. Secuenciación de los productos de PCR.

Se realizó según lo indicado en el apartado 6.4.5. Se seleccionó una cepa de *A. caviae* 5.2 y como testigo positivo los amplicones del plásmido *pFBAOT6* de la cepa transformante *E. coli* J53.

6.7. Estudio bioinformático de marcadores de islas de patogenicidad.

6.7.1. Análisis bioinformático de la proteína CagE

Se descargó la secuencia de CagE ([YP_001910298](#)) de la base de datos de proteínas del NCBI ([URL 1](#)). Los homólogos (secuencias de proteínas y DNA) se buscaron mediante la opción PSI-BLAST en la base RefSeq mostrando los 100 mejores resultados; los parámetros restantes se manejaron según lo recomienda el programa. De las secuencias mostradas se seleccionaron microorganismos de diversos géneros y especies cuyo valor de expectación osciló entre los 0.0 y 1.0×10^{-4} . Las secuencias se descargaron a un archivo *.txt en formato FASTA.

Se realizaron alineamientos de las secuencias de proteínas por métodos reiterativos y progresivos; las puntuaciones obtenidas por cada uno de ellos fueron evaluadas en los programas “GenDoc” y “T-Coffee Core” para determinar el mejor alineamiento. Se obtuvieron logos de las regiones más conservadas así como el modelo reportado en la base de datos “SwissProt” para la proteína CagE. A partir del alineamiento con la mejor puntuación; se realizó el alineamiento del DNA por traducción inversa usando el programa “tranalign” del servidor “EMBOSS” ([URL 5](#)) el cuál se guardó en formato fasta (DNA cagE.fasta). Se empleó el programa “MEGA 4” para la construcción del árbol filogenético, para lo cual el archivo se convirtió a formato meg; se realizó el cálculo de distancias con 4 modelos evolutivos (distancia p, Jukes Cantor, Kimura 2 Parámetros y Tajima Nei) y se seleccionó el modelo evolutivo que mejor explica los datos. La construcción del árbol filogenético se realizó usando método de Unión de Vecinos (“Neighbor Joining” ó NJ) y el método de promedios aritméticos de pares de grupos sin peso (UPGMA) y “bootstrap” de 1000 repeticiones.

6.7.2. Búsqueda de marcadores de islas de patogenicidad mediante el programa IslandPath.

Se obtuvo el genoma completo de *A. hydrophila* ATCC 7966 (clave de acceso: NC_008570) y *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* A449 (clave de acceso: NC_009348) de la base de datos del NCBI. Se alimentó el programa "IslandPath Analysis" disponible en línea (URL 4) con las secuencias obtenidas. Se descargó el archivo visual del resultado y se procedió a analizar e interpretar las imágenes obtenidas.

7. RESULTADOS

7.1. Recuperación de las cepas de *Aeromonas* spp.

El material biológico empleado se recuperó sin problema mediante siembra en medio Casoy. La figura 9 muestra un ejemplo de un cultivo con morfología colonial característica de *A. hydrophila* a las 24 h de incubación.



Figura 9. Morfología colonial de las cepas de *A. hydrophila* sobre gelosa casoy después de 24 h de incubación a 37°C.

A las 104 cepas de *Aeromonas* spp. recuperadas se les comprobó su pureza. El cuadro 10 muestra la identidad y origen de aislamiento de las cepas de trabajo. Se recuperaron 41 cepas de origen ambiental y 63 de origen clínico aisladas de pacientes con cuadros diarreicos y de gastroenteritis del estado de Hidalgo.

Cuadro 10: Identidad y origen de aislamiento de las cepas de *Aeromonas* spp. recuperadas y empleadas en el presente trabajo.

<i>Especie</i>	<i>Cepas de origen clínico</i>	<i>Cepas de origen ambiental</i>		
		<i>Agua dulce</i>	<i>Pescado congelado</i>	<i>Agua salada</i>
<i>A. hydrophila</i>	25			7
<i>A. bestiarum</i>		4	6	
<i>A. salmonicida</i>			6	
<i>A. caviae</i>	25			14
<i>A. veronii</i> bv sobria	12		4	
<i>A. trota</i>	1			
Total (n=104)	63	4	16	21

Además de las 104 cepas de origen clínico y ambiental se recuperaron 14 cepas tipo. El cuadro 11 muestra la identidad y número de colección de las cepas empleadas como material de trabajo.

Cuadro 11: Cepas de referencia de *Aeromonas* spp. recuperadas.

<i>Grupo de Hibridación</i>	<i>Genoespecie</i>	<i>Cepa Tipo</i>	
		ATCC	CECT
1	<i>A. hydrophila</i>	7966	839
2	<i>A. bestiarum</i>	51108	4227
3	<i>A. salmonicida</i>	33658	894
4	<i>A. caviae</i>	15468	838
5	<i>A. media</i>	33907	4232
6	<i>A. eucrenophila</i>	23309	4224
7	<i>A. sobria</i>	43079	4245
8	<i>A. veronii</i>	9071	-
9	<i>A. jandaeii</i>	49568	4228
10	<i>A. veronii</i> bv. veronii	35624	4257
13	<i>Aeromonas</i> gpo. 501	N/A	N/A
14	<i>A. trota</i>	49657	4255
16	<i>A. encheleia</i>	51929	4342
17	<i>A. popoffii</i>	BAA-243	4995

ATCC: American Type Culture Collection. CECT: Colección Española de Cultivos Tipo. N/A: No aplica

7.2. Extracción de DNA.

La figura 10 muestra el corrimiento electroforético del DNA genómico de las cepas de *Aeromonas* spp. en un gel de agarosa al 0.8%. Se emplearon 2 métodos de extracción de DNA: el reactivo comercial InstaGene Matrix^{MR} (BIO-RAD) y el método de choque térmico. Las concentraciones medidas espectrofotométricamente variaron de 367 ng/μL a 4820 ng/μL en los DNA's extraídos con el InstaGene Matrix y de 4570 ng/μL a 23 567 ng/μL en los DNA's extraídos con el método de choque térmico; todas las muestras fueron diluidas para el ensayo de PCR, a una concentración final de 80 ng/mL.

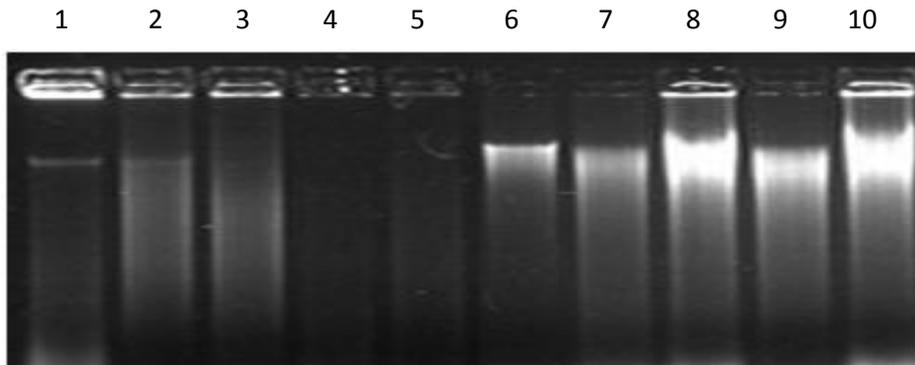


Figura 10. Electroferograma del DNA genómico de las cepas de *Aeromonas* spp.
Carriles 1 a 5: Extracción con InstaGeneMatrix. Carriles 6 a 10: Extracción por choque térmico.

7.3. Determinación del gen *cagE* de *H. pylori*.

7.3.1. Estandarización de la PCR en cepas de *Aeromonas* spp.

Bajo las condiciones iniciales estandarizadas por González en 2006 se logró el amplicón esperado de 350 pb, correspondiente al gen *cagE* de *H. pylori*, con el DNA de la cepa *A. bestiarum* AhA4 donde se observa una banda muy tenue del tamaño esperado y en el DNA de la cepa tipo *H. pylori* ATCC 43504 (figura 11).

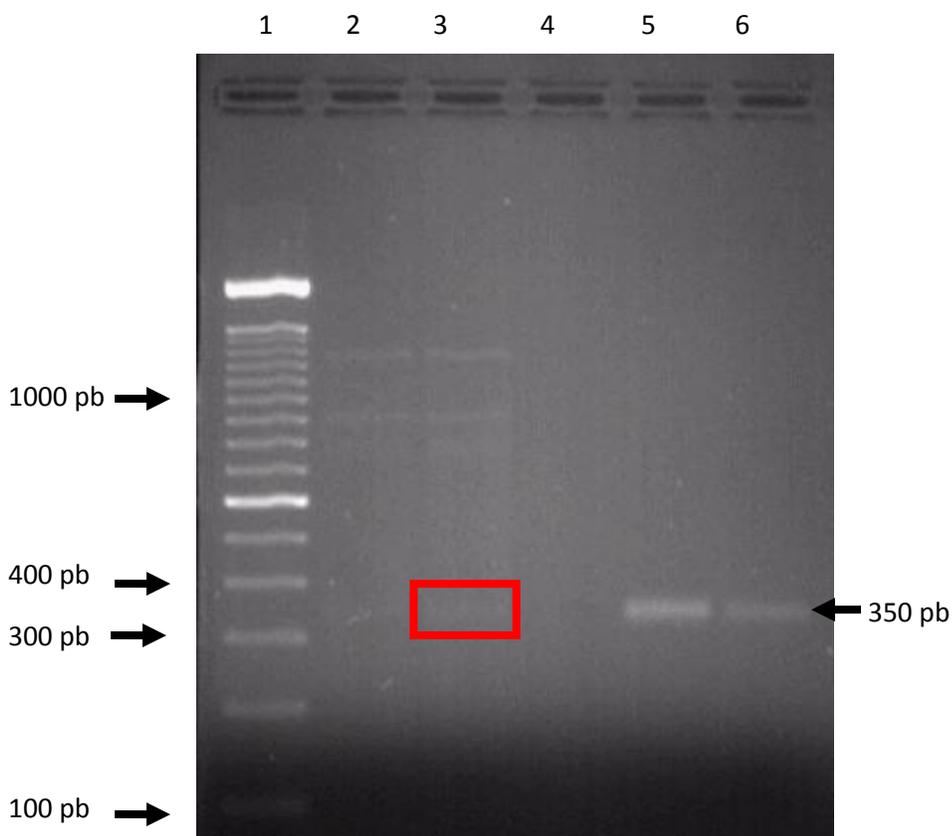


Figura 11. Electroferograma de la amplificación del gen *cagE* (350 pb) bajo las condiciones estandarizadas por González en 2006. Carril 1: Marcador de talla molecular. Carril 2: *A. bestiarum* 112. Carril 3: *A. bestiarum* AhA4. Carril 4: Testigo de reactivos. Carril 5 y 6: *H. pylori* ATCC 43504

Debido a que el método descrito por González en 2006 para amplificar el gen *cagE* en *H. pylori* no funcionó bien en las cepas del género *Aeromonas* probadas, se decidió realizar cambios a dicha técnica. Inicialmente se modificaron las cantidades de DNA molde y temperatura de alineamiento mediante PCR en gradiente. Para esta estandarización de parámetros se usó exclusivamente la cepa *A. bestiarum* AhA4 de origen ambiental ya que en el primer ensayo mostró un amplicón tenue, como testigo positivo se empleó el DNA de *H. pylori* ATCC 43504 y como testigo negativo el DNA de *E. coli* K12 (figura 12).

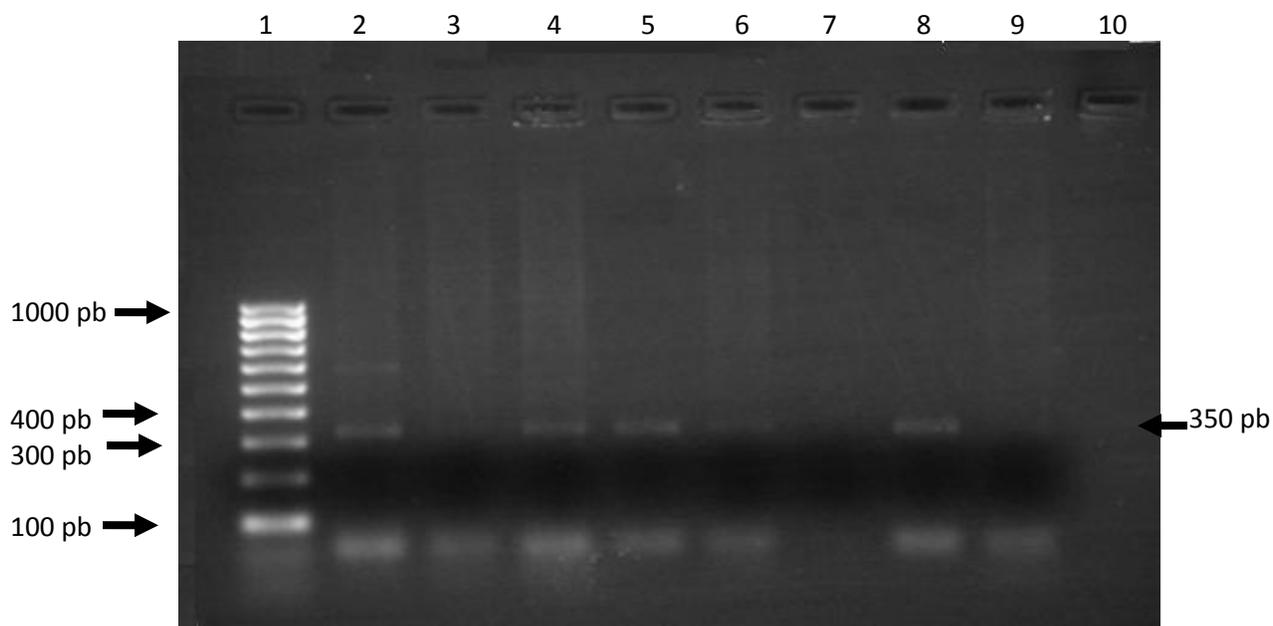


Figura 12. Electroferograma de la estandarización de la PCR del gen *cagE* (350 pb).

Carril 1: Marcador de talla molecular. **Carril 2:** *A. bestiarum* AhA4 con 0.5 UI/μL de *Taq* a 57°C. **Carril 3:** *A. bestiarum* AhA4 con 240 ng/mL de DNA a 57°C. **Carril 4:** *A. bestiarum* AhA4 con 0.5 UI/μL de *Taq* y 240 ng/mL de DNA a 57°C. **Carril 5:** *H. pylori* (testigo positivo) a 57°C. **Carril 6:** *H. pylori* (testigo positivo) a 58°C. **Carril 7:** *A. bestiarum* AhA4 a 58°C. **Carril 8:** *H. pylori* (testigo positivo) a 59°C. **Carril 9:** *A. bestiarum* AhA4 a 59°C. **Carril 10:** Cepa de *E. coli* K 12 (testigo negativo) a 57°C.

Después de los ajustes realizados, la mezcla de reacción estandarizada en las que se logró la amplificación del gen *cagE* en cepas de *Aeromonas* spp. se muestran en el cuadro 12 y 13:

Cuadro 12: Mezcla de reacción estandarizada para la amplificación del gen *cagE* en cepas de *Aeromonas* spp.

<i>Mezcla de reacción</i>	<i>Concentración inicial</i>	<i>Concentración final</i>	<i>Cantidades de reactivos (μL)</i>
H ₂ O	-	-	14.8
Regulador	10X	1X	2.5
MgCl ₂	50 mM	3 mM	1.5
dNTP's	10 mM	0.8 mM	2.0
Iniciador F1	15 pM	0.6 pM	1.5
Iniciador R1	15 pM	0.6 pM	1.5
DNA molde	80 ng/mL	-	2.0

Cuadro 13: Condiciones de amplificación estandarizadas para la PCR del gen *cagE*.

<i>Fases</i>	<i>Tiempo (min)</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Número de Ciclos</i>
Desnaturalización Inicial	7:00	94	1
Se adicionó 0.2 µL de enzima <i>Taq</i> Polimerasa (5 UI/µL)			
Desnaturalización	1:00	94	35
Alineamiento	1:00	57	
Extensión	1:00	72	
Extensión Final	7:00	72	1

El volumen final fue de 25 µL. Se adicionaron 0.2 µL de enzima *Taq* Polimerasa (Invitrogen) (5 UI/µL) al terminar los 7 min del proceso de desnaturalización inicial (PCR en Hot Start). Se incluyó DNA de las cepas testigo negativas así como un testigo de reactivos al cual no se le adicionó DNA.

7.3.2. PCR para la amplificación del gen *cagE*.

Una vez estandarizados los parámetros, se analizaron en búsqueda del gen *cagE*, 104 cepas de origen clínico y ambiental así como las 14 cepas tipo de *Aeromonas* spp. La figura 13 muestra un producto de PCR de 350 pb detectado en cepas ambientales cuyo DNA se extrajo con el kit comercial InstaGene Matrix. La figura 14 muestra el mismo producto de PCR de 350 pb, sin embargo, en este caso se empleó el método de choque térmico para extraer el DNA de las cepas ambientales de *Aeromonas* spp.

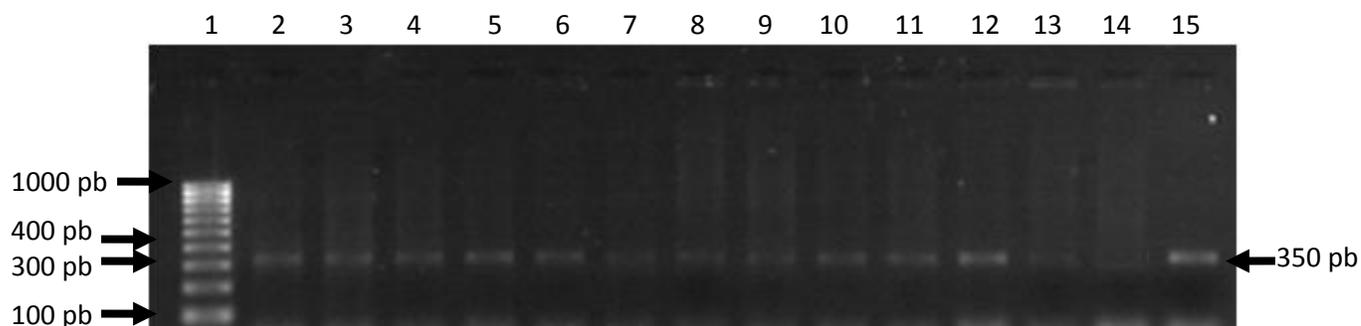


Figura 13. Electroferograma de amplificación del gen *cagE* (350 pb) mediante PCR, en cepas ambientales de *Aeromonas* spp. (Extracción por InstaGene Matrix). Carril 1: Marcador de talla molecular. Carril 2: *A. salmonicida* 32. Carril 3: *A. salmonicida* 37. Carril 4: *A. salmonicida* 40. Carril 5: *A. veronni* bv. sobria 47. Carril 6: *A. veronni* bv. sobria 47. Carril 7: *A. bestiarum* 112. Carril 8: *A. bestiarum* 104. Carril 9: *A. bestiarum* 114. Carril 10: *A. bestiarum* 119. Carril 11: *A. veronni* bv. sobria 136. Carril 12: *A. bestiarum* 156. Carril 13: *A. bestiarum* AhA4. Carril 14: Testigo negativo. Carril 15: *H. pylori* ATCC 43504 (testigo positivo).

