

47



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

DETERMINACION DE PERFILES ELECTROFORETICOS POR CAMPOS PULSADOS DE CEPAS DE *Escherichia coli* ENTEROTOXIGENICA (ETEC) CON DIVERSOS SEROTIPOS Y FIMBRIAS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA PRESENTA KAREN HAHN ARELLANO

28/5/14



MEXICO, D. F.

2000



EXAMENES PROFESIONALES FACULTAD DE QUIMICA



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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



**Jurado asignado:**

- Presidente                      Prof. Eida Peniche Quintana
  
- Vocal                              Prof. Marisol López López
  
- Secretario                      Prof. Yolanda López Vidal
  
- 1 er sup.                         Prof. Ruth Edith Martin Fuentes
  
- 2 do sup.                         Prof. Héctor Enrique Espinosa Arciniega

Lab. De Inmunopatogénesis Molecular  
Fac. Medicina, UNAM

Asesor:                      Dra. Yolanda López Vidal

Sustentante:                 Karen Hahn Arellano

SI TE ATRAE UNA LUCECITA, SÍGUELA.  
SI TE CONDUCE A UN PANTANO,  
YA SALDRÁS DE ÉL.  
PERO SI NO LA SIGUES,  
TODA LA VIDA TE MORTIFICARÁS  
PENSANDO QUE ACASO ERA TU ESTRELLA.  
SENECA

Con cariño y un profundo agradecimiento a mis padres, porque siempre han sabido  
hacerme sentir del tamaño de un gigante cuando a veces me creí un enanito.

Con todo mi amor a mis dos hermanos, Ingrid y Dirk, por estar siempre a mi lado e  
impulsarme a lograr cada día más.

Con amor también a Toña, mi muy querida Toña.

## **Gracias:**

A mis compañeros y amigos de laboratorio:

Maribel Amieva Fernández, Mauricio Castañón Arreola, Gonzalo Castillo Rojas, Mónica Domínguez, Cristina Majalca, Edith Merced, Rosario Morales Espinosa.

Dra. Gabriela Echaniz (INSP, Cuernavaca) por aceptarme en su laboratorio.

M. en C. Ma. Elena Velázquez (INSP, Cuernavaca) por ser mi maestra y amiga.

Ai Dr. Cravioto por sus ideas.

A Armando Navarro y Gabriel Pérez Soto (Depto. Salud Pública, Fac. Medicina, UNAM) por su ayuda.

A la Dra. Yolanda López Vidal por aceptarme en su grupo y abrirme nuevos caminos.

### **Especialmente gracias a:**

Gabriela Delgado Sapién

Alberto J. Vieyra Angulo

María del Carmen Miranda Arellano

**Por estar en las buenas y en las malas...**

## LIEBE

Ist Liebe eine Macht, die über mich kommt? Dann kann ich die Liebe nur dem blinden Zufall überlassen. Ich habe Glück und sie kommt zu mir, oder ich habe Pech und sie kommt nicht.

Oder ist Liebe eine Arbeit? Dann ist sie nicht eine Sache des Zufalls. Sondern dann ist sie meine Sache, mein Werk. Jeder weiß, wie wichtig Liebe ist, alle suchen Liebe, träumen von Liebe. Aber keiner denkt, man muß Liebe lernen.

Es ist unser Schaufensterdenken. Wir sind das Kaufen gewohnt. Wir suchen so lange, bis wir im Schaufenster unseres Lebens das richtige Objekt gefunden haben - und dann denken wir: Jetzt habe ich Sie, die Liebe.

Aber Liebe ist nicht eine Frage des Objekts, sondern eine Frage des Könnens.

Wer Liebe lernen will, für den muß Sie wichtiger sein als alles andere. An alles andere geben wir unsere Energie: an den Erfolg, an die Macht, an das Geld.

Fast keine Mühe verwenden wir auf das Lernen der Liebe.

## INDICE

	Págs.
I. ÍNDICE DE FIGURAS	3
II. ÍNDICE DE TABLAS	3
III. ABREVIATURAS	4
IV. RESUMEN	5
V. JUSTIFICACIÓN	6
VI. OBJETIVO GENERAL	6
VII. OBJETIVOS PARTICULARES	6
1. GENERALIDADES	
1.1. Familia <i>Enterobacteriaceae</i>	7
1.2. Fisiología y estructura	7
1.3. Características microbiológicas	8
1.4. Hábitat	9
2. IMPORTANCIA CLÍNICA	
2.1. Epidemiología	10
2.2. Transmisión	10
2.3. Serotipos	11
2.4. Factores Antigénicos de Colonización (CFAs)	15
2.5. Toxinas	20
3. EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR	
3.1. Criterios para evaluar un sistema de tipificación	21
3.2. Técnicas fenotípicas	22
3.3. Técnicas genotípicas	24
4. MATERIAL Y MÉTODOS	
4.1. Diseño del estudio	27
4.2. Características de las cepas	27
4.3. Equipo de laboratorio	29

	<b>Págs.</b>
4.4. Material de laboratorio	29
4.5. Medio de cultivo	30
4.6. Reactivos químicos	30
4.7. Método	31
4.7.1. Cultivo	31
4.7.2. Preparación de las muestras	31
4.7.3. Lavado de discos de muestra	32
4.7.4. Genoma bacteriano digerido con enzima de restricción	32
4.7.5. Electroforesis en gel de muestras digeridas con la enzima <i>Not I</i>	32
4.7.6. Tinción y fotografía del gel	33
5. RESULTADOS	
5.1. Estandarización	34
5.2. Fotografías	36
5.3. Tablas de resultados	39
5.4. Dendogramas	41
6. DISCUSIÓN	44
7. CONCLUSIONES	51
8. APÉNDICE	52
9. REFERENCIAS	53



<b>I.     <b>ÍNDICE DE FIGURAS</b></b>	<b>Págs.</b>
1. Tinción de Gram de <i>E. coli</i>	8
2. Microscopía electrónica de <i>E. coli</i>	8
3. Colonias de <i>E. coli</i> en EMB	8
4. Enterobacterias asociadas a bacteriemias	10
5. Estructura antigénica de <i>E. coli</i>	12
6. Arbol filogenético del grupo de fimbrias tipo CFA/I de ETEC humanas	16
7. ETEC expresando fimbrias CFA/I	17
8. Morfología de fimbrias	19
9. Distribución geográfica de ETEC	19
10. Internalización de la toxina termolábil	20
11. Gel 1	36
12. Gel 2	37
13. Gel 3	38
14. Dendograma obtenido con el programa SPSS 8.0	42
15. Dendograma obtenido con el programa BioImage	43

## **II.    **ÍNDICE DE TABLAS****

1. Géneros y especies de enterobacterias	7
2. Características de antígenos capsulares	11
3. Serotipos de <i>E. coli</i>	14
4. Características de CFs de ETEC humanas	18
5. Características de los sistemas de tipificación bacteriana	26
6. Características de cepas de ETEC usadas	27
7. Carriles y muestras del Gel 1	36
8. Carriles y muestras del Gel 2	37
9. Carriles y muestras del Gel 3	38
10. Comparación de perfiles por los tres métodos	40
11. Fragmentos obtenidos con la enzima de restricción <i>Not I</i>	45

<b>I. ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>Págs.</b>
1. Tinción de Gram de <i>E. coli</i>	8
2. Microscopía electrónica de <i>E. coli</i>	8
3. Colonias de <i>E. coli</i> en EMB	8
4. Enterobacterias asociadas a bacteriemias	10
5. Estructura antigénica de <i>E. coli</i>	12
6. Arbol filogenético del grupo de fimbrias tipo CFA/I de ETEC humanas	16
7. ETEC expresando fimbrias CFA/I	17
8. Morfología de fimbrias	19
9. Distribución geográfica de ETEC	19
10. Internalización de la toxina termolábil	20
11. Gel 1	36
12. Gel 2	37
13. Gel 3	38
14. Dendograma obtenido con el programa SPSS 8.0	42
15. Dendograma obtenido con el programa BioImage	43

## **II. ÍNDICE DE TABLAS**

1. Géneros y especies de enterobacterias	7
2. Características de antígenos capsulares	11
3. Serotipos de <i>E. coli</i>	14
4. Características de CFs de ETEC humanas	18
5. Características de los sistemas de tipificación bacteriana	26
6. Características de cepas de ETEC usadas	27
7. Carriles y muestras del Gel 1	36
8. Carriles y muestras del Gel 2	37
9. Carriles y muestras del Gel 3	38
10. Comparación de perfiles por los tres métodos	40
11. Fragmentos obtenidos con la enzima de restricción <i>Not I</i>	45

### III. ABREVIATURAS

CFA	Factor Antigénico de Colonización
ETEC	<i>Escherichia coli</i> Enterotoxigénica
LT	Toxina Termolábil
ST	Toxina Termoestable
LPS	Lipopolisacárido
G + C	Contenido de Guanina y Citosina
µm	Micrometro
µL	Microlitro
EMB	Agar Eosina Azul de Metileno
Aprox.	Aproximadamente
DNA	Acido Desoxirribonucleico
Ab	Anticuerpo
CS	Componentes de Superficie
Moo.	Microorganismo
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
PAGE	Electroforesis en Gel de Poliacrilamida
pb	Pares de bases
kb	Kilobases
λ	Longitud de onda
EDTA	Acido Etilendiaminotetracético
rpm	Revoluciones por minuto
UV	Luz Ultravioleta
D.O.	Densidad Optica

#### IV. RESUMEN

*Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) es el agente infeccioso más común capaz de causar diarrea, principalmente en los países en vías de desarrollo y en turistas. La incidencia anual de las infecciones por ETEC se estima en 650 millones de casos de diarrea, causando la muerte en 800,000 niños menores de 5 años.

A ETEC se le han descrito dos factores de virulencia muy importantes; las fimbrias que promueven la adhesión y colonización, y la capacidad de secretar toxinas termolábil (LT) y termoestable (ST). Otro factor de virulencia es el lipopolisacárido (LPS), ya que tiene una gran capacidad endotóxica.

Las contribuciones en las caracterizaciones fenotípicas en ETEC como serotipo, perfil de producción de enterotoxinas y tipo de fimbria que expresan han sido múltiples. Sin embargo, el conocimiento de la existencia clonal es pobre o inexistente. El objetivo del presente trabajo es conocer la clonalidad en cepas de ETEC y proponer una clasificación basada en el genoma completo digerido con la enzima *Not I* de 36 cepas de ETEC mediante perfiles de electroforesis de campos pulsados.

De las 36 cepas de ETEC con diversos perfiles de enterotoxinas y que expresan diferentes fimbrias se encontraron alrededor de 30 diferentes patrones electroforéticos de campos pulsados, por lo que se concluye que las cepas no tienen un mismo ancestro, sino que son clonas que en otro tiempo fueron clonas independientes.

## V. JUSTIFICACIÓN

La diarrea aguda infecciosa es un problema prioritario en la población infantil de países en desarrollo. Uno de los principales agentes etiológicos capaz de causar diarrea es *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC), y sus principales eventos de patogenicidad son adherencia (CFAs) y producción de toxinas (LT / ST). Se conocen ya más de 20 CFAs diferentes, sin embargo, se desconoce si poseen un ancestro común.

## VI. OBJETIVO GENERAL

Estudiar la clonalidad de las cepas de *E. coli* enterotoxigénica que expresan diferentes CFAs.

## VII. OBJETIVOS PARTICULARES

- Utilizar una colección de cepas de ETEC que expresan diferentes CFAs, serotipos y toxinas elegidas al azar y a doble ciego.
- Estandarizar el método de Electroforesis de Campos Pulsados.
- Estandarizar el método de digestión con la enzima *Not I* para las cepas de referencia.
- Definir los patrones obtenidos para la colección de cepas de ETEC.
- Definir la existencia o no de clonalidad.

## **V. JUSTIFICACIÓN**

La diarrea aguda infecciosa es un problema prioritario en la población infantil de países en desarrollo. Uno de los principales agentes etiológicos capaz de causar diarrea es *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC), y sus principales eventos de patogenicidad son adherencia (CFAs) y producción de toxinas (LT / ST). Se conocen ya más de 20 CFAs diferentes, sin embargo, se desconoce si poseen un ancestro común.

## **VI. OBJETIVO GENERAL**

Estudiar la clonalidad de las cepas de *E. coli* enterotoxigénica que expresan diferentes CFAs.

## **VII. OBJETIVOS PARTICULARES**

- Utilizar una colección de cepas de ETEC que expresan diferentes CFAs, serotipos y toxinas elegidas al azar y a doble ciego.
- Estandarizar el método de Electroforesis de Campos Pulsados.
- Estandarizar el método de digestión con la enzima *Not I* para las cepas de referencia.
- Definir los patrones obtenidos para la colección de cepas de ETEC.
- Definir la existencia o no de clonalidad.

