



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**Caracterización Genética de los Operones
Ribosómicos de *Escherichia coli* Enterotoxigénica, con
Base en los Perfiles de Restricción de su Espacio
Intergénico.**

TESIS

Que para obtener el título de:
Químico Farmacéutico Biólogo

Presenta
Diego Núñez Tovar



México, DF.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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:** Rodolfo Pastelín Palacios.
Vocal: María del Rosario Morales Espinosa.
Secretario: Santiago Ávila Ríos.
1er. Suplente: Luis Ángel Maldonado Manjarrez.
2do. Suplente: Gabriela Delgado Sapién.

Sitio donde se desarrolló el tema: Laboratorio de genómica bacteriana. Edificio de Investigaciones, 5to. Piso. Facultad de Medicina.

Asesor del Tema

Dra. María del Rosario Morales Espinosa.

Supervisor Técnico

Dra. Gabriela Delgado Sapién.

Sustentante

Diego Núñez Tovar.

Agradecimientos

A la Dra. Rosario Morales, por permitir que formara parte de este proyecto tan importante y mostrarme su apoyo y amistad desde el primer día que llegue al Laboratorio.

A la Dra. Gabriela Delgado, por su amistad, consejos y su asesoría que fue de gran importancia para poder terminar este trabajo.

Al Biólogo José Luis Méndez, por toda su ayuda en este trabajo y su amistad, sobre todo por que hizo que pasara buenos momentos en el Laboratorio.

A Blanca, Bety, Annel y Esvin que estuvieron trabajando en el Laboratorio, por su amistad y ayuda que me brindaron.

A la Universidad, que me dio los mejores momentos de mi vida como estudiante y me llena de orgullo ser parte de esta institución tan maravillosa.

Gracias.

Dedicatoria

En primer lugar quiero agradecer a mis padres, María Eugenia Tovar y José Núñez, por todo su cariño y apoyo que me brindan para poder terminar este sueño.

A mis hermanos Emmanuel, Jhonatan y Omar que con su ejemplo, fueron base para que terminara esta Licenciatura y sobre todo por la ayuda que me han brindado durante toda la vida. A Julia, por toda la ayuda que me ha dado y a mi sobrino Mauricio.

A todos mis amigos de la Facultad de Química, en especial a Jessica por su valiosa amistad y todo su apoyo. A Leo, Ulises, Bryan, Luis Guillermo, Itzel, Jocelyn, Dennis, Montse y Mabel, por los buenos momentos que vivimos en la carrera. A Paulina, Juan, Mingyar, Marian, Juliana, Osvaldo, Iván, Héctor y Daniel por su amistad y tiempo que hemos pasado juntos.

A mis amigos de toda la vida: Alan, Armando, Liliana, Mario y Pedro, que han estado acompañándome en distintos momentos de mi vida.

Gracias.

ÍNDICE

CAPITULO 1.

1.0. INTRODUCCIÓN.

	<u>Página.</u>
1.1. Introducción.....	7
1.2. Objetivos.....	9
1.3. Hipótesis.....	9

CAPITULO 2.

2.0. GENERALIDADES.

2.1. <i>Escherichia coli</i>	10
2.1.1. Historia de <i>E. coli</i>	10
2.1.2. Aislamiento.....	12
2.1.3. Bioquímicas.....	12
2.2. Cepas patógenas de <i>E. coli</i>	13
2.2.1. <i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica (ETEC).....	13
2.2.2. Serotipificación.....	14
2.2.3. Manifestaciones clínicas de infecciones por ETEC.....	15
2.2.4. Epidemiología.....	16
2.3. Diagnóstico de ETEC.....	18
2.3.1. Ensayos de laboratorio.....	18
2.4. Mecanismos moleculares de virulencia de ETEC (Patogénesis).....	19
2.4.1. Adhesión e Invasión.....	19
2.4.2. Factores de colonización (CFs).....	20
2.4.3. <i>E. coli</i> common pilus (ECP).....	21
2.4.4. TibA.....	21
2.4.5. Tia.....	21
2.4.6. Efectos citotóxicos.....	22
2.4.7. Enterotoxina Termoestable (ST).....	22
2.4.8. Enterotoxina Termolábil (LT).....	24
2.5. Operones RNA ribosomales de <i>E. coli</i>	26
2.5.1. Estructura de los siete operones de <i>E. coli</i> y su espacio intergénico 16S-23S (ISR).....	27
2.5.2. Diseño de iniciadores.....	30
2.5.3. Heterogeneidad Intercistronica de <i>E. coli</i>	31
2.6. Endonucleasas de restricción.....	31

CAPITULO 3.

3.0. DISEÑO EXPERIMENTAL Y METODOLOGÍA.

3.1. Cepas bacterianas.....	33
-----------------------------	----

	<u>Página.</u>
3.2. Serotipificación y detección de toxinas LT y ST.....	33
3.3. Identificación morfológica y bioquímica.	34
3.4. Sistema de identificación de <i>Enterobacteriaceae</i> API 20E.....	34
3.5. Extracción de DNA.....	34
3.6. Oligonucleótidos (diseño de iniciadores).....	35
3.7. Amplificación por PCR.....	36
3.8. Elección de las Enzimas de Restricción (Endonucleasas) <i>In-silico</i>	36
3.9. Procedimiento experimental de restricción.....	37
3.10. Análisis del patrón de bandeo generado por la restricción (PCR-RFLP).....	38

CAPITULO 4.

4.0. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1. Identificación de las cepas de ETEC.....	39
4.2. Análisis <i>In-silico</i> de la restricción de los 7 operones <i>rrn</i> de cuatro cepas de <i>E. coli</i>	40
4.3. Resultados experimentales PCR-RFLP.....	51
4.3.1. Amplificación por PCR del espacio intergénico 16S-23S RNAr.....	51
4.4. Restricción de los productos amplificados por PCR del espacio intergénico 16S-23S RNAr de las cepas ETEC con las endonucleasas <i>RsaI</i> , <i>TaqI</i> y <i>Hinfi</i>	53
4.4.1. Perfiles generados por la restricción de <i>RsaI</i>	53
4.4.2. Perfiles generados por la restricción de <i>TaqI</i>	54
4.4.3. Perfiles generados por la restricción de <i>Hinfi</i>	54
4.4.4. Restricción de los productos amplificados por PCR del espacio intergénico 16S-23S RNAr de las cepas externas a <i>Escherichia</i> con <i>RsaI</i>	56
4.5. Comparación de los perfiles de restricción generados por <i>RsaI</i> en las cepas analizadas <i>In-silico</i> y las cepas clínicas de ETEC.....	57
4.6. Análisis de los perfiles identificados en las cepas de ETEC aisladas en cada niño a lo largo de sus dos primeros años de vida.....	64
4.7. Relación de los perfiles de restricción identificados con su aislamiento en presencia o ausencia de diarrea.....	93
4.8. Persistencia en el intestino y relación clonal de cepas de ETEC.....	95
4.9. Agrupación de perfiles detectados en el total de cepas de ETEC de los 20 niños estudiados.....	97
5.0. CONCLUSIONES.....	107
6.0. BIBLIOGRAFÍA.....	108
7.0 APÉNDICE.....	111

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1. Introducción.

Escherichia coli enterotoxigénica (ETEC) es la causa más común de diarrea en países en desarrollo, causando anualmente 280-400 millones de episodios diarreicos en niños menores de 5 años y siendo responsable de un estimado de 300,000 a 500,000 muertes anuales en estos niños. También es una causa importante de la diarrea del viajero en las personas que viajan a estas regiones endémicas del mundo. El resultado de la enfermedad usualmente dura de 3-5 días y se puede presentar desde diarrea leve a una enfermedad severa parecida al cólera **(31)**. Las infecciones por ETEC son adquiridas principalmente por la ingesta de comida contaminada o agua. Para infectar, ETEC primero se establece en el epitelio del intestino delgado utilizando factores de colonización (CFs) y proteínas de superficie. Una vez establecido, ETEC expresa al menos una de las dos distintas clases de enterotoxinas, LT (termolábil) y/o ST (termoestable), que resulta en la producción de diarrea secretora **(26)**.

El cromosoma de *Escherichia coli* (*E. coli*) presenta siete operones ribosómicos (rrn) de similar tamaño, pero no idéntica secuencia de nucleótidos. Los operones contienen genes que codifican para tres RNAr (ribosomales) en el orden 16S-23S-5S, además de genes para RNAt (transferencia). Entre los genes 16S y 23S se encuentra el espacio intergénico de longitud variable (Intergenic Spacer Region, ISR). El tamaño de esta región puede variar considerablemente para las diferentes especies bacterianas, e incluso entre los diferentes operones que posee una bacteria dentro de su cromosoma. Esta variación en longitud es principalmente debido a la presencia de genes de RNAt. Cuatro operones (rrnB, C, E y G) contienen en el espacio intergénico 16S-23S un gen para RNAt^{Glu-2} (llamado ISR1) y los tres operones (rrnA, D, y H) restantes contienen genes para RNAt^{Ile-1} y RNAt^{Ala-1B} (ISR2) **(1)**. Debido al hecho de que muchas bacterias tienen múltiples copias de operones rrn, y algunos de ellos presentan variaciones específicas en el

espacio intergénico, se plantea la posibilidad de que la caracterización de estas variaciones ayude en la identificación y tipificación de estas cepas **(14)**.

En México, siendo un país endémico de enfermedades diarreicas, no se cuenta con suficientes estudios epidemiológicos que proporcionen una información valiosa en el análisis genético subsecuente de una población de cepas de ETEC estudiada. La PCR-RFLP (Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción del espacio intergénico 16S-23S RNAr amplificado por PCR) ha sido usado en el presente estudio para caracterizar a una colección de cepas de ETEC aisladas de heces, de un grupo de niños seguidos longitudinalmente durante sus dos primeros años de vida en una región rural de México.

El análisis de los perfiles de restricción de estas regiones intergénicas de las cepas de ETEC aisladas de un mismo niño, nos permitió relacionar a las cepas que presentaron un mismo perfil como “líneas clonales”, y que probablemente la colonización de estas cepas pudo persistir por un tiempo, incluso prolongado, en el intestino del niño, coincidiendo su posterior aislamiento con un cuadro diarreico o permaneciendo el niño asintomático.

Los resultados en general nos permitieron realizar una caracterización genética de la colección de cepas de ETEC de acuerdo a su perfil de restricción, identificando las cepas con perfiles predominantes que colonizaron mayormente a estos niños durante sus dos primeros años de vida. Así mismo, se identificó un perfil de restricción (R2) relacionado a cepas aisladas de diarrea y un perfil (R9) característico en cepas aisladas de niños en días donde no presentaron diarrea.

Por último, no se encontró una relación específica con el fenotipo y las características genéticas de las cepas, indicando que la expresión fenotípica de los factores asociados a virulencia (toxinas, CFAs, serotipo) puede cambiar con el tiempo.

1.2. Objetivos.

Objetivo general. Determinar la relación clonal de cepas de *Escherichia coli* enterotoxigénica aisladas de niños menores de dos años con periodos intermitentes de diarrea, con base en los perfiles de restricción obtenidos de su espacio intergénico 16S-23S RNAr.

Objetivos particulares.

- Estandarizar y obtener los perfiles de restricción de los productos de PCR de los espacios intergénicos 16S-23S RNAr de cada una de las cepas ETEC a estudiar, utilizando las endonucleasas *RsaI*, *TaqI* y *HinfI*.
- Analizar los perfiles de restricción obtenidos de estas regiones intergénicas de las cepas ETEC con respecto a su patrón de bandeo.
- Con base en el análisis de los perfiles de restricción, determinar los grupos clonales entre la colección de cepas de ETEC aisladas en los niños.
- Determinar si existe alguna asociación entre la presencia de diarrea y algún(os) perfil(es) de restricción identificado.

1.3. Hipótesis.

La técnica de PCR-RFLP para la tipificación de cepas clínicas por medio de la caracterización del espacio intergénico 16S-23S RNAr, permite diferenciar cepas bacterianas pertenecientes a una misma especie y determinar la relación genotípica que puede existir entre ellas. Por lo tanto, la obtención de resultados idénticos mediante esta técnica, puede agrupar a las cepas clínicas de ETEC en estudio, como bacterias que tienen un mismo origen clonal.

CAPITULO 2 GENERALIDADES

2.1. *Escherichia coli*.

Escherichia coli (*E. coli*) es uno de los organismos modelo mejor caracterizado. La cepa de referencia *E. coli* K-12 y sus derivados han sido clave en los avances en genética, bioquímica y biología molecular. *E. coli* tiene la característica de ser tanto un comensal intestinal generalizado de vertebrados como un patógeno versátil. Pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, genero *Escherichia*, especie *E. coli*. Es una bacteria Gram-negativa, no esporulada, anaerobia facultativa, habitante de los intestinos y las heces de los animales de sangre caliente y reptiles. En el tracto digestivo, cepas comensales de *E. coli* se encuentran en el intestino grueso, especialmente en el ciego y el colon. Residen en la capa de moco que cubre a las células epiteliales en todo el tracto y se liberan dentro del lumen intestinal con el componente de moco degradado excretándose en las heces **(28)**.

E. coli es una de las primeras especies de bacterias en colonizar el intestino durante la infancia, llegando a una muy alta densidad antes de la expansión de anaerobios. Las cepas iniciales pueden proceder de la microbiota materna fecal y también del personal maternal de enfermería. De hecho, el aumento de higiene en los hospitales y en las familias que viven en países industrializados ha reducido la colonización temprana por *E. coli* **(28)**.

2.1.1. Historia de *E. coli*.

E. coli fue descubierta por Theodor Escherich en 1885. En honor a él, la bacteria recibió su nombre. Escherich fue un pediatra alemán dedicado al estudio de los problemas que afectaban la salud infantil. En 1885 presentó la conferencia "La bacteria intestinal del recién nacido e infantes" a la Sociedad de Morfología y Fisiología, en la que describió la morfología y las propiedades de una población

bacteriana –denominada bacteria coli común– Que había observado en las secciones inferiores del intestino **(17)**.

La historia de *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) en México, una cepa patógena de *E. coli* (*ver más adelante*), inicia con la fundación del Hospital Infantil de México en 1943. A *E. coli* se le atribuía como comensal, perteneciente a la flora normal del intestino grueso. Las enfermedades diarreicas constituían una causa predominante de muerte en los niños lactantes y preescolares. Era desconcertante encontrar con mayor frecuencia a esta bacteria, y para esos años, *E. coli* era tradicionalmente calificada como inofensiva. Estas observaciones llevaron a investigar la presencia de anticuerpos aglutinantes de aislados de pacientes fallecidos.

El motivo del descubrimiento, fue una niña de dos meses de edad, que había ingresado al hospital para la corrección inicial del labio leporino complicado. Después de la intervención quirúrgica comenzó a padecer vómitos, otitis media supurada y bronconeumonía como padecimiento terminal. Se obtuvieron muestras de las heces y se aislaron solamente bacterias fermentadoras de lactosa, identificadas como *E. coli*. Además, se encontró aglutinación intensa y rápida de la cepa, exclusivamente con el suero aglutinante preparado con el antígeno XXXV, factor somático de *Salmonella adelaide*. Con las cepas aisladas se inmunizaron conejos, con el suero sanguíneo obtenido de los animales se practicaron reacciones de aglutinación contra el aislamiento de *E. coli* y contra una cepa de *S. adelaide*, obteniéndose siempre una reacción positiva. En acto continuo se realizaron ensayos de absorciones de aglutininas con el suero preparado con *S. adelaide* y con el de *E. coli*. Los resultados confirmaron que la cepa contenía un antígeno somático propio de una enterobacteria altamente patógena, que no había sido encontrado en ninguna *Escherichia*. En honor del fundador de la Escuela Mexicana de Pediatría (Federico Gómez) se le designó *Echerichia coli-Gómez*. Este descubrimiento científico fue comunicado en el Boletín Médico del Hospital Infantil de México, en 1946, sin embargo fue casi ignorado **(5)**.

En 1956 en Calcuta, investigadores inyectaron cepas vivas de *E. coli*, aisladas de niños y adultos con enfermedad parecida al cólera, dentro del asa ileal de conejos y encontraron grandes cantidades de líquido acumulado en las asas, similar a lo observado con *Vibrio cholerae*. Sin embargo, no se probó si se producía una enterotoxina. En 1968, se reportaron estudios en Calcuta, de adultos y niños con una enfermedad parecida al cólera, obteniendo aislamientos de *E. coli*, de heces y del intestino delgado. En estos pacientes se comprobó que tenían respuesta antitoxina a la enterotoxina termolábil producida por estos microorganismos. En estudios con animales demostraron que las cepas de *E. coli* son responsables de enfermedades diarreicas en varias especies, como: cerdos, terneros y conejos. Estudios en estos animales, se encontró que estos organismos producen toxinas y factores de colonización específicos. Todos estos resultados también fueron pronto confirmados con voluntarios humanos que bebieron inóculos de la bacteria. Posteriormente otros estudios realizados en Dhakota y Bangladesh, mostraron que ETEC es la bacteria más frecuente encontrada en niños con diarrea **(23)**.

2.1.2. Aislamiento.

E. coli puede ser recuperada fácilmente de muestras clínicas en medios generales o selectivos, incubándose a 37°C en condiciones aerobias. Los aislamientos de *E. coli* de heces, suele ser recuperado de agar MacConkey o agar eosina azul de metileno, que son medios selectivos para el grupo de enterobacterias y permite diferenciar a los microorganismos entéricos con base en su morfología **(21)**.

2.1.3. Bioquímicas.

Las cepas de *E. coli* son seleccionadas de placas de agar MacConkey para fines epidemiológicos o clínicos. La identificación presuntiva de *E. coli* en el agar MacConkey se basa en la fermentación de lactosa. Sin embargo, esta identificación debe de hacerse con cautela, ya que hay alrededor del 10% de las cepas de *E. coli* que son lactosa negativo. La prueba del indol, es la prueba bioquímica clave para la identificación de *E. coli* pues la bacteria es positiva en el 99% de los casos **(21)**.

2.2. Cepas patógenas de *E. coli*.

E. coli comensal permanece confinada al lumen intestinal sin causar daño; sin embargo, en los pacientes inmunosuprimidos o con una patología debilitante, o bien, cuando la bacteria cambia de nicho ecológico mas allá de las barreras gastrointestinales, las cepas comensales de *E. coli* pueden actuar como patógenos oportunistas. Las infecciones por *E. coli* patógena puede limitarse a las superficie de la mucosa intestinal y del aparato urinario. En general, *E. coli* se asocia a tres síndromes clínicos: (i) infección del tracto urinario, (ii) sepsis / meningitis, e (iii) infecciones entéricas /enfermedades diarreicas **(21)**.

Hay seis tipos reconocidos de *E. coli* patogénica que puede provocar diarrea en los seres humanos infectados, que emplean diferentes mecanismos de acción: *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enterohemorrágica o productora de toxina shiga (EHEC / STEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* adherente difusa (DAEC) y *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) **(30)**.

2.2.1. *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC).

La diarrea infecciosa aguda es la segunda causa más común de muerte en niños que viven en países en desarrollo, solo superado por las infecciones respiratorias agudas. Los agentes etiológicos más importantes son ETEC, rotavirus, *Vibrio cholerae* y *Shigella* sp. Se estima que estos enteropatógenos son responsables de 1.5 millones de muertes por año **(23)**. Las enfermedades diarreicas causan importantes niveles de morbilidad y mortalidad infantil en muchos países, considerándose como un problema de salud público mayor. Su transmisión y frecuencia se relaciona con la falta de higiene y la pobreza, así como la desnutrición y las malas condiciones sanitarias **(6, 20)**.

La diarrea en humanos por ETEC se presenta de inicio repentino, es de tipo secretora que puede llevar a la deshidratación debido a la pérdida de líquido y electrolitos, aunque generalmente se autolimita **(30)**. Factores de virulencia específicos como enterotoxinas y factores de colonización (CFs) diferencian a

ETEC de los otros tipos de *E. coli*. ETEC tiene la habilidad de colonizar el intestino delgado a través de sus CFs y de sus proteínas de superficie coli (CS), donde produce y libera al menos una de sus dos enterotoxinas, la enterotoxina termolábil (LT) y/o la enterotoxina termoestable (ST), que forman los principales factores de virulencia por los cuales ETEC puede causar diarrea acuosa **(11, 4)**.

2.2.2. Serotipificación.

La serotipificación fue desarrollada por Kauffman en 1940, y la tarea fue continuada por Orskov. Basándose en la combinación de 173 antígenos O (somáticos) cada uno de los cuales define un serogrupo, 56 antígenos H (flagelares) y 80 antígenos K (capsulares) **(28)**.

Una combinación específica de antígenos O y H define el "serotipo" de un aislado. Un número extremadamente alto de serotipos han sido descritos. Serogrupos específicos de *E. coli* puede estar asociados con ciertos síndromes clínicos, aunque los antígenos (O, H y K) no son responsables de la virulencia, sino más bien son utilizados para la clasificación serológica. Los serotipos y serogrupos sirven también, como marcadores cromosómicos fácilmente identificables que se correlacionan con clonas específicas de virulencia **(21)**.

La serotipificación de las cepas de ETEC ha mostrado que ciertos serotipos se presentan con mayor frecuencia en ciertas áreas geográficas. Las toxinas LT y ST; y los CFs son codificados por genes presentes en plásmidos. La pérdida de estos elementos móviles con el cambio fenotípico de la cepa no afecta en general la composición genética del cromosoma bacteriano, permitiendo conservar la relación genética de las cepas y/o su relación clonal. La serotipificación puede ser acoplada a la tipificación genética en estudios epidemiológicos que permiten agrupar cepas patogénicas de ETEC. Sin embargo, la gran variación en los serogrupos O y H de las cepas ETEC hace que la serotipificación *per se* no sea adecuada para la identificación de las cepas ETEC. Además, los perfiles de serotipo de ETEC pueden cambiar con el tiempo **(23)**.

2.2.3. Manifestaciones clínicas de infecciones por ETEC.

Las infecciones producidas por cepas de ETEC en humanos, característicamente causan diarrea acuosa y deshidratación. En niños muy pequeños, la enfermedad puede conducir a la muerte si no son adecuadamente tratados con terapia de rehidratación, mientras que en niños mayores y adultos generalmente resultan en una incapacidad temporal **(25)**.

La enfermedad es generalmente brusca en el comienzo con un corto periodo de incubación (14 a 50h). La diarrea producida por ETEC es de tipo secretora: la enfermedad comienza con un inicio repentino de heces acuosas (sin sangre o células inflamatorias) y a menudo vómitos, que conducen a la deshidratación debido a la pérdida de líquidos y electrolitos (sodio, potasio, cloruro y bicarbonato) en las heces. La pérdida de líquidos progresivamente resulta en boca seca, rápido pulso, letargo, disminución de la turgencia de la piel, disminución de la presión arterial, calambres musculares y eventualmente choque en la más grave forma. La diarrea debido a ETEC puede ser leve, breve (3-5 días) y autolimitada o puede resultar en severas purgas, similar a la observada en la infección por *V. cholerae*. Los pacientes generalmente no presentan fiebre. Si la hidratación se mantiene, los pacientes sobreviven, y sin dejar secuela. Con el tratamiento adecuado, la mortalidad es muy baja (1%) **(20, 23)**.

La fisiopatología de la enfermedad causada por ETEC es esencialmente el mismo que el causado por *V. cholerae* y el cuadro clínico es idéntico, especialmente en los adultos. La necesidad de una dosis infecciosa grande, la proliferación de las bacterias en el intestino delgado a través de factores de colonización y la producción de enterotoxinas y la diarrea acuosa tipo secretora que produce la deshidratación clínica son comparables en ambas enfermedades **(23)**.

La administración de antibióticos a los que cepas de ETEC son susceptibles, ha demostrado la disminución en la duración de la diarrea y la intensidad de excreción de ETEC. Sin embargo, estos agentes efectivos pueden no estar disponibles en las zonas donde la incidencia es alta; además, la resistencia de

cepas de ETEC a antibióticos es un problema emergente. Debe tenerse en mente, por tanto, que la piedra angular del manejo de la infección por ETEC es mantener el estado normal de hidratación **(21)**.

El subsalicilato de bismuto o loperamida es efectivo en disminuir la severidad de la diarrea, este último no debe administrarse en pacientes con fiebre o disentería a menos que los antibióticos también sean dados. En la actualidad, las fluoroquinolonas (por ejemplo, ciprofloxacina, norfloxacina y ofloxacina) son los agentes más comúnmente recomendados **(21)**.

2.2.4. Epidemiología.

Las cepas de ETEC se asocian a dos síndromes clínicos principales: a) diarrea entre los niños menores de 5 años y b) la diarrea del viajero en los países en desarrollo. El patrón epidemiológico de la enfermedad de ETEC está determinada en gran parte por una serie de factores: (i) inmunidad de la mucosa a la infección por ETEC desarrollándose en los individuos expuestos, (ii) incluso las personas inmunes asintomáticos pueden arrojar un gran número de microorganismos ETEC virulentos en las heces; y (iii) la infección requiere relativamente una dosis infecciosa alta **(21)**.

Las investigaciones epidemiológicas han implicado la contaminación de alimentos y el agua como los vehículos más comunes de infección por ETEC **(21)**. En México, las enfermedades diarreicas ocupan uno de los primeros lugares en la morbilidad de niños menores de cinco años, generando el 7.4% en la demanda de consulta en los servicios de salud y el 10% de las hospitalizaciones pediátricas. En México, esta bacteria se ha aislado de pacientes pediátricos hasta en un 70% de los casos y su desarrollo se relaciona con zonas donde la higiene es precaria; asimismo, en el ámbito mundial es la categoría de mayor aislamiento **(6)**.

Un estudio realizado por **Chávez B. E., et al (6)**, en el Estado de Puebla, Méx., mostró que ETEC se encontró en un 75% de cepas aisladas de aire y agua, en un 73.52% de las cepas aisladas en niños, en un 61.11% de las cepas obtenidas de alimentos y en un 42.85% de las cepas aisladas de adultos. En otro estudio

realizado por **Cortes O. L., et al (8)**, de un brote de diarrea ocasionado por el desbordamiento de un canal de aguas negras en Chalco, Méx., se muestreó a la población del lugar que presento diarrea, obteniéndose 1550 hisopos rectales, donde se aisló ETEC en un 62%.

Un estudio realizado por **Cravioto A., et al (9)** de un cohorte de 56 niños del Edo. de Morelos, Méx., nacidos entre 15 marzo de 1982 y 14 marzo de 1983 mostró que la incidencia y posible etiología de la diarrea aguda estuvo asociada en el 75% de casos a cepas de *E. coli* enteropatógena (EPEC) y *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), junto con rotavirus y posiblemente *Shigella*. Pero contrario a lo que se esperaba, se encontró una alta frecuencia de microorganismos patógenos colonizando el intestino de los niños, que no presentaban diarrea.

En otro estudio realizado por **Cravioto A., et al (10)**, en la misma comunidad del Edo. de Morelos, Méx., con un cohorte de 75 infantes nacidos entre agosto de 1985 y enero de 1986, seguidos longitudinalmente durante sus dos primeros años de vida, se analizaron muestras de heces de cada niño tomadas con un intervalo de 15 días y cada vez que el niño presentó diarrea, durante el tiempo que duro el estudio. Cada muestra de heces fue sembrada en diferentes medios de cultivo selectivos y de enriquecimiento para el crecimiento de microorganismos. El estudio mostró que la diarrea se detectó en el 82% en los niños con aislamientos iniciales de EHEC (*Escherichia coli* enterohemorrágica), en 64% de los niños con EPEC o *Shigella*. Sin embargo la incidencia del aislamiento para EHEC y *Shigella* en los niños fue baja. El riesgo de diarrea asociada con la inicial colonización con otros enteropatógenos como rotavirus, *Campylobacter* y ETEC fue baja. ETEC y EPEC constituyeron los dos más comunes enteropatógenos encontrados en estos niños. Así mismo, se observó la relación de una posible protección de la colonización inicial contra infecciones subsecuentes por el mismo microorganismo.

Aunque las infecciones que ocurren por cepas de ETEC son más frecuentemente en infantes, también ETEC es el agente etiológico de la diarrea del viajero, entre los adultos provenientes de países desarrollados que visitan países en desarrollo,

donde la infección por ETEC es endémica. Diferentes estudios indican que del 20 al 60% de los viajeros experimentan diarrea; y ETEC es la responsable en el 20 al 40% de los casos **(21)**.

Las características de los tipos de toxinas y CFs presentes en las cepas de ETEC aisladas de niños pequeños varían entre los países en los que ETEC es endémica. Después de los 5 años de edad la incidencia de infecciones por ETEC disminuye, aumentando nuevamente en mayores de 15 años, siendo aproximadamente responsable de la enfermedad en el 25% de los adultos **(23)**.

2.3. Diagnóstico de ETEC.

2.3.1. Ensayos de laboratorio.

Los ensayos fisiológicos, como el modelo del Asa ligada de conejo para la toxina LT y el ensayo del ratón lactante para la toxina ST se utilizaron inicialmente como estándar de oro antes de que otros simples ensayos pudieran ser aplicados. En 1974, el ensayo para la detección de la toxina LT, fue mediante la acción directa de la toxina en cultivos de dos líneas celulares: Y1 (células suprarrenales) y células CHO (de ovario de hámster chino), donde se producía una respuesta fisiológica que era detectada por cambios morfológicos en ambas líneas de células. Estos cambios fueron específicos para la toxina LT y podría ser neutralizada por la antitoxina. Ambos ensayos de líneas celulares fueron utilizados ampliamente hasta el desarrollo tecnológico del ensayo ELISA en 1977, y posteriormente se utilizó también para la toxina ST **(23)**.

En 1980, se iniciaron métodos usando técnicas de diagnóstico molecular, como la detección de los genes que codifican para las enterotoxinas, mediante el uso de sondas marcadas con P^{32} , estas sondas son secuencias de nucleótidos derivadas de los genes específicos que codifican para cada una de las toxinas LT y ST presentes en plásmidos. Este método es altamente específico y sensible que permite ser empleado en cepas aisladas de heces y muestras ambientales **(23)**.

En 1993, la técnica de PCR fue utilizada por primera vez en el diagnóstico de ETEC, utilizando iniciadores específicos para la amplificación de los genes de ambas toxinas **(23)**.

Otros factores de virulencia detectados por métodos inmunológicos y moleculares son los factores de colonización (CFs) de cepas de ETEC, los cuales se han caracterizado con la utilización de ensayos de dot blot contra diferentes anticuerpos monoclonales anti-CF, sondas de DNA y por PCR **(23)**.

Un punto a tener en cuenta es que las cepas de ETEC pueden presentar cambios fenotípicos en la expresión de sus CFs o de sus enterotoxinas, debido a que estos factores de virulencia son codificados en genes que están presentes en plásmidos y pueden perderse fácilmente o ser silenciados debido a la pérdida de genes reguladores, sobre todo en cepas que han sido almacenadas por tiempo prolongado. Sin embargo, el uso de sondas de DNA tiene la capacidad de detectar la presencia de estos genes en este tipo de cepas **(23)**.

2.4. Mecanismos moleculares de virulencia de ETEC (Patogénesis).

2.4.1. Adhesión e Invasión.

Los CFs son estructuras proteicas de superficie que permite a las bacterias unirse a la mucosa intestinal. La pérdida de los CFs de las bacterias lleva a la incapacidad de colonizar y causar enfermedad. Mientras los CFs son claramente esenciales para iniciar la enfermedad, hay otros estudios que muestran la participación de otros genes como, *tia* y *tib*, involucrados en la patogénesis de las bacterias, promoviendo la interacción y/o invasión de la bacteria en las células hospederas, y en las interacciones célula-célula que participan en la agregación bacteriana y en la formación en biopelículas. Es posible que los CFs sean responsables de iniciar el contacto "long-range" (largo alcance) de la bacteria con la célula huésped, después los productos de los genes *tia* y *tib* aumentan la intimidad y fuerza de interacción entre la bacteria y la membrana de la celular huésped **(30)**.

2.4.2. Factores de colonización (CFs).

Un grupo heterogéneo de estructuras superficiales proteínicas denominados factores de colonización (CFs) fueron de los primeros factores de virulencia identificados en ETEC y siguen siendo importantes objetivos para el desarrollo de vacunas. Por lo menos 25 diferentes CFs se han descrito hasta la fecha y la mayoría están codificados en plásmidos **(11)**.

