

003 76

7



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MEXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**EVOLUCION DEL LOCUS PATOGENICO LEE EN
ESCHERICHIA COLI ASOCIADA A MAMIFEROS
SILVESTRES Y HUMANOS.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS
(ECOLOGIA Y CIENCIAS AMBIENTALES)**

PRESENTA :

LUISA BEATRIZ SANDNER MIRANDA

DIRECTORA DE TESIS:

**DRA. VALERIA FRANCISCA EUGENIA LEOPOLDINA
DE MARIA DE GUADALUPE SOUZA SALDIVAR**

2001



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

A mis padres y a Clau por haber creído siempre en mí

A Luis, Valeria y Nunnemacher por haber hecho de este sueño una realidad

ÍNDICE

Resumen en español	1
Resumen en inglés	2
I. Introducción	3
1.- Generalidades	3
2.- Estructura genética y antecedentes evolutivos de <i>Escherichia coli</i>	4
3.- Patogénesis y epidemiología	5
II. Objetivos e hipótesis	14
III. Materiales y métodos	16
IV. Resultados	28
V. Discusión y conclusiones	32
Agradecimientos	35
Literatura citada	36
Tablas y figuras	42
Anexos	55

RESUMEN

Escherichia coli es un excelente modelo para el estudio de la patogénesis ya que en una sola especie se encuentran genes, grupos de genes en islas de patogénesis y plásmidos que codifican los determinantes de un amplio espectro de virulencia. En este trabajo se utilizaron 122 cepas aisladas de diferentes mamíferos de México, tanto silvestres como domésticos, así como de seres humanos. Estas cepas fueron analizadas por PCR e hibridación tipo Southern para determinar la presencia de algunos genes pertenecientes a la isla patogénica LEE (del inglés, "locus of enterocyte effacement"), el locus de esfacelamiento enterocítico que está ubicado en el cromosoma de esta bacteria. En el estudio de PCR, dos marcadores, los genes *cesT/eae* y el gen *espB* se encontraron juntos en 25.4% de las cepas estudiadas. El conjunto de genes *cesT/eae* se encontró en 8.2% de las cepas sólo, mientras que el gen *espB* se encontró en 15.6% de los casos sólo. Las pruebas de hibridación fueron realizadas con una submuestra de 25 cepas. Cuatro regiones del LEE fueron analizadas usando sondas específicas de DNA: En los resultados se encontró que las cuatro regiones estaban todas presentes (44%), todas ausentes (12%), o presentes en diferentes combinaciones (44%) en una cepa dada. Las regiones flanqueadoras del LEE mostraron la tasa más alta de hibridación (72%). Estos resultados indican que el LEE es una región muy dinámica tanto a nivel del locus completo (ya que es adquirido por linajes independientes de *E. coli*), como a nivel de sus genes individuales (ya que éstos se presentan en diferentes combinaciones en las diferentes cepas). Es probable que los diferentes genes que componen esta "isla patogénica" se adquieran o pierdan de manera independiente, y que quizá, en los linajes no patógenos estén participando en otras funciones diferentes a la de la patogénesis. Eventualmente, mediante procesos graduales de transferencia horizontal estos genes son organizados para formar la isla completa, que junto

con otros elementos extracromosomales, como los plásmidos adquiridos por evolución paralela, completan el escenario patogénico de *E. coli*.

ABSTRACT

Escherichia coli is an excellent model for studying the evolution of pathogenicity since within one species various genes, that cause virulence, can be found in pathogenic islands and plasmids. A collection of 122 strains from different mammal hosts, including wild mammals and humans, were analyzed by PCR and Southern hybridization for the presence of some of the genes included in the LEE (locus of enterocyte effacement). In PCR analysis, two markers (*cesT/eae* and *espB* genes) were found together in more strains (25.4%) than alone, as *CesT/eae* gene by itself was less common (8.2%) than *espB* gene alone (15.6 %). Four regions of the LEE were analyzed in a sub-sample of 25 strains using Southern hybridization. The four regions were either all present (44%), all absent (12%) or in different combinations (44%) in a given strain. The flanking regions of the LEE showed the highest rate of hybridization (in 72% of the strains). The results indicate that the LEE is a very dynamic entity, both at the complete locus (as it is acquired by different independent lineages of *E. coli*) and at the single gene level (as it exhibited different gene patterns within the locus). The different genes that conform to this locus seem to be horizontally acquired (or lost) in an independent way, perhaps serving other functions in the non-pathogenic lineages when not in the pathogenic island. In this way, horizontal transfer allows the gradual, stepwise construction of gene cassettes facilitating coordinate regulation and expression of novel functions.

I.INTRODUCCIÓN

1.- Generalidades

La clasificación taxonómica de *Escherichia coli* ha estado basada principalmente en las características metabólicas y antigénicas de las bacterias, pero en los últimos años las técnicas moleculares, como por ejemplo la secuenciación de ácidos nucleicos, los métodos de PCR (reacción en cadena de la polimerasa), e hibridaciones han sido de gran utilidad para definir mejor la genealogía bacteriana y por consiguiente abrir a la Microbiología las puertas del estudio de la evolución (Woese,1987). *E. coli* pertenece al género *Escherichia*. Este género está constituido por bacterias coliformes, Gram-negativas, anaerobias facultativas, móviles y con flagelos peritricos, capaces de fermentar lactosa y acetato. Este género consta de varias especies, *E. coli*, *E. hermannii*, *E. blattae*, *E. vulneris* y *E. fergusonii*, pero la más conocida y estudiada es *E. coli*. Este género pertenece a la familia Enterobacteriaceae (Atlas,1990).

E. coli es un miembro común de la microbiota intestinal de mamíferos, aves y reptiles. Mucho se sabe de *E. coli* asociada a humanos, pero estudios de la historia natural y genética de poblaciones de esta bacteria en animales silvestres son escasos. La colección estándar de referencia ECOL (Ochman y Selander, 1984) contiene un número de cepas aisladas de cinco órdenes de mamíferos no humanos, obtenidos de animales en estado de cautiverio (zoológicos). En un intento de ampliar el conocimiento de la historia natural y estructura genética de poblaciones de *E. coli* asociadas a mamíferos y aves silvestres, Souza y colaboradores (1999) han colectado más de 2000 cepas en México, Venezuela y Australia. Utilizando una sub-muestra de esta colección encontraron que la diversidad genética de *E. coli* es de $H = 0.682$, la más alta reportada hasta ahora (Milkman, 1973; Selander y Levin, 1980; Caugant *et*

al., 1981). La alta diversidad genética podría ser reflejo de la adaptación de las cepas a sus diferentes y variados hospederos. Además de vivir anaeróbicamente en el intestino grueso (en una concentración de 10^6 células por gramo de colon), *E. coli* puede vivir en ambientes secundarios como el agua, suelo, sedimentos y alimentos en concentraciones de hasta 10^4 células por ml en el caso de agua contaminada (Selander *et al.*, 1987).

El genoma de *E. coli* consta de un cromosoma circular de alrededor de 4×10^6 pares de bases, un contenido de G-C de 49-51% y un 2% de secuencias repetidas (Blattner *et al.*, 1997).

2.- Estructura genética y antecedentes evolutivos de *Escherichia coli*

En general se considera que la estructura poblacional de *E. coli* es básicamente clonal. Milkman y Bridges (1990), han estimado la tasa de recombinación como 10^{-10} por célula por generación, 5 veces menor que la de mutación, por lo que los procesos evolutivos (a corto plazo) operarían en esta especie mediante la extinción estocástica de líneas celulares o mediante la selección periódica de mutaciones que afectan la adecuación (Levin, 1981). Esto traería como consecuencia una disminución en la variación genética de la especie y un fuerte desequilibrio de ligamiento. Estudios recientes han cambiado este punto de vista, confirmando que las poblaciones bacterianas fluctúan entre ser relativamente panmícticas hasta ser básicamente clonales a diferentes niveles poblacionales (Maynard-Smith *et al.*, 1993), y que los eventos de recombinación son más frecuentes de lo estimado (Dykhuizen y Green, 1991). Los marcos clonales (Milkman, 1997) son un ejemplo de la evidencia de eventos de recombinación en un pasado. También los eventos de transducción por bacteriófagos y la existencia de los sistemas de modificación y restricción del DNA son ejemplos de la importancia de este proceso en la estructuración y evolución de las poblaciones naturales de *E. coli*

La recombinación o transferencia horizontal ha jugado un papel muy importante en la evolución de la patogénesis en *E. coli* (Perna *et al.*, 2001). No está claro si el ancestro de *E. coli* era patógeno o no, pero se reconoce que la virulencia bacteriana está sujeta a la evolución y que parte de la diversidad de *E. coli* patógena es producto de la adquisición, por transferencia horizontal, de elementos móviles como las islas patogénicas y los plásmidos que portan genes que le confieren cualidades de virulencia (Levine *et al.*, 1985). Así mismo, estos elementos novedosos pueden conferirle a la bacteria que los posee, la capacidad de sobrevivir las barreras defensivas del organismo invadido y de explotar diferentes nichos (Falkow, 1996).