## V. JUSTIFICACIÓN

La diarrea aguda infecciosa es un problema prioritario en la población infantil de países en desarrollo. Uno de los principales agentes etiológicos capaz de causar diarrea es *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC), y sus principales eventos de patogenicidad son adherencia (CFAs) y producción de toxinas (LT / ST). Se conocen ya más de 20 CFAs diferentes, sin embargo, se desconoce si poseen un ancestro común.

## VI. OBJETIVO GENERAL

Estudiar la clonalidad de las cepas de *E. coli* enterotoxigénica que expresan diferentes CFAs.

## VII. OBJETIVOS PARTICULARES

- Utilizar una colección de cepas de ETEC que expresan diferentes CFAs, serotipos y toxinas elegidas al azar y a doble ciego.
- Estandarizar el método de Electroforesis de Campos Pulsados.
- Estandarizar el método de digestión con la enzima *Not I* para las cepas de referencia.
- Definir los patrones obtenidos para la colección de cepas de ETEC.
- Definir la existencia o no de clonalidad.

## 1. GENERALIDADES

### 1.1. Familia *Enterobacteriaceae*

La familia *Enterobacteriaceae* es el grupo más grande y heterogéneo de bacilos Gram negativos con importancia clínica. Se han descrito por lo menos 27 géneros y 102 especies. (Tabla 1).<sup>10, 27.</sup>

Género	No. de Especies	Género	No. de Especies
<i>Citrobacter</i>	4	<i>Klebsiella</i>	7
<i>Edwardsiella</i>	4	<i>Kluyvera</i>	2
<i>Enterobacter</i>	13	<i>Morganella</i>	2
<i>Escherichia</i>	5	<i>Proteus</i>	4
<i>Shigella</i>	4	<i>Providencia</i>	5
<i>Ewingella</i>	1	<i>Salmonella</i>	7 subgrupos
<i>Hafnia</i>	2	<i>Serratia</i>	10
		<i>Yersinia</i>	11

Tabla 1. Géneros y especies de Enterobacterias.<sup>10</sup>

### 1.2. Fisiología y Estructura

Los miembros del género *Escherichia* son bacilos Gram negativos, móviles, no esporulados, sin agrupación característica, y miden de 0.6 a 0.8  $\mu\text{m}$  de ancho por 2 a 4 de largo. El contenido de G + C es de 49 - 52 %. ( Figuras 1 y 2).<sup>12, 27</sup>





Figura 1. Tinción de Gram de *E. coli*.<sup>1</sup>



Figura 2. Microscopía electrónica de *E. coli*.<sup>1</sup>

### 1.3. Características Microbiológicas

Son microorganismos facultativos, se desarrollan con 18 – 24 horas de incubación a 37 ° C. Sus requerimientos nutricionales son simples, fermentan la glucosa y la lactosa y reducen el nitrato . Las colonias suelen ser blancas a grisáceas en medios sin indicador, de 2 a 6 mm de diámetro, no hemolíticas, convexas, de bordes regulares y aspecto húmedo.

Algunos medios selectivos donde pueden ser identificadas debido al indicador son Agar Eosina Azul de Metileno (EMB) y Agar ENDO, en donde se observan colonias con reflejos metálicos verdosos debido a la fermentación de lactosa. ( Figura3).<sup>10, 12, 27.</sup>

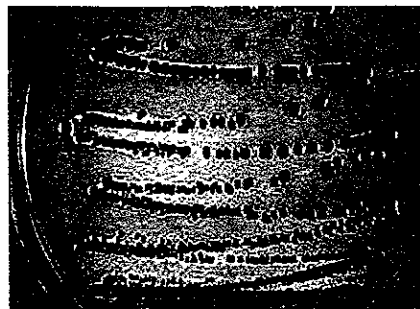


Figura 3. Colonias de *E. coli* en EMB.<sup>1</sup>

Dentro de sus características bioquímicas se encuentran que son indol positivas, citrato negativas y ureasa negativas.<sup>10</sup>

#### 1.4. Hábitat

*Escherichia coli* es un microorganismo ubicuo que se encuentra en suelo, agua y vegetación; y forma parte de la flora intestinal común en la mayoría de los animales e incluso humanos. Es el microorganismo anaerobio facultativo encontrado en mayor proporción en el intestino, presentándose a densidades normales de aprox.  $10^6$  células por gramo de contenido en el colon. Sin embargo, es un componente menor de la flora intestinal total. *E. coli* es una de las primeras bacterias en colonizar a recién nacidos, generalmente proveniente de las heces de la madre (tanto en humanos como animales).

Generalmente no se aísla de productos alimenticios frescos como queso o leche, a menos que hayan sido contaminados recientemente.<sup>IV, 10, 27.</sup>

## 2. IMPORTANCIA CLÍNICA

### 2.1. Epidemiología

Las enterobacterias son responsables del 30 al 35 % de todas las septicemias, más del 70 % de las infecciones del tracto urinario y muchas infecciones intestinales.<sup>5, 10.</sup>

El género *Escherichia* consiste en 5 especies, entre las más importantes están: *E. coli* y *E. blattae*.

*E. coli* es el moo. más frecuentemente aislado en casos de septicemia. Se asocia a más del 80 % de las infecciones del tracto urinario, hasta el 75 % (junto con estreptococos del grupo B) de los casos de meningitis neonatal y a 45 % de las gastroenteritis; siendo esta última el motivo de la presente investigación.<sup>VI, 6, 27, 35</sup> (Figura 4).

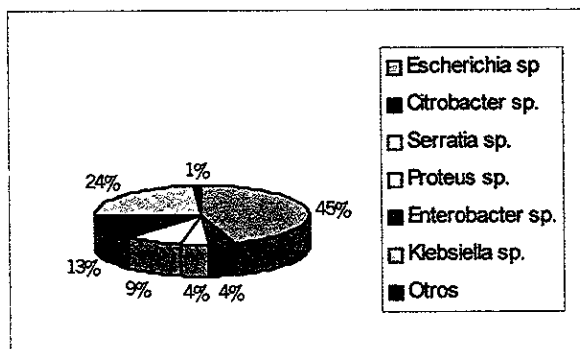


Figura 4. Enterobacterias asociadas a bacteriemias.<sup>27</sup>

### 2.2. Transmisión

En las infecciones gastrointestinales causadas por *E. coli* hay tres principales vías de transmisión. La primera y la más común es la ingestión de agua y alimentos contaminados con heces de animales o humanas, el contagio fecal-oral. La segunda es por infecciones nosocomiales, mismas que representan un grave problema de salud pública. Estas

infecciones son generalmente de heridas, neumonía secundaria y peritonitis. La tercera es por diseminación endógena en individuos susceptibles. <sup>III. 27.</sup>

### 2.3. Serotipos

El género *Escherichia* se clasifica serológicamente basándose en tres tipos principales de antígenos: lipopolisacárido o somático (O), capsular (K) y proteínas flagelares (H). El término serotipo se usa sólo cuando se conocen los antígenos O y H. Si no se identifica el antígeno H se debe usar el término serogrupo. Los tres antígenos están codificados por DNA cromosomal.

El antígeno somático (O) está compuesto principalmente de complejos de lipopolisacárido y forma parte de la estructura de la pared bacteriana. La inmunogenicidad de las unidades repetidas de polisacárido es precisamente lo que le da a estos antígenos su especificidad. Es muy común que se presenten reacciones cruzadas con este antígeno entre algunas *E. coli* y *Shigella* o *Salmonella*. Existen sin embargo, algunas cepas que carecen de estas cadenas de lipopolisacáridos y se vuelven autoaglutinables. A estas cepas se les denomina OR (por rugosas).

Los antígenos capsulares (K) son principalmente polisacáridos ácidos divididos inicialmente en tres tipos: A, B o L; dependiendo de su sensibilidad al calor. (Tabla 2).<sup>27</sup>

Antígenos Capsulares	Característica
A	Es inactivado a 121 ° C por una hora.
B	Soporta temperatura de 100 ° C. No pierde el poder de unir Ab a 121 ° C.
L	Soporta temperatura de 100 ° C. Pierde el poder de unir Ab a 100 ° C por una hora.

Tabla 2. Características de los antígenos capsulares <sup>II</sup>

La diversidad antigénica de los antígenos flagelares (H) se basa en los diferentes tipos de flagelina presente en la estructura.

En el primoaislamiento de *E. coli*, las cepas son no móviles o escasamente móviles, condición que cambia generalmente al pasar las cepas a un medio semisólido. Sólo esas cepas se tipifican para el antígeno flagelar. Aquellas cepas que no adquieren la capacidad de movilidad, se les designa como no móviles (NM) o H<sup>-</sup>. (Figura 5).<sup>11, 27</sup>

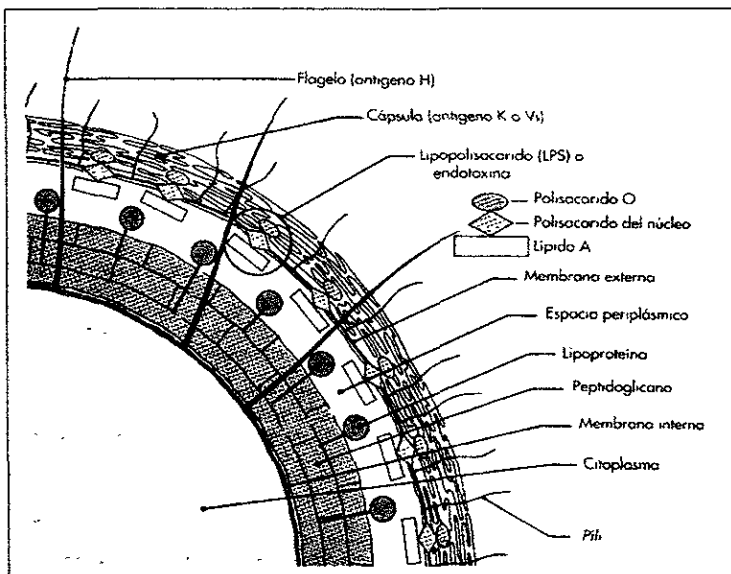


Figura 5. Estructura Antigénica de *E. coli*<sup>27</sup>

Las cepas de *E. coli* que causan gastroenteritis se subdividen en 5 grupos: Enteroinvasivo (EIEC), Enteropatogénico (EPEC), Enterohemorrágico (EHEC), Enteroagregativo (EagEC) y Enterotoxigénico (ETEC).<sup>27</sup>

Las **Enteroinvasivas** son capaces de invadir y destruir el epitelio del colon, causando fiebre y calambres, con sangre y leucocitos en las heces. La mayoría de las cepas son no móviles. El carácter de invasividad se confirma mediante la prueba de Sereny, consistente en inocular la bacteria en el ojo de un cobayo, induciendo queratoconjuntivitis. En países tropicales son una causa importante de diarrea tipo disentería. Estas cepas de *E. coli* invasivas actúan principalmente en el intestino grueso. <sup>II, 27</sup>

Las **Enteropatógenicas** son una causa muy importante de diarrea infantil en países en vías de desarrollo. La enfermedad se induce por la capacidad del microorganismo para adherirse a la membrana plasmática de eritrocitos y causar destrucción de las microvellosidades adyacentes del intestino delgado. <sup>II, 27</sup>

*E. coli* **Enterohemorrágica** es capaz de producir una toxina parecida a la de *Shigella*, denominada Shiga-like o verotoxina (debido a que causa un efecto citopático en la línea celular Vero en cultivo de tejido). Se han descrito dos toxinas: una homóloga a la de *Shigella dysenteriae* y otra con una homología con la de *Shigella* del 60 %. Es muy importante la dosis infecciosa de *E. coli*, que es muy pequeña en comparación con otras enterobacterias. Se reportan casos de hasta 2 bacterias por 25 g de comida como dosis infecciosa.

Las enfermedades que se presentan van desde diarrea leve sin complicaciones hasta colitis hemorrágica con dolor abdominal intenso o diarrea sanguinolenta y fiebre. A estas cepas también se asocia el Síndrome Hemolítico Urémico, que es insuficiencia renal aguda, trombocitopenia y anemia hemolítica. El 50 % de las cepas enterohemorrágicas pertenecen al serotipo O157. H7. La enfermedad por EHEC se presenta con mayor frecuencia en los meses cálidos del año y en niños menores de 5 años. <sup>II, 27, 36.</sup>

*E. coli* **Enteroagregativo**, es conocido como enteroadherente, se asocia con diarrea persistente o crónica en lactantes, caracterizada por durar más de 14 días. Las caracterizan los diferentes tipos de adherencia resistente a D-Manosa en cultivo celular, y se sugiere que producen una toxina termolábil. <sup>II, 27.</sup>

Por último, las cepas **Enterotoxigénicas** causan diarrea secretora seguida de un periodo de incubación de 1-2 días y duración de 3-4 días y los síntomas que se presentan son espasmos, vómito y diarrea acuosa.

