

00544

3

28;



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE QUÍMICA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**

**DETECCION DE *Escherichia coli* ENTEROPATOGENA
POR HIBRIDACION DE COLONIAS Y PERFILES DE
ADHERENCIA A CELULAS HEp-2 EN DIARREAS
INFANTILES**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
ESPECIALISTA EN BIOQUÍMICA CLÍNICA
P R E S E N T A
Q. F. B. MONICA MIRABAL GARCIA



MEXICO, D. F.

MARZO DE 1995



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

00544

3

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

28

FACULTAD DE QUIMICA
DIVISION DE FENOMENOS DE POTENCIAL

MEMORIA DE EJERCICIOS DE LABORATORIO
DE QUIMICA ANALITICA
ANALISIS DE UN MUESTRA DE
CANTIDAD

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
ESPECIALISTA EN QUIMICA GENERAL
D E F E S E N D O
C E D. MONICA MIRABAL GARCIA



MEXICO, D. F.

MARZO DE 1963

El presente trabajo fue realizado bajo la asesoría de la Dra. Yolanda López Vidal en el Departamento de Infectología-Investigación, del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubiran.

Agradezco a la Dra. Yolanda López Vidal por la oportunidad de realizar el presente trabajo, por brindarme parte de su tiempo y por sus acertados comentarios.

A todo el personal del Departamento de Infectología-Investigación y en especial a Gonzalo, Amelia, Enrique, Fer Tuz, Fer Arteaga y Luis Manuel por su compañerismo y gran apoyo.

Al M. en C. José Molina López por ser amigo y maestro.

A mis amigos y compañeros de la Especialidad en Bioquímica Clínica.

A tí Maricela por ser mi amiga y compañera en todo momento.

A mis Padres por su cariño, comprensión y apoyo que a lo largo de mi vida me han brindado y que sin ellos este paso más no sería posible.

A mis Hermanos y sus familias con el cariño y respeto de siempre.

INDICE

	PAG.
Lista de Tablas	i
Lista de Figuras	ii
Abreviaturas	iii
Resumen	1
Introducción	2
Antecedentes Históricos	3
Manifestaciones Clínicas	4
Mecanismos de Patogenicidad	4
Epidemiología	7
Justificación	9
Objetivos	9
Material y Métodos	10
Resultados	21
Discusión	34
Conclusiones	39
Apendice	40
Bibliografía	43

LISTA DE TABLAS

		PAG.
Tabla 1	Frecuencia de ECEP en países en vías de desarrollo	8
Tabla 2	Criterios de lectura en la hibridación en relación al perfil de adherencia	32
Tabla 3	Criterios de lectura considerados en la hibridación. Hibridación del 100%.	32
Tabla 4	Hibridación del 75%.	33
Tabla 5	Hibridación menor del 75%.	33
Tabla 6	Hibridación del 100% más hibridación del 75%.	33
Tabla 7	Relación entre perfiles de adherencia y coinfección con otros patógenos entericos.	34
Tabla 8	Duración del cuadro diarreico para cada perfil de adherencia.	35
Tabla 9	Distribución de edades en relación al perfil de adherencia observado.	35

LISTA DE FIGURAS

		PAG.
Figura 1	Modelo de dos estadios de la patogénesis de ECEP.	7
Figura 2	Obtención de la sonda EAF con las endonucleasas de restricción.	14
Figura 3	Principio del marcaje de la sonda EAF-Dig con el método	16
Figura 4	Extracción del plásmido pJPN 16.	21
Figura 5	Obtención de la sonda EAF del pJPN16 con endonucleasas de restricción.	22
Figura 6	Extracción y purificación de la sonda EAF a partir del gel de agarosa.	23
Figura 7	Marcaje de la sonda EAF con digoxigenina.	24
Figura 8	Membrana de hibridación de los controles y cepas de <i>E. coli</i> con la sonda EAF-Dig.	26
Figura 9	Monocapa de células HEp-2 en la cual se observan las microcolonias de <i>E. coli</i> típicas de la adherencia localizada.	27
Figura 10	Monocapa de células HEp-2 en la cual se observan las <i>E. coli</i> adheridas en palizada.	28

ABREVIATURAS

AA	Adherencia agregativa
AL	Adherencia localizada
pb	pares de bases
BFP	Pilis Formadores de Haces
Da	Daltons
DC	Desprendimiento celular
Dig	digoxigenina
D.O	Densidad óptica
EAF	Factor de Adherencia de ECEP
EAF-Dig	Sonda marcada con digoxigenina
eaeA	Genes que codifican para el fenómeno de Adherencia íntima y esfacelamiento
ECEA	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
ECEH	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
ECEI	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
ECEP	<i>Escherichia coli</i> enteropatógena
ECET	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica
FAS	Tinción de actina fluorescente
HEp-2	Línea celular de carcinoma laríngeo
MDa	MegaDaltons
MEM	Medio mínimo esencial
NBT	Nitroazul de tetrazolio
pEAF	Plásmido EAF
rpm	revoluciones por minuto
SSAF	Solución salina amortiguadora de fosfatos
SSC	Solución salina de citrato de sodio
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
UV	Luz ultravioleta
X-Fosfato	5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato

RESUMEN

La frecuencia de *E. coli* enteropatógena (ECEP) asociada a diarrea fue determinada en 128 cepas aisladas de niños menores de dos años alimentados al seno materno, durante episodios diarreicos en el período Abril a Septiembre de 1993. Con la finalidad de buscar una metodología alternativa a la adherencia celular propuesta por Cravioto, se utilizó la sonda que detecta los genes que codifican para el Factor de Adherencia de ECEP (sonda EAF) como único método de escrutinio. La sonda fue extraída del plásmido pJPN 16, empleando un macrométodo de lisis alcalina y utilizando las endonucleasas de restricción *Sal I* y *Bam HI*, para posteriormente marcarla con un método no radiactivo, digoxigenina (EAF-Dig). Las cepas fueron probadas con la sonda EAF-Dig en condiciones estrictas de hibridación. Aquellas cepas consideradas EAF+ fueron caracterizadas por su perfil de adherencia. El 27% de las cepas hibridaron con la sonda EAF y se distribuyeron en 4 perfiles de adherencia: adherencia agregativa (AA), adherencia localizada (AL), desprendimiento celular (DC) y adherencia negativa. Las cepas de *E. coli* EAF+ fueron aisladas como único patógeno en el 53% de los casos, el resto presentó coinfección con *Entamoeba histolytica* y *Campylobacter*. No se encontraron casos de diarrea crónica y el tiempo de duración promedio fue de 5.3 días. Las edades de los pacientes fluctúan entre 6 y 24 meses. Debido a la variación entre los patrones de adherencia y que no concuerdan con la definición de ECEP, se concluyó que se trata de un grupo bacteriano muy heterogéneo y por lo tanto la sonda EAF no puede ser usada como único método de escrutinio, sino que debe utilizarse con un método complementario, dado que las características de virulencia están mediadas por un grupo de genes.

INTRODUCCION

Las enfermedades diarreicas son un problema de salud pública en nuestro país, así como en otros países en vías de desarrollo en donde la población infantil es la más afectada.

La diarrea ha sido reconocida como una de las principales causas de morbi- mortalidad y se ha estimado que de 5 a 10 millones de muertes ocurren anualmente entre la población de Asia, Africa y América Latina, de los cuales 4.6 millones se presentan entre la población infantil menor de 5 años de edad (1).

Escherichia coli se presenta como una de las especies de microorganismos anaerobios facultativos de flora normal de intestino y juega un papel importante manteniendo la fisiología de este órgano. Dentro de estas especies, sin embargo, existen cepas patógenas que causan distintos síndromes de esta enfermedad diarreica (2).

Hasta el momento se reconocen cinco categorías de cepas de *E. coli* productoras de diarrea:

1 *E. coli* enterohemorrágica (ECEH)

2 *E. coli* enteroinvasiva (ECEI)

3 *E. coli* enterotoxigénica (ECET)

4 *E. coli* enteropatógena (ECEP)

5 *E. coli* enteroagregativa (ECEA).

Las categorías están basadas en sus diferentes propiedades de virulencia, el tipo de interacción con la mucosa intestinal, tipo de síndrome clínico, epidemiología y serotipos (2).

ANTECEDENTES HISTORICOS.

El año de 1985 marcó el centenario de la primera descripción de *Escherichia coli* por el pediatra alemán Theodore Escherich, quien llamó a este microorganismo *Bacterium coli commune* para indicar la ocurrencia universal en el intestino de individuos sanos.

Aunque muchos autores atribuyen el descubrimiento de *E. coli* diarreogénica a John Bray, la patogenicidad intestinal de *E. coli* fue primero sugerida por Laurelle, quien desde el año de 1889 argumentó que este organismo podía causar peritonitis si se liberaba en la cavidad peritoneal como resultado de la perforación intestinal (3).

Laurelle también aludió la posibilidad de que *E. coli* pudiera causar diarrea y vómito (cólera nostras).

ECEP fueron los primeros organismos de *E. coli* conocidos como causantes de diarrea; en el año de 1945 John Bray identifica estas cepas como *Bacterium coli neopolitanum* y demuestra que cepas aisladas de brotes nosocomiales y de brotes de una comunidad en una población de neonatos pueden ser aglutinados con antisueros de conejo que no reaccionan con *E. coli* aislada de niños sanos. Esas primeras investigaciones epidemiológicas recibieron un importante adelanto con el advenimiento de la serotipificación de Kauffman (3).

En 1955 Neter y colaboradores proponen el término de *E. coli* enteropatógena para referirse a:

"Aquellas cepas de *E. coli* de serotipos epidemiológicamente asociados a enfermedad diarreica que no pertenecen a ninguna de las otras categorías" (es decir no producen enterotoxinas termolábiles o termoestables o verotoxinas, ni invaden mucosa intestinal como *E. coli* enteroinvasiva)(4).