3.- Patogénesis y epidemiología

Escherichia coli es un miembro común de la microbiota comensal de mamíferos y aves. Sin embargo, es capaz de causar serias enfermedades en humanos y animales incluyendo diarrea, colitis hemorrágica, disentería, síndrome de uremia hemolítica, septicemia, infecciones de la vejiga y los riñones, neumonía, meningitis neonatal, bacteremia en pacientes con SIDA y pielonefritis (Nataro and Kaper, 1998). En base a los mecanismos patogénicos, *E. coli* diarreagénica se puede caracterizar en cinco categorías: enterotoxigénica (ETEC), enteroinvasiva (EIEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroagregativa (EAEC) y enteropatogénica (EPEC) (Donnenberg y Kaper, 1992). Las cepas de *E. coli* que son capaces de colonizar el tracto urinario se clasifican en otra categoría (UTI). Estas categorías generalmente están asociadas a serogrupos específicos basados en los antígenos somáticos (O), flagelares (H) y capsulares (K) (Anexo A). Una combinación específica de antígenos O y H definen el serotipo de una cepa que puede ser asociada a un determinado síndrome clínico. Los antígenos serológicos *per se* no confieren la virulencia, pero son marcadores que en buena medida se asocian con la

presencia de ciertos factores de virulencia (Nataro y Kaper, 1998). En esta investigación se utilizaron 122 cepas de diferentes serotipos y asociadas a diferentes hospederos, sirviendo las cepas EPEC y EHEC como modelo para el estudio de la evolución de la patogénesis en *E. coli*, ya que éstas presentan genes asociados a procesos patogénicos que afectan las poblaciones humanas.

Existen pocos datos sobre el porcentaje de incidencia de los diferentes serotipos en México, pero algunos estudios señalan que al menos en México, los niños son colonizados por bacterias patógenas durante los dos primeros años de vida (Cravioto *et al.*, 1988) Existen algunos estudios que indican que los serotipos más comúnmente asociados a EPEC y ETEC tienen una incidencia significativamente mayor en los niños pequeños y esta incidencia aumenta en zonas rurales donde las condiciones de salubridad son poco adecuadas (Cravioto *et al.*, 1988).

a) *Escherichia coli* enteropatogénica

Las cepas clasificadas como *E. coli* enteropatogénica (EPEC) están adaptadas a hospederos humanos y a otros mamíferos, y causan diarrea aguda en niños menores de 2 años en países en vías de desarrollo (Levine, 1987). La razón por la cual la incidencia en adultos es muy baja aún no es clara, pero podría deberse a la pérdida de receptores específicos con la edad (Nataro y Kaper, 1998). Raramente producen infecciones extraintestinales. Las epidemias son esporádicas y suceden en hospitales o guarderías. Cuando son adultos los infectados, se supone que se debe a la ingestión de gran cantidad de inóculo o a individuos depauperados (Nataro y Kaper, 1998).

La transmisión de EPEC es fecal-oral y generalmente a través de manos y otros objetos contaminados. Se han encontrado serotipos característicos de EPEC en aire, agua, comida y en los excrementos de animales que pueden servir como reservorios de estas bacterias (Nataro y Kaper, 1998).

Las EPEC han sido caracterizadas en base a su serotipo, a su histopatología mediante el análisis de biopsias del epitelio intestinal, y a la ausencia de la toxina de tipo “Shiga” (Jerse et al, 1990; Nataro y Kaper, 1998). La histopatología es conocida como “lesión de adherencia y esfacelamiento” A/E (del inglés: Attachment/Effacement) y será discutida ampliamente más adelante.

La presencia o ausencia del plásmido EAF no había sido considerada como un marcador de esta cepa, ya que existen cepas EPEC que no lo poseen, sobre todo en cepas asociadas a animales (Rocha *et al.*, 1999). Lo que sí está en debate es que si estas cepas sin EAF pueden considerarse como verdaderos patógenos para el hombre (Kaper, 1996). Finalmente, en el Segundo Simposio Internacional sobre EPEC se llegó a una definición consenso: “ las cepas que producen la lesión A/E, negativas para la toxina de tipo Shiga (Stx) y que poseen el plásmido EAF son consideradas como EPEC típicas, mientras que las que no tienen el plásmido son cepas EPEC atípicas” (Nataro y Kaper,1998).

b) Locus de esfacelamiento enterocítico LEE

Mc Daniel *et al.*(1995) reportaron una región de aproximadamente 35 kb que codifica para todos los factores que producen el fenotipo A/E en varios patógenos entéricos como *E. coli* enteropatogénica (EPEC) y *E. coli* enterohemorrágica (EHEC). Otros patógenos como *Citrobacter rodentium* y *Hafnia alvei* una región similar (Shauer y Falkow, 1993). Aunque varios estudios previos al trabajo de Moon *et al.* (1983) reportaron esta histopatología de la mucosa intestinal (Cravioto *et al.*, 1979), fue gracias a él que se acuñó el término A/E. Este fenotipo se caracteriza por el esfacelamiento o borramiento de las microvellosidades de la mucosa del intestino delgado y la adherencia íntima de la bacteria a la célula epitelial.

Se han descrito varios genes que pertenecen a esta isla patogénica conocida con el nombre de locus LEE (del inglés “locus of enterocyte effacement”, locus de esfacelamiento enterocítico). El grupo de

genes *eae*, *esp* y *esc* (Fig.1) han sido estudiados ampliamente por diversos autores. Los genes *eae* codifican para una proteína de membrana externa de 94 a 97 kDa llamada intimina, la cual es responsable de la adherencia íntima de la bacteria al epitelio intestinal. Este fue el primer gen de virulencia que fue confirmado en EPEC (Jerse et al,1990). Los genes *esp* codifican para proteínas que son secretadas y transferidas a la célula epitelial del hospedero donde son responsables de activar la transducción de señales a través del epitelio(Foubister *et al.*, 1994; Kenny y Finlay, 1995). El grupo *esc* codifica las proteínas responsables de la exportación de factores de virulencia que confirman la existencia de un sistema de secreción de tipo III en estas bacterias. Este sistema de secreción es homólogo al sistema de secreción de *Yersinia* y es dependiente del contacto de la bacteria con la célula del hospedero (Jarvis *et al.*, 1995). Las proteínas secretadas o proteínas efectoras tienen un efecto directo sobre la célula hospedera y la modifican para beneficio del patógeno. Se ha visto que los genes que codifican el sistema de secreción están ubicados generalmente en islas patogénicas. Su origen no está claro, pero dada su homología con los genes flagelares, podría ser que procedan de ese grupo de genes, o dado que casi siempre se ubican en un cassette de virulencia , podría ser que tenga origen foráneo (Meccas y Strauss, 1996). Mutaciones de la cepa EPEC E2348/69 en la región del gen *eae* resultan en una virulencia atenuada. Sin embargo, mutaciones en el locus *espB* eliminan la formación de la lesión A/E (Jarvis *et al.* 1995). Recientemente se propuso la existencia de una proteína producida y exportada por EPEC que después de ser fosforilada es insertada en la membrana del epitelio intestinal, sirve como receptor de la intimina. Esta proteína ha sido llamada Tir (Translocated intimin receptor). Anteriormente se le atribuía origen epitelial y se le conocía con el nombre de Hp90 (Kenny *et al.*1997).

c) Plásmido EAF (EPEC attachment factor)

Además de los factores cromosómicos, se requiere de un plásmido para que se de la lesión completa de adherencia y esfacelamiento en EPEC. Estas bacterias se adhieren a la superficie de la mucosa intestinal en grupos discretos, un fenómeno conocido como adherencia localizada (LA). En base a estas observaciones, parece evidente que las bacterias, además de interactuar con la superficie del epitelio, interactúan entre si. Girón y colaboradores (1991) identificaron unos filamentos en EPEC que se agregan formando un pilus, el cual se enmadeja de tal manera que forma una estructura tridimensional donde se embeben las bacterias. La producción del BFP (del inglés Bundle-Forming Pilus) se asocia con la presencia de un plásmido de aproximadamente 92 kb que codifica factores de adherencia en EPEC y que es llamado EAF (del inglés EPEC Adherence Factor). Cepas EPEC que carecen de este plásmido no son virulentas en humanos o se adhieren pobremente a células HEp-2 (Girón *et al.*, 1991). En otro trabajo posterior se sugirió que en este plásmido se encontraba la región reguladora del gen *eae* a la cual se le designó como la región *per* (Gómez-Duarte y Kaper, 1995) (Fig.1). Cepas EPEC curadas de este plásmido, o con mutaciones en la región designada como *per*, presentaban bajos niveles de intimina y deficiencia en producir la lesión A/E. Se ha demostrado que la región *per* también regula positivamente otros genes que componen el locus LEE (Gómez *et al.*, 1994).

El hecho de que parte de los genes reguladores del LEE se encuentren en un plásmido, que el contenido de G-C es de 29.6% y que exista una homología de nucleótidos entre la región *perD* y un elemento transponible, el Tn7, sugieren que esta región fue introducida en EPEC por algún transposón. Es probable, pero aún no ha sido comprobado, que el locus LEE completo también haya sido introducido en la región *selC* del cromosoma de *E. coli* por elementos transponibles. Parece ser que *selC* es una región del cromosoma de *E. coli* en la que generalmente estos cassettes de virulencia son

insertados (Mc Daniel *et al.* 1995). La regulación codificada por elementos plasmídicos y la existencia de elementos móviles conservados en *E. coli* entérica, nos dan luz acerca de los mecanismos evolutivos que han modelado la virulencia en esta especie bacteriana.

d) Histopatología de la lesión A/E

La inducción de la lesión A/E en EPEC ha sido descrita con un modelo patogénico de tres etapas (Donnenberg y Kaper, 1992) (Fig.2).