Las ETEC se caracterizan, como su nombre lo dice, por la producción de 2 enterotoxinas, una de ellas similar a la toxina del cólera. La toxina termolábil (LT), se destruye al calentarla a 100 ° C durante 30 minutos, y la otra es termorresistente (ST). La producción de ambas toxinas está codificada por plásmidos, que en subcultivo se pierden fácilmente. En su mayoría también codifican para resistencia a antimicrobianos y/o para los pilis de adherencia que producen (excepto para CS2). Entre los más importantes están: K88 en cerdos, K99 en vacas y Factores de Colonización (CF) en humanos, por lo que se establece la infección especie-específica. <sup>11, 27</sup> (Tabla 3).

Grupo	Serotipos más comunes
Enteroinvasivo	O28.H-, O112.a.c.H-, O124.H30, 124.H32, O124.H-, O136.H-, O143.H-, O144.H-, O152.H-, O159.H-, O167.H4, O167.H5
Enteropatogénico	O18.a.c.H7, O20.H26, O20.H34, O25.H1, O26.H11, O26.H-, O44.H34, O55.H6, O55.H7, O55.H-, O86.H27, O86.H34, O86.H-, O91.H7, O91.H-, O111.H2, O111.H12, O111.H-, O114.H10, O114.H32, O119.H6, O119.H-, O125.H21, O125.H-, O126.H2, O126.H-, O127.H9, O127.H21, O127.H40, O127.H-, O128.H2, O128.H7, O128.H8, O128.H12, O128.H-, O142.H6, O158.H23.
Enterohemorrágico	O4.H-, O5.H-, O16.H6, O26.H11, O26.H21, O26.H32, O46.H31, O48.H21, O55.H7, O91.H10, O91.H21, O98.H-, O111.H2, O111.H8, O111.H-, O113.H21, O117.H14, O118.H12, O119.H6, O125.H-, O126.H8, O128.H2, O145.H-, O157.H7, O157.H-, O172.H-
Enteroadgregativo	O7.H-, O77.H18, O86.H-, O126.H27, O127.H2.
Enterotoxigénico	O6.H16, O8.H9, O11.H27, O15.H11, O20.H-, O25.H42, O25.H-, O27.H7, O78.H11, O78.H12, O128.H7, O148.H28, O149.H10, O159.H20, O173.H-

Tabla 3 Serotipos de *E. coli*. <sup>11</sup>

## 2.4. Factores Antigénicos de Colonización (CFAs)

ETEC se adhiere a las superficies epiteliales del intestino mediante estructuras superficiales filamentosas, denominadas CFAs. Hasta la fecha, se conocen 20 diferentes CFAs en ETEC aisladas de humanos (Tabla 4), siete de ellos están bien caracterizados, y se enlistan a continuación: CFA/I y los componentes de superficie CS1 a CS6 de CFA/II y CFA/IV. Los diferentes CFAs se asocian a determinados serogrupos y algunos con un solo serotipo. Estos son detectados entre el 50 al 80% de los aislamientos clínicos de ETEC. Sin embargo, los más frecuentes en estudios epidemiológicos de un gran número de áreas geográficas, son CFA/I, CS1 y CS6. En otros países, estos CFs están ausentes del todo, sin encontrar una prevalencia hacia otras fimbrias, lo que sugiere que probablemente su diversidad sea mayor o bien que sea un rearrreglo estructural de estas mismas fimbrias ejercidas por la presión del hospedero para evadir la respuesta inmune. (Figura 9).

Actualmente, estos veinte CFAs conocidos de ETEC aisladas de humanos, se han clasificado en cuatro familias, de acuerdo a su morfología (ya sea de fimbrias ó fibrilas) e inmunogenicidad. El grupo o familia de fimbrias de CFA/I está constituido por: CFA/I, CS1, CS2, CS4, CS14, CS17 y CS19; mismas que están relacionadas genéticamente (ver árbol filogenético). La existencia de esta familia de fimbrias, se debe probablemente a la presión inmunológica ejercida por el hospedero.<sup>3, 11, 14, 19, 21, 22, 26</sup> (Figura 6).



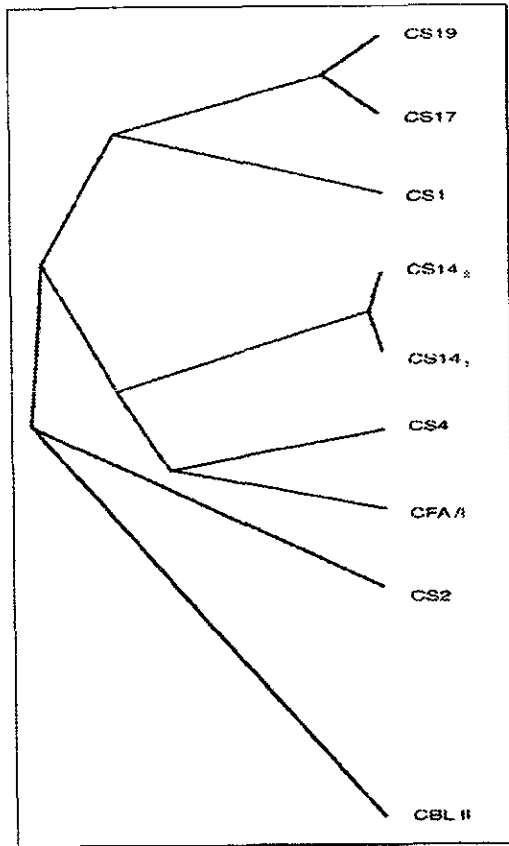


Figura 6. Arbol filogenético del grupo de fimbrias Tipo CFA/I de ETEC humanas. <sup>11</sup>  
 Probable relación genética de fimbrias basado en la secuenciación amino terminal de las mismas

Recientemente, en la infección natural en humanos se ha descrito la presencia de anticuerpos que reconocen epítomos comunes, así como anticuerpos de sueros hiperinmunes contra: CS1, CS2, CS4, PCFO166 y CS17, que son capaces de unirse a secuencias continuas de la subunidad CFA/I, que sugiere que su exposición es en la superficie.

Los diferentes CFAs se han clasificado como fimbrias o fibrilas, de acuerdo a su morfología. Así, las fimbrias como CFA/I y CS1 son proteínas rígidas, como cabellos filamentosos. Están constituidos por cientos de copias de una subunidad de una proteína estructural. (Figura 8) Por el contrario, las fimbrias CS5 y CS7 tienen dos fibrilas arregladas en una doble hélice, por lo que son más delgadas y flexibles. (Figura 8).<sup>3, 11, 14, 19, 21, 22, 26</sup>

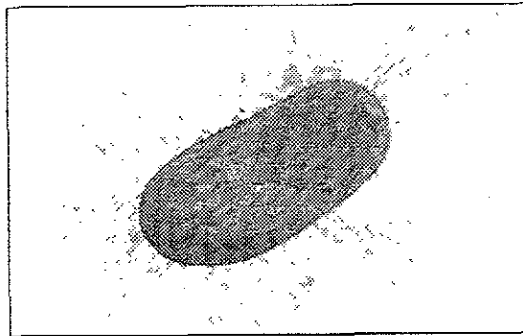


Figura 7 ETEC expresando fimbrias CFA/I <sup>11</sup>

Se conocen muy bien los diferentes CFs que existen, así como sus componentes de superficie (CS). Algunas de sus características se resumen en la tabla 4 y su morfología se aprecia en la figura 7.

CF	CS	Morfología	Tamaño (kD)	Toxinas	Serogrupos Comunes
<b>Familia CFA/I</b>					
CFA/I	CFA/I	7 nm	15.0	ST + LT, ST	O4,O7,O15,O20,O25, O63,O78,O110, O126,O128,O136,O1 53,O159.
CS1	CS1	7 nm	16.5	ST + LT	O6,O139.
CS2	CS2	7 nm	15.3	ST + LT	O6.
CS4	CS4	6 nm	17.0	ST + LT	O25
PCFO166	CS14	7 nm	15.5 / 17.0	ST	O20,O71,O98,O166.
CS17	CS17	7 nm	17.5	LT	O8,O15,O48,O114,O 146.
CS19	CS19	7 nm	16.0	ST + LT	O8.
<b>Grupo 'CS5'</b>					
CS5	CS5	5 nm	21.0	ST	O6,O29,O92,O114,O 115,O167
CS7	CS7	3-6 nm	21.5	ST + LT	O15,O103,O114.
PCFO9	CS13		27.0	LT	O9,O143.
CS20	CS20	7 nm	20.8	ST + LT	O17.
PCFO20	CS18	7 nm	25.0	ST + LT	O20.
<b>Tipo IV</b>					
CFA/III	CS8	7 nm	18.0	LT	O25
Longus	CS21	7 nm	22.0	ST + LT, ST, LT	O2,O6,O8,O20,O25, O49,O128,O139.
8786	CS15		16.3	ST	O117.
<b>Diferentes</b>					
CS3	CS3	2-3 nm	15.1	ST + LT	O8,O9,O78,O80,O11 5,O128,O139,O168.
CS6	CS6		14.5 / 16.0	ST + LT, ST, LT	O25,O27,O92,O148, O153,O159.
PCFO148	CS11	3 nm		ST + LT	O148.
PCFO159	CS12	7 nm	19.0	ST + LT	O159.
2230	CS10		16.0	ST	O25.

Tabla 4. Características de CFs de ETEC humanas. <sup>11</sup>

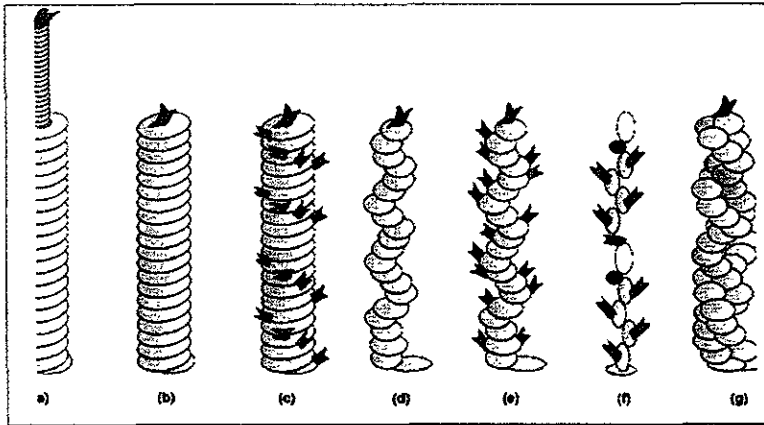


Figura 8. Morfología de fimbrias: a) Fimbria P de *E. coli* uropatogénica. b) Fimbria CFA/I. c) Fimbria rígida. d) Modelo de un CF fibrilar. e) Modelo de CF fibrilar. f) Modelo de K99. g) Modelo de una fimbria CS5 y CS7. <sup>11</sup>

De la misma manera, se ha hecho un mapa de la distribución geográfica de ETEC humanas dependiendo del CF expresado (mas no de los componentes de superficie CS). (Figura 9). <sup>3, 11, 14, 19, 21, 22, 26, 30.</sup>



Figura 9. Distribución geográfica de ETEC: Azul = Regiones endémicas de CFA/I, Rojo = Regiones endémicas de CFA/II, Amarillo = Regiones endémicas de CFA/IV, Verde = Regiones endémicas de CFA/I y CFA/II. Naranja = Regiones endémicas de CFA/II y CFA/IV. <sup>11</sup>

## 2.5. Toxinas

El 35 % de las cepas de ETEC aisladas en el mundo expresa la toxina termolábil (LT), otro 35 % expresa ambas toxinas y el restante 30 % expresa la toxina termoestable (ST).

La toxina termoestable es una proteína de peso molecular pequeño con numerosos enlaces disulfuro, que le confieren estabilidad al calor. No se conoce exactamente la función de esta toxina, aunque se postula que también induce diarrea secretora.<sup>27</sup>

La toxina termolábil es del tipo A-B (es decir, que consta de una subunidad A y una o varias B), o similar a la toxina del cólera. La subunidad A es responsable de la actividad enzimática intracelular de la toxina, mientras que la subunidad B media la unión a la célula para facilitar la transferencia de la subunidad A al interior.<sup>II, III, 11, 27.</sup> (Figura 10).