MANIFESTACIONES CLINICAS

ECEP se ha asociado como una importante causa de diarrea infantil, principalmente diarrea aguda aunque también se han descrito casos en diarrea de tipo persistente (1). **ECEP** coloniza el intestino delgado produciendo diarrea de tipo secretor, que puede estar acompañada de fiebre, vómito y la diarrea presentar moco sin sangre. Los niños menores de 6 meses presentan la forma más severa de la enfermedad, raramente afecta a niños mayores de 1 año, y el período de incubación es de 2 a 12 días.

MECANISMOS DE PATOGENICIDAD

Como el conocimiento de la patogénesis de **ECEP** ha avanzado, es visto que la serotipificación como único método de identificación ha caído en desuso, ya que no nos proporciona información acerca de la presencia de los factores de virulencia asociados a esta *E. coli* (4).

Por tanto ahora es más apropiado definir **ECEP** con base en sus determinantes genéticos que codifican propiedades patógenas características como son:

- 1) Adherencia Localizada
- 2) Adherencia íntima y Esfacelamiento.

1) ADHERENCIA LOCALIZADA

Cravioto y col. reportaron que el 80% de las cepas de **ECEP** aisladas de brotes de diarrea en cuneros se adhieren a células HEp-2 en forma de microcolonias (5). Scaletsky y col. denominaron a este tipo de adherencia Adherencia Localizada (AL) la cual se caracteriza por la producción de microcolonias que más que cubrir uniformemente las células de un cultivo monocapa lo hacen en una porción localizada de la célula (6). Esta propiedad se asocia a la presencia de un plásmido cuyo tamaño varía de 55 a 70 MDa llamado pEAF (7).

La cepa prototipo E234869 (O127:H6) contiene un plásmido de 60 MDa (pMAR 2). Este plásmido fue mapeado con endonucleasas de restricción; cuando un fragmento que codifica para la resistencia a kanamicina fue clonado en el sitio *Sal I* del plásmido, la propiedad de adhesividad se perdió. Estos datos sugirieron que el fragmento de 1000 bp *Bam HI - Sal I*, que flanquean el sitio crítico *Sal I*, contienen la porción del material genético que codifica para la adhesividad a células HEP-2. Así, este fragmento ha sido utilizado como sonda. Como aun no se sabe la naturaleza de la adhesina involucrada en este fenómeno, al plásmido se le ha denominado EAF, o sea que codifica para el Factor de Adherencia de ECEP y a la sonda, sonda EAF (8).

Girón y cols. han descrito que cuando ECEP es crecida en un medio sólido conteniendo sangre o en presencia de células HEP-2, este microorganismo expresa haces de filamentos, llamados Pilis Formadores de Haces o BFP, los cuales crean una red de fibras que mantienen unidos a los microorganismos. Ellos han sugerido que esta propiedad pudiera ser una adaptación que contribuye a su supervivencia en la superficie de la mucosa intestinal, ya que permite la formación de colonias estables (9).

Esta propiedad también está asociada a la presencia del pEAF y el desarrollo de adherencia de tipo localizado. Dicho pili está formado por unidades repetitivas de 19 500 Daltons (Da). Recientemente se desarrolló una sonda de 0.85 kb a la cual se le ha denominado sonda *bfpA* (10).

II) ADHERENCIA INTIMA Y ESFACELAMIENTO

Otra característica importante en la patogénesis de ECEP es la de producir una lesión histopatológica intestinal en humanos o en modelos animales. Esta lesión fue descrita por Moon y col. (11) como una lesión de Adherencia y Esfacelamiento (EAE), que se caracteriza por una adherencia íntima de la bacteria a la superficie del enterocito, causando una destrucción localizada de las microvellosidades para posteriormente ser parcialmente rodeada por proyecciones de la superficie del enterocito (fenómeno conocido como formación de pedestal). En las regiones de adherencia íntima se observa un rearrreglo de los elementos del citoesqueleto con una polimerización de filamentos de actina.

Knutton desarrolló un método de detección de este tipo de lesión, es la prueba de tinción de Actina Fluorescente (FAS), en donde el isotiocianato de fluoresceína es conjugado a la faloidina, la cual se une específicamente a filamentos de actina polimerizada y así se determinan altas concentraciones de actina en células epiteliales (12).

En contraste a la adherencia localizada, la adherencia y esfacelamiento ocurren en ausencia del pEAF, aunque en número y cinética retardada ya que esta propiedad está codificada en el cromosoma bacteriano, en el cual se ha identificado un gen que se ha denominado *eae* (Adherencia y Esfacelamiento de *E.coli*), que fue identificado por mutagénesis con TnphoA. Se han detectado secuencias homólogas en todas las cepas ECEP FAS+. El gen *eae* consiste de un fragmento de lectura abierta de 1817 bp. Este gen codifica para una proteína de membrana externa de 94 kDa a la cual se le ha denominado "intimina" reconocida por antisueros de la fase convaleciente de voluntarios infectados con ECEP (13, 14).

ECEP se consideró durante mucho tiempo un microorganismo no invasivo. En estudios realizados con el microscopio electrónico demuestran bacterias intracelulares, incluyendo especímenes clínicos y una variedad de células epiteliales. Sin embargo el significado de la invasividad en la patogénesis de ECEP no es claro, ya que esta bacteria no causa disentería (4).

El modelo más aceptado en la patogénesis de ECEP es el de dos estadios:

- 1a. Fase: Comprende el acercamiento y acumulación de las bacterias a las células epiteliales en un patrón localizado mediado por la adhesina EAF, o más recientemente, propuesto por Girón, mediado por BFP.
- 2a. Fase: Una vez formadas las microcolonias se inicia la destrucción de las microvellosidades intestinales, es decir el esfacelamiento, que hasta el momento se desconoce como se produce. La falta de microvellosidades permite a las bacterias adherirse en forma íntima a los receptores de las membranas presentes en la célula epitelial y los subsecuentes cambios en el citoesqueleto (4), Figura 1.

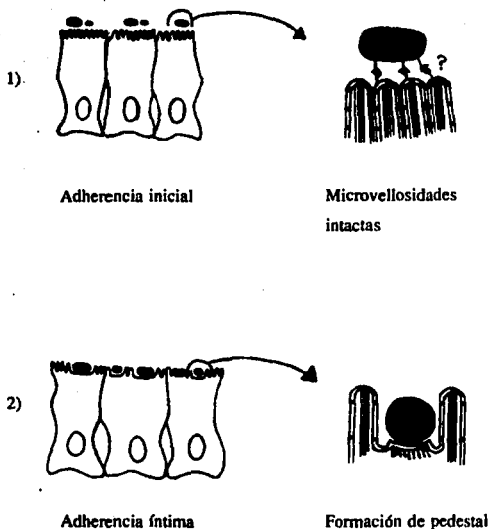


Figura 1 Modelo de dos estadios de la patogénesis de ECEP.

EPIDEMIOLOGIA

La diarrea neonatal nosocomial debida a ECEP actualmente es rara en países desarrollados. En Estados Unidos los serotipos clásicos de ECEP no parecen ser una importante causa de brotes de enfermedad entérica y su papel como agente causal es en casos esporádicos de diarrea infantil. En el Reino Unido, se reportan casos esporádicos (16) y la incidencia ha permanecido igual por más de 15 años; sin embargo, en países en vías de desarrollo la prevalencia de diarrea por ECEP es muy alta como se observa en la Tabla 1.

Tabla 1 Frecuencia de ECEP en países en vías de desarrollo.

PAIS	AÑO	POBLACION	METODOS	FRECUENCIA DE AISLAM.	LUGAR QUE OCUPA
Sao Paulo Brasil (17)	Mayo-Agosto 1985	Niños > 1 año	Adherencia e Hibridación	23.0 %	1er lugar
Bangkok Tailandia (18)	Enero-Diciembre 1988	Niños < 6 meses	FAS, Hibridación y Serotipificación	5.5 %	4o lugar, después de Salmonella, Rotavirus y C. jejuni.
Bangladesh (19)	Marzo-Agosto 1988	Niños < 20 meses	Hibridación y Serotipificación	18.0 %	En el 2do puesto más frecuente.
Beijing China (20)	Abril-Mayo 1989	-	Hibridación	5.0 %	5o lugar, después de Salmonella, Rotavirus, ECEP, ECEM y Aeromonas.
Guadaluajara México (21)	Verano de 1985	Niños de 3 a 84 meses	Adherencia y Serotipificación	13.0 %	3er lugar.
Mérida México (15)	Agosto de 1985 a Febrero de 1987	Niños < 1 año	Adherencia, Serotipi- ficación e Hibridación	45.0 %	1er lugar asociado a diarreas.
Chile (23)	Noviembre de 1985 a Marzo de 1986	-	Adherencia, serotipi- ficación e Hibridación	27.3 %	En este estudio el porcentaje está incrementado, ya que sólo se considera a las E. coli diarragénicas, de entre las cuales ECEP es la más común.

Adherencia a células HEp-2
Hibridación con la sonda EAF
FAS Tinción de actina fluorescente.

JUSTIFICACION

Las enfermedades diarreicas se presentan como un grave problema de salud en países en vías de desarrollo, como el nuestro. ECEP es uno de los agentes causales de diarreas en niños como ha sido demostrado en varios estudios epidemiológicos, sin importar las estrategias para su detección, por lo tanto se hace necesario aplicar un método diagnóstico rápido, sencillo y confiable.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la frecuencia de *Escherichia coli* enteropatógena (ECEP) en muestras de heces diarreicas en niños menores de dos años, utilizando la sonda EAF mediante hibridación de colonias.