Los tipos de CFs son subdivididos por su antigenicidad, peso molecular, secuencia de sus aminoácidos en la región amino-terminal de la subunidad mayor y también con base en la morfología estructural de sus fimbrias. Una nueva nomenclatura ha sido introducida para la clasificación de CFs asociados a cepas en humanos, llamados, Factores de Colonización Antigénicos (CFAs), designándolos como antígenos de superficie de coli (CS) y además acompañándolos de un número que corresponde al orden cronológico de identificación, con la excepción de CFA/I.

Los grupos CFA/I, CFA/II y CFA/IV son los CFAs más prevalentemente identificados en ETEC en estudios epidemiológicos a nivel mundial. CFA/I es una estructura fimbrial uniforme de varilla rígida compuesta de un solo tipo antigénico de fimbria. CFA/II consiste de CS3 solo o en combinación con CS1 o CS2. CFA/IV consiste de CS6 solo o en combinación con CS4 y CS5 **(30)**.

Los CFs son antigénicamente y estructuralmente diversos. En general, estos CFs son codificados en un operón de cuatro genes: un gen codifica para un chaperón periplásmico, otro para una subunidad mayor fimbrial, otro para una proteína de membrana externa usher y uno más para una subunidad menor. La subunidad menor está localizada en la punta de la fimbria, con la mitad de la región N-terminal de la proteína responsable de la unión a la célula huésped. Los receptores para los CFs no han sido completamente caracterizados pero algunos se conocen por ser glicoconjugados en la membrana de las células eucariotas. Sin embargo, hay probablemente una gran diversidad en número y tipos de receptor para estas adhesinas **(11, 30)**.

Curiosamente, mientras que los factores de colonización desempeñan sin duda un papel importante en la patogénesis de las enfermedades humanas, muchas cepas no producen un CF reconocible **(11)**.

2.4.3. *E. coli* common pilus (ECP).

Tanto las cepas comensales, como las cepas de *E. coli* patógenas producen ECP. Este pilus no es relacionado con ninguno de los CFs conocidos de ETEC. En un estudio reciente en ETEC, demostraron que aproximadamente el 80% de las cepas lleva el gen *ecpA* que codifica para la subunidad principal estructural de este pilus. Análisis fenotípicos mostraron que el 58% de las cepas producen ECP independientemente de la presencia o ausencia de los CFs, sugiriendo un importante papel por ECP en la biología de ETEC, particularmente en cepas CF-negativas, y en las infecciones en humanos **(4)**.

2.4.4. TibA.

Es una adhesina no-CF la cual es codificada por *tib*, un gen cromosomal descrito para ETEC. Este gen está presente en un operón compuesto por 4 genes *tibDBCA*. TibA, un miembro de la familia de autotransportadores, es una proteína (104KDa) de membrana externa que es glicosilada mediante la acción de TibC. Solo la forma glicosilada de TibA dirige a la bacteria a la unión con el receptor específico en las células epiteliales. Además de la adherencia a células animales, TibA promueve agregación de la población bacteriana y la formación de biopelículas, independientemente de que si ésta está glicosilada o no **(30 y 20)**.

2.4.5. Tia.

Tia es una proteína de membrana externa, codificada cromosomalmente por el gen *tia*. En cepas de ETEC H10407, el gen *tia* está presente en una isla de patogenicidad (46-kb) con un contenido de GC más bajo que el resto del genoma. Tia es traducida con un péptido señal clásico que es cortado en la región N-terminal para producir una proteína de membrana externa de 25kDa. Investigaciones revelaron que Tia se une a proteoglicanos heparin sulfato, que son

abundantes glicosaminoglicanos localizados en la superficie de células eucariontes. Tia actúa como una invasina así como una adhesina jugando un papel importante en la patogénesis de ETEC (11, 30).

2.4.6. Efectos citotóxicos.

Una vez establecido el contacto cercano con la célula huésped, las cepas de ETEC puede elaborar una o más enterotoxinas (ST y/o LT), que inducen secreción de fluido y/o inhibición de la absorción en el intestino delgado. Estos efectos tóxicos son característicos de la infección por ETEC y conducen a la manifestación de diarrea secretora. Sin embargo, además de estas clásicas toxinas, se han descrito otras toxinas que han sido implicadas en la patogénesis de ETEC, a saber: la toxina **EAST1** que comparte varias similitudes con la región funcional de la toxina STa demostrando que existe un 50% de identidad entre ambas toxinas, además que activa la producción de GMPc, la toxina **EatA**, un autotransportador secundario serina-proteasa de ETEC, que causa daño a la superficie celular epitelial, acelerando la virulencia de ETEC y por último **ClyA**, una citotoxina formadora de poros en la membrana de células eucariotas. Sin embargo, su total entendimiento aún no ha sido establecido (30).

2.4.7. Enterotoxina Termoestable (ST).

Hay dos clases de toxinas termoestables (STs) que difieren en estructura y mecanismo de acción: la soluble al metanol, resistente a proteasas STa (o STI) y la insoluble al metanol, sensible a proteasas STb (o STII). Genes para ambas clases de toxinas son encontradas predominantemente en plásmidos (21, 30).

La toxina STa ha sido clasificada de acuerdo al hospedero del cual fue aislada la cepa de ETEC, existiendo dos variantes, STh (humana) y STp (porcina), aunque variantes de STp ya se han aislado también de cepas de origen humano. Ambos tipos son sintetizados como un pre-pro-péptido de 72 aminoácidos que es procesado durante la exportación para producir la toxina activa madura de 18 o 19 aminoácidos ricos en cisteína, de un tamaño de 2kDa. Una secuencia es removida durante la translocación a través de la membrana interna por Sec dependiente de

un péptido señal, liberando el pro-péptido dentro del espacio periplásmico, donde DsbA, una proteína codificada cromosomalmente, cataliza la formación de tres puentes disulfuro en el pro-péptido antes de que éste sea exportado a través de la membrana externa por medio de la proteína transportadora TolC. La pro-región es removida para liberar la pequeña toxina madura por difusión a través de la membrana externa. La formación de los puentes disulfuro en la maduración de la porción de esta toxina le confiere termo estabilidad y solo 13 aminoácidos son suficientes para el efecto biológico **(30, 11)**.

La toxina STa se une a el receptor guanilato ciclasa C (GC-C), una proteína glicosilada localizada en el borde de cepillo del intestino delgado, la activación del dominio de la guanilato ciclasa, resulta en un incremento en los niveles de GMPc intracelular. Este incremento a su vez activa a la proteína cinasa II dependiente de GMPc que conduce a la fosforilación del regulador transmembranal de fibrosis quística (CFTR) del canal de cloruro, conduciendo a la secreción de Cl⁻ e inhibición de absorción de Na⁺. El resultado de estas complejas interacciones es la acumulación de fluido neto en el lumen intestinal y diarrea secretora **(11, 30)**.

La toxina STb principalmente está asociada a cepas de ETEC de porcinos pero también ha sido encontrado en aislados humanos. El gen que codifica para STb, es *estII* que presenta un ORF que codifica para 71 aminoácido, esta proteína presenta una región péptido señal de 23 residuos que son removidos durante la translocación a través de la membrana interna dependiente de Sec, al pasar al espacio periplásmico la proteína es liberada como una toxina de 48-aminoácido y de un tamaño de 5.1KDa. Una vez en el periplasma, la proteína DsbA interviene para formar cuatro puentes disulfuro en STb antes de ser exportada al medio extracelular a través de la proteína TolC **(11, 30)**.

La toxina STb se une a sulfatidos, un ácido glicoesfingolípido ampliamente distribuido en las membranas de las células epiteliales del intestino. La secreción de fluido ocurre después de la internalización de la toxina vía activación de una proteína reguladora de unión a GTP sensible a la toxina pertusis. Esto resulta en una afluencia de calcio a través de un receptor dependiente de canales de calcio,

activando a la proteína cinasa II dependiente de calmodulina, que abre un canal iónico intestinal y puede también activar a la proteína cinasa C y consecuentemente a CFTR. Se cree que el incremento en los niveles de calcio regulan las fosfolipasas (A2 y C) que liberan ácido araquidónico de los fosfolípidos de membrana, conduciendo a la formación de prostaglandinas E2 (PGE₂) y 5-hidroxitriptamina (5-HT), que inducen el transporte de agua y electrolitos fuera de las células intestinales, que tiene como resultado diarrea secretora **(30)**.

2.4.8. Enterotoxina Termolábil (LT).

La enterotoxina LT está estrechamente relacionada con la toxina del cólera (CT) expresada por *Vibrio cholerae* **(30)**. Esta holotoxina que tiene una conformación AB₅ es codificada por los genes *eltAB* que residen en plásmidos. Esta toxina de 86 kDa está compuesta de un anillo de cinco subunidades B de un tamaño de 11.6 kDa cada subunidad, asociadas con una subunidad A de 28 kDa. La subunidad A consiste de dos distintos dominios estructurales vinculados por un puente disulfuro; el dominio A1 posee actividad ADP ribosilasa, mientras que el fragmento A2 media la interacción con las subunidades B para formar el complejo AB₅ **(30, 11)**.

Un aparato de secreción Tipo II funcional codificado por 11 genes (*gspC-M*) presentes en el cromosoma de la bacteria, fue recientemente detectado en cepas de ETEC y se demostró que se requiere para la secreción de LT a través de la membrana externa. El proceso de exportación de proteínas en bacterias gram-negativas es un evento de dos pasos; el primero, consiste de la translocación de las subunidades a través de la membrana interna, por un péptido N-terminal de señalización, vía la proteína Sec. El segundo paso, una vez en el periplasma, las subunidades son rápidamente ensambladas en una holotoxina AB₅ madura en un proceso que es dependiente de DsbA. La secreción a través de la membrana externa se basa en la translocación de la holotoxina AB₅ madura por el aparato Tipo II a través de la membrana externa. Sin embargo, la secreción de LT parece que tiene un nivel de complejidad adicional, se ha identificado que un operón de cuatro genes localizado en una isla de patogenicidad es requerido para la

secreción de LT. La delección de *leoA*, un gen dentro del operón, suprime la secreción de la toxina LT. Se ha observado que una cepa que carece de este operón acumula la toxina LT en el periplasma de la bacteria. Sin embargo la exacta contribución que juegan estos genes del operón en la secreción de la toxina LT sigue siendo un enigma **(30, 11)**.

El proceso de liberación de la toxina LT en los receptores gangliósidos sobre la superficie de las células intestinales no está muy claro. Después de la secreción a través de la membrana externa, la toxina se une por su subunidad B a los LPS (lipopolisacáridos) de la superficie extracelular de la bacteria. La mayoría de la actividad de la toxina LT en el ambiente extracelular está asociada con vesículas de membrana externa, uniéndose las subunidades B a los gangliósidos de las células del hospedero **(30, 11)**.

El tipo de receptor en la superficie celular a la que la toxina LT se une depende de la especificidad de la subunidad B. En este contexto, las LTs pueden ser divididas en dos grupos: LT-I y LT-II. La toxina LT-I es la más estrechamente relacionada con la toxina de cólera (CT) con 75% de similitud en la subunidad A y 77% en la subunidad B. Dos distintas enterotoxinas de LT-II: LT-IIa y LT-IIb se han identificado. La subunidad A de LT-IIa y LT-IIb comparte similitud entre ellas y con la subunidad A de LT-I y de la toxina CT, mientras que las subunidades B de LT-IIa y LT-IIb no son homologas significativamente a las subunidades B de la toxina CT y LT-I. Estas diferencias confieren a la subunidad B la habilidad para reconocer diferentes receptores como los gangliósidos GM1 presentes en la mayoría de las células **(30, 11)**.

Una vez que las subunidades B se unen a los receptores de la membrana, la subunidad A entra a la célula huésped mediante las subunidades B. El puente disulfuro conectado al dominio de la subunidad A permanece sin reducción hasta que entran en contacto la subunidad B con la superficie celular, donde la subunidad A es reducida a dos fragmentos A1 y A2, permitiendo a la subunidad A1 entrar a la célula. Para la plena toxicidad, la subunidad A debe ser cortada proteolíticamente para separar los dos dominios. Una vez dentro de la célula, la

subunidad A1 cataliza la ADP ribosilación de la proteína $G_{S\alpha}$. Un componente de la proteína (α -GTP) activa la adenilato ciclasa, que a su vez conduce a la activación permanente del complejo adenilato ciclasa y subsecuentemente a la elevación de niveles de AMPc intracelulares. Esta a su vez conduce a la activación de la proteína cinasa A dependiente de AMPc y a la fosforilación de canales iónicos, como CFTR, para estimular la secreción de Cl^- y la reducción de la absorción de Na^+ . Además, la subunidad A de la toxina ha sido implicada en la estimulación del metabolismo de ácido araquidónico conduciendo a la producción de PGE_2 y 5-HT, y a su vez la estimulación de secreción intestinal, resultando en diarrea acuosa **(30, 11)**.

2.5. Operones RNA ribosomales de *E. coli*.

La mayoría de los procariontes conocidos tienen genes que codifican para los diferentes RNAs, que participan en el ensamble del ribosoma. Los genes RNAr (ribosomales) (16S, 23S y 5S) están organizados dentro de un operón como la unidad funcional de transcripción. El número de estos operones RNA ribosomales (rrn) en una especie dada depende en gran medida en su tasa de crecimiento y puede ser de 1 a 11 **(14)**.

En *E. coli* los rrn pertenecen a una familia multigénica, su cromosoma presenta siete operones de similar, pero no idéntica secuencia de nucleótidos. Son genes altamente expresados que representan más de la mitad de la actividad transcripcional de *E. coli* en altas tasas de crecimiento **(1)**.

En la naturaleza, células de *E. coli* experimentan constantemente cambios ambientales. *E. coli* en su hospedero, se ve expuesto a una variedad de condiciones nutricionales, mientras que en el agua encuentran extremas necesidades. Es en este contexto de continuos cambios ambientales las bacterias han evolucionado los mecanismos de control del RNAr, que está muy integrado con requerimientos de crecimiento de la célula bacteriana **(12)**.

Experimentos con *E. coli* donde han sido inactivado múltiples operones rrn, mostraron que tasas de crecimiento casi óptimas son obtenidas en un medio

complejo, con solo cinco operones *rrn* intactos. Sin embargo, los siete operones *rrn* son necesarios para una rápida adaptación en determinados nutrientes y cambios de temperatura (7).

2.5.1. Estructura de los siete operones de *E. coli* y su espacio intergénico 16S-23S (ISR).

El RNAr de *Escherichia coli* es sintetizado a partir de 7 operones no contiguos (*rrnB*, *C*, *E*, *G*, *A*, *D* y *H*) en el cromosoma, que son distribuidos asimétricamente sobre el origen de replicación (*oriC*) (figura 1). Tres especies de RNAr son hechas, y el orden de sus genes dentro de los operones *rrn* es: 16S RNA- 23S RNA- y 5S RNA (12).

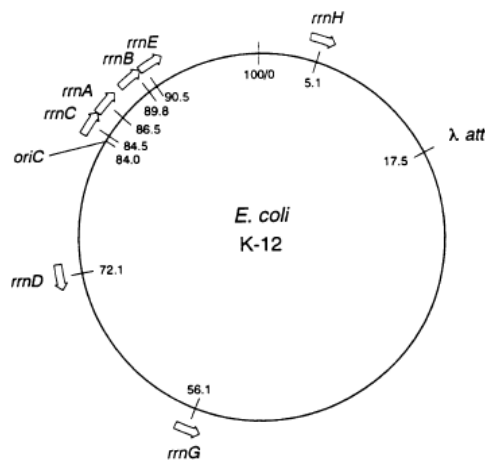


Figura 1. Representación del reloj cromosomal de *E. coli*. Se muestra la localización en minutos de los 7 operones *rrn* de *E. coli* K-12.

Los genes RNAr son esenciales para la supervivencia de todos los organismos y son altamente conservados en las bacterias y otros reinos. En consecuencia, la caracterización del gen 16S RNAr está ahora bien establecida como un método estándar para la identificación de especies, géneros y familias de bacterias. Por el contrario, relativamente pocas secuencias completas del gen 23S RNAr han sido reportadas, en comparación con secuencias del gen 16S RNAr. Esto se debe en parte, al tamaño del gen 23S que es mayor al 16S. Así, el gen 23S al igual que el gen 5S no ha sido utilizado ampliamente con fines filogenéticos (16).

Entre los genes 16S y 23S, y entre los genes 23S y 5S se encuentran los espacios intergénicos de longitud variable (ISR) (**figura 2**). Estas regiones pueden variar considerablemente en secuencia de nucleótidos para las diferentes especies, e incluso entre los diferentes operones que posee un mismo microorganismo. Pero las secuencias son específicas y conservadas para cada operón dentro de una misma especie. Por lo tanto se plantea la posibilidad de que la caracterización de esta región entre las cepas, especies y géneros pueda ser utilizada para propósitos de identificación y tipificación (**14**).

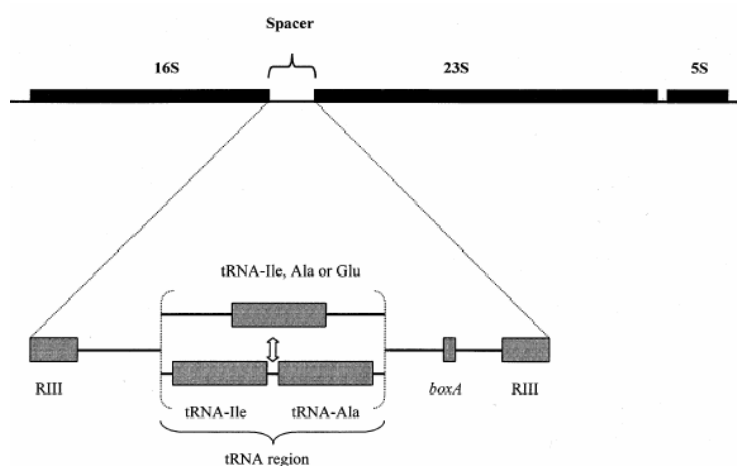


Figura 2. Representación esquemática del espacio intergénico 16S-23S y sus regiones funcionales (**14**).

La variación en la longitud de los espacios intergénicos es principalmente debida a la presencia de varias unidades funcionales dentro de ellas, tales como genes de RNAt. Los operones *rrnB*, -C, -E y -G de *E. coli* tienen un gen para RNAt^{Glu-2} en el espacio intergénico 16S-23S (llamado ISR1), mientras que los operones *rrnA*, -D y -H tiene genes para RNAt^{Ile-1} y ARNt^{Ala-1B} (ISR2) (**7,1**). Además, el espacio intergénico 16S-23S de los operones *rrnB* y *rrnG* contienen una secuencia de 106-nucleótidos que forma una estructura secundaria potencial llamada "ribosomal spacer loop" (*r/s*). Algunos operones *rrn* también difieren en presentar genes en el extremo 3' del gen 5S. El operón *rrnC* tiene los genes RNAt^{Asp} y RNAt^{Trp}. El operón *rrnD* tiene un gen RNAt^{Thr-1}, y el operón *rrnH* tiene uno para RNAt^{Asp-1}. El operón *rrnD* es el único que posee dos genes 5S RNAr (**figura 3**) (**7**).

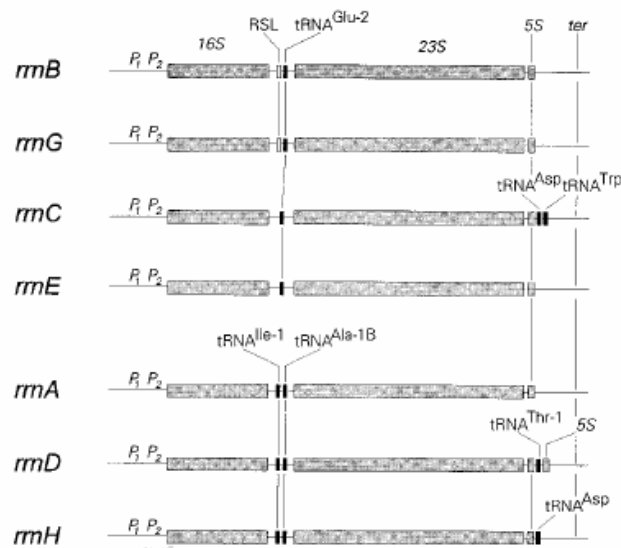


Figura 3. Estructura de los 7 operones *rrn* de *E. coli*. P1 y P2 son los promotores en tándem del operón. Las cajas sombreadas representan los genes 16S, 23S y 5S. Los RNAs están representados por las cajas en negritas y las cajas pequeñas vacías entre el espacio intergénico 16S-23S de *rrnB* y *rrnG* indican el ribosomal spacer loop (rsl). El complejo de la región terminadora (*ter*) al final de cada operón consiste de un terminador independiente de rho seguido por un terminador dependiente rho (7).

Otras unidades funcionales entre el espacio intergénico comprenden secuencias para el reconocimiento de enzimas tales como la ribonucleasa III, involucrada en el proceso de empalme para obtener el ribosoma maduro; la secuencia *boxA* involucrada en el reconocimiento enzimático que participa con un papel antiterminador durante la transcripción. A pesar de que son de gran importancia para el correcto desempeño del operón, no son universalmente conservadas entre todos los microorganismos, lo cual es especialmente cierto para la ribonucleasa III y *boxA*, que solo son similares entre los microorganismos estrechamente relacionados. Estas unidades funcionales dentro del espacio intergénico usualmente no suman más del 50% del tamaño completo. El resto de estas regiones consiste de secuencias no esenciales sometidas a eventos de inserción-delección, tal como la secuencia *rsl* en algunos operones de *E. coli*, cuya ausencia en cepas mutantes no parece afectar su crecimiento.

Sin embargo, dentro de especies discretas o unidades taxonómicas operacionales de cepas estrechamente relacionadas, el espacio intergénico puede ser muy conservado con respecto a la alineación de nucleótidos. La razón de estas secuencias conservadas entre cepas estrechamente relacionadas es probablemente debido a su localización entre dos genes altamente conservados

(16S y 23S). Por otra parte, en el espacio intergénico de cepas estrechamente relacionadas puede haber nucleótidos no-alineables reflejando frecuentes eventos de inserción-delección. Estas diferencias pueden ser usadas para la caracterización de cepas y pueden ser extremadamente útiles para tipificación en epidemiología o biotecnología **(14)**.

Diferencias de nucleótidos individuales de las copias genómicas del gen 16S han sido detectadas. Sin embargo, aún más variación ha sido detectada en el espacio intergénico 16S-23S RNAr entre múltiples copias genómicas. Esta variación ha sido usada para la identificación de bacterias y estudios de evolución **(15)**.

2.5.2. Diseño de iniciadores.

Cualquier caracterización dirigida por PCR para la amplificación de todas las copias de los espacios intergénicos 16S-23S RNAr de una o más bacterias, es totalmente dependiente del diseño de iniciadores adecuados y altamente específicos derivados de las regiones conservadas que flanquean los genes 16S y 23S RNAr **(16)**.

El polimorfismo en longitud y secuencia presente en el producto de PCR obtenido de cada una de estas regiones puede ser usado en el reconocimiento de género y especie. El producto de PCR puede ser digerido por enzimas de restricción, y los fragmentos resultantes pueden ser resueltos por electroforesis. Si el producto de PCR contiene la secuencia de reconocimiento de la endonucleasa de restricción en un sitio específico, el o los fragmento (s) resultantes en tamaño pueden ser indicativo de una especie en particular **(18)**.

Tramos de DNA no funcional presumiblemente están también presentes en el ISR y deben exhibir un grado considerable de variación de secuencia por deriva genética. Estas secuencias polimórficas podrían hacer a la región intergénica un cronómetro para medir la velocidad molecular filogenética a corto plazo, es decir, un buen marcador de los principales linajes dentro de una especie **(12)**.

2.5.3. Heterogeneidad Intercistronica de *E. coli*.

En un estudio realizado por **Antón A. I., et al (1)** donde se analizaron las secuencias de los siete operones de los ISR de 12 cepas de la colección ECOR y K-12, se encontraron en *E. coli* K-12 tres regiones principales de heterogeneidades en la secuencia del ISR. La primera está localizada corriente arriba (extremo 5') del gen para tRNA^{glu-2} (solo presente en ISR1) donde se encuentra una secuencia de 106 pb (denominada *rsI*) ó 20 bp (20-mer). Los espacios intergénicos 16S-23S de los operones *rrnB* y *rrnG* contienen la secuencia *rsI*. Esta *rsI* está ausente en el espacio intergénico de los operones *rrnC*, *rrnE* y *rrnB* de algunos descendientes de la cepa original K-12 (*rrnB1*), en que *rsI* es reemplazada por una corta secuencia de 20 nucleótidos (7). La segunda región corresponde a un bloque de 14 bases, en la posición 294-307 (de nuevo solo presente en ISR1) agrupadas en una estructura secundaria tallo-asa (stem-loop) del operón. Finalmente, la tercera región es un bloque de 17pb (17-mer) substituido por una diferente secuencia de 8pb (8-mer) en la posición 404-420 en los operones *rrnG*, *rrnA* y *rrnD* de K12, esta secuencia es compartido con el ISR2. Además de estas heterogeneidades importantes, sustituciones de una sola base de diferencia en cada operón individual se ha identificado. Por otra parte, el ISR de los operones *rrnC* y *rrnE* sólo tienen tres nucleótidos de diferencia, y el ISR de *rrnD* y *rrnA* difieren en un solo nucleótido. En conjunto, los operones *rrn* de *E. coli* K-12 muestran una notable heterogeneidad intercistronica. Se ha sugerido que esto podría desempeñar un papel en la prevención de recombinación excesiva entre los *rrn*, que a menudo resulta en grandes reordenamientos genómicos (1).

2.6. Endonucleasas de restricción.

Estas enzimas, aisladas en bacterias, reciben este nombre debido a que limitan o previenen las infecciones víricas degradando el ácido nucleico invasor. Las enzimas de restricción reconocen una secuencia específica de nucleótidos (denominada sitio de restricción) de una molécula de DNA de doble cadena, y cortan el DNA por esa secuencia.

Las enzimas de restricción se denominan según el organismo en el que se descubrieron, utilizando un sistema alfanumérico. Hay dos tipos de enzimas de restricción. Las enzimas de Tipo I cortan las dos cadenas del DNA en una posición aleatoria a cierta distancia del sitio de restricción. Las enzimas de Tipo II reconocen una secuencia específica y cortan las dos cadenas de la molécula de DNA con absoluta precisión dentro de la secuencia reconocida.

Las secuencias reconocidas por las enzimas Tipo II son simétricas. La secuencia de una de las cadenas leída en dirección 5'-3' es la misma que la secuencia de la cadena complementaria leída también en dirección 5'-3'. Las secuencias que se leen igual en ambas direcciones se denominan palindrómicas.

Las enzimas Tipo II, dependiendo de su especificidad, al cortar la cadena del DNA provocan dos tipos de cortes: Cortes pegajosos, dejando productos con extremos complementarios (cohesivos) y cortes simétricos, dejando productos con extremos romos **(19)**.

CAPITULO 3

DISEÑO EXPERIMENTAL Y METODOLOGÍA

3.1. Cepas bacterianas.

Se analizaron 158 cepas de *E. coli* enterotoxigénica, aisladas de heces de 20 niños que inicialmente forman parte de un estudio longitudinal en una cohorte de 75 niños de un pueblo rural "Lugar Sobre la Tierra Blanca" del Edo. de Morelos, Méx. **(10)**. Estas cepas de ETEC forman parte de la colección de patógenos de la Facultad de Medicina. Se encuentran almacenadas en viales con medio de huevo Dorset correctamente identificadas. Se seleccionó una muestra representativa de las cepas de ETEC aisladas de 20 niños, de los cuales, 15 niños presentaron periodos intermitentes de diarrea, aislándose las cepas tanto en presencia y ausencia de la enfermedad y 5 niños que permanecieron asintomáticos (niños control). Los niños fueron seleccionados a partir de una base de datos proporcionada, tomando en cuenta el número de cepas aisladas en cada niño, el serotipo, identificación de toxinas y CFAs.

Las cepas *E. coli* K-12 (control -), ETEC H10407 (control +) se trabajaron como cepas de referencia y las cepas: *Citrobacter freundii* E9750, *Citrobacter rodentium*, *Salmonella typhimurium* LT2 y *Salmonella enterica* variedad Senftenberg D74210, se incluyeron en el estudio como cepas externas al género *Escherichia*.

3.2. Serotipificación y detección de toxinas LT y ST.

La serotipificación se realizó para cada una de las cepas en el Laboratorio de Referencia de Patógenos Entéricos de la Facultad de Medicina, UNAM. Edif. de Investigación 3er. piso.

La detección de las toxinas LT y ST fue realizada en un estudio previo por medio de hibridación de DNA con sondas específicas de cada uno de estos genes. Así mismo, se llevó a cabo la identificación de los factores de colonización (CFAs), por medio del ensayo de ELISA **(10)**.

3.3. Identificación morfológica y bioquímica.

A partir de una asada de los viales con medio de huevo Dorset de las cepas ETEC, se aislaron colonias únicas en placas de agar MacConkey y Base de Agar Sangre. A partir de la identificación presuntiva colonial, todos los tipos de colonias crecidas en el medio MacConkey se sembraron en un tubo con medio Gelosa Especial y se incubaron a 35°C / 24 horas para su crecimiento.

Se tomó una asada de la bacteria crecida en el tubo con Gelosa Especial y se sembró en agua peptonada (3mL) e incubó a 35°C / 3 horas. A partir de este cultivo bacteriano se identificó cada una de las colonias mediante pruebas bioquímicas (ver **apéndice IIIa**).

3.4. Sistema de identificación de *Enterobacteriaceae* API 20E.

A las cepas bacterianas que arrojaron resultados diferentes en las pruebas bioquímicas a los esperados para *E. coli*, se les realizó las pruebas por medio del sistema API 20E (ver **apéndice IIIa**). Se tomó un inóculo de la cepa del medio Gelosa Especial y se sembró en medio Muller-Hinton, se incubó a 35°C/18-24 horas. Se tomó una asada del microorganismo crecido en el medio y se resuspendió homogéneamente en 5mL de solución salina isotónica (0.85% de NaCl), ajustando el inóculo al tubo de referencia 0.5 de McFarlan. Se depositó una cantidad del inóculo bacteriano en cada uno de los pozos de la batería bioquímica API 20E de acuerdo a las instrucciones y se incubó a 36°C/18-24 horas. La lectura e interpretación de resultados se hizo conforme a las indicaciones del fabricante.

3.5. Extracción de DNA.

El DNA fue extraído por medio del Kit comercial (QIAamp DNA Mini Kit).

A partir del medio Gelosa Especial, se cultivo una asada de la cepa de interés en 5mL de caldo LB. Se incubó a 35°C/18h en agitación. La extracción del DNA a partir del paquete bacteriano se hizo siguiendo las instrucciones del kit de extracción (ver **apéndice Ic**).

La integridad del DNA fue corroborada en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Para determinar la concentración de DNA se tomó una alícuota de 5µl del DNA mezclado con 2µl de loading buffer y se corrió en una electroforesis horizontal en paralelo con Low DNA Mass Ladder con buffer TBE 0.5X, la banda de DNA fue vista en un transiluminador UV. La concertación obtenida de DNA fue entre 200-600ng. Se almacenó en refrigeración a 4°C para su conservación.

6.6. Oligonucleótidos (diseño de iniciadores).

Se diseñaron iniciadores específicos para la amplificación del espacio intergénico 16S-23S RNAr de los operones *rrn* de las cepas clínicas de ETEC, a partir de una secuencia de nucleótidos obtenida de los genes 16S y 23S del operón C de la cepa *E. coli* K-12 W3110 (**figura 4**), de la página National Center for Biotechnology Information (NCBI) (**apéndice IIa**). Para el diseño de los iniciadores de utilizo el programa LASERGENE (DNASTART, Inc).