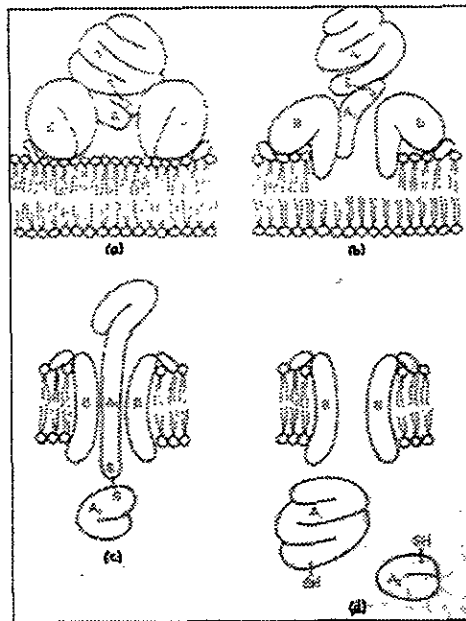


Figura 10. Internalización de la toxina termolábil.<sup>v</sup>

### 3. EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR

En años recientes, la investigación en epidemiología y patogénesis ha utilizado una gran variedad de técnicas derivadas de inmunología, bioquímica y genética. A estos estudios se les conoce como epidemiología molecular. Las técnicas más desarrolladas se refieren a bacterias, ya que las aplicadas a hongos están aún en desarrollo y el estudio de virus se restringe a unos cuantos centros especializados.<sup>23</sup>

La suposición básica para cualquier sistema de tipificación es que aislamientos epidemiológicamente relacionados se deriven de la expansión clonal de un solo precursor y, por lo tanto, comparten características y difieren de aquéllos no relacionados epidemiológicamente. La utilidad de una característica particular para tipificar depende de su estabilidad en una cepa y su diversidad entre especies. Sin embargo, aislamientos de moos. patógenos pueden mostrar menor diversidad genética que las cepas ambientales y clínicas. A estos aislamientos patógenos que representan los grupos genéticamente relacionados se les conoce como linajes. Están caracterizados por factores de virulencia que ayudan a la colonización y persistencia e invasión en el sitio de infección.<sup>7, 23.</sup>

#### 3.1. Criterios para evaluar un sistema de tipificación

Algunos de los criterios que debe cumplir un sistema de tipificación son:

- Su capacidad de tipificar: que es la habilidad de obtener resultados precisos y positivos para cada aislamiento analizado.
- Su reproducibilidad: que consiste en obtener el mismo resultado con la misma técnica cuando se analiza la misma cepa varias veces.
- Su poder discriminatorio: que es, la habilidad para diferenciar entre cepas no relacionadas. Con una técnica ideal, se debería reconocer cada aislamiento no relacionado como único, aunque en la práctica la mayoría de las técnicas se consideran estadísticamente útiles si el tipo más común que detecta se encuentra en < 5% de la población.<sup>23</sup>

Los métodos se clasifican generalmente en técnicas fenotípicas y genotípicas. Las primeras se basan en detectar características expresadas por el microorganismo y las segundas conllevan el análisis del DNA cromosomal o extracromosomal.<sup>23</sup>

### 3.2. Técnicas fenotípicas

Estas técnicas dependen generalmente de la capacidad del microorganismo de alterar espontáneamente la expresión de la característica estudiada. La gran limitación de estas técnicas son las numerosas cepas que no son tipificables ya que presentan un fenotipo Nulo o Cero.

- Biotipificación: Se establece el patrón de actividad de  $\leq 20$  enzimas celulares metabólicas. Los sistemas automatizados son diseñados para identificar la especie. Se practica en varios laboratorios de microbiología como rutina. Dos grandes fallas son, que el poder de discriminación es pobre y que las mutaciones al azar pueden confundir la interpretación de los datos.<sup>23</sup>
- Susceptibilidad a antimicrobianos: En laboratorios clínicos se hace de rutina para evaluar la mayoría de los aislamientos bacterianos. La determinación es manual o en equipos automatizados, es fácil de realizar y relativamente barato. En estudios epidemiológicos no tiene mucha utilidad por la variación fenotípica y la resistencia a antimicrobianos. Es importante que entre cepas diferentes puede haber intercambio de plásmidos u otros elementos de DNA extracromosomal y por lo tanto desarrollar un perfil similar o idéntico.<sup>7</sup>
- Serotipificación: Los microorganismos de la misma especie pueden diferir en la expresión antigénica de su superficie celular. Esos cambios se detectan mediante esta técnica usando herramientas de inmunología. Para ciertos moos. como *Salmonella* y *Shigella* es una técnica rápida y sencilla, aunque tiene serias limitaciones. Por ejemplo, los sueros poli y monoclonales son generalmente caros y difíciles de conseguir, además de poseer un pobre poder de discriminación.<sup>23</sup>

- Bacteriófagos y Bacteriocinas: Se han identificado los bacteriófagos líticos para algunas especies como *S. aureus* y *Salmonella*. Los aislamientos se caracterizan por su susceptibilidad o resistencia a la lisis cuando se les enfrenta a un panel de bacteriófagos. No es una técnica sencilla y muchas cepas quedan sin tipificar.<sup>7</sup>
- Electroforesis de proteínas e *immunoblot*: Se detectan variaciones en proteínas estructurales. En la electroforesis se aíslan células enteras o proteínas de superficie. En un gel de poliacrilamida (como el SDS-PAGE) se separan las muestras y se tiñe con un colorante como Azul de Coomasie para observar el patrón resultante. Las proteínas pueden ser marcadas radioactivamente y se toma una autorradiografía.

En el ensayo de *immunoblot* se transfieren los productos bacterianos a una membrana de nitrocelulosa y son detectados con antisueros cepa-específicos y/o con un pozo de sueros humanos. Todas las cepas se pueden tipificar aunque resulta difícil interpretar los resultados por el gran número de bandas proteicas detectadas.<sup>4, 28, 29</sup>

- Electroforesis de enzimas *multilocus*: Detecta diferencias en la movilidad electroforética de enzimas metabólicas solubles individuales. Las proteínas se separan mediante un gel de almidón y las enzimas se detectan con sus substratos específicos. Los cambios en la movilidad reflejan sustituciones de aminoácidos, que alteran la carga de la proteína y por lo tanto se detectan variaciones en los genes que codifican para la enzima. Esta técnica no es fácil y tiene poca aplicación en estudios epidemiológicos. Sin embargo, es muy útil para obtener datos cuantitativos de la genética de poblaciones de especies patógenas.<sup>4, 28.</sup>



### 3.3. Técnicas genotípicas

Surgen como una alternativa a las técnicas fenotípicas debido a los problemas que presentan éstas últimas, de baja reproducibilidad y poder de discriminación. Muchos sistemas usan métodos basados en DNA. El mayor problema (además de la dificultad técnica) es la interpretación de los resultados

- Perfil de plásmidos: En la técnica más básica, los plásmidos se aíslan de cada cepa y por electroforesis se separan en un gel de agarosa para determinar el número y tamaño de los mismos. Los plásmidos también se pueden digerir con endonucleasas de restricción y comparar el número y tamaño de los fragmentos resultantes. Aunque la diferenciación para aquellas cepas que carecen de plásmidos o poseen sólo uno o dos es pobre, la técnica es muy sencilla. El problema es que al ser elementos extracromosomales de DNA, pueden perderse o ganarse espontáneamente por otras cepas, lo que lo hace difícil de interpretar. <sup>7</sup>
- Restricción con endonucleasas de DNA: Las enzimas de restricción cortan en una secuencia de nucleótidos específica y el número y tamaño de los fragmentos generados reflejan la frecuencia y distribución de estos sitios de restricción. Las endonucleasas usadas tienen sitios de restricción frecuentes, por lo que generan cientos de fragmentos que van desde las 0.5 kb hasta 50 kb. Los fragmentos se separan en gel de agarosa por electroforesis (con un campo eléctrico constante). Los patrones o perfiles se tiñen con bromuro de etidio y se observan con luz ultravioleta. Cepas diferentes de la misma especie presentan perfiles diferentes debido a las variaciones en su DNA. La mayor limitación es la dificultad para interpretar los perfiles tan complejos. También se puede confundir la presencia de plásmidos con un fragmento de DNA cromosomal. <sup>7</sup>

- *Southern Blot* de DNA cromosomal: Los fragmentos de la restricción enzimática se separan en gel de agarosa mediante electroforesis y se transfieren a una membrana de nitrocelulosa o *nylon*. Un fragmento de DNA marcado se usa como prueba y se detectan fragmentos que contienen secuencias homólogas (*loci*) a la prueba. Las variaciones en número y tamaño de los fragmentos se conocen como RFLPs (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), que reflejan el número de *loci* homólogos a la prueba y el lugar de los sitios de restricción que flanquean esos *loci*. Todas las cepas que contengan una secuencia homóloga a la prueba se pueden tipificar y los resultados son muy reproducibles. El poder discriminatorio está en función del número y variabilidad de los fragmentos detectados. Los análisis de *Southern Blot* de genes que codifican para funciones metabólicas o factores de virulencia se usan para tipificar aislamientos. Los ribotipos se basan en el análisis de *Southern Blot* que detecta polimorfismos asociados con el operón ribosomal. Todas las bacterias tienen estos operones y las secuencias ribosomales son altamente conservadas, por lo que todos los aislamientos son tipificables.<sup>23</sup>
- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR): Es muy útil en la detección de agentes infecciosos. Esta técnica replica (amplifica) rápida y exponencialmente fragmentos de DNA (templado) delimitados por cebadores. Se requiere de una DNA polimerasa, el templado y dos oligonucleótidos o cebadores pequeños que son complementarios al templado. El producto se genera en pocas horas. Una gran dificultad consiste en preparar muestras libres de contaminación, ya que se pueden obtener falsos positivos o negativos. Los productos de PCR se analizan en gel de agarosa por electroforesis, teñido con bromuro de etidio y observado con luz ultravioleta.<sup>2, 7, 23</sup>
- Secuenciación de DNA: Múltiples aislamientos se comparan al secuenciar el mismo *locus* de cada uno de ellos. Ya se ha usado en estudios de variación natural en poblaciones bacterianas y los resultados son muy confiables y objetivos. La limitante es la calidad de la técnica y los costos.<sup>23</sup>

- Electroforesis de campos pulsados (PFGE): Es una variación de la electroforesis en gel de agarosa, y permite el análisis de DNA cromosomal (e incluso de plásmidos). El DNA es digerido con enzimas de restricción de corte poco frecuente, generando entre 10 y 20 fragmentos que miden de 30 a 800 kb. Todas las cepas se pueden tipificar con esta técnica, y aunque es un poco más tardada que otras (de 6 - 10 días, dependiendo del moo ) y se requiere equipo y reactivos caros y especializados, se obtienen resultados muy reproducibles. La técnica tiene un gran poder discriminatorio y de comparación, superior a cualquiera de las otras técnicas disponibles.

Los fragmentos obtenidos de la digestión enzimática forman un perfil de bandas, también llamado huella digital (*Fingerprint*), que representa el DNA completo de la bacteria (a diferencia de las otras técnicas genéticas que sólo analizan un fragmento del DNA), detectando variaciones entre cepas, tan pequeñas como una mutación puntual o una delección hasta cambios mayores como inserciones o recombinación. <sup>1, 7, 8, 9, 13, 15, 16, 17, 18, 20, 23, 24, 25, 29, 32, 33, 34</sup>

(Tabla 5).

<i>Sistema de Tipificación</i>	<i>Cepas Tipificables</i>	<i>Reproducibilidad</i>	<i>Diferenciación</i>
<b>Métodos fenotípicos</b>			
Biotipificación	Todas	Pobre	Pobre
Susceptibilidad a antimicrobianos	Todas	Pobre	Pobre
Serotipificación	La mayoría	Buena	Pobre
Bacteriófagos	La mayoría	Pobre	Pobre
<i>Inmunoblot</i>	Todas	Excelente	Bueno
Enzimas <i>Multilocus</i>	Todas	Excelente	Bueno
<b>Métodos genotípicos</b>			
Perfil de Plásmidos	La mayoría	Pobre	Pobre
Restricción con Endonucleasas	Todas	Buena	Pobre
Ribotipos	Todas	Excelente	Bueno
PFGE	Todas	Excelente	Excelente
PCR	Todas	Excelente	Bueno
Secuenciación	Todas	Excelente	Excelente

Tabla 5. Características de los sistemas de tipificación bacteriana <sup>23</sup>

## 4. MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.1. Diseño del estudio

- Se seleccionaron 30 cepas de ETEC provenientes de niños con y sin diarrea del estudio epidemiológico realizado por el Dr. Alejandro Cravioto y cols. y 6 cepas de referencia de ETEC obtenidas del mismo.
- Las cepas de ETEC tienen como características expresar diferentes CFAs y enterotoxinas, además de pertenecer a diferentes serotipos.
- El estudio es doble ciego ya que el tutor y la estudiante desconocen las características de las diferentes cepas de ETEC, hasta obtener el reporte de los perfiles de electroforesis en geles de agarosa por campos pulsados.