OBJETIVOS PARTICULARES

Estandarizar las condiciones de extracción, corte y marcaje de la sonda EAF

Estandarizar las condiciones óptimas de hibridación.

Aplicar la sonda EAF en cepas de *E. coli* aisladas de muestras diarreicas de niños menores de dos años.

Determinar el perfil de adherencia a células HEp-2 de las cepas de *E. coli* EAF positivo.

MATERIAL Y METODOS

CEPAS DE REFERENCIA.

VECTOR pCVD 315 clonado con el fragmento de 1000 bp del Plásmido EAF (pMAR 2), en los sitios de restricción *Bam* HI - *Sal* I con marcador de resistencia a ampicilina. Al plásmido resultante se le denominó pJPN 16, el cual fue insertado en *Escherichia coli* HB101.

CEPA CONTROL (+): *E. coli* E2348\ 69 (O127:H6). Posee el plásmido pMAR2 de 60 MDa. Originalmente fue aislada de un brote de gastroenteritis infantil en el Reino Unido, en 1969.

CEPA CONTROL (-):

EcEH

EcEI

EcEA

E. coli HB101

Cepas donadas por el Dr. J. P. Nataro (Center for Vaccine Development, University of Maryland School of Medicine, Baltimore)

POBLACION DE ESTUDIO.

128 cepas de *E. coli* aisladas de episodios diarreicos durante el período Abril a Septiembre de 1993, de niños menores de dos años alimentados al seno materno, pertenecientes a la comunidad de San Pedro Mártir, Delegación Tlalpan, México, D.F. Se seleccionaron cepas Lactosa (+) con una morfología colonial característica de *E. coli*, la cual fue corroborada con pruebas bioquímicas.

EXTRACCION DEL PLASMIDO pJPN 16.

El plásmido pJPN 16 fue extraído de la cepa *E. coli* HB101 utilizando el macrométodo de lisis alcalina el cual es una modificación del método de Birnboim y Doly (1979).

La cepa de *E. coli* que contiene el plásmido pJPN16 se cultivó en 30 mL de caldo Luria con ampicilina a una concentración de 50 µg/mL durante 18 horas en agitación a 37°C. Posteriormente, con esos 30 mL se inocularon 500 mL de caldo Luria con la misma concentración de ampicilina, incubándolo nuevamente a 37°C/18 horas en agitación para obtener una cantidad suficiente de plásmido.

Con el fin de separar el paquete bacteriano, el cultivo se centrifugó durante 10 minutos/4°C/6000 rpm, el sedimento obtenido fue resuspendido en 4 mL de solución de lisis glucosa/tris/EDTA; a esta suspensión se le adicionaron 10 mg de lisozima disuelta en un ml de solución glucosa/tris/EDTA y al término se agregaron 20 mL de solución NaOH/SDS, incubándose 10 minutos a 4°C, se adicionaron 7.5 mL de acetato de potasio, se incubó 10 minutos a 4°C, y así, el sobrenadante rico en plásmido, recuperado después de una centrifugación a 13 000 rpm/10 minutos/4°C, fue decantado a través de una gasa estéril, a éste se le añadieron 0.6 volúmenes de isopropanol para su precipitación, y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente. El plásmido pCVD 315 en forma de precipitado que se obtuvo al centrifugar a 11 000 rpm/10 minutos/temperatura ambiente, fue lavado con 4 mL de etanol al 70% preenfriado a -20°C, se secó al vacío y se procedió a su purificación.

La purificación del DNA plasmídico se realizó resuspendiéndolo en 1 mL de solución glucosa/tris/EDTA, añadiendo 2 mL de NaOH/SDS y se dejó a temperatura ambiente 10 minutos. Después se le adicionaron 1.5 mL de acetato de potasio y se incubó nuevamente 10 minutos a temperatura ambiente.

La extracción del plásmido pJPN 16 concentrado en el sobrenadante resultado de una centrifugación a 11 000 rpm/10, minutos se hizo con un volumen igual de una solución de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1), se obtuvo la fase acuosa, la cual fue lavada 2 veces más con una solución de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1). El DNA del plásmido se precipitó de la fase acuosa con acetato de sodio a una concentración final de 0.3 M y 2.5 volúmenes de etanol absoluto y se incubó toda la noche a -20°C; el plásmido, en forma de precipitado, se lavó dos veces con etanol al 70% preenfriado a -20°C, eliminando así los

contaminantes; el sedimento se secó al vacío y se resuspendió en solución amortiguadora TE y se almacenó a 4°C hasta su uso.

La detección del plásmido pJPN 16 en la suspensión final se realizó con un corrimiento electroforético en agarosa al 0.7% a 95 volts por un período de 90 minutos aproximadamente; se usó DNA de fago lambda digerido con *Hind* III como marcador de peso molecular.

CUANTIFICACION DEL DNA PLASMIDICO pJPN 16.

Una vez extraído el plásmido pJPN 16, la cuantificación se realizó mediante un método espectrofotométrico a una longitud de onda de 260 y 280 nm. La lectura obtenida a 260 nm se multiplicó por el factor 50 (Densidad Optica de 1.0 corresponde a aproximadamente 50 µg/mL de DNA de doble cadena). La relación de D.O 260/280 nm fue un índice de la pureza del plásmido pCVD 315 obtenido.

OBTENCION DE LA SONDA EAF DEL PLASMIDO pJPN 16 CON ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN

La sonda EAF se obtuvo del plásmido pJPN 16 al final de su digestión en los sitios de inserción con las enzimas *Sal* I (Stratagene 10U/mL) y *Bam* HI (Stratagene 12 U/mL) como se indica a continuación:

REACTIVOS	CONCENTRACION
DNA plasmídico	1 µg
Sol. amortiguadora 10X	1.5X
<i>Sal</i> I	2.5 U
<i>Bam</i> HI	2.5 U
Agua desionizada	c.b.p. 20 µL

La mezcla fue incubada toda la noche a 37°C o dos horas como mínimo . La separación de la sonda EAF (fragmento de 1000 bp) se realizó por electroforesis en gel de agarosa al 0.7 %, teñido con bromuro de etidio para su visualización, usando como marcador de peso molecular DNA de ϕ X174 digerido con *Hae* III. El fragmento de gel conteniendo la sonda EAF se cortó para extraer este DNA posteriormente, Figura 2.

EXTRACCION Y PURIFICACION DE LA SONDA EAF A PARTIR DEL GEL DE AGAROSA

La extracción y purificación de la sonda EAF se llevó a cabo utilizando el equipo comercial geneclean II (BIO 101 Inc.) de la siguiente manera: el fragmento de gel conteniendo la banda de DNA correspondiente a la sonda EAF, fue pesado para determinar su volumen por peso (1 g equivale aproximadamente a 1 ml de gel), y de esta manera agregar 3 volúmenes de NaI e incubar a 55°C para disolver el gel y liberar la sonda EAF. La captura de la sonda EAF soluble se llevó a cabo añadiendo cantidad suficiente de matriz de sílica e incubando en agitación durante 15 a 60 minutos a temperatura ambiente; posteriormente esta suspensión fue centrifugada 5 minutos a 14 000 rpm para sedimentar la matriz con la sonda unida, con la finalidad de eliminar todos los contaminantes de la sonda EAF; este sedimento se lavó tres veces con solución de NEWWASH (NaCl, tris, EDTA, etanol y agua).

La sonda EAF se eluyó de la matriz de sílica resuspendiéndola en un volumen de agua igual al de la matriz de sílica añadida, se colocó a 55°C/3 minutos, con lo cual el DNA de la sonda EAF quedó solubilizado en el sobrenadante obtenido después de centrifugar.

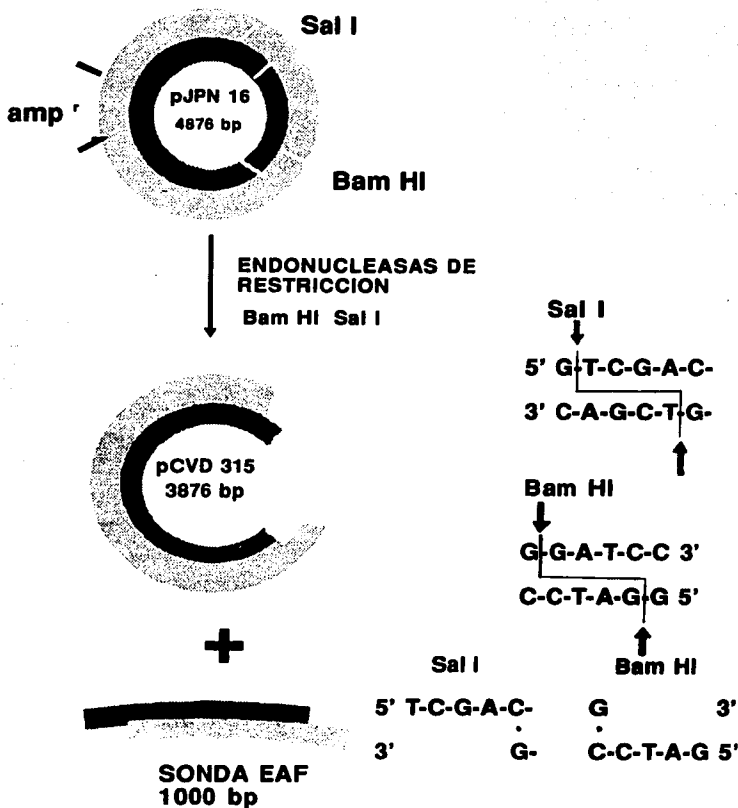


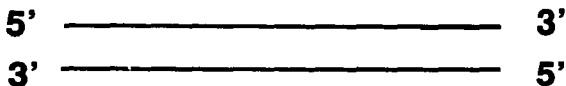
Figura 2 Obtención de la sonda EAF con las endonucleasas de restricción Sal I y Bam HI.