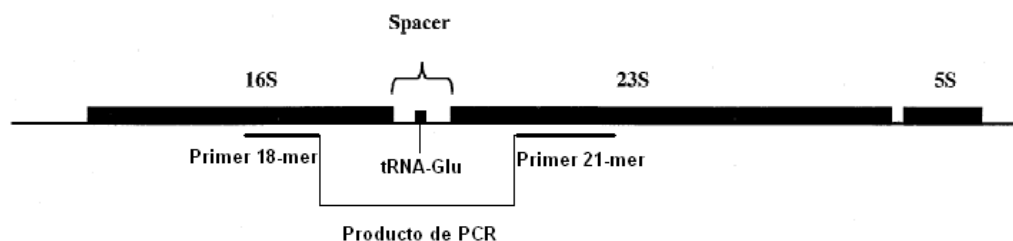


Figura 4. Representación esquemática del operón *rrnC* de la cepa *E. coli* K-12 W3110. Se muestra los sitios aproximados de la secuencia de los iniciadores para la amplificación por PCR del espacio intergénico y parte de los genes 16S y 23S RNAr.

El iniciador 1 (forward) 16SEI-F (5´ CCGGCCGGGAAGTCAAAG 3´) corresponde al gen 16S posición 3693721-3693738pb. Gene ID: 7436649 NBCI. El iniciador 2 (reverse) 23SEI-R (5´ CTCGCCGCTACTGGGGGAATC 3´) correspondiente al gen 23S posición 3692726-36922746pb. Gene ID: 7436069 NBCI. Ambos iniciadores fueron sintetizados en Invitrogen®.

Iniciadores (Primers).

Iniciador1 (forward): 18-pb. 16SEI-F	5' CCGGCCGGGAACTCAAAG 3'
Iniciador2 (reverse): 21-pb. 23SEI-R	5' CTCGCCGCTACTGGGGGAATC 3'

La concertación de los iniciadores trabajada fue de 60pmol/μl. (ver **apéndice IIb**)

3.7. Amplificación por PCR.

La amplificación por PCR del espacio intergénico 16S-23S RNAr de las cepas de ETEC, se hizo agregando en un tubo para PCR 5μl de Buffer 10X, 1μl de MgCl₂ (50mM), 1μl de dNTP's (10mM) (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1μl de cada uno los iniciadores a una concertación de 60pmol/μl., 2.5U de *Taq* I DNA polimerasa y 1μl de DNA (aproximadamente a una concertación de 200-600ng/μl) para un volumen final de 50μl.

Condiciones de reacción de PCR: Desnaturalización 93 °C por 3 minutos seguido de 35 ciclos a 94 °C por un minuto. Alineación a 64 °C por un minuto y 72 °C por 2 minutos.

El producto amplificado por PCR se observó en un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. Se tomó una alícuota de 5μl del producto de PCR, mezclado con 2μl de loading buffer y se depositó en uno de los pozos del gel corriéndose la muestra en una electroforesis horizontal con buffer TBE 0.5X, el tamaño del producto amplificado fue determinado con base a un marcador de peso molecular de DNA de 100pb, visto bajo un transiluminador UV.

3.8. Elección de las Enzimas de Restricción (Endonucleasas). *In-silico*

(Ver **apéndice IIc**).

Se realizó un experimento *In-silico* usando el programa de la página <http://insilico.ehu.es/> para amplificar el espacio intergénico 16S-23S RNAr de cada uno de los operones de un grupo de cepas de *E. coli* disponibles en el programa (*E. coli* IA1, *E. coli* ED1a, *E. coli* E24377A y *E. coli* K-12 W3110). La secuencia amplificada *in-silico* con nuestros iniciadores, se editó con el programa *EditSeq*,

posteriormente con la secuencia editada se utilizó el programa *SeqBuilder* para determinar el tipo de enzimas que cortaban la región de estudio. Las endonucleasas *Hinfl*, *RsaI* y *TaqI* se seleccionaron por presentar un mayor polimorfismo (**Figura 5**). Experimentalmente se utilizaron también las enzimas *AluI*, *DpnI* y *Sau3A*, sin embargo no se observó un polimorfismo en los perfiles de restricción generados, por lo cual se descartaron.

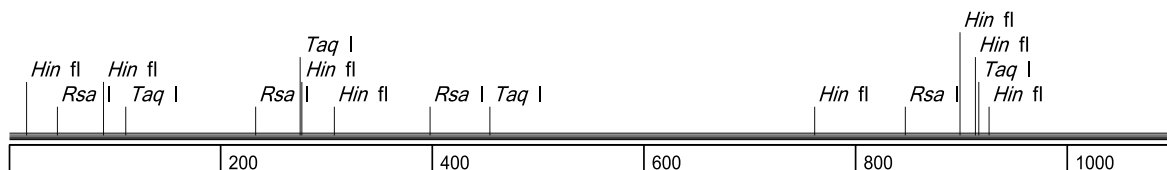


Figura 5. Esquema de restricción de los cortes realizados por las Enzimas *Hinfl*, *RsaI* y *TaqI* en un producto de PCR del espacio intergénico 16S-23S RNAr amplificado (1105pb) de la cepa *Escherichia coli* K-12 W3110, utilizando el programa *SeqBuilder*.

3.9. Procedimiento experimental de restricción.

Mezcla de restricción. Se tomaron 10µl del producto amplificado por PCR y se agregaron 5U de la enzima de restricción y 2.5µl del correspondiente buffer 10X con un volumen final de 25µl en un tubo para PCR. Se incubó durante toda la noche a la temperatura óptima de cada enzima en baño de agua. (*RsaI* y *Hinfl* a 37 °C y *TaqI* a 65°C).

La restricción de los productos de PCR fue vista en un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. Se agregó al tubo de la mezcla de restricción 7µl de loading buffer, del cual se tomó una alícuota de 15µl cargándose en un pozo del gel para su corrimiento electroforético con buffer TBE 0.5X, el tamaño de las bandas fue determinado con un marcador de peso molecular de DNA de 100pb, visto sobre un transiluminador UV.

3.10. Análisis del patrón de bandeo generado por la restricción (PCR-RFLP).

El análisis de los perfiles de restricción de las cepas ETEC fue realizado por inspección visual en las fotos obtenidas de los geles de agarosa. El tamaño de las bandas obtenidas (referidos a el número de pares de bases) fue estimado usando el Scanner Bio Image® Sharp JX-610, mediante el software Whole band Analyzer. Las diferencias menores en la intensidad de las bandas no fueron consideradas. Las cepas aisladas fueron consideradas genéticamente indistinguibles si poseían perfiles de restricción con el mismo número y el mismo tamaño de bandas. Los perfiles fueron considerados diferentes cuando al menos una banda fue distinta en tamaño, presencia o ausencia.

CAPITULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Identificación de las cepas de ETEC.

Identificación bioquímica de las 158 cepas de ETEC (**ver apéndice IIIa**).

Indol.....	91.1% positivo (144 cepas)
Fermentación de glucosa.....	100% positivo.
Fermentación de lactosa.....	99.3% positivo (157 cepas)
Rojo de metilo.....	99.3% positivo (157 cepas)
Voges-Proskauer.....	0% positivo.
Citrato de Simmons.....	0% positivo.
Ácido sulfhídrico.....	0% positivo.

De las 158 cepas de ETEC que se trabajaron, 16 de ellas fueron confirmadas como *E. coli* por medio de API 20E (**ver apéndice IIIb**).

La identificación de alguna de las dos toxinas LT y/o ST (STp y STh), fue el elemento principal para clasificar a las cepas como ETEC. (Los resultados son mostrados en las tablas de las páginas 97-104. Así mismo, se muestran los CFAs y serotipos identificados para cada una de las cepas estudiadas).

4.2. Análisis *In-silico* de la restricción de los 7 operones rrn de cuatro cepas de *E. coli*.

Las cepas *E. coli* K-12 W3110, *E. coli* IA11, *E. coli* E24377A y *E. coli* ED1a fueron analizadas *In-silico* por medio de una simulación experimental utilizando nuestros iniciadores para amplificar su espacio intergénico 16S-23S RNAr de cada uno de sus operones.

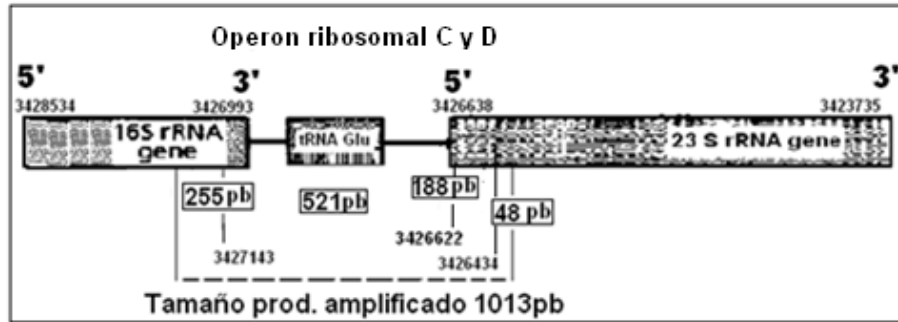
Utilizando el programa *EditSeq*, para la edición de la secuencia amplificada y *Seqbuilder* para la restricción de la secuencia, a partir de las endonucleasas *RsaI*, *TaqI* y *HinfI* anteriormente seleccionadas, se obtuvo un perfil de restricción en cada amplificado generado por los cortes de las enzimas. Este análisis se usó para la interpretación de nuestros resultados experimentales y tener una referencia de lo que se esperaba obtener.

A continuación se muestran unos esquemas representativos del sitio de corte por la enzima *RsaI* en cada uno de los operones de las cepas analizadas *In-silico* y los tamaños de las bandas generadas por el sitio de corte. Estos resultados solo incluyen a la enzima *RsaI*, por presentar un mayor polimorfismo, por lo que fue seleccionada para el análisis de las cepas clínicas.

Interpretación de esquemas (paginas 40-48).

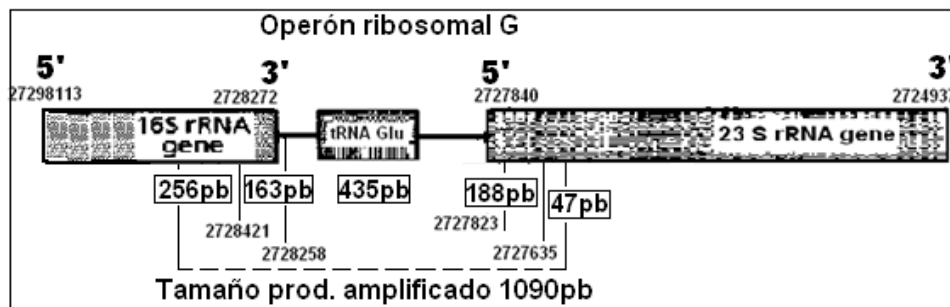
Las líneas verticales con el número indican la posición en el operón en el cual *RsaI* realiza el corte, los números encerrados en un cuadro indican el tamaño de la banda generada por la restricción (en pares de bases) y la línea punteada indica el tamaño del producto de PCR amplificado.

Cepa 1. *E. coli* K-12 W3110.



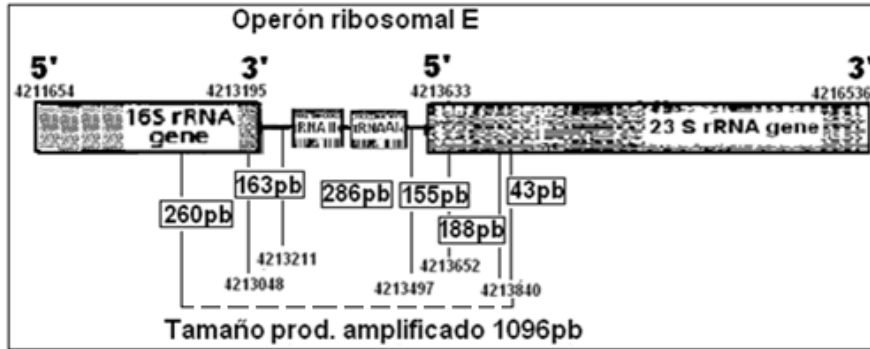
Esquema 1. Sitios de restricción por *RsaI* en el operón C y D de *E. coli* K-12 W3110.

En el **operón C y D** se produce un producto de PCR de 1013pb, en este amplificado no se producen cortes en el espacio intergénico, solo se realizan tres cortes en los genes 16S y 23S, el tamaño principal generado es de 521pb. Los cortes que se realizan en los genes generan bandas de 255pb, 188pb y 48pb.



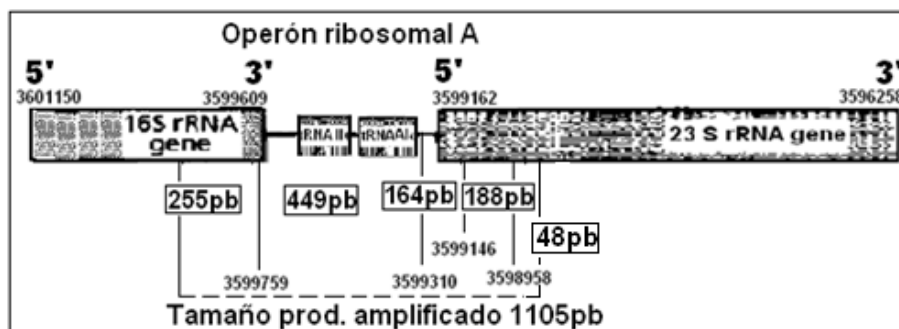
Esquema 2. Sitios de restricción por *RsaI* en el operón G de *E. coli* K-12 W3110.

En el **operón G** se produce un producto de PCR de 1090pb, se realiza un corte en el intergénico a una distancia de 14 nucleótidos del extremo 3' del gen 16S y se produce una banda principal de 435pb, los demás cortes se realizan en los genes 16S y 23S, generando tamaños de 256pb, 163pb, 188pb y 47pb. Para el **operón B**, los resultados son similares a el **operón G**, solo cambia el tamaño del producto de PCR amplificado (1099pb) y produce una banda de 444pb en vez de 435pb, los demás tamaños de las bandas se conservan.



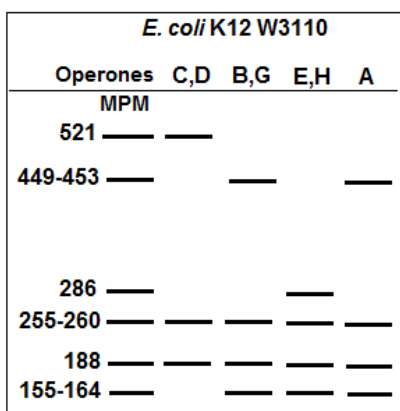
Esquema 3. Sitios de restricción por *RsaI* en el operón E de *E. coli* K-12 W3110.

En el **operón E** se produce un producto de PCR de 1096 pb, en éste se realizan dos cortes en el intergénico, uno a 16 nucleótidos del extremo 3' del gen 16S y otro cercano al gen RNA^{t^{Ala}} a 136 nucleótidos del extremo 5' del gen 23S, el tamaño de la banda obtenida por estos cortes es de 286pb, los demás cortes se realizan en los genes 16S y 23S, generando tamaños de 260pb, 163pb, 155pb, 188pb y 43pb. Para el **operón H** los resultados son similares a el **operón E**, solo cambia el tamaño del producto de PCR amplificado (1105pb) y el tamaño de las bandas obtenidas por los cortes son de 286pb por los dos cortes en el ISR y las bandas 259pb, 188pb, 164pb, 163pb y 44pb por los cortes en los genes 16S y 23S.



Esquema 4. Sitios de restricción por *RsaI* en el operón A de *E. coli* K-12 W3110.

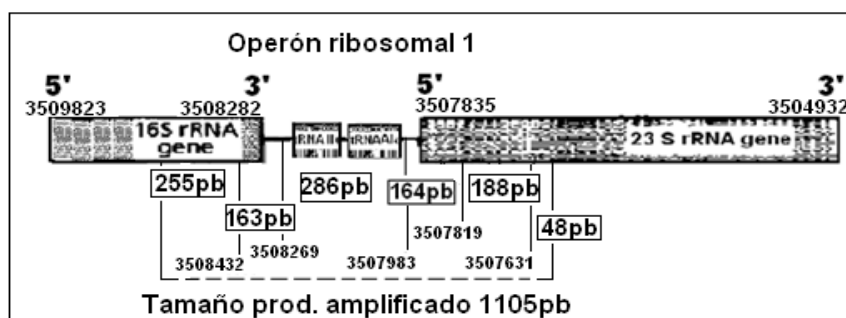
En el **operón A** se obtiene un producto de PCR de 1105pb, se produce un corte en el intergénico cercano al gen RNA^{Ala} a 148 nucleótidos del extremo 5' del gen 23S, produciendo la banda de 449pb, los demás tamaños son producidos por los cortes en los genes 16S y 23S, de 255pb, 164pb, 188pb y 48pb.



Esquema 5. Perfiles generados con *RsaI* en cada uno de los 7 operones de la cepa *E. coli* K12 W3110.*

Los operones C D, B G y E H presentan el mismo patrón de bandeado. Los operones C, D y B, G esta agrupados en operones que tienen en su espacio intergénico un gen para RNA^{I} (ISR1) y los operones E y H en operones que tienen en su espacio intergénico dos genes para RNA^{I} (ISR2).

Cepa 2. *E. coli* IA1 (cepa comensal).

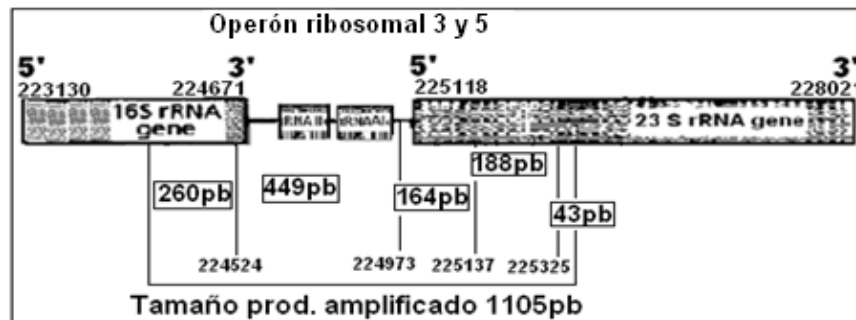


Esquema 6. Sitios de restricción por *RsaI* en el operón 1 de *E. coli* IA1.

*

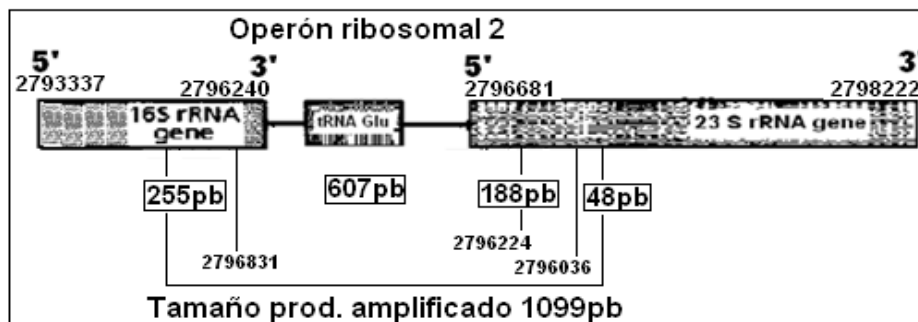
Las bandas con tamaños menores de 50pb no fueron incluidas en el análisis por tratarse de una banda de bajo peso y no visualizarse en un gel de agarosa.

El **operón 1** produce un producto de PCR de 1105pb, en este operón se realizan dos cortes en el intergénico, uno a 13 nucleótidos del extremo 3' del gen 16S y otro cercano al gen RNA^t^{Ala} a 148 nucleótidos del extremo 5' del gen 23S, el tamaño de la banda obtenida principal por estos cortes es de 286pb, los demás cortes se realizan en los genes 16S y 23S, generando tamaños de 255pb, 163pb, 164pb, 188pb y 48pb.



Esquema 7. Sitios de restricción por *RsaI* en el operón 3 y 5 de *E. coli* IA11.

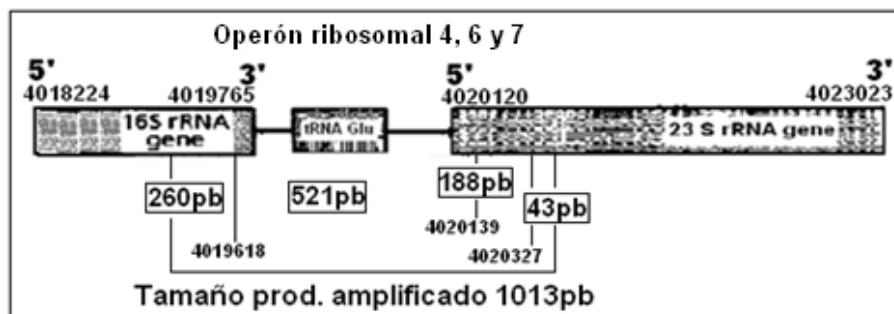
Los **operones 3 y 5** producen un producto de PCR de 1105pb, en este operón se realiza un corte en el intergénico cercano al gen RNA^t^{Ala} a 145 nucleótidos del extremo 5' del gen 23S, produciendo la banda 449pb, los demás tamaños son producidos por los cortes en los genes 16S y 23S, generando tamaños de 260pb, 164pb, 188pb y 43pb.



Esquema 8. Sitios de restricción por *RsaI* en el operón 2 de *E. coli* IA11.

En el **operón 2** se produce un producto de PCR de 1099pb, podemos observar que no se realiza ningún corte en el espacio intergénico, la banda principal

producida es de 607pb, las demás son generadas por los cortes en los genes 16S y 23S, con tamaños de 255pb, 188pb y 48pb.



Esquema 9. Sitios de restricción por *RsaI* en el operón 4, 6 y 7 de *E. coli* IAI1.

Para los **operones 4, 6 y 7** se produce un producto de PCR de 1013pb, podemos ver que no se realiza ningún corte en el ISR, la banda principal producida es de 521pb, las demás son generadas por los cortes en los genes 16S y 23S, produciendo bandas de 260pb, 188pb y 43pb.

<i>E. coli</i> IAI1				
Operones	1	3,5	2	4,6,7
MPM				
607	—		—	
521				—
449-453	—	—		
286	—	—		
255-260	—	—	—	—
188	—	—	—	—
155-164	—	—	—	

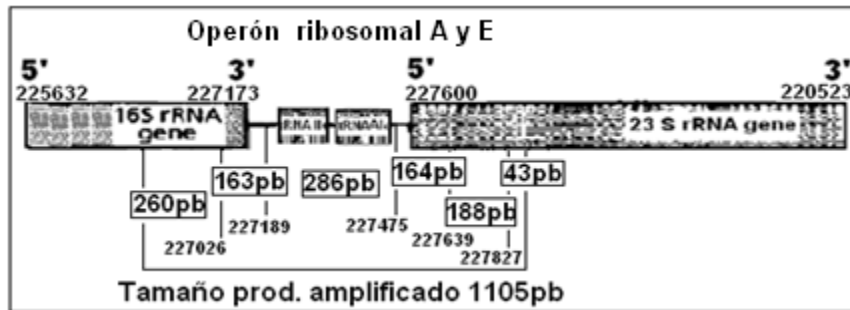
Esquema 10. Perfiles generados con *RsaI* en cada uno de los 7 operones de la cepa *E. coli* IAI1.*

Para esta cepa de *E. coli*, los operones que presentan el mismo patrón de bandeo son 3 y 5 (ISR2) y los operones 4, 6, y 7 (ISR1).

*

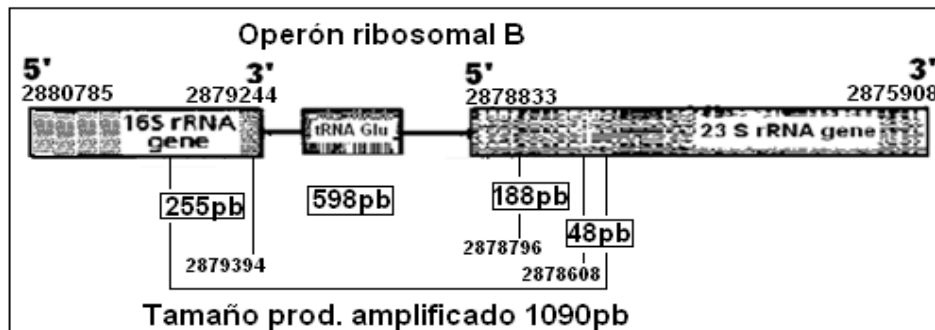
Las bandas con tamaños menores de 50pb no fueron incluidas en el análisis por tratarse de una banda de bajo peso y no visualizarse en un gel de agarosa.

Cepa 3. *E. coli* E24377A. (cepa ETEC)



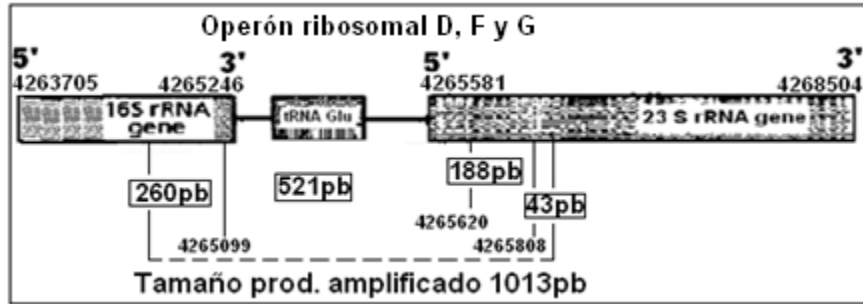
Esquema 11. Sitios de restricción por *RsaI* en el operón A y E de *E. coli* E24377A.

En los **operones A y E** se produce un producto de PCR de 1105pb, los cortes en el espacio intergénico se realizan a una distancia de 16 nucleótidos del extremo 3' del gen 16S y otro cercano al gen RNAt^{Ala} a 125 nucleótidos del extremo 5' del gen 23S, el tamaño de la banda obtenida principal por estos cortes es de 286pb, los demás cortes se realizan en los genes 16S y 23S, generando tamaños de 260pb, 163pb, 164pb, 188pb y 43pb. Para el **operón C** se obtienen tamaños de bandas muy parecidos al **operón A** (255pb, 163pb, 286pb, 164pb, 188pb, 48pb).



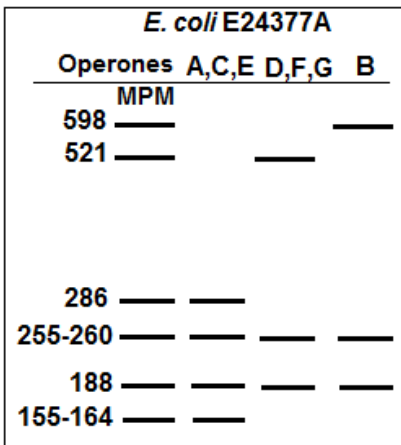
Esquema 12. Sitios de restricción por *RsaI* en el operón B de *E. coli* E24377A.

En el **operón B** se produce un producto de PCR de 1090pb, podemos ver que en el intergénico no se realiza ningún corte de restricción, la banda principal producida es de 598pb, las demás son generadas por los cortes en los genes 16S y 23S, de 255pb, 188pb y 48pb.



Esquema 13. Sitios de restricción por *RsaI* en el operón D, F y G de *E. coli* E24377A.

En los **operones D, F y G** se produce un producto de PCR de 1013 pb, podemos ver que no se realiza ningún corte de restricción en el espacio integénico, la banda principal producida es de 521pb, las demás bandas son generadas por los cortes en los genes 16S y 23S, de 260pb, 188pb y 43pb.

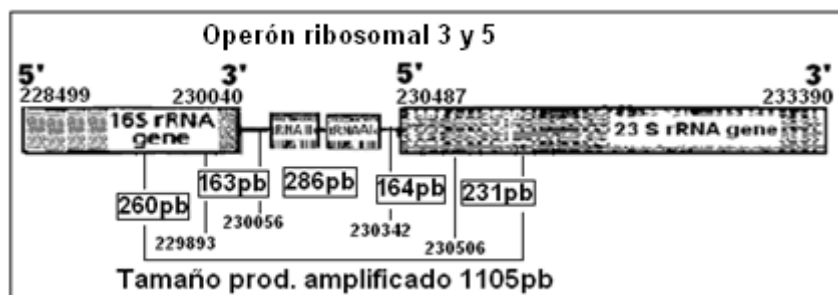


Esquema 14. Perfiles generados con *RsaI* en cada uno de los 7 operones de la cepa *E. coli* E24377A.*

Para esta cepa de *E. coli*, los operones que presentan el mismo patrón de bandeo son A, C y E (ISR2) y los operones D, F y G (ISR1).

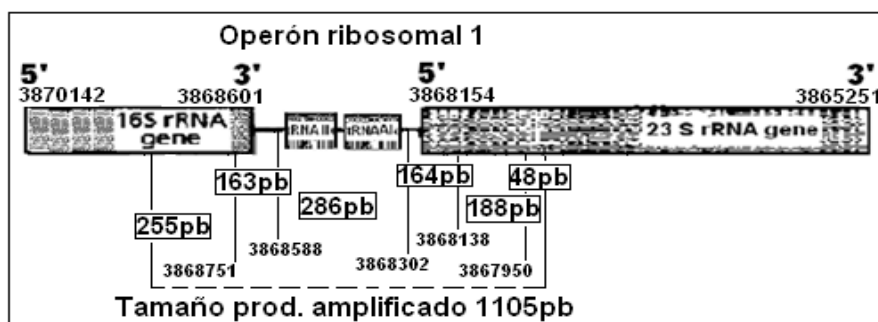
* Las bandas con tamaños menores de 50pb no fueron incluidas en el análisis por tratarse de una banda de bajo peso y no visualizarse en un gel de agarosa.

Cepa 4. *E. coli* ED1a. (cepa comensal)



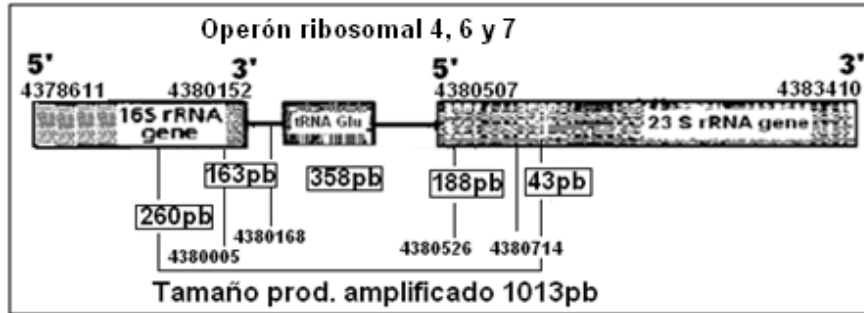
Esquema 15. Sitios de restricción por *RsaI* en el operón 3 y 5 de *E. coli* ED1a.

Para los **operones 3 y 5** se produce un producto de PCR de 1105pb, en esta cepa se realizan dos cortes en el intergénico, uno a 16 nucleótidos del extremo 3' del gen 16S y otro cercano al gen RNAt^{Ala} a 145 nucleótidos del extremo 5' del gen 23S, el tamaño de la banda obtenida por estos cortes es de 286pb, los demás cortes se realizan en los genes 16S y 23S, generando tamaños de 260pb, 163pb, 164pb y 231pb.



Esquema 16. Sitios de restricción por *RsaI* en el operón 1 de *E. coli* ED1a.

En el **operón 1** produce un producto de PCR de 1105pb, en éste se realizan dos cortes en el intergénico, uno a una distancia de 13 nucleótidos del extremo 3' del gen 16S y otro cercano al gen RNAt^{Ala} a 148 nucleótidos del extremo 5' del gen 23S, el tamaño de la banda obtenida por estos cortes es de 286pb, los demás cortes se realizan en los genes 16S y 23S, generando tamaños de 255pb, 163pb, 164pb, 188pb y 48pb.



Esquema 17. Sitios de restricción por *RsaI* en el operón 4, 6 y 7 de *E. coli* ED1a.

En los **operones 4, 6 y 7** se produce un producto de PCR de 1013pb, el corte en el intergénico se realiza a una distancia de 16 nucleótidos del extremo 3' del gen 16S y se produce una banda de 358pb, los demás cortes se realizan en los genes 16S y 23S, generando tamaños de 260pb, 163pb, 188pb y 43pb. Para el **operón 2** se tienen tamaños muy parecidos a los operones antes descritos, los tamaños son de 255pb, 163pb, 358pb, 188pb y 48pb.