### 4.2. Características de las Cepas de ETEC

A continuación se enlistan las características de las 36 cepas de *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) analizadas:

No. cepa	Código del niño	Serotipo	Fimbria	Edad del niño (Meses)	Presencia de diarrea	Perfil de toxinas
E - 1	850215	O159 : H-	CFA / I	11	NO	D
E - 4	850301	O159 : H-	CFA / I	17½	SI	D
E - 7	850306	O159 : H-	CFA / I	20½	NO	D
E - 10	850207	O29 : H21	CFA / I	8½	SI	A
E - 13	850208	O29 : H21	CFA / I	9	SI	A
E - 16	850301	O29 : H21	CFA / I	22½	NO	A
E - 19	850403	O29 : H21	CFA / I	21½	SI	C
E - 22	850203	O78 : H12	CFA / I	10	SI	A
E - 25	850212	O78 : H12	CFA / I	19½	NO	C
E - 28	850511	O78 : H12	CFA / I	10½	NO	A

No. cepa	Código del niño	Serotipo	Fimbria	Edad del niño (Meses)	Presencia de diarrea	Perfil de toxinas
E - 2	850108	O159 : H4	CFA/IV (CS6)	14	NO	B
E - 5	850312	O25 : H-	CFA/IV (CS6)	8	SI	B
E - 8	860609	O25 : H42	CFA/IV (CS4)	9	SI	B
E - 11	850103	O25 : H42	CFA/IV (CS4)	23	NO	B
E - 14	850403	O25 : H42	CFA/IV (CS4)	12½	SI	B
E - 17	850502	O78 : H12	CFA/IV (CS4)	17½	SI	C
E - 20	850502	O78 : H12	CFA/IV (CS4)	17½	SI	C
E - 23	850206	O8 : H-	CFA/IV (CS6)	16½	NO	B
E - 26	850318	O8 : H9	CFA/IV (CS4)	1 DIA	NO	C
E - 29	850513	O8 : H9	CFA/IV (CS6)	5½	NO	B
E - 3	850102	O6 : H16	CFA/II (CS1)	22½	NO	A
E - 6	850204	O6 : H16	CFA/II (CS3)	24	NO	C
E - 9	850209	O6 : H16	CFA/II (CS3)	20	NO	C
E - 12	850210	O6 : H16	CFA/II (CS3)	21½	NO	C
E - 15	850505	O6 : H16	CFA/II (CS3)	10	NO	B
E - 18	850215	O6 : H16	CFA/II (CS3)	18½	SI	C
E - 21	850301	O6 : H16	CFA/II (CS3)	23	NO	C
E - 24	850308	O6 : H16	CFA/II (CS3)	12	SI	B
E - 27	850404	O6 : H16	CFA/II (CS3)	20½	NO	C
E - 30	850502	O6 : H16	CFA/II (CS3)	24	NO	C
E - 31		O167 : H5	CS 5 + CS 6			
E - 32		O78 : H11	CFA / I			
E - 33		O6 : H	CFA/II (CS2)			
E - 34		O166 : H27	PCF O166			
E - 35		O114 : H21	CS 17			
E - 36		O63 : H-	CFA / I			

Tabla 6 Características de cepas ETEC usadas

A = presenta toxina ST, B = presenta toxina LT, C = presenta ST y LT, D = no presenta ST ni LT.

Nota: Las cepas E - 31 a la E - 36 son cepas de referencia incluidas en el estudio, aunque no se cuenta con la edad del paciente ni su código, ni el perfil de toxinas.

### **4.3. Equipo de laboratorio**

- Agitador magnético, Thermolyne
- Agitador Vortex, Fisher
- Agitador orbital, Lab - Line
- Autoclave, Rochester
- Balanza analítica, Ohaus
- Baño metabólico, Grant
- Centrifuga y microcentrifuga, Sorvall
- Cámara de Electroforesis para Campos Pulsados, Bio Rad
- Cámara fotográfica, Kodak
- Congelador ( - 20 ° C), Nieto
- Espectrofotómetro ( Visible), Beckman
- Fuente de poder, Bio Rad
- Incubadora ( 37 ° C), Lab Line
- Potenciómetro, Oakton
- Refrigerador ( 4 ° C), Nieto
- Regulador de corriente, Complet R
- Transiluminador ( Luz Ultravioleta  $\lambda = 242 \text{ nm}$ ), Hoefer
- Ultracongelador ( - 70 ° C), Revco

### **4.4. Material de laboratorio**

- Asas bacteriológicas desechables
- Batas de laboratorio
- Bulbos de hule
- Cubreobjetos
- Flotador para microtubos
- Gradillas
- Guantes

- Matraces aforados
- Matraces Erlenmeyer
- Mechero
- Microtuboş (Eppendorf)
- Micropipetas
- Pipetas Pasteur
- Pipetas serológicas
- Placa de vidrio ( 15 x 15 cm)
- Portaobjetos
- Probetas
- Propipetas
- Puntas para micropipetas
- Termómetro ( - 10 hasta 80 ° C)
- Tubos de polipropileno de 15 mL con tapón
- Tubos de vidrio con rosca ( 16 x 150)
- Vasos de precipitados

#### 4.5. Medio de cultivo

Caldo Luria

#### 4.6. Reactivos químicos

- Acido bórico, Merck
- Acido clorhídrico, Técnica Química
- Agarosa Low Melting Point, SeaPlaque
- Agarosa NA, Pharmacia
- Azul de bromofenol, SIGMA
- Bromuro de etidio, SIGMA
- Amortiguador de Restricción para la enzima *Not I*, Gibco
- Cloruro de sodio, J.T. Baker

- Desoxicolato de sodio, SIGMA
- EDTA, Aldrich
- Enzima de restricción *Not I*, Gibco
- Hidróxido de sodio, Merck
- Lauril sarcosinato de sodio, SIGMA
- Lisozima, Lakeside
- Proteinasa K, SIGMA
- RNasa, Lakeside
- Trizma Base, SIGMA

#### 4.7. Método

##### 4.7.1. Cultivo

La población de estudio fue de 30 cepas de *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC), aisladas de niños menores de 25 meses, obtenidas a doble ciego de una colección del Dr. Alejandro Cravioto; y seis cepas de referencia obtenidas del mismo. Las muestras se cultivaron en 5 mL de caldo Luria estéril y se incubaron con agitación (200 rpm) durante la noche (18 horas) a 37 ° C. <sup>8,13, 17, 18, 31</sup>

##### 4.7.2. Preparación de las muestras

La suspensión bacteriana se centrifugó a 4500 rpm durante 5 minutos eliminando después el sobrenadante. El paquete bacteriano se resuspendió en 500 µL de solución PIV fría, centrifugándose por 2 minutos a 12 000 rpm. El sobrenadante se eliminó nuevamente y el paquete se resuspendió en 200 µL de PIV frío.

La agarosa Low Melting Point se preparó colocándola a 42 ° C para evitar su solidificación. 150 µL de la suspensión bacteriana se mezclaron con 150 µL de la agarosa líquida con la ayuda del vortex. Se colocaron 20 µL de la mezcla sobre una placa de vidrio



para cada disco con muestra. La placa se incubó a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos hasta que los discos solidificaron y se colocaron en un tubo Falcon de 15 mL con 1 mL de solución EC - Lisis. Los tubos se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  en baño María durante 3 horas. La solución EC - Lisis se eliminó y se agregó a cada tubo 1 mL de solución ESP. Todos los tubos se incubaron a  $50^{\circ}\text{C}$  durante la noche (18 horas).<sup>8,13,17,18,31</sup>

#### 4.7.3. Lavado de discos de muestra

La solución ESP se eliminó y se adicionaron 10 mL de TE con agitación a temperatura ambiente durante una hora con el fin de eliminar por completo los residuos de proteínas degradadas. Los tubos con los discos se guardaron a  $4^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.<sup>8,9,13,17,18,31</sup>

#### 4.7.4. Genoma bacteriano digerido con enzima de restricción

Un disco de cada muestra se colocó en tubos Eppendorf nuevos marcados con las claves de las muestras a analizar con ayuda de un asa desechable estéril. 500  $\mu\text{L}$  de amortiguador de restricción de la enzima *Not I* se les agregaron a estos tubos y se colocaron a  $37^{\circ}\text{C}$  en baño María durante 30 minutos para equilibrar las muestras con el medio y la temperatura de restricción óptima para la enzima. El amortiguador de restricción se eliminó y se agregaron 45  $\mu\text{L}$  de la mezcla de amortiguador con enzima de restricción *Not I* (20 U/disco) para incubar durante 18 horas a  $37^{\circ}\text{C}$  en baño María.<sup>8,13,17,18,31</sup>

#### 4.7.5. Electroforesis en gel de muestras digeridas con enzima *Not I*

A cada disco se le agregaron 5  $\mu\text{L}$  de amortiguador de carga y se incubaron a  $4^{\circ}\text{C}$ . La cámara de electroforesis se lavó dos veces con agua bidestilada estéril para eliminar cualquier residuo de electroforesis previas (como sales de la solución amortiguadora).

De la agarosa NA al 1 % preparada, se guardaron aprox. 3 mL a 50 ° C (para mantenerla líquida). En el gel sólido, las muestras se colocaron en los carriles y todos se sellaron con la agarosa líquida. Finalmente el gel se colocó en la cámara y se inició la electroforesis con las siguientes condiciones: <sup>8,13, 17, 18, 24, 25, 31</sup>

1. Voltaje: 6 V / cm
2. Pulsos: 1 - 35 segundos
3. Temperatura: 14 ° C
4. Tiempo de corrida: 23 horas
5. TBE 0.5 x (solución amortiguadora)

#### **4.7.6. Tinción y fotografía del gel**

Al término de la electroforesis el gel se tiñó con bromuro de etidio a una concentración de 0.5 µg/mL a temperatura ambiente durante 30 minutos. Mientras tanto, se lavó la cámara de electroforesis con agua bidestilada estéril para evitar la acumulación de sales de solución amortiguadora de electroforesis previas.

Después de la tinción, el gel se observó en un transiluminador con luz U.V y se tomó la fotografía con un tiempo de exposición de 1 segundo para su interpretación y análisis. <sup>8,13, 17, 18, 24, 25, 31</sup>

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Estandarización

Se realizó la estandarización con las variables críticas del ensayo, para determinar las condiciones óptimas que a continuación se enlistan:

- Cultivo: La fase logarítmica de crecimiento se eligió por ser la del mayor número de moos. jóvenes y viables. El período ideal de incubación de la fase logarítmica para *E. coli* en caldo Luria fue de 8 horas, como se reporta en la literatura.<sup>13, 17, 19, 20.</sup>
- Densidad óptica: El objetivo fue estandarizar el inóculo bacteriano para que sea el mismo en todas las preparaciones bacterianas y, por ende, los resultados sean comparables entre sí. En reportes anteriores se determinó la densidad óptica con luz visible a una longitud de onda  $\lambda = 620$  nm, y con un intervalo entre 0.05 y 0.25 de absorbancia.<sup>23</sup> La fórmula que se aplica es la que sigue:

$$D.O. \times 40 \times 210 - 210$$

El resultado fue la cantidad de solución PIV que se agregó a cada muestra para una misma suspensión bacteriana. Si la lectura de absorbancia es superior o inferior a los límites antes mencionados, la suspensión bacteriana se descartó y se obtuvo un nuevo cultivo estandarizado dentro del intervalo antes mencionado. Es un factor muy importante, para asegurarse de tener el DNA suficiente en el gel de agarosa para obtener bandas bien definidas por electroforesis.

- Proteinasa K: En la solución de ESP (para degradar las proteínas bacterianas), se agregó la Proteinasa K en el momento de utilizarse. Hay que evitar prepararla con anterioridad y alicuotarla, ya que la Proteinasa K ya no es capaz de penetrar en los discos de agarosa para degradar las proteínas bacterianas.

- Eliminación del exceso de residuos bacterianos: La lisis con Proteinasa K generó residuos bacterianos que pueden interferir cuando se lleva a cabo la electroforesis de campos pulsados creando barrido de las bandas o bandas no bien definidas. La obtención de bandas bien definidas se logró eliminando perfectamente estos residuos mediante varios lavados previos a la electroforesis como se indicó en la técnica.
- Restricción con la enzima *Not I*: Las instrucciones del proveedor se siguieron en el tiempo y condiciones de restricción, para que la digestión enzimática fuese completa
- Cámara de electroforesis En la medida de lo posible debe estar libre de partículas extrañas y/o DNAsas. Antes de su uso debe lavarse con agua bidestilada estéril para eliminar los residuos de sales de la solución amortiguadora (TBE) utilizada en electroforesis anteriores.
- Parámetros de la electroforesis de campos pulsados: la temperatura se controló con extremo cuidado, ya que influye para la obtención de un perfil electroforético con bandas de DNA bien definidas. La temperatura no excedió los 14 ° C.

## 5.2. Fotografías

A continuación se muestran las fotos obtenidas con una cámara Polaroid y con 1 seg de exposición. (Los gels mostrados son los gels definitivos). Todos los gels se corrieron durante 23 horas, a 14° C, con pulsos de 1 a 35 segundos, con 20 unidades de enzima *Not I* y en un gel de agarosa al 1% en TBE 0.5 x.