MARCAJE DE LA SONDA EAF CON DIGOXIGENINA (SONDA EAF-DIG)

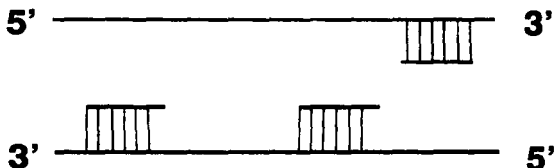
La sonda EAF fue marcada con digoxigenina (Dig), empleando el equipo Dig-ácidos nucleicos marcaje y detección (Boehringer Mannheim), que es un método no radiactivo, Figura 3.

3 a 10 µg de la sonda EAF se linearizó y desnaturalizó calentándolo a 95°C /10 minutos e inmediatamente después se colocó 30 segundos en hielo seco/etanol, posteriormente se pasó a un baño de hielo y se añadió: 2 µL de mezcla de hexanucleótidos, 2µL de dNTP (mezcla de nucleótidos que contiene los nucleótidos marcados), c.b.p. 19 µL de agua redestilada estéril y 1 µL de enzima klenow (equivalente a 2 U de enzima) la mezcla se incubó a 37°C por más de 20 horas.

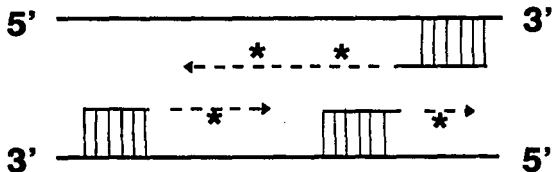
Una vez transcurrido este período la reacción fue detenida añadiendo 2 µL de EDTA 0.2 M pH 8.0 y la sonda EAF-Dig se precipitó con 2.5 µL de LiCl 4 M y 75 µL de etanol absoluto a -20°C, incubándose a -70°C /1 hora. Se centrifugó a 12 000 rpm/10 minutos y la sonda EAF-Dig precipitada se lavó con etanol al 70% frío para eliminar el exceso de reactivos; fue secada al vacío, para posteriormente disolverse en 50 µL de amortiguador TE por 30 minutos a 37 °C.



Desnaturalización del DNA y apareamiento al azar de los hexanucleótidos



Enzima klenow y mezcla de nucleótidos con el nucleótido marcado



mezcla de hexanucleótidos

* dUTP marcado con digoxigenina

→ enzima klenow

--- desoxinucleótidos complementarios

Figura 3 Principio del marcaje de la sonda EAF-Dig con el método "random primer".

FIJACION DE LA SONDA EAF-DIG A UN SOPORTE SOLIDO

Con la finalidad de cuantificar la sonda EAF-Dig obtenida, 1 μ L de cada una de las diluciones: 1:5, 1:50, 1:500, 1:5000 y 1:50 000 se colocaron sobre una membrana de nylon. A continuación se prepararon diluciones iguales de un DNA-Dig de concentración conocida y también se colocó 1 μ L de cada una de éstas, sobre la misma membrana nylon. El DNA se fijó a la membrana por exposición a luz UV durante 3 minutos.

CUANTIFICACION DE LA SONDA EAF-DIG

La cuantificación se realizó utilizando un método comparativo de la intensidad del color desarrollado por un DNA-Dig de concentración conocida y la sonda EAF-Dig.

La detección de la digoxigenina unida a la sonda EAF y al DNA control se llevó a cabo de la siguiente manera:

La membrana de nylon fue humedecida en solución amortiguadora Genius 1 y después se incubó en solución amortiguadora Genius 2 por 15 minutos con la finalidad de bloquear la membrana y evitar reacción de fondo. La siguiente incubación fue con el anticuerpo antidigoxigenina diluido 1:5000 en solución Genius 2 durante 15 minutos, después de este período se lavó el exceso de anticuerpo dos veces, 15 minutos cada lavado con solución Genius 1 y la membrana se colocó en solución amortiguadora Genius 3 por un período de dos minutos, ya que esta solución activa a la fosfatasa alcalina que está conjugada al anticuerpo. Para el desarrollo del color se incubó la membrana en la obscuridad en 10 ml de solución Genius 3 con 45 μ L de nitroazul de tetrazolio (NBT) y 35 μ L de 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato (X-fosfato), que actúan como sustratos de la enzima fosfatasa alcalina. Todo lo anterior se realizó a temperatura ambiente. Se determinó su concentración comparando la intensidad de los puntos del DNA-Dig control con los de la sonda EAF-Dig.

FIJACION DEL DNA PROCEDENTE DE LAS COLONIAS DE *E. coli* A UN SOPORTE SOLIDO

Cada cepa de *E. coli* fue inoculada con la punta de un palillo de madera estéril en la superficie de agar soya tripticasa; después de incubar 18 horas a 37 °C las colonias obtenidas se adhirieron a una membrana de nylon estéril (soporte sólido), colocándola sobre la superficie del agar durante 5 minutos. Posteriormente las colonias transferidas a la membrana nylon se lisaron con el objeto de liberar el DNA bacteriano. Esto se realizó como se menciona a continuación:

Las membranas se colocaron primero sobre un papel filtro impregnado con una solución desnaturalizante (NaOH 0.5M, NaCl 1.5M) durante 15 minutos, y después sobre un papel filtro impregnado con solución de pH 7.4 (tris 0.5M, HCl 1M, NaCl 1.5M) que actuó como neutralizante. Entre cada cambio de solución la membrana era colocada sobre un papel filtro seco por 5 minutos para eliminar el exceso de líquido.

El DNA liberado de cada colonia de *E. coli* se fijó a la membrana exponiéndolo a la luz UV durante 3 minutos. Las membranas así procesadas fueron conservadas en sobres de papel filtro en un desecador a temperatura ambiente hasta su uso.

HIBRIDACION DEL DNA DE LAS CEPAS DE *E. coli* CON LA SONDA EAF-DIG

Las condiciones óptimas de hibridación entre el DNA de las cepas de *E. coli* y la sonda EAF-Dig se determinaron utilizando como control positivo la cepa *E. coli* E2348/69 y como controles negativos las cepas ECEH, ECEI, ECEA y *E. coli* HB101; el DNA proveniente de la lisis de las colonias de cada uno de estas cepas fue fijado sobre un papel de nylon por el método descrito anteriormente. Una vez determinadas estas condiciones, se probó hibridar cinco cepas de *E. coli* que presentaron un patrón de adherencia localizada.

La hibridación se realizó en las siguientes condiciones: las membranas de nylon con el DNA fijado, tanto de las cepas de *E. coli* problema como de los controles negativos y positivo, fueron incubadas en solución de prehibridación en una proporción de 20 mL de solución por cada 100 cm² de membrana, utilizando para ello bolsas de plástico selladas y sumergidas en un baño de agua a 68°C; con la finalidad de quitar a las membranas los restos bacterianos que quedaron como residuo sobre éstas después de la lisis, se cambió la solución de prehibridación por solución nueva después de una hora de incubación continuándose por dos horas más. Posteriormente la membrana se cubrió con la solución de hibridación que contenía 40 ng/mL de sonda EAF-Dig, y se incubó a 68°C toda la noche. Al día siguiente la membrana fue lavada 10 minutos a temperatura ambiente con solución SSC 5X y dos veces 15 minutos cada lavado a 68°C con solución SSC 0.1X. Se llevó a cabo la detección de la digoxigenina unida a la sonda EAF que hibridó con el DNA de las cepas de *E. coli* como se mencionó anteriormente.

DETERMINACION DEL PERFIL DE ADHERENCIA A CELULAS HEP-2 PRESENTADO POR LAS CEPAS DE *E. coli*

A las cepas de *E. coli* que hibridaron con la sonda EAF-Dig se les determinó el perfil de adherencia a células HEP-2, siguiendo la metodología descrita por Cravioto y colaboradores (5).

Cada cepa a probar fue crecida durante un período de 18 horas a 37°C en agitación en un ml de caldo triptona al 1%, que contenía D-manosa a una concentración final de 1%; la turbidez que se obtuvo después de esta incubación fue comparable al estandar 0.5 de McFarland que equivale a 10⁸ Unidades Formadoras de Colonia/mL (UFC/mL); el cultivo obtenido se centrifugó 15 minutos a 3000 rpm, se descartó el sobrenadante y el botón bacteriano fue resuspendido en un ml de SSAF; el inóculo se preparó adicionando 975 µL de medio mínimo esencial (MEM) sin suero y sin antibiótico más 25 µL de la suspensión bacteriana anterior.

La monocapa de células HEP-2 se preparó en una placa de polipropileno de 24 pozos, cada pozo con un cubreobjetos redondo estéril y sobre él células HEP-2, de manera que la monocapa quedara formada sobre el cubreobjetos; la placa fue incubada a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂ y 85% de humedad durante 24 horas para obtener una monocapa del 90 al 95% de confluencia. Después de esta incubación, fue desechado el MEM de cada uno de los pozos y cada pozo lavado con un mL de SSAF; posteriormente se añadieron cada una de las suspensiones bacterianas preparadas, incluyendo un control positivo y un pozo con la cepa negativa a la adherencia.

La placa fue incubada por tres horas a 37°C con atmósfera de 5% de CO₂, después de este período de incubación se descartó el MEM, y se lavó tres veces cada pozo con un mL de SSAF, con la finalidad de quitar a las bacterias no adheridas a las células; las células se fijaron con un mL de metanol, dejando actuar el metanol durante 60 segundos, posteriormente se adicionó un mL de colorante Giemsa y se dejó teñir durante 20 minutos; cada pozo fue lavado tres veces con un mL de agua desionizada, para eliminar el exceso de colorante.