<i>E. coli</i> ED1a			
Operones	5,3	1	2,4,6,7
358	—		—
286	—	—	—
255-260	—	—	—
231	—		
188	—	—	—
155-164	—	—	—

Esquema 18. Perfiles generados con *RsaI* de cada uno de los 7 operones de la cepa *E. coli* ED1a.*

Para esta cepa de *E. coli*, los operones que presentan el mismo patrón de bandeo son el 5 y 3 (ISR2) y los operones 2, 4, 6 y 7 (ISR1).

El análisis *in-silico* de los perfiles de restricción anteriormente presentado, mostró el perfil generado individualmente de cada operón *rrn* que conforman el cromosoma de cada una de las 4 cepas de *E. coli* utilizadas como referencia. Sin embargo, la apreciación en un gel de agarosa de todas las bandas de diferente tamaño, generadas por los 7 operones de cada una de las cepas, se muestran en el siguiente esquema.

Cepas	<i>E. coli</i> K12 W3110	<i>E. coli</i> IAI1	<i>E. coli</i> E24377A	<i>E. coli</i> ED1a
598-607	MPM	—	—	—
521	—	—	—	—
449-453	—	—	—	—
358	—	—	—	—
286	—	—	—	—
255-260	—	—	—	—
231	—	—	—	—
188	—	—	—	—
155-164	—	—	—	—

Esquema 19. Se muestran los perfiles de restricción en conjunto de todos los 7 operones de cada una de las cepas analizadas *In-silico*.*

Los resultados *In-silico* en general mostraron que operones *rrn* que solo tienen un gen para RNAt en su espacio intergénico (ISR1), pueden presentar un corte en el ISR con la enzima *RsaI* o no presentar ninguno. En los operones que no presentan cortes en el ISR producen bandas de 607pb, 598pb y 521pb, dependiendo del tamaño del producto amplificado por PCR (1099pb, 1090pb y 1013pb respectivamente). Los operones que presentaron un corte en el ISR, este era producido cercano al extremo 3' del gen 16S y el tamaño de la banda principal obtenida dependía del producto amplificado por PCR, a saber: 1099pb (una banda de 444pb), 1090pb (banda de 435pb) y 1013pb (banda de 358pb).

En cuanto a los operones *rrn* que presentan dos genes para RNAt en su espacio intergénico (ISR2), se producían uno o dos cortes en el ISR por *RsaI*, distales a los genes de RNAt, uno cercano del extremo 3' del gen 16S y el otro cercano al gen de RNAt^{Ala-1B} próximo del extremo 5' del gen 23S. Los operones con un solo

* Las bandas con tamaños menores de 50pb no fueron incluidas en el análisis por tratarse de una banda de bajo peso y no visualizarse en un gel de agarosa.

corte en el ISR, se llevaba a cabo cercano al gen de RNAt^{Ala-1B}, obteniéndose una banda principal de 449pb, con un tamaño del amplificado por PCR de 1105pb. En cuanto a los operones con dos cortes en el ISR se obtuvo principalmente una banda de 286pb, con tamaños de productos amplificados por PCR de 1096pb o 1105pb.

El análisis nos mostró también que los tamaños de las bandas entre 255pb-260pb y 188pb son producidos en todos los operones *rrn*, cortes generados principalmente por la restricción de *RsaI* en los genes 16S y 23S RNAr, genes altamente conservados en su secuencia de nucleótidos. Así mismo, un igual patrón de bandeo puede ser generado por más de un operón del mismo tipo (ISR1 o ISR2) presentes en una misma cepa.

4.3. Resultados experimentales PCR-RFLP.

4.3.1. Amplificación por PCR del espacio intergénico 16S-23S RNAr.

El espacio intergénico 16S-23S RNAr de las cepas clínicas de ETEC amplificaron dos bandas visibles con tamaños entre 1000pb y 1100pb (**foto 1**), con la excepción de la cepa aislada el día 132 de vida del niño 3, que presentó una banda de 1100pb y otra de 1200pb. Para las cepas *E. coli* K-12 y ETEC H10407, igualmente se obtuvieron dos bandas amplificadas con tamaños entre 1000pb y 1100pb.

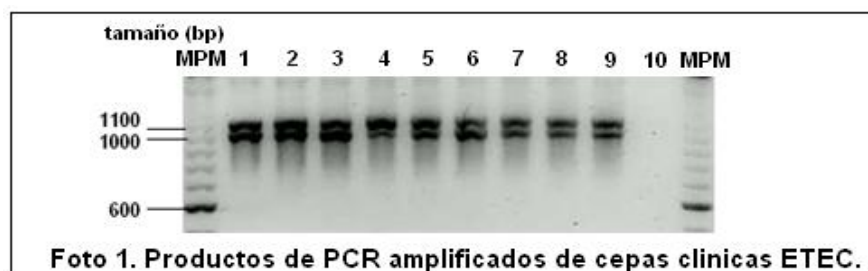


Foto 1. Producto de PCR amplificado del espacio intergénico 16S-23S RNAr de las cepas ETEC (carriles 1-9), mostrado en un gel de agarosa al 1.5%.

El producto de PCR amplificado del ISR 16S-23S RNAr para las cuatro cepas que se utilizaron como externas al género de *Escherichia*, dieron amplificados con tamaños muy diferentes a los generados por las cepas de ETEC (**foto 2**). Para la cepa de *Citrobacter freundii* E9750 el producto amplificado por PCR mostró dos bandas entre 900pb y 1000pb, para la cepa *Salmonella typhimurium* LT2 se apreció una banda entre 1200pb, para la cepa *Citrobacter rodentium* se observan dos bandas entre 1100pb y 1200pb y para la cepa *Salmonella* Senftenberg D74210 solo una banda entre 1050pb.

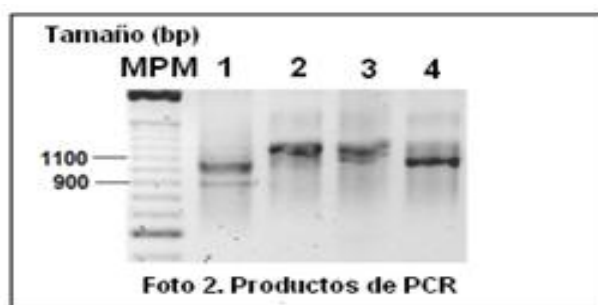
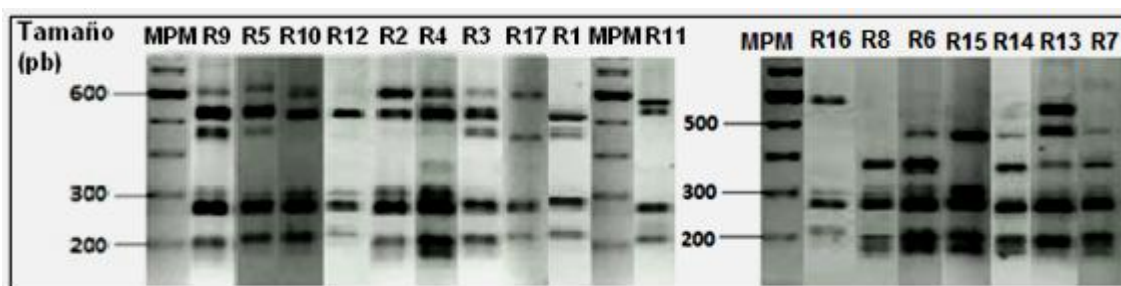


Foto 2. Producto de PCR amplificado del espacio intergénico 16S-23S RNAr, en un gel de agarosa 1.5%: carril 1. *Citrobacter freundii* E9750, carril 2. *Salmonella typhimurium* LT2, carril 3. *Citrobacter rodentium*, y carril 4. *Salmonella* Senftenberg D74210.

4.4. Restricción de los productos amplificados por PCR del espacio intergénico 16S-23S RNAr de las cepas ETEC con las endonucleasas *RsaI*, *TaqI* y *HinfI*.

La restricción de los productos amplificados por PCR se llevó a cabo individualmente con cada una de las endonucleasas (*RsaI*, *TaqI* y *HinfI*), esperando encontrar variaciones en la longitud del fragmento amplificado por PCR. Estas variaciones se utilizaron como marcadores genéticos para determinar el polimorfismo presente en la colección de cepas de ETEC para su posterior estudio y clasificación con respecto al perfil producido.

4.4.1. Perfiles generados por la restricción de *RsaI*.



Fot
o 3. Perfiles de restricción generados por la enzima *RsaI* de los productos de PCR de las cepas ETEC, mostrados en un gel de agarosa al 1.5%.

El total de perfiles producidos con la enzima *RsaI* fue 17 (R1-R17^{**}). (Tabla 1). La cepa *E. coli* K-12 presentó un perfil de restricción R5 y la cepa ETEC H10407 presentó un perfil R10.

** El número del perfil asignado fue realizado arbitrariamente conforme se identificaba un perfil nuevo.

4.4.2. Perfiles generados por la restricción de *TaqI*.

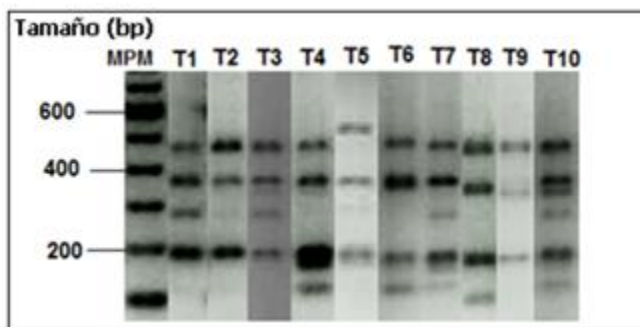


Foto 4. Perfiles de restricción generados por la enzima *TaqI* de los productos de PCR de las cepas ETEC, mostrados en un gel de agarosa al 1.5%.

El total de perfiles observados con *TaqI* fue 10 (T1-T10^{**}). Sin embargo, 98 cepas presentaron dos perfiles con mayor frecuencia (T1 y T2) (**Tabla 1**).

4.4.3. Perfiles generados por la restricción de *HinfI*.

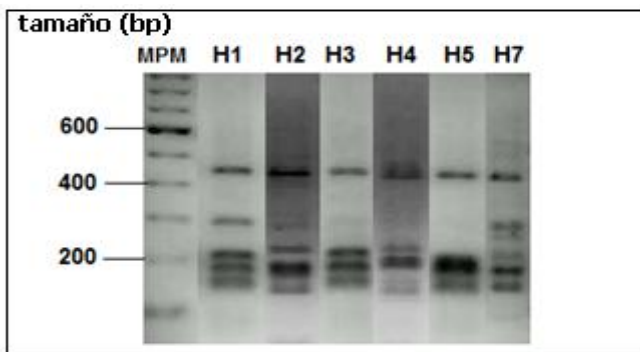


Foto 5. Perfiles de restricción generados por la enzima *HinfI* de los productos de PCR de las cepas ETEC, mostrados en un gel de agarosa al 1.5%.

El total de perfiles observados con *HinfI* fue 7 (H1-H7^{**}). Sin embargo, 102 cepas presentaron un mismo perfil H3 (**Tabla 1**), indicando que no se detectó un buen polimorfismo con esta enzima experimentalmente.

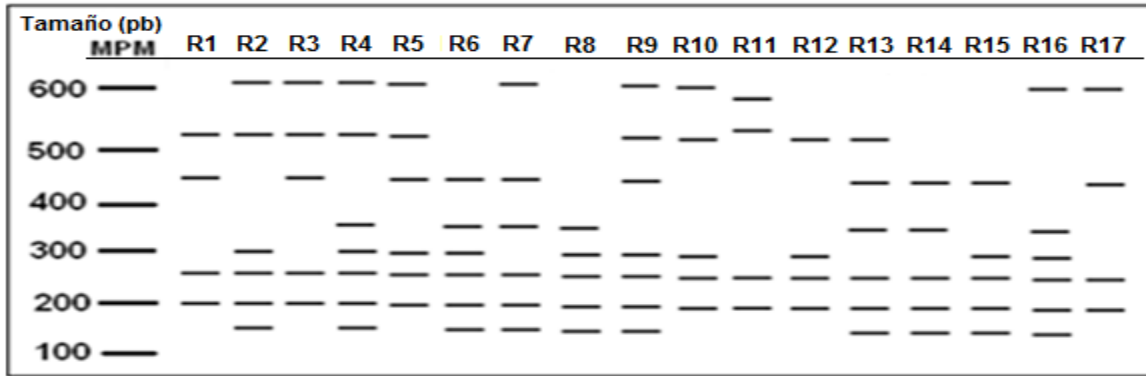
^{**} El número del perfil asignado fue realizado arbitrariamente conforme se identificaba un perfil nuevo.

Los tamaños de las bandas para cada perfil generado por la restricción se muestran en la siguiente tabla.

Endonucleasa	Secuencia de corte	Perfil (# cepas con el perfil)	Tamaño de las bandas producidas (pb).
<i>RsaI</i>	5´-GT ↓ AC- 3´ 3´-CA ↑ TG- 5´	R1 (13 cepas) R2 (17 cepas) R3 (32 cepas) R4 (5 cepas) R5 (8 cepas) R6 (12 cepas) R7 (4 cepas) R8 (4 cepas) R9 (19 cepas) R10 (19 cepas) R11 (1 cepa) R12 (3 cepas) R13 (3 cepas) R14 (11 cepas) R15 (5 cepas) R16 (1 cepa) R17 (1 cepa)	520,454,260,198 608,520,300,260,198,174 608,520,454,260,198 608,520,358,300,260,198,174 608,520,454,300,260,198 454,358,300,260,198,174 608,454,358,260,198,174 358,300,260,198,174 608,520,454,300,260,198,174 608,520,300,260,198 575,537,260,198 520,300,260,198 520,454,358,260,198,174 454,358,260,198,174 454,300,260,198,174 608,358,300,260,198,174 608,454,260,198
<i>TaqI</i>	5´-T ↓ CG A- 3´ 3´-A GC ↑ T- 5´	T1 (51 cepas) T2 (47 cepas) T3 (3 cepas) T4 (9 cepas) T5 (1 cepas) T6 (31 cepas) T7 (10 cepas) T8 (1 cepa) T9 (1 cepa) T10 (4 cepas)	470,370,285,200 470,370,200 470,370,344,285,200 470,370,200,188,130 541,370,200 470,370,200,130 470,370,285,200,130 464,353,200,120 464,344,200 470,370,344,285,200,130
<i>HinfI</i>	5´-G ↓ ANT C- 3´ 3´-C T NA ↑G- 5´	H1 (38 cepas) H2 (11 cepas) H3 (102 cepas) H4 (1 cepa) H5 (4 cepas) H6 (1 cepa) H7 (1 cepa)	460,300,217,185,152 460,300,217,176,152 460,217,185,152 443,415,217,185,152 460,217,199,152 300,282,265,217,199,152 460,300,265,217,185,152

Tabla 1. Total de perfiles generados después de la restricción de los productos de PCR de las cepas ETEC con las endonucleasas *RsaI*, *TaqI* y *HinfI*.

La enzima *RsaI* mostró un mayor polimorfismo a diferencia de las otras dos enzimas utilizadas, además de que se observó una mejor caracterización y agrupación de las cepas para cada uno de los perfiles generados. Los patrones RFLP de *RsaI*, fueron seleccionados para el análisis comprensivo en este estudio.



Esquema 20. Representación de los perfiles totales generados en las cepas clínicas de ETEC por *RsaI*.

4.4.4. Restricción de los productos amplificados por PCR del espacio intergénico 16S-23S RNAr de las cepas externas a *Escherichia* con *RsaI*.

Los perfiles de restricción obtenidos en las 4 cepas incluidas en este estudio como externas, fueron muy diferentes a los generados por la cepas de ETEC (**foto 6**). Las 4 cepas presentaron un perfil diferente entre sí, sin embargo, presentaron dos bandas que coincidieron en tamaño para las cuatro cepas (294pb y 211pb).

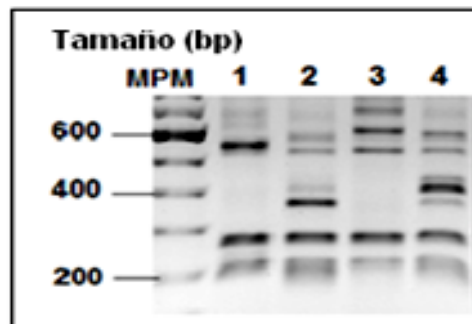


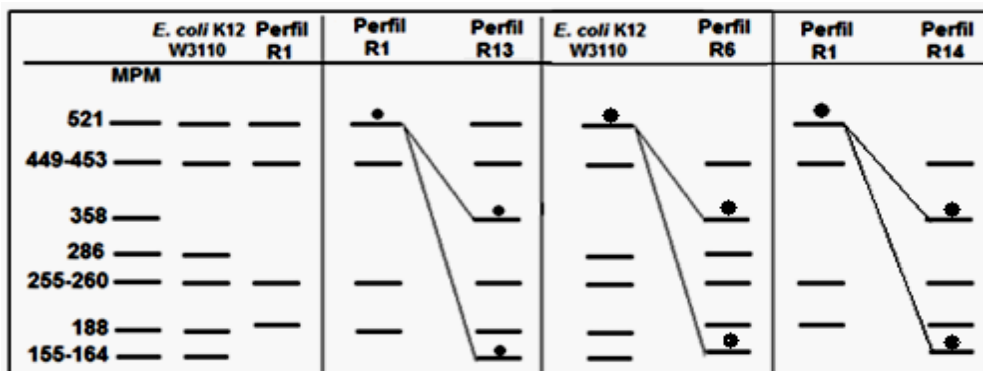
Foto 6. Perfiles generados por la enzima *RsaI* para las cepas externas, mostrados en un gel de agarosa al 1.5%. Carril 1. *Citrobacter freundii* E9750, carril 2. *Salmonella typhimurium* LT2, carril 3. *Citrobacter rodentium*, carril 4. *Salmonella senftenberg* D74210.

Cepa	Tamaño de bandas (pb)
1. <i>Citrobacter freundii</i> E9750	569,294,211
2. <i>Salmonella typhimurium</i> LT2	599,550,374,294,211,188
3. <i>Citrobacter rodentium</i>	725,636,550,294,211
4. <i>Salmonella senftenberg</i> D74210	620,550,426,374,294,211

Tabla 2. Tamaños de bandas generadas por la restricción con la enzima *RsaI*, de las cepas externas al género *Escherichia*.

4.5. Comparación de los perfiles de restricción generados por *RsaI* en las cepas analizadas *In-silico* y las cepas clínicas de ETEC.

Análisis del perfil generado en la cepa *E. coli* K-12 W3110.



Esquema 21. Relación de perfiles entre la cepa *E. coli* K-12 W3110 y los perfiles R1, R13, R6 y R14 generados en las cepas clínicas ETEC.

La cepa *E. coli* K-12 W3110 presentó un perfil de restricción que difiere al generado por el perfil R1, que presentaron las cepas clínicas de ETEC. Las bandas 520pb, 454pb, 260pb y 198pb (188pb para *E. coli* K12 W3110) están presentes en ambos perfiles. Sin embargo, la diferencia entre los perfiles es la ausencia de las bandas 286pb y 155-164pb en R1, lo que hace que se distingan entre ellos. (**esquema 21**, 1er. cuadro)

La cepa *E. coli* K-12 W3110, presenta dos operones ISR1 (C y D) que generan una banda de 521pb por la restricción de *RsaI* (**esquema 1**). Las cepas clínicas que presentaron el perfil R1 que presentan esta banda, por lo tanto, tienen estos tipos de operones que generan la banda de 521pb. Con respecto al perfil R13, probablemente este perfil pudo haberse generado a partir de un evento genético en alguno de estos dos operones, donde por medio de un cambio de base en uno de estos operones que generan la banda 521pb, dio origen a un sitio de corte que reconoció la enzima *RsaI*, generando dos bandas con tamaños aproximados de 358pb y 174pb que están presentes en el perfil R13 (este tipo de restricción se puede ver en los operones 2, 4, 6 y 7 de la cepa *E. coli* ED1a, ver **esquema 17**,

donde la restricción en el ISR1 genera dos bandas de 358pb y 163pb). Obviamente las mutaciones no ocurren por igual en todos los operones, y por lo tanto, se pueden conservar una o más copias con secuencias primitivas del operón, en este perfil, un operón que genera la banda de 520pb es conservado. El nuevo perfil que surgiría si ocurriera ese evento genético (2do. cuadro del **esquema 21**), sería el perfil R13. Las bandas de 520pb, 454pb, 260pb y 198pb se conservan entre los perfiles R1 y R13.

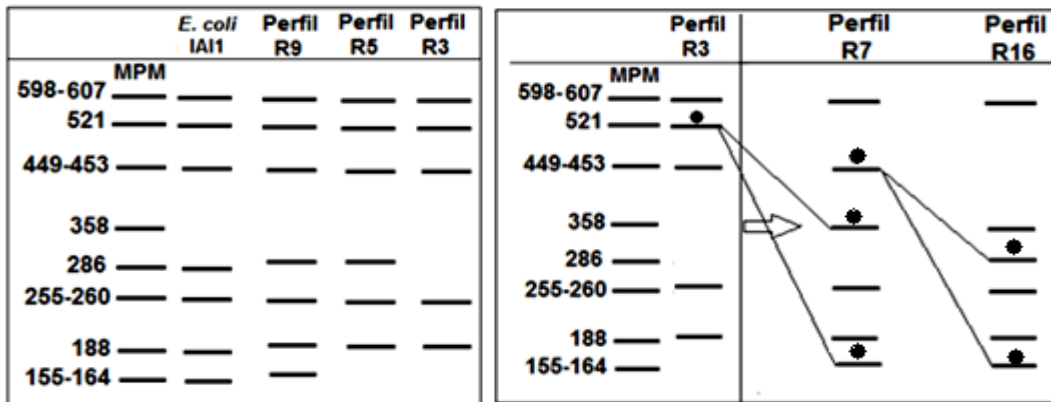
En el tercer cuadro del **esquema 21**, proponemos la generación del perfil R6 a partir del perfil de *E. coli* K-12 W3110. En esta ocasión, la banda 520pb desaparece completamente en el perfil R6 y genera las dos bandas antes mencionadas en R13 (358pb y 174pb). Para que esto suceda, tendrían que cambiar los dos operones (D y C) la secuencia de reconocimiento para la enzima *RsaI*, lo que sugiere, que el perfil R6 se ha diferenciado en un mayor nivel del perfil que presenta la cepa *E. coli* K-12 W3110. El perfil R6, además de las bandas 358pb y 174pb (155-164pb en *E. coli* K-12 W3110) generadas por la banda de 520pb, conserva ciertas características presentando bandas de 454pb, 300pb (286pb en *E. coli* K-12 W3110), 260pb y 198pb (188pb en *E. coli* K-12 W3110) del perfil de la cepa *E. coli* K-12 W3110.

En el **esquema 21**, 4to. Cuadro, a partir del perfil R1, se propone el patrón de bandeo generado en R14. Podemos observar que para el perfil R14, además de la pérdida de la banda 520pb (mismo caso que en el perfil R6, antes mencionado) que generó las bandas 358pb y 174pb, se conservan las demás bandas presentes en R1: 454pb, 260pb y 198pb. La pérdida de la banda 520pb nos indica el grado de diferenciación entre los operones de los perfiles de estas cepas.

Los perfiles R6 y R14 difieren entre ellos por la presencia de la banda de 300pb en R6, probablemente generada por el reconocimiento de un corte de restricción por *RsaI*, en un operón ISR2 cercano al extremo 3' del gen 16S (ver **esquema 6**, banda 286pb), conservando las demás bandas (454pb, 358pb, 260pb, 198pb y

174pb) en ambos perfiles (**esquema 21**), indicando que podrían estar relacionados ambos perfiles.

Análisis del perfil generado en la cepa *E. coli* IA11 (cepa comensal).



Esquema 22. Relación de perfiles entre la cepa *E. coli* IA11 y los perfiles R9, R5, R3, R7 y R16 generados en las cepas clínicas ETEC.

La cepa *E. coli* IA11 presenta el mismo perfil de restricción por *RsaI* que el perfil R9 de las cepas ETEC (ver **esquema 22**, primer cuadro). Las bandas 608pb, 520pb, 454pb, 300pb (286pb en *E. coli* IA11), 260pb y las bandas 198pb y 174pb (188pb y 155-164pb en *E. coli* IA11) están presentes en ambos perfiles.

Entre los perfiles R9 y R5 que presentaron las cepas de ETEC, la ausencia de la banda 174pb en R5 (**esquema 22**, primer cuadro) hace que se diferencien entre sí. Probablemente, debido a esta diferencia con respecto a esa banda de menor tamaño, R5 puede estar relacionada con cepas con el perfil R9. Con respecto al perfil R3, las bandas con tamaños de 300pb y 174pb no están presentes en este perfil a diferencia de R9, y con respecto al perfil R5, la única banda de diferencia entre los perfiles (R3 y R5) es la banda de 300pb ausente en R3. Sin embargo, se conservan bandas características de 607pb, 520pb, 454pb, 260pb y 198pb entre los tres perfiles (R9, R5 y R3).

La diferencia del patrón de restricción generado entre los perfiles R3 y R9 (mismo perfil generado en *E. coli* IA11) puede ser debido al no reconocimiento del corte de

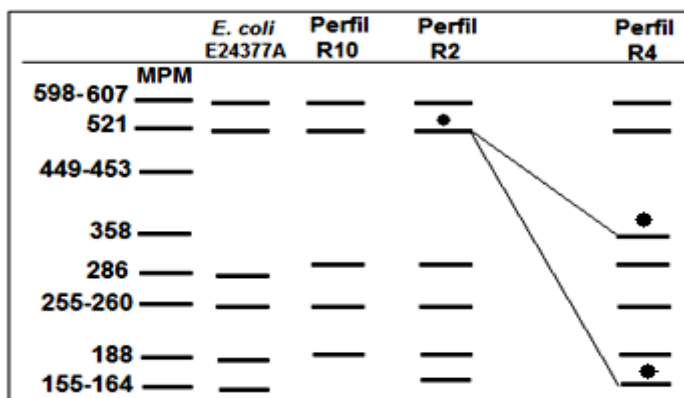
restricción por la enzima *RsaI*, debido a un cambio de base en un operón ISR2 que genera las bandas de 300pb y 174pb presentes en el perfil R9 (ver **esquema 6**, operón 1, bandas 286pb y 163pb), donde probablemente en el perfil R3 no se lleva a cabo el corte en el ISR cercano al extremo 3' del gen 16S. Lo que indica que este tipo de cepas tiene sus 3 operones ISR2 con el mismo tipo de restricción al de los operones 3 y 5 de la cepa *E. coli* IA11 (ver **esquema 7**).

Los perfiles R7 y R16 que presentaron cepas de ETEC, proponemos que se han generado a partir del perfil R3, sin embargo, han ocurrido varios cambios en la secuencia de reconocimiento de la enzima *RsaI* en los operones, que los han diferenciado en gran medida, sugiriendo que son cepas completamente diferentes. El perfil R7, se diferencia del perfil R3 en la pérdida de la banda 520pb, que genera las bandas 358pb y 174pb (antes mencionado en *E. coli* K-12 W3110). Las demás bandas que se conservan en ambos perfiles son: 607pb, 454pb, 260pb y 198pb (ver **esquema 22**, segundo cuadro).

El perfil R16 se genera a partir de la pérdida de la banda 454pb que presenta el perfil R7 por la restricción de *RsaI*, generando dos bandas aproximadamente de 300pb y 174pb (este tipo de restricción se puede ver en el operón 1 (ISR2) de la cepa *E. coli* IA11, ver **esquema 6**, donde se generan tamaños de 286pb y 163pb). Las bandas 607pb, 358pb, 260pb, 198pb y 174pb se conservan en ambos perfiles (ver **esquema 22**, segundo cuadro).

La pérdida de bandas que producen un nuevo perfil (sobre todo las de mayor tamaño), nos habla que la secuencia de reconocimiento para la enzima *RsaI* ha cambiado para todos los operones que generaban esa banda característica, sin conservar secuencias primitivas, refiriéndose ya no solo a una mutación que puede ocurrir en un solo operón, si no que la cepa con dicho perfil generado se ha diferenciado completamente de las demás.

Análisis del perfil generado en la cepa *E. coli* E24377A (cepa ETEC).



Esquema 23. Relación de perfiles entre la cepa *E. coli* E24377A y los perfiles R10, R2 y R4 generados en las cepas clínicas ETEC.

La cepa *E. coli* E24377A presenta el mismo patrón de restricción por *RsaI* que el perfil R2 (ver **esquema 23**), donde las bandas 607pb, 520pb, 300pb (286pb en *E. coli* E24377A), 260pb y las bandas 198pb y 174pb (188pb y 155-164pb en *E. coli* E24377A) se conservan en ambos perfiles.

El perfil R2 se diferencia de R10 únicamente en la ausencia de la banda 174pb en R10, lo que nos habla probablemente que estén relacionadas genéticamente.

Los perfiles R2 y R4 están estrechamente relacionados, diferenciados únicamente por la banda de 358pb, presente en R4 (**esquema 23**). Probablemente esta banda se genera a partir de una mutación en la secuencia de nucleótidos para el reconocimiento de la enzima *RsaI*, haciendo que se produzca un corte en el intergénico cercano al extremo 3' del gen 16S de un operón ISR1 que genera la banda de 521pb [En la cepa *E. coli* E24377A tres operones ISR1 (D, F y G) producen esta banda, ver **esquema 13**], conservando la secuencia primitiva de los otros operones, ya que la banda de 520pb se mantiene en R4. La restricción de la banda 521pb genera dos bandas con tamaños aproximados de 358pb y 174pb (este tipo de restricción se puede ver en los operones ISR1 2, 4, 6 y 7 de la cepa *E. coli* ED1a, ver **esquema 17**, donde se generan tamaños de 358pb y 163pb).

Las bandas 608pb, 520pb 300pb, 260pb, 198pb y 174pb se conservan entre los perfiles (R2 y R4).

Análisis del perfil generado en la cepa *E. coli* ED1a (cepa comensal).

	<i>E. coli</i> ED1a	Perfil R8
MPM		
521 _____		
449-453 _____		
358 _____	_____	_____
286 _____	_____	_____
255-260 _____	_____	_____
231 _____	_____	
188 _____	_____	_____
155-164 _____	_____	_____

Esquema 24. Relación de perfiles entre la cepa *E. coli* ED1a y el perfil R8 generado en las cepas clínicas ETEC.

La cepa *E. coli* ED1a presenta un patrón de bandeo muy similar al perfil R8 generado en las cepas clínicas ETEC, con la única diferencia de la ausencia de la banda 231pb en el perfil R8. Esta banda se produce en el gen 23S, donde no se produce un corte de restricción por *RsaI* que es común en los demás tipos de operones de esta cepa (**esquema 15**). Las demás bandas 358pb, 300pb (286pb en *E. coli* ED1a), 260pb y las bandas 198pb y 174pb (188pb y 155-164pb en *E. coli* ED1a) se conservan en ambos perfiles (**esquema 24**).

Los perfiles de restricción R11, R12, R15 y R17 que presentaron algunas cepas de ETEC estudiadas, no se relacionó su patrón de bandeo con alguna de las cepas estudiadas *In-silico*, lo que sugiere que estas cepas presentan un diferente polimorfismo. Sin embargo, los tamaños de las bandas que se generaron en su perfil, son en su mayoría los mismos tamaños que están presentes en los perfiles descritos anteriormente y las bandas de 260pb y 198pb, se siguen observando en sus perfiles.

A partir de los resultados presentados por **Antón A. I., et al (1)**, donde analizan las secuencias del ISR 16S-23S RNAr de los siete operones *rrn* de 12 cepas de la colección ECOR y la cepa *E. coli* K-12, concluyen que la mayoría de las sustituciones de nucleótidos dispersos que afectan a ambos tipos de regiones (ISR1 y ISR2) se encuentra al principio (11-21nt) del extremo 3' del gen 16S y al final (368-376nt) cercano al extremo 5' del gen 23S. Este polimorfismo es parcialmente responsable de la diversidad en el PCR-RFLP de los ISR de los aislamientos uropatógenos de cepas de *E. coli* descritos en **García-Martínez, J., et al. (13)**. Así mismo, podemos referirnos a estas sustituciones de nucleótidos como las responsables del polimorfismo encontrado en nuestra colección de cepas patógenas de ETEC, ya que a partir de los resultados obtenidos experimentalmente, se pudo relacionar el tamaño de la bandas generadas en el patrón de restricción de cada perfil con las bandas generadas en el análisis *In-silico*, donde los principales sitios de corte por la enzima *RsaI* en la secuencia de nucleótidos del ISR son los referidos por **Antón A. I., et al (1)**.