Gel 1:

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17

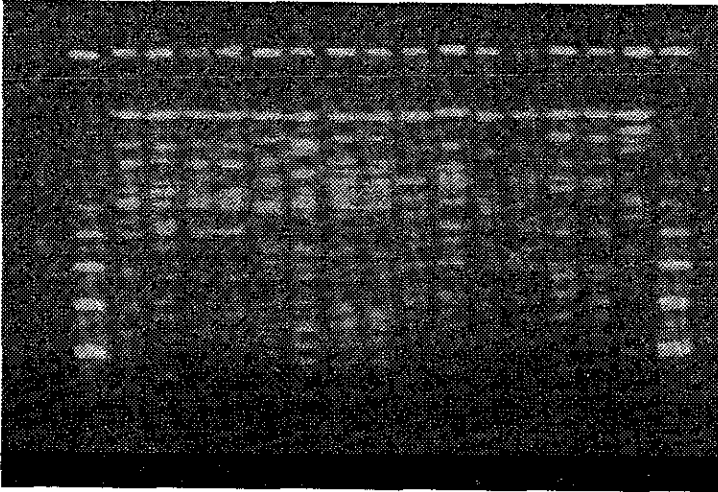


Figura 11. Gel 1.

Carril	Muestra	Carril	Muestra
1	$\lambda$	10	E-6
2	E-1	11	E-9
3	E-2	12	E-12
4	E-4	13	E-15
5	E-7	14	E-16
6	E-5	15	E-19
7	E-11	16	E-3
8	E-14	17	$\lambda$
9	E-17		

Tabla 7. Carriles y muestras del Gel 1.

**Gel 2:**

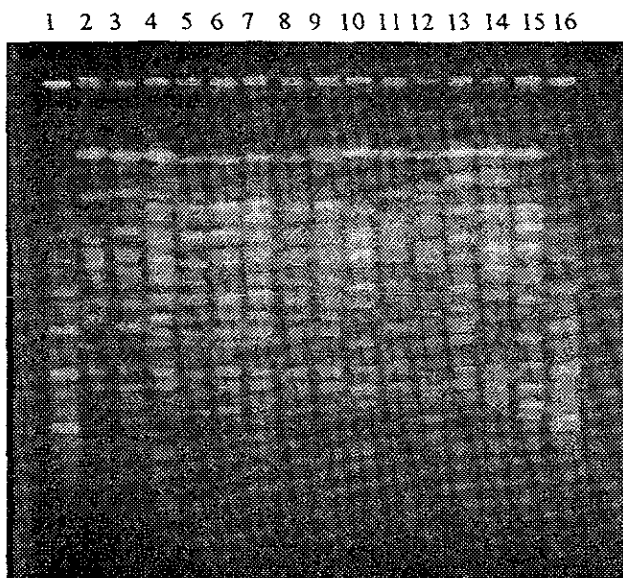


Figura 12. Gel 2.

Carril	Muestra	Carril	Muestra
1	$\lambda$	9	E-29
2	E-13	10	E-26
3	E-21	11	E-27
4	E-18	12	E-8
5	E-20	13	E-10
6	E-25	14	E-23
7	E-22	15	E-24
8	E-28	16	$\lambda$

Tabla 8 Carriles y muestras del Gel 2

**Gel 3:**

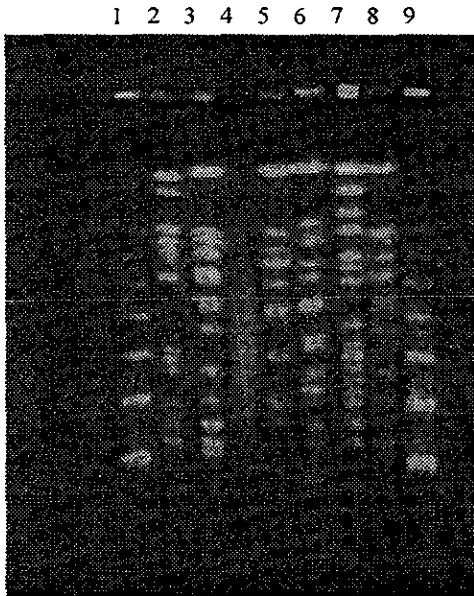


Figura 13. Gel 3.

Carril	Muestra	Carril	Muestra
1	$\lambda$	6	E - 34
2	E - 31	7	E - 35
3	E - 32	8	E - 36
4	E - 37	9	$\lambda$
5	E - 33		

Tabla 9. Carriles y muestras del Gel 3.

### 5.3. Tablas de resultados

Los geles se analizaron por tres métodos: el primero (que es el clásico), a partir de las fotografías originales de forma visual; el segundo, usando las fotografías escaneadas (y por lo mismo amplificadas) y un programa estadístico SPSS versión 8.0; y el tercero, usando las fotografías escaneadas y un programa de computación (BioImage).

En el primero se compararon las bandas obtenidas y se consideró que:

1. Dos cepas de ETEC son idénticas si presentan el mismo perfil de bandas. (Cero en distancia genética),
2. Dos cepas de ETEC están muy cercanamente relacionadas si presentan de una a 4 bandas de diferencia entre sí en el perfil generado. (Distancia genética de 0.4 a 1.6, respectivamente).
3. Dos cepas de ETEC no están cercanamente relacionadas si presentan de 4 a 8 bandas de diferencia en sus perfiles. (Distancia genética de 1.6 a 3.2).
4. Dos cepas de ETEC son diferentes si presentan más de 8 bandas de diferencia en sus perfiles. (Distancia genética mayor a 3.2)

(Siempre y cuando se use la misma enzima, mismas condiciones del experimento y al momento de tomar la fotografía, como se hizo en este estudio).

Usualmente, cuando las cepas de ETEC son idénticas, se les marca con la misma letra (por ejemplo A, B, C, etc.), si son muy cercana o cercanamente relacionadas se marcan con la letra de la cepa de referencia y un número para indicar la relación (como A1, A2, etc.), y si no están relacionadas se marcan con una letra diferente (A o B). En este caso, por haber obtenido un gran número de perfiles diferentes, se les asignaron números en lugar de letras y letras en lugar de números (1, 2, 3 y 1A, 1B, etc.). (Tabla 10).

En el segundo método se calculó el peso molecular de todas las bandas observadas en las fotografías escaneadas tomando como referencia los marcadores de peso molecular. Con los pesos moleculares de todas las bandas se creó una tabla binaria de ausencia y presencia de bandas (1=presencia y 0=ausencia). Al igual que en el primer método, se construyó una tabla de perfiles de las cepas de ETEC usadas. (Tabla 10). El programa



estadístico SPSS obtuvo un dendograma (mostrando la distancia genética entre las cepas) basado en la presencia y ausencia de bandas.

En el tercer método, el cálculo, la construcción de la tabla de números binarios y el dendograma los realizó el programa BioImage.

CEPA	MÉTODO 1	MÉTODO 2	MÉTODO 3	CEPA	MÉTODO 1	MÉTODO 2	MÉTODO 3
E-1	1 A	5	1	E-19	4 B	20	19
E-2	1 D	6	2	E-20	6 B	21	20
E-3	5	7	3	E-21	3 B	22	21
E-4	1 A	8	4	E-22	7	1 B	22 A
E-5	1 B	9	5	E-23	11	23	23
E-6	3 A	10	6	E-24	12	4 B	24
E-7	1 A	11	7	E-25	6 B	2 B	22 B
E-8	9	12	8	E-26	8 A	24	25
E-9	3 A	13	9	E-27	8 B	25	26
E-10	10	14	10	E-28	7	1 A	27 A
E-11	1 C	15	11	E-29	7	1 A	27 B
E-12	3 A	16	12	E-30	---	---	---
E-13	3 A	17	13	E-31	13	26	28
E-14	2	3 A	14 A	E-32	14	4 C	29 A
E-15	3 A	18	15	E-33	15	27	30
E-16	4 A	19	16	E-34	16	28	31
E-17	2	3 B	14 B	E-35	17	29	32
E-18	6 A	2 A	18	E-36	18	4 A	29 B
			No. Total de perfiles:		----- 26	----- 34	----- 35

Tabla 10 Comparación del número de perfiles por los tres métodos.

La cepa E-30 no presentó ningún perfil de bandas debido a que su DNA fue degradado durante la preparación de las muestras. Lamentablemente, no se obtuvo en al menos tres ocasiones que se preparó la cepa, DNA intacto, por lo que no se tomó en cuenta para este estudio.

Es importante mencionar que para el método uno, se obtuvieron 26 perfiles para las 35 cepas utilizadas (implicando que varias cepas presentan el mismo perfil), para el método dos se obtuvieron 34 perfiles para 35 cepas (de las cuales sólo dos cepas tienen el mismo perfil) y en el método tres se obtuvieron 35 perfiles para las mismas 35 cepas (ningún perfil se repite).

#### **5.4. Dendogramas**

Una vez obtenida la tabla binaria, se usó el programa estadístico SPSS 8.0 para crear un dendograma donde se observó la distancia genética entre todas las cepas usadas. La escala que señala la distancia genética (abscisas) va de 0 a 0.7, siendo las cepas más cercanas a 0 las más similares y las más divergentes las cercanas a 0.7 (o diferentes genéticamente). (Figura 14).

El otro dendograma fue creado de la misma forma el programa BioImage. (Figura 15). La escala en este dendograma va de cero a 0.72, y se aplicó el mismo criterio descrito anteriormente.

En el eje de las ordenadas están las cepas y sus características fenotípicas como son el código de la cepa de ETEC, serotipo, fimbria y toxinas.