Los cubreobjetos con la monocapa adherida a ellos se sacaron de los pozos y se pasaron por las siguientes soluciones: acetona; acetona; acetona/xileno (vol/vol); xileno; xileno, 30 segundos en cada una de ellas.

Para la observación al microscopio de los resultados obtenidos, 24 portaobjetos se marcaron con la clave dada a cada cepa y sobre ellos fue puesta una gota de bálsamo de Canadá, sobre la cual se colocó el cubreobjeto redondo correspondiente, con la monocapa celular hacia abajo. Las preparaciones, una vez secas, fueron observadas con el objetivo de inmersión, considerando como positivas más del 40% de células con bacterias adheridas.

Aquellas cepas que en este primer ensayo mostraron resultados de adherencia negativa, se les realizó un segundo ensayo con seis horas de incubación, en el cual se hizo un lavado intermedio a las tres horas con un ml de SSAF, para continuar incubando con MEM sin suero y antibiótico durante tres horas más, utilizándose el mismo criterio para positividad.

RESULTADOS

EXTRACCION DEL PLASMIDO pJPN 16.

La extracción del plásmido pJPN 16 en un principio se realizó por el método de Kado y Liu; aunque se obtenía un DNA plasmídico puro la cantidad era menor, ya que se trata de un micrométodo que presenta la ventaja de ser un procedimiento rápido, a comparación del macrométodo de lisis alcalina que dió un rendimiento de aproximadamente (0.9 mg/ 500 ml) de cultivo, por lo que sólo se realizó una extracción y se mantuvo almacenada a 4 °C, (Fig 4).

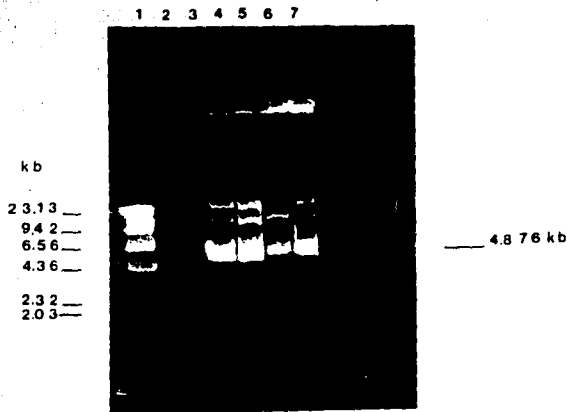


Figura 4 En el carril 1 se observa el DNA del fago lambda digerido con *Hind* III, usado como marcador de peso molecular y en los carriles 4, 5, 6 y 7 el DNA del plasmido pJPN 16 extraído por el macrométodo de lisis alcalina y cuyo tamaño es de 4876 bp. Gel de agarosa al 0.7%. Tendido con bromuro de etidio.

OBTENCION DE LA SONDA EAF DEL PLASMIDO pJPN 16 CON ENDONUCLEASAS DE RESTRICCION

La pureza del DNA plasmídico permitió la digestión con las endonucleasas de restricción *Sal I* y *Bam HI* (0.5 U/ μ g DNA de cada enzima). Con la finalidad de realizar los cortes en un solo paso se utilizó una concentración de solución amortiguadora a la cual las dos enzimas fueran activas; esta concentración fué de 1.5 X partiendo de una solución amortiguadora de 10X.

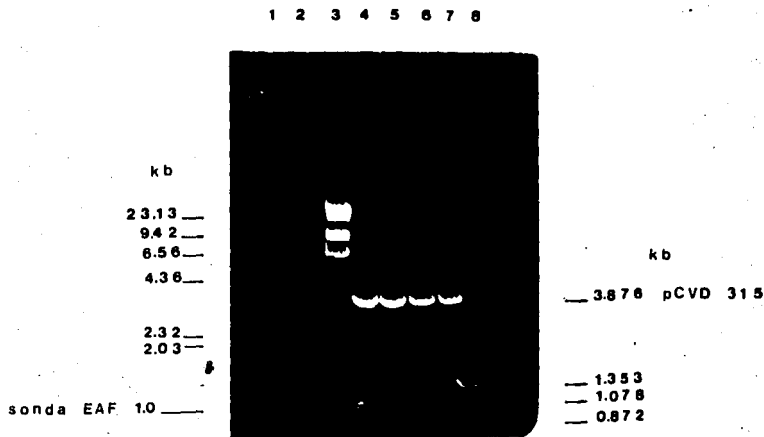


Figura 5 En el carril 3 se observa el marcador de peso molecular lambda digerido con *Hind III*, el cual sirve para detectar el vector pCVD 315 (3876 bp); los carriles 4, 5, 6 y 7 muestran la sonda EAF de 1000 bp, obtenida al digerir 9 μ g de plasmido pJPN 16 con 2.5 U de cada enzima (*Bam HI* y *Sal I* por μ g de plásmido). El carril 8 muestra el marcador ϕ X174 digerido con *Hae III*, usado como marcador de peso molecular. Gel de agarosa al 0.7 %. Teñido con bromuro de etidio.

EXTRACCION Y PURIFICACION DE LA SONDA EAF A PARTIR DEL GEL DE AGAROSA

Una vez identificada la sonda EAF, se extrajo del gel con la matriz de sílica; para constatar que realmente se extraía la sonda EAF se hizo un corrimiento electroforético y se detectó la sonda de 1000 bp en la solución de elución; la Figura 6 muestra este DNA.

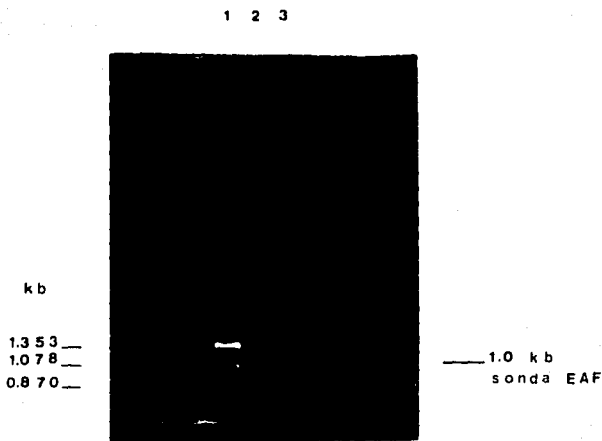


Figura 6 El carril 1 muestra el DNA del fago 6X174 digerido con *Hae* III usado como marcador de peso molecular, el carril 2 muestra 2 μ L de la solución de elución con la sonda EAF de 1000 bp extraída y purificada del gel de agarosa con matriz de sílica. Gel de agarosa al 0.7%. Teñido con bromuro de etidio

MARCAJE DE LA Sonda EAF CON DIGOXIGENINA (SONDA EAF-DIG)

El marcaje de la sonda EAF se realizó con el método de random primer. Una vez realizado este marcaje la cantidad de sonda obtenida fue de 5 ng/ μ l, cantidad suficiente para hibridar las membranas (el volumen de sonda marcada obtenida es de 50 μ l), Figura 7.

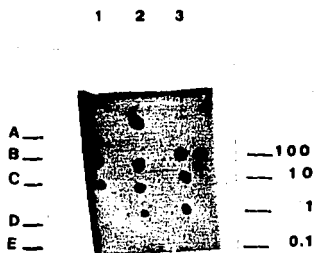


Figura 7 Las posiciones 1 y 2 corresponden a la sonda EAF-Dig con las siguientes diluciones: A) 1:5, B) 1:50, C) 1:500, D) 1:5000 y E) 1:50 000. La posición 3 corresponde al control con las concentraciones marcadas. Por comparación la sonda EAF-Dig de la posición 1 tuvo una concentración aproximada de 5 ng/ μ L y la sonda EAF-Dig de la posición 2 tuvo una concentración aproximada de 2.5 ng/ μ L.

FIJACION DEL DNA PROCEDENTE DE LAS COLONIAS DE *Escherichia coli* A UN SOPORTE SOLIDO.

Se utilizaron como el soporte sólido dos tipos de membrana, una de ellas fue la membrana de nitrocelulosa, la cual no se utilizó debido a que su manejo era más difícil por ser quebradiza a la manipulación y tenía la desventaja de que era necesario someterla a un tratamiento previo a su uso. La membrana de nylon zeta-probe (BIO-RAD) fue la utilizada en este estudio, presentó la ventaja de ser resistente y de presentar menos reacción de fondo al llevar a cabo la detección de la digoxigenina unida a la sonda EAF.

La lisis bacteriana de las colonias de las cepas de *E. coli* fue comprobada al realizar una tinción de gram y no observar células bacterianas completas.

HIBRIDACION DE LAS CEPAS DE *Escherichia coli* CON LA SONDA EAF-DIG.

Las condiciones de temperatura y concentración de sales a las cuales se llevó a cabo la hibridación se determinaron utilizando la cepa control positivo E2348/69 y las cepas control negativo ya mencionadas; una vez determinadas las condiciones óptimas, en las cuales sólo el control positivo mostraba hibridación con la sonda EAF-Dig, como se observa en la Figura 8.