I Etapa: Adherencia localizada

Al comienzo de la infección, la bacteria se adhiere a las microvellosidades del epitelio intestinal mediada por el BFP, que como se dijo anteriormente está codificado por los genes plasmídicos *bfp*. A este primer paso se le conoce como adherencia localizada. Estudios recientes han concluido que el BFP es necesario para la adherencia entre bacterias, pero no existe prueba definitiva de que el BFP medie la adherencia directa a las células epiteliales (Nataro and Kaper, 1998). Sin embargo, cepas mutantes en el *bfpA*, el gen que codifica para la subunidad principal de BFP, son avirulentas en voluntarios adultos (Bieber *et al.*, 1998). Se han descrito 14 genes en el plásmido EAF que se requieren para el ensamblaje del BFP (Sohel *et al.* 1996, Stone *et al.* 1996) (Fig. 1) y que son regulados también por los genes *per* (*bfpIVW*, Tobe *et al.* 1996) y por el gen cromosomal *dsbA* que codifica una enzima que cataliza la formación de enlaces disulfuro necesarios para la estabilidad de las fimbrias de tipo IV (BFP) (Zhang y Donnenberg, 1996).

II Etapa: Transducción de señales

Inmediatamente después de la adherencia inicial, EPEC libera una serie de señales moleculares cuyo blanco son las células epiteliales, promoviendo la fosforilación de la proteína Tir, que tiene como función ser receptor en la membrana de las células epiteliales (Kenny *et al.*, 1997). También se produce

un aumento en los flujos intracelulares de calcio $[Ca^{2+}]$ inducido por el inositol trifosfato (ITP), lo cual resulta en cambios importantes del citoesqueleto del enterocito debido al rompimiento o polimerización de la actina de las microvellosidades. El ITP resulta del rompimiento del fosfatidil inositol con la enzima fosfolipasa C, la cual parece ser que es activada por la bacteria (Baldwin *et al.* 1991). De esta forma se promueve la adherencia íntima de las bacterias al epitelio intestinal. Los genes responsables de estos eventos son los del grupo *esp* y los del sistema de secreción, los *esc*. Mutaciones en estos genes eliminan estas señales.

III Etapa: Adherencia íntima

Durante esta etapa la bacteria se une íntimamente al enterocito vía la intimina, la cual es codificada por el gen *eae* provocando la formación de una estructura de pedestal en la superficie de la célula epitelial característica de esta patogénesis (Fig. 2).

Hicks *et al.* (1998) proponen un modelo de cuatro etapas en el cual la adherencia inicial no está mediada por el BFP, sino por otro tipo de adhesinas aún no determinadas. Las dos siguientes etapas son iguales que en el modelo descrito arriba y se propone en la cuarta etapa, que las cepas típicas EPEC que expresan el BFP forman colonias tridimensionales capaces de expandirse a lo largo del epitelio (Fig 3). Este modelo podría explicar la formación de la lesión A/E en cepas EHEC, las cuales poseen el locus LEE pero no el plásmido EAF.

Las causas de la aparición de diarrea en individuos infectados con bacterias que pertenecen a serotipos correspondientes a EPEC y EHEC son multifactoriales. Por ejemplo, pueden ser provocadas por la activación de dos cinasas, la PKC que induce cambios en la secreción de agua y electrolitos por el epitelio, y la fosforilación de la miosin-cinasa, que conlleva a un aumento de la permeabilidad de la

membrana. Estos fenómenos, en conjunto con el esfacelamiento de las microvellosidades del epitelio que impiden la función de absorción, son los responsables de la aparición de la diarrea intensa (Nataro y Kaper, 1998).

e) Regulación

El LEE parece estar regulado sincrónicamente por genes plasmídicos y cromosomales. El regulador plasmídico *per*, activa la expresión de los genes *bfp* del plásmido y el *eae* del cromosoma (LEE) (Gómez-Duarte y Kaper, 1995). Estudios recientes han demostrado que *per* regula directamente la expresión de la región *orf1* del LEE designada como *ler* (LEE encoded regulator) (Mellies *et al.*, 1999). A su vez, *Orf1* (*Ler*) regula positivamente la actividad de dos operones policistrónicos del sistema de secreción de tipo III del LEE, el gen *tir*, el gen *eae* y un operón de la región de los genes de transducción de señales. Esta regulación de tipo cascada se activa por medio del regulador global IHF (integration host factor), el cual actúa directamente sobre *ler* (Friedberg *et al.*, 1999).

f) *Escherichia coli* enterohemorrágica EHEC

Aunque las cepas que pertenecen a los serotipos EHEC también poseen la isla patogénica LEE (Fig. 4), el síndrome patológico que producen es algo diferente al de las EPEC. Este síndrome se conoce con el nombre de colitis hemorrágica (HC). EHEC produce la lesión A/E, aunque se han observado algunas diferencias histopatológicas. Por ejemplo, EHEC no induce la fosforilación de la proteína receptora Tir (Ismaili *et al.*, 1995), pero además produce un daño característico en el epitelio intestinal inducido por una toxina de tipo Shiga. Esta toxina está codificada por un bacteriófago insertado en el cromosoma. Las cepas EHEC tienen un plásmido de 60MDa (pO157) que codifica una enterohemolisina, toxina homóloga a la producida por *E. coli* uropatogénica, UTI, y que lisa los eritrocitos liberando la hemoglobina y el grupo hemo que contribuyen al crecimiento de las bacterias. No

existen datos que sugieran su papel en la patogénesis de EHEC (Nataro y Kaper, 1998). El gen responsable de la adherencia localizada es el gen *eae*, que a diferencia de las EPEC codifica una intimina que solo es capaz de adherirse al intestino grueso. Este hecho sugiere que la variación que existe en la secuencia C-terminal del *eae*, donde se encuentra la secuencia encargada de la unión específica de esta proteína al epitelio (Oswald *et al.*, 2000), es responsable de la diferencia que existe entre los procesos de adherencia de ambos serotipos EPEC y EHEC (Yu y Kaper, 1992).

Las bacterias con serotipo EHEC producen fimbrias que favorecen la adherencia al epitelio, pero aún no se han reportado los genes responsables, probablemente se encuentren en el plásmido pO157 (Karch *et al.*, 1987).

La *E. coli* enterohemorrágica ha sido ampliamente estudiada debido a su impacto epidemiológico en países desarrollados. El serotipo O157:H7 ha sido responsable de una gran cantidad de brotes epidémicos (Riley *et al.*, 1983), pero también otros serotipos como O26:H11, O103:H2, O111:NM y O113:H21 están asociados tanto a colitis hemorrágica como a un síndrome conocido como HUS, síndrome de uremia hemolítica (Nataro y Kaper, 1998).

Las bacterias que pertenecen a los otros serotipos, no poseen la isla patogénica LEE y su histopatología está determinada por otros grupos de genes y plásmidos ajenos a este estudio.

II. OBJETIVOS

El fácil manejo de *E. coli* en el laboratorio, el detallado conocimiento de su genoma (Blattner *et al.*, 1997; Riley y Serres, 2000; Perna *et al.*, 2001), junto con los diferentes grados de virulencia, la gran diversidad de patogénesis y el conocimiento de los mecanismos genéticos de los genes patogénicos, hacen de este organismo un excelente modelo para estudiar la evolución de la patogénesis en bacterias. La mayor parte de los estudios realizados sobre patogénesis bacteriana se han basado en muestras clínicas de humanos, lo cual tiene una gran importancia en el campo de la epidemiología, pero no da necesariamente información acerca de los mecanismos evolutivos involucrados. Nosotros consideramos que para un estudio evolutivo es necesario incluir en la muestra cepas asociadas a mamíferos silvestres, para así poder ampliar el conocimiento sobre la evolución de los genes asociados a la patogénesis. En este estudio se escogieron los genes *cesT/eae* y *espB* del locus LEE como marcadores de la patogénesis en 122 cepas de *E. coli* asociadas a humanos y mamíferos silvestres de diferentes serotipos, para así entender cómo fue construido el locus LEE y cuál es la forma más probable de transmisión en las poblaciones naturales de *E. coli*.

Hipótesis de trabajo

Ho: Si los genes del locus LEE siempre están juntos como un cassette patogénico y éste fue adquirido por transferencia horizontal en una o más ocasiones como una unidad funcional, entonces observaremos que los elementos del locus están juntos en la mayoría de las cepas que presentan estos genes. En el árbol de relaciones filogenéticas se observaría uno o más linajes con la isla de patogénesis, pero no una distribución aleatoria de sus elementos.

Hi: si los genes del locus LEE no siempre forman parte de un cassette patogénico y son genes independientes que por eventos de recombinación y transferencia horizontal dieron lugar a lo que conocemos como LEE, entonces observaremos que cada uno de los elementos se presenta solo o en diferentes combinaciones en las diferentes cepas, y que su distribución en el árbol de parentesco es dispersa y aleatoria.

Para probar la hipótesis nula vamos a determinar mediante los métodos PCR la presencia de dos de los genes patogénicos del locus LEE y mediante hibridación tipo Southern, la presencia de cuatro regiones del locus en diferentes cepas de *E. coli* asociada a mamíferos silvestres y a humanos sanos y con diarrea. Si todos los genes están presentes con mayor frecuencia que la que se estima por el azar en las cepas patogénicas estudiadas, entonces aceptamos nuestra hipótesis nula.