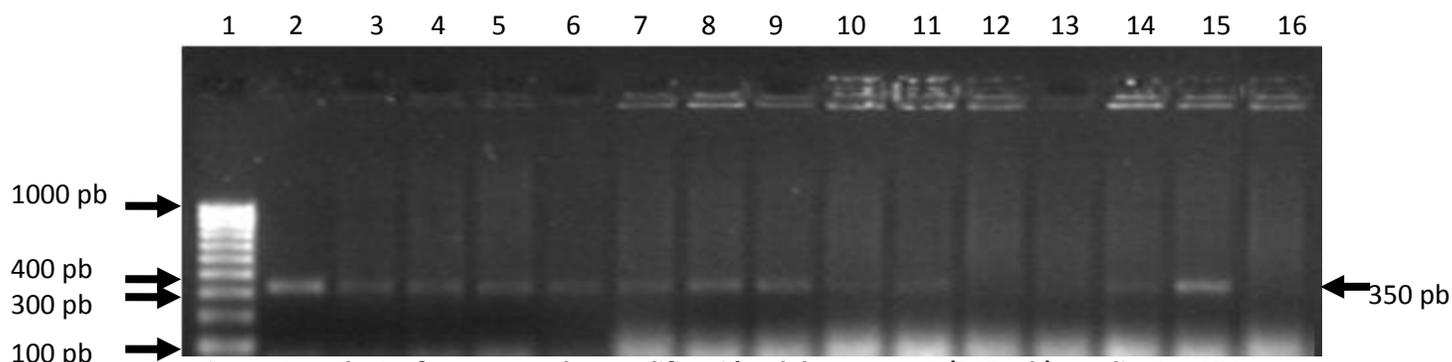


Figura 14. Electroferograma de amplificación del gen *cagE* (350 pb) mediante PCR, en cepas ambientales de *Aeromonas* spp. (Extracción por choque térmico). Carril 1: Marcador de talla molecular. Carril 2: *H. pylori* ATCC 43504 (testigo positivo). Carril 3: *A. bestiarum* AhA5. Carril 4: *A. veronni* bv. sobria AhA7. Carril 5: *A. bestiarum* As20P. Carril 6: *A. salmonicida* AhA13. Carril 7: *A. salmonicida* 32. Carril 8: *A. salmonicida* 37. Carril 9: *A. salmonicida* 40. Carril 10: *A. bestiarum* 104. Carril 11: *A. bestiarum* 112. Carril 12: *A. bestiarum* 114. Carril 13: *A. bestiarum* 119. Carril 14: *A. bestiarum* AhA4. Carril 15: *A. bestiarum* AhA4. Carril 16: Testigo negativo.

Un total de 23 de las 41 (56%) cepas ambientales probadas presentaron el amplicón del gen *cagE*. Las cepas de referencia y aislamientos clínicos del estado de Hidalgo no presentaron amplicados para este gen (figura 15).

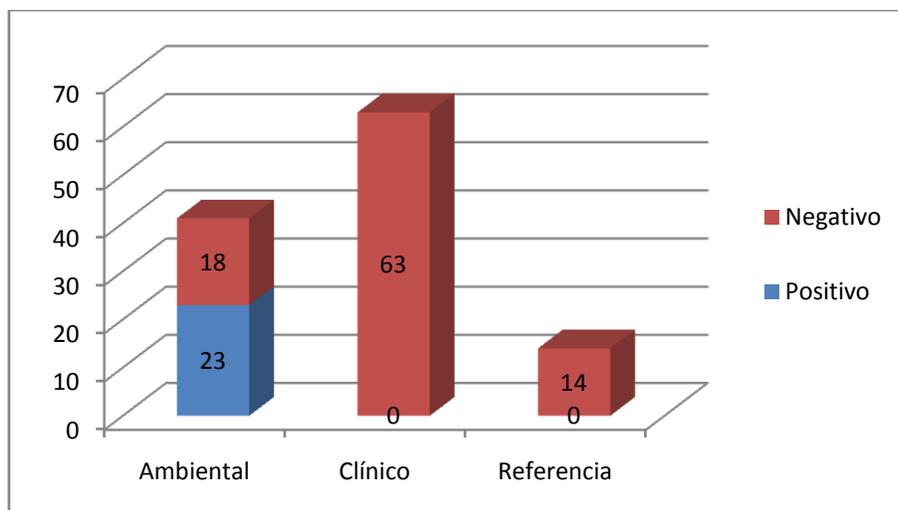


Figura 15. Presencia del gen *cagE* de *H. pylori* en cepas de origen clínico y ambiental de *Aeromonas* spp.

7.3.3. Secuenciación de los productos de PCR

El amplicón de la cepa *A. bestiarum* AhA4 aislada de pescado congelado se seleccionó para realizar la secuenciación, debido a que presentó la mayor concentración de producto purificado de PCR. La figura 16 muestra el electroferograma de los productos de PCR del gen *cagE* después de la purificación con el kit Pure Link (Invitrogen) en un gel de agarosa al 2%.

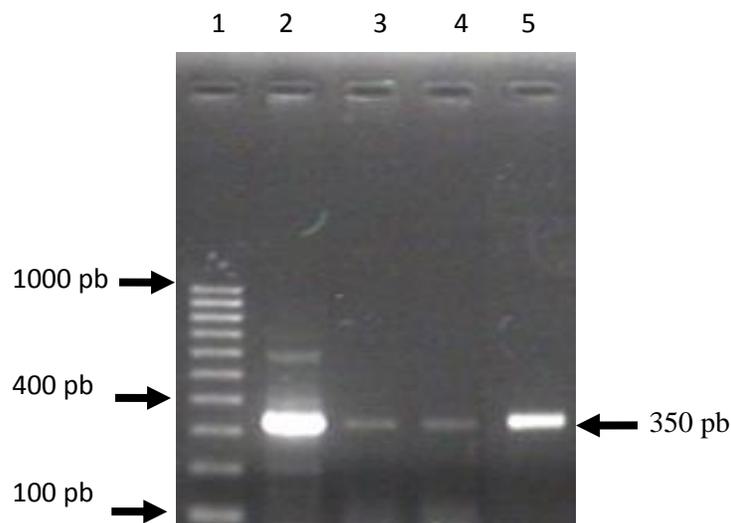


Figura 16. Electroferograma de los productos de PCR del gen *cagE* purificados. Carril 1: Marcador de talla molecular. Carril 2: Amplicón sin purificar de la cepa de *A. bestiarum* AhA4. Carriles 3 y 4: Amplicones purificados de la cepa de *A. bestiarum* AhA4. Carril 5: Amplicón purificado de *H. pylori* ATCC 43504 (testigo positivo).

La secuencia consenso obtenida posee una longitud de 272 nt y es presentada en el cuadro 14. El resultado de análisis por BLASTn se muestra en la figura 17 donde se obtiene un porcentaje máximo de identidad de 78% con un valor de expectación de 2×10^{-47} para el gen *cagE* de *H. pylori*.

Cuadro 14: Secuencia del gen *cagE* de la cepa *A. bestiarum* AhA4

Gen	Secuencia
<i>cagE</i>	CTG CCA ATA AGA ATA AAG AGA ACC ACA AAA TCT AAA AAA CAT TCA TAG TTA AAC GGA GAG AAA AAC AAA GCG CTC ACA AGC ATG TCT TCC ATG AAG CCA AGT AAA GAA ATG GCA AAA GAC ATC CAC TTA AAA CCA AAC AGA GAA AAA AGG CTC ATG AAC GCT GCA AAC TCC AAA CCC AAA AAC AAA AAA GGT TTT TTA AAT GAT CGC GCG ATC CAT ACT AAA AAC TAT AAT CTT TCA GGA ATC AAA GAG CGA CAA ACA CAA TAA CAA CCA CA

Sequences producing significant alignments:
(Click headers to sort columns)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AV330644.1	Helicobacter pylori strain Du23:2 cag pathogenicity island section 2, pa	197	309	95%	2e-47	78%
AB191103.1	Helicobacter pylori cagE gene for cag pathogenicity island protein E, co	197	309	95%	2e-47	78%
AB191098.1	Helicobacter pylori cagE gene for cag pathogenicity island protein E, co	197	305	95%	2e-47	78%
AB191096.1	Helicobacter pylori cagE gene for cag pathogenicity island protein E, co	197	305	95%	2e-47	78%
AB191093.1	Helicobacter pylori cagE gene for cag pathogenicity island protein E, co	197	305	95%	2e-47	78%
AB191072.1	Helicobacter pylori cagE gene for cag pathogenicity island protein E, co	197	300	95%	2e-47	78%
AF001439.1	Helicobacter pylori 399, complete genome	197	305	95%	2e-47	78%
AE000511.1	Helicobacter pylori 26695, complete genome	197	309	95%	2e-47	78%

Figura 17. Alineamiento obtenido en el programa BLASTn de la secuencia del gen *cagE* en la cepa *A. bestiarum* AhA4 con la base de datos del Gene Bank.

7.4. Determinación del gen *tfc16* de *H. influenzae* en cepas de *Aeromonas* spp.

7.4.1. Estandarización de la PCR en cepas de *Aeromonas* spp.

Bajo las condiciones iniciales propuestas por Espinoza-Mellado en 2009 se obtuvo el electroferograma mostrado en la figura 18 donde se observa un amplicón de 277 pb en los carriles 14 y 15 correspondiente al gen *tfc16* de *H. influenzae* homólogo a *virB4* en el género *Aeromonas*, de la misma forma, en el carril 10 se observa una señal de poca intensidad del tamaño esperado y corresponde al DNA de la cepa de *A. bestiarum* AhA4.



Figura 18. Electroferograma de la estandarización de la PCR del gen *tfc16* (277 pb) en cepas de *Aeromonas* spp. Carril 1: Marcador de talla molecular. Carril 2: *A. salmonicida* 32. Carril 3: *A. bestiarum* AhA5. Carril 4: *A. veronni* bv. sobria AhA7. Carril 5: *A. bestiarum* As20P. Carril 6: *A. salmonicida* AhA13. Carril 7: *A. salmonicida* 32. Carril 8: *A. salmonicida* 37. Carril 9: *A. salmonicida* 40. Carril 10: *A. bestiarum* AhA4. Carril 11: *A. bestiarum* 112. Carril 12: *A. bestiarum* 114. Carril 13: *A. bestiarum* 119. Carril 14 y 15: Cepa de *H. influenzae* (testigo positivo). Carril 16: Cepa de *E. coli* K12 (testigo negativo). Carril 17: Testigo de reactivos.

Para la estandarización de esta técnica en cepas de *Aeromonas* spp., se realizó una PCR en gradiente de temperatura (figura 19) usando el DNA de la cepa de *A. bestiarum* AhA4 de origen ambiental; como testigo positivo se empleó el DNA de la cepa de *H. influenzae* ATCC 33930 y como testigo negativo el DNA de la cepa de *E. coli* K12.

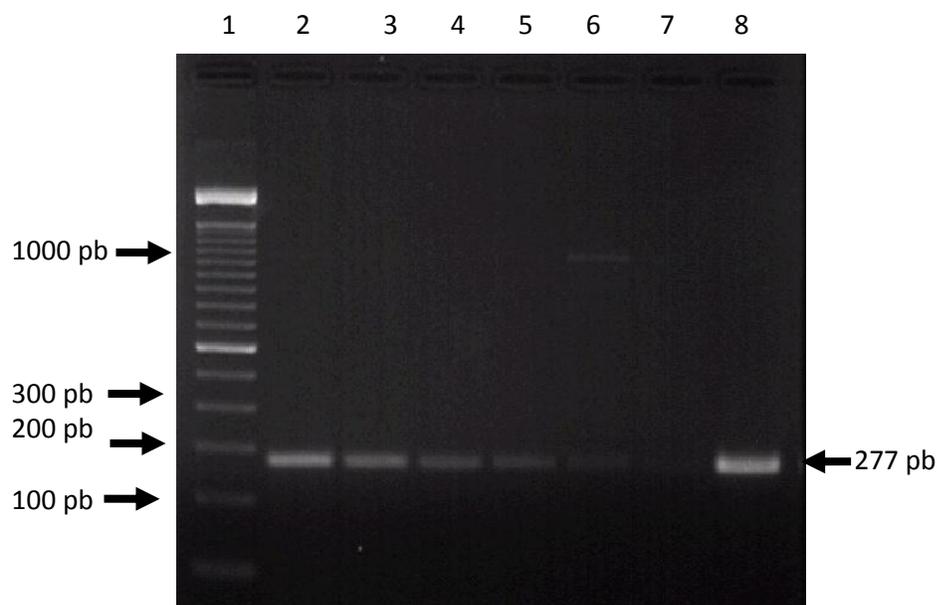


Figura 19. Estandarización de temperatura del gen *tfc16* en cepas de *Aeromonas* spp. **Carril 1:** Marcador de talla molecular. **Carril 2:** *A. bestiarum* AhA4 a 50°C. **Carril 3:** *A. bestiarum* AhA4 a 52°C. **Carril 4:** *A. bestiarum* AhA4 a 54°C. **Carril 5:** *A. bestiarum* AhA4 a 56°C. **Carril 6:** *A. bestiarum* AhA4 a 58°C. **Carril 7:** *A. bestiarum* AhA4 a 60°C. **Carril 8:** Cepa de *H. influenzae* (testigo positivo) a 60°C.

El volumen final fue de 25 μL . Se adicionaron 0.2 μL de enzima *Taq* Polimerasa (Invitrogen) (5 UI/ μL) al terminar los 7 min del proceso de desnaturalización inicial (PCR Hot Start). Las condiciones de reacción estandarizadas se presentan en el cuadro 15.

Cuadro 15: Condiciones de amplificación estandarizadas para la PCR del gen *tfc16* en cepas de *Aeromonas* spp.

<i>Fases</i>	<i>Tiempo (min)</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Número de Ciclos</i>
Desnaturalización Inicial	7:00	94	1
Se adicionó 0.2 μL de enzima <i>Taq</i> Polimerasa (5 UI/ μL)			
Desnaturalización	1:00	94	30
Alineamiento	1:00	50	
Extensión	1:00	72	
Extensión Final	7:00	72	1

7.4.2. PCR para la amplificación del gen *tfc16* de *H. influenzae* en cepas de *Aeromonas* spp.

La figura 20 muestra un producto de PCR de 277 pb que corresponde al gen *tfc16* determinado en las cepas de *Aeromonas* spp.

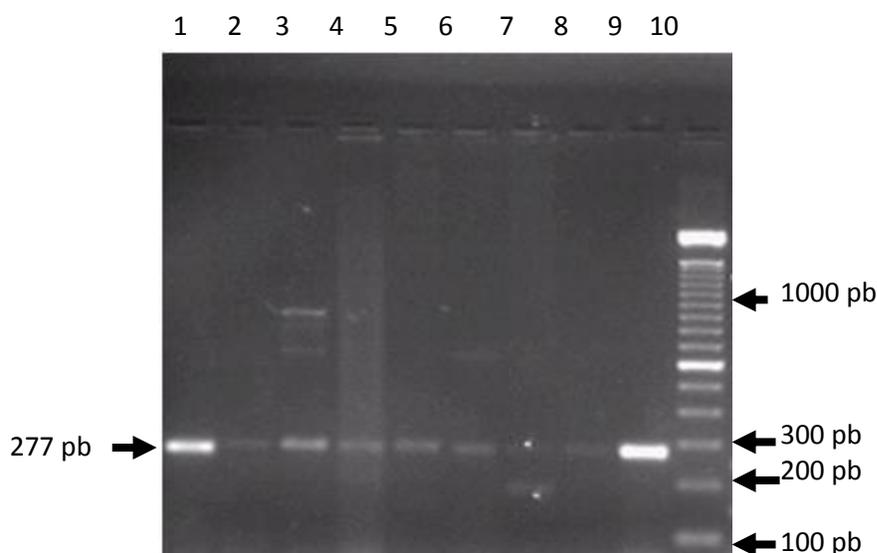


Figura 20. Electroferograma de amplificación del gen *tfc16* de 277 pb en cepas ambientales de *Aeromonas* spp. Carril 1: *A. caviae* 7.5. Carril 2: *A. caviae* 7.4. Carril 3: *A. hydrophila* 11.3. Carril 4: *A. caviae* 4.4. Carril 5 : *A. caviae* 9.2. Carril 6: *A. hydrophila* 8.3. Carril 7: *A. hydrophila* 1.5. Carril 8: *A. caviae* 5.2. Carril 9: *H.influenzae* ATCC 33930 (control positivo). Carril 10: Marcador de talla molecular.

Se observó que 14 de las 41 (34%) cepas ambientales presentaron el amplicón esperado, mientras que ninguna de las cepas de origen clínico ni de referencia presentaron este gen, como se muestra en la figura 21.

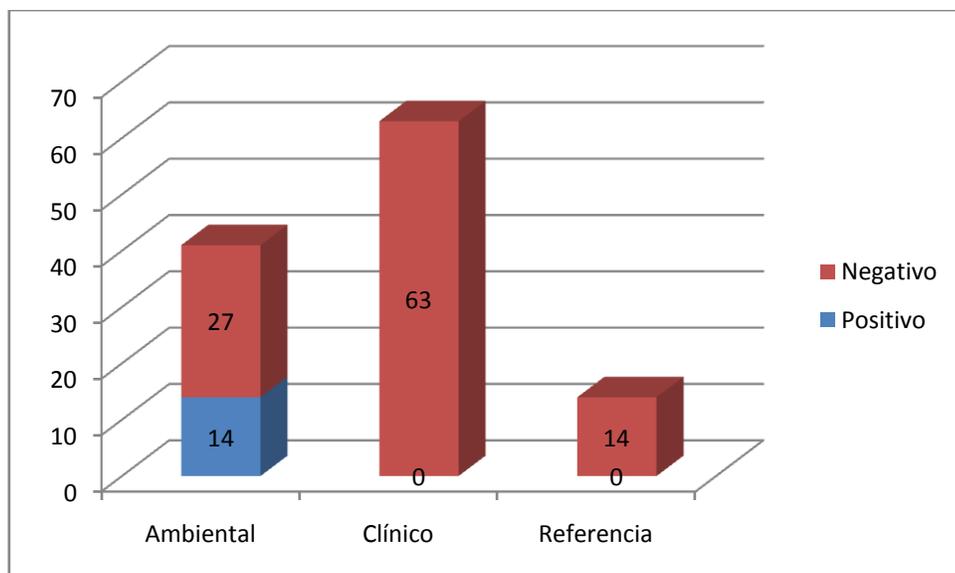


Figura 21. Presencia del gen a *tfc16* de *H.influenzae* homólogo a *virB4* en cepas de origen clínico y ambiental de *Aeromonas* spp.

7.4.3. Secuenciación de los productos de PCR

Se seleccionó la cepa *A. bestiarum* AhA4 de pescado congelado para realizar la secuenciación, debido a que esta cepa se uso para la estandarización de la técnica. La figura 22 muestra el electroferograma de los productos de PCR del gen *tfc16* después de la purificación con el kit Pure Link (Invitrogen) en un gel de agarosa al 2%.

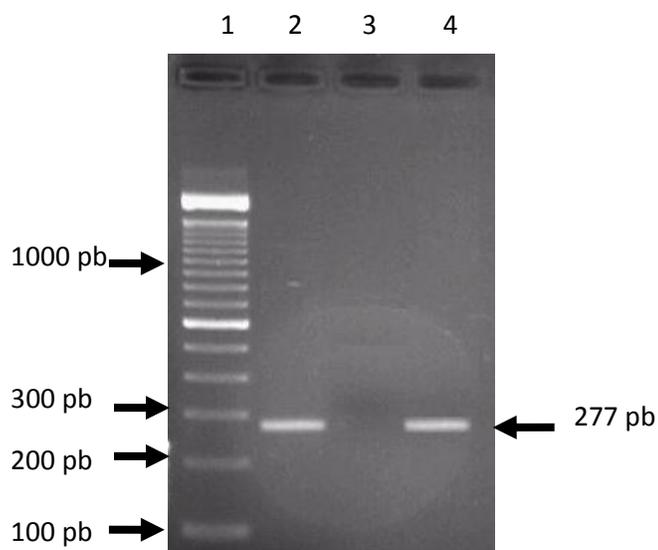


Figura 22. Electroferograma de los productos de PCR del gen *tfc16* purificados. Carril 1: Marcador de talla molecular. Carril 2 y 4: Amplicón purificado de la cepa de *A. bestiarum* AhA4. Carril 3: Testigo de reactivos.