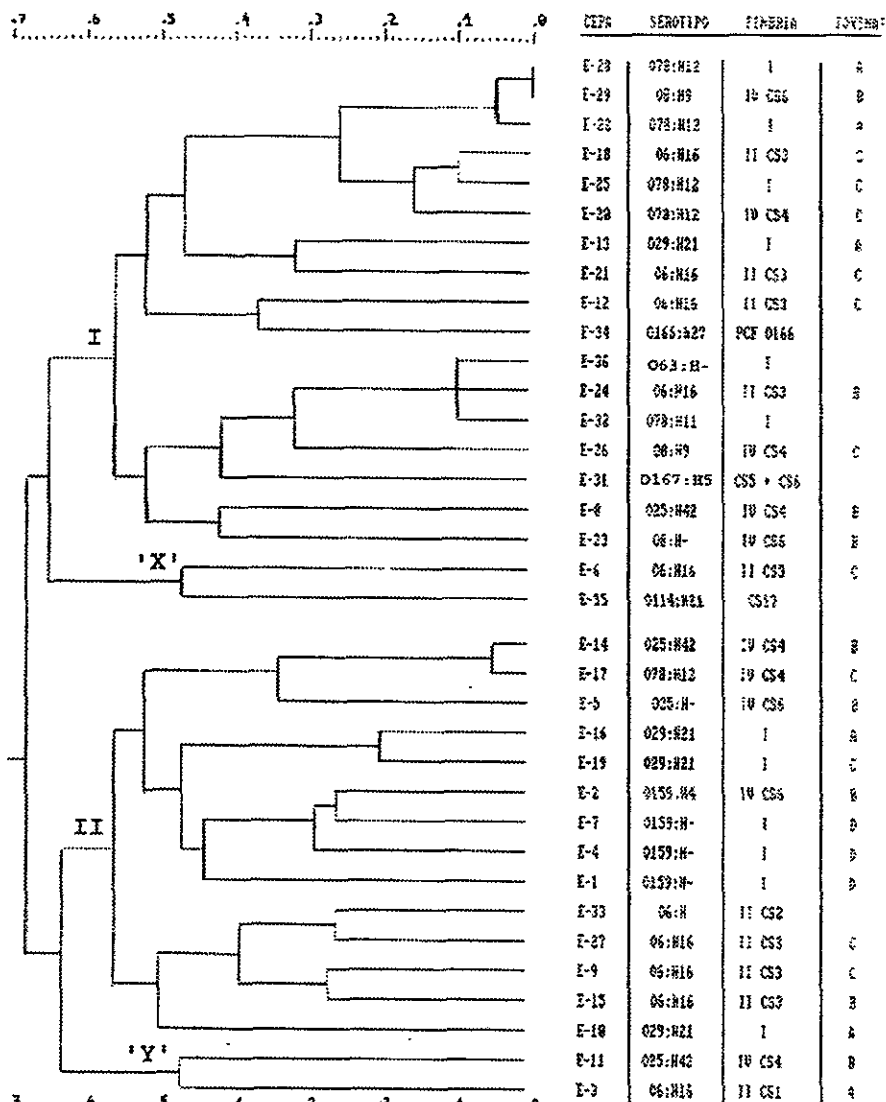


Figura 14. Dendrograma obtenido con SPSS 8.0

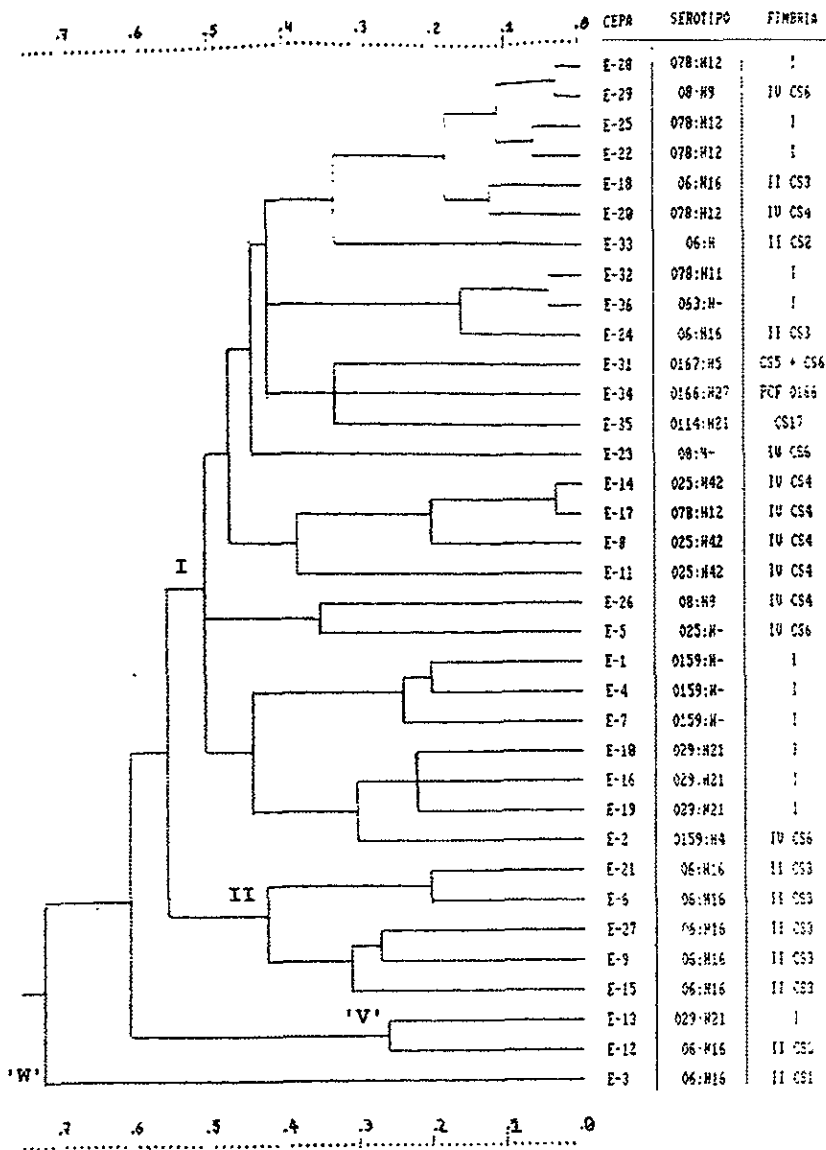


Figura 15. Dendrograma obtenido con BioImage

## 6. DISCUSIÓN

La electroforesis de campos pulsados es una herramienta de biología molecular a la que no se recurre mucho en México, a pesar de sus múltiples usos, quizá por la falta de personal experto o por el gran número de variables por estandarizar.

El inóculo bacteriano fue el mismo en todas las muestras para que los resultados fueran comparables. Si el inóculo es demasiado pequeño, no hay suficiente DNA y no se observan bandas bien definidas. Si por el contrario, el inóculo es demasiado grande, se observa un barrido en la electroforesis de campos pulsados como en el carril cuatro del tercer gel. Por esto se debió de trabajar únicamente las muestras que estuvieron dentro del intervalo de densidad óptica señalado (por la fórmula descrita en los resultados).

Otro factor importante fue el tratamiento que se le dio a las muestras para eliminar todas las proteínas de los discos de muestra y dejar únicamente el DNA embebido en agarosa. Se utilizó lisozima para la lisis bacteriana ya que ésta cataliza la ruptura hidrolítica de los polisacáridos presentes en la pared celular de *E. coli*. La RNasa fue para prevenir algún daño en el DNA, ya que debe permanecer intacto para obtener buenos resultados. La proteinasa K eliminó finalmente las proteínas bacterianas rompiendo los enlaces disulfuro de las mismas. Es importante mencionar que la proteinasa K reaccionó con la mayor actividad enzimática posible y se eliminaron los residuos de proteínas mediante lavados. De este modo, se aseguró que en las muestras sólo quedó el DNA puro para la restricción enzimática y su posterior corrimiento electroforético de campos pulsados.

Durante esta restricción, la cantidad de enzima usada fue de 20 Unidades por disco. Aunque el tiempo de actividad enzimática fue corto (unas cuantas horas), las muestras se incubaron con la enzima durante toda la noche para asegurar que la digestión fuese completa.

El equipo y los parámetros de electroforesis de campos pulsados son también factores que se estandarizaron. La cámara de electroforesis estuvo limpia de partículas extrañas y DNAsas. Las DNAsas pueden degradar el DNA contenido en las muestras, y las partículas pueden obstruir la circulación de la solución amortiguadora de electroforesis, provocando un calentamiento excesivo. Es importante mantener la temperatura constante a 14 ° C, ya que una mayor temperatura provoca que las bandas no se definan bien o que se vean deformadas (forma de "U"). Los pulsos se eligieron de acuerdo a las recomendaciones del fabricante para dar una mayor definición a las bandas dentro del intervalo de 50 a 500 kpb. En la literatura está reportado que la enzima utilizada (*Not I*) reconoce una secuencia de corte de 8 pb:



por lo que se obtienen aprox. 22 fragmentos al cortar el genoma completo de *E. coli* (cepa EMG2), como se muestra a continuación:

No. de Fragmento	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Tamaño (kpb)	1000	360	360	275	250	250	245	240	230	210	205

No. de Fragmento	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
Tamaño (kpb)	203	191	130	106	100	100	95	43	43	40	20

Tabla 11. Fragmentos obtenidos con la restricción de *Not I*.

Por la información de esta tabla, la mayoría de los fragmentos de DNA caen en el intervalo de 50 a 500 kpb, que fue el tamaño de bandas para el que se obtuvo una mejor definición con los parámetros de electroforesis antes mencionados (pulsos, temperatura y tiempo de electroforesis). El marcador que se utilizó fue  $\lambda$  (sus concatámeros), con pesos moleculares de 48.5 a 485 kpb. En el análisis de los geles las bandas en este intervalo fueron las consideradas puesto que son las bien definidas y se calculó el peso molecular tomando como base los pesos del marcador.

En el análisis de los geles es importante señalar que por las características del estudio de doble ciego, las cepas de ETEC se agruparon únicamente por su perfil electroforético de campos pulsados, ya que no se conocieron las características fenotípicas de las cepas hasta concluidos los tres análisis y obtenidos los dendogramas correspondientes.

Por el método número uno, los geles se analizaron de manera visual y se obtuvieron 26 perfiles para las 35 cepas estudiadas. Se infiere entonces que hay varias cepas que tuvieron la misma huella digital: perfil 1A para las cepas E-1, E-4 y E-7; perfil 2 para las cepas E-14 y E-17; perfil 3A para las cepas E-6, E-9, E-12, E-13 y E-15; perfil 6B para las cepas E-20 y E-25. Un mismo perfil implicó que las cepas son idénticas en su perfil de restricción y genéticamente su distancia fue de cero. Con este método se observó también que hay varias cepas de ETEC que están muy cercanamente relacionadas, como todas aquellas con un perfil número 1 (E-1, E-2, E-4, E-5, E-7 y E-11). Estas seis cepas presentaron en sus perfiles menos de cuatro bandas de diferencia, lo cual pudo originarse por mutaciones puntuales, deleciones o inserciones; que son eventos genéticos “menores” que pueden o no significar un cambio fenotípico en la cepa. Todas las demás cepas de ETEC con mayor número de bandas de diferencia no están cercanamente relacionadas o bien son cepas de ETEC clonalmente diferentes.

En el método dos, se encontraron 34 huellas digitales para las 35 cepas de ETEC, implicando que sólo hay dos cepas con un perfil idéntico (E-28 y E-29 y distancia genética de cero), mismas que en el análisis clásico se describieron como idénticas. También hay cepas que están cercanamente relacionadas como las del perfil 3 (E-14 y E-17), que en el análisis uno aparecen como idénticas. Lo mismo ocurre con el perfil 2 (cepas E-18 y E-25). Con este método se elimina un poco la subjetividad del primero, ya que no se determinó si las bandas son iguales o no, sino que se calcularon los pesos de las mismas para comparar los perfiles entre sí. Es por ello que el número de perfiles encontrados aumentó y que las cepas ya no parecen estar tan relacionadas entre sí.

En el tercer y último método de comparación se encontraron 35 perfiles diferentes, lo que significa que ninguna cepa es idéntica a otra en su patrón de restricción.

Se observó que el número de perfiles aumentó considerablemente cuando se utilizaron métodos más objetivos (esto es, programas de computación) para analizar la semejanza o diferencias entre los perfiles generados. Dicho aumento va de 26 a 34 y 35 (con los métodos 1, 2 y 3 respectivamente).

En el método dos de análisis se utilizó un programa que parte de una tabla binaria para construir el dendograma correspondiente, pero se calculó el peso molecular de las bandas de DNA para la construcción de la tabla binaria. Esto implicó que el método no fue completamente objetivo, pero sí más que el método uno.

En el tercer método, el cálculo de las bandas y la construcción del dendograma lo hizo el programa BioImage, con mayor objetividad que el método dos. Los únicos parámetros en los que se influyó fueron los del mínimo y máximo de intensidad de las bandas que se tomaron y la desviación de migración de las bandas para ser tomadas como la misma banda, esto con fundamentos matemáticos.

En los dendogramas obtenidos, (Figuras 14 y 15) cada 0.05 de distancia genética representa una banda de diferencia entre dos perfiles.

En el dendograma hecho con el programa SPSS se observan claramente dos divisiones principales (por agrupar un mayor número de cepas de ETEC) denominadas I y II. La distancia genética entre éstas es de 0.68, lo que indica que no están relacionadas genéticamente ya que presentan una diferencia de más de 8 bandas de DNA.

Dentro de la rama I, hay dos cepas de ETEC (E-6 y E-35) que forman un linaje ('X') que difiere del resto por una distancia de 0.65. Se observó dentro de esta misma rama un agrupamiento (*cluster*) que incluyó a 3 cepas de ETEC (las primeras tres de la parte superior del dendograma). Este *cluster* tiene una distancia genética de 0.05 (1 banda de



diferencia), por lo que están cercanamente relacionadas. Incluso, dos de ellas (E-28 y E-29) se observan como idénticas.

Hay otro pequeño *cluster* (puesto que sólo abarca tres cepas de ETEC), con una distancia genética de 0.1 (o dos bandas de diferencia). Estas cepas de ETEC (E-36, E-24 y E-32) también están cercanamente relacionadas.

En la rama II, también hay dos cepas de ETEC (E-11 y E-3) que forman un linaje aparte ('Y') por tener una distancia genética de 0.47. En esta rama sólo se presenta un *cluster* de cepas cercanamente relacionadas (E-14 y E-17) con una distancia genética de 0.05.

Todas las demás cepas presentaron distancias genéticas mayores a 1.6, por lo que se consideró que no están cercanamente relacionadas.

En el segundo dendograma, generado por el programa BioImage, se observó una gran división (I), que abarcó casi a todas las cepas de ETEC. La distancia genética de esta rama con respecto a la rama II es de 0.55, lo que significa que son diferentes o no están relacionadas genéticamente.

Dentro de la rama I, se observaron hasta 4 *clusters* (A-D) de cepas de ETEC cercanamente relacionadas. Uno de los más sobresalientes (por agrupar a 4 cepas) es el que se denominó con la letra "A". Este cluster presenta una distancia de 1.1 y agrupa a las cepas E-28 y E-29 (con distancia entre sí de 0.4) y a E-25 y E-22 (con distancia entre sí de 0.7).

En la rama II, todas las cepas tienen una distancia superior a 1.6, por lo que no están cercanamente relacionadas.

Hay tres cepas que formaron dos linajes separados por la distancia que presentan. El primero ("V"), lo forman las cepas de ETEC E-13 y E-12 con una distancia de 0.6 del resto de las cepas y el segundo ("W"), lo forma únicamente la cepa E-3 con una distancia del resto de 0.72.

Es importante resaltar que en ninguno de los dendogramas se observó una correlación entre las características fenotípicas (sin importar si están codificadas en cromosoma o en plásmidos) de las cepas de ETEC y la agrupación y sus respectivas distancias genéticas. Esto se hace más evidente al comparar por ejemplo las cepas E-28 (O78:H12, CFA/I, Toxina ST) y E-29 (O8:H9, CFA/IV - CS6, Toxina LT), que en el primer dendograma aparecen como idénticas y en el segundo como cercanamente relacionadas: ya que a pesar de esta similitud en su patrón de restricción estas cepas tienen diferente serotipo, fimbria e incluso producción de toxinas. Esto nos sugiere que no obstante lo poderosa que es la técnica de electroforesis de campos pulsados, sólo se diferenciaron entre patrones de restricción y no puede inferirse en las características fenotípicas de las cepas de ETEC.