Se probaron seis cepas, de las cuales algunas pertenecían a los serotipos ECEP y que presentaron los siguientes resultados:

CEPA No. 1	SEROTIPO	AL/FAS	HIBRIDACION DE LA SONDA EAF-DIG.
1	O111:NM	+/	+
2	O126:NM	-/-	-
3	O111ac:NM	+/+	+
4	O148:NM	+/+	+
5	O55:H6	+/+	+
6	O111:NM	+/-	-

CONTROLES

E. coli
HB101

ECEH

ECEI

ECEA

ECEP

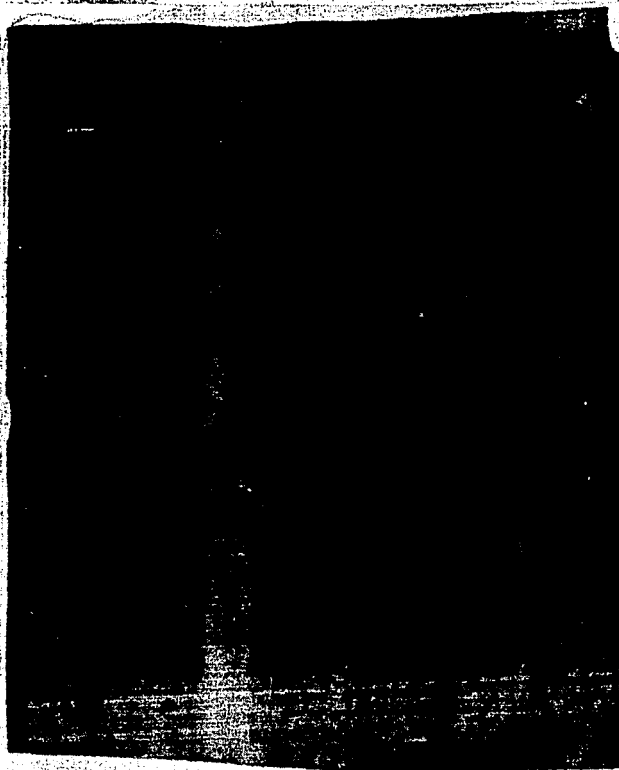


Figura 5 Membrana de hibridación de los controles y cepas de E. coli con la sonda EAF-Dig.



Figura 9 Monocapa de células HEp-2 en la cual se observan las microcolonias de **E. coli** típicas de la adherencia localizada. Técnica según Cravioto y col. (5).

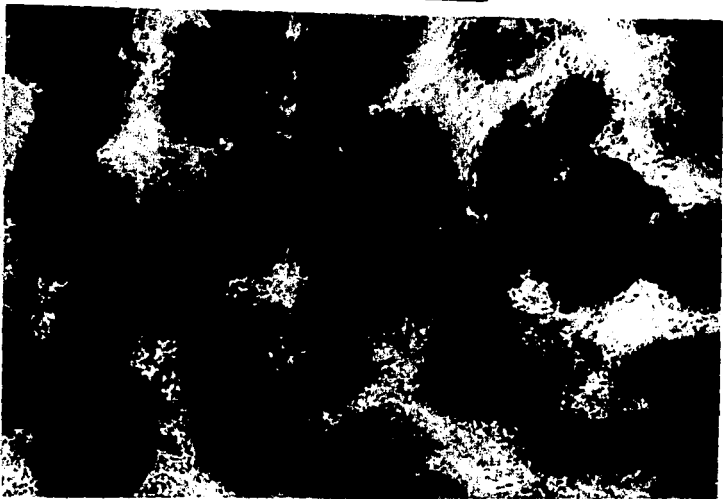


Figura 10 Monocapa de células HEp-2 en la cual se observan las *E. coli* adheridas en palizada tanto a la superficie de la célula como al vidrio de la preparación. Técnica según Cravioto y col. (5).

De las 128 cepas de *E. coli* aisladas de episodios diarreicos de niños menores de dos años, 35 cepas, es decir el 27 % hibridaron con la sonda EAF-Dig, considerándose tres criterios de lectura para la hibridación: aquellas colonias cuya intensidad del color desarrollado por la detección de la digoxigenina unida a la sonda EAF era igual a la intensidad desarrollada por el control positivo se consideraron con una hibridación del 100 %, aquella intensidad que era menor a la del control positivo pero mucho mayor a la del control negativo se consideró con una hibridación del 75 % y aquella intensidad un poco mayor a la del control negativo sin llegar a ser igual a éste se consideró con una hibridación menor del 75 %, Figura 8.

DETERMINACION DEL PERFIL DE ADHERENCIA OBSERVADO PARA CADA UNA DE LAS CEPAS DE *Escherichia coli*.

Los perfiles de adherencia observados para cada una de las cepas de *E. coli* que hibridaron con la sonda EAF-Dig fueron las siguientes: Adherencia Agregativa (AA) para aquellas cepas que presentaron adherencia tanto a las células como al vidrio, Adherencia Localizada (AL) para aquellas cepas que presentaron la formación de una colonia adherida en una porción localizada de la célula, Desprendimiento Célular (DC) para aquellas cepas que provocaron el desprendimiento de la monocapa de células HEP-2 de la superficie del cubreobjetos redondo y por último, aquellas cepas que no se adhirieron a las células HEP-2 de la monocapa.

Los perfiles de adherencia observados para cada una de estas cepas se distribuyeron en los criterios de hibridación como se muestra en la Tabla 2.

**TABLA 2 CRITERIOS DE LECTURA EN LA HIBRIDACION
EN RELACION AL PERFIL DE ADHERENCIA.**

PERFIL DE ADHERENCIA	HIBRIDACION	HIBRIDACION	HIBRIDACION	TOTAL n
	100% n (%)	75 % n (%)	<75 % n (%)	
AA	2 (28.6)	3 (42.9)	2 (28.6)	7
NEG	12 (50)	5 (20.8)	7 (29.2)	24
DC	0 (0)	3 (100)	0 (0)	3
AL	1 (100)	0 (0)	0 (0)	1

La separación de cada uno de estos criterios en relación al perfil de adherencia se muestra en las tablas 3, 4, 5 y 6.

**CRITERIOS DE LECTURA CONSIDERADOS EN LA HIBRIDACION
TABLA 3. HIBRIDACION DEL 100 %**

PERFIL DE ADHERENCIA	n (%)
AA	2 (13.3)
NEG	12 (80)
DC	0 (0)
AL	1 (6.7)
TOTAL	15 (100)

TABLA 4. HIBRIDACION DEL 75 %

PERFIL DE ADHERENCIA	n (%)
AA	3 (27.3)
NEG	5 (45.4)
DC	3 (27.3)
AL	0 (0)
TOTAL	11 (100)

TABLA 5. HIBRIDACION MENOR DEL 75 %

PERFIL DE ADHERENCIA	n (%)
AA	2 (22.2)
NEG	7 (77.8)
DC	0 (0)
AL	0 (0)
TOTAL	9 (100)

TABLA 6. HIBRIDACION DEL 100 % MAS HIBRIDACION DEL 75 %

PERFIL DE ADHERENCIA	n (%)
AA	5 (19.2)
NEG	17 (65.4)
DC	3 (11.6)
AL	1 (3.8)
TOTAL	26 (100)

El 47 % (9/19) de los pacientes en los que se detectó *E. coli* EAF+ presentaron un estado de coinfección, siendo *Campylobacter sp* y *E. histolytica* los patógenos encontrados además de *E. coli* EAF+. A *Campylobacter sp* se le encontró con una frecuencia del 36 % (7/19) y a *E. histolytica* con una frecuencia del 11 % (2/19) en dichos pacientes, Tabla 7.

TABLA 7. RELACION ENTRE PERFILES DE ADHERENCIA Y COINFECCION CON OTROS PATOGENOS ENTERICOS.

PERFIL DE ADHERENCIA	<i>Campylobacter</i> n (%)	<i>E. histolytica</i> n (%)	* <i>E. coli</i> n (%)	TOTAL
AA	1 (20)	1 (20)	3 (60)	5
AL	0 (0)	1 (100)	0 (0)	1
NEG	6 (54.5)	0 (0)	5 (45.5)	11
DC	0 (0)	0 (0)	2 (100)	2

* patógeno único.

El criterio tomado para considerar que un microorganismo patógeno diferente de *E. coli* estaba asociado al cuadro diarreico es que éste fuera encontrado en un periodo no mayor a 7 días antes o 7 días después de que se presentara la diarrea.

Considerando que aquel cuadro diarreico con una duración mayor a 14 días sería tomado como una diarrea de tipo crónico, en ninguno de los pacientes se presentó un cuadro diarreico de este tipo, ya que sólo un paciente presentó un período de 14 días, encontrándose en el límite del criterio considerado. La Tabla 8 presenta la duración de la diarrea y su distribución de acuerdo a cada perfil de adherencia.

TABLA 8. DURACION DEL CUADRO DIARREICO PARA CADA PERFIL DE ADHERENCIA

PERFIL DE ADHERENCIA	DURACION MEDIA (DIAS)	INTERVALO (DIAS)
AA	4.4	2 - 7
AL	7.0	-
DC	3.0	2 - 4
NEG.	6.0	4 - 14

Las edades en las cuales se detectaron *E. coli* EAF+ fueron desde 6 meses, que fue el único paciente al que se le aisló una *E. coli* con un perfil de adherencia localizado (AL) hasta los 24 meses, edad límite para ser incluidos en este estudio, Tabla 9.

TABLA 9. DISTRIBUCION DE EDADES EN RELACION AL PERFIL DE ADHERENCIA OBSERVADO

PERFIL DE ADHERENCIA (n)	EDAD MEDIA (MESES)	INTERVALO (MESES)
AA (5)	12.6	8 - 23
AL(1)	6.0	-
DC(2)	11.0	8 - 14
NEG(11)	13.8	9 - 24

DISCUSION

En los estudios epidemiológicos realizados en países en vías de desarrollo **ECEP** se encuentra dentro de los cinco primeros lugares como agente causante de diarrea en niños menores de dos años (17 - 23). Por tal motivo se han desarrollado varios métodos de detección, basados algunos de ellos en sus propiedades de patogenicidad. La característica de adherirse a células epiteliales *in vitro* en un perfil conocido como Adherencia Localizada, se ha utilizado como un indicador importante de su patogenicidad *in vivo*. Basándose en esta propiedad se desarrolló la sonda EAF de 1000 bp obtenida del plásmido EAF (60 MDa); dicha sonda fue utilizada en el presente estudio como método de detección de **ECEP** (8).