Se obtuvo la secuencia de la cepa de *A. bestiarum* AhA4 cuya longitud es de 249 nucleótidos y se presenta en el cuadro 16. El resultado de análisis por BLASTn se muestra en la figura 23 donde se obtiene un porcentaje de identidad de 100% con un valor de expectación de 2×10^{-126} para el gen *tfc16* de *H. influenzae*.

Cuadro 16: Secuencia del gen *tfc16* de la cepa de *A. bestiarum* AhA4

Gen	Secuencia
<i>tfc16</i>	CTG AGA CTG CCT CAC TGA TAT TCA TTC ATT CTT TCT TGA GG CA GCG CTT CCC GGT GCT ATC AGA CCT GCA GCT AGC TGG CCA GCG TCC CTT GCC CCA TGC GCC GCC AGC GAG CCG GGC AGG TTT TCC TTC CCT CTC CTG CT TGT AGA GCT TCA GGC AAT CAA GGC AAA TAC TGC CGG CAA TGA GTG CCT GGC CCG GCA GGC ATG CTT GTG AAA TTG CAC TGA TTT GAC CAC CTA TTT TAA CCG CGG TGA

Sequences producing significant alignments:
(Click headers to sort columns)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
AM227386.1	Haemophilus influenzae plasmid ICEhin1056	459	459	98%	3e-126	100%	
AM824335.1	Haemophilus influenzae parA gene for chromosome partitioning protein,	453	453	98%	1e-124	99%	
AM824334.1	Haemophilus influenzae parA gene for chromosome partitioning protein,	453	453	98%	1e-124	99%	
CP000057.2	Haemophilus influenzae 86-028NP, complete genome	453	453	98%	1e-124	99%	
CP000436.1	Haemophilus somnus 129PT, complete genome	178	178	82%	2e-41	78%	
AE017143.1	Haemophilus ducreyi strain 35000HP complete genome	147	147	75%	3e-32	76%	
CP000947.1	Haemophilus somnus 2336, complete genome	122	122	93%	1e-24	71%	
AM502716.1	Bordetella petrii strain DSM 12804, complete genome	42.8	42.8	15%	0.87	82%	
CP000170.1	Burkholderia xenovorans LB400 chromosome 1, complete sequence	42.8	42.8	15%	0.87	82%	
CB538724.4	Mouse DNA sequence from clone RP23-81N12 on chromosome X Contai	42.8	42.8	22%	0.87	78%	
AF17740.1	Pseudomonas putida clc transposon	42.8	42.8	15%	0.87	82%	
AF013599.4	Drosophila melanogaster chromosome 2R, complete sequence	41.0	41.0	10%	3.0	92%	E
AC018631.3	Drosophila melanogaster clone BACR03106, complete sequence	41.0	41.0	10%	3.0	92%	
AF935279.5	Zebrafish DNA sequence from clone CH211-195M9 in linkage group 24,	41.0	41.0	10%	3.0	92%	

Figura 23. Alineamiento obtenido en el programa BLASTn de la secuencia del gen *tfc16* en la cepa *A. bestiarum* AhA4 con la base de datos del Gene Bank.

7.5. Determinación de los genes *virB2*, *virB9* y *virB11* del sistema de secreción tipo IV.

7.5.1. Diseño de los iniciadores.

En las figuras 24, 25 y 26 se muestran los resultados del análisis de algunos parámetros fisicoquímicos obtenidos en el programa DNAMAN (versión 3) de los iniciadores diseñados para la amplificación de los genes *virB2*, *virB9* y *virB11* del sistema de secreción tipo IV del género *Aeromonas*.

<p>FWD Oligo: 5'-CCTGGGTTATATGGCCTG-3' Primer1: 18 bases Composition: 2A; 4C; 6G; 6T; 0 OTHER Percentage: 11% A; 22% C; 33% G; 33% T; 0%OTHER MW=5.58 kDa Hybridization: D:D Salt: 50 mM Formamide: 0% Mismatch: 0 bp Thermo Tm = 56.3 °C %GC Tm = 54.9 °C GC+AT Tm = 56.0 °C No complementary found</p>	<p>REW Oligo: 5'-AGCCGCAATAATGAGGTC-3' Primer1: 18 bases Composition 6 A; 4 C; 5 G; 3 T; 0 OTHER Percentage: 33% A; 22% C; 27% G; 16% T; 0%OTHER MW=5.59 kDa Hybridization: D:D Salt: 50 mM Formamide: 0% Mismatch: 0 bp Thermo Tm = 56.2 °C %GC Tm = 52.6 °C GC+AT Tm = 54.0 °C No complementary found</p>
<p>Two primers complementarity. Max complementarity in continuous: 4 bp, free energy= 0.70 Kcal/mol Max complementarity in discontinuous: 8 bp</p>	

Figura 24. Diseño y análisis del iniciador para el gen *virB2*.

<p>FWD Oligo: 5'-GGTGGCATCTATGACAAG -3' Primer1: 19 bases Composition: 5 A; 3 C; 6 G; 4 T; 1 OTHER Percentage: 26% A; 15% C; 31% G; 21% T; 5%OTHER MW=5.93 kDa Hybridization: D:D Salt: 50 mM Formamide: 0% Mismatch: 0 bp Thermo Tm = 54.3 °C %GC Tm = 53.0 °C GC+AT Tm = 57.0 °C</p>	<p>REW Oligo: 5'-CGGTCAGCTCAAAGTTAT-3' Primer1: 18 bases Composition: 5 A; 4 C; 4 G; 5 T; 0 OTHER Percentage: 27% A; 22% C; 22% G; 27% T; 0%OTHER MW=5.56 kDa Hybridization: D:D Salt: 50 mM Formamide: 0% Mismatch: 0 bp Thermo Tm = 51.1 °C %GC Tm = 50.3 °C GC+AT Tm = 52.0 °C</p>
<p>Two primers complementarity. Max complementarity in continuous: 4 bp, free energy= 0.20 Kcal/mol Max complementarity in discontinuous: 7 bp</p>	

Figura 25. Diseño y análisis del iniciador para el gen *virB9*.

FWD	REW
Oligo: 5'-CGCTGGATGATTACGAGA -3'	Oligo: 5'-GGGAGCGCATAAACGTAG-3'
Primer1: 19 bases	Primer1: 18 bases
Composition 5A; 3C; 6G; 4T; 1 OTHER	Composition 6A; 3C; 7G; 2T; 0 OTHER
Percentage: 26% A; 15% C; 31% G; 21% T; 5%OTHER	Percentage: 33% A; 16% C; 38% G; 11% T; 0%OTHER
MW=5.93 kDa	MW=5.66 kDa
Hybridization: D:D	Hybridization: D:D
Salt: 50 mM	Salt: 50 mM
Formamide: 0%	Formamide: 0%
Mismatch: 0 bp	Mismatch: 0 bp
Thermo Tm = 57.4 °C %GC Tm = 53.0 °C	Thermo Tm = 56.9 °C %GC Tm = 54.9 °C
GC+AT Tm = 57.0 °C	GC+AT Tm = 56.0 °C
Two primers complementarity.	
Max complementarity in continuous: 4 bp, free energy=-3.30 Kcal/mol	
Max complementarity in discontinuous: 7 bp	

Figura 26. Diseño y análisis del iniciador para el gen *virB11*

7.5.2. Estandarización de la PCR para los genes *virB*.

Bajo las condiciones propuestas en los cuadros 8 y 9 y con el DNA plasmídico de la cepa transformante de *E. coli J53* se obtuvo el electroferograma mostrado en la figura 27 donde se observan amplicones de 114 pb para el gen *virB2*, 278 pb para el gen *virB9* y 200 pb para el gen *virB11*.

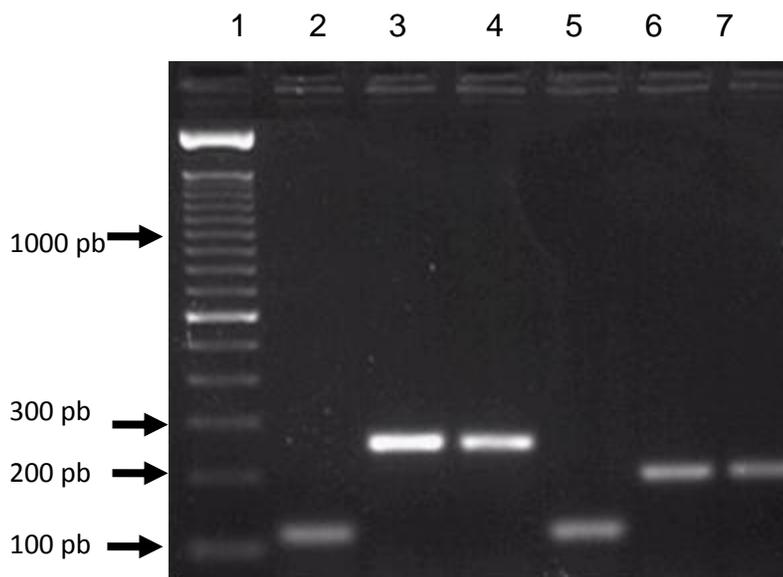


Figura 27. Electroferograma de los productos de amplificación de los genes *virB* en la cepa transformante de *E. coli J53* con el plásmido *pFBAOT6*. Carril 1: Marcador de talla molecular. Carriles 2 y 5: gen *virB2* (114 pb). Carriles 3 y 4: gen *virB9* (278 pb). Carriles 6 y 7: gen *virB11* (200 pb).

Los análisis de complementariedad y T_m de los iniciadores permitían emplearlos en una PCR múltiple, por lo que se decidió probarlos bajo las condiciones iniciales de reacción; obteniendo el electroferograma de la figura 28.

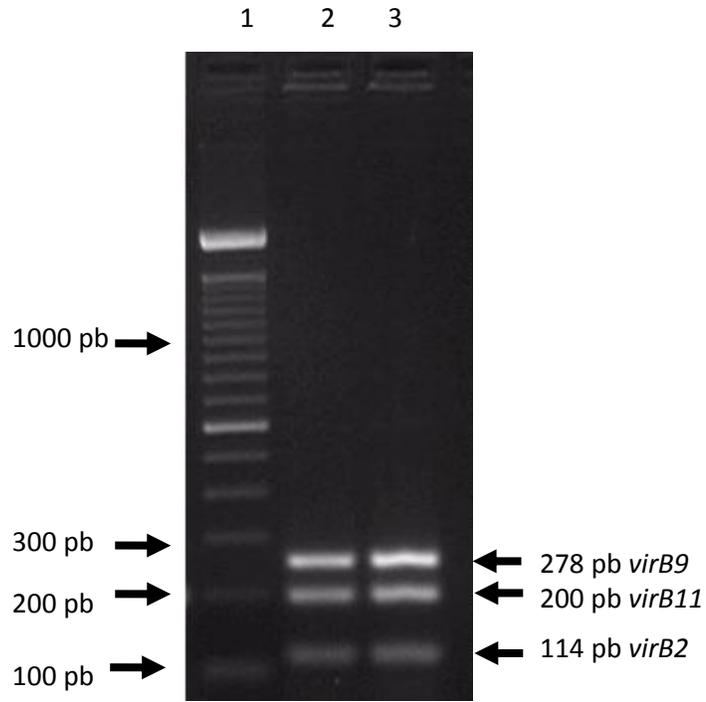


Figura 28. Electroferograma de la PCR múltiple para los genes *virB* en la cepa transformante de *E. coli* J53 con el plásmido *pFBAOT6*. Carril 1: Marcador de talla molecular. Carriles 2 y 3: PCR múltiple para los genes *virB2* (114 pb), *virB9* (278 pb) y *virB11* (200 pb).

Con el objetivo de optimizar la amplificación de los tres genes en una misma reacción, se realizó una PCR en gradiente de temperatura (figura 29). Se usó como testigo positivo el plásmido *pFBAOT6* obtenido de la cepa transformante *E. coli* J53 y como testigo negativo el DNA de la cepa de *E. coli* K12.

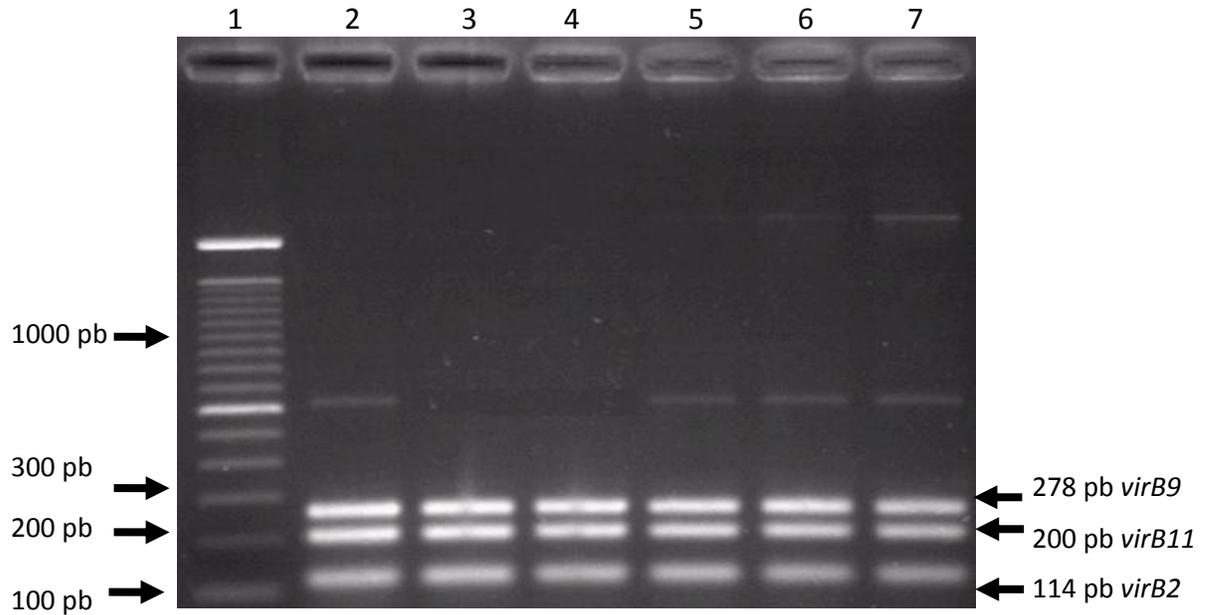


Figura 29. Electroferograma del gradiente de temperatura para la PCR múltiple de los genes *virB* en la cepa transformante de *E. coli* J53 con el plásmido *pFBAOT6*. Carril 1: Marcador de talla molecular. Carril 2: PCR múltiple a 50°C. Carril 3: PCR múltiple a 52°C. Carril 4: PCR múltiple a 54°C. Carril 5: PCR múltiple a 56°C. Carril 6: PCR múltiple a 58°C. Carril 7: PCR múltiple a 60°C.

Con el objetivo de continuar la estandarización de esta técnica, se realizó PCR ajustando la concentración de $MgCl_2$ en cada mezcla de reacción (figura 30).

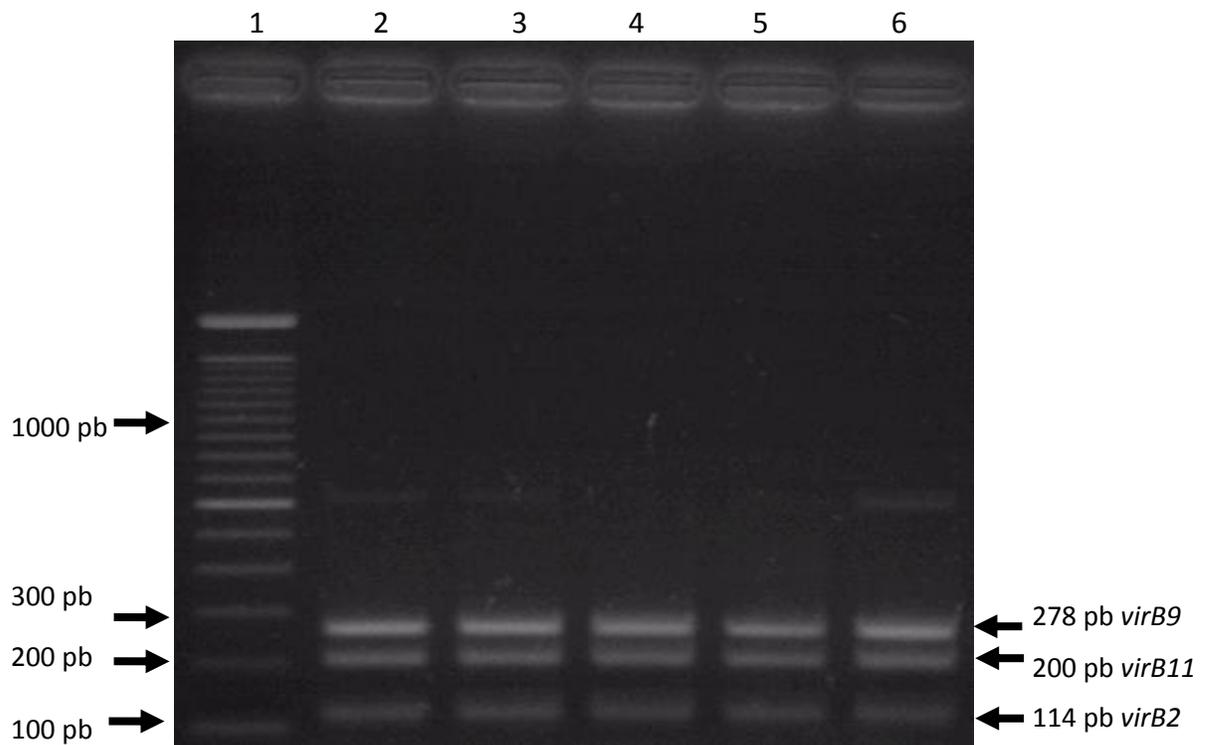


Figura 30. Electroferograma del gradiente de concentración de $MgCl_2$ para la PCR múltiple de los genes *virB* en la cepa transformante de *E. coli* J53 con el plásmido *pFBAOT6*. Carril 1: Marcador de talla molecular. Carril 2: PCR múltiple con 2.2 mM de $MgCl_2$. Carril 3: PCR múltiple con 2.6 mM de $MgCl_2$. Carril 4: PCR múltiple con 3.0 mM de $MgCl_2$. Carril 5: PCR múltiple con 3.4 mM de $MgCl_2$. Carril 6: PCR múltiple con 3.8 mM de $MgCl_2$.

Las condiciones finales de reacción para la PCR múltiple estandarizada para los genes *virB* del sistema de secreción tipo IV se muestran en los cuadros 17 y 18.

Cuadro 17: Mezcla de reacción estandarizada para la PCR múltiple de los genes *virB2*, *virB9* y *virB11*.