III. MATERIALES Y METODOS

a) Cepas bacterianas

Las bacterias fueron colectadas del excremento de mamíferos pertenecientes a once órdenes. Las cepas asociadas a humanos fueron donadas amablemente por el Dr. Alejandro Cravioto, director de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México. Estas fueron recolectadas de excremento de pacientes sanos y con diarrea.

Un total de 122 cepas fueron utilizadas en este estudio, 86 asociadas a mamíferos silvestres y 36 asociadas a humanos (incluida la cepa EPEC E2348/69, donada por J. B. Kaper y usada como control positivo en este estudio (cepa 5063, ver Anexo B). Todas las cepas fueron recolectadas en México, con excepción de las cepas 2381 y 2382 que fueron obtenidas en el zoológico “El Pinar” de Caracas, Venezuela, la cepa tipo EPEC E2348/69 donada por el Dr. Kaper (5063 en este estudio) y la cepa tipo EPEC B171-8, donada por el Dr. Puente (5064 en este estudio, ver Anexo B).

Las cepas se obtuvieron directamente de las excretas con un hisopo de algodón estéril y se transfirieron a un tubo estéril con medio de cultivo de soya (Casoy), etiquetado con la fecha, sitio de colecta, especie del mamífero, orden, dieta y nombre del colector.

Aislamiento de cepas bacterianas. Las muestras fecales en los tubos de transporte se suspendieron en LB (caldo de Luria) y se incubaron 24 horas a 37 °C para propiciar el crecimiento celular y así poder realizar las pruebas bioquímicas para identificar a *E. coli* (ver Anexo C). Alícuotas de este cultivo se sembraron en los medios selectivos para obtener colonias aisladas. Primero se sembraron en un medio mínimo en lactosa, luego, las colonias Lac+ se picaron en un medio mínimo de citrato, y con el mismo palillo se picaron en un medio ML para poder recuperarlas, ya que *E. coli* no

crece en citrato. Las colonias Lac+ y Cit- se sembraron en TSI (triple sugar agar) y se dejaron incubando por 24 horas. La reacción esperada es la transformación del medio a color amarillo debido a la oxidación de los azúcares, la ausencia de producción de azufre y la producción de burbujas debido al gas producido por la respiración anaeróbica. Las cepas que dieron resultados positivos fueron transferidas a un medio de urea de color anaranjado en el que se dejaron crecer por 4 días a 37 °C. La presencia de ureasa cambia el color naranja del medio a rosado, por lo que las cepas que no cambiaron el color fueron recuperadas como *E.coli*. Las cepas elegidas se recuperaron del medio TSI y se sembraron en medio sólido, Mac Conkey o LB de donde colonias aisladas se guardaron en un criotubo con 1ml de UL a -80°C.

b) Cepas de referencia

Como cepas de referencia se utilizaron las cepas EPEC E2348/69 y B171-8. Estas se usaron como control positivo en el PCR y en el Southern Blot (Anexo B).

c) Tipificación serológica

Las cepas de *E. coli* fueron tipificadas utilizando los métodos propuestos por Orskov y Orskov (1984). Para la tipificación de los antígenos O y H de las cepas se obtuvieron sueros de conejo específicos los cuales se inmunizaron contra cada uno de los 173 antígenos somáticos (O) y 56 flagelares (H) de cepas de *E. coli* de Referencia Internacional (proporcionadas por los doctores B. Rowe y T. Cheasty del laboratorio Central de Salud Pública en Londres, Inglaterra).

La tipificación del antígeno O se realizó utilizando 173 antisueros O del esquema antigénico. Primero se sembraron las bacterias en agar nutritivo de soya y luego se incubaron a 37°C por 18 horas. El cultivo obtenido se calentó a 100°C con vapor fluente durante una hora. Finalmente se ajustó el inóculo al tubo tres del nefelómetro de Mcfarland. En microplacas de titulación de 96 pozos, se

distribuyeron 50 µl de las diluciones 1:100 de los sueros de conejo. A cada pozo se le agregaron 50 µl del antígeno O. Las microplacas se incubaron a 50°C durante 18 horas. Los sueros que reaccionaron con el antígeno se titulan haciendo diluciones seriadas al doble para poder comparar el título obtenido con el título del antígeno homólogo. Finalmente se utilizaron sueros específicos para establecer con exactitud el antígeno O del cultivo.

Para la tipificación del antígeno flagelar H se utilizaron 56 sueros. El antígeno H se obtuvo sembrando los cultivos de *E. coli* en un medio semisólido en tubos de Cragies, posteriormente se inocularon en un caldo de cultivo y se formalizaron. Procediendo como en la tipificación del antígeno O, en microplacas de titulación de 96 pozos, se distribuyeron diluciones de 1:100 de los sueros H de conejo en una proporción de 50 µl de antisuero y 50 µl del antígeno H. Las microplacas se incubaron a 50°C durante 2 horas. Los sueros que presentaron reacción con el antígeno H fueron titulados haciendo diluciones seriadas al doble para comparar el título obtenido con el título homólogo del suero H. Se usaron sueros H específicos para determinar con exactitud al antígeno H del cultivo. De esta forma se obtuvo el serotipo de cada cultivo, que es la fórmula antigénica O-H (Anexo A).

d) Electroforesis de isoenzimas

Las 122 cepas fueron plateadas en medio sólido LB y se dejaron crecer por 24 horas a 37°C. Del medio sólido se tomó una sola colonia, que se inoculó en 15ml de medio LB líquido y se incubó a 37°C por 24 horas en agitación a 200 r.p.m. Los cultivos se centrifugaron durante 5 minutos a 5000 r.p.m. Se desechó el sobrenadante y la pastilla celular se resuspendió en 1.5 ml de buffer 0.09M tris-HCl pH8. Las bacterias resuspendidas se lisaron con lisozima, congelando y descongelando en dos ocasiones. Los lisados se guardaron en microtubos de 0.5 ml a -80°C. Las electroforesis se realizaron en acetatos de

celulosa utilizando 8 µl. de cada uno de los lisados colocados en los pozos del aplicador Super Z-12 (Laboratorios Helena) según la técnica descrita por Hebert y Beaton (1993). Se emplearon membranas de acetato de celulosa de la marca Titán III que fueron remojados por 20 minutos previos a su utilización en buffer Tris-Glicina, el cual también es utilizado como buffer de corrida (o electrodo). Los acetatos se sacaron del buffer, se escurrieron y se secaron con papel secante. Cada uno se colocó en la base del sistema de aplicación con el lado del acetato hacia abajo y sobre el lado que tiene la película de celulosa se marcó el aplicador con las muestras de los lisados, 12 por cada membrana. El acetato de celulosa impregnado con las muestras se colocó en la cámara de electroforesis y el circuito se cerró con dos tiras de papel filtro que conectan a la membrana con el buffer. La cámara se conectó a una fuente de poder y las muestras corrieron del cátodo al ánodo por 15 minutos a 200 voltios.

Cada membrana se probó para una enzima específica. Se probaron 10 enzimas que son indicadoras de 11 diferentes loci del genoma de *E. coli*: IDH (Isocitrato Deshidrogenasa), PEP (Peptidasa), PGM (Fosfoglucomutasa), ARK (Argininaquinasa), ME (Enzima Máfica) ésta es indicadora para dos loci, MPI (Manosa 6-fosfato Isomerasa), ADH (Alcohol Deshidrogenasa), MDH (Malato Deshidrogenasa), 6GPDH (Glucosa 6-fosfato Deshidrogenasa) y XDH (Xantina Deshidrogenasa) (Souza *et al.*, 1999).

Para la tinción de las enzimas el acetato de celulosa se colocó sobre un vidrio grueso y se vertió la mezcla específica de reactivos para cada reacción (ver Anexo D). Los acetatos se guardaron en la oscuridad durante el tiempo que duró la tinción. Debido a que este tiempo es variable para cada enzima, los acetatos se revisaron cada 15 minutos. Una vez teñidos se enjuagaron con agua corriente y se procedió a su interpretación. Se observaron las bandas en las membranas y se determinaron las movilidades relativas asignando números de acuerdo a la distancia recorrida por la proteína a partir del

sitio de origen, de modo que cada número o banda teñida sobre la membrana representa un alelo diferente de un mismo locus. La combinación de todos los números para cada enzima representa el electrotipo (ET) de cada cepa (Anexo E). Este procedimiento se aplicó dos veces a cada cepa analizada para así confirmar los datos.

e) Caracterización de los genes *cesT/ae* y *esp B* mediante el método de PCR

En microtubos con 250 µl de agua destilada se introdujeron 2 asadas de las bacterias que crecieron previamente en medio sólido Mc Conkey. Los microtubos se calentaron a 95°C en un termociclador por 10 minutos, luego se transfirieron a hielo y finalmente se centrifugaron a 14 000 rpm por 2 minutos. El sobrenadante se utilizó como fuente de DNA para el PCR. El PCR (Polimerase Chain Reaction) se utilizó para amplificar dos regiones del locus LEE en las cepas asociadas a humanos y a mamíferos silvestres. Para los genes *cesT/ae* se diseñaron un par de oligonucleótidos que amplifican una región de 333 pares de bases y que incluyen un segmento de la región espaciadora entre el *cesT* y el *ae* y además un segmento pequeño de la región 5' del gen *ae*. Para el gen *espB* se diseñaron un par de oligonucleótidos que amplifican un segmento interno de este gen de 387 pares de bases.