4.6 Análisis de los perfiles identificados en las cepas de ETEC aisladas en cada niño a lo largo de sus dos primeros años de vida.

En cada uno de los esquemas se muestra el día de vida del niño en que fueron aisladas las cepas y si estuvo acompañado de un evento diarreico (mostrado con un punto negro), al igual que el tamaño y el número de bandas de los perfiles obtenidos por la restricción con *RsaI* y su serotipo. A cada una de las cepas aisladas le fue asignado un número consecutivo de acuerdo a su aislamiento.

Niño 1 (No. 85020747) Tabla 3.

Edad (días)	15	139	258	274	540	546	624	685	730
# Cepa	1	2 3	4	5 6	7	8 9	10	11 12	13
Diarrea	○	○ ○	●	● ●	●	○ ○	○	○ ○	○
# Bandas	5	4 4	6	5 5	6	6 7	7	4 5	5
Perfil	R3	R1 R1	R2 R3 R3	R2 R2 R4 R4	R1 R14 R14				
Tamaño (pb)	608 520 454	520 520 454	608 520 454	608 520 454	608 520	608 520	608 520	608 520	520 454 454
			300			358	358		358
	260	260	260	260	260	260	260	260	260
	198	198	198	198	198	198	198	198	198
			174			174	174		174
Serotipo	1. O20:H- 2. O90:H34 3. O78:H2 4. O29:H11 5. OR:H27		6. O128:H27 7. OR:H27 8. O159:H20 9. O8:H9 10. O39:H9		11. O?:H7 12. O?:H- 13. O80:H26				
	● Presencia de diarrea		○ Ausencia de diarrea						

Se trabajaron 13 cepas de *E. coli* enterotoxigénica aisladas del niño número 1 en diferentes días (15, 139, 258, 274, 540, 546, 624, 685 y 730) después de su nacimiento, durante sus dos primeros años de vida. Las cepas estudiadas procedentes de este niño presentaron cinco perfiles (R3, R1, R2, R4, R14). El día 15 de vida del niño se aisló una cepa que presentó el perfil R3 (de cinco bandas). El día 139 fueron aisladas 2 cepas de ETEC que tuvieron el mismo perfil R1 (de 4 bandas) indicando que ambas cepas pertenecen a la misma clona. La comparación del perfil R3 (aislamiento día 15) y el perfil R1 (aislamientos día 139) de estas cepas, muestra que la diferencia se basa únicamente en la ausencia (perfil R1) ó presencia (perfil R3) de una banda de aproximadamente 608pb, esto indica que se tratan de dos cepas muy diferentes, debido a que esta banda es

producida por un operón (ISR1), en el cual no se realiza ningún corte de restricción en su espacio intergénico y su amplificado por PCR de un mayor tamaño, hace que se diferencie de un operón (ISR1) que produce una banda de 520pb (ver **esquemas 8 y 9**). Sin embargo, entre ambos perfiles comparten 4 bandas (520pb, 454pb, 260pb y 198pb) (**Tabla 3**). El día 258 de vida de este niño se presentó un cuadro de diarrea acuosa, aislándose de heces una cepa que presentó el perfil R2 (de 6 bandas), perfil que presenta el mismo patrón de restricción que la cepa *E. coli* E24377A (ver **esquema 23**). El perfil de este nuevo aislamiento es muy diferente al perfil R1 (cepa anteriormente aislada). Las cepas con perfil R2 y perfil R3, se han diferenciado genéticamente entre sí, ya que las bandas de 300pb y 174pb que presenta el perfil R2, que son generadas en operones ISR2 (ver **esquema 11**, bandas 286pb y 163pb) por dos cortes de restricción en su intergénico. Probablemente, en operones de cepas con el perfil R3, el sitio de corte cercano al extremo 3' del gen 16S no es reconocido por la enzima *RsaI*, debido a un cambio de base, lo que implicaría que se formara una banda de aproximadamente 454pb (449pb en el operón de la cepa *E. coli* E24377A), sin embargo, esto debe ocurrir en los 3 operones ISR2 de la cepa con perfil R3, lo que indica en gran medida su diferenciación. El día 274 en un evento de diarrea, se aíslan 2 cepas que presentan nuevamente el perfil R3, mismo de la cepa aislada el día 15 (259 días después). El día 540 se presentó otro episodio diarreico aislándose nuevamente una cepa con el perfil R2. Para el día 546 del niño no se registra diarrea y se aíslan dos cepas que presentan perfiles diferentes (R2 y R4). El perfil R2 se ha presentado en cepas aisladas de diferentes días en el niño, sugiriendo que estas cepas han persistido en el intestino del niño por más de 280 días. La cepa con el perfil R4 al parecer es una subclona del perfil R2, donde la diferencia entre los perfiles es una banda de 358pb presente en R4. Probablemente esta banda es generada por un cambio de base en un operón ISR1 que genera la banda de 520pb (ver **esquema 13**) que dio origen a un sitio de corte en el ISR para la enzima *RsaI*, dividiendo a ésta banda en dos fragmentos con tamaños de 358pb y 174pb aproximadamente, presentes en el perfil R4 (ver explicación en **esquema 23**), conservándose entre los perfiles las bandas de

608pb, 520pb, 300pb, 260pb, 198pb y 174pb (**Tabla 3**). El día 624 de vida del niño, nuevamente se aisló una cepa con el perfil R4, indicando que ésta cepa ha permanecido 78 días en el intestino del niño sin producir enfermedad. El día 685 se aislaron dos cepas con perfiles diferentes (R1 y R14). La cepa con perfil R14, probablemente se ha diferenciado del perfil R1, por la pérdida de la banda de 520pb en R14 (presente en R1), ocasionado por la restricción de la enzima *RsaI* en operones ISR1 que generan este tamaño de banda, produciendo dos bandas con tamaños de 358pb y 174pb aproximadamente (ver explicación **esquema 21**, cuarto cuadro). Por último, el día 730 de vida de este niño se aísla una cepa de ETEC con el perfil R14, mismo identificado en la cepa aislada 14 días antes.

Con respecto a los serotipos detectados se observa una gran diversidad, así mismo para las cepas que fueron aisladas el mismo día y que presentaron el mismo perfil.

Niño 2. (No. 85021447) Tabla 4.

Edad (días)	240		333		541		546		606		613		653		658	
# Cepa	1	2	3		4	5	6	7	8	9	10		11			
Diarrea	●	●	○		●	●	●	●	○	●	○		●			
# Bandas	6	6	5		5	6	5	5	5	4	5		4			
Perfil	<u>R7</u>	<u>R7</u>	<u>R3</u>		<u>R3</u>	<u>R7</u>	<u>R3</u>	<u>R3</u>	<u>R10</u>	<u>R12</u>	<u>R14</u>		<u>R1</u>			
Tamaño (pb)	608	608	608		608	608	608	608	608							
	454	454	454		454	454	454	454			454		454			
	358	358				358					358					
									300	300						
	260	260	260		260	260	260	260	260	260	260		260			
	198	198	198		198	198	198	198	198	198	198		198			
	174	174				174					174					
Serotipo	1. OR:H20		2. O27:H20		3. OR:H-		4. OR:H5		5. O?:H-		6. O64:H5		7. O64:H5		8. O6:H16	
	9. O153:H-		10. OR:H-		11. OR:H-											

● Presencia de diarrea ○ Ausencia de diarrea

En el niño número 2 se trabajaron 11 cepas de ETEC aisladas en diferentes días (240, 333, 541, 546, 606, 613, 653 y 658) después de su nacimiento, las cuales

presentaron seis perfiles (R7, R3, R10, R12, R14 y R1). El día 240 en un cuadro de diarrea acuosa, se aislaron dos cepas que presentaron el mismo perfil R7 (de 6 bandas), indicando que ambas cepas pertenecen a la misma clona. El día 333, en ausencia de diarrea, se aísla una cepa con el perfil R3 (de 5 bandas). Los perfiles R7 y R3, están diferenciados en gran medida por la pérdida de la banda de 520pb en el perfil R7 (presente en R3), probablemente, debido a la restricción de *RsaI* en los operones ISR1 que forman esta banda, generando las bandas de 358pb y 174pb en el perfil R7 (ver explicación en **esquema 22**, segundo cuadro). El día 541 hay un evento diarreico, donde la cepa aislada presenta el perfil R3, mismo que presentó la cepa aislada el día 333 (208 días con anterioridad). Para el día 546 (5 días después) se observa la permanencia de este perfil R3 en dos cepa aislada de diarrea, indicando que ambas cepas del día 546 pertenecen a la misma clona. En el mismo día 546, se aisló una cepa que presentó de nuevo el perfil R7 (aislamiento día 240), que probablemente podría implicar que la cepa ha permanecido 306 días en el intestino del niño. Los días 606 y 613 se aíslan dos cepas que presentan los perfiles R10 (de 5 bandas) y R12 (de 4 bandas) respectivamente, el día 613 estuvo acompañado de diarrea. La cepa con el perfil R12 (día 613), muestra una sola diferencia con respecto al perfil R10 (día 606), la ausencia de una banda de 608pb en R12, compartiendo entre sí las bandas 520pb, 300pb, 260pb, 198pb, siendo los únicos dos perfiles que presentan una banda de 300pb en comparación de los demás perfiles de las cepas aisladas en el niño (**tabla 4**). La banda de 608pb producida por un operón (ISR1), no se realiza ningún corte de restricción en su espacio intergénico y su amplificado por PCR es de un mayor tamaño, con relación a un operón (ISR1) que produce una banda de 520pb (ver **esquemas 8 y 9**). Por tal motivo, las cepas con los perfiles R10 y R12, son muy diferentes. El día 653, se aísla una cepa con perfil R14 (de 5 bandas), su patrón de bandeo es parecido al del perfil R7 (aislado en días anteriores), donde mantienen las bandas 454pb, 358pb, 260pb 198pb y 174pb entre los perfiles, la diferencia se basa en la banda de 608pb, ausente en R14 (**tabla 4**), mismo caso que los perfiles antes descritos (R10 y R12), lo que implica que se tratan de cepas muy diferentes. El día 658 en un evento de diarrea se aísla una cepa con el perfil

R1 (de 4 bandas). Como se mencionó en el niño 1, el perfil R14 suponemos que se ha diferenciado del perfil R1, por la pérdida de la banda de 520pb en R14, ocasionado por la restricción de la enzima *RsaI* en operones ISR1 que generan este tamaño de banda, produciendo dos bandas con tamaños de 358pb y 174pb aproximadamente (ver explicación **esquema 21**, cuarto cuadro).

Con respecto a los serotipos identificados, se muestra una gran diversidad, sin embargo, las dos cepas aisladas el día 546 (con perfil R3), presentan el mismo serotipo O64:H5; y comparten el mismo antígeno H con la cepa del día 541 que presenta el mismo perfil de restricción. Igualmente las dos cepas aisladas el día 240 (perfil R7), tienen el mismo antígeno H20.

Niño 3. (No. 86061047) Tabla 5.

Edad (días)	132			135			244			274		
# Cepa	1	2	3	4	5	6	4	5	6	4	5	6
Diarrea	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
# Bandas	4	5	6	6	5	5	6	5	5	6	5	5
Perfil	<u>R11</u>	<u>R3</u>	<u>R2</u>	<u>R2</u>	<u>R14</u>	<u>R14</u>						
Tamaño (pb)	575	608	608	608			608					
	537	520	520	520			520					
		454								454	454	
			300							358	358	
	260	260	260	300			300					
	198	198	198	260	260	260	260	260	260	260	260	260
			174	198	198	198	198	198	198	198	198	198
				174	174	174	174	174	174	174	174	174
Serotipo		1. O?:H29			4. O6:H16					5. OR:H-		
		2. O64:H-			6. O20:H-							
		3. OR:H-										

● Presencia de diarrea ○ Ausencia de diarrea

Para el niño número 3, se trabajaron 6 cepas de ETEC aisladas de diferentes días (132, 135, 244 y 274) después de su nacimiento, las cuales presentaron cuatro perfiles (R11, R3, R2, R14). Todas las cepas fueron aisladas en eventos de diarrea. El día 132 de vida del niño se aisló una cepa que presentó el perfil R11 (de 4 bandas), el cual presenta dos bandas completamente diferentes (575pb y 537pb) a todos los demás perfiles de las cepas aisladas en el niño y de toda la

colección de cepas de ETEC que se trabajaron (esta cepa presenta un producto de PCR diferente al de las demás cepas de ETEC). Sin embargo, conserva las dos bandas comunes para todos los aislamientos (260pb y 198pb) (**tabla 5**). El día 135, se aíslan dos cepas que presentan perfiles diferentes (R3 y R2), la diferencia entre estos perfiles (ya descrita en el niño 1), es la presencia de la banda 454pb en el perfil R3, que es generada por el no reconocimiento de un corte en el intergénico por *RsaI* cercano al extremo 3' del gen 16S en los operones ISR2 que generan las bandas de 300pb y 174pb presentes en el perfil R2 (**esquema 11**) conservándose las demás bandas (608pb, 520pb, 260pb y 198pb). Como se ha mencionado anteriormente, el perfil R2 presenta el mismo patrón de restricción que el generado por la cepa *E. coli* E24377A (**esquema 23**). Para el día 244 (109 días después) persiste una cepa que presenta el mismo perfil R2 (aislada del día 135). Para el día 274, se aísla dos cepas que presentaron el mismo perfil R14 (de 5 bandas), indicando que ambas cepas pertenecen a la misma clona. El patrón de bandeo de estas cepas aisladas del niño, nos habla que las cepas que colonizaron el intestino son muy diferentes entre sí, indicando probablemente que el niño fue colonizado por diferentes cepas en los respectivos días.

Con respecto a los serotipos identificados, son diferentes para todas las cepas.

Niño 4. (No. 85030147) **Tabla 6.**

Edad (días)	77	95	212	241	287	441	504	540	547	639	645	685	700																	
# Cepa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15															
Diarrea	○	○	○	○	○	●	○	○	●	●	●	○	●	○	○															
# Bandas	6	7	5	5	5	5	6	5	5	5	5	6	5	5	4															
Perfil	<u>R6</u>	<u>R9</u>	<u>R10</u>	<u>R10</u>	<u>R3</u>	<u>R3</u>	<u>R5</u>	<u>R10</u>	<u>R10</u>	<u>R10</u>	<u>R3</u>	<u>R6</u>	<u>R3</u>	<u>R10</u>	<u>R12</u>															
Tamaño (pb)		608 520 454	608 520	608 520 454	608 520	608 520 454	608 520 454	608 520	608 520	608 520	608 520	608 520 454	608 520 454	608 520	608 520															
	358	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	358	300	300	300															
	260	260	260	260	260	260	260	260	260	260	260	260	260	260	260															
	198	198	198	198	198	198	198	198	198	198	198	198	198	198	198															
	174	174										174																		
Serotipo	1. O107:H10		2. O107:H-		3. O120:H-		4. O166:H-		5. O128:H27		6. O16:H7		7. O164:H31		8. OR:H-		9. O159:H-		10. O159:H-		11. O64:H5		12. O80:H26		13. O175:H27		14. O29:H11		15. O6:H16	

● Presencia de diarrea ○ Ausencia de diarrea

En el niño número 4 se trabajaron 15 cepas aisladas en diferentes días (77, 95, 212, 241, 287, 441, 504, 540, 547, 639, 645, 685 y 700) después de su nacimiento, las cuales presentaron seis perfiles (R6, R9, R10, R3, R5, R12). En el día 77 de vida del niño se aisló una cepa de ETEC que presentó el perfil R6 (de 6 bandas), la cual se aisló sin presencia de diarrea. Para el día 95, se observa la colonización de una cepa que presenta un perfil R9 (de 7 bandas), perfil completamente diferente al anterior, este perfil (R9) presenta el mismo patrón de restricción que la cepa *E. coli* IA11 (ver **esquema 22**). El día 212 se aisló una cepa con perfil R10 (de 5 bandas), la cual difiere con el perfil anterior (R9) en la ausencia de dos bandas (454pb y 174pb), permaneciendo las bandas 608pb, 520pb, 300pb, 260pb y 198pb (**Tabla 6**) entre los perfiles, lo que implica que se tratan de dos cepas muy diferentes. Este perfil R10, se vuelve a presentar en la cepa aislada el día 241, persistiendo en el intestino del niño 29 días. En el día 287 se aísla una cepa con perfil R3 (de 5 bandas). Los perfiles R3 y R9 (este último en el aislamiento del día 95), presentan cierta relación genética. La diferencia del patrón de restricción puede ser debido al no reconocimiento del corte de restricción por la enzima *RsaI* en un operón ISR2 que genera las bandas de 300pb

y 174pb en el perfil R9. Donde probablemente en el perfil R3 no se lleva a cabo el corte en el intergénico cercano al extremo 3' del gen 16S, generando la banda de 454pb (ver explicación en **esquema 22**), sin embargo, las banda de 608pb, 520pb, 454pb, 260pb y 198pb permanecen en ambos perfiles. El día 441 (154 días después) se aísla una cepa de diarrea, que presentó el mismo perfil R3. Para el día 504 se aíslan dos cepas en ausencia de diarrea, que presentan dos perfiles diferentes (R5 y R10). La diferencia entre ambos perfiles es la ausencia de la banda de 454pb en el perfil R10, conservando entre ambos perfiles las bandas de 608pb, 520pb, 300pb, 260pb y 198pb. En el día 540 en un episodio de diarrea, se aísla una cepa con el perfil R10. Una cepa con este mismo perfil (R10) continua persistiendo su aislamiento en el día 547, igualmente en un evento diarreico, persistiendo desde el día 212 de vida del niño (335 días). El mismo día 547 se aisló otra cepa con un perfil R3, ya identificado desde el día 287 (260 días después). El día 639, se aísla una cepa sin evento diarreico que presentó el perfil R6 mismo de la cepa aislada el día 77 (562 días después). Este perfil (R6) se diferencia de los demás perfiles identificados en el niño por no presentar las banda de 608pb y 520pb. El día 645 se aísla una cepa con perfil R3, en presencia de diarrea. Este perfil R3, se ha aislado desde el día 287 de vida del niño, lo que probablemente se traten de cepas relacionadas genéticamente que presentan el mismo perfil de restricción, que se ha mantenido en el intestino del niño por 358 días. El día 685 se obtiene una cepa con perfil R10, cuyo perfil se ha identificado a lo largo de la mayoría de los aislamientos en el niño, lo que nos podría indicar igualmente, que un grupo de cepas que presentan el mismo perfil de restricción se han mantenido en el intestino (417 días después). El día 700 de vida del niño se aísla una cepa con un perfil R12, la banda de 608 ausente en este perfil, hace que se distinga entre el perfil R10 (anteriormente aislado), conservando las bandas de 520pb, 300pb, 260pb y 198pb entre los perfiles. La banda de 608pb es producida por un operón ISR1, en el cual no se realiza ningún corte de restricción en su intergénico y su amplificado por PCR es de un mayor tamaño, en comparación de un operón ISR1 que produce una banda de 520pb (ver **esquemas 8 y 9**), motivo por el cual difieren entre sí.

Con respecto a los serotipos, las cepas aisladas los días 77 y 95, presentan el mismo serogrupo O107, sin embargo, son cepas que presentan un perfil muy diferente. Los días 540 y 547, se aíslan dos cepas que presentan el mismo perfil R10 y sus serotipos son el mismo, O159:H-

Niño 5. (No. 85031747) Tabla 7.

Edad (días)	168			278		303		636		729
# Cepa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Diarrea	○	○	○	●	●	●	●	●	○	
# Bandas	6	6	4	4	6	6	6	7	7	
Perfil	<u>R6</u>	<u>R6</u>	<u>R1</u>	<u>R1</u>	<u>R2</u>	<u>R6</u>	<u>R2</u>	<u>R9</u>	<u>R9</u>	
Tamaño (pb)			520	520	608		608	608	608	
	454	454	454	454		454		454	454	
	358	358				358				
	300	300			300	300	300	300	300	
	260	260	260	260	260	260	260	260	260	
	198	198	198	198	198	198	198	198	198	
	174	174			174	174	174	174	174	
Serotipo	1. O170:H- 2. O170:H- 3. O64:H- 4. O78:H12 5. O166:H?					6. 64474:H32 7. OR:H- 8. O29:H11 9. O?:H-				

● Presencia de diarrea ○ Ausencia de diarrea

Para el niño número 5, se trabajaron 9 cepas aisladas de diferentes días de vida (168, 278, 303, 636 y 729), las cuales presentaron cuatro perfiles (R6, R1, R2, R9). El día 168 se aíslan tres cepas de ETEC, dos cepas presentaron un perfil R6 (de 6 bandas), indicando que se trata de la misma clona y una cepa con un perfil R1 (de 4 bandas). Estos dos perfiles son muy distintos entre sí (**Tabla 7**), por lo tanto se habla de una infección mixta, donde dos cepas colonizaron el intestino del niño el mismo día. Para el día 278 (110 días después) se mantiene el perfil R1 en una cepa aislada en un evento con diarrea. El día 303 de vida del niño, se aíslan dos cepas en un evento de diarrea acuosa que presentan perfiles diferentes (R2 y R6), su patrón de bandas entre los perfiles difiere considerablemente (**Tabla 7**), indicando que se trata de una infección de dos cepas completamente diferentes aisladas el mismo día. El perfil R6, anteriormente identificado en el aislamiento del

Para el niño número 6, se trabajaron 4 cepas aisladas de diferentes días (164, 172 y 304), las cuales presentaron cuatro perfiles (R4, R3, R6, R9). Las cuatro cepas aisladas presentaron un perfil diferente. El día 164 se aisló una cepa con perfil R4 (de 7 bandas) sin presencia de diarrea. El día 172, en un evento de diarrea acuosa, se aisló una cepa que presentó el perfil R3, patrón muy diferente al anterior, tratándose de dos cepas muy diferentes que colonizan al niño. El día 304 se aíslan dos cepas de diarrea con perfil diferente (R6 y R9), los cuales presentan varias diferencias en su patrón de bandeo (**Tabla 8**), refiriéndose que son dos cepas completamente diferentes que colonizan en el mismo tiempo. La cepa con perfil R9, presenta el mismo patrón de restricción que la cepa *E. coli* IA11 (**Esquema 22**, primer cuadro). Entre los perfiles R3 y R9, como se ha mencionado con anterioridad, presentan cierta relación genética. La diferencia del patrón de restricción puede ser debido al no reconocimiento del corte de restricción por la enzima *RsaI* en un operón ISR2 del perfil R3, que generan las bandas de 300pb y 174pb en el perfil R9 (ver explicación en **esquema 22**), sin embargo, las bandas de 608pb, 520pb, 454pb, 260pb y 198pb permanecen en ambos perfiles.

Con respecto a los serotipos, presenta cada cepa uno diferente, sin embargo la cepa 3 (con el perfil R6), se identificó el serotipo 64474:H32, el mismo serotipo que presenta la cepa 6 aislada del niño 5 (día 303), estas dos cepas coinciden también en tener el mismo perfil R6.

Niño 7. (No. 86060947) **Tabla 9.**

Edad (días)	29			148	166		282
# Cepa	1	2	3	4	5	6	7
Diarrea	○	○	○	●	○	○	●
# Bandas	7	7	7	6	6	6	6
Perfil	R9	R9	R9	R2	R6	R6	R2
Tamaño (pb)	608	608	608	608			608
	520	520	520	520			520
	454	454	454		454	454	
					358	358	
	300	300	300	300	300	300	300
	260	260	260	260	260	260	260
	198	198	198	198	198	198	198
	174	174	174	174	174	174	174
Serotipo	1. O109:H20 2. O109:H19 3. O109:H21 4. O29:H11			5. O152:H- 6. O152:H- 7. O25:H42			

● Presencia de diarrea ○ Ausencia de diarrea

Para el niño número 7, se trabajaron siete cepas aisladas de diferentes días (29, 148, 166 y 282) de vida de niño, las cuales presentaron tres perfiles (R9, R2, R6). El día 29 de vida del niño se aislaron tres cepas de ETEC que presentaron el mismo perfil R9 (de 7 bandas), indicando que se tratan de la misma clona. Estas cepas, presentan el mismo perfil de restricción que la cepa *E. coli* IA11 (**esquema 22**, primer cuadro). El día 148 se aisló una cepa en un evento de diarrea que presentó un perfil R2 (de 6 bandas), este perfil se diferencia del anterior (R9), por la ausencia de la banda 454pb en R2, ambos perfiles presentan las bandas 608pb, 520pb 300pb, 260pb, 198pb 174pb. La cepa con perfil R2, presenta el mismo perfil de restricción que la cepa *E. coli* E24377A (**esquema 23**). El día 166, se aíslan dos cepas (en ausencia de diarrea) que presentan el mismo perfil R6 (de 6 bandas), indicando ser la misma clona. Este perfil (R6) se observa claramente que se trata de una cepa completamente diferente a las demás aisladas en el niño, ya que difiere por la ausencia de las bandas 608pb y 520pb presentes en los perfiles anteriores (R9 y R2) y por la presencia de la banda 358pb en este perfil (**Tabla 9**). El día 282, en un evento de diarrea, se aísla una cepa con perfil R2, mismo perfil identificado el día 148, lo que podría indicar que la cepa ha permanecido 134 días en el intestino del niño, volviendo a producir la enfermedad.

Con respecto al serotipo, las tres cepas aisladas el día 29 que presentaron el mismo perfil, solo las cepas 2 y 3 presentaron el mismo serogrupo O109, defiriendo en antígeno H, la otra cepa 1, presento un serotipo distinto. Las dos cepas aisladas el día 166 con el mismo perfil (R6), presentaron el mismo serotipo O152:H-

Niño 8. (85031247). Tabla 10.

Edad (días)	151	243	272	349	362	490	579	656	670
# Cepa	1	2	3 4	5 6	7	8	9 10	11	12 13
Diarrea	○	●	○ ○	○ ○	○ ○	● ○	○ ○	○ ○	○ ○
# Bandas	7	5	7 7	7 7	6	6	5 5	5	7 7
Perfil	R9	R3	R9 R9	R9 R9	R6	R13	R15 R15	R14	R4 R9
Tamaño (pb)	608 520 454	608 520 454	608 608 520 520 454 454	608 608 520 520 454 454	608 520 454	608 520 454	358 358 520 454	454 454 454	358 608 608 520 520 454
	300		300 300	300 300	300		300 300	358	300 300
	260	260	260 260	260 260	260 260	260	260 260	260	260 260
	198	198	198 198	198 198	198 198	198	198 198	198	198 198
	174		174 174	174 174	174 174	174	174 174	174	174 174
Serotipo	1. O4:H16				6. O64:H-		11. O64:H-		
	2. O25:H-				7. O?:H-		12. O8:H9		
	3. O56:H-				8. O1:H45		13. O8:H9		
	4. O56:H-				9. O?:H-				
	5. OR:H2				10. O?:H-				

● Presencia de diarrea ○ Ausencia de diarrea

En el niño número 8 se trabajaron 13 cepas ETEC aisladas de diferentes días (151, 243, 272, 349, 362, 490, 579, 656 y 670) de vida del niño, las cuales presentaron siete perfiles (R9, R3, R6, R13, R15, R14, R4). El día 151 la cepa aislada presentó el perfil R9 (de 7 bandas). Este perfil (R9), como se ha mencionado con anterioridad, presenta el mismo patrón de restricción que la cepa *E. coli* IA11 (**Esquema 22**, primer cuadro). El día 243 se aisló una cepa de diarrea que presentó el perfil R3, este perfil difiere por la ausencia de dos bandas (300pb y 174pb) con respecto al perfil anterior (R9). Como se ha dicho con anterioridad, los perfiles R3 y R9, presentan cierta relación genética. La diferencia del patrón de restricción puede ser debido al no reconocimiento del corte de restricción por la enzima *RsaI* en un operón ISR2 del perfil R3, que genera las bandas de 300pb y

174pb en el perfil R9 (ver explicación en **esquema 22**), sin embargo, las bandas de 608pb, 520pb, 454pb, 260pb y 198pb permanecen en ambos perfiles. El perfil R9 se vuelve a identificar en las cepas aisladas los días 272 y 349 (en ausencia de diarrea), aislándose en ambos días dos cepas con el mismo perfil, indicando que se trata de la misma clona. Este perfil R9, ha permanecido 198 días en el intestino del niño sin causar enfermedad. El día 362 se aísla una cepa de diarrea que presenta el perfil R6 (de 6 bandas), esta cepa presenta un patrón muy diferente a los perfiles encontrados con anterioridad (R9 y R3), donde las bandas de 608pb y 520pb desaparecen en este perfil (**tabla 10**). Para el día 490, se aísla una cepa que presenta el perfil R13 (de 6 bandas) en ausencia de diarrea, que difiere considerablemente con el perfil anterior identificado. El día 579 se aíslan dos cepas con mismo perfil R15 (de 5 bandas), tratándose de la misma clona. Entre el perfil R15 (aislamiento día 579) y el perfil R6 (aislamiento día 362) la diferencia entre ellos es la banda de 358pb ausente en R15, compartiendo las demás bandas entre ellos (ver **tabla 10**). El día 656 se aísla una cepa que presenta el perfil R14 (de 5 bandas), este perfil difiere de R6 (identificado día 362), en la ausencia de la banda de 300pb en el perfil R14, conservando las demás bandas entre ambos (ver **tabla 10**). Como podemos observar en la línea de aislamientos del niño, a partir del día 362 hasta el día 656, se ve claramente la colonización de un grupo de cepas muy diferentes a las cepas aisladas con anterioridad, de los perfiles identificados (R6, R13, R15 y R14), los cuatro no presentan la banda de 608pb y tres no presentan la banda de 520pb (**Tabla 10**). Por último el día 670, se aíslan dos cepas, una presenta el perfil R9 detectado desde el día 151 (519 días después) y otra cepa un el perfil R4. El perfil R9 ha sido el más prevalente en los aislamientos de éste niño. El perfil R4 (de 7 bandas), no presenta la banda de 454pb, banda presente en todos los perfiles de las cepas aisladas en el niño.

Con respecto a los serotipos identificados, el día 272 donde se aislaron dos cepas que presentaron el mismo perfil (R9), se identificó el mismo serotipo O56:H-. El día 349, cepa 6, y el día 656, cepa 11, presentan el mismo serotipo O64:H-, sin embargo, difieren en perfiles. Las dos cepas aisladas el día 670, presentan el mismo serotipo O8:H9, sin embargo se identificaron dos perfiles diferentes (R4 y

R9), observándose la discriminación entre cepas que tienen la misma característica fenotípica.

Niño 9. (85030847) Tabla 11.

Edad (días)	47	211	258	303	334	439	504	610	652	
# Cepa	1	2 3	4	5	6	7	8	9	10	
Diarrea	○	○ ○	○	●	●	○	○	●	●	
# Bandas	7	7 7	5	6	6	7	7	6	4	
Perfil	R9	R9 R9	R15	R2	R2	R9	R9	R2	R1	
Tamaño (pb)	608 520 454	608 608 520 520 454 454	454	608 520	608 520	608 520 454	608 520 454	608 520	520 454	
	300	300 300	300	300	300	300	300	300		
	260	260 260	260	260	260	260	260	260	260	
	198	198 198	198	198	198	198	198	198	198	
	174	174 174	174	174	174	174	174	174	174	
Serotipo	1. O27:H18	2. O109:H19	3. O109:H-	4. O?:H-	5. O85:H-	6. O6:H16	7. O103:H21	8. O13:H-	9. O8:H-	10. O167:H5

● Presencia de diarrea ○ Ausencia de diarrea

En el niño número 9 se trabajaron 10 cepas aisladas de diferentes días (47, 211, 258, 303, 334, 439, 504, 610 y 652), las cuales presentaron cuatro perfiles (R9, R15, R2, R1). El día 47 de vida del niño, se aisló una cepa que presentó el perfil R9 (de 7 bandas), mismo patrón de restricción que presenta la cepa *E. coli* IA11 (**esquema 22**, primer cuadro). El día 211, se aíslan dos cepas que presentan el mismo perfil R9, indicando que pertenecen a la misma clona, (antes identificado el día 47), indicando que la cepa ha permanecido 164 días en el intestino del niño sin producir enfermedad. El día 258 se aísla una cepa con perfil R15, que difiere del anterior por la ausencia de dos bandas (608pb y 520pb), manteniendo entre ambos perfiles las bandas de 454pb, 300pb, 260pb, 198pb y 174pb (**tabla 11**). Los días 303 y 334 de vida del niño, se presenta un episodio de diarrea, de estos días se aislaron dos cepas con perfil R2 respectivamente (permaneciendo 31 días). Este perfil R2, presenta el mismo patrón de restricción que la cepa *E. coli* E24377A (**esquema 23**). Para los días 439 y 504, se aíslan dos cepa

respectivamente, que presentaron el mismo perfil R9. Este perfil (R9) se identificó anteriormente los días 47 y 211 de vida del niño, lo que probablemente podría indicar que un grupo de cepas que presentan el mismo perfil de restricción, relacionadas genéticamente, han permanecido en el intestino del niño 457 días sin causar diarrea. El día 610, en un evento de diarrea, se aisló una cepa con el perfil R2, este patrón fue observado en cepas aisladas anteriormente los días 303 y 334 (307 días con anterioridad), relacionándose este perfil con la presencia de la enfermedad (**tabla 11**). El día 652, en un evento de diarrea, se aísla una cepa con perfil R1 (de 4 bandas), su patrón de bandeo difiere considerablemente a los perfiles anteriores identificados.