<i>Mezcla de reacción</i>	<i>Concentración inicial</i>	<i>Concentración final</i>	<i>Cantidades de reactivos (μL)</i>
H ₂ O	-	-	11.7
Regulador	10 X	1 X	2.5
MgCl ₂	50 mM	3.0 mM	1.5
dNTP's	2 mM	0.16 mM	2.0
Iniciador V2F	0.1 μM	0.4 nM	1.0
Iniciador V2R	0.1 μM	0.4 nM	1.0
Iniciador V9F	0.1 μM	0.4 nM	1.0
Iniciador V9R	0.1 μM	0.4 nM	1.0
Iniciador V11F	0.1 μM	0.4 nM	1.0
Iniciador V11R	0.1 μM	0.4 nM	1.0
<i>Taq</i> Pol (Invitrogen)	5 UI/μL	1.5 UI/μL	0.3

Cuadro 18: Condiciones de amplificación estandarizadas para la PCR múltiple de los genes *virB2*, *virB9* y *virB11*.

<i>Fases</i>	<i>Tiempo (min)</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Número de Ciclos</i>
Desnaturalización Inicial	7:00	94	1
Desnaturalización	1:00	94	
Alineamiento	1:00	54	30
Extensión	1:00	72	
Extensión Final	7:00	72	1

7.5.3. PCR para la amplificación de los genes *virB* en cepas de *Aeromonas* spp.

La figura 31 muestra algunos resultados de la PCR múltiple para los genes *virB* en las cepas de origen clínico de *Aeromonas* spp.

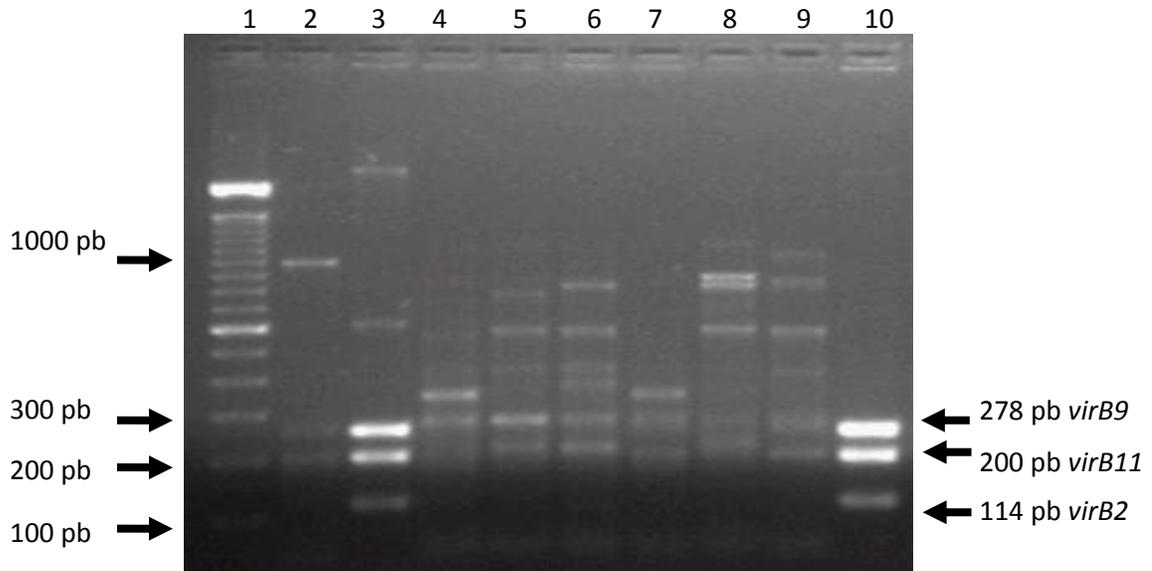


Figura 31. Electroferograma de amplificación de los genes *virB* en cepas de origen clínico de *Aeromonas* spp. Carril 1: Marcador de talla molecular. Carril 2: *A. caviae* Hg 1. Carril 3: *A. caviae* Hg 4. Carril 4: *A. hydrophila* Hg 5. Carril 5: *A. hydrophila* Hg 11. Carril 6: *A. hydrophila* Hg 18. Carril 7: *A. hydrophila* Hg 20. Carril 8: *A. caviae* Hg 21. Carril 9: *A. caviae* Hg 22. Carril 10: *E. coli* J53 (testigo positivo).

La figura 32 muestra algunos resultados de la PCR múltiple para los genes *virB* en las cepas de origen ambiental de *Aeromonas* spp.

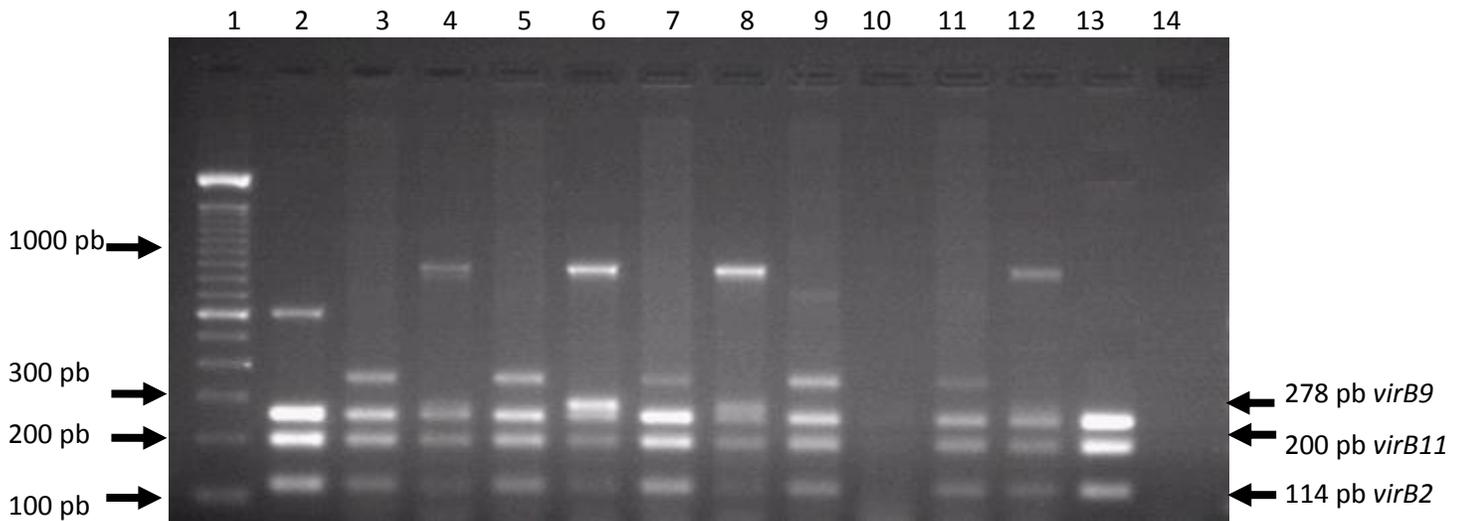


Figura 32. Electroferograma de amplificación de los genes *virB* en cepas de origen ambiental de *Aeromonas* spp. Carril 1: Marcador de talla molecular. Carril 2: *A. salmonicida* 32. Carril 3: *A. bestiarum* 112. Carril 4: *A. bestiarum* 119. Carril 5: *A. salmonicida* 37. Carril 6: *A. salmonicida* 40. Carril 7: *A. bestiarum* 104. Carril 8: *A. bestiarum* 114. Carril 9: *A. veronii* bv. sobria 47. Carril 10: *A. caviae* 2.6. Carril 11: *A. bestiarum* 156 Carril 12: *A. caviae* 4.4. Carril 13: *E. coli* J53 (testigo positivo) Carril 14: Testigo de reactivos.

La figura 33 muestra un resumen de los resultados de la búsqueda de los genes *virB* del SSTIV por PCR en cepas de *Aeromonas* spp. de origen clínico y ambiental.

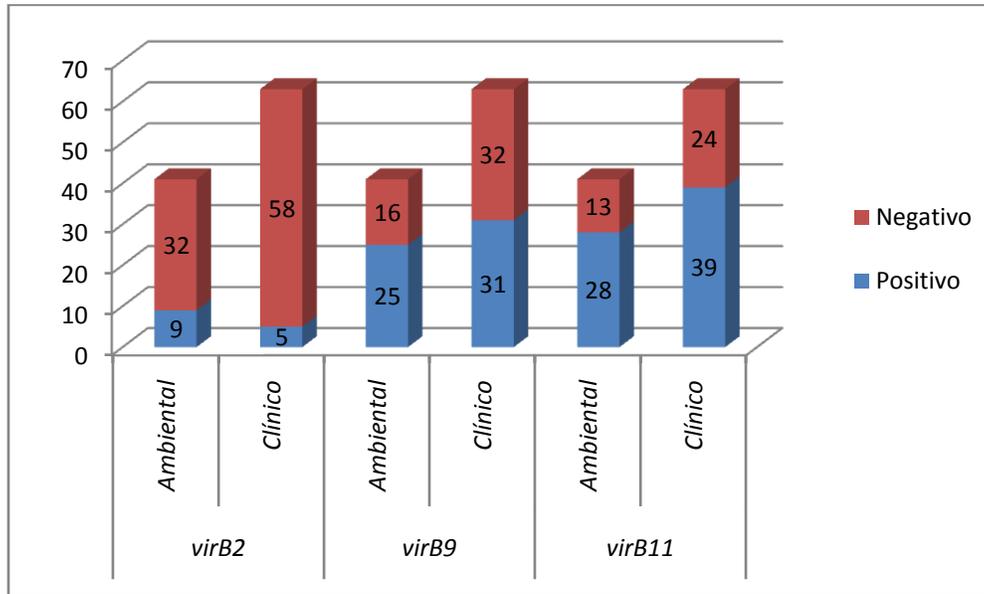


Figura 33. Determinación de los genes *virB* del SSTIV por PCR en cepas de origen clínico y ambiental de *Aeromonas* spp.

7.5.4. Secuenciación de los productos de PCR.

Se determinó la secuencia de los 3 amplicones obtenidos en la PCR múltiple para la cepa *A. caviae* 5.2. La figura 34 muestra el electroferograma de los productos de PCR después de la purificación con el kit Pure Link (Invitrogen) en un gel de agarosa al 2%.

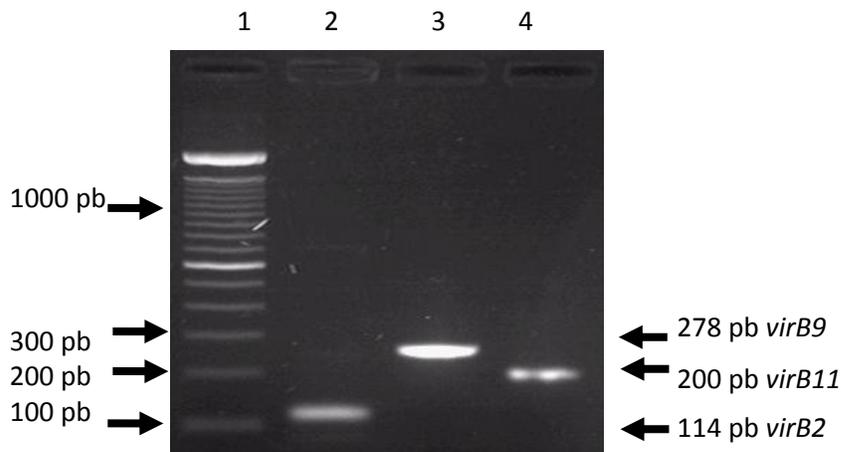


Figura 34. Electroferograma de los productos de PCR de los genes *virB* del SSTIV de la cepa *A. caviae* 5.2. Carril 1: Marcador de talla molecular. Carril 2: gen *virB2* (114 pb). Carril 3: gen *virB9* (278 pb). Carril 4: gen *virB11* (200 pb).

Las secuencias obtenidas para cada gen se presentan en el cuadro 19. La longitud de la secuencia para el gen *virB2* es de 93 nucleótidos, 225 nucleótidos corresponden al gen *virB9* y 152 nucleótidos para el gen *virB1*. El resultado de los análisis por BLASTn se muestra en la figura 35 donde se observan porcentajes de identidad de alrededor del 80% con valores de expectación significativos para los genes del SSTIV del plásmido *pFBAOT6* de *E. coli*.

Cuadro 19: Secuencias de los genes *virB* amplificados por PCR en la cepa *A. caviae* 5.2.

Gen	Secuencia
<i>virB2</i>	CAT GGC CCC CCA ACG GTC ACC AGA CGA TAA AAC CAC AGG AAG TAA CGG CCG CCT CAC CGG TCA GGC GGC CAG CCC AGA CCA CAT AAC CCA GGA
<i>virB9</i>	GGG GGG GAA AAA GAT CAT TAC ACC CCG CCC AGG TCA CAA AAA GAA TTA ACA AAG AGG GAT TTT CTA CAG GGG CAA CAT CCC AAA CCA AGT AAT CAC CAA TAG CAA CAT CGG CGA TAA AGA CAC TTG CAA AAT TGC ACA AGT AGA AAA GCA ACA ATG GAC AAA GAC TCT CGG CAA AAG GGC CGA AAC AAA AAT GAC AGA TAT CAC CAA CGT TCA GAG ATA CAA CCA
<i>virB11</i>	TCC GCT ACC AAA GCC CGA CAA ATG ATG TTT AGG CGA GAC TTG ATC GCC GCC AAA AAA CGC CTT AAA CTT CAG GCT TGC TTG AGT TAA AGA GTT CGT TCA CTT GCT AAG CAG ATG AAT AAT CAA TTA TGG CAA CCC GCT TTT CCC ATA AGC AA

A (Click headers to sort columns)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
DQ401103.1	Aeromonas hydrophila plasmid pRA3, complete sequence	86.0	86.0	98%	2e-14	81%	
CR376602.1	plasmid pFBAOT6 from Aeromonas punctata (Aeromonas caviae) H	86.0	86.0	98%	2e-14	81%	
XM_001702893.1	Chlamydomonas reinhardtii predicted protein (CHLREDRAFT 19484	39.2	39.2	44%	2.9	80%	UG
CT025541.1	Mouse DNA sequence from clone RP23-479F10 on chromosome 17,	39.2	39.2	27%	2.9	92%	
AC166072.2	Mus musculus BAC clone RP23-226J22 from chromosome 3, comple	39.2	39.2	25%	2.9	95%	
AC125140.3	Mus musculus chromosome 17 clone RP24-327D1, complete sequer	39.2	39.2	27%	2.9	92%	

(Click headers to sort columns)

B

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
DQ401103.1	Aeromonas hydrophila plasmid pRA3, complete sequence	120	222	93%	3e-24	80%	
CR376602.1	plasmid pFBAOT6 from Aeromonas punctata (Aeromonas caviae) H	120	222	93%	3e-24	80%	
AP250624.1	Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone: FLbf84105, mRNA se	42.8	42.8	14%	0.75	87%	U
AC158487.2	Capitella capitata clone JGIAUTO-1A15, complete sequence	42.8	42.8	15%	0.75	88%	
CB385064.7	Zebrafish DNA sequence from clone CH211-236H18 in linkage grou	42.8	42.8	20%	0.75	80%	
AL669851.8	Mouse DNA sequence from clone RP23-18K13 on chromosome X Cc	42.8	42.8	12%	0.75	92%	
CP001103.1	Alteromonas macleodii 'Deep ecotype', complete genome	41.0	41.0	14%	2.6	87%	G G G G G G G G G G
XM_002080952.1	Drosophila simulans GD10775 (Dsim\GD10775), mRNA	41.0	41.0	15%	2.6	88%	
XM_001503169.2	PREDICTED: Equus caballus F-box protein 3 (FBXO3), mRNA	41.0	41.0	17%	2.6	85%	
EU832324.1	Synthetic construct Homo sapiens clone HAIB:100067353: DKFZ00C	41.0	41.0	17%	2.6	85%	
EU832409.1	Synthetic construct Homo sapiens clone HAIB:100067438: DKFZ00C	41.0	41.0	17%	2.6	85%	
AB172188.1	Macaca fascicularis brain cDNA clone: OHA-17052, similar to human	41.0	41.0	17%	2.6	85%	
XM_001144906.1	PREDICTED: Pan troglodytes similar to F-box protein 3, transcript v	41.0	41.0	17%	2.6	85%	
XM_001144906.1	PREDICTED: Pan troglodytes similar to F-box protein 3, transcript v	41.0	41.0	17%	2.6	85%	
XM_001144906.1	PREDICTED: Pan troglodytes similar to F-box protein 3, transcript v	41.0	41.0	17%	2.6	85%	
XM_001144685.1	PREDICTED: Pan troglodytes similar to F-box protein 3, transcript v	41.0	41.0	17%	2.6	85%	

C

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
DQ401103.1	Aeromonas hydrophila plasmid pRA3, complete sequence	149	149	92%	4e-33	85%	
CR376602.1	plasmid pFBAOT6 from Aeromonas punctata (Aeromonas caviae) H	149	149	92%	4e-33	85%	
AC087992.7	Homo sapiens chromosome 8, clone RP11-57D13, complete sequen	48.4	48.4	25%	0.038	87%	
CP000961.1	Shewanella woodvi ATCC 51908, complete genome	42.8	42.8	21%	0.47	90%	
XM_769544.1	Cryptococcus neoformans var. neoformans B-3501A hypothetical p	41.0	41.0	16%	1.6	96%	G
AF017346.1	Cryptococcus neoformans var. neoformans JEC21 chromosome 6, c	41.0	41.0	16%	1.6	96%	
XM_571485.1	Cryptococcus neoformans var. neoformans JEC21 translation relea	41.0	41.0	16%	1.6	96%	UG
BX649440.3	Zebrafish DNA sequence from clone CH211-198M12 in linkage grou	41.0	41.0	17%	1.6	92%	
FN357487.1	Schistosoma mansoni genome sequence supercontig Smp_scaff000	39.2	39.2	18%	5.7	92%	G
XM_955681.2	Neurospora crassa OR744 hypothetical protein NCU01254 partial m	39.2	39.2	25%	5.7	82%	
AM174307.2	Vitis vinifera contig VV78X107863.6, whole genome shotgun sequer	39.2	39.2	17%	5.7	92%	
AC124400.4	Mus musculus BAC clone RP24-357O21 from chromosome 14, cont	39.2	39.2	19%	5.7	89%	
BX294015.1	Neurospora crassa DNA linkage group V BAC contig B10N12	39.2	39.2	25%	5.7	82%	

Figura 35. Alineamiento obtenido en el programa BLASTn de la secuencia de los genes *virB2* (A), *virB9* (B) y *virB11* (C) del SSTIV de la cepa *A. caviae* 5.2 con la base de datos del Gene Bank.

7.6. Análisis global de resultados.

La figura 36 muestra un resumen de los resultados de la presencia de los marcadores estudiados en cepas de *Aeromonas* spp. de origen clínico; se observa que el gen *virB11*, que corresponde a una ATPasa del SSTIV se encuentra con mayor frecuencia en estas cepas. Así mismo, se resalta que los genes *cagE* de *H. pylori* o *tfc16* de *H. influenzae* no se encontraron en los casos de diarrea y gastroenteritis del estado de Hidalgo.