El diseño de oligonucleótidos se hizo en el Centro para la Fijación del Nitrógeno, en Cuernavaca, Morelos, en base al programa OLIGO 5.0 Sequence Analysis Software y al programa del GENBANK (ref.NID g41305 y g975875): Los oligonucleótidos fueron construídos en los Laboratorios Lakeside, USA. Para el gen *cesT/ae* el par de oligonucleótidos son:

5' GTT TGC AGA GAA TGG TGG CCC 3'
5' TAG CTT ATG CTT GTG CCG GGT 3'

Para el gen *espB* el par de oligonucleótidos son:

5' GCC GCT CTG ATT GGT GGT GCT 3'
5' TGG CGT TGA ACC GGA AAT CCT 3'

La reacción del PCR se realizó utilizando el kit GeneAmp PCR Reagent Kit with AmpliTaq DNA Polymerase (Perkin-Elmer). Se usó una concentración de 25 pmol de cada oligonucleótido y 1.5 unidades de Taq Polimerasa por tubo de reacción, (ver anexo F).

Las condiciones de la reacción fueron las siguientes:

90°C temperatura de desnaturalización durante 1 min	} durante treinta ciclos consecutivos
56°C temperatura de alineación 1 min	
72°C temperatura de polimerización 1 min	

Los productos de PCR fueron separados mediante electroforesis en un gel de agarosa a 1.5% en buffer Tris-Acetatos, a 80 volts durante 1 hora y revelados con bromuro de etidio bajo una lámpara de UV. Como control positivo se utilizó la cepa de referencia EPEC E2348/69 donada por el Dr. Kaper.

f) Hibridación tipo Southern

Con el fin de probar la hipótesis de independencia de los componentes del LEE en nuestra muestra, se utilizó una sub-muestra de 25 cepas tomadas al azar y se realizó la prueba de hibridación de tipo Southern. Cuatro regiones del locus LEE fueron analizadas: la región flaqueadora 5', que corresponde a los genes *rorf1* y *rorf2* (sonda A), la región del sistema de secreción *esc-sep* (sonda B), la región del gen *eae* (sonda C) y la región del gen *espB* (sonda D) (McDaniel et al, 1995) (Fig.5).

A.-Purificación de DNA total

Para la técnica de Southern (1975) se utilizó una submuestra de 25 cepas escogidas en base a la presencia o ausencia de los genes *cesT/eae* y *espB* previamente estudiados con el método de PCR. El DNA total de las cepas se extrajo mediante el método de fenol:cloroformo:alcohol iso-amílico

- a) Se inocularon 5ml de medio de cultivo DM1000 con una asada de la cepa de interés. Se incubó durante 14 hrs. a 37°C en agitación a 200 r.p.m.

- b) Se centrifugó el cultivo en un microtubo de 1.5 ml durante 2' a 10 000 r.p.m. (3 centrifugaciones consecutivas a fin de recuperar la pastilla celular y descartar el sobrenadante).
- c) Se resuspendió la pastilla con vortex en 1ml de TE 50:20, pH=8.0 (ver anexo F para los reactivos).
- d) Se centrifugó por 2' a 10 000 r.p.m. y se descartó el sobrenadante.
- e) Se resuspendió en 400 μ l. de TE 50:20, pH 8.0
- f) A esta suspensión se le agregó 50 μ l. de una solución de pronasa (5 mg/ml) y 50 μ l. de SDS al 10% en TE 50:20, pH 8.0
- g) Se mezcló por inversión y se incubó la mezcla por 45' a 37°C.
- h) El resuspendido se pasó tres veces con una jeringa a través de una aguja del no. 20 y otras tres veces por una del no. 25.
- i) Se le agregó una mezcla de 500 μ l de Fenol:Cloroformo:Alcohol iso-amílico (24:24:1) y se mezcló con vortex y luego se centrifugó durante 10' a 10 000 r.p.m. a 4°C. La fase acuosa se recuperó y se vertió en un microtubo. Este procedimiento se repitió dos veces y una vez con 500 μ l de cloroformo.
- j) A la fase acuosa se le agregó 1ml de etanol absoluto frío y se dejó precipitando durante 2 horas a -20°C.
- k) Se centrifugó el precipitado durante 15' a 10 000 rpm y 4°C. Se descartó el sobrenadante.
- l) Se secaron los tubos en un rotoevaporador durante 10 min
- m) Se resuspendió en 500 μ l de TE 10:1, pH 8.0.
- n) A la suspensión se le añadió 10 μ l de RNAsa y se incubó por 1 hora a 37°C.
- o) Se repitieron los pasos i), j), k) y l) se resuspendió en 60ml de TE 10:1, pH 8.0 y se almacenó a -20°C.

p) Se evaluó el DNA purificado en un gel de agarosa al 1% en buffer Tris boratos, donde se corrió por 1 hora a 100 volts.

Para poder obtener resultados homogéneos en la hibridación se procedió a medir mediante un fluorómetro las concentraciones del DNA purificado y se obtuvo un promedio de aproximadamente 150 ng/ μ l. Las muestras que presentaron concentraciones mayores o menores se ajustaron a un estándar.

B.- Digestión del DNA mediante enzimas de restricción

Para la digestión del DNA se utilizó 1 μ g de DNA/1U de la enzima *EcoRI* que corta en el sitio 5'G*AATTC3'

3'CTTAA*G5'

La digestión se llevó a cabo en un horno de microondas suministrando pulsos de 10 seg. a poder máximo y descansos de 3 min entre los pulsos, para un total de 5 pulsos (1 μ g de DNA/1U de enzima).

Los patrones electroforéticos se obtuvieron en geles de agarosa al 1% en buffer Tris-Acetatos 1X, pH 8.0 a 50 volts, por 15 horas a 4°C.

C.- Transferencia de DNA de los geles de agarosa a filtros de nitrocelulosa

Esta técnica permite transferir los patrones de restricción de DNA a membranas de nitrocelulosa para poder llevar a cabo la técnica de hibridación.

Los geles con los patrones fueron tratados de la siguiente manera a 4° C:

- a) Lavado en HCl 0.25 M por 20 min dos veces consecutivas.
- b) Lavado con NaOH 0.5 M y NaCl 1.5 M por 15 min, dos veces consecutivas.
- c) Lavado con Tris-HCl 0.5 M y NaCl 1.5 M por 30 min dos veces consecutivas.

La transferencia fue llevada a cabo en forma de “sandwich”. Los filtros de nitrocelulosa se embebieron en una solución de SSC 6X y se pusieron en contacto directo con el gel (dos de cada lado). Encima se pusieron dos filtros de papel Whatman de 3 mm y 10 toallas de papel secante. Todo este paquete se colocó entre dos vidrios y se les colocó un peso de 1 kg encima. La transferencia se dejó por 20 horas a temperatura ambiente.

Al término de la transferencia los filtros de nitrocelulosa se marcaron de acuerdo a la secuencia de los pozos del gel, se embebieron en una solución SSC 6X y luego se secaron en un horno por 2 horas a 80°C.

D.- Extracción de las sondas de los plásmidos vectores

Para la hibridación se usaron 4 sondas que corresponden a cuatro regiones diferentes del locus LEE. Estas sondas están insertadas en plásmidos vectores en cuatro cepas de *E. coli*. La sonda A corresponde a la región 5' del locus LEE, la sonda B corresponde a una región del sistema de secreción, la sonda C al gen *eae* y la D al *espB* (McDaniel *et al.*, 1995) (Fig. 5).

Las bacterias vectores se incubaron en 3 ml de LB líquido con 30 µl de una solución de ampicilina a 10mg/ml durante 12 horas a 37°C en agitación. Los plásmidos vectores se extrajeron utilizando el kit High Pure Plasmid (Boehringer-Mannheim). Se monitorearon en un gel de agarosa al 1%, con buffer TB, pH 8.0.

Una vez obtenidos los plásmidos procedimos a extraer las sondas. Esto se realizó según el protocolo del laboratorio del Dr. Kaper. La sonda A de 2870 pb que se encuentra en un inserto de 3009 pb se extrajo del plásmido pSPORT 1 mediante la digestión con las enzimas de restricción *Bgl* II/*Mlu*I. La sonda B de 2948pb, debido a que es prácticamente del mismo tamaño que su vector, el plásmido pBluescript KS (-) se extrajo mediante una triple digestión con las enzimas *Eco*R I/*Sal* I/*Pvu* II. Esta última enzima corta al

vector en tres fragmentos distintos al de la sonda. La sonda **C** está clonada en el plásmido pUC 19 y mide 1050 pb. se extrajo mediante la enzima *Hind* III. La sonda **D** de aproximadamente 2.3 kb está clonada en el plásmido Bluescript KS (-) y se extrajo mediante la digestión con las enzima *Sma* I/*Xba* I. Las digestiones de los plásmidos se realizaron a 37°C por 2 horas con las enzimas correspondientes. Los patrones de restricción se corrieron en un gel de agarosa al 0.7% en TB 1X, pH 8.0. La banda correspondiente a cada sonda se extrajo del gel directamente. Para ello se cortó el trozo de gel correspondiente a la sonda, se calculó la concentración aproximada de DNA y se utilizó el kit Sephaglass Brand Prep Kit (Pharmacia Biotech) para purificar el DNA de la sonda.