Las condiciones de hibridación que se determinaron con los controles positivos y negativos se consideran condiciones estrictas, ya que la temperatura de hibridación fue alta y la concentración de sales baja, lo cual hace que la hibridación entre la sonda y el DNA bacteriano se lleve a cabo únicamente entre cadenas de DNA estrictamente complementarias. El marcaje de la sonda fue realizado con un método no radiactivo (digoxigenina) el cual, además de esta ventaja presenta una estabilidad mayor (1 año) y un manejo menos complicado de la sonda al descartar todos los cuidados que se deben de tener al manejar radiactividad.

Al realizar la hibridación con las cepas problema se observó que el color desarrollado por la detección de la digoxigenina unida a la sonda EAF (EAF-Dig) presentaba colonias sin color (negativas) y colonias con tres diferentes intensidades. Estas se consideraron **E. coli** EAF+ y fueron clasificadas en tres criterios de hibridación: hibridación del 100 % (Intensidad igual al control positivo), hibridación del 75 % (intensidad menor al control positivo pero mucho mayor al negativo) e hibridación <75% (Intensidad mayor al control negativo), para posteriormente observar su perfil de adherencia y así conocer su comportamiento, ya que una de las críticas del uso de las sondas de DNA para propósitos diagnósticos es que las cepas detectadas puedan contener fragmentos de DNA homólogos pero no expresar el gen por alguna razón (26). Se obtuvieron como resultado cuatro perfiles de adherencia: AA, AL, DC y Adherencia Negativa.

De igual manera, Girón y colaboradores (10) reportan diferentes intensidades de hibridación, sólo que descartan aquellas que presentan intensidad menor que el control positivo, ya que al realizar los ensayos de adherencia estas cepas no presentan adherencia localizada, y aquellas con hibridación igual al control positivo para algunas cepas es necesario prolongar los tiempos de incubación de las bacterias con la monocapa celular hasta nueve horas para que se exprese el fenotipo de AL.

Si consideramos el total de cepas y obtenemos la distribución del perfil de adherencia en cada criterio de hibridación (Tabla 1), observamos que para AA un gran porcentaje (42.9%) está presente en la hibridación del 75 % así como todas las cepas con DC. Si nuestro interés es la detección de cepas ECEP con posible AL, de acuerdo con la definición de ECEP propuesta éstas se encuentran dentro del grupo con hibridación del 100 %, además de que un porcentaje alto (50%) de cepas no adherentes también está considerado en este grupo.

Si consideramos cada criterio de hibridación por separado y analizamos la distribución en cada perfil de adherencia, encontramos que la sonda presenta una baja especificidad en las condiciones de hibridación usadas, ya que aunque nuestro criterio sea el más estricto (hibridación del 100 %) el porcentaje de AL del total de cepas consideradas es muy bajo: 6.7 %, el de AA 13.3 % y el mayor porcentaje será el ocupado por las cepas no adherentes 80 % y no se consideran las de DC.

Si consideramos los dos criterios (hibridación del 75 % o hibridación menor del 75 %) quizás podríamos tener la certeza de que en nuestro grupo no existan cepas con adherencia localizada o bien que no se expresen fenotípicamente en un alto porcentaje (45.4 % y 77.8 % respectivamente).

El considerar los dos criterios juntos (hibridación del 100 % e hibridación del 75 %) y excluir el tercero (hibridación sólo menor del 75 %) disminuimos el porcentaje de cepas con AL (3.8 %) y aumentamos el de AA (19.2 %), pero excluimos a las cepas con DC.

Sin embargo, no podemos inclinarnos hacia ninguno de los criterios antes mencionados, pues nos encontramos ante un grupo de cepas de *E. coli* muy heterogéneo, con una gran variabilidad genética (22,23 y 24), ya que las cepas que hibridaron con la sonda EAF y no presentan ningún tipo de adherencia, podemos asumir que poseen los genes que codifican para EAF y que estos fueron incorrectamente expresados o no se expresaron todos y por ello no fue posible observar el fenotipo de adherencia localizada (16).

Se observó que la presencia del gen EAF no define los diferentes perfiles de adherencia y no se puede descartar la posibilidad de que las secuencias detectadas como complementarias de los genes comprendidos en la sonda sean constitutivos o bien sean reguladores. Aún se desconocen los mecanismos de regulación y expresión de los genes EAF; tan es así que no se conoce si existe alguna adhesina involucrada y por tanto se le sigue denominando Factor de Adherencia de ECEP.

En este estudio otro tipo de adherencia reportado con gran frecuencia fue el perfil de tipo agregativo (AA), este no es el primer estudio en que se presenta este caso: Girón y colaboradores ya han reportado este mismo fenómeno y propone que algunas cepas de ECEA puedan poseer el gen EAF (10).

La finalidad de probar esta sonda únicamente con cepas provenientes de niños menores de dos años con diarrea fue debido a que esta población es la más afectada por este patógeno y se consideró que existía una probabilidad mayor de encontrar estas cepas y comprobar la utilidad de la sonda como único método de escrutinio (8, 15, 19, 21).

Por todo lo anterior a nuestras cepas las denominamos *E. coli* EAF+ y el porcentaje de cepas positivas detectadas fue el 27 %; los reportes de estudios realizados en México varían desde un 13 % detectado en niños de 3 a 84 meses en Guadalajara, hasta un 45% reportado por Cravioto y colaboradores en un estudio realizado en Morelos (15, 21). Esta diferencia también puede deberse a la metodología empleada.

Las cepas de *E. coli* EAF+ fueron aisladas como único patógeno del 53 % de los pacientes, presentando coinfección con únicamente dos patógenos, como son: *Campylobacter* y *Entamoeba histolytica*, en donde el mayor porcentaje fue encontrado con *Campylobacter* (37%). El porcentaje de aislamiento de *E. coli* EAF+ como único agente asociado con diarrea es importante, y aunque este estudio no es de tipo caso-control, se puede pensar que estas cepas de *E. coli* pueden estar asociadas al cuadro clínico presentado por el paciente y por tanto jugar un papel importante como agente causal de diarrea en esta población.

Se ha reportado que ECEP puede asociarse a diarrea de tipo crónico (4); sin embargo, en este estudio no se encontró ningún paciente con una duración de más de 14 días del cuadro diarreico, ya que el paciente que presentó la mayor duración fue de 14 días encontrándose en el límite del criterio, y la menor duración presentada fue de dos días, con un promedio de 5.3 días.

Según el estudio realizado por Cravioto y colaboradores (15), la colonización por ECEP asociada a la presencia de diarrea presenta un incremento mayor durante los primeros 6 meses de vida que durante los segundos 6 meses, y se encuentra con menor frecuencia en el segundo año de vida; en este caso se encontraron pacientes infectados con *E. coli* EAF+ desde los 6 meses hasta los dos años; estos datos concuerdan con lo reportado ya en otros estudios.

No todas las cepas de *E. coli* hibridan con la sonda y aquellas que lo hacen no presentan la misma intensidad; debido a esto nosotros concluimos que nos encontramos ante un grupo muy heterogéneo de *E. coli* (ECEP) del cual aun se desconocen sus mecanismos de patogenicidad. La sonda EAF es un método que de alguna manera selecciona o diferencia dos tipos de *E. coli* y podría usarse como un tamiz, pero como único método de detección es poco sugerida, ya que tiene la desventaja de ser una sonda muy grande y se desconoce la adhesina para la cual codifican sus genes, así como también se desconocen los mecanismos de regulación de la expresión de esos genes, por lo que se hace necesario la clonación y secuenciación de esta sonda en pequeños fragmentos y así poder elucidar la función específica para cada uno de los genes.

Otro de los problemas ante los cuales nos encontramos al realizar este trabajo, es que cada grupo reporta sus condiciones de hibridación y en algunos casos no fue posible reproducir los resultados reportados.

El objetivo de usar esta sonda fue el encontrar un método más sencillo que la técnica de adherencia a cultivo celular propuesta por Cravioto (5). A diferencia de otros trabajos es que en este estudio no se clasificaron y/o seleccionaron las cepas de *E. coli* para definir las dentro del grupo ECEP, utilizándose como único método de escrutinio la hibridación con la sonda EAF.

Considerando lo que hasta el momento se conoce de la patogénesis de ECEP, para producir daño deben llevarse a cabo dos fenómenos: 1) presentar una adherencia inicial de tipo localizado codificada por los genes del pEAF y 2) producir la adherencia íntima y esfacelamiento de las microvellosidades intestinales con la polimerización de filamentos de actina. Una propuesta sería usar dos sondas la de EAF que detecta la presencia del plásmido y la sonda *eaeA* que detecta la presencia de los genes cromosómicos que codifican para el fenómeno de adherencia y esfacelamiento.

Sin embargo las investigaciones continúan y ya se ha propuesto una nueva sonda (sonda *bfpA*) la cual, a diferencia de la sonda EAF, se conoce la adhesina presuntamente involucrada en la adherencia, (pilis formadores de haces BFP). Ya se ha secuenciado y es posible usar oligonucleótidos en lugar de la sonda completa; sin embargo, esto aun se encuentra en estudio y pronto quizás será posible comprobar su utilidad en estudios epidemiológicos (10).