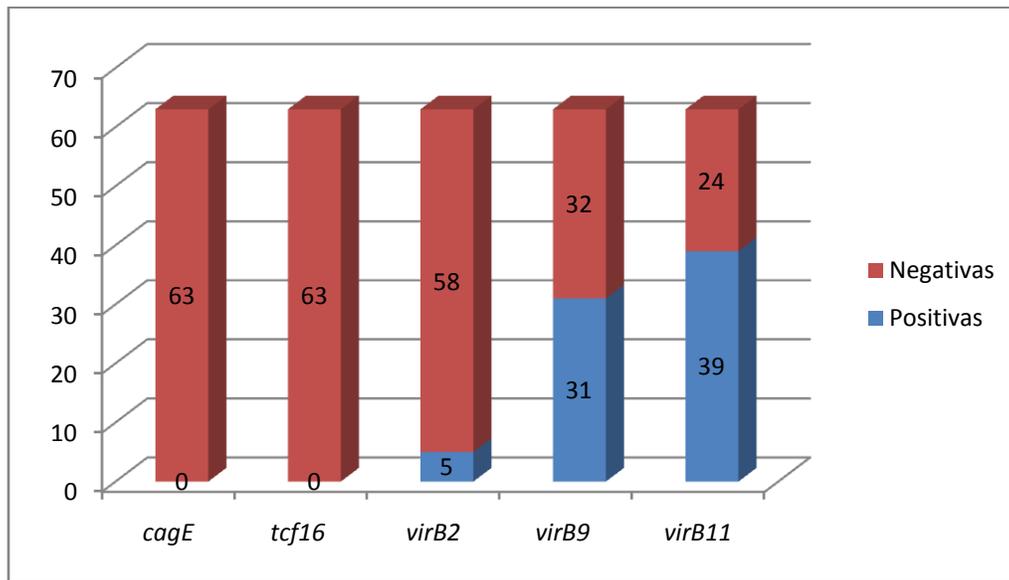


Figura 36. Análisis global de la frecuencia obtenida por PCR de los genes marcadores de PAI's en cepas de origen clínico de *Aeromonas* spp.

La figura 37 muestra un resumen de los resultados de la presencia de los marcadores estudiados en cepas de *Aeromonas* spp. de origen ambiental; se observa que el gen *virB11*, que corresponde a una ATPasa del SSTIV se encuentra con mayor frecuencia en estas cepas, mientras que el gen *virB2* que forma el pili de secreción en este mismo sistema, presentó la menor frecuencia de detección en cepas provenientes de muestras de agua de diversos ambientes.

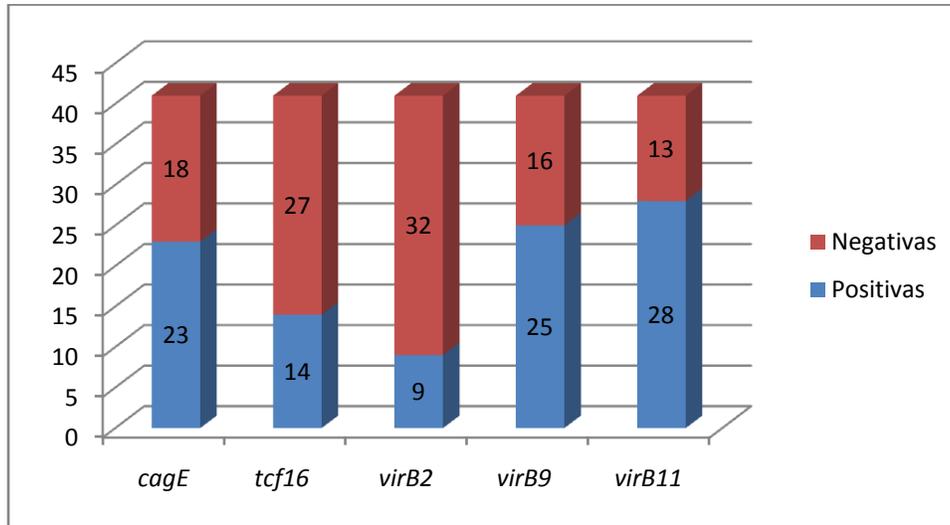


Figura 37. Análisis global de la frecuencia obtenida por PCR de los genes marcadores de PAI's en cepas de origen ambiental de *Aeromonas* spp.

El cuadro 20 muestra la integración de todos los resultados obtenidos para la detección de los marcadores de islas de patogenicidad determinados en este estudio. En el apéndice se muestran los resultados desglosados para cada una de estas cepas.

Cuadro 20: Distribución de los genes marcadores de PAI's determinados en este estudio.

Especies	Origen	Número de aislamientos	Número de aislamientos positivos y frecuencia (%) para los genes probados individualmente				
			cagE	tcf16	virB2	virB9	virB11
<i>A. hydrophila</i>	Ambiental	7	3 (42)	5 (71)	4 (57)	4 (57)	4 (57)
	Clínico	25	0 (0)	0 (0)	0 (0)	13 (52)	11 (44)
<i>A. caviae</i>	Ambiental	14	1 (7)	8 (57)	5 (36)	7 (50)	8 (57)
	Clínico	25	0 (0)	0 (0)	3 (12)	12 (48)	20 (80)
<i>A. veronii</i> bv. sobria	Ambiental	4	4 (100)	0 (0)	0 (0)	2 (50)	3 (75)
	Clínico	12	0 (0)	0 (0)	2 (10)	6 (50)	8 (66)
<i>A. trota</i>	Clínico	1	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>A. salmonicida</i>	Ambiental	6	6 (100)	0 (0)	0 (0)	5 (83)	5 (83)
<i>A. bestiarum</i>	Ambiental	10	9 (90)	1 (10)	0 (0)	7 (70)	8 (80)
Total en cepas de origen ambiental		41	23 (56)	14 (34)	9 (23)	25 (61)	28 (68)
Total en cepas de origen clínico		63	0 (0)	0 (0)	5 (8)	31 (49)	39 (62)

7.7. Estudios bioinformáticos.

7.7.1. Estudio bioinformático de la proteína CagE.

Del resultado obtenido en la búsqueda de homólogos de ATPasas del SSTIV por el programa PSI-BLAST, se seleccionaron 36 secuencias de aminoácidos con su respectiva secuencia de DNA que codifican para la proteínas homólogas a CagE cuyo género, especie y longitud de la secuencia de proteína se muestran en el cuadro 21.

Cuadro 21: Microorganismos incluidos y longitud de la secuencia de su proteína homóloga a CagE.

<i>Microorganismo</i>	<i>Longitud (aa)</i>	<i>Proteína homóloga</i>
<i>Aeromonas_caviae</i>	815	VirB4
<i>Agrobacterium_rhizogenes</i>	789	VirB4
<i>Agrobacterium_tumefaciens</i>	757	VirB4
<i>Agrobacterium_tumefaciens_mut</i>	789	VirB4
<i>Bartonella_tribocorum</i>	823	VblB4 / TrwK
<i>Bordetella_bronchiseptica</i>	824	PtIC
<i>Bordetella_parapertussis</i>	824	PtIC
<i>Brucella_abortus</i>	831	VirB4
<i>Brucella_canis</i>	831	VirB4
<i>Brucella_melitensis</i>	831	VirB4
<i>Brucella_suis</i>	831	VirB4
<i>Campylobacter_coli</i>	922	CmgB3/4
<i>Campylobacter_jejuni</i>	922	CmgB3/4
<i>E_coli_K12</i>	785	TraC
<i>Enterobacter_sakazakii</i>	914	P. hipotética
<i>Erwinia_tasmaniensis</i>	790	TraE
<i>Erwinia_tasmaniensis_mut</i>	824	TraE
<i>H_pylori</i>	981	CagE
<i>H_pylori_26695</i>	983	CagE
<i>H_pyloriP12</i>	983	CagE
<i>Haemophilus_influenzae_aegyptius</i>	807	TraE like / Tfc16
<i>Klebsiella_pneumoniae</i>	866	VirB4
<i>Moraxella_bovis</i>	828	VirB4-like
<i>Proteus_mirabilis</i>	924	P. hipotética
<i>Providencia_rettgeri</i>	823	P. conjugativa
<i>Pseudomonas_syringae_phaseolicola</i>	850	VirB4
<i>Rhizobium_etli</i>	795	VirB4
<i>Salmonella_enterica_ent_Dublin</i>	823	TrbE/TriC
<i>Salmonella_enterica_enterica</i>	841	TrbE/TriC
<i>Shigella_boydii</i>	915	TriC
<i>Stenotrophomonas_maltophilia</i>	815	P. conjugativa
<i>Vibrio_fischeri</i>	817	VirB4
<i>Vibrio_harveyi</i>	752	TraE
<i>Yersinia_pestis</i>	894	TriC / VirB4
<i>Yersinia_pseudotuberculosis</i>	915	TriC / VirB4
<i>Yersinia_pseudotuberculosis_mut</i>	915	TriC / VirB4

El cuadro 22 muestra los resultados de las puntuaciones obtenidas para cada alineamiento de secuencias de proteínas, se seleccionó el programa MUSCLE del servidor EBI para construir la filogenia, debido a que los alineamientos producidos en este programa mostraron las mejores puntuaciones al ser evaluados con los programas GeneDoc y T-Coffee Core.

Cuadro 22: Puntuaciones obtenidas para los alineamientos de proteínas.

Programa	Suma de Pares	Entropía (H)	T-Coffee Consistencia
Clustal W-EBI	9 481 560	3 739 791	68
T- Coffee	9 361 291	3 839 657	72
Expresso	9 361 291	3 839 657	87
Multi Align	7 649 974	4 049 159	69
Dialign2	9 519 054	4 049 159	69
Muscle	9 229 701	3 770 557	70

En la figura 38 se muestra el modelo de la subunidad principal de la proteína CagE (clave de acceso Q48252) a partir de la base de datos SwissProt en la que se señalan los dominios más conservados.

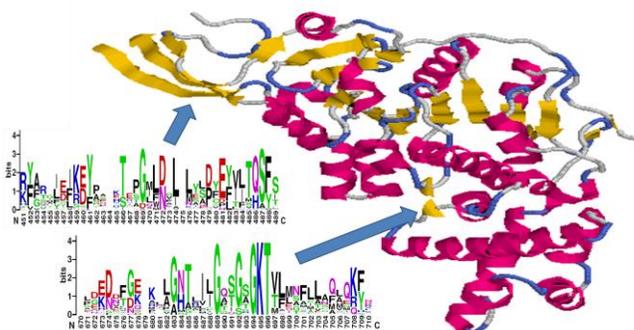


Figura 38. Modelo de la subunidad A de la proteína CagE obtenida de SwissProt.

La representación en web-logo muestra los dominios más conservados de la proteína, el sitio catalítico comprende los residuos de aminoácidos GKT presentes en todos los homólogos a CagE.

Se probaron los modelos evolutivos de Jukes-Cantor y Kimura 2 Parámetros, encontrándose que ambos modelos calculan distancias similares (figura 39), por lo que se decidió emplear el modelo más simple (Jukes Cantor).

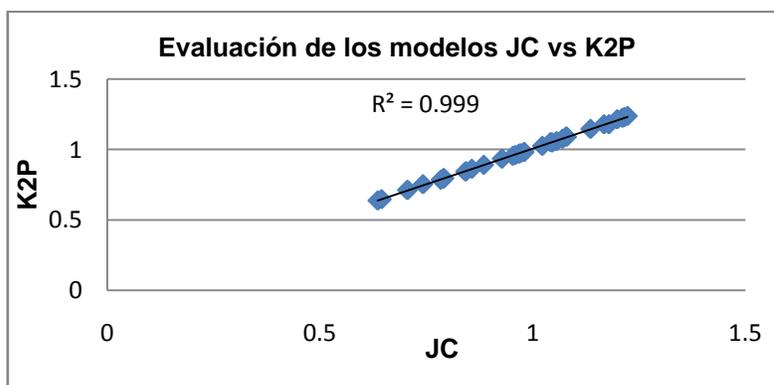


Figura 39. Evaluación de los modelos evolutivos para la reconstrucción del fenograma.

El fenograma se construyó a partir del alineamiento obtenido en Muscle del EBI en el programa MEGA 4 por el método Neighbor Joining (NJ) con el modelo Jukes Cantor (JC) y bootstrap de 1000 repeticiones debido a que estos parámetros explican de manera más clara y precisa las secuencias estudiadas (figura 40).

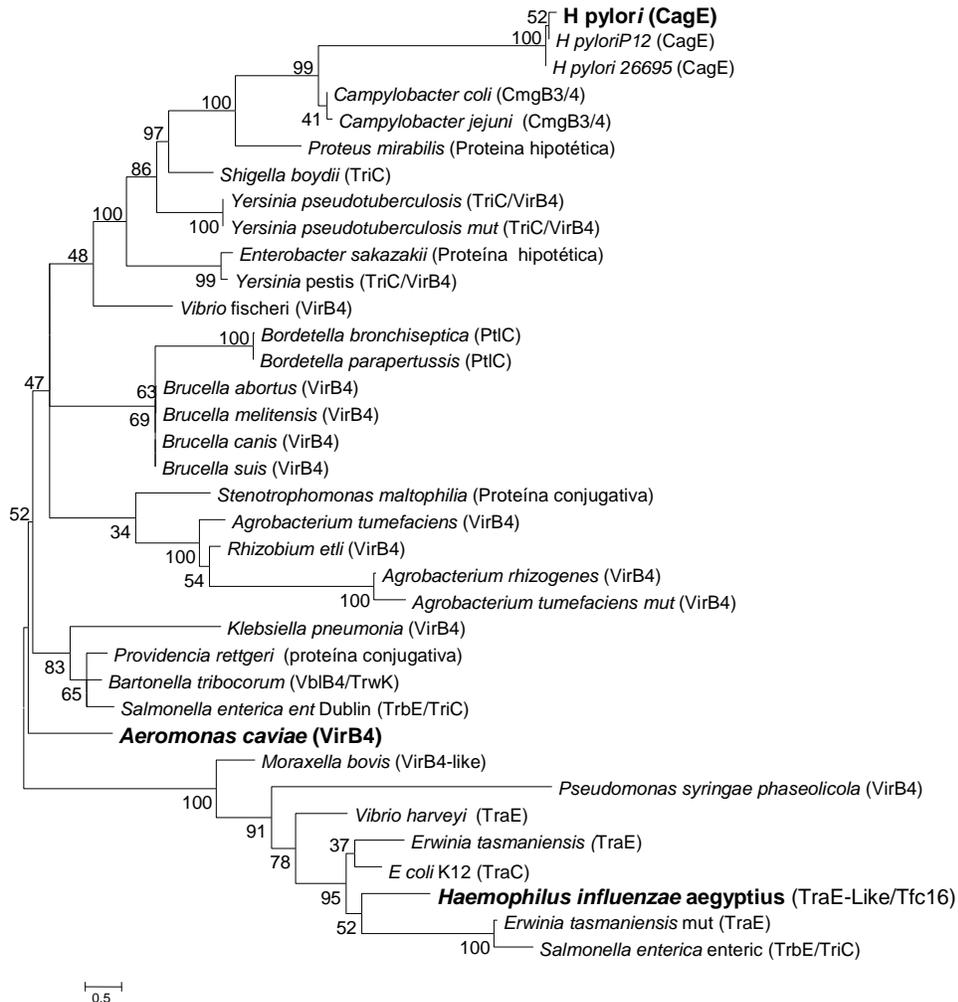


Figura 40. Fenograma obtenido para las ATPasas homólogas a la proteína CagE.
Entre paréntesis se indica el nombre de la proteína correspondiente a cada microorganismo.

7.7.2. Búsqueda de marcadores de islas de patogenicidad mediante el programa IslandPath.

El cuadro 23 muestra el análisis del programa para la cepa de *H. pylori* 26695. Cada círculo representa un único marco abierto de lectura y está coloreado

o marcado de acuerdo con la leyenda al pie del cuadro. Sobre el gráfico obtenido se muestra un cuadro amarillo que marca la ubicación de la isla de patogenicidad *cag-PAI*, una región marcada en azul que indica las proteínas que no están presentes en otras cepas poco virulentas de *H. pylori* y un cuadro rojo muestra una zona de plasticidad que contienen diferentes genes para las distintas especies patógenas de este género.

Cuadro 23: Análisis del genóforo de *H. pylori* ATCC 700392 por el programa IslandPath

Parámetros	Valores
Tamaño del Genoma	1 667 867 pb
Marcos abiertos de lectura	1 576
Pseudo tRNA's	38
Genes de Integrasa	2
Genes de Transposasa	22

Gráfico

El gráfico muestra una representación visual del genoma de *H. pylori* ATCC 700392. El fondo está compuesto de una matriz de círculos de colores (amarillo, azul claro, rosa) que representan predicciones de marcos abiertos de lectura basadas en el contenido de G+C. Las líneas horizontales dentro de los círculos indican variaciones en el uso de codones. Las barras verticales de color negro representan pseudo tRNAs, los cuadros negros representan genes de transposasa y los triángulos negros representan genes de integrasa. Se observan varias regiones destacadas con recuadros de colores: un recuadro amarillo en la parte superior izquierda, un recuadro azul en el centro y un recuadro rojo en la parte inferior derecha.

Cada círculo en el gráfico corresponde a la predicción de un marco abierto de lectura que codifica para un producto dentro del genoma del organismo. El círculo amarillo indica un valor de %G+C mayor que el valor más alto, el círculo azul claro un valor promedio, se establece por defecto +/- 3.48%. El círculo rosa indica un valor menor que el valor más bajo de % de G+C. Las líneas horizontales en los círculos indican regiones con un uso diferente de codones. Las barras verticales de color negro indican un pseudo tRNA entre dos marcos abiertos de lectura. Los cuadros negros indican un gen que codifica para una transposasa, mientras que los triángulos negros indican una integrasa.

Los cuadros 24 y 25 muestran los resultados del programa IslandPath para las cepas, *A. hydrophila* ATCC 7966 y *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* A449 respectivamente. Se señalan en un cuadro rojo las regiones amplias del genóforo que son posibles islas de patogenicidad debido a que poseen un % de G+C menor que el promedio establecido además de que poseen un uso de codones distinto al

resto del genóforo, sin embargo, la anotación reportada por el NCBI no corresponde a genes implicados en la virulencia de estas cepas o bien reporta proteínas hipotéticas aún no descritas. Se sugiere realizar estudios *in vitro* para caracterizar adecuadamente estas regiones y establecer adecuadamente su rol dentro del genóforo bacteriano.