E) Marcado de las sondas con Dioxigenina

Se utilizaron 7 µl. de DNA purificado (aprox. 200ng. de DNA de cada una de las sondas) y se diluyeron en 16 µl. de agua destilada. Se desnaturalizó el DNA incubándolo a 96°C por 10 min y luego se puso en hielo. Se le añadió 4 µl. de DIG-High Prime 5X (Mannheim-Boehringer) se mezcló y se incubó durante 12 horas a 37°C.

F) Hibridación

Mientras se marcaba la sonda, los filtros de nitrocelulosa se colocaron cada uno en un tubo de hibridación a prehibridar en 50 ml de buffer de hibridación (ver Anexo F) y en un horno con rotor 50°C durante 2 horas. Se sacaron 20 ml de la solución de hibridación y se agregaron directo al tubo de hibridación la sonda marcada y previamente calentada por 10 min a 96°C. Se dejó incubando en los tubos a 50°C, en el horno con rotor durante toda la noche.

G) Lavados

Se retiró la solución con la sonda marcada y se guardó a -20°C . Los filtros se lavaron en tinas de lavado con las siguientes condiciones:

Durante 15 min a 42°C con una solución de SSC 2X/SDS 0.1% y luego durante 15 min a 42°C con una solución de SSC 0.1X/SDS 0.1%. Después de los lavados los filtros se incubaron en una solución amortiguadora de maléico 1X (ver anexo F) durante 1 min a 55°C para remover el SDS.

Se bloqueó el proceso con 100 ml de una solución de bloqueo 10X (se preparó diluyendo la solución de bloqueo 1x en buffer maléico). Se incubó en el rotor durante 1 hora a 37°C .

Se descartó la solución de bloqueo y se le añadió 60 ml de la solución del anticuerpo (1 en 10 000 de la solución de bloqueo). Se incubaron los filtros durante 30 min a 37°C .

Se hicieron dos lavados de 15 min cada uno a temperatura ambiente con el buffer de lavado (ver Anexo F). Finalmente se incubaron los filtros con buffer de equilibrar (ver Anexo F) por 2 min a temperatura ambiente. Se colocaron los filtros sobre un acetato y se le añadieron 20 gotas de CSPD-ready Kit para provocar la reacción bioluminiscente. Se colocó otro acetato sobre los filtros y se incubaron 30 min a 37°C . Se expusieron los filtros en una placa radiográfica por 30 min y finalmente se revelaron mediante métodos convencionales.

g) Reconstrucción filogenética

Para la reconstrucción filogenética se usó el método de matriz de distancia UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic averages), que se basa en un algoritmo que agrupa los taxa de acuerdo a la distancia genética mínima media entre ellos. Cada OTU (unidad taxonómica operacional, del inglés operational taxonomic unit), hace la misma contribución al cálculo de las

distancias medias. El dendrograma resultante está implícitamente enraizado en el punto donde el último grupo se une. La suposición más importante sobre la que descansa este método es que la tasa de evolución en todas las ramás del dendrograma debe ser igual (Avice, 1994).

Los datos recogidos en la lectura del gel de acetato de celulosa del MLEE, fueron vaciados en el programa ETCLUS (v.2.1): Multilocus Diversity Analysis (Whittam, 1990). Este programa registra la diversidad genética de la población, el número promedio de alelos, el número de electrotipos y construye un dendrograma o árbol genealógico basado en el método de distancia UPGMA. Se realizaron 1000 bootstraps en el análisis de UPGMA, únicamente los valores mayores de cincuenta fueron tomados en cuenta.

h) Análisis estadístico

Pruebas de independencia fueron realizadas utilizando el método de la ji-cuadrada para variables discretas (tablas de contingencia) (Hamburg, 1979). Se realizaron cuatro pruebas de independencia para la presencia o ausencia de los genes del LEE (usando los resultados de PCR) con respecto al serotipo y a la genealogía de las cepas, al orden y dieta del hospedero a la que están asociadas las bacterias.

IV. RESULTADOS

a) Serotipos bacterianos

Los grupos patogénicos de cada cepa fueron determinados en base a su serotipo (Nataro y Kaper, 1988) (Anexo B). De las 122 cepas de este estudio, 38.5% presentaron serotipos patógenos, de éstos, 26.2% provienen de aislados humanos y 12.3% de mamíferos silvestres. Los serotipos patogénicos fueron más comunes en las bacterias asociadas al orden Carnívora (40%).

El serotipo ETEC se encontró asociado con más frecuencia a los órdenes Xenarthra y Rodentia. Las cepas asociadas a humanos presentaron la mayor parte de los serotipos incluidos en este estudio (ver Anexo B). Esto no es sorprendente puesto que para este estudio fueron escogidas con el fin de estudiar la mayor parte de los serotipos patogénicos de *E. coli*. El serotipo patogénico más común tanto en humanos como en animales silvestres fue el serotipo EPEC. Los serotipos UTI y EIEC se presentaron exclusivamente en cepas de humanos.

b) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Esta prueba se realizó con el fin de monitorear la presencia de los genes *cesT/ea*e y *espB* incluidos en la isia de patogénica LEE en 122 cepas asociadas a mamíferos silvestres, así como a humanos sanos o con síntomas de diarrea. Los resultados de las amplificaciones de PCR se analizaron de acuerdo a los serotipos bacterianos (Tabla 1), el orden del hospedero (Tabla 2) y la dieta del hospedero (Tabla 3). El análisis de PCR indica que ambos genes no necesariamente se encuentran juntos en una cepa dada (Anexo B). Casi la mitad de las cepas (40.9%) amplificaron al menos uno de los dos marcadores. El gen *cesT/ea*e se encontró solo en un 8.2% de los casos, mientras que el gen *espB* se

encontró sólo en un 15.6% de las cepas. Ambos genes se encontraron en un mayor porcentaje juntos (25.4%) que separados. 89.5% de las cepas EPEC presentaron ambos genes, 60.0% de las EAEC y 42.9% de las EHEC. Únicamente 9.3% de las no patogénicas amplificaron para ambos genes. Las cepas con serotipos ETEC y EIEC no amplificaron ningún marcador de PCR (Tabla 1). Se encontró una asociación entre los marcadores de patogénesis y el serotipo bacteriano ($\chi^2= 91.99$, $gl= 18$, $p< 0.00001$, Tabla 5). Este hecho demuestra que el serotipo es un buen marcador de la patogénesis bacteriana, al menos para las cepas que producen la lesión A/E. Así mismo, los productos de PCR para los marcadores de los genes *cesT/ea*e y *espB* fueron encontrados en diferentes proporciones en las cepas asociadas a los diferentes órdenes. El gen *cesT/ea*e se encontró en mayor proporción en los órdenes Carnívora, Chiroptera y Primates, mientras que el gen *espB* se encontró en mayor proporción en el orden Rodentia. Ambos marcadores juntos amplificaron en cepas asociadas al orden Carnívora (45%) y en el orden Primates (42.5%) (Tabla 2). Se encontró una asociación entre los marcadores del PCR y el orden del hospedero ($\chi^2= 53.15$, $gl= 30$, $p= 0.006$; Tabla 5).

Los resultados del PCR también se agruparon según la dieta de los hospederos (Tabla 3). Herbívoros y granívoros presentaron mayor porcentaje de cepas con el gen *espB*. La mayor proporción de cepas con el gen *cesT/ea*e se encontró en el grupo de los hematófagos (aunque estadísticamente la muestra de éstos no es significativa). La mayor proporción de cepas con ambos marcadores se encontró en omnívoros y carnívoros. Los piscívoros no presentaron ninguno de los marcadores, aunque la muestra es pequeña.

Los resultados muestran que existe una relación entre tener los genes o no, y los sistemas de digestión de los hospederos ($\chi^2= 44.29$, $gl= 21$, $p= 0.002$; Tabla 5). Hospederos con dietas de tipo herbívoros y/o granívoros, que incluyen animales del orden Rodentia y a los ungulados, presentan un

mayor porcentaje de cepas con el gen *espB* solamente. Hospederos con sistema digestivo carnívoro y/o omnívoro presentan un mayor porcentaje de cepas que tienen el LEE completo. Esto sugiere que las cepas están adaptadas a los diferentes tipos de intestinos (su hábitat natural), y que probablemente estos genes son genes adaptativos.

En las Tablas 2 y 3 se puede ver que el porcentaje total de las 122 cepas usadas en este estudio que presentan ambos marcadores es de alrededor de 25.4%, el porcentaje de cepas que posee solamente el gen *espB* es de alrededor de 15.6% y 8.2% de las cepas sólo tienen el gen *cesT/ae*.

c) Hibridación tipo Southern

Las pruebas de hibridación en las 25 cepas tomadas al azar, revelan que en una cepa dada cada uno de los componentes del LEE puede estar presente independientemente de los demás. El número de las hibridaciones positivas va desde 0 hasta 4 para cada cepa (Tabla 4). Los resultados indican ocho diferentes patrones de hibridación: 12% de las cepas no presentaron hibridación alguna, 4% hibridó únicamente con la sonda A, 4% con la sonda B y 4% con la sonda D únicamente. 4% con las sondas A y B, 24% con las sondas A y D (regiones flanqueadoras), 4% con las sondas A, B y D y 44% con todas las sondas (Tabla 4). Las sondas de las regiones flanqueadoras presentaron el porcentaje más alto de hibridación (72% de las cepas). En general los resultados del PCR y los de la hibridación son congruentes ($r = 0.57, p < 0.005$) (Fig. 6 a y 6 b).