Las técnicas moleculares son herramientas poderosas en el análisis del DNA bacteriano. Una de las técnicas más recurridas por su reproducibilidad y objetividad, es la secuenciación de DNA. El más grande inconveniente es el alto costo y cierta dificultad para interpretar los resultados. Otras técnicas muy utilizadas son enzimas multilocus y ribotipos. Ambas técnicas se basan en parte del genoma bacteriano (específicamente las enzimas metabólicas de la bacteria y por lo tanto los genes que las codifican y el RNA ribosomal, respectivamente). Estas técnicas no son muy difíciles de estandarizar e implementar en un laboratorio de investigación y los resultados son reproducibles y con un gran poder de discriminación. Sin embargo, sólo analizan una parte del genoma bacteriano y sólo se puede inferir lo que sucede en el resto del genoma. Al respecto, la técnica de electroforesis de campos pulsados es aún más poderosa que estas últimas, ya que analiza el genoma completo de la bacteria y se alcanzan a observar cambios tan pequeños en el DNA como son las mutaciones puntuales. A pesar de que se detectan estos cambios, es importante comparar los resultados con características biológicas y fenotípicas ya que estas mutaciones

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

pueden ser sinónimas y por lo tanto no representar cambios importantes para el moo. Una técnica con tan grande poder discriminatorio nunca debería tomarse como absoluta, sino que deben emplearse varias técnicas tanto fenotípicas como genotípicas y comparar los resultados obtenidos para llegar a una conclusión. Las técnicas fenotípicas (como serotipificación) no deberían menospreciarse ya que aportan información importante sobre el moo, pero sí deben complementarse con técnicas de vanguardia como lo es la electroforesis de campos pulsados para no interpretar erróneamente los resultados obtenidos.

## 7. CONCLUSIONES

1. No se observó clonalidad en las 35 cepas de ETEC trabajadas, mediante la técnica de electroforesis de campos pulsados.
2. No existe correlación entre las características fenotípicas de estas cepas de ETEC y su distancia genética (o distribución en el dendograma).
3. Es de suma importancia estandarizar las condiciones de corrida, de la técnica y del equipo para que los resultados sean reproducibles y confiables.
4. Por ser un estudio a doble ciego, se eliminó en gran medida el sesgo que representaría conocer las características de las cepas antes del trabajo de laboratorio.
5. De los tres métodos de análisis, el más subjetivo fue el convencional (analizando las fotografías a simple vista); en tanto que el más objetivo fue el que utilizó el programa BioImage.
6. El tipo de análisis que se sugiere hacer en un laboratorio está en función del tiempo y experiencia del investigador (a) y del equipo del que se dispone en el laboratorio.

## 8. APÉNDICE

### Medio de cultivo y soluciones

#### Caldo Luria

Peptona de Carne	5.0 g
Extracto de Levadura	2.5 g
Cloruro de Sodio	2.5 g

Aforar a 500 ml . Autoclave .

#### Tris 1 M , pH = 8.0

Trizma Base	121.1 g
Agua	800 ml

Ajustar pH con aprox. 42 ml de HCl conc.  
Aforar a 1000 ml . Autoclave .

#### EDTA 0.5 M , pH = 8.0

EDTA	186.1 g
Agua	800 ml

Ajustar pH con aprox. 20 g de NaOH .  
Aforar a 1000 ml . Autoclave .

#### ES ( EDTA + Sarcosil )

EDTA	93.1 g
Agua	400 ml

Ajustar pH con aprox. 20 g NaOH a 9.0 .  
Lauril Sarcosinato de Na 0.5 g  
Aforar a 500 ml . Autoclave .

#### Tris 1 M , pH = 7.5

Trizma Base	121.1 g
Agua	800 ml

Ajustar pH con aprox 45 ml HCl concen .  
Aforar a 1000 ml . Autoclave .

#### TBE 10 x

Trizma Base	108 g
Acido Bórico	55 g
EDTA 0.5 M , pH=8	40 ml

Aforar a 1000 ml . Autoclave .

#### EC ( EDTA + Cloruro de Na)

Tris 1 M , pH=8.0	5.0 ml
NaCl	29.2 g
EDTA 0.5 M , pH=8.0	100 ml
Desoxicolato de Na	1 g
Laurilsarcosinato de Na	2.5 g

Aforar a 500 ml . Autoclave .

#### EC - Lisis

EC	1 ml/cepa
RNasa 10 mg/ml	5 µl/cepa
Lisozima 10 mg/ml	10 µl/cepa

#### ESP ( ES + Proteinasa K )

ES	1 ml/cepa
Proteinasa K	0.001 g/cepa

#### TE ( Tris + EDTA )

Tris 1 M , pH=7.5	10 ml
-------------------	-------

EDTA 0.5 M , PH=8 2 ml

Aforar a 1000 ml . Autoclave .

#### PIV

NaCl	29.22 g
Tris 1 M , pH=8	5 ml

Aforar a 500 ml . Autoclave .

#### RNasa 10 mg/ml

RNasa	30 mg
Agua	3 ml

Hervir a 100 ° C por 15 min .

Alicuotar y guardar a - 20 ° C .

## 9. REFERENCIAS:

1. Arbeit R., Arthur M., Dunn R., Kim Ch., Selander R. and Goldstein R. Resolution of Recent Evolutionary Divergence among *Escherichia coli* from Related Lineages: The Application of Pulsed Field Electrophoresis to Molecular Epidemiology. *J. Infect. Dis.* 161: 230 – 235, 1990.
2. Amheim N. and Erlich H. Polymerase Chain Reaction Strategy. *Annu. Rev. Biochem* 61: 131 – 156, 1992.
3. Arthur R., Johnson C., Rubin R. *et al.* Molecular Epidemiology of Adhesion and Hemolysin Virulence Factors Among Uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 57: 303 – 313, 1989.
4. Beltrán P., Delgado G., Navarro A., Trujillo F., Selander R. and Cravioto A. Genetic Diversity and Population Structure of *Vibrio cholerae*. *J. Clin. Microbiol.* 37: 581 – 590, 1999.
5. Black R. Epidemiology of Diarrhoeal Disease: Implications for Control by Vaccines. *Vaccine.* 11: 100-106, 1993.
6. Black R. Epidemiology of Travelers' Diarrhea and Relative Importance of Various Pathogens. *Rev. Infect. Dis.* 12: 573-579, 1990.
7. Caugant D., Levin B., Lidin-Janson, Whittam, Edén C. and Selander R. Genetic Diversity and Relationships among Strains of *Escherichia coli* in the Intestine and Those Causing Urinary Tract Infection. *Prog. Allergy.* 33: 203-227, 1983.
8. Clayton Ch., Wren B., Mullany P., Topping A. and Tabaqchali S. Molecular Cloning of *Campylobacter pylori* Species-Specific Antigens in *Escherichia coli* K-12. *Infect. Immun.* 57: 623 – 629, 1989.

9. Chang N. and Taylor D. Use of Pulsed - Field Gel Electrophoresis to Size Genomes of *Campylobacter* Species and to Construct a *Sal I* Map of *Campylobacter jejuni* UA580. *J Bacteriol.* 172: 5211 - 5217, 1990.
10. Evans D.J. and Evans D.G. Mechanisms, Manifestations and Management in Enteric Infections. Chapman & Hall. 1989, págs: 31-40.
11. Gastra W and Svennerholm A.M. Colonization Factors of Human Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). *Trends in Microbiology.* 4: 444 - 452, No. 11, 1996.
12. Garza R. Manual de prácticas de bacteriología. Departamento de Biología. Facultad de Química, UNAM. Págs.: 69-79.
13. Gautom R. Rapid Pulsed Field Gel Electrophoresis Protocol for Typing of *Escherichia coli* O157: H7 and Other Gram-Negative Organisms in 1 Day. *J. Clin. Microbiol.* 35: 2977-2980, 1997.
14. Girón J., Levine M. and Kaper J. Longus: a Long Pilus Ultrastructure Produced by Human Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 12: 71-82, 1994.
15. Goering R. Molecular Epidemiology of Nosocomial Infection: Analysis of Chromosomal Restriction Fragment Patterns by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 14:595 - 600, 1993.
16. Ichiyama S., Ohta M., Shimokata K., Kato N. and Takeuchi J Genomic DNA Fingerprinting by Pulsed Field Gel Electrophoresis as an Epidemiological Marker for Study of Nosocomial Infections Caused by Methicillin - Resistant *S. aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 29: 2690 - 2695, 1991.

17. Izumiya H., Terajima J., Wada A., Inagaki Y., Itoh K., Tamura K. and Watanabe H. Molecular Typing of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157. H7 Isolates in Japan by Using Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 35: 1675-1680, 1997
18. Johnson J., Weagant S., Jinneman K. and Bryant J. Use of Pulsed-Field Gel Electrophoresis for Epidemiological Study of *Escherichia coli* O157: H7 during a Food-Borne Outbreak. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2806 – 2808, 1995.
19. Knotton S., McConell M., Rowe B. and McNeish A. Adhesion and Ultrastructural Properties of Human Enterotoxigenic *Escherichia coli* Producing Colonization Factor Antigens III and IV. *Infect. Immun.* 57: 3364-3371, 1989.
20. Kreiswirth B., Kornblum J. and Arbeit R.. Evidence for a Clonal Origin of Methicillin resistance *S. aureus*. *Science.* 259: 227-230, 1993.
21. Levine M., Nalin D., Hoover D., Bergquist E., Hornick R. and Young C. Immunity to Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 23:729-739, 1979.
22. Manning, Higgins, Lumb and Lanser. Colonization Factor Antigens and a New Fimbrial Type, CFA/V, on O115:H40 and H- Strains of ETEC in Central Australia.
23. Maslow J., Mulligan M.E. and Arbeit R..Molecular Epidemiology: Application of Contemporary Techniques to the Typing of Microorganisms. *Clin. Infect. Dis.* 17: 153 - 164, 1993
24. Matushek M., Bonten M. and Hayden M. Rapid Preparation of Bacterial DNA for Pulsed - Field Gel Electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 34: 2598 - 2600, 1996.
25. Maule John. Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *Molecular Biotechnology.* 9:107-126, 1998.



26. McConell M., Thomas L., Day N. and Rowe B. Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for the Detection of Adhesion Factor Antigens of Enterotoxigenic *E. coli*. J Infect. Dis. 152: 1120-1127, 1985.
27. Murray P., Kobayashi G, Pfäller M y Rosenthal K Microbiología Médica. 2º Edición. Harcourt Brace. España, 1997. Págs.: 227 – 234.
28. Orskov F., Whittam T., Cravioto A. and Orskov I. Clonal Relationships among Classic Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Belonging to Different O Groups. J. Infect. Dis. 162: 76 – 81, 1990.
29. Pfäller M., Wendt C., Hollis R., Wenzel R., Fritschel S., Neubauer J. and Herwaldt L. Comparative Evaluation of an Automated Ribotyping System versus Pulsed-Field Gel Electrophoresis for Epidemiological Typing of Clinical Isolates of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* from Patients with Recurrent Gram-Negative Bacteremia. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 25: 1-8. 1996.
30. Selander R., Caugant D. and Whittam T. Genetic Structure and Variation in Natural Populations of *Escherichia coli* . En: Neidhart F., Ingraham K., Magasanik B., Low K., Schaechter M., Umberger H. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, cellular and molecular biology. American Society for Microbiology. E.U, 1987, págs: 1625-1648.
31. Smith C., Econome J., Schutt A., Klco S. and Cantor Ch. A Physical Map of the *Escherichia coli* K12 Genome. Science. 27:1448-1453, 1990.
32. Taylor D., Eaton M., Chang N. and Salama S. Construction of a *Helicobacter pylori* Map and Demonstration of Diversity at the Genome Level. J. Bacteriol. 174: 6800 – 6806, 1992.

33. Tenover F., Arbeit R., Goering R., Mickelsen P., Murray B., Persing D. and Swaminathan B. Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. *J. Clin Microbiol* 33: 2233 – 2239, 1995.
34. Tierney L , McPhee S. y Papadakis M. Diagnóstico Clínico y Tratamiento Manual Moderno. México, 1998, págs.: 1284- 1286.
35. Wassenaar T., Geilhausen B. and Newell D. Evidence of Genomic Instability in *Campylobacter jejuni* Isolated from Poultry. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1816 – 1821, 1998.
36. Whittam T., Wachsmuth I.K. and Wilson R. Genetic Evidence of *Escherichia coli* 0157:H7 Associated with Hemorrhagic Colitis and Hemolytic Uremic Syndrome. *J. Infect. Dis.* 157: 1124 - 1133, 1988.

#### Citas de Internet

- I. <http://microvet.arizona.edu/Courses/MIC420/lecture.notes/ecoli/ecoli-general.html>
- II. <http://sun1.bham.ac.uk/bcm4ght6/res.html>
- III. <http://vn.cfsan.fda.gov/~mow/chap13.html>
- IV. <http://www.bact.wisc.edu/Bact330/lectureecoli>
- V. <http://www.healthgate.com/cgi-bin/q-format.cgi>
- VI. <http://www.paho.org/default.htm>