Cuadro 24: Análisis del genóforo de *A. hydrophila* ATCC 7966 por el programa IslandPath

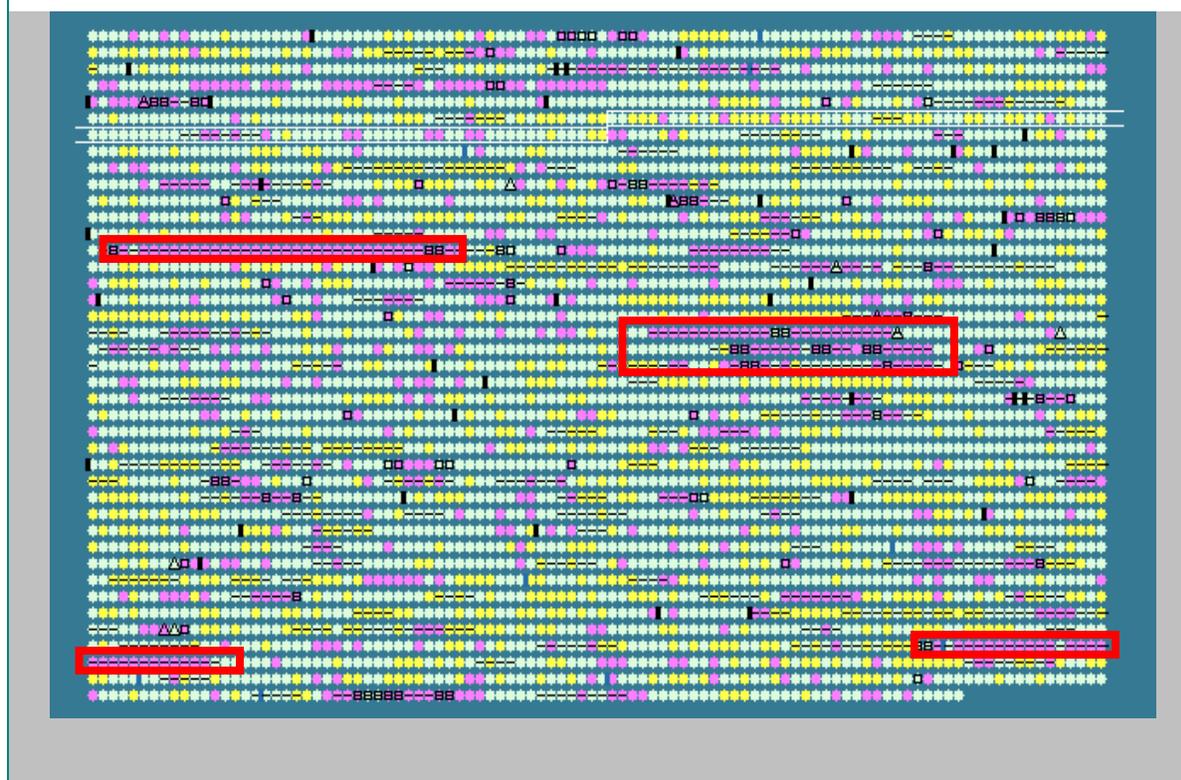
Parámetros	Valores
Tamaño del Genoma	4 744 448 pb
Marcos abiertos de lectura	4 122
Pseudo tRNA's	38
Genes de Integrasa	2
Gráfico	

Cada círculo en el gráfico corresponde a la predicción de un marco abierto de lectura que codifica para un producto dentro del genoma del organismo. El círculo amarillo indica un valor de %G+C mayor que el valor más alto, el círculo azul claro un valor promedio, se establece por defecto +/- 3.48%. El círculo rosa indica un valor menor que el valor más bajo de % de G+C. Las líneas horizontales en los círculos indican regiones con un uso diferente de codones. Las barras verticales de color negro indican un pseudo tRNA entre dos marcos abiertos de lectura. Los cuadros negros indican un gen que codifica para una transposasa, mientras que los triángulos negros indican una integrasa.

Cuadro 25: Análisis del genóforo de *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* A449 por el programa IslandPath

Parámetros	Valores
Tamaño del Genoma	4 702 402 pb
Marcos abiertos de lectura	4 086
Pseudo tRNA's	39
Genes de transposasa	89
Genes de integrasa	9

Gráfico



Cada círculo en el gráfico corresponde a la predicción de un marco abierto de lectura que codifica para un producto dentro del genoma del organismo. El círculo amarillo indica un valor de %G+C mayor que el valor más alto, el círculo azul claro un valor promedio, se establece por defecto +/- 3.48%. El círculo rosa indica un valor menor que el valor más bajo de % de G+C. Las líneas horizontales en los círculos indican regiones con un uso diferente de codones. Las barras verticales de color negro indican un pseudo tRNA entre dos marcos abiertos de lectura. Los cuadros negros indican un gen que codifica para una transposasa, mientras que los triángulos negros indican una integrasa.

8. DISCUSIÓN

El género *Aeromonas* se asocia a enfermedades intestinales y extraintestinales tales como síndrome urémico hemolítico, sepsis, epiglotitis, endocarditis, peritonitis, meningitis, osteomielitis, colitis, mionecrosis gaseosa, neumonía, e infección respiratoria y bacteriemia. Presenta alta incidencia en el medio ambiente ya que este género se encuentra ampliamente distribuido en suelo, agua potable, aguas negras, aguas contaminadas, ríos, lagos y mares. El mecanismo de patogenicidad se considera multifactorial, dentro del cual participan proteínas de membrana externa, toxinas secretadas al medio, resistencia a antibióticos, resistencia a metales pesados y desinfectantes de uso común, entre otros (Castro-Escarpulli y cols., 2002).

El panorama ideal para la comprensión de la patogenicidad de un organismo sería la identificación y el conocimiento de la participación de los genes implicados en la virulencia. Actualmente, existen diferentes procedimientos para detectar genes potencialmente implicados en la patogenicidad de un microorganismo, por ejemplo: la hibridación sustractiva, ya que es un método que permite identificar diferencias a nivel genético entre dos cepas bacterianas (URL 6), sin embargo; el costo de las sondas específicas para cada gen es muy alto, por lo que resulta poco asequible cuando se analizan un gran número de cepas, además de que la expresión de los factores de virulencia del microorganismo depende en gran medida de las presiones de selección y/o competencia del medio ambiente en el que se encuentre (Hacker y Carniel, 2001); es por ello que los ensayos fenotípicos para la detección de los factores de virulencia del microorganismo juegan un papel importante en la búsqueda y caracterización de islas de patogenicidad; algunos de estos métodos pueden ser: cultivo en medios especiales con antibióticos o con factores de crecimiento para la expresión de proteínas o toxinas excretables al medio, ensayos de adherencia o citotoxicidad en cultivos de células indicadoras, inoculación directa del patógeno a modelos animales y observación de sus efectos los cuales estarán encaminados a la expresión de los factores de virulencia codificados en las islas de patogenicidad.

Con los antecedentes de patogenicidad y virulencia en el género *Aeromonas* hay razones para pensar en la existencia de islas de patogenicidad por lo que se planteó una estrategia para la selección de cepas que presuntivamente presenten PAI's, al emplear marcadores moleculares que indiquen la presencia de las mismas y su detección por PCR, que es una herramienta confiable y altamente sensible para tal fin.

Se escogieron los genes marcadores de *cag*-PAI de *H. pylori* (*cagA* y *cagE*); *tfc16* de *H. influenzae* y otros marcadores de sistemas de secreción tipo IV como *virB2*, *virB9*, *virB11* para su búsqueda en cepas de *Aeromonas* spp. de origen ambiental y clínico. El primer paso fue la extracción de DNA a partir de las cepas incluidas en este estudio; al comparar los métodos de extracción de DNA empleados, observamos que con el kit comercial *InstaGene Matrix* se obtiene un DNA de alta pureza, sin embargo, no se conserva adecuadamente la integridad del material genético debido a que se observa un barrido en la mayoría de los carriles, lo que nos indica la degradación del mismo. Por otro lado, con la extracción por el método de choque térmico se obtiene un DNA de buena integridad y concentración, sin embargo, no posee buena pureza debido a que se observan en la parte inferior del gel, barridos que corresponden a RNA y otros *deiritus* celulares, los cuales no interfieren de manera significativa en los ensayos de PCR como lo demuestra Salgado y cols. que en 2008 estandarizaron una técnica de extracción de DNA empleando un horno de microondas con el fin de amplificar el gen *16S rDNA* de actinomicetos y enterobacterias.

El material genético obtenido por estos métodos de extracción se empleó para la PCR, observando que el método de choque térmico, a pesar de ser una técnica sencilla, es altamente eficiente si se siguen algunas recomendaciones como: cuidar que la cantidad de inóculo no rebase el arillo de metal del asa calibrada negra y que éste provenga de una cepa en fase logarítmica de crecimiento, atender los tiempos de incubación, almacenarlo a -20°C y desechar el material genético que se ha usado más de 5 ocasiones distintas; es preciso mencionar que si la cepa posee plásmidos u

otros elementos móviles fuera del genóforo, el método de choque térmico podrá conservar la integridad de los mismos en la mayoría de los casos (Ruiz-Ruiz, 2007).

El segundo paso fue la estandarización de la PCR para lograr la amplificación del gen *cagE* de *H. pylori* en las cepas de *Aeromonas* spp. ya que las condiciones descritas por González en 2006, no favorecieron la amplificación del gen en éste género. Sin embargo, realizando algunas modificaciones a la técnica; se logró su amplificación demostrándose la presencia del gen *cagE* de 350 pb en 23/41 cepas de origen ambiental. La especificidad de la PCR se demostró mediante la secuenciación del amplicón de la cepa *A. bestiarum* AhA4.

Debido a que el gen *cagE* se propuso como marcador de la isla de patogenicidad *cag*-PAI intacta por su actividad de ATPasa del sistema de secreción tipo IV (Hsu y cols., 2002; Ikenoue y cols., 2001), su presencia en cepas de *Aeromonas* spp. de origen ambiental, supone la presencia de una isla de patogenicidad cuya función en la secreción de proteínas o DNA hacia el medio externo o bien, formar parte del mecanismo de patogenicidad de este género al translocar moléculas con actividad biológica hacia una célula hospedera en el individuo infectado. En la literatura revisada hasta el momento no existe un hallazgo similar en el género *Aeromonas*.

Los resultados obtenidos en este trabajo complementan el estudio realizado por Datta y cols., en 2003 que demostraron la presencia del gen *cagA* de *H. pylori* por PCR e hibridación en fase sólida (Colony Blot), en cepas ambientales de *Aeromonas* spp. de diferentes muestras de agua obtenidas de Calcuta, India. La secuencia de nucleótidos de los productos de PCR reveló un 97 a 98% de similitud del gen *cagA*-like de las cepas de origen ambiental de *Aeromonas* spp. contra aislamientos clínicos de *H. pylori*; sin embargo, se observó la pérdida de éste gen después de 2 subcultivos en el laboratorio; es difícil explicar la razón por la cual algunas cepas son capaces de retener a *cagA* mientras que otras lo pierden espontáneamente; una teoría al respecto sugiere que se reduce el número de copias

de *cagA* debido a que la replicación del extremo 5' de la isla *cag*-PAI donde se halla codificado este gen, es de manera discontinua, por lo que no todas las células hijas contarán con una copia completa de la isla. Alvarado-Hernández, en el 2007, en el laboratorio de Bacteriología Médica, pudo reproducir estos resultados usando 169 cepas de *Aeromonas* spp. aisladas del medio ambiente (80% de pescado congelado y 20% aisladas de agua en España), de las cuales 20 cepas presentaban el gen *cagA*, por PCR e hibridación en fase sólida (Dot Blot), las cuales correspondieron a las especies *A. bestiarum*, *A. veronii* bv. sobria y *A. salmonicida*; de la misma forma que Datta y cols. se observa una pérdida de este gen después de subcultivarla en el laboratorio, por lo que en el presente trabajo se decidió determinar si existían los genes involucrados en el mecanismo de secreción tipo IV para la exportación de CagA o de alguna similar involucrada en el mecanismo de patogenicidad.

Contrastando los resultados de Alvarado-Hernández, 2007 para *cagA*, con los resultados del gen *cagE* descritos en este trabajo, se observa que las cepas de origen ambiental aisladas de pescado congelado y de aguas de fuentes públicas en España, presentan ambos marcadores (*cagE* y *cagA*) cuyo probable origen es la transferencia horizontal a través de un mecanismo que pudiera involucrar al sistema de secreción tipo IV, la conjugación tradicional o el recientemente descrito sistema de liberación-captación de DNA (Cascales y Christie, 2003). Esta teoría se ve apoyada por tres trabajos de investigación: i) Mazari-Hiriar y cols., en 2001 detectaron que *H. pylori* es capaz de sobrevivir hasta 16 días en agua destilada, salina, residual e inclusive en agua clorada junto a otras bacterias enteropatógenas incluyendo *A. hydrophila*, *A. caviae* y *A. veronii*; por lo que es probable que en diversos ambientes, *Aeromonas* spp. y *H. pylori* compartan el hábitat y pudiera existir un intercambio de material genético. ii) Se ha reportado que *Aeromonas* tiene la capacidad de permanecer en sistemas de reserva y distribución de agua potable antes y después de ser tratadas con cloro (Villaruel-López y cols., 2005) por lo que se le puede recuperar de muestras de agua potable obtenidas de grifos, filtros, cisternas y tanques de almacenamiento de diferentes dependencias y clínicas multidisciplinarias lo cual garantiza su permanencia en el medio (Tequianes-Bravo y

cols., 2005). iii) Además, se ha demostrado que estas bacterias pueden colonizar los sistemas de abastecimiento, formando una biopelícula, de hecho en el agua tratada, pueden llegar a alcanzar concentraciones de 10^3 UFC/100 mL esta estructura garantiza la permanencia en el medio y favorece el intercambio genético con *H. pylori* y con otros microorganismos (Castro-Escarpulli y cols., 2002).

Debido a la importancia de los sistemas de secreción y su relación con las islas de patogenicidad se decidió detectar si las cepas de origen ambiental o clínico poseen una ATPasa que nos diera un indicio de la presencia y funcionalidad de un SSTIV en estos microorganismos. En *A. caviae* y *A. hydrophila* se ha descrito a la proteína VirB4 como la principal ATPasa de este sistema de secreción (Kulinska y cols., 2008; Rangrez y cols., 2006; Rhodes y cols., 2004), ésta posee homólogos cercanos y remotos entre diversos microorganismos patógenos humanos o de plantas; el fenograma de la figura 40 muestra la relación que existe entre estas ATPasas descritas para los sistemas de secreción tipo IV. Se observa que la secuencia de *A. caviae* se separa de un clado que agrupa a la mayoría de las proteínas incluida CagE de *H. pylori* y se acerca a un sitio donde se encuentran mezcladas bacterias patógenas de plantas y humanos que incluyen a *H. influenzae* cuya proteína Tfc16 muestra mayor grado de similitud e identidad con VirB4 de *A. caviae* y con la proteína TraC codificada en el plásmido F de *E. coli* (Espinoza-Mellado, 2009).

Aprovechando el grado de homología descrito anteriormente, se seleccionó el gen *tfc16* de *H. influenzae* que codifica para una ATPasa funcional del SSTIV; el cual se encuentra en un elemento de resistencia conjugativo denominado ICEHin1056, que anteriormente fue referido como el plásmido p1056; alberga los transposones Tn10 y Tn3, que le proveen resistencia a ampicilina, tetraciclina y cloranfenicol (Mohd-Zain y cols., 2004). Su tamaño es de 59.4 Kb y tiene 64 marcos abiertos de lectura (ORF's) (Juhas y cols., 2007). Estudios recientes han identificado que en la isla genómica ICEHin1056, 24 de los 64 ORF's totales conciernen a un SSTIV, relacionado con la propagación de islas genómicas (Juhas y cols., 2007). El

elemento conjugativo ICE*Hin*1056 tiene la facilidad de integrarse al cromosoma de su célula hospedera y formar la isla genómica, o bien, escindirse de ella para transferirse por conjugación a otro microorganismo.

Las condiciones descritas por Espinoza-Mellado en 2009, para la amplificación de esta ATPasa, no favorecieron la amplificación del gen en el género *Aeromonas*; sin embargo, realizando algunas modificaciones a la técnica; se logró obtener una señal de buena intensidad, demostrándose que 14/41 cepas ambientales presentaron un amplicón de 277 pb correspondiente al gen *tfc16* de *H. influenzae* según lo indicó la secuenciación y el análisis por BLAST. Las cepas de referencia de *Aeromonas* spp. y los aislamientos clínicos del estado de Hidalgo no presentaron amplicones para este gen. No se han encontrado referencias bibliográficas que indiquen que *H. influenzae* y *Aeromonas* spp. comparten un mismo hábitat como en el caso discutido anteriormente (con *H. pylori*-*Aeromonas* spp.); sin embargo, tampoco podemos descartar que existan procesos de transferencia de material genético entre estos dos géneros de manera directa o indirecta a través de fagos u otros elementos genéticos móviles.

A partir de lo anterior, podemos afirmar que el hallazgo del gen *tfc16* en las cepas de *Aeromonas* spp. se debe a la similitud e identidad que comparte con el gen *virB4* descrito en *A. culicicola* (Rangrez y cols., 2006), en *A. caviae* (Rhodes y cols., 2004) y en *A. hydrophila* (Kulinska y cols., 2008) más que a una transferencia genética horizontal. Las cepas en las cuáles no se detectó el gen, es probable que no cuenten con un sistema de secreción tipo IV funcional o que presenten otra ATPasa homóloga que cumpla la función de translocación del efector.

A pesar de que VirB4 es la proteína mas conservada en la mayoría de los SSTIV (Yuan y cols., 2005) no es posible establecer el grado de conservación del sistema de secreción con solo esta proteína, por lo que es necesario conocer todas las secuencias de genes *virB* de las cepas clínicas y ambientales seleccionadas en

este trabajo y realizar estudios filogenéticos más detallados como lo plantean Rangrez y cols., en 2006 con el operón *AcTra* de *A. culicicola*.

La transferencia horizontal de genes contribuyen a la diversificación y adaptación de microorganismos, teniendo un impacto significativo en la plasticidad del genoma de especies bacterianas del ambiente, la evolución de bacterias patógenas, y la diseminación de genes de resistencia a antibióticos y de otros factores de virulencia (Juhas y cols., 2007; Juhas y cols., 2008). Muchas especies bacterianas utilizan los sistemas de secreción especializados para transferir macromoléculas a través de membranas (Nagai y Roy, 2003), que podrían estar contenidos en islas o isletas de patogenicidad.

Por lo que en el presente trabajo se diseñaron tres juegos de iniciadores y se estandarizó una PCR múltiple para amplificar cada uno de los genes que codifican para las tres proteínas principales del sistema de secreción tipo IV: VirB2 como principal componente del pilus conjugativo o de secreción, VirB11 el cual es un componente asociado a la membrana interna que pudiera formar canales para la translocación del sustrato o proveer energía para el ensamblaje y funcionamiento de la maquinaria, además de que participa en los cambios conformacionales inducidos por la hidrólisis del ATP para transducir la información del citoplasma hacia las subunidades extracitoplásmicas. Mientras que otros componentes como VirB9 forman un núcleo periplásmico que puede también constituir un canal de translocación a lo largo del sistema membranal del microorganismo (Christie y Vogel, 2000; Cascales y Christie, 2003; González-Pedrajo y Dreyfus, 2003).

Rhodes y cols. en 2004 demostró la presencia de un sistema de secreción tipo IV en el plásmido *pFBAOT6* de *A. caviae* HGB5 perteneciente a la familia *IncU* que además del SSTIV poseen genes de resistencia a antibióticos como tetraciclina y ampicilina. Dicho elemento conjugativo nos fue facilitado por su equipo de trabajo para contar con un testigo positivo para la estandarización de la PCR múltiple de los genes *virB2*, *virB9* y *virB11* de 114, 278 y 200 pb respectivamente, la cual la

empleamos como estrategia de selección de cepas que potencialmente poseen este sistema de secreción.

Al analizar los resultados de manera global, determinamos que el gen *virB11* presentó mayor frecuencia de detección para ambos grupos de cepas, mientras que el gen *virB2* sólo estuvo presente en 14/104 cepas. Dado que el SSTIV es funcional solo si están presentes todas las proteínas del complejo, la pérdida de alguna de ellas nos indica que el sistema ya no es funcional o que las cepas poseen un sistema de liberación-captación de material genético hasta ahora solo descrito en patógenos humanos como *H. pylori*, *C. jejuni* y *N. gonorrhoeae* (Cascales y Christie, 2003) y en microorganismos fitopatógenos como *A. tumefaciens*, en el que se ha reportado la existencia de cepas mutantes que carecen del pili codificado por el gen *virB2*, pero que conservan la capacidad de transferir el plásmido Ti (Llosa y cols., 2002); por lo que se puede inferir que la proteína VirB2, o sus homólogos, pueden ser fundamentales para el contacto bacteria-célula hospedera como en el caso del transporte de la proteína vacuolizante CagA de *H. pylori* (Censini y cols., 1996), pero a su vez, VirB2 cumple un papel accesorio o no esencial para la liberación o captación de DNA a partir del medio o de otros microorganismos. Esta hipótesis se sustenta a partir del hecho de que observamos que las cepas de agua del estado de Veracruz conservan el sistema de secreción tipo IV completo, mientras que las cepas de pescado congelado o agua de fuentes públicas de España, tienden a perder el gen *virB2*, pero poseen los genes *cagA* y *cagE* obtenidos por transferencia horizontal como se había mencionado anteriormente. Hasta el momento no se cuenta con la literatura suficiente para sustentar esta teoría, así mismo tampoco existen reportes de cepas de *Aeromonas* spp. que presenten un SSTIV codificado en el genoma o en algún elemento móvil insertado en la misma; por lo que los hallazgos aquí descritos son inéditos en el género *Aeromonas*, lo cual resalta la importancia de este trabajo ya que permitió seleccionar las cepas que son candidatos a un estudio genotípico más detallado y comprobar, en un principio, la presencia de un sistema de secreción tipo IV completo y funcional y posteriormente la descripción detallada de una isla de patogenicidad si fuese este el caso.