La falta de correlación perfecta puede ser el resultado de varios hechos. Un resultado positivo para Southern y negativo para PCR, puede deberse a que los sitios del primer son muy polimórficos. La situación inversa es más difícil de explicar, podría deberse a que estos genes tienen alelos muy divergentes. Los datos de secuencia del gen *espB* (V. Souza comunicación personal) apoyan esta última

explicación. Finalmente, errores de apreciación podrían oscurecer algunos resultados. Sin embargo, los resultados relevantes que se derivan de este estudio son que el locus LEE no necesariamente está completo, que los genes se encuentran en diferentes combinaciones y que predomina la combinación de los cuatro genes patogénicos en cepas humanas de origen clínico con serotipos patógenos EHEC y EPEC.

d) Reconstrucción filogenética

La presencia y ausencia de los marcadores de PCR [genes del LEE *cesT/ea* (c) y *espB* (d)] y los resultados de la hibridación de tipo Southern (sondas A, B, C y D) de la sub-muestra de 25 cepas, se mapearon en un dendrograma (Fig. 7) con base a electroforesis de isoenzimas.

El dendrograma presentó tres grupos genéticos, I, II y III. La mayoría de las cepas asociadas a humanos se encuentran en el grupo I. El grupo II agrupa a la mayor parte de las cepas asociadas al orden Rodentia, mientras que el grupo III es el grupo más divergente e incluye cepas de primates silvestres y de manatíes. Las demás cepas se encuentran distribuidas sin ningún patrón observable. Se observa que los caracteres patogénicos están distribuidos a lo largo de todo el árbol, sugiriendo que los genes patogénicos han aparecido independientemente en varias ocasiones en los diferentes grupos genéticos de *E. coli*. Este hecho nos indica que la isla patogénica se está moviendo por transferencia horizontal, y que quizá el modelo clonal epidémico sólo se da en cepas humanas.

Se encontró una asociación entre los marcadores del PCR y la genealogía de *E. coli* ($\chi^2= 18.57$, $gl= 6$, $p= 0.005$; Tabla 5), debida quizá, a la sobrerrepresentación de las cepas patógenas en el grupo I.

V. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Contrariamente a lo descrito por otros autores (Elliot *et al.*, 1998; Kaper, 1998; Nataro y Kaper, 1998), nuestros resultados indican que el LEE es una entidad genética muy dinámica, tanto a nivel de los genes que lo componen (ya que se presentan en diferentes patrones dentro del locus), como a nivel del locus completo (ya que es adquirido por los diferentes linajes de *E. coli*). Estas observaciones sugieren que los genes del LEE podrían tener funciones distintas de la patogénesis cuando se encuentran solos. Por otro lado, los resultados nos pueden dar luz sobre el ensamblaje y evolución de esta isla patogénica. De acuerdo a esta interpretación, los diferentes genes que componen el LEE probablemente han evolucionado de forma independiente, teniendo diversas funciones en las bacterias no patógenas y fueron ensamblándose de una manera gradual y escalonada hasta su subsiguiente integración en una isla patogénica (Lawrence, 1997). La asociación encontrada entre el serotipo bacteriano y los genes de patogénesis sugieren que una cepa dada debe de poseer un trasfondo genético específico para poder adquirir los genes patogénicos, como por ejemplo, sitios de inserción de bacteriófagos.

Algunas cepas solamente presentaron uno de los genes del LEE, sugiriendo de nuevo que la isla no se formó en un paso evolutivo sino que sus genes fueron integrándose gradualmente y adaptándose en una o más cepas o especies intermediarias (de la Cruz y Davies, 2000). Eventualmente, una combinación de varios genes puede ser particularmente efectiva en hacer que una cepa sea exitosamente patogénica, y éstas luego se pueden dispersar en una población de forma epidémica (Maynard-Smith, 1992). Esta isla patogénica puede luego transferirse de forma horizontal a otros linajes bacterianos. Análisis de secuencia de los genes *eae*, *tir* y *espB* de estas cepas (Souza, comunicación personal), junto con los datos del presente estudio, sugieren un modelo de evolución de la patogénesis donde la

transferencia horizontal juega un papel relevante, tanto para la construcción inicial de la isla, como para la dispersión de este complejo. Un posible mecanismo de transferencia horizontal podría ser por transducción ya que el LEE se encuentra ubicado en un sitio de inserción de un bacteriófago, el sitio *selC* (Mc Daniel *et al.*, 1995). Este modelo de ensamblaje gradual ha sido sugerido por diferentes autores para el ensamblaje de clones patogénicos causantes de enfermedades novedosas (Lederberg, 1998; de la Cruz y Davies, 2000) y en particular para el ensamblaje del complejo antigénico O (Reeves, 1992; 1993).

Está claro que el origen y evolución del LEE se podría explicar con otros modelos. Una alternativa sería que la isla fue adquirida de forma completa y que las cepas que sólo tienen uno o dos de sus genes perdieron por procesos de deleción o rearrreglos cromosomales los demás componentes del locus. Su contenido de G-C de 38.36% (Elliot *et al.*, 1998) que es diferente del contenido de G-C de una *E. coli* promedio (50.8%) (Blattner *et al.* 1997), sugiere que esta isla es relativamente nueva en términos evolutivos. El hecho de que el 72% de la sub-muestra de las 25 cepas que se sometieron a las pruebas de hibridación tipo Southern presentaran las regiones flanqueadoras del locus, sugiere la posibilidad de una disrupción del cassette.

La asociación significativa entre los componentes del LEE y el orden y dieta del hospedero, sugiere que los genes del LEE pueden tener un papel adaptativo. Esto podría deberse a los diferentes tipos de epitelio del intestino en los diferentes órdenes y/o dietas de los hospederos de *E. coli*, por ejemplo, que la lesión A-E no pueda ser expresada en intestinos como los de los herbívoros.

El dendrograma indica que la mayor parte de las cepas asociadas a humanos, patógenas o no, se encuentran en el grupo genealógico I. Sin embargo, presentan diferentes combinaciones de los elementos del LEE. En general, no se observó un patrón claro en la distribución de los genes de patogénesis a lo largo del dendrograma.

Los datos indican que en *E. coli* la recombinación es un proceso importante a varios niveles, y sugieren que el LEE es dispersado en diferentes trasfondos genotípicos por transferencia horizontal. Este modelo refuerza el papel de la recombinación genética en moldear la estructura genética y la evolución de *E. coli* como lo han sugerido diversos autores (Dykhuizen y Green, 1991; Guttman, 1997). Este estudio, junto con otros (Reid *et al.*, 2000), indican que diversos linajes de *E. coli* han adquirido los mismos genes patogénicos varias veces, incluyendo la isla completa y los genes plasmídicos, construyendo de esta forma los mecanismos moleculares que promueven la virulencia. En este caso, las características patogénicas son la suma de diferentes factores. Sin embargo, esta isla patogénica podría ser inestable genéticamente debido a las altas tasas de recombinación interna que existe. Este hecho podría ser la causa de la gran variación observada en los genes *eae* (McGraw *et al.*, 1999) y en los genes *tir* (Paton *et al.*, 1998), pero también podría ser la causa de la disrupción del locus LEE y la conversión de una *E. coli* patogénica a una bacteria de la flora común de los mamíferos.

Como conclusión, se rechaza la hipótesis nula que sostiene que el LEE es una entidad estable y se acepta la alternativa: el LEE es una entidad dinámica tanto a nivel del locus como a nivel de sus componentes, por lo que se sugiere que su origen fue una construcción gradual.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi comité tutorial, Dra. Valeria Souza, Dr. Luis Eguiarte y Dr. Alejandro Cravioto, por su apoyo y paciencia. A mi comité de sinodales por sus valiosos comentarios. Quiero agradecer también al Dr. J.B Kaper por donarnos la cepa tipo EPEC E23/48 y las cuatro sondas del LEE usadas en esta investigación. Al Dr. José Luis Puente por donarnos la cepa tipo EPECB171-8. Al Dr. Guillermo Dávila y a Oscar Rodriguez por su apoyo técnico y moral. A Aldo Valera por haber realizado las electroforesis y a Laura Espinoza por hacer posible los latosos y eternos Southern blots. A Martha Rocha y Amanda Castillo por sus ideas y aportaciones. Quiero agradecer especialmente a la Dra. Claudia Silva, que creyó en mí y que sin su apoyo moral y académico este trabajo no hubiera llegado a su fin. A todas las personas de diferentes instituciones que ayudaron a la colecta de las cepas. Agradezco también a todos los miembros del Lab por su buena disposición y por los momentos agradables que me hicieron pasar en estos años: a Luis, Valeria, Ciau, Lau, Martita, Aldo, Arturo, Toño, René, Erika, Amanda, Salvador, Jordan, al cafecito, a Depeche Mode y a Soda Stereo, gracias. No me puedo olvidar de mi familia que siempre me apoyó, gracias Andrés, Fer, Andy, Gon y Chey, por tener paciencia.