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

CONCLUSIONES

- 1 ECEP es un grupo bacteriano muy heterogeneo del cual se desconocen aun los genes involucrados que codifican para sus mecanismos de patogenicidad.
- 2 La sonda EAF de alguna manera selecciona o diferencia un tipo de *E. coli* y podría usarse como tamiz, pero no como único método de detección
- 3 Dado que las características de virulencia estan mediadas por un grupo de genes se debe usar un método complementario a la hibridación de la sonda EAF, como sería la hibridación además con la sonda *eaeA*.

APENDICE: Preparación de Soluciones.

SOLUCION DE GLUCOSA/TRIS/EDTA.

Glucosa 50 mM
Tris.HCl 25 mM (pH 8.0)
EDTA 10 mM (pH 8.0)
Autoclavear y guardar a 4°C

SOLUCION NaOH/SDS.

NaOH 0.2 N
SDS 1 %

SOLUCION DE ACETATO DE POTASIO

Acetato de Potasio	5 M	60.0 ml
Acido Acético Glacial		11.5 ml
Agua		28.5 ml

SOLUCION AMORTIGUADORA TRIS/EDTA (TE).

NaCl 0.1 M
Tris.Cl 10 mM (pH 8.0)
EDTA 1 mM (pH 8.0)

SOLUCION SALINA DE CITRATO DE SODIO (SSC) 20 X.

NaCl 0.1 M
Citrato de Sodio 300 mM
pH 7.5

SOLUCION AMORTIGUADORA GENIUS 1

NaCl 150 mM
Tris.HCl 100 mM (pH 7.5)
Filtrar a través de membrana de 0.45 µm.

SOLUCION AMORTIGUADORA GENIUS 2

A 80 ml de solución amortiguadora Genius 1, añadir 2 g de reactivo bloqueador (equipo para Marcado y Detección de Acidos Nucleicos Boehringer Manheim). Calentar a 60°C y mezclar hasta disolver el reactivo bloqueante. Llevar a un volúmen de 100 ml con Genius 1. Almacenar a 4°C.

SOLUCION AMORTIGUADORA GENIUS 3

Tris.HCl 100 mM
NaCl 100 mM
Ajustar el pH 9.5
MgCl₂ 50 mM
Filtrar a través de membrana de 0.45µm.

SOLUCION AMORTIGUADORA GENIUS 4

Tris.HCl 10 mM
EDTA 1 mM
Ajustar pH 8.0

SOLUCION DESNATURALIZANTE

NaOH 0.5M
NaCl 1.5M

SOLUCION NEUTRALIZANTE

Tris	60.55g (0.5 M)
HCl	1 M 35ml (pH 7.4)
NaCl	87.66g
Agua c.b.p.	1000 ml.

SOLUCION DE PREHIBRIDACION

SSC 5X

N-lauroylsarcosinato al 0.1 %

SDS al 0.02%

Reactivo bloqueante (Boehringer Mannheim) al 1.0 %

(A partir de una solución madre 5X)

SOLUCION MADRE DE REACTIVO BLOQUEADOR 5X

Reactivo bloqueante al 10 %

Maleato de sodio pH 7.5 al 0.1 %

A 80 ml de agua desionizada añadir 1.16gr de Acido maleico, añadir NaOH para ajustar el pH a 7.5, agregar 10 g. de reactivo bloqueador, calentar a 60°C hasta su disolución. Autoclavear antes de usar.

SOLUCION SALINA AMORTIGUADORA DE FOSFATOS (SSAF) (CULTIVO CELULAR)

NaCl	8.0 g
KCl	0.2 g
Na ₂ HPO ₄	1.15 g

Ajustar el pH a 7.2, aforar a 1000 ml y esterilizar.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Lima A. A. M., Guerrant R. L. Persistent Diarrhea in children Epidemiology, Risk factors, pathophysiology, nutritional impact and management. *Epid Rev* 1992; **14**:222-242.
- 2.- Levine M. M. *Escherichia coli* that cause diarrhea: Enterotoxigenic, Enteropathogenic, Enteroinvasive, Enterohemorrhagic and Enteroadherent. *J Infect Dis* 1987; **9**:28-53.
- 3.- Robins-Browne R. M. Traditional Enteropathogenic *Escherichia coli* of Infantile Diarrhea. *Rev Infect Dis* 1987; **9**:28-53.
- 4.- Donnenberg M. S. and Kaper J. B. Minireview Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1992; **60**:3953-3961.
- 5.- Cravioto A., Gross R. J., Scotland S. M. and Rowe B. An Adhesive Factor Found in strains of *Escherichia coli* Belonging to the Traditional Infantile Enteropathogenic Serotypes. *Curr Microb* 1979; **3**:95-99.
- 6.- Scaletsky I.C.A., Silva M.L. and Trabulsi L.R. Distinctive Patterns of Adherence of Enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa Cells. *Infect Immun* 1984; **45**:534-536.
- 7.- Knutton S., Baldini M. M., Kaper J. B. and McNeish A. S. Role of Plasmid encoded adherence Factors in adhesion of Enteropathogenic *Escherichia coli* to Hep-2 cells. *Infect Immun* 1987; **55**:78-85.
- 8.- Nataro J. P., Baldini M. M., Kaper J. B., Black R. E., Bravo N. and Levin M. M. Deteccion of an Adherence Factor of Enteropathogenic *Escherichia coli* with a DNA Probe. *J Infect Dis* 1985; **152**:560-565.
- 9.- Girón J. A., Yue Ho A. S. and Schoolnik G. K. An inducible Bundle Forming Pilus of Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science* 1991; **251**:710-713.

- 10.- Girón J. A., Donnenberg M. S., Martín W. C., Jarvis K. G. and Kaper J. B. Distribution of Bundle Forming Pilus Structural Gene (bfpA) among Enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Infect Dis* 1993; **168**:1037-1041.
- 11.- Moon H. W., Whipp R.A., Argenzio R.A., Levine M.M., and Gianella R.A. Attaching and effacing of rabbit and human enteropathogenic *E. coli* in pig and rabbit intestines. *Infect. Immun.* 1983; **41**: 1340-1351.
- 12.- Knutton S., Baldwin T., Williams P. H., McNeish A. S. Actin accumulation at sites of Bacterial Adhesion to Tissue Culture Cells: Basis of a New Diagnostic Test for Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1989; **57**:1290-1298.
- 13.- Jerse A. E., Jun Yu., Tall B. D. and Kaper J. B. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**:7839-7840.
- 14.- Donnenberg M.S. and Kaper J. B. Construction of an eae Deletion Mutant of *EcEP* by Using a Positive Selection Suicide Vector. *Infect Immun* 1991; **59**:4310-4317.
- 15.- Cravioto A., Reyes R. E., Trujillo F., Vazquez V., Navarro A. Risk of Diarrhea during the first year of life associated with initial and subsequent colonization by specific enteropathogens. *Am J Epidemiol* 1990; **131**:886-904.
- 16.- Summary of a Workshop of Enteropathogenic *Escherichia coli*. From the National Institute of Allergy and Infectious Diseases. *J Infect Dis* 1983; **147**:1108-1118.
- 17.- Gomes A.T.T., Blake P.A., and Trabulsi L.R. Prevalence of *Escherichia coli* strains with Localized, Diffuse, and Aggregative Adherence to HeLa cells in infants with Diarrhea and Matched controls. *J Clin Microb* 1989; **27**:266-269.

- 18.- Echeverria P., Orskov F., Orskov I., Knutton S., Scheutz F., Brown J.E. and Lescomboon U. Attaching and Effacing **Enteropathogenic Escherichia coli** as a cause of infantile Diarrhea in Bangkok. *J Infect Dis* 1991; **164**:550-554.
- 19.- Strockbine N.A., Faruque S.M., Kay B.A., Haider K., Alam K., Alam A.N., Tzipooris and Wachsmuth I. K. DNA probe analysis of diarrhoeagenic **E. coli** detection of EAF-positive isolates of traditional **EPEC** serotypes among Bangladeshi paediatric diarrhoeae patients: *Mol Cell Probes* 1992; **6**:93-99.
- 20.- Kain K.C., Barteluk R. L., Kelly M.T., Hexin, Hua G., Yuan G., Proctor E. M., Byrnes S., and Stiver H.G. Etiology of childhood diarrhea in Beijing, China. *J Clin Microb* 1991; **29**:90-95.
- 21.- Mathewson J.J., Oberhelman R.A., Dupont H.L., Cabada F.J., Vasquez G.E. Enteroadherent **Escherichia coli** as a cause of diarrhea among children in México. *J Clin Microb* 1987; **25**: 1917-1919
- 22.- Levine M.M. Use of DNA probes and Hep-2 cell adherence assay to detect diarrheagenic **Escherichia coli**. *J Infect Dis* 1988; **158**: 224-228.
- 23.- Scotland S.M., Smith H.R. and Rowe B. **Escherichia coli** 0128 strains from infants with diarrhea commonly show localized adhesion and positivity in the fluorescent **Enteropathogenic E. coli** Adherence Factor Probe. *Infect Immun* 1991; **59**: 1569-1571.
- 24.- Betuin L., Orskov I., Orskov F., Zimmermann S., Prada J. Clonal diversity and virulence factors in strains of **E. coli** of the classic enteropathogenic serogroup 0114. *J Infect Dis* 1990; **162**: 1329-1334.

- 25.- Orskov F., Whittam T.S., Cravioto A. and Orskov I. Clonal Relationships among classic enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) belonging to different O groups. *J Infect Dis* 1990; **162**: 76-81.

- 26.- Jallat C., Liurelli V., Rich Ch., and Joly B. *Escherichia coli* strains involved diarrhea in France: High prevalence and heterogeneity of diffusely adhering strains. *J Clin Microb* 1993; **31**: 2031-2037.

- 27.- Ausbel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A. and Struhl K. *En: Current protocols in molecular biology*. Ed. Wiley Interscience. 1989; vol 1: 1.1-2.9.