Otra hipótesis que explica la ausencia de algunos genes del sistema de secreción tipo IV en las cepas estudiadas es la similitud en cuanto al mecanismo de secreción entre el SSTIV y el SSTVI de reciente descripción (Tseng y cols., 2009), por lo que se infiere que algunas proteínas pudiesen ser homólogas remotas y por ello fueron detectadas por PCR con los iniciadores descritos en este trabajo. Sin embargo, revisando la base de datos GeneBank del NCBI (URL 1) aún no se cuenta con las secuencias completas de los genes del SSTVI en *Aeromonas* spp. por lo que aún no se podrían realizar estudios *in silico* para determinar con exactitud la validez o no de esta teoría.

El cuadro 20 muestra un panorama general de la frecuencia de aislamiento de los genes marcadores propuestos en este trabajo. Sólo 4 cepas de origen clínico presentaron amplicones positivos para los 3 genes del sistema de secreción tipo IV y corresponden a: *A. caviae* Hg155, Hg158 y Hg175 así como *A. veronii* bv. sobria Hg170. Mientras que 8 cepas de origen ambiental poseen los 3 genes marcadores *virB2*, *virB9* y *virB11*; corresponden a las cepas 4.4, 5.2, 7.2 y 7.5 de *A. caviae* y 1.3, 1.5, 4.3 y 8.3 de *A. hydrophila* cuyo origen de aislamiento son muestras de agua de playas del estado de Veracruz, por lo que todas las cepas arriba mencionadas se convierten en candidatos para una búsqueda más exhaustiva y dirigida de una isla de patogenicidad con genes de secreción. Cabe mencionar que las cepas 4.4 de *A. caviae*, 1.3 y 8.3 de *A. hydrophila* presentaron los 5 marcadores de islas de patogenicidad propuestos en este estudio.

Finalmente, el uso del programa IslandPath, para la detección de islas de patogenicidad en microorganismos secuenciados resultó limitado para el caso del género *Aeromonas*, ya que solo se conoce la secuencia completa de dos cepas en las cuales se desconoce aún la función de muchos productos de expresión de regiones características de las islas de patogenicidad. Una de estas cepas secuenciadas es *A. salmonicida* A449 subsp. *salmonicida*, que es un microorganismo patógeno para peces cuyo análisis con IslandPath mostró varios sitios posibles de

localización de PAI's al poseer amplias regiones con un contenido de G+C menor que el resto del genoma, un uso distinto de codones y lo más importante, varios marcos abiertos de lectura que codifican para integrasas o transposasas que pudiesen interactuar con tales regiones de patogenicidad. Al realizarse la anotación del genoma de este microorganismo, se detectó la presencia de proteínas del sistema de secreción tipo II, III y IV, lo que correlaciona perfectamente con los datos mostrados en la sección de antecedentes de este trabajo (Reith y cols., 2008). Con lo anterior podemos sugerir la realización de ensayos *in vitro* para caracterizar la posible isla de patogenicidad en la cepa *A. salmonicida* A449. Para el caso de *A. hydrophila*, se observan amplias regiones aún no caracterizadas que poseen proteínas hipotéticas por lo que también se sugiere realizar estudios para anotar adecuadamente la función de estos productos de expresión en la base de datos GeneBank del NCBI.

9. CONCLUSIONES

- Debido a que los genes *cagE* y *cagA* ha sido identificados como marcadores de *cag*-PAI en *H. pylori*, su presencia en cepas ambientales de *Aeromonas* spp. podría ser indicativo de la presencia de islas de patogenicidad en este género.
- El gen *virB4* que codifica para una ATPasa del SSTIV se encontró en cepas de origen ambiental de *Aeromonas* spp. usando los iniciadores para el gen *tfc16* de *H. influenzae*.
- Las cepas de referencia y los aislamientos clínicos no poseen los genes *cagE* y *virB4*.
- Se estandarizó una PCR múltiple con 3 genes marcadores del sistema de secreción tipo IV: *virB2* de 114 pb, *virB9* de 278 pb y *virB11* de 200 pb.
- El gen *virB11* presentó la mayor frecuencia de detección en cepas de origen clínico y ambiental, mientras que el gen *virB2* presentó la menor frecuencia de detección para ambos grupos de cepas.
- Se encontraron 8 cepas de origen ambiental y 3 de origen clínico que son candidatos para una búsqueda de una isla de patogenicidad y su posible caracterización. Todas ellas poseen los 3 marcadores del sistema de secreción tipo IV propuestos en este trabajo.

10. PERSPECTIVAS

- Realizar ensayos de expresión de las proteínas CagA y CagE en las cepas de *Aeromonas* spp. positivas a estos marcadores y determinar su identidad y similitud con respecto a las proteínas homólogas descritas en *H. pylori*.
- Amplificar y secuenciar todo el sistema de secreción tipo IV en aquellas cepas que poseen los genes *virB2*, *virB9* y *virB11*. Así como la determinación de su probable ubicación dentro del genóforo y la cadena o sentido en el cual están codificadas.
- Determinar el papel de la proteína VirB2 en la translocación de material genético o proteínas en cepas de *Aeromonas* spp. mediante cepas silvestres y mutadas para este carácter.
- Determinar la presencia de secuencias de inserción, tRNA's, transposasas o integrasas río arriba y río abajo de las secuencias que codifican para el SSTIV con el fin de determinar su inclusión en una isla de patogenicidad
- Probar los métodos de hibridación substractiva con estos genes marcadores de islas de patogenicidad en un universo más amplio de cepas de *Aeromonas* spp. de reciente aislamiento

11. PRODUCTOS OBTENIDOS

- Presentación de protocolo de tesis en el seminario del Posgrado de Biomedicina y Biotecnología Molecular (14 de marzo de 2008).
- Presentación del poster titulado “*cagA* gene of *Helicobacter pylori* in *Aeromonas* spp. strains isolated from environmental samples in México” el 9th. International Symposium on *Aeromonas* and *Plesiomonas* en Vila Real, Portugal del 10 al 12 de Septiembre de 2008.
- Presentación del poster titulado “Análisis Bioinformático de la Proteína *cagE* de *Helicobacter pylori* y su relación con los Sistemas de Secreción Tipo IV en otros Microorganismos” en el seminario de la asignatura de Bioinformática como parte de los trabajos complementarios al curso.
- Presentación de avances de tesis en el seminario del Posgrado de Biomedicina y Biotecnología Molecular (26 de mayo de 2009).
- Participación como asistente y presentación del trabajo en formato poster titulado: “Análisis Bioinformático de la proteína *CagE* de *Helicobacter pylori* y su Relación con los Sistemas de Secreción Tipo IV de Otros Microorganismos” en las VII Jornadas del Posgrado de Biomedicina y Biotecnología Molecular en México D.F., del 24 al 27 de Marzo de 2009.
- Participación como asistente y presentación del trabajo en formato poster titulado: “Estudio Preeliminar de la Presencia el Gen *cagE* en Cepas de *Aeromonas* spp. de Origen Ambiental” en el Congreso 70 Aniversario del IPK; VII Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología, en La Habana, Cuba del 1 al 4 de Junio de 2009.
- Presentación de terminación de tesis en el seminario del Posgrado de Biomedicina y Biotecnología Molecular (4 de noviembre de 2009).
- Participación como asistente y presentación del trabajo en formato poster titulado: “Estudio Preeliminar de la Presencia el Gen *cagE* en Cepas de *Aeromonas* spp. de Origen Ambiental” en el 5to. Congreso Nacional Estudiantil de Investigación y el 5to. Congreso de Investigación Politécnica en la ciudad de Querétaro, Querétaro del 28 al 30 de octubre de 2009.
- Preparación de la nota al editor titulada: *Aeromonas* spp. strains isolated from environmental samples posses *cagA* and *cagE* genes of *Helicobacter pylori*. Para la revista: Applied and Environmental Microbiology.

12. REFERENCIAS

- Aguilera-Arreola, M. G. (2002). Estudio de la diversidad genética de cepas de *A. hydrophila* aisladas de orígenes diferentes. Tesis de maestría. Departamento de Microbiología. México, DF. IPN-ENCB.
- Alor, R.S. 2000. Identificación de *Aeromonas* spp. en hisopos rectales en el estado de Hidalgo, México. Symposium Latinoamericano de Ciencias Biotecnológicas (SILCIBIO-*Nocardiae*). Davis-California (USA).
- Alvarado-Hernández, A. M. (2007). Búsqueda del gen *cagA* en *Aeromonas* de origen ambiental. Tesis de licenciatura. Departamento de Microbiología. México, DF IPN – ENCB
- Altwegg, M. y Geiss, H. K. (1989). *Aeromonas* as a human pathogen. Crit Rev Microbiol **16**(4): 253-286.
- Backert, S. y Selbach, M. (2008). Role of type IV secretion system in *Helicobacter pylori* pathogenesis. Cell Microbiol **10**(8): 1573-1581.
- Bach, S.; Makristathis, A.; Rotter, M. y Hirschl, A. M. (2002). Gene expression profiling in AGS cells stimulated with *Helicobacter pylori* isogenic strains (*cagA* positive or *cagA* negative). Infect Immun **70**(2): 988-992.
- Baez-Arias, R. (2007). Sistemas de secreción bacterianos. Tesina de licenciatura. Departamento de Microbiología. México, DF IPN – ENCB
- Burr, S. E.; Stuber, K. y Frey, J. (2003a). The ADP-ribosylating toxin, AexT, from *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* is translocated via a type III secretion pathway. J Bacteriol **185**(22): 6583-6591.
- Burr, S. E.; Wahli, T.; Segner, H; Pugovkin, D. y Frey, J. (2003b). Association of Type III secretion genes with virulence of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. Dis Aquat Organ **57**(1-2): 167-171.
- Cambronne, E.D. y Roy, C.R. (2006) Recognition and delivery of effector proteins into eukaryotic cells by bacterial secretion systems. *Traffic*. **7**(1): 929-939.

- Cascales, E. y Christie, P. J. (2003). The versatile bacterial type IV secretion systems. *Nat Rev Microbiol* **1**(2): 137-149.
- Castro-Escarpulli G. (2002). Aplicación de técnicas moleculares en cepas de *Aeromonas* aisladas en México. Tesis doctoral. Departamento de Microbiología. México, DF. IPN-ENCB.
- Castro-Escarpulli, G.; Aguilera-Arreola, M. G.; Giono-Cerezo, S.; Hernández-Rodríguez, C.H.; Rodríguez-Chacón, M.; Soler F., L.; Aparicio-Ozores G. y Figueras S., M. J. (2002). El género *Aeromonas* ¿un patógeno importante en México? *Enf Infec y Micro* **22**(4): 206-216.
- Castro-Escarpulli, G.; Aparicio, O.G. y Aguilera-Arreola M.G. (2005). Género *Aeromonas*. En *Bacteriología Médica*. Lugo de la Fuente G. Ed. Cuellar Guadalajara Jalisco,: 89-105.
- Censini, S.; Lange, C.; Xiang, Z.; Crabtree, J. E.; Ghiara, P.; Borodovsky, M.; Rappuoli, R. y Covacci, A. (1996). *cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**(25): 14648-14653.
- Chacón, M.R.; Figueras, M.J.; Castro-Escarpulli, G.; Soler, L. y Guarro, J. (2003). Distribution of virulence genes in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp., *Antonie Van Leeuwenhoek*, **84**(1):269-278.
- Chacón, M. R.; Soler, L.; Groisman, E. A.; Guarro, J. y Figueras, M. J. (2004). Type III secretion system genes in clinical *Aeromonas* isolates. *J Clin Microbiol* **42**(3): 1285-1287.
- Christie, P. J. y Vogel, J. P. (2000). Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. *Trends Microbiol* **8**(8): 354-360.
- Couturier, M. R.; Tasca, E.; Montecucco, C. y Stein, M. (2006). Interaction with CagF is required for translocation of CagA into the host via the *Helicobacter pylori* type IV secretion system. *Infect Immun* **74**(1): 273-281.
- Dacanay, A.; Knickle, L.; Solanky, K. S.; Boyd, J. M.; Walter, J. A.; Brown, L. L.; Johnson, S. C. y Reith, M. (2006). Contribution of the type III secretion

system (TTSS) to virulence of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. *Microbiology* **152**(6): 1847-1856.

- Datta, S.; Khan, A.; Nandy, R. K.; Rehman, M.; Sinha, S.; Chattopadhyay, S.; Das, S. C. y Nair, G. B. (2003). Environmental isolates of *Aeromonas* spp. harboring the *cagA*-like gene of *Helicobacter pylori*. *Appl Environ Microbiol* **69**(7): 4291-4295.
- Day, A. S.; Jones, N. L.; Lynett, J. T.; Jennings, H. A.; Fallone, C. A.; Beech, R. y Sherman, P. M. (2000). *cagE* is a virulence factor associated with *Helicobacter pylori*-induced duodenal ulceration in children. *J Infect Dis* **181**(4): 1370-1375.
- Dehio, C. (2008). Infection-associated type IV secretion systems of *Bartonella* and their diverse roles in host cell interaction. *Cell Microbiol* **10**(8): 1591-1598.
- Draper, O.; Middleton, R.; Doucleff, M. y Zambryski, P. C (2006). Topology of the *VirB4C* terminus in the *Agrobacterium tumefaciens* *VirB/D4* type IV secretion system. *J Biol Chem* **281**(49): 37628-37635.
- Espinoza-Mellado, MR. (2009). Efecto vacuolizante de sobrenadantes de *Haemophilus influenzae* en la línea celular HEP-2 y su relación con los genes *hap* y *tfc16*. Tesis de maestría. Departamento de Microbiología, México D.F., IPN-ENCB.
- Fernández, F.; Sandra, A.; Guillermina, T.A. y Elsa S. (2004). Estructura de Mosaico del Cromosoma Bacteriano: Islas patogénicas. *INHRR* **35**(2):20-31. ISSN 0798-0477.
- Figueras, M. J.; Guarro, J. y Martínez-Murcia, A. (2000). Clinically relevant *Aeromonas* species. *Clin Infect Dis* **30**(6): 988-989.
- Figueroa, O.I.M. y Verdugo, R.A. (2005). Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* spp. *Rev Lat Microbiol*, **47**(1-2):25 – 42
- Gal-Mor, O. y Finlay, B. B. (2006). Pathogenicity islands: a molecular toolbox for bacterial virulence. *Cell Microbiol* **8**(11): 1707-1719.
- Garcia-Vallve, S.; Romeu, A. y Palau, J. (2000). Horizontal gene transfer in bacterial and archaeal complete genomes. *Genome Res* **10**(11): 1719-1725.

- González-Pedrajo, B y Dreyfus, G. (2003). Sistemas de secreción de proteínas en las bacterias Gram negativas: Biogénesis flagelar y translocación de factores de virulencia. Mensaje Bioquímico. Vol. XXVII.
- González, V. R. (2006). PCR multiplex para marcadores de virulencia de *H. pylori* aislados de paciente pediátricos. Tesis de maestría. Departamento de Microbiología, México D.F., IPN-ENCB.
- Groisman, E. A. y Ochman, H. (1996). Pathogenicity islands: bacterial evolution in quantum leaps. Cell **87**(5): 791-794.
- Guan, K. L. y Dixon, J. E. (1990). Protein tyrosine phosphatase activity of an essential virulence determinant in *Yersinia*. Science **249**(4968): 553-556.
- Hacker, J.; Blum-Oehler, G.; Muhldorfer, I. y Tschape, H. (1997). Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. Mol Microbiol **23**(6): 1089-1097.
- Hacker, J. y Kaper, J. B. (2000). Pathogenicity islands and the evolution of microbes. Annu Rev Microbiol **54**(1): 641-679.
- Hacker, J. y Carniel, E. (2001). Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity. A Darwinian view of the evolution of microbes. EMBO Rep **2**(5): 376-381.
- Henderson, I. R. y Nataro, J. P. (2001). Virulence functions of autotransporter proteins. Infect Immun **69**(3): 1231-1243.
- Hsiao, W.; Wan, I.; Jones, S. J. y Brinkman, F. S. (2003). IslandPath: aiding detection of genomic islands in prokaryotes. Bioinformatics **19**(3): 418-420.
- Hsu, P. I.; Hwang, I. R.; Citty, D.; Lai, K. H.; El-Zimaity, H. M.; Gutierrez, O.; Kim, J. G.; Osato, M. S.; Graham, D. Y. y Yamaoka, Y. (2002). Clinical presentation in relation to diversity within the *Helicobacter pylori* *cag* pathogenicity island. Am J Gastroenterol **97**(9): 2231-2238.
- Ikenoue, T.; Maeda, S.; Ogura, K.; Akanuma, M.; Mitsuno, Y.; Imai, Y.; Yoshida, H.; Shiratori, Y. y Omata, M. (2001). Determination of *Helicobacter pylori* virulence by simple gene analysis of the *cag* pathogenicity island. Clin Diagn Lab Immunol **8**(1): 181-186.

- Janda, J.M. (2001). *Aeromonas y Plesiomonas*. en Molecular Medical Microbiology. Sussman M., Ed. Academic Press, San Diego. 1237-1270.
- Juhas, M.; Crook, D. W.; Dimopoulou, I. D.; Lunter, G.; Harding, R. M.; Ferguson, D. J. y Hood, D. W. (2007). Novel type IV secretion system involved in propagation of genomic islands. *J Bacteriol* **189**(3): 761-71.
- Juhas, M.; Crook, D. W. y Hood, D. W. (2008). Type IV secretion systems: tools of bacterial horizontal gene transfer and virulence. *Cell Microbiol* **10**(12): 2377-2286.
- Juhas, M.; van der Meer, J. R.; Gaillard, M.; Harding, R. M.; Hood, D. W. y Crook, D. W. (2009). Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. *FEMS Microbiol Rev* **33**(2): 376-393.
- Khajanchi, B. K.; Sha, J.; Kozlova, E. V.; Erova, T. E.; Suarez, G.; Sierra, J. C.; Popov, V. L.; Horneman, A. J. y Chopra, A. K. (2009). N-acylhomoserine lactones involved in quorum sensing control the type VI secretion system, biofilm formation, protease production, and in vivo virulence in a clinical isolate of *Aeromonas hydrophila*. *Microbiology* **155**(11): 3518-3531.
- Kostakioti, M.; Newman, C. L.; Thanassi, D. G. y Stathopoulos, C. (2005). Mechanisms of protein export across the bacterial outer membrane. *J Bacteriol* **187**(13): 4306-4314.
- Kulinska, A.; Czeredys, M.; Hayes, F. y Jagura-Burdzy, G. (2008). Genomic and functional characterization of the modular broad-host-range *RA3* plasmid, the archetype of the IncU group. *Appl Environ Microbiol* **74**(13): 4119-4132.
- Kwok, T.; Zabler, D.; Urman, S.; Rohde, M.; Hartig, R.; Wessler, S.; Misselwitz, R.; Berger, J. ; Sewald, N.; Konig, W. y Backert, S (2007). *Helicobacter* exploits integrin for type IV secretion and kinase activation. *Nature* **449**(7164): 862-866.
- Llosa, M.; Gomis-Ruth, F. X.; Coll, M. y de la Cruz F., F. (2002). Bacterial conjugation: a two-step mechanism for DNA transport. *Mol Microbiol* **45**(1): 1-8.
- Martin-Carnahan A. y Joseph S. W. (2005). Genus I. *Aeromonas stanier* 1947, 213^{AL}, p 556-578. En D.J. Brenner, N.R. Krieg, J.T. Staley y G.M. Garrity (ed).