LITERATURA CITADA

- Atlas, R.M. 1990. Microbiología: Fundamentos and aplicaciones. CECSA, México. 870 pp.
- Avise, J.C. 1994. Molecular Markers Natural History and Evolution. Chapman & Hall. New York. London.
- Baldwin, T. J., W. Ward, A. Aitken, S. Knutton y P. H. Williams. 1991. Elevation of intracellular free calcium levels in Hep-2 cells infected with enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **59**: 1599-1604.
- Bieber, D., S. W. Ramer, C. Y. Wu, W. J. Murray, T. Tobe, R. Fernandez y G. K. Schoolnik. 1998. Type IV pili, transient bacterial aggregates, and virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science* **280**: 2114-2118.
- Blattner, F. R., Plunkett, I. G., Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F., Gregor, J., Davis, N. W., Kirkpatrick, H. A., Goeden, M. A., Rose, D. Mau, J., B., y Shao, Y. 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**: 1453-1462.
- Cravioto, A., R. J. Gross, S. M. Scotland, y B. Rowe. 1979. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. *Curr Microbiol* **3**: 95-99.
- Cravioto, A., R. E. Reyes, R. Ortega, G. Fernández, R. Hernández y D. López. 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.
- Caugant, D. A., B. R. Levin y R. K. Selander. 1981. Genetic diversity and temporal variation in the *E. coli* population of human host. *Genetics* **98**: 467-490.
- de la Cruz, F. y J. Davies. 2000. Horizontal gene transfer and the origin of species: lessons from bacteria. *Trends Microbiol* **8**: 128-133.
- Dykhuizen, D. E. y L. Green. 1991. Recombination in *Escherichia coli* and the definition of biological species. *J Bacteriol* **173**: 7257-7268
- Donnenberg, M. S., y J. B. Kaper. 1992. Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **60**: 3953-3961.

- Elliot, S. J., L. A. Wainwright, T. K. McDaniel, K. G. Jarvis, Y. K. Deng, L. C. Lai, B. P. MacNamara, M. S. Donnenberg, y J. B. Kaper. 1998. The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. *Mol Microbiol* 28: 1-4.
- Falkow, S. 1996. The evolution of pathogenicity in *Escherichia*, *Shigella* and *Salmonella*. En *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Vol 2. Ed. F. C. Neidhardt, J. L. Ingraham, K. Brooks Low, B. Magasanik M. Schaechter and H. E. Umbarger. ASM, Washington, D.C.
- Foubister, V., I. Rosenshine, M. S. Donnenberg y B. B. Finlay. 1994. The *eaeB* gene of enteropathogenic *Escherichia coli* is necessary for signal transduction in epithelial cells. *Infect Immun* 62: 3038-3040.
- Friedberg, D., T. Umanski, Y. Fang y I. Rosenshine. 1999. Hierarchy in the expression of the locus of enterocyte effacement genes of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 34: 941-952.
- Girón J. A., A. S. Y. Ho y G. K. Schoolnik. 1991. An inducible Bundle-Forming Pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science* 354: 710-713.
- Gómez, O. G., J. A. Girón, M. S. Donnenberg y J. B. Kaper. 1994. Per A regulates the expression of genes coding for intimate adherence and localized adherence in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Plasmid* 32: 357 (abstract)
- Gómez-Duarte, O. G. y J. B. Kaper. 1995. A plasmid-encoded regulatory region activates chromosomal *eaeA* expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 63: 1767-1776.
- Guttman, D. S. 1997. Recombination and clonality in natural populations of *Escherichia coli*. *Trends Ecol Evol* 12: 16-22.
- Hamburg, M. 1979. Basic Statistics: A Modern Approach. 2nd.ed. Harcourt Brace Jovanovich, Inc. N.Y.
- Hebert, P. D. N. y M. J. Beaton. 1993. Methodologies for allozyme analysis using cellulose acetate electrophoresis. Helena Laboratories. EUA. 31 pp.
- Hicks, S., G. Frankel, J. B. Kaper, G. Dougan y A. D. Phillips. 1998. Role of intimin and bundle-forming pili in enteropathogenic *Escherichia coli* adhesin to pediatric intestinal tissue in vitro. *Infect Immun* 66: 1570-1578.
- Ismaili, A., D. J. Philpott, M. T. Dytoc y P. M. Sherman. 1995. Signal transduction responses following adhesion of verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Infect Immun* 63: 3316-3326.
- Jarvis, K. G., J. A. Girón, A. E. Jerse, T. K. McDaniel, M. Donnenberg y J. B. Kaper. 1995. Enteropathogenic *Escherichia coli* contains a putative type III secretion system necessary for the

- export of proteins involved in attaching and effacing lesion formation. *Proc Natl Acad Sci USA*. **92**: 7996-8000.
- Jerse, A. E., J. Yu, B. D. Tall, y J. B. Kaper. 1990. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. **87**: 7839-7843.
- Kaper, J. B. 1996. Defining EPEC. *Rev Microbiol Sao Paulo*. **27**: 130-133.
- Kaper, J. B. 1998. EPEC delivers the goods. *Trends Microbiol* **6**: 169-173.
- Karch, H., J. Heesemann, R. Laufs, A. D. O'Brien, C. O. Tacket y M. M. Levine. 1987. A plasmid of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is required for expression of a new fimbrial antigen and for adhesion to epithelial cells. *Infect Immun* **55**: 455-461.
- Kenny, B. y B. B. Finlay. 1995. Protein secretion by enteropathogenic *Escherichia coli* is essential for transducing signals to epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. **92**: 7991-7995.
- Kenny, B., R. DeVinney, M. Stein, D. J. Reinscheid, E. A. Frey y B. B. Finlay. 1997. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfer its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell* **91**: 511-520.
- Lawrence, J. G. 1997. Selfish operons and speciation by gene transfer. *Trends Microbiol* **5**: 355-359.
- Lederberg, J. 1998. Emerging infection: An evolutionary perspective. *Em Infect Dis* **4**: 366-371.
- Levin, B. R. 1981. Periodic selection, infectious gene exchange and the genetic structure of *E. coli* populations. *Genetics* **99**: 1-23.
- Levine, M. M., J. P. Nataro, H. Karch, M. M. Baldini, J. B. Kaper, R. E. Black, M. L. Clements y A. D. O'Brien. 1985. The diarrheal response of humans to some classic serotypes of enteropathogenic *Escherichia coli* is dependent on a plasmid encoding an enteroadhesiveness factor. *J Infect Dis* **152**: 550-559.
- Levine, M. M. 1987. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherent. *J Infect Dis* **155**: 377-389.
- Maynard-Smith, J. 1992. Analysing the mosaic structure of genes. *J Mol Evol* **34**: 126-129.
- Maynard-Smith, J., N. H. Smith, M. O'Rourke y B. G. Spratt. 1993. How clonal are bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 4384-4388.
- Mc Daniel, T. K., K. G. Jarvis, M. S. Sonnenberg y J. B. Kaper. 1995. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *PNAS* **92**: 1664-1668.

- McGraw, E. A., J. Li, R. K. Selander y T. S. Whittam. 1999. Molecular evolution and mosaic structure of α , β , and γ intimins of pathogenic *Escherichia coli*. *Mol Biol Evol* **16**: 12-22.
- Mecas, J. y E. J. Strauss. 1996. Molecular mechanisms of bacterial virulence: Type III secretion and pathogenicity islands. *Em Infec Dis* **2**: 271-288.
- Mellies, J. L., S. J. Elliot, V. Sperandio, M. S. Donnenberg y J. B. Kaper. 1999. The Per regulon of enteropathogenic *Escherichia coli*: identification of a regulatory cascade and a novel transcriptional activator, the locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator (*Ler*). *Mol Microbiol* **33**: 296-306.
- Milkman, R. 1973. Electrophoretic variation in *Escherichia coli* from natural sources. *Science* **182**: 1024-1026.
- Milkman, R. y M. M. Bridges. 1990. Molecular evolution of the *Escherichia coli* chromosome. III. Clonal frames. *Genetics* **126**: 505-517.
- Milkman, R. 1997. Recombination and population structure in *Escherichia coli* Perspectives. Anecdotal, historical and critical commentaries on genetics. *Genetics* **146**: 745-750.
- Moon, H. W., S. C. Whipp, R. A. Argenzio, M. M. Levine, y R. A. Giannella. 1983. Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. *Infect Immun* **41**: 1340-1351.
- Nataro, J. P. y J. B. Kaper. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* **11**: 142-201.
- Ochman, H. y R. K. Selander. 1984. Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations. *J Bacteriol* **157**: 690-693.
- Orskov, F. y I. Orskov. 1984. Serotyping of *Escherichia coli*. In: *Methods in Microbiology*. London: T. Bergman. Academic Press.
- Cswald, E., H. Schmidt, S. Morabito, H. Karch, O. Marchès y A. Caprioli. 2000. Typing of intimin genes in human and animal enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: characterization of a new intimin variant. *Infect Immun* **68**: 64-71.
- Paton, A. W., P. A. Manning, M. C Woodrow y J. C. Paton. 1998. Translocated intimin receptors (Tir) of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* isolates belonging to serogroup O26, O111 and O157 react with sera from patients with hemolytic-uremic syndrome and exhibit marked sequence heterogeneity. *Infect Immun* **66**: 5580-5586.

- Perna, N. T., G. Plunkett, V. Burland, B. Mau, J. D. Glasner, D. J. Rose, G. F. Mayhew, P. S. Evans, J. Gregor, H. A. Kirkpatrick, G. Pósfai, J. Hackett, S. Klink, A. Boutin, Y. Shao, L. Miller, E. J. Grotbeck, N. Wayne Davis, A