En este niño podemos ver que cepas con el perfil R2 se están aislando de eventos diarreicos, mientras que aislamientos con perfil R9 se presentan en cepas donde no hay enfermedad. Entre los perfiles (R2 y R9) la diferencia entre ellos radica en la restricción de los operones ISR2. Las cepas con perfil R2 presentan los 3 operones ISR2 con dos cortes en el intergénico que producen las bandas de 300pb y 174pb, mientras cepas con perfil R9 presentan dos tipos de cortes en sus operones ISR2, un operón presenta dos cortes en el intergénico generando las bandas de 300pb y 174pb y los otros dos operones solo se produce un corte en el intergénico generando una banda de 454pb.

Con respecto al serotipo se muestra una gran variedad en todas las cepas. Las dos cepas aisladas el día 211, que presentan el mismo perfil R9, tiene el mismo serogrupo O109.

Niño 10. (85020147) Tabla 12.

Edad (días)	244	419			608	610	638
# Cepa	1	2	3	4	5	6	7
Diarrea	●	●	●	●	○	●	○
# Bandas	6	6	4	6	5	6	5
Perfil	<u>R6</u>	<u>R2</u>	<u>R1</u>	<u>R2</u>	<u>R15</u>	<u>R7</u>	<u>R3</u>
Tamaño (pb)		608	608	608	608	608	608
		520	520	520			520
	454		454		454	454	454
	358					358	
	300	300	300		300		
	260	260	260	260	260	260	260
	198	198	198	198	198	198	198
	174	174	174		174	174	
Serotipo	1. O80:H26			5. O?H-			
	2. O88:H25			6. O27:H20			
	3. O8:H44			7. O91:H10			
	4. O36:H26						

● Presencia de diarrea ○ Ausencia de diarrea

Para el niño número 10, se trabajaron 7 cepas aisladas de diferentes días (244, 419, 608, 610 y 638), las cuales presentaron seis perfiles (R6, R2, R1, R15, R7, R3). El día 224 de vida del niño, en un evento diarreico se aisló una cepa con perfil R6 (de 6 bandas). 175 días después del primer evento diarreico (día 419) el niño vuelve a presentar diarrea de donde se aíslan tres cepas, de las cuales dos presentan el mismo perfil R2 (de 6 bandas), indicando que se tratan de la misma clona y una cepa presentó el perfil R1 (de 4 bandas), el patrón de bandas de ambos perfiles, nos habla de dos cepas muy diferentes que están colonizando el intestino del niño en un mismo periodo de tiempo (**tabla 12**). Como se ha mencionado con anterioridad, el perfil R2 presenta el mismo patrón de restricción que la cepa *E. coli* E24377A (**esquema 23**). El día 608, se aisló una cepa con perfil R15 (de 5 bandas) en ausencia de diarrea, que se diferencia en gran medida con los perfiles R2 y R1 anteriormente identificados y con respecto al perfil R6 (aislado día 244), difiere en la banda 358pb ausente en R15, las demás bandas (454pb, 300pb, 260pb, 198pb y 174pb) están presentes en ambos perfiles. El día 610 se aísla una cepa con el perfil R7 (de seis bandas), en un evento de diarrea acuosa, que difiere en gran medida en su patrón de bandeo al perfil anterior (R15) identificado. El día 638 de vida del niño, se aísla una cepa que presenta el perfil

R3 (de 5 bandas). Entre los perfiles R3 y R7, se propuso con anterioridad (**esquema 22**, segundo cuadro), que el perfil R7 se ha diferenciado del perfil R3 por la pérdida de la banda 520pb (presente en R3) por la restricción de *RsaI*, generando las bandas 358pb y 174pb en el perfil R7. Una gran diversidad de cepas colonizaron el intestino del niño y ningún perfil se observó que persistió en posteriores aislamientos.

Con respecto a los serotipos identificados, son diferentes para todas las cepas.

Niño 11. (85010147) Tabla 13.

Edad (días)	2	61	123	137	294	440	489
# Cepa	1	2	3	4	5	6	7
Diarrea	○	●	●	○	●	○	○
# Bandas	5	7	5	5	6	7	5
Perfil	<u>R14</u>	<u>R9</u>	<u>R14</u>	<u>R14</u>	<u>R2</u>	<u>R4</u>	<u>R3</u>
Tamaño (pb)		608			608	608	608
	454	520			520	520	520
		454	454	454			454
	358		358	358		358	
		300			300	300	
	260	260	260	260	260	260	260
	198	198	198	198	198	198	198
	174	174	174	174	174	174	
Serotipo	1. O170:H- 2. OR:H33 3. OR:H- 4. O64:H-				5. O29:H11 6. O8:H9 7. OR:H-		

● Presencia de diarrea ○ Ausencia de diarrea

Para el niño número 11, se trabajaron 7 cepas aisladas de diferentes días (2, 61, 123, 137, 294, 440 y 489), las cuales presentaron cinco perfiles (R14, R9, R2, R4, R3). El día 2 de vida del niño se aisló una cepa que presentó un perfil R14 (de cinco bandas). El día 61, en un evento de diarrea, se aisló una cepa que presentó el perfil R9 (de siete bandas), perfil que presenta el mismo patrón de restricción que la cepa *E. coli* IA11 (**esquema 22**, primer cuadro). Para los días 123 y 137, se aisló una cepa respectivamente, que presentaron el mismo perfil R14 (anteriormente identificado día 2), probablemente indicando que la cepa ha permanecido durante 121 días en el intestino del niño. Solo el día 123 presentó

diarrea el niño. Estas cepas con perfil R14, se tratan de cepas muy diferentes, en relación a las demás cepas aisladas en el niño, principalmente por la ausencia de las bandas 608pb y 520pb, comunes en los demás perfiles (**tabla 13**). En el día 294 en un evento diarreico, se aísla una cepa que presentó el perfil R2, que presenta el mismo patrón de bandeo que la cepa *E. coli* E24377A (**esquema 23**). El día 440 se aísla una cepa con perfil R4 (en ausencia de diarrea), el cual difiere del perfil R2 (anteriormente aislado) en una banda de 358pb presente en R4. Probablemente esta banda es generada por un cambio de base en un operón ISR1 que genera una banda de 520pb, que dio origen a un sitio de corte en el ISR para la enzima *RsaI*, dividiendo a ésta banda en dos fragmentos con tamaños de 358pb y 174pb aproximadamente, presentes en el perfil R4 (ver explicación en **esquema 23**), conservándose entre los perfiles las bandas de 608pb, 520pb, 300pb, 260pb, 198pb y 174pb. En el día 489, se aísla una cepa con el perfil R3, que presenta cierta relación con el perfil R9 (identificado el día 61). La diferencia entre los patrones de restricción puede ser debido al no reconocimiento del corte de restricción por la enzima *RsaI* en un operón ISR2 del perfil R3, que genera las bandas de 300pb y 174pb en el perfil R9 (ver explicación en **esquema 22**), sin embargo, las banda de 608pb, 520pb, 454pb, 260pb y 198pb permanecen en ambos perfiles.

Con respecto a los serotipos identificados, son diferentes para todas las cepas.

Niño 12. (85030447) Tabla 14.

Edad (días)	2	191	624	654	661
# Cepa	1	2	3	4	5
Diarrea	○	●	●	○	●
# Bandas	5	5	5	5	5
Perfil	<u>R3</u>	<u>R3</u>	<u>R3</u>	<u>R10</u>	<u>R3</u>
Tamaño	608	608	608	608	608
(pb)	520	520	520	520	520
	454	454	454		454
				300	
	260	260	260	260	260
	198	198	198	198	198
Serotipo	1. O166:H10 2. OR:H? 3. O128:H49		4. O129:H- 5. O167:H5		

● Presencia de diarrea ○ Ausencia de diarrea

Para el niño número 12, se trabajaron 5 cepas aisladas de diferentes días (2, 191, 624, 654 y 661), las cuales presentaron dos perfiles (R3, R10). El día 2 de vida del niño, se aisló una cepa que presentó un perfil R3 (de cinco bandas). El día 191 (189 días después), la cepa aislada presenta el mismo perfil R3, con la diferencia de que fue aislada en un evento de diarrea. El día 624, se vuelve a aislar de diarrea una cepa que presenta el perfil R3 y continúa su aislamiento el día 661 (37 días después), produciendo la enfermedad. Sugiriendo que cepas, relacionadas genéticamente, con el mismo perfil (R3) de restricción han permanecido durante 659 días en el intestino del niño. Sin embargo, hay un lapso de 533 días donde no se aisló ninguna cepa de ETEC y no se puede tener una conclusión detallada. Entre estos dos últimos días (624 y 661), se aisló una cepa el día 654, en ausencia de diarrea, que presentó el perfil R10 (de 5 bandas). Entre los dos perfiles identificados en el niño, se observa que se tratan de dos cepas muy distintas (**tabla 14**).

Con respecto al serotipo, fue distinto para cada cepa aislada en el niño.

Niño 13. (85031547) Tabla 15.

	92	283		639		667
# Cepa	1	2	3	4	5	6
Diarrea	○	●	●	●	●	○
# Bandas	4	5	5	6	6	4
Perfil	<u>R1</u>	<u>R10</u>	<u>R10</u>	<u>R5</u>	<u>R5</u>	<u>R1</u>
Tamaño (pb)	520 454	608 520	608 520	608 520	608 520	520 454
	260 198	300 260 198	300 260 198	300 260 198	300 260 198	260 198
Serotipo	1. O166:H15 2. OR:H45 3. OR:H45		4. O141:H- 5. O141:H- 6. O78:H10			

● Presencia de diarrea ○ Ausencia de diarrea

Para el niño número 13, se trabajaron 6 cepas aisladas de diferentes días (92, 283, 639 y 667), las cuales presentaron tres perfiles (R1, R10, R5). El día 92 de vida del niño se aisló una cepa que presentó el perfil R1 (de 4 bandas). En el día 283, en un evento diarreico, se aislaron dos cepas que presentaron el mismo perfil R10 (de 5 bandas), indicando que se trata de la misma clona. Entre estos dos perfiles (R1 y R10), su patrón de bandeo difiere considerablemente (**tabla 15**), lo que nos habla de cepas muy diferentes. El día 639 de vida del niño, se aíslan dos cepas de diarrea, las cuales presentan el mismo perfil R5 (de 5 bandas), indicando que trata de la misma clona. El perfil R5 se diferencia del perfil R10 por la ausencia de la banda 454pb en R10 (**tabla 15**), las demás bandas (608pb, 520pb, 300pb, 260pb y 198pb) se conservan entre sí. El día 667, se aísla una cepa con el perfil R1, mismo perfil presentado el día 92 de vida del niño (575 días después).

Con respecto al serotipo, en el día 283, para las dos cepas aisladas que presentaron el mismo perfil R10 presentan el mismo serotipo OR:H45 y para el día 639 las dos cepas aisladas que presentaron el mismo perfil R5, se identificó el mismo serotipo O141:H-.

Niño 14. (85040347) Tabla 16.

Edad (días)	211	244	379	649	657	671		
# Cepa	1	2	3	4	5	6	7	8
Diarrea	○	○	●	●	●	●	●	○
# Bandas	5	5	6	6	4	5	4	6
Perfil	<u>R10</u>	<u>R15</u>	<u>R2</u>	<u>R2</u>	<u>R12</u>	<u>R10</u>	<u>R1</u>	<u>R6</u>
Tamaño (pb)	608		608	608		608		
	520		520	520	520	520	520	
		454					454	454
								358
	300	300	300	300	300	300		300
	260	260	260	260	260	260	260	260
	198	198	198	198	198	198	198	198
		174	174	174				174
Serotipo	1. OR:H21 2. O?:H- 3. O25:H42 4. O25:H42				5. O19:H21 6. OR:H21 7. O167:H5 8. O152:H2			

● Presencia de diarrea ○ Ausencia de diarrea

Para el niño número 14, se trabajaron 8 cepas aisladas de diferentes días (211, 244, 379, 649, 657 y 671), las cuales presentaron seis perfiles (R10, R15, R2, R12, R1, R6). El día 211 de vida del niño, se aisló una cepa que presentó el perfil R10 (de cinco bandas). En el día 244 se aisló una cepa que presentó un perfil R15 (de 5 bandas), que por la diferencia en su patrón de bandeo con respecto al perfil anterior (R10), podemos inferir que se trata de dos cepas muy diferentes. El día 379 se aíslan dos cepas de diarrea que presentaron el perfil R2 (de 6 bandas), indicando que se tratan de la misma clona. Este perfil R2 presenta el mismo patrón de restricción que la cepa *E. coli* E24377A (**esquema 23**). El perfil R2 difiere con respecto al perfil R10 (identificado en el día 211) en la banda 174pb (ausente en R10), manteniendo la bandas 608pb, 520pb, 300pb, 260pb y 198pb entre los perfiles, indicando probablemente que están relacionadas. El día 649 en un evento diarreico, se aisló una cepa con el perfil R12 (de 4 bandas), este perfil difiere del perfil R10 en la ausencia de la banda de 608pb en R12, conservando las bandas de 520pb, 300pb, 260pb y 198pb entre los perfiles. La banda de 608pb es producida por un operón ISR1, en el cual no se realiza ningún corte de restricción en su intergénico y su amplificado por PCR es de un mayor tamaño, en comparación al de un operón ISR1 que produce una banda de 520pb (ver

esquemas 8 y 9), motivo por el cual difieren entre sí. El día 657 en presencia de diarrea, se aíslan dos cepas que presentaron dos perfiles distintos (R10 y R1). El perfil R10 se vuelve a identificar 446 días después (anteriormente aislado el día 211). Entre estos perfiles identificados el mismo día, difieren considerablemente en su patrón de bandeo, lo que nos indica que se tratan de dos cepas completamente diferentes colonizando en el mismo periodo de tiempo. El día 671 se aisló una cepa con perfil R6 (de 6 bandas) en ausencia de diarrea, tratándose de una cepa muy diferente a las anteriores aisladas debido a su patrón de bandeo (**tabla 16**). Este perfil (R6), difiere con R15 (identificado día 244), por la banda 358pb (ausente en R15), conservando las bandas 454pb, 300pb, 260pb, 198pb y 174pb entre ambos perfiles.

Con respecto al serotipo, la cepas aisladas el día 379 que presentaron el mismo perfil R2, se identificó el mismo serotipo O25:H42. Así mismo para las cepas aisladas los días 211 y 657 que presentaron el mismo perfil R10, se identificó el mismo serotipo OR:H21.

Niño 15. (8505024) Tabla 17.

Edad (días)	440	531			730
# Cepa	1	2	3	4	5
Diarrea	○	●	●	●	○
# Bandas	6	5	4	4	5
Perfil	<u>R13</u>	<u>R3</u>	<u>R1</u>	<u>R1</u>	<u>R10</u>
Tamaño (pb)	520 454 358 260 198 174	608 520 454	520 454	520 454	608 520 300 260 198
Serotipo	1. O?:H14 2. O103:H21 3. O78:H12	4. O103:H- 5. O6:H16			

● Presencia de diarrea ○ Ausencia de diarrea

En el niño número 15, se trabajaron 5 cepas aisladas de diferentes días (440, 531 y 730), las cuales presentaron cuatro perfiles (R13, R3, R1, R10). El día 440 de

vida del niño se aisló una cepa que presentó el perfil R13 (de 6 bandas). El día 531 se aislaron tres cepas en un cuadro diarreico, de cuales, dos presentaron el mismo perfil R1 (de 4 bandas), indicando ser la misma clona, y la otra cepa presentó un perfil R3 (de 4 bandas). Entre estos dos perfiles, la ausencia de la banda 608 en el perfil R1 (**tabla 17**), indica que se trata de dos cepas muy diferentes, debido a que esta banda es producida por un operón (ISR1), en el cual no se realiza ningún corte de restricción en su intergénico y su amplificado por PCR es de un mayor tamaño, lo que hace que se diferencie de un operón ISR1 que produce una banda de 520pb (ver **esquemas 8 y 9**). Sin embargo, entre ambos perfiles comparten 4 bandas (520pb, 454pb, 260pb y 198pb). Entre los perfiles R1 (aislado día 531) y R13 (aislado 440), se sugiere que presentan cierto grado de relación, donde la banda 520pb, puede generar las bandas 358pb y 174pb (presentes en el perfil R13) por la restricción de *RsaI*, manteniéndose la banda de 520pb en R13 (secuencia primitiva de un operón) (ver explicación **esquema 21**, segundo cuadro). El día 730, se aísla una cepa con perfil R10 (de 5 bandas), su patrón de bandeos que presenta es muy diferente al de las cepas aisladas anteriormente.

Con respecto a los serotipos identificados todos fueron diferentes para todas las cepas.

En resumen para los 15 niños anteriormente estudiados que presentaron diarrea intermitente, se observó que los perfiles R3, R2, R9, R1 y R6 fueron los más identificados entre los aislamientos de estos niños. El perfil R3, fue el más recurrente (identificado en 10 niños). Sin embargo, su identificación no fue relacionada con la enfermedad (diarrea). Con respecto al perfil R2, casi todas las cepas aisladas que presentaron este perfil, se relacionó con la presencia de diarrea. Por el contrario, el perfil R9 su identificación fue generalmente en días donde no hubo diarrea (posteriormente se abordara este tema con mayor detalle, página 93). La edad más temprana que un niño presentó diarrea aislandose una cepa de ETEC (niño 11) fue de 61 días de nacido. Generalmente en los demás niños la diarrea se presentó entre los 150 y 250 días después de nacido.

Niño control 1. (85020247) **Tabla 18.**

Edad (días)	196	228	273	286	516	531	637	698		
# Cepa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Diarrea	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
# Bandas	6	5	5	6	5	5	6	6	5	5
Perfil	<u>R6</u>	<u>R14</u>	<u>R14</u>	<u>R16</u>	<u>R3</u>	<u>R3</u>	<u>R5</u>	<u>R5</u>	<u>R3</u>	<u>R3</u>
Tamaño (pb)				608	608	608	608	608	608	608
	454	454	454		520	520	520	520	520	520
					454	454	454	454	454	454
	358	358	358	358						
	300			300			300	300		
	260	260	260	260	260	260	260	260	260	260
	198	198	198	198	198	198	198	198	198	198
	174	174	174	174						
Serotipo	1. O170:H-				6. O167:H5					
	2. OR:H-				7. OR:H-					
	3. O9:H-				8. O64:H5					
	4. O20:H5				9. O148:H28					
	5. OR:H-				10. O15:H8					

● Presencia de diarrea ○ Ausencia de diarrea

Para el niño control 1, se trabajaron 10 cepas aisladas de diferentes días (196, 228, 273, 286, 516, 531, 637 y 698), las cuales presentaron cinco perfiles (R6, R14, R16, R3, R5). El día 196 de vida del niño se aíslan 3 cepas ETEC, dos cepas presentaron el perfil R14 (de cinco bandas), indicando que se trata de la misma clona y una cepa el perfil R6 (de seis bandas). Entre estos dos perfiles la única diferencia es la ausencia (perfil R14) ó presencia (perfil R6) de una banda de 300pb, compartiendo entre ambos perfiles las bandas 454pb, 358pb, 260pb 198pb y 174pb (**tabla 18**). El día 228 se aísla una cepa que tiene un perfil R16 (de 6 bandas), que difiere considerablemente en su patrón de bandeo a los perfiles antes mencionados. Los días 273 y 286 se aisló una cepa que presentaron el mismo perfil R3 respectivamente (de 5 bandas), indicando que la cepa permaneció 13 días en el intestino del niño. En los días 516 y 531 se aísla una cepa que presenta el mismo perfil R5 respectivamente (de 6 bandas) indicando que la cepa con el mismo perfil ha permaneciendo 15 días en el intestino. Entre los perfiles R3 y R5, difieren solo en la presencia (perfil R5) ó ausencia (perfil R3) de la banda de 300pb, compartiendo las demás bandas entre los perfiles (608pb, 520pb, 454pb, 260pb y 198pb) (**tabla 18**). Los días 637 y 698 (61 días después), se aísla una cepa respectivamente, que presenta el mismo perfil R3 cuyo aislamiento se ha identificado desde el día 273 de vida del niño (425 días con anterioridad).

Con respecto a los serotipos identificados fueron diferentes para todas las cepas aisladas.

Niño control 2. (85031847) Tabla 19.

Edad (días)	1			440	562	608
# Cepa	1	2	3	4	5	6
Diarrea	○	○	○	○	○	○
# Bandas	5	5	5	6	6	5
Perfil	<u>R10</u>	<u>R10</u>	<u>R10</u>	<u>R5</u>	<u>R5</u>	<u>R3</u>
Tamaño (pb)	608	608	608	608	608	608
	520	520	520	520	520	520
				454	454	454
	300	300	300	300	300	
	260	260	260	260	260	260
	198	198	198	198	198	198
Serotipo	1. O8:H9			4. OR:H19		
	2. O8:H9			5. O159:H4		
	3. O8:H9			6. O128:H49		

● Presencia de diarrea ○ Ausencia de diarrea

Para el niño control 2 se trabajaron 6 cepas aisladas de diferentes días (1, 440, 562 y 608), las cuales presentaron tres perfiles (R10, R5, R3). Las tres cepas de ETEC aisladas el día 1 de vida del niño, presentaron el mismo perfil R10 (de 5 bandas), indicando que se trata de la misma clona. El día 440 y 562, se aisló una cepa cada día que presentan el mismo perfil R5 (de 6 bandas), sugiriendo que la cepa ha persistido en el intestino del niño por 122 días. Entre los perfiles R10 y R5, la diferencia se basa en la presencia (perfil R5) ó ausencia (perfil R10) de la banda de 454pb, compartiendo las bandas 608pb, 520pb, 300pb, 260pb y 198pb entre los perfiles. En el día 608, se aísla una cepa con perfil R3 (de 5 bandas), donde este perfil a diferencia del anterior (R5), no presenta la banda 300pb, conservando las demás bandas (608pb, 520pb, 454pb, 260pb y 198pb) entre los perfiles (**tabla 19**).

Con respecto al serotipo, podemos ver que las tres cepas aisladas el día uno de vida del niño, que presentan el mismo perfil (R10), se identificó el mismo serotipo O8:H9 para las tres cepas.

Niño control 3. (85021147) Tabla 20.

Edad (días)	19	30	275	345	410	518
# Cepa	1	2	3	4	5	6
Diarrea	○	○	○	○	○	○
# Bandas	5	6	5	4	5	5
Perfil	<u>R3</u>	<u>R13</u>	<u>R10</u>	<u>R17</u>	<u>R 8</u>	<u>R10</u>
Tamaño (pb)	608 520 454	520 454	608 520	608 454	358 300 260 198	608 520 300 260 198
Serotipo		1. O78:H2 2. O114:H38 3. O29:H21		4. O162:H33 5. O146:H28 6. O159:H-		

● Presencia de diarrea ○ Ausencia de diarrea

Para el niño control 3, se trabajaron 6 cepas aisladas de diferentes días (19, 30, 275, 345, 410 y 518), las cuales presentaron cinco perfiles (R3, R13, R10, R17, R8). El día 19 de vida del niño se aisló una cepa que presentó un perfil R3 (de 5 bandas). El día 30, se aísla una cepa con perfil R13 (de 6 bandas). Entre ambos perfiles difieren considerablemente en el patrón de bandas generado, lo que implica que se traten de dos cepas muy diferentes. En el día 275 se aísla una cepa con perfil R10 (de cinco bandas), que sigue diferenciándose con respecto a los dos perfiles antes identificados (**tabla 20**). El día 345 se aisló una cepa con el perfil R17 (de 4 bandas) y el día 410 se aisló una cepa que presenta el perfil R8 (de 5 bandas). El perfil R8, presenta un patrón de restricción muy similar al de la cepa *E. coli* ED1a (ver **esquema 24**). Todos los perfiles identificados hasta el momento, muy probablemente se traten de cepas completamente diferentes, que han colonizado al niño en respectivos días (**tabla 20**). El día 518, de nuevo se observa el perfil R10 en la cepa aislada, perfil anteriormente identificado (día 275), indicando probablemente que esta cepa ha persistido en el intestino del niño 243 días.

Con respecto al serotipo podemos ver que son diferentes para todas las cepas aisladas.

Niño control 4. (85021047). Tabla 21.

Edad (días)	79	305		319	410	606
# Cepa	1	2	3	4	5	6
Diarrea	○	○	○	○	○	○
# Bandas	5	5	5	6	5	5
Perfil	<u>R3</u>	<u>R8</u>	<u>R8</u>	<u>R5</u>	<u>R10</u>	<u>R3</u>
Tamaño (pb)	608			608	608	608
	520			520	520	520
	454			454		454
		358	358			
		300	300	300	300	
	260	260	260	260	260	260
	198	198	198	198	198	198
		174	174			
Serotipo	1. O45:H15 2. O45:H17 3. O45:H17			4. O159:H21 5. O8:H- 6. O27:H7		

● Presencia de diarrea ○ Ausencia de diarrea

Para el niño control 4, se trabajaron 6 cepas aisladas de diferentes días (79, 305, 319, 410 y 606), las cuales presentaron cuatro perfiles (R3, R8, R5, R10). El día 79 de vida del niño se aisló una cepa con perfil R3 (de 5 bandas). El día 305 se aíslan dos cepas que presentan el mismo perfil R8 (de 5 bandas), tratándose de la misma clona. Este perfil (R8) es completamente diferente al que presentan las demás cepas aisladas en el niño (**tabla 21**). El perfil R8, presenta un patrón de restricción muy similar al de la cepa *E. coli* ED1a (**esquema 24**). El día 319 se aísla una cepa con el perfil R5 (de 6 bandas) y el día 410 se aisló una cepa que presenta el perfil R10 (de 5 bandas). Entre los perfiles R10 y R5, la diferencia se basa en la presencia (perfil R5) ó ausencia (perfil R10) de la banda de 454pb, compartiendo las bandas 608pb, 520pb, 300pb, 260pb y 198pb entre los perfiles. En el día 606, de nuevo se aísla una cepa que presenta el perfil R3, mismo perfil del aislamiento día 79, (527 días con anterioridad).

Con respecto al serotipo, las dos cepas aisladas del día 305 que presentan el mismo perfil (R8), se identificó el mismo serotipo O45:H17.

Control 5. (85020447) Tabla 22.

Edad (días)	33	625	682	731
# Cepa	1	2	3	4
Diarrea	○	○	○	○
# Bandas	5	5	5	5
Perfil	<u>R3</u>	<u>R8</u>	<u>R3</u>	<u>R3</u>
Tamaño (pb)	608 520 454		608 520 454	608 520 454
		358 300		
	260 198	260 198 174	260 198	260 198
Serotipo	1. O78:H12 2. O?:H-		3. O78:H12 4. O78:H12	

● Presencia de diarrea ○ Ausencia de diarrea

Para el niño control 5, se trabajaron 4 cepas aisladas de diferentes días (33, 625, 682 y 731), las cuales presentaron dos perfiles (R3, R8). Las cepas de ETEC aisladas los días 33, 682 y 731 de vida del niño presentan el mismo perfil R3 (de 5 bandas), la cual probablemente son cepas con el mismo perfil de restricción relacionadas genéticamente que han persistido en el intestino del niño 698 días. El día 625 se aisló una cepa con el perfil R8 (de 5 bandas), perfil completamente diferente a R3 (**tabla 22**). Como se ha mencionado con anterioridad el perfil R8, presenta un patrón de restricción muy similar al de la cepa *E. coli* ED1a (**Esquema 24**).

Con respecto al serotipo, es interesante observar que las tres cepas con el perfil R3, a pesar de la gran distancia en los días de aislamiento entre la primer cepa (día 33) y las últimas dos (682 y 731), se identificó el mismo serotipo O78:H12 para las tres cepas.

En resumen, para los niños control que no presentaron diarrea ocasionada por ETEC, el perfil R3 fue identificado en todos los niños por lo menos en alguno de sus aislamientos. El perfil R8, fue identificado en 3 de los 5 niños control, este perfil no fue identificado en ninguna cepa aislada de los niños que presentaron diarrea intermitente.

4.7. Relación de los perfiles de restricción identificados con su aislamiento en presencia o ausencia de diarrea.

La frecuencia de los principales perfiles de restricción identificados en la colección de cepas de ETEC de mayor a menor fue: R3 (32 cepas), R9 y R10 (19 cepas para cada uno), R2 (17 cepas), R1 (13 cepas), R6 (12 cepas) y R14 (11 cepas).

El perfil de restricción R3 predominó en el aislamiento de al menos una cepa en casi todos los niños estudiados. Los perfiles R3, R5 y R10 estuvieron ampliamente distribuidos en las cepas aisladas tanto en niños con casos de diarrea intermitente (aisladas en presencia o ausencia de diarrea), así como en los niños control (asintomáticos).

Perfiles exclusivos aislados de diarrea.

Las cepas que presentaron el perfil R2 (17 cepas) se aislaron más frecuentemente de diarrea (94%). Solo una cepa con este perfil se aisló de un niño que no presentó diarrea en el momento de su aislamiento. Esta cepa fue aislada junto con otra cepa de ETEC que presentó un perfil R4 (perfil identificado exclusivamente de muestras fecales sin diarrea).

El perfil R2 presenta el mismo perfil de restricción que la cepa *E. coli* E24377A, (estudiada *In-silico*), cuya secuencia pertenece a una cepa tipo de *E. coli* enterotoxigénica. A partir de los resultados mostrados, se observó que este patrón de bandeo fue característico en cepas que en su mayoría se relacionó su aislamiento a estados de enfermedad en estos niños.

Además de cepas con el perfil R2 que se asociaron a diarrea, cepas con el perfil R7 (4 cepas) y R11 (1 cepas) también fue asociado su aislamiento en días donde los niños presentaron diarrea.

Correlación de episodios diarreicos a ETEC.

Es importante mencionar que no solo cepas de ETEC fueron aisladas en los niños de este estudio, lo que podría implicar que el cuadro de diarrea acuosa pudo tener origen por un diferente patógeno. Por lo tanto, debe tenerse en cuenta que cepas

como *E. coli* enteropatógena, *E. coli* enterohemorrágica, *Salmonella sp.*, *Campylobacter jejuni* y rotavirus, fueron también aisladas en estos niños. Sin embargo, en este trabajo no se contempló esta información. Por lo que debe tenerse en mente para posteriores estudios.

Perfiles exclusivos aislados en ausencia de diarrea.

Cepas con el perfil R9 (19 cepas), fueron más frecuentemente aisladas de heces en niños sin diarrea (84%), aunque hubo tres cepas con este perfil que fueron aisladas de niños que presentaron diarrea. Una cepa de estas tres (niño 5, día 636), se aisló junto con otra cepa que presentó un perfil R2 (perfil característico de diarrea), probablemente a esta última cepa se deba el cuadro diarreico. La segunda cepa (niño 6, día 304) se aísla junto con otra cepa que presentó un perfil R6, el cual su aislamiento se relacionó en cepas aisladas de diarrea o sin diarrea, pudiendo este último ser el causante del cuadro de enfermedad. La tercera cepa (niño 11, día 61), fue aislada como cepa única ese día y no se relacionó el motivo de la diarrea.

El perfil R9 presenta el mismo perfil de restricción que la cepa *E. coli* IA11 (analizada *In-silico*), cuya secuencia pertenece a una cepa comensal. En este trabajo se observa que la identificación de este perfil fue principalmente en cepas de ETEC aisladas de heces en condiciones normales (sin diarrea).

Otros perfiles que presentaron las cepas aisladas en niños en días donde no presentaron diarrea son: Perfil R4 (5 cepas), R8 (4 cepas), R13 (3 cepas), R15 (5 cepas) y los perfiles R16 y R17 (con una sola cepa aislada respectivamente).

Perfiles exclusivos identificados en niños con casos de diarrea intermitente.

Cepas con los perfiles R15 (5 cepas), R7 (4 cepas), R9 (19 cepas), R12 (3 cepas), R2 (17 cepas), R4 (5 cepas) y R1 (13 cepas) fueron solamente aisladas de niños que presentaron alguna vez diarrea ocasionada por ETEC.

Perfiles exclusivos identificados en niños control.

Cepas con los perfiles R16 (1 cepa), R8 (4 cepas) y R17 (1 cepa) fueron exclusivamente identificados en los niños control, que permanecieron asintomáticos durante el estudio.

El análisis *In-silico* de la cepa *E. coli* ED1a (una cepa comensal) muestra que el perfil R8 es un perfil muy parecido al que presenta ésta cepa que no produce enfermedad.

4.8. Persistencia en el intestino y relación clonal de cepas de ETEC.

Es importante mencionar que las muestras de heces recolectadas en cada uno de los niños fue rigurosa, llevada a cabo cada 15 días y cada vez que el niño presentó diarrea. Se realizaron los aislamientos con el mayor cuidado posible para poder identificar todas las cepas que pudieron estar presentes en una muestra de heces (ver artículo 10), asegurándonos que la capacidad de detección en el aislamiento de las cepas de ETEC en los niños a lo largo de sus dos primeros años de vida fue adecuada.

Los perfiles R3, R9, R10, R2, R1, R6 y R14 mayormente identificados en las cepas aisladas de los niños de la región en estudio, durante las diferentes etapas de vida (dos primeros años), mostraron el polimorfismo genético que existe entre las cepas de ETEC que colonizaron a estos niños.

Para las cepas que presentaron los perfiles R3, R7, R9, R10, R6, R1 y R2, se observó que persistió su aislamiento en un mismo niño durante un tiempo prolongado, indicando que cepas con el mismo perfil de restricción permanecían colonizando su intestino, mostrando intervalos en tiempo de permanencia de un aislamiento a otro de: R3 (213-698 días), R7 (306 días), R9 (93-519 días), R10 (243-446 días), R6 (135-562 días), R1 (110-575 días) y R2 (109-333 días). En un menor número de días, también estuvieron presentes cepas con los perfiles R4,

R5 y R14, permaneciendo cortos intervalos de tiempo: R4 (78 días), R5 (15-121 días) y R14 (45-121 días).

Las cepas que presentaron el mismo perfil de restricción, indican que poseen un mismo genotipo. Estos aislamientos de cepas de ETEC provenientes de diferentes días en un mismo niño, probablemente nos habla de una “línea-clonal” de cepas estrechamente relacionadas, es decir son grupos de bacterias originados a partir de un mismo clon inicial. Sin embargo, no podemos asegurar que se trate de la misma clona que ha permanecido todo ese tiempo en el intestino del niño, en los casos donde se hable de un tiempo muy largo (más de un año), entre el aislamiento de la primer cepa a la última cepa que presenta el mismo perfil de restricción, pero si pueden relacionarse entre ellas como cepas con una corta distancia genética. Para poder tener una certeza de la clonalidad de estas cepas, deben combinarse con resultados genotípicos de otros métodos de tipificación (posteriormente se abordara con mayor detalle este tema, página 105).

Las cepas que presentaron los perfiles R11, R12, R13, R15, R16 y R17 fueron aisladas en una sola ocasión en los niños que fueron identificadas, no volviéndose a aislar en otro momento de la vida del mismo niño, las cuales se relacionaron como cepas transitorias. Por otro lado, las cepas con los perfiles R16, R17 y R11 fueron perfiles únicos que se identificaron en solo un cepa de toda la colección de ETEC.

Durante los aislamientos de las cepas de ETEC, se observó que en un mismo día se pudieron aislar hasta dos cepas de ETEC con un perfil distinto, indicando que en un niño se puede presentar una infección al mismo tiempo con dos poblaciones de cepas que pueden no estar relacionadas genéticamente.

4.9. Agrupación de perfiles detectados en el total de cepas de ETEC de los 20 niños estudiados.

A continuación se muestra la agrupación de todas las cepas aisladas de diferentes niños que presentaron el mismo perfil de restricción por la enzima *RsaI*. Se indica el niño, el día y la fecha en que la cepa fue aislada, el número consecutivo que le fue dado a la cepa, si fue acompañado de diarrea, las toxinas identificadas (LT, STH y STP), CFAs, serotipo y el perfil obtenido por las enzimas *TaqI* y *HinfI*.

Perfiles identificados en muestras sin diarrea.

Perfil R9.

Niño	no. de cepa	Día	fecha	Diarr	LT	STP	STH	CFA1	CS2	CS3	CS4	CS6	<i>TaqI</i>	<i>HinfI</i>	Serotipo
N4	2	95	40186	0	0	0	1	0	1	1	0	0	T6	H1	O107:H-
N5	8	636	210787	1	0	0	1	0	0	0	0	0	T2	H1	O29:H11
N5	9	729	221087	0	1	0	0	0	0	0	0	0	T2	H1	O?:H-
N6	4	304	291086	1	0	1	1	0	0	0	0	0	T6	H7	O26:H32
N7	1	29	200286	0	1	0	0	0	0	0	0	0	T6	H1	OR:H20
N7	2	29	200286	0	1	0	0	0	0	0	0	0	T6	H1	O109:H19
N7	3	29	200286	0	1	0	0	0	0	0	0	0	T6	H1	O109:H21
N8	1	151	170386	0	1	0	0	0	0	0	0	0	T6	H1	O4:H16
N8	3	272	160786	0	1	0	0	0	0	1	0	0	T6	H1	O56:H-
N8	4	272	160786	0	1	0	0	0	0	1	0	0	T6	H1	O56:H-
N8	5	349	11086	0	1	0	0	0	0	0	0	1	T1	H1	OR:H2
N8	6	349	11086	0	1	0	0	0	0	0	0	1	T1	H1	O64:H-
N8	13	670	180887	0	1	0	0	0	0	0	0	1	T1	H3	O8:H9
N9	1	47	251185	0	0	0	1	1	0	0	1	1	T1	H2	O27:H18
N9	2	211	80586	0	1	0	0	0	0	0	0	1	T6	H3	O109:H19
N9	3	211	80586	0	1	0	0	0	0	0	0	1	T6	H3	O109:H-
N9	7	439	221286	0	0	0	1	1	0	0	0	0	T2	H3	O103:H21
N9	8	504	250287	0	1	0	0	0	0	0	0	0	T2	H3	O103:H-
N11	2	61	161085	1	1	1	0	0	1	1	0	0	T4	H1	OR:H33

El perfil R9 fue uno de los más frecuentes encontrados en cepas de ETEC, la mayoría de las cepas fueron aisladas de muestra de heces sin diarrea, aunque hay tres cepas que muestran este perfil que fueron aisladas de diarrea. Este perfil mostró el mismo patrón de restricción que la cepa *E. coli* IA11, una cepa comensal (analizada *In-silico*).

Perfil R8.

Niño	no. de cepa	Día	Fecha	Diarr.	LT	STP	STH	CS6	TaqI	Hinfl	Serotipo
C3	5	410	71186	0	0	1	0	0	T2	H3	O146:H28
C4	2	305	240786	0	0	0	1	0	T2	H3	O45:H17
C4	3	305	240786	0	0	0	1	0	T2	H3	O45:H17
C5	2	625	270587	0	1	0	0	1	T2	H3	O?:H-

El perfil R8 fue identificado únicamente en cepas de niños control.

Perfil R15.

Niño	no. de cepa	Día	Fecha	Diarr.	LT	STP	STH	CS2	CS3	CS4	CS6	TaqI	Hinfl	Serotipo
N8	74	579	190587	0	1	0	0	0	0	0	1	T6	H1	O?:H-
N8	75	579	190587	0	1	0	0	0	0	0	1	T6	H1	O?:H-
N9	82	258	240686	0	0	0	1	1	1	0	0	T6	H1	O?:H-
N10	93	608	60587	0	1	1	0	0	0	1	1	T8	H1	O?:H-
N14	115	244	80786	0	0	1	0	0	0	0	0	T4	H3	O?:H-

Perfil identificado en cepas aisladas de heces de apariencia normal de niños con diarrea intermitente. En ninguna de estas cepas con este perfil R15 se pudo caracterizar serológicamente y las 5 cepas fueron indol negativo por bioquímica.

Perfil R13.

Niño	no. de cepa	Día	Fecha	Diarr.	LT	TaqI	Hinfl	Serotipo
N8	8	490	190287	0	1	T1	H3	O1:H45
N15	2	440	160287	0	1	T2	H3	O?:H14
C3	2	30	231085	0	1	T6	H3	O114:H38

El perfil 13 se presentó en cepas a las que solo se identificó la producción de la toxina LT. En estas cepas no se reporta algún tipo de CFA.

Perfil R4.

niño	no. de cepa	días	fecha	Diarr	LT	STP	CS6	TaqI	Hinfl	Serotipo
N1	9	546	180387	0	0	1	0	T2	H3	O8:H9
N1	10	624	40687	0	1	0	1	T2	H3	O39:H9
N6	1	164	110686	0	1	0	1	T2	H1	O8:H9
N8	12	670	180887	0	1	0	1	T7	H3	O8:H9
N11	6	440	301086	0	1	0	0	T1	H3	O8:H9

El perfil R4 se presentó en cepas de ETEC aisladas de eventos sin diarrea en niños que presentaron casos de diarrea intermitente. Se observa el predominio del serotipo O8 y todas las cepas de este perfil presentan antígeno H9.

Perfiles identificados en muestras con y sin diarrea

Perfil R3.

Niño	no. de cepa	Día	Fecha	Día r	LT	STP	STH	CFA1	CS1	CS2	CS3	CS4	CS6	TaqI	Hinfl	Serotipo
N1	1	15	31085	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	T1	H2	O20:H-
N1	5	274	190686	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	T1	H3	OR:H27
N1	6	274	190686	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	T1	H3	O128:H27
N2	3	333	220886	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	T1	H3	OR:H-
N2	4	541	180387	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	T1	H3	OR:H5
N2	6	546	230387	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	T1	H3	O64:H5
N2	7	546	230387	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	T1	H3	O64:H5
N3	2	135	60686	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	T2	H3	O64:H-
N4	5	287	150786	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	T1	H2	O128:H27
N4	6	441	161286	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	T1	H3	O16:H7
N4	11	547	10487	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	T1	H3	O64:H5
N4	13	645	80787	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	T1	H1	O175:H27
N6	2	172	190686	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	T1	H2	O128:H27
N8	2	243	170686	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	T6	H1	O25:H-
N10	7	638	50687	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	T2	H2	O91:H10
N11	7	489	181286	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	T1	H2	OR:H-
N12	1	2	81085	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	T6	H3	O166:H10
N12	2	191	150486	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	T6	H3	OR:H?
N12	3	624	220687	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	T1	H3	O128:H49
N12	5	661	290787	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	T7	H3	O167:H5
N15	1	531	180587	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	T1	H3	O103:H21
C1	5	273	60686	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	T2	H3	OR:H-
C1	6	286	190686	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	T2	H3	O167:H5

C1	9	637	50687	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	T1	H5	O148:H28
C1	10	698	50887	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	T1	H1	O15:H8
C2	6	608	230687	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	T1	H3	O128:H49
C3	1	19	121085	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	T2	H3	O78:H12
C4	1	79	101285	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	T2	H3	OR:H15
C4	6	606	210587	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	T2	H1	O27:H7
C5	1	33	121085	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	T2	H3	O78:H12
C5	3	682	230787	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	T2	H3	O78:H12
C5	4	731	100987	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	T2	H3	O78:H12

El perfil R3 fue el más frecuentemente identificado entre las cepas de ETEC aisladas de los niños de la región de "Lugar Sobre la Tierra Blanca", Morelos, Méx.

Perfil R6.

Niño	no. de cepa	Día	Fecha	Diarr.	LT	STP	STH	CS2	CS3	CS4	CS6	TaqI	Hinfl	Serotipo
N4	1	77	171285	0	0	0	1	0	0	0	0	T6	H1	O107:H10
N4	12	639	20787	0	1	1	0	0	0	0	0	T1	H3	O80:H26
N5	1	168	90486	0	1	0	0	0	1	0	0	T2	H3	O170:H-
N5	2	168	90486	0	1	0	0	0	1	0	0	T2	H3	O170:H-
N5	6	303	220886	1	1	0	0	0	1	0	0	T7	H3	64474:H32
N6	3	304	291086	1	0	1	1	0	0	0	0	T2	H3	64474:H32
N7	5	166	70786	0	1	0	0	0	0	0	0	T1	H3	O152:H-
N7	6	166	70786	0	1	0	0	0	0	0	0	T1	H3	O152:H-
N8	7	362	141086	1	1	1	0	0	0	0	0	T4	H3	O?:H-
N10	1	244	70586	1	1	1	0	0	0	1	1	T7	H3	O80:H26
N14	8	671	80987	0	1	0	0	0	0	0	0	T1	H1	O152:H2
C1	1	196	210386	0	1	0	1	1	1	0	0	T2	H3	O170:H-

Perfil R5.

Niño	no. de cepa	Día	Fecha	Diarr.	LT	STP	CS3	CS6	TaqI	Hinfl	Serotipo
N4	7	504	170287	0	1	0	0	0	T1	H3	O164:H31
N13	4	639	230787	1	0	1	0	0	T6	H3	O141:H-
N13	5	639	230787	1	0	1	0	0	T6	H3	O141:H-
C1	7	516	40287	0	1	0	1	0	T1	H2	OR:H-
C1	8	531	190287	0	1	0	0	0	T1	H2	O64:H5
C2	4	440	60187	0	1	0	0	0	T6	H3	OR:H19
C2	5	562	80587	0	1	0	0	0	T6	H3	O159:H4
C4	4	319	70886	0	1	0	0	1	T2	H3	O159:H21

Perfil R14.

Niño	no. de cepa	Día	Fecha	Diarr.	LT	STP	STH	CFA1	CS2	CS3	CS4	CS6	TaqI	Hinfl	Serotipo
N1	12	685	40887	0	1	1	0	0	0	0	1	1	T2	H3	O?:H-
N1	13	730	180987	0	0	1	0	0	0	0	0	0	T1	H3	O80:H26
N2	10	653	80787	0	1	1	0	1	0	0	0	0	T2	H3	OR:H-
N3	5	274	231086	1	1	1	1	0	0	0	0	0	T2	H5	OR:H-
N3	6	274	231086	1	1	1	1	0	0	0	0	0	T2	H5	O20:H-
N8	11	656	40887	0	0	0	1	0	0	0	0	0	T7	H1	O64:H-
N11	1	2	180885	0	1	1	1	0	1	1	0	0	T6	H3	O170:H-
N11	3	123	171285	1	1	1	1	0	0	0	0	0	T4	H3	OR:H-
N11	4	137	311285	0	1	1	1	0	0	0	0	0	T4	H3	O64:H-
C1	2	196	210386	0	1	0	1	0	1	1	0	0	T2	H3	OR:H-
C1	3	196	210386	0	1	0	1	0	1	1	0	0	T2	H5	O9:H-

Perfil R1.

niño	no. de cepa	días	fecha	Diarr	LT	STP	STH	CFA1	CS1	CS3	CS4	CS6	TaqI	Hinfl	Serotipo
N1	2	139	40286	0	0	0	1	0	0	0	1	1	T2	H3	090:H34
N1	3	139	40286	0	0	0	1	0	0	0	1	1	T2	H3	078:H2
N1	11	685	40887	0	1	1	0	0	0	0	1	1	T2	H3	O?:H7
N2	11	658	130787	1	0	0	1	0	0	0	0	0	T2	H3	OR:H-
N5	3	168	90486	0	1	0	0	0	0	1	0	0	T1	H2	O64:H-
N5	4	278	280786	1	1	0	1	0	1	1	0	0	T2	H3	O78:H12
N9	10	652	230787	1	1	0	0	0	0	0	0	1	T6	H3	O167:H5
N10	3	419	291086	1	1	0	0	0	0	0	0	0	T1	H3	O8:H44
N13	1	92	220186	0	1	0	0	0	0	0	0	0	T7	H3	O166:H15
N13	6	667	200887	0	1	0	0	0	0	0	0	1	T7	H3	O78:H10
N14	7	657	250887	1	1	1	1	1	0	0	0	0	T1	H3	O167:H5
N15	3	531	180587	1	1	1	1	0	0	0	1	1	T2	H3	O78:H12
N15	4	531	180587	1	1	1	1	0	0	0	1	1	T1	H3	O103:H-

Perfil R12.

niño	no de. cepa	días	fecha	Diarr	LT	STH	CFA1	CS1	CS3	TaqI	Hinfl	Serotipo
N2	9	613	290587	1	1	1	0	1	1	T1	H3	O153:H-
N4	15	700	10987	0	1	1	0	1	1	T2	H3	O6:H16
N14	5	649	170887	1	0	1	1	0	0	T1	H3	O19:H21

Perfil R10.

Niño	no. de cepa	Día	Fecha	Diar	LT	STP	STH	CFA1	CS1	CS2	CS3	CS4	CS6	TaqI	Hinfl	Serotipo
N2	8	606	220587	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	T2	H3	O6:H16
N4	3	212	10586	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	T6	H3	O120:H-
N4	4	241	300586	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	T6	H3	O166:H-
N4	8	504	170287	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	T1	H3	OR:H-
N4	9	540	250387	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	T1	H3	O159:H-
N4	10	547	10487	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	T1	H3	O159:H-
N4	14	685	170887	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	T1	H1	O29:H11
N12	4	654	220787	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	T7	H3	O129:H-
N13	2	283	10886	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	T10	H1	OR:H45
N13	3	283	10886	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	T10	H1	OR:H45
N14	1	211	50686	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	T1	H1	OR:H21
N14	6	657	250887	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	T1	H1	OR:H21
N15	5	730	31287	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	T2	H3	O6:H16
C2	1	1	241085	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	T2	H3	O8:H9
C2	2	1	241085	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	T2	H3	O8:H9
C2	3	1	241085	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	T1	H3	O8:H9
C3	3	275	250686	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	T1	H2	O29:H21
C3	6	518	230287	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	T3	H3	O159:H-
C4	5	410	61186	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	T2	H3	O8:H-

Perfiles identificados en cepas aisladas de diarrea.

Perfil R2

niño	no. de cepa	Día	fecha	Diar	LT	STP	STH	CFA1	CS1	CS2	CS3	CS4	CS6	TaqI	Hinfl	Serotipo
N1	4	258	30686	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	T1	H1	O29:H11
N1	7	540	120387	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	T3	H3	OR:H27
N1	8	546	180387	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	T3	H3	O159:H20
N3	3	135	230986	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	T1	H1	OR:H-
N3	4	244	230986	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	T2	H3	O6:H16
N5	5	303	220886	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	T6	H1	O166:H?
N5	7	636	210787	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	T1	H3	OR:H-
N7	4	148	190686	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	T1	H2	O29:H11
N7	7	282	311086	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	T7	H1	O25:H42
N9	5	303	80886	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	T2	H3	O85:H-
N9	6	334	80986	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	T6	H3	O6:H16
N9	8	610	110687	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	T7	H3	O8:H-
N10	2	419	291086	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	T6	H1	O88:H25
N10	4	419	291086	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	T6	H1	O36:H26

N11	5	294	60686	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	T1	H1	O29:H11
N14	3	379	201186	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	T10	H3	O25:H42
N14	4	379	201186	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	T10	H3	O25:H42

El perfil de restricción R2 se caracterizó por estar presente en cepas de ETEC aisladas principalmente de eventos diarreicos. Este perfil muestra el mismo patrón de restricción que la cepa *E. coli* E24377A, una cepa tipo de ETEC (analizada *In-silico*).

Perfil R7.

Niño	no. de cepa	Día	Fecha	Diarr.	LT	STP	STH	CFA1	CS4	CS6	TaqI	Hinfl	Serotipo
N2	1	240	210586	1	0	1	1	1	0	0	T4	H3	OR:H20
N2	2	240	210586	1	0	1	1	1	0	0	T4	H3	O27:H20
N2	5	546	230387	1	1	0	0	0	0	0	T4	H4	O?:H-
N10	6	610	80587	1	0	1	0	0	1	1	T4	H3	O27:H20

Perfiles únicos identificados en cepas aisladas de niños con y sin diarrea

Perfil R17.

niño	no. de cepa	días	fecha	Diarr	LT	TaqI	Hinfl	Serotipo
C3	4	345	80986	0	1	T6	H1	O162:H33

Perfil único identificado en una cepa de un niño control, donde solo se identificó la toxina LT y ningún CFA reconocible.

Perfil R11.

niño	no. de cepa	días	fecha	Diarr	STH	TaqI	Hinfl	Serotipo
N3	1	132	60686	1	1	T5	H6	O?:H29

Perfil identificado en un niño en un evento de diarrea. El producto amplificado por PCR del espacio intergénico de esta cepa, mostró un mayor tamaño a los otros productos obtenidos de las otras cepas. En esta cepa solo se identificó la toxina STh, pero no se reportó ningún CFA. Una característica Bioquímica sobresaliente de esta cepa ETEC es que fue indol negativo.

Perfil R16.

Niño	no. de cepa	Día	Fecha	Diarr.	LT	STH	CS2	CS3	TaqI	Hinfl	Serotipo
C1	4	228	220486	0	1	1	1	1	T9	H1	O20:H5

El perfil 16 fue identificado en una sola cepa, aislada de un niño control.

La caracterización de serotipo, producción de toxinas y CFAs en estas cepas de ETEC nos muestra una gran variedad fenotípica que nos impidió establecer una relación entre el fenotipo y el genotipo (relacionado con el perfil de restricción).

Las cepas aisladas en un mismo día (en un mismo niño) que presentaban el mismo perfil de restricción, se relacionaron como cepas del mismo clon, donde generalmente presentaban el mismo serotipo, toxinas y CFAs, dándonos una evidente “conexión clonal” entre las cepas, solo en algunos casos cambio el serotipo.

En cuanto a cepas con un mismo perfil aisladas en un transcurso de tiempo más largo (meses o años) en un mismo niño, generalmente diferían en serotipo, toxinas identificadas, CFAs e inclusive en la presencia de diarrea. Esto nos puede llevar a entender la pérdida de estas cualidades fenotípicas con el tiempo, así como los constantes cambios genéticos que puede sufrir una cepa en cada generación, pudiendo alterar su relación clonal.

Solo el niño control 5, se aislaron dos cepas estrechamente relacionadas los días 33 y 731 de vida del niño (698 días de diferencia), cuyas cepas presentan el

mismo fenotipo y el mismo perfil de restricción con las tres enzimas utilizadas, después de un periodo tan largo de aislamiento, indicándonos la evidente persistencia de esta cepa en el intestino del niño. Estas cepas son de gran interés para posteriores estudios.

El concepto de identidad de un clon se ve complicado en la práctica experimental por el hecho de que los microorganismos son genéticamente inestables y acumulan modificaciones de su material genético con cada generación. Estas modificaciones se pueden deber a mutaciones al azar o a fenómenos de recombinación genética como la inserción o la delección de elementos móviles como plásmidos, secuencias de inserción o transposones. A esta inestabilidad genética de los microorganismos se le conoce como “deriva génica”. Así, pues, la clonalidad no es absoluta, sino que está modulada por el tiempo, o sea, la similitud de los componentes en un clon irá divergiendo con el tiempo **(3)**.

Método de tipificación PCR-RFLP.

El método de PCR-RFLP a partir de la caracterización de los espacios intergénicos 16S-23S RNAr de los operones ribosómicos es una herramienta útil para la caracterización de cepas de ETEC de muestras epidemiológicas. La región intergénica resultó ser adecuada para la diferenciación de cepas de ETEC y permitió la clasificación de las cepas en grupos estrechamente relacionados cuando presentaron idénticos resultados y divergentes cuando dos aislamientos estudiados presentaron resultados diferentes.

Este método de PCR-RFLP, cumple con los requerimientos que debe tener un método de tipificación: su poder de identificación es adecuado para catalogar cualquier aislamiento en un tipo determinado, es reproducible, su poder discriminatorio es capaz de diferenciar entre aislamientos no relacionados y su interpretación de resultados es relativamente sencilla. Sin embargo, es una técnica laboriosa.

Los métodos de tipificación genotípicos permiten determinar si los microorganismos analizados se encuentran genéticamente relacionados y por lo

tanto, pueden ser considerados como representantes de una misma cepa o clon. La clonalidad implica que dos aislamientos estén estrechamente relacionados, teniendo un mismo origen clonal. Sin embargo, para poder ubicar distintos aislamientos en una misma línea clonal se requieren resultados coincidentes en más de un método de tipificación. Por lo que es conveniente implementar otros métodos de tipificación en el presente trabajo, para poder establecer con mayor certeza la clonalidad de dos aislados. El método de electroforesis de campo pulsado (PFGE), es la técnica que tiene el más alto poder discriminatorio, la mejor reproducibilidad y la de mayor versatilidad de las técnicas de tipificación. Aunque el costo es elevado y es laborioso con respecto al tiempo requerido. Sin embargo, existen otros métodos que son variantes de la técnica de PCR que han sido aplicadas con fines epidemiológicos. El ERIC-PCR (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*) y el REP-PCR (*Repetitive Extragenic Palindromic*), que resultan ser sumamente sencillas, no dependen del uso de enzimas de restricción, ni de técnicas electroforéticas específicas, son rápidas, de relativo bajo costo y excelente reproducibilidad. Sin embargo, suelen tener una menor versatilidad y un poder de resolución menor que el PFGE.

El uso de métodos adicionales de tipificación para el análisis de las cepas de ETEC en estudio, nos ayudaría a determinar con una mayor credibilidad la clonalidad de las cepas que por medio del PCR-RFLP fueron catalogadas como cepas que persistió su aislamiento a lo largo de la vida del niño. Así mismo, poder determinar, si cepas con un perfil R2, se relaciona a eventos de diarrea. Determinar el origen clonal de estas cepas, puede asegurarnos que el microorganismo causante del segundo cuadro infeccioso es el mismo que causó la infección original, pudiendo considerarse adecuado el uso de un tratamiento antimicrobiano para ETEC en estos niños.

CONCLUSIONES.

La caracterización de los operones ribosómicos de las cepas de ETEC, a partir de la restricción del espacio intergénico 16S-23S RNAr amplificada por PCR, mostró que el perfil R3 generado por la enzima *RsaI*, fue el de mayor prevalencia identificado en las cepas de ETEC aisladas de los niños de esta región rural del Edo. de Morelos.

La identificación de cepas con los perfiles R2 y R9 pudo relacionarse específicamente con diarrea y sin diarrea respectivamente. Además el perfil R2, es un perfil característico de la cepa tipo de ETEC *E. coli* E24377A. Contrariamente, el perfil R9 es un perfil característico que presenta una cepa tipo comensal de *E coli* IA11.

Nuestros resultados sugieren que la colonización de una cepa de ETEC en un niño puede persistir por un tiempo prolongado, identificándose en el transcurso de vida del niño cepas que presentan un mismo perfil de restricción, las cuales están relacionadas genéticamente, pudiendo tener un mismo origen clonal. Sin embargo, es indispensable el uso de diferentes métodos de tipificación complementarios, que permitan asegurar con certeza la clonalidad de dos aislados de ETEC y que la recurrencia de infecciones por esta bacteria en los niños sea asociada a la misma clona, siendo necesario el uso de antibióticos para su tratamiento.

Por último, en la mayoría de los casos no se encontró una relación específica con las características fenotípicas y genotípicas de las cepas. Esto probablemente pudiera explicarse por cambios genéticos (mutaciones, inserciones, deleciones, transferencia horizontal de genes, etcétera) que se traducen en un cambio fenotípico entre las cepas en un nicho específico a través del tiempo y en coexistencia con otros géneros y especies bacterianas.

BIBLIOGRAFÍA.

1. **Antón A. I., Martínez-Murcia A. J. & Rodríguez-Valera F.** 1998. Sequence diversity in the 16S–23S Intergenic Spacer Region (ISR) of the rRNA operons in representatives of the *Escherichia coli* ECOR collection. *J. Mol. Evol.* 47: 62–72.
2. **Arias B. I. & Huguet T. J. C.** 2002. Detección molecular de toxinas termoestable y termolábil de *Escherichia coli* mediante hibridación. *Rev. Peru Med Exp Salud Publica* 19(4): 193-196.
3. **Bernal M., Pouton R. A. & Máttar S.** 2004. Utilización del RAPD para detectar clonalidad entre cepas de *Escherichia coli* enteropatógena (ECEP) aisladas de pacientes pediátricos con diarrea. *Universitas Médica.* 45(1): 7-12
4. **Blackburn D., Husband A., Saldaña Z., Nada R. A., Klena J., Qadri F. & Girón J. A.** 2009. Distribution of the *Escherichia coli* Common Pilus among diverse strains of Human Enterotoxigenic *E. coli*. *J. Clin. Microbiol.* 47(46): 1781-1784.
5. **Carrillo R. J.** 1983. *Escherichia coli*. Historia de una hipótesis. *Bol. Méd. Hosp. Infant. Méx.* 40: 28-33.
6. **Chávez B. E., Martínez Gómez L. E., Cedillo Ramírez M. L., Gil Juárez C., Avelino Flores F. y Castañeda Roldán E. I.** 2007. Identificación de cepas de *Escherichia coli* enterotoxigénicas en diferentes ambientes. *Enf. Inf. Microbiol.* 27 (3): 70-74.
7. **Condon C., Squires C. & Squires C. L.** 1995. Control of rRNA transcription in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* 59(4): 623–645.
8. **Cortes O. L., Rodríguez A. G., Moreno E. E., Tenorio L. J. M., Torres M. B. P. y Montiel V. E.** 2002. Brote causado por *Escherichia coli* en Chalco, México. *Rev. Salud Pública de México.* 44(4): 297-302.
9. **Cravioto A., Reyes E. R., Ortega R., Fernández G., Hernández R. & López D.** 1988. Prospective study of diarrhoeal disease in a cohort of rural Mexican children: Incidence and isolated pathogens during the first two years of life. *Epidem. Inf.* 101: 123-134.
10. **Cravioto A., Reyes R., Trujillo F., Uribe F., Navarro A., De La Roca J., Hernández M., Pérez G & Vázquez V.** 1990. Risk of diarrhea during the first year of life associated with initial and subsequent colonization by specific enteropathogens. *American J. Epidem.* 131(5): 886-904.
11. **Fleckenstein J. M., Hardwidge P. R., Munson G. P., Rasko D. A., Sommerfelt H. & Steinsland H.** 2010. Molecular mechanisms of enterotoxigenic *Escherichia coli* infection. *Microbes and Infection.* 12: 89-98.
12. **García-Martínez J, Martínez-Murcia A., Antón A. I. & Rodríguez-Valera F.** 1996. Comparison of the small 16S to 23S intergenic spacer region (ISR) of the RNA operons of some *Escherichia coli* strains of the ECOR collection and *E. coli* K12. *J Bacteriol.* 178(21): 6374–6377.
13. **García-Martínez, J., Martínez-Murcia J. A., Rodríguez-Valera F & Zorraquino A.** 1996. Molecular evidence supporting the existence of two

- major groups in uropathogenic *Escherichia coli*. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 14: 231-244.
14. **García-Martínez, J., Acinas S. G., Antón A. I. & Rodríguez-Valera F.** 1999. Use of the 16S-23S ribosomal genes spacer region in studies of prokaryotic diversity. J. Microbiol. Met. 36: 55-64.
 15. **Gürtler V.** 1999. The role of recombination and mutation in 16S-23S rDNA spacer rearrangements. Gene 238: 241-252.
 16. **Gütelr V. & Stanisich V. A.** 1996. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. Microbiol. 142: 3-16.
 17. **Hacker J. & Blum-Oehler.** 2007. In appreciation of Theodor Escherich. Nature Publishing Group. 5: 902.
 18. **Jensen M. A., Webster J. A. & Straus N.** 1993. Rapid identification of bacteria on the basis of Polymerase Chain Reaction-Amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. Appl. Environ. Microbiol. 59(4): 945-952.
 19. **Klug W. S. & Cummings M. R.** 1999. Conceptos de genética. 5ta. Edición. Prentice Hall Iberia, Madrid. Págs. 454-456.
 20. **Lindenthal C. & Elsinghorst E. A.** 2001 Enterotoxigenic *Escherichia coli* TibA Glycoprotein Adheres to Human Intestine Epithelial Cells. Infection and Immunity. 69(1): 52-57.
 21. **Nataro, J. P. & Kaper J. B.** 1998 Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clinical Microbiol. Rev. 11(1): 142-201.
 22. **Pérez L. S., Rodríguez-Valera F., Lan R. & Reeves R. P.** 1998. Variation of the ribosomal operon 16S-23S gene spacer region in representatives of *Salmonella enterica* Subspecies. J. Bacteriol. 180(8): 2144-2151.
 23. **Qadri F., Svennerholm Ann-Mari, Faruque A. S. & Bradley S. R.** 2005 Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: Epidemiology, Microbiology, Clinical Features, Treatment, and Prevention. Clin. Microbiol. Rev. 18 (3): 465-483.
 24. **Rodríguez A. G.** 2002. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. Salud púb. de Méx. 44(5): 464-475.
 25. **Shaheen H., Khalil S., Rao M., Elyazeed R., Wierzba T., Peruski L., Putman S., Navarro A., Morsy B., Cravioto A., Clemens J., Svennerholm Ann-Mari & Savarino S.** 2004. Phenotypic profiles of Enterotoxigenic *Escherichia coli* associated whit early childhood diarrhea in rural Egypt. J. Clinic. Microbiol. 44(12): 5588-5595.
 26. **Sizemore D. R., Roland K. L. & Ryan U. S.** 2004. Enterotoxigenic *Escherichia coli* factors and vaccine approaches. Expert Rev. 3(5): 585-595.
 27. **Souza V., Castillo A., Rocha M., Sandner L., Silva C. & Eguiarte L.** 2001. Ecología evolutiva de *Escherichia coli*. INC, 26:513-517. ISSN 0378-1844.
 28. **Tenaillon O., Skurnik D., Picard B. & Denamur E.** 2010. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. Nature Rev. Microbiol. 8: 207-217
 29. **Turner S. M., Chaudhuri R. R., Jiang Z-D., DuPont H., Gyles C., Penn C. W., Pallen M. J., & Henderson I. R.** 2006. Phylogenetic comparisons reveal multiple acquisitions of the toxin genes by Enterotoxigenic

- Escherichia coli* strains of different evolutionary lineages. J. Clin. Microbiol. 44(12): 4528-4536.
30. **Turner S. M., Scott-Tucker A., Cooper L. M., & Henderson I. R.** 2006. Weapons of mass destruction: virulence factors of the global killer Enterotoxigenic *Escherichia coli*. FEMS Microbiol Lett 263: 10-20.
 31. **WHO.** 2006. Future directions for research en Enterotoxigenic *Escherichia coli* vaccines for developing countries. Releve Epidemiologique. 81(11): 97-104.

Páginas web.

32. <http://insilico.ehu.es/>
33. www.ncbi.gov.

APÉNDICE.

8.1 Apéndice I.

Apéndice 1a. Material, equipos y reactivos.

Material	Equipos
-Tubos de ensayo 13X100 con tapón de rosca y sin tapón. -Tubos de ensayo 16X150 con rosca.	Termociclador. -MultiGene. Labnet Internacional, Inc. -MJ Research PTC-200
-Cajas petri de plástico estériles.	-Potenciómetro (CORNING, 442).
-Matraz volumétricos de 500 y 1000mL.	-Incubadora Revco Technologies.
-Matraz Erlenmeyer de 250, 600 y 1000 mL.	-Baño de agua. Boekel Grant.
-Vasos de precipitados de 50, 100 y 500mL.	-Termoblock. Multi-blok. Lab. Line.
-Tubos Eppendorf de 1.5 mL y 100µl.	-Vortex. Mistral Mixer. Lab line.
-Mechero Fisher.	-Centrifuga. Biofuge pico Heraeus. Accesolab.
-Probetas de 500, 1000 mL.	-Transiluminador (HOEFER).
-Asas bacteriológicas.	-Autoclave.
-Puntas para micropipetas.	-Balanza analítica.
-Pipetas Pasteur estériles.	-Fotodine palaroid. 23876.
-Espátula.	-Scanner. Bio Image. Sharp JX-610. Whole band Analyzer.
-Micropipetas (2µl. 10µl. 20µl. 100µl. 200µl. 500µl y 1000µl).	Cámara electroforética. LKB Bromma 2010 Maxiphor.
	-Refrigerador.

Reactivos.	Medios de cultivo.
Agarosa. Invitrogen®. Catalogo no. 15510-019. Lote 1106405.	Sulfuro Indol Movilidad (SIM). Merck®.
	Agar Hierro Kligler (KIA). Merck®.
	Agar Citrato de Simmons. Bioxon®.
Enzimas. Hinf I invitrogen®. Catalogo no. 15223-019. Rsa I invitrogen®. Catalogo no. 15424-013. Taq I invitrogen®. Catalogo no. 15218-019.	Caldo Rojo de Metilo-Voges Proskauer (RMVP). Bioxon®.
	Mac Conkey Agar. Bioxon®.
	Base de Agar Sangre. BD Bioxon®
	Sangre de Carnero desfibrinada y estéril. Gelosa Especial. Bioxon®.
QIAamp DNA Mini Kit (kit comercial para extraer DNA). Qiagen®.	Luria Broth base (LB). Invitrogen®.
Taq DNA polymerase, Recombinant. Invitrogen®. Cat. no. 11615-010 (500 unidades) Conc. 5U/µl.	Muller-Hinton. Dibico®.
Agua para PCR y agua destilada.	Peptona de caseína. Bioxon®.
Buffer 10X para PCR. Invitrogen®. minus Mg.	
dNTP's 10mM. Invitrogen®.	

MgCl ₂ 50mM. Invitrogen®.	
Primers. Invitrogen®.	
Bromuro de etidio. 10mg/mL.	
Buffer TBE 0.5X.	
Batería de pruebas API 20E.	
Rojo de metilo.	
KOH 40%	
Indol de Ehrlich.	
Reactivo de Kovacs.	
α-naftol 5%	
Etanol abs. 95%.	
NaCl.	
HCl. conc.	
Gibco BRL® Markers and Standards. 100bp DNA Ladder. Cat. no. 15628-019	
Low DNA Mass Ladder. Cat. no. 10068-013.	
TE pH 8.	
EDTA 0.5M pH 8.	

Apéndice Ib. Preparación de medios de cultivo y reactivos.

1. **Caldo Luria (LB)** (Miller's LB Broth base). Invitrogen®. Lote 80265079. Suspender 25.0g del medio en un litro de agua destilada, dejar hidratar por 15 min. Hervir hasta completa disolución. Distribuya en tubos de ensayo 16X150mL con tapón de rosca (5 mL por tubo). Esterilizar en autoclave 15 min/121°C ó 15 lb. Conservar a 4°C.

2. **Agar Kligler**. Merck®. Lote 00802. Suspender 55g de Agar Kligler en un litro de agua destilada, dejar hidratar por 15 min. Hervir hasta completa disolución. Distribuya en tubos de ensayo con tapón de rosca (3 mL por tubo). Esterilizar en autoclave 15 min/121°C ó 15 lb. Inclinar los tubos de tal manera que se genere un pico de flauta. Conservar a 4°C.

3. **Medio de cultivo SIM**. Merck®. Lote 41017. Suspender 30g de Medio de cultivo SIM en un litro de agua destilada, dejar hidratar por 15 min. Hervir hasta completa disolución. Distribuya en tubos de ensayo con tapón de algodón (3 mL por tubo). Esterilizar en autoclave 15 min/121°C ó 15 lb. Dejar que el medio solidifique en posición vertical. Conservar a 4°C.

4. **Agar MacConkey**. BD Bioxon®. Lote 8285472. Suspender 50g del medio en un litro de agua destilada. Mezclar bien hasta que se tenga una suspensión uniforme. Dejar reposar de 10-15 min. Calentar suavemente agitando frecuentemente y hervir durante un minuto. Esterilizar en autoclave 15min/121°C ó 15 lb. Vaciar en cajas petri estériles y dejar solidificar. Conservar a 4°C.

5. **Medio RMVP**. BD Bioxon®. Lote 01112211. Disolver 17g del polvo en un litro de agua destilada. Dejar hidratar durante 10-15 min. Disuelva calentando y deje hervir aproximadamente un minuto. Distribuya en tubos de ensayo con tapón de algodón (3 mL por tubo) y esterilice en autoclave 15 min/121°C ó 15 lb. Conservar a 4°C.

6. **Agar Citrato de Simmons.** BD Bioxon®. Lote 186B0A2. Suspender 24.2g de polvo en un litro de agua destilada. Dejar hidratar durante 10-15 min. Mezclar y calentar suavemente agitando frecuentemente hasta que el medio hierva durante 1 min. Distribuir en tubos de ensayo con tapón de rosca (3 mL por tubo) y esterilizar 15min/121°C ó 15 lb. Se deja enfriar en posición inclinada de tal manera que se genere un pico de flauta. Conservar a 4°C.

7. **Base de Agar Sangre:** BD Bioxon®. Lote 8273351. Suspender 40g de polvo en un litro de agua destilada. Mezclar, calentar con agitación frecuente y hervir durante 1 min hasta disolución completa. Esterilizar en autoclave 15min/121°C ó 15 lb. Para la preparación de placas con sangre, enfriar la base a 45- 50 °C y adicionar 5% de sangre estéril defibrinada. Vaciar en cajas petri estériles y dejar solidificar. Conservar a 4°C.

8. **Gelosa Especial.** 1L pH = 7.2-7.4

Base de agar sangre.....20g. BD Bioxon®. Lote 8273351
Agar bacteriológico.....15g. BD Bioxon®. Lote H101617J
Extracto de carne.....1.5g BD Bioxon®. Lote C3016670
Agua destilada.....1000mL

Mezclar bien y calentar suavemente agitando frecuentemente hasta que el medio hierva durante 1 min. Ajustar pH. Distribuir en tubos con tapón de rosca (4 mL por tubo) y esterilizar 15min/121°C ó 15 lb. Se deja enfriar en posición inclinada de tal manera que se genere un pico de flauta. Conservar a 4°C.

9. **Muller Hinton.** DIBICO®. Lote: 1732111. Suspender 21g de polvo en un litro de agua destilada. Mezclar perfectamente, calentar con agitación frecuente y hervir durante 1 min hasta disolución completa. Vaciar en tubos de ensayo de 16X150mL. Esterilizar en autoclave 15min/121°C ó 15 lb. Conservar a 4°C.

10. **Agua peptonada 1%.**

Peptona de caseína. Bioxon®. Lote F7066016

Disolver 10g en 1L agua destilada. Ajustar pH 7.2 Mezclar bien. Distribuir en tubos (2 mL por tubo) y esterilizar 15min/121°C ó 15 lb. Conservar a 4°C.

10. **Agarosa MP.** Invitrogen®. Catalogo no. 15510-019. Lot. no. 1106405.

11. **Reactivo de Kovacs:** Disolver 10g de *p*-dimetilaminobenzaldehído (DMAB) en 150mL de alcohol amílico ó isoamílico puro: puede ser necesario calentar con suavidad para disolver. Agregar lentamente 50mL de HCl concentrado a la mezcla. Conservar en un frasco ámbar, guardar en refrigeración cuando no esté en uso.

12. **α -naftol al 5 %:** Reactivo utilizado para la prueba Voges-Proskauer. El α -naftol actúa como intensificador de color.

Disolver 5g de α -naftol en menos de 100 mL de alcohol absoluto (o al 95%). Transferir la solución a un frasco graduado de 100 mL y llevarlo a 100 mL con etanol absoluto. Conservar en refrigeración cuando no se use.

13. **Hidróxido de potasio al 40%:** Reactivo utilizado en la prueba Voges-Proskauer, el cual ayuda a la absorción de CO₂ en el medio VP.

Pesar con rapidez 40g de KOH y disolver en menos de 100 mL de agua destilada. Este reactivo es altamente higroscópico. Transferir la solución a un frasco graduado de 100 mL y llevar a 100 mL con agua destilada. Conservar en una botella de polietileno o recubierta con parafina. Vencimiento a las 2-3 semanas de preparación. Evitar la exposición directa con la piel ya que puede causar quemaduras dolorosas.

14. Rojo de metilo: Es un indicador de pH que ya es ácido y denotará cambios en la acidez por reacciones de color por encima de un rango de pH 4.4 – 6 o menor en el medio, el reactivo permanece rojo, mientras que con la acidez disminuida a pH 6, el indicador vira a amarillo.

Disolver 0.1g de rojo de metilo en 300 mL de alcohol etílico al 95%. Agregar 200 mL de agua desionizada a la mezcla de alcohol-indicador; volumen total, 500 mL. Mantener en refrigeración cuando no se use. Vencimiento a las 2-3 semanas después de la preparación.

15. Solución salina isotónica. (0.85% de NaCl).

16. Buffer TBE.

TBE 5X.

Tris base.....54g.

Ácido bórico (Merck®).....27.5g.

EDTA 0.5M pH 8.....20mL.

Aforar a un Litro de agua desionizada estéril.

TBE 0.5X.

Diluir 1:10 el buffer de TBE 5X con agua desionizada estéril.

17. Bromuro de etidio 10mg/mL.

Bromuro de etidio.....1g.

Agua desionizada estéril.....100mL.

Mezclar en agitador magnético por muchas horas hasta asegurar la disolución del colorante.

18. EDTA 0.5M pH 8

EDTA. 2H₂O.....186.1g

H₂O desionizada.....800mL.

Agitar vigorosamente (en placa de agitación) y ajustar el pH a 8.0 con NaOH (aprox. 20 g). Aforar a 1000 mL, esterilizar por autoclave 15min/121°C ó 15 lb.

19. TE pH 8

Tris 1M pH 8.....10mL.

EDTA 0.5 M pH 8.....2mL.

Aforar a 1000 mL, alicuotar y esterilizar por autoclave 15min/121°C ó 15 lb de presión.

Apéndice Ic. Protocolo de extracción de DNA.

1. Colectar el pellet de 5mL del cultivo en caldo LB en un tubo Eppendorf de 1.5mL mediante centrifugación 1300rpm/5min.
2. Resuspender el pellet con 1100µl de TE. Tomar 100µl de la suspensión y colocar en otro tubo Eppendorf de 1.5mL. Centrifugar a 7500rpm/5 minutos, desechar el sobrenadante.
3. Resuspender el botón bacteriano con 200µl de buffer ATL.
4. Adicionar 25µl de proteinasa K, agitar en vortex. Incubar en termoblock a 56°C/15 min. Agitar en vortex a los 5, 10 y 15min.
4. Adicionar 200µl de buffer AL, agitar por vortex. Incubar en termoblock 70°C/15min. Agitar en vortex a los 5, 10 y 15min. Centrifugar a 8 000rpm/1 min.
5. Adicionar 200µl de etanol absoluto, agitar por vortex, dar un pin.
6. Transferir la mezcla a la columna. Centrifugar a 8 000rpm/1 min. Desechar el filtrado.
7. Agregar a la columna 500µl de buffer AWI. Centrifugar a 8000rpm/ 1min.
8. Colocar la columna en un nuevo tubo colector.
9. Adicionar 500µl de buffer AW2, centrifugar a 14000rpm/3 min., desechar el filtrado, volver a centrifugar a 14000rpm/1 min.
10. Colocar la columna en un tubo Eppendorf de 1.5mL. Adicionar 250µl de agua para PCR, incubar a temperatura ambiente un minuto. Centrifugar a 8000rpm/ 1 min.
11. Colocar la columna en un tubo Eppendorf de 1.5mL. Adicionar 50µl de agua para PCR, incubar a temperatura ambiente un minuto. Centrifugar a 8000rpm/1 min.

8.2 Apéndice II.

Apéndice Ila. Secuencia de los genes 16S y 23S RNAr de *Escherichia coli* str. K-12 substr. W3110.

Gen 23S rrlC RNAr.

3692977-3690074 GenelD: 7436069.

```
GGTTAAGCGACTAAGCGTACACGGTGGATGCCCTGGCAGTCAGAGGCGATGAAGGACGT
GCTAATCTGCGATAAGCGTCCGGTAAGGTGATATGAACCGTTATAACCGGCGATTTCCGAA
TGGGGAAACCCAGTGTGTTTTCGACACACTATCATTAACTGAATCCATAGGTTAATGAGGC
GAACCGGGGGAACCTGAAACATCTAAGTACCCCGAGGAAAAGAAATCAACCGAGATTCC
CCCAGTAGCGGCGAGCGAACGGGGAGCAGCCCAGAGCCTGAATCAGTATGTGTGTT
AGTGGAAGCGTCTGGAAAGGCGCGGATACAGGGTGACAGCCCCGTACACAAAAATGCA
CATATTGTGAGCTCGATGAGTAGGGCGGGACACGTGGTATCCTGTCTGAATATGGGGGG
ACCATCCTCCAAGGCTAAATACTCCTGACTGACCGATAGTGAACCAGTACCGTGAGGGAA
AGGCGAAAAGAACCCCGGCGAGGGGAGTGAAAAAGAACCTGAAACCGTGTACGTACAAG
CAGTGGGAGCACGCTTAGGCGTGTGACTGCGTACCTTTTGTATAATGGGTCAGCGACTTA
TATTCTGTAGCAAGGTTAACCGAATAGGGGAGCCGAAGGGAAACCGAGTCTTAACTGGGC
GTTAAGTTGCAGGGTATAGACCCGAAACCCGGTATCTAGCCATGGGCAGGTTGAAGGTT
GGGTAACACTAACTGGAGGACCGAACCGACTAATGTTGAAAAATTAGCGGATGACTTGTG
GCTGGGGGTGAAAGGCCAATCAAACCGGGAGATAGCTGGTTCTCCCCGAAAGCTATTTA
GGTAGCGCCTCGTGAATTCATCTCCGGGGGTAGAGCACTGTTTCGGCAAGGGGGTCATC
```

CCGACTTACCAACCCGATGCAAACCTGCGAATACCGGAGAATGTTATCACGGGAGACACAC
GGCGGGTGCTAACGTCCGTCGTGAAGAGGGAAACAACCCAGACCGCCAGCTAAGGTCCC
AAAGTCATGGTTAAGTGGGAAACGATGTGGGAAGGCCAGACAGCCAGGATGTTGGCTT
AGAAGCAGCCATCATTTAAAGAAAGCGTAATAGCTCACTGGTTCGAGTCGGCCTGCGCGGA
AGATGTAACGGGGCTAAACCATGCACCGAAGCTGCGGCAGCGACGCTTATGCGTTGTTG
GGTAGGGGAGCGTTCTGTAAGCCTGCGAAGGTGTGCTGTGAGGCATGCTGGAGGTATCA
GAAGTGCGAATGCTGACATAAGTAACGATAAAGCGGGTGAAAAGCCCCTCGCCGGAAG
ACCAAGGGTTCCTGTCCAACGTTAATCGGGGCAGGGTGAGTCGACCCCTAAGGCGAGGC
CGAAAGGCGTAGTCGATGGGAAACAGGTTAATATTCCTGTACTTGGTGTTACTGCGAAGG
GGGACGGAGAAGGCTATGTTGGCCGGGCGACGGTTGTCCCGGTTTAAGCGTGTAGGC
TGGTTTTCCAGGCAAATCCGGAAAATCAAGGCTGAGGCGTGATGACGAGGCACTACGGT
GCTGAAGCAACAATGCCCTGCTTCCAGGAAAAGCCTCTAAGCATCAGGTAACATCAAAT
CGTACCCCAAACCGACACAGGTGGTCAGGTAGAGAATACCAAGGCGCTTGAGAGAACTC
GGGTGAAGGAAGTGGCAAATGGTGCCGTAACCTCGGGAGAAGGCACGCTGATATGTA
GGTGAAGCGACTTGCTCGTGGAGCTGAAATCAGTCGAAGATAACAGCTGGCTGCAACTG
TTTATTA AAAACACAGCACTGTGCAAACACGAAAGTGGACGTATACGGTGTGACGCCTGC
CCGGTGCCGGAAGGTTAATTGATGGGGTTCAGCGCAAGCGAAGCTCTTGATCGAAGCCCC
GGTAAACGGCGGCCGTAACATAACGGTCTTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTCGGGTAAAGT
TCCGACCTGCACGAATGGCGTAATGATGGCCAGGCTGTCTCCACCCGAGACTCAGTGAA
ATTGAAGTTCGCTGTGAAGATGCAGTGTACCCGCGGCAAGACGGAAAGACCCCGTGAACC
TTTACTATAGCTTGACACTGAACATTGAGCCTTGATGTGTAGGATAGGTGGGAGGCTTTGA
AGTGTGGACGCCAGTCTGCATGGAGCCGACCTTGAAATACCACCCTTTAATGTTTGATGT
TCTAACGTGGACCCGTGATCCGGGTTGCGGACAGTGTCTGGTGGGTAGTTTGACTGGGG
CGGTCTCCTCCTAAAGAGTAACGGAGGAGCACGAAGGTTGGCTAATCCTGGTCGGACAT
CAGGAGGTTAGTGCAATGGCATAAGCCAGCTTGACTGCGAGCGTGACGGCGCGAGCAG
GTGCGAAAGCAGGTCATAGTGATCCGGTGGTTCTGAATGGAAGGGCCATCGCTCAACGG
ATAAAAGGTAACCGGGGATAACAGGCTGATACCGCCCAAGAGTTCATATCGACGGCGGT
GTTTGGCACCTCGATGTGCGGCTCATCACATCCTGGAGCTGAAGTAGGTCCCAAGGGTATG
GCTGTTTCGCCATTTAAAGTGGTACGCGAGCTGGGTTTGAACGTCGTGAGACAGTTCCGT
CCCTATCTGCCGTGGGCGCTGGAGAAGTGGAGGGGGCTGCTCCTAGTACGAGAGGACC
GGAGTGGACGCATCACTGGTGTTCGGGTTGTCATGCCAATGGCACTGCCCGGTAGCTAA
ATGCGGAAGAGATAAGTGTGAAAGCATCTAAGCACGAAACTTGCCCCGAGATGAGTTCT
CCCTGACTCCTTGAGAGTCTGAAGGAACGTTGAAGACGACGACGTTGATAGGCCGGGT
GTGTAAGCGCAGCGATGCGTTGAGCTAACCGGTAATAAGTGAACCGTGAGGCTTAACCTT

Gen 16S rrsC RNAr.

3694873-3693332. GenelD: 7436649

AAATTGAAGAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAA
GTCGAACGGTAACAGGAAACAGCTTGCTGTTTCGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTA
ATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCA
TAACGTTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCCAGA
TGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTG
AGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA
GTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAA
GGCCTTCGGGTTGTAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAATACCTTTGC
TCATTGACGTTACCCGCGAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT
ACGGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTAAGTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGT
TAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCTGATACTGGCAAGCTT
GAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGA
GGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGC
GTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCGACTTG
GAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTGCACCGCCTGGGG

AGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAG
CATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTGGTCTTGACATCCACGGAAGTT
TTCAGAGATGAGAATGTGCCTTCGGGAACCGTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCA
GCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTG
CCAGCGGT**CCGGCCGGGA**ACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGT
GGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGGGCTACACACGTGCTACAATGG
CGCATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCCTCGTAGT
CCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAG
AATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGT
GGGTTGCAAAAGAAGTAGGTAGCTTAACCTTCGGGAGGGCGCTTACCACTTTGTGATTCA
TGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAACCGTAGGGGAACCTGCGGTTGGATCACCTCC
TTA

Apéndice IIb. Dilución de iniciadores.

Concentración requerida 60pmol/μl.

Upper Primer: 18-mer. 16-23 El-F. 5' CCGGGCGGGAACTCAAAG 3'
Invitrogen Conc. 23.0nm

Se agregó 200μl de agua para PCR y se dejó hidratando durante 24h.
23 000pmol/200μl = 115pmol/μl Sol. Stock.

Dilución.

(115pmol/μl) (X) = (60pmol/μl) (100μl vol. a trabajar)

X = 52.17μl

Sol. de trabajo. 52.20μl sol. stock + 47.80 de agua para PCR.

Lower Primer: 21-mer 16-23 El-R. 5' CTCGCCGCTACTGGGGGAATC 3'
Invitrogen Conc. 19.6nm

Se agregó 200μl de agua para PCR y se dejó hidratando durante 24h.
19 600pmol/200μl = 98pmol/μl Sol. Stock.

Dilución.

(98pmol/μl) (X) = (60pmol/μl) (100μl vol. a trabajar)

X = 61.22μl

Sol. de trabajo. 61.20μl sol. stock + 38.80 de agua para PCR.

Apéndice IIc. Enzimas de restricción. (Endonucleasas)

Hinf I invitrogen®. Catalogo no. 15223-019 Lot: 2906006

Conc.: 10U/μl Size: 1000 Units.

Hinf I es aislado de *Haemophilus influenzae*. Rf

Reacción de condición: REact 2 buffer 10X a 37 °C

5' -G ↓ ANT C- 3'

3' -C T NA ↑G- 5'

Rsa I invitrogen®. Catalogo no. 15424-013 Lot: 2810013
Conc.: 10U/μl Size: 1000 Units.
Rsa I es aislado de *Rhodopseudomonas sphaeroides*.
Reacción de condición: REact 1 buffer 10X a 37 °C
5´ -GT ↓ AC- 3´
3´ -CA ↑ TG- 5´

Taq I invitrogen®. Catalogo no. 15218-019 Lot: KDN4DI
Conc.: 50U/μl Size: 5000 Units.
Taq I es aislado de *Thermus aquaticus*. YT-1
Reacción de condición: REact 2 buffer 10X a 65 °C
5´ -T ↓ CG A- 3´
3´ -A GC ↑ T- 5´

8.3 Apéndice III.

Apéndice IIIa. Identificación morfológica colonial.

Base de Agar Sangre: En las placas de agar sangre se observaron colonias grises, redondas, sin hemólisis, de aspecto húmedo.

Agar MacConkey: En algunas placas se aislaron dos tipos de colonias, las cuales fueron trabajadas por separado en su confirmación bioquímica de *E. coli*. Las colonias aisladas de bacterias que fermentan lactosa como *E. coli* eran rosas, color producido por la acidificación del medio. Su morfología era redonda, de borde definido y presentaban un halo color turbio. Los microorganismos no fermentadores de lactosa produjeron colonias incoloras.

Identificación bioquímica: (Pruebas realizadas)

1. Sulfuro Indol Movilidad (SIM).
Incubar 35 °C/24 horas. Aerobiosis. Agregar 5 gotas del reactivo de Kovacs.
2. Agar Hierro Kligler (KIA).
Incuabar 35 °C/24 horas. Aerobiosis.
3. Agar Citrato de Simmons.
Incuabar 35 °C/24-48 horas. Aerobiosis.
4. Caldo Rojo de Metilo-Voges Proskauer (RMVP).
Incubar 35°C/48 horas. Aerobiosis. Dividir el medio para hacer las pruebas por separado. RM agregar de 4-5 gotas de rojo de metilo, agitar hasta homogenizar. VP agregar 12 gotas de α-naftol 5% en etanol y 4 gotas de KOH al 40%, homogenizar, dejar reposar 10-15 minutos.

Las colonias fueron identificadas como *E. coli*, al presentar resultados de acuerdo a los característicos que presenta *E. coli* de acuerdo a la literatura.

IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE ESCHERICHIA COLI	
Prueba bioquímica	% de positividad
Oxidasa	0
Producción de indol	98
Rojo de metilo	99
Voges-Proskauer	0
Citrato de Simmons	1
H ₂ S (TSI)	1
Hidrólisis de urea	1
Utilización de malonato	0
Acido de glucosa	100
Gas de glucosa	95
Fenilalanina desaminasa	0
Lisina descarboxilasa	90
Arginina dihidrolasa	17
Ornitina descarboxilasa	65
Movilidad a 36 °C	95
Hidrólisis de gelatina a 22 °C	0
KCN crecimiento en	3
Fermentación de lactosa	95
Fermentación de la sacarosa	50
Fermentación de D-manitol	98
Fermentación de D-sorbitol	94
Fermentación de mucato	95
Fermentación de dulcitol	60
Fermentación de salicina	40
Fermentación de adonitol	5
Fermentación de inositol	1
Fermentación de L-arabinosa	99
Fermentación de la rafinosa	50
Fermentación de L-ramnosa	80
Fermentación de maltosa	95
Fermentación de D-xilosa	95
Fermentación de trealosa	98
Fermentación de celobiosa	2
Fermentación de α -metil-D glucósido	0
Fermentación de eritritol	0
Hidrólisis de la esculina	35
Fermentación de melobiosa	75
Fermentación de D-arabitol	5
Fermentación de D-manosa	98
Fermentación de glicerol	75
Nitrato a nitrito	100
Tartrato de Jordán	95
Utilización de Acetato	90
Lipasa (aceite de maíz)	0
DNasa a 25 °C	0
ONPG	95

Obtenido de (24).

SIM. Se observó movilidad por medio de la turbidez en el medio. Las cepas fueron Indol (+) al desarrollar un color rojo al agregar unas gotas del reactivo de Kovacs, indicando la capacidad de formar indol, con la excepción de algunas cepas (las cuales se realizó API 20E).

Kligler. Las cepas fueron (+) por presentar el pico y el fondo del agar amarillo, indicando que fermentan lactosa y glucosa. En la mayoría de las cepas se presentó burbujas en el medio y algunas veces ruptura del agar indicando la presencia de gas. No se observó la producción de ácido sulfhídrico.

Citrato de Simmons y Voges Proskauer. Para todas las cepas las dos pruebas fueron (-).

Rojo de metilo: Fue (+) para casi todas las cepas. Se produjo una coloración roja en el medio al agregar el indicador rojo de metilo indicando la presencia de productos ácidos provenientes de la fermentación de glucosa.

8.3.2 Sistema de identificación bioquímica API 20E.

Este sistema estandarizado de identificación fue utilizado para las cepas que presentaron resultados diferentes a los esperados por *E. coli* en las pruebas bioquímicas. Esta prueba se realizó a 21 cepas, de las cuales, solo 16 fueron corroboradas como *E. coli*. Las cepas que fueron confirmadas por este sistema son: Del niño 1 (cepas 7 y 8), niño 3 (cepa 1), niño 4 (cepas 8, 9, 10 y 13), niño 5 (cepa 7), niño 8 (7, 9 y 10), niño 9 (cepa 4), niño 10 (cepa 5), niño 14 (cepa 2), control 3 (cepa 6) y control 4 (cepa 3).

Resultados principales de API 20E.

Niño/ #cepa	Perfi l RsaI	Serotipo	ONP G	LD C	OD C	H2 S	IN D	V P	GL U	MA N	SO R	RH A	SA C	ME L	AR A	Resultad o
N1/7	R2	OR:H27	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	E. coli 1
N1/8	R2	O159:H20	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	E. coli 2
N3/1	R11	O?:H29	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	E. coli 2
N4/8	R10	OR:H-	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	E. coli 2
N4/9	R10	O159:H-	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	E. coli 2
N4/10	R10	O159:H-	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	E. coli 2
N4/13	R3	O175:H27	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	E. coli 1
N5/7	R2	OR:H-	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	E. coli 2
N8/7	R6	O?:H-	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	E. coli 2
N8/9	R15	O?:H-	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	E. coli 2
N8/10	R15	O?:H-	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	E. coli 2
N9/4	R15	O?:H-	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	E. coli 2
N10/5	R15	O?:H-	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	E. coli 2
N14/2	R15	O?:H-	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	E. coli 2
C3/6	R10	O159:H-	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	E. coli 2
C4/3	R8	O45:H17	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	E. coli 1