Bergey's manual of systematic bacteriology, 2nd ed., vol 2, part B. Springer, New York. NY.

- Mazari-Hiriart, M.; Lopez-Vidal, Y.; Castillo-Rojas, G.; Ponce de Leon, S. y Cravioto, A. (2001). *Helicobacter pylori* and other enteric bacteria in freshwater environments in Mexico City. Arch Med Res **32**(5): 458-467
- Mohd-Zain, Z.; Turner, S. L.; Cerdeno-Tarraga, A. M.; Lilley, A. K.; Inzana, T. J.; Duncan, A. J.; Harding, R. M.; Hood, D. W.; Peto, T. E. y Crook, D. W. (2004). Transferable antibiotic resistance elements in *Haemophilus influenzae* share a common evolutionary origin with a diverse family of syntenic genomic islands." J Bacteriol **186**(23): 8114-22.
- Nagai, H. y Roy, C. R. (2003). Show me the substrates: modulation of host cell function by type IV secretion systems. Cell Microbiol **5**(6): 373-383.
- Owen, R. J.; Peters, T. M.; Varea, R.; Teare, E. L. y Saverymuttu, S. (2001). Molecular epidemiology of *Helicobacter pylori* in England: prevalence of *cag* pathogenicity island markers and *IS605* presence in relation to patient age and severity of gastric disease. FEMS Immunol Med Microbiol **30**(1): 65-71.
- Rajakumar, K.; Sasakawa, C. y Adler, B. (1997). Use of a novel approach, termed island probing, identifies the *Shigella flexneri* pathogenicity island which encodes a homolog of the immunoglobulin A protease-like family of proteins. Infect Immun **65**(11): 4606-4614.
- Rangrez, A. Y.; Dayananda, K. M.; Atanur, S.; Joshi, R.; Patole, M. S. y Shouche, Y. S. (2006). Detection of conjugation related type four secretion machinery in *Aeromonas culicicola*. PLoS One **1**(1):1-15.
- Rebollo, B. y Escamilla, E. (1984). Aislamiento e identificación de *Aeromonas* spp. y *Plesiomonas shigelloides* como causa de diarrea en humanos. INNSZ. Memorias Congreso Nacional Mexicano. Veracruz, Ver.
- Reith, M. E.; Singh, R. K.; Curtis, B.; Boyd, J. M.; Bouevitch, A.; Kimball, J.; Munholland, J.; Murphy, C.; Sarty, D.; Williams, J.; Nash, J. H.; Johnson, S. C. y Brown, L. L. (2008). The genome of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* A449: insights into the evolution of a fish pathogen. BMC Genomics **9**(1):1-15.

- Rhodes, G.; Parkhill, J. ; Bird, C.; Ambrose, K.; Jones, M. C.; Huys, G.; Swings, J. y Pickup, R. W. (2004). Complete nucleotide sequence of the conjugative tetracycline resistance plasmid pFBAOT6, a member of a group of IncU plasmids with global ubiquity. *Appl Environ Microbiol* **70**(12): 7497-7510
- Rincón, A. F. (2005). Caracterización de la Heterogeneidad Genética de la Isla de Patogenicidad de *Helicobacter pylori* en Aislamientos Clínicos Mexicanos. Tesis de Maestría. Cuernavaca Mor., Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas. Instituto Nacional de Salud Publica . ESPM. pp. 11-19.
- Rota, C. A.; Pereira-Lima, J. C.; Blaya, C. y Nardi, N. B. (2001). Consensus and variable region PCR analysis of *Helicobacter pylori* 3' region of *cagA* gene in isolates from individuals with or without peptic ulcer. *J Clin Microbiol* **39**(2): 606-612.
- Ruiz-Ruiz JM. (2007). Estandarización de una PCR para a búsqueda de genes de patogenicidad de *Escherichia coli* enterohemorrágica aislada de casos de diarrea en humanos. Tesis de Licenciatura. México D.F. InDRE (CENAVECE/SSA) - ENCB (IPN).
- Salgado, A.; Ramírez, N.; Sandoval E. y Sandoval, H. (2008) Fast method for DNA extraction in *Nocardia* and *Saccharomonospora*. *J Myc Med* **18**(2):100-102
- Schmidt, H. y Hensel, M. (2004) Pathogenicity Islands in Bacterial Pathogenesis; *Clin. Microbiol. Rev.*; **17**(1):14-56.
- Stuber, K.; Burr, S. E.; Braun, M.; Wahli, T. y Frey, J. (2003). Type III secretion genes in *Aeromonas salmonicida* subsp *salmonicida* are located on a large thermolabile virulence plasmid. *J Clin Microbiol* **41**(8): 3854-3856
- Suarez, G.; Sierra, J. C.; Erova, T. E.; Sha, J.; Horneman, A. J. y Chopra, A. K. (2010). A type VI secretion system effector protein, VgrG1, from *Aeromonas hydrophila* that induces host cell toxicity by ADP ribosylation of actin. *J Bacteriol* **192**(1): 155-168.
- Tabei, S. M.; Hitchen, P. G.; Day-Williams, M. J.; Merino, S.; Vart, R.; Pang, P. C.; Horsburgh, G. J.; Viches, S.; Wilhelms, M.; Tomas, J. M.; Dell, A. y Shaw,

- J. G. (2009). An *Aeromonas caviae* genomic island is required for both O-antigen lipopolysaccharide biosynthesis and flagellin glycosylation. *J Bacteriol* **191**(8): 2851-2863.
- Tequianes-Bravo, L.; Pérez-González, D.A.; González-Malvárez, M.M.; Flores-Pimentel, M. y Marroquín-Segura, R. (2005). Aislamiento de *Aeromonas* productoras de aerolisina y enterotoxina en muestras de agua potable en la facultad de estudios superiores Zaragoza y otras dependencias de la UNAM. *Bioquímica*, **30**(1):23-2.
 - Tseng, T.T.; Tyler, B.M. y Setubal, J.C. (2009). Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the Gene Ontology. *BMC Microbiol.* **9**(1): 1-9.
 - Tummuru, M. K.; Sharma, S. A. y Blaser, M. J. (1995). *Helicobacter pylori* *picB*, a homologue of the *Bordetella pertussis* toxin secretion protein, is required for induction of IL-8 in gastric epithelial cells. *Mol Microbiol* **18**(5): 867-876.
 - Vilches, S.; Urgell, C.; Merino, S.; Chacon, M. R.; Soler, L.; Castro-Escarpulli, G.; Figueras, M. J. y Tomas, J. M. (2004). Complete type III secretion system of a mesophilic *Aeromonas hydrophila* strain. *Appl Environ Microbiol* **70**(11): 6914-6919.
 - Villarruel-López, A.; Fernández-Rendón, E.; Mota de la Garza, L.; Ortigoza-Ferado, J. (2005). Presence of *Aeromonas* spp. in water from drinking-water- and wastewater- treatment plants in México city. *Water Environ Res.* **77**:3074-3079.
 - Yamaoka, Y.; Kodama, T.; Kashima, K.; Graham, D. Y. y Sepulveda, A. R. (1998). Variants of the 3' region of the *cagA* gene in *Helicobacter pylori* isolates from patients with different *H. pylori*-associated diseases. *J Clin Microbiol* **36**(8): 2258-2263.
 - Yu, H. B.; Zhang, Y. L.; Lau, Y. L.; Yao, F.; Vilches, S.; Merino, S.; Tomas, J. M.; Howard, S. P. y Leung, K. Y. (2005). Identification and characterization of putative virulence genes and gene clusters in *Aeromonas hydrophila* PPD134/91. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**(1): 4469-4477.

- Yuan, Q.; Carle, A.; Gao, C.; Sivanesan, D.; Aly, K. A.; Hoppner, C.; Krall, L.; Domke, N. y Baron, C. (2005) Identification of the VirB4-VirB8-VirB5-VirB2 Pilus Assembly Sequence of Type IV Secretion Systems. *J. Biol. Chem.* **280**(28): 26349- 26359.

Referencias electrónicas:

- URL1: Base de datos GeneBank
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>
- URL 2: BLAST del NCBI
<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- URL 3: Boletín Epidemiológico de la Secretaria de Salud.
<http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/2009/sem51/pdf/cua1y2.pdf>
- URL 4: Programa IslandPath
<http://www.pathogenomics.sfu>
[#IslandPath](http://gchelpdesk.ualberta.ca/news/30jan06/cbhd_news_30jan06.php)
- URL 5: Servidor EMBOSS
<http://148.204.162.24/emboss>
- URL 6: Subtractive Hybridization
<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/brands/Dynal/Streptavidin-Coupled-Dynabeads/Subtractive-Hybridization.html>

13.APÉNDICE

Los cuadros muestran los resultados de la determinación por PCR de los genes marcadores de PAI's

Determinación de los genes marcadores en cepas clínicas de *Aeromonas* spp.

Cepa	Especie	Origen	cagE	tcf16	virB2	virB9	virB11
Hg 1	<i>A. caviae</i>	Hidalgo	-	-	-	+	+
Hg 3	<i>A. hydrophila</i>	Hidalgo	-	-	-	-	-
Hg 4	<i>A. caviae</i>	Hidalgo	-	-	-	+	+
Hg 5	<i>A. hydrophila</i>	Hidalgo	-	-	-	+	+
Hg 6	<i>A. hydrophila</i>	Hidalgo	-	-	-	+	-
Hg 11	<i>A. hydrophila</i>	Hidalgo	-	-	-	+	-
Hg 17	<i>A. veronii</i>	Hidalgo	-	-	-	+	+
Hg 18	<i>A. hydrophila</i>	Hidalgo	-	-	-	+	+
Hg 20	<i>A. hydrophila</i>	Hidalgo	-	-	-	+	-
Hg 21	<i>A. caviae</i>	Hidalgo	-	-	-	+	+
Hg 22	<i>A. caviae</i>	Hidalgo	-	-	-	+	+
Hg 24	<i>A. caviae</i>	Hidalgo	-	-	-	+	+
Hg 28	<i>A. hydrophila</i>	Hidalgo	-	-	-	+	+
Hg 30	<i>A. hydrophila</i>	Hidalgo	-	-	-	+	+
Hg 33	<i>A. hydrophila</i>	Hidalgo	-	-	-	+	+
Hg 34	<i>A. hydrophila</i>	Hidalgo	-	-	-	+	+
Hg 35	<i>A. hydrophila</i>	Hidalgo	-	-	-	+	-
Hg 36	<i>A. hydrophila</i>	Hidalgo	-	-	-	-	-
Hg 37	<i>A. hydrophila</i>	Hidalgo	-	-	-	-	-
Hg 44	<i>A. caviae</i>	Hidalgo	-	-	-	-	+
Hg 46	<i>A. veronii</i>	Hidalgo	-	-	-	-	-
Hg 51	<i>A. veronii</i>	Hidalgo	-	-	-	-	+
Hg 53	<i>A. veronii</i>	Hidalgo	-	-	+	-	-
Hg 62	<i>A. trota</i>	Hidalgo	-	-	-	-	-
Hg 63	<i>A. hydrophila</i>	Hidalgo	-	-	-	-	-
Hg 75	<i>A. hydrophila</i>	Hidalgo	-	-	-	+	-
Hg 81	<i>A. caviae</i>	Hidalgo	-	-	-	-	-
Hg 82	<i>A. hydrophila</i>	Hidalgo	-	-	-	-	-
Hg 84	<i>A. caviae</i>	Hidalgo	-	-	-	-	+
Hg 88	<i>A. caviae</i>	Hidalgo	-	-	-	-	+
Hg 94	<i>A. hydrophila</i>	Hidalgo	-	-	-	-	-
Hg 105	<i>A. hydrophila</i>	Hidalgo	-	-	-	+	-
Hg 106	<i>A. hydrophila</i>	Hidalgo	-	-	-	-	-
Hg 108	<i>A. caviae</i>	Hidalgo	-	-	-	-	-
Hg 109	<i>A. veronii</i>	Hidalgo	-	-	-	+	+

Cepa	Especie	Origen	<i>cagE</i>	<i>tcf16</i>	<i>virB2</i>	<i>virB9</i>	<i>virB11</i>
Hg 112	<i>A. veronii</i>	Hidalgo	-	-	-	+	-
Hg 119	<i>A. veronii</i>	Hidalgo	-	-	-	-	+
Hg 121	<i>A. caviae</i>	Hidalgo	-	-	-	-	+
Hg 122	<i>A. caviae</i>	Hidalgo	-	-	-	+	+
Hg 124	<i>A. caviae</i>	Hidalgo	-	-	-	-	+
Hg 126	<i>A. caviae</i>	Hidalgo	-	-	-	+	+
Hg 128	<i>A. caviae</i>	Hidalgo	-	-	-	-	-
Hg 133	<i>A. hydrophila</i>	Hidalgo	-	-	-	-	+
Hg 137	<i>A. caviae</i>	Hidalgo	-	-	-	-	-
Hg 145	<i>A. caviae</i>	Hidalgo	-	-	-	-	+
Hg 146	<i>A. caviae</i>	Hidalgo	-	-	-	+	+
Hg 148	<i>A. veronii</i>	Hidalgo	-	-	-	-	+
Hg 153	<i>A. hydrophila</i>	Hidalgo	-	-	-	+	+
Hg 155	<i>A. caviae</i>	Hidalgo	-	-	+	+	+
Hg 156	<i>A. hydrophila</i>	Hidalgo	-	-	-	-	+
Hg 158	<i>A. caviae</i>	Hidalgo	-	-	+	+	+
Hg 162	<i>A. veronii</i>	Hidalgo	-	-	-	+	+
Hg 165	<i>A. caviae</i>	Hidalgo	-	-	-	+	+
Hg 169	<i>A. caviae</i>	Hidalgo	-	-	-	-	-
Hg 170	<i>A. veronii</i>	Hidalgo	-	-	+	+	+
Hg 171	<i>A. caviae</i>	Hidalgo	-	-	-	-	+
Hg 173	<i>A. veronii</i>	Hidalgo	-	-	-	-	-
Hg 175	<i>A. caviae</i>	Hidalgo	-	-	+	+	+
Hg 176	<i>A. veronii</i>	Hidalgo	-	-	-	+	+
Hg 179	<i>A. hydrophila</i>	Hidalgo	-	-	-	-	-
Hg 180	<i>A. hydrophila</i>	Hidalgo	-	-	-	-	+
Hg 181	<i>A. caviae</i>	Hidalgo	-	-	-	-	+
Hg 187	<i>A. hydrophila</i>	Hidalgo	-	-	-	-	+

Determinación de los genes marcadores en cepas ambientales de *Aeromonas* spp.

Cepa	Especie	Origen	<i>cagE</i>	<i>cagA</i> *	<i>tcf16</i>	<i>virB2</i>	<i>virB9</i>	<i>virB11</i>
32	<i>A. salmonicida</i>	Pescado congelado	+	+	-	-	+	+
AhA4	<i>A. bestiarum</i>	Pescado congelado	+	+	+	-	+	+
AhA3	<i>A. bestiarum</i>	Pescado congelado	-	+	-	-	-	-
AhA5	<i>A. bestiarum</i>	Pescado congelado	+	+	-	-	+	+
119	<i>A. bestiarum</i>	Agua dulce	+	+	-	-	-	+
AhA7	<i>A. veronni</i> bv. sobria	Pescado congelado	+	+	-	-	+	+
AhA13	<i>A. salmonicida</i>	Pescado congelado	+	+	-	-	+	+
104	<i>A. bestiarum</i>	Pescado congelado	+	+	-	-	+	+

Cepa	Especie	Origen	<i>cagE</i>	<i>cagA</i> *	<i>tcf16</i>	<i>virB2</i>	<i>virB9</i>	<i>virB11</i>
112	<i>A. bestiarum</i>	Agua dulce	+	+	-	-	+	+
114	<i>A. bestiarum</i>	Agua dulce	+	+	-	-	+	+
156	<i>A. bestiarum</i>	Agua dulce	+	+	-	-	+	+
57	<i>A. bestiarum</i>	Pescado congelado	+	+	-	-	-	-
60	<i>A. veronni</i> bv sobria	Pescado congelado	+	+	-	-	-	+
AhA1	<i>A. salmonicida</i>	Pescado congelado	+	+	-	-	+	+
AhA10	<i>A. salmonicida</i>	Pescado congelado	+	+	-	-	-	-
40	<i>A. salmonicida</i>	Pescado congelado	+	+	-	-	+	+
136	<i>A. veronni</i> bv. sobria	Pescado congelado	+	+	-	-	-	-
47	<i>A. veronni</i> bv. sobria	Pescado congelado	+	+	-	-	+	+
37	<i>A. salmonicida</i>	Pescado congelado	+	+	-	-	+	+
As20P	<i>A. bestiarum</i>	Pescado congelado	+	+	-	-	+	+
7.3	<i>A. caviae</i>	Agua salada	-	N/D	-	-	-	-
7.4	<i>A. caviae</i>	Agua salada	-	N/D	+	-	+	+
2.6	<i>A. caviae</i>	Agua salada	-	N/D	-	-	+	-
9.2	<i>A. caviae</i>	Agua salada	-	N/D	+	-	-	+
1.6	<i>A. caviae</i>	Agua salada	-	N/D	+	+	-	+
6.1	<i>A. caviae</i>	Agua salada	-	N/D	-	-	-	-
7.8	<i>A. caviae</i>	Agua salada	-	N/D	+	-	+	+
7.2	<i>A. caviae</i>	Agua salada	-	N/D	+	+	+	+
8.2	<i>A. caviae</i>	Agua salada	-	N/D	-	-	-	-
7.6	<i>A. caviae</i>	Agua salada	-	N/D	-	-	-	-
5.2	<i>A. caviae</i>	Agua salada	-	N/D	+	+	+	+
7.1	<i>A. caviae</i>	Agua salada	-	N/D	-	-	-	-
7.5	<i>A. caviae</i>	Agua salada	-	N/D	+	+	+	+
4.4	<i>A. caviae</i>	Agua salada	+	N/D	+	+	+	+
4.3	<i>A. hydrophila</i>	Agua salada	-	N/D	+	+	+	+
1.5	<i>A. hydrophila</i>	Agua salada	-	N/D	-	+	+	+
8.3	<i>A. hydrophila</i>	Agua salada	+	N/D	+	+	+	+
11.5	<i>A. hydrophila</i>	Agua salada	+	N/D	+	-	-	-
11.6	<i>A. hydrophila</i>	Agua salada	-	N/D	-	-	-	-
8.1	<i>A. hydrophila</i>	Agua salada	-	N/D	+	-	-	-
1.3	<i>A. hydrophila</i>	Agua salada	+	N/D	+	+	+	+

N/D: No determinado. *cagA**: Datos tomados de Alvarado-Hernández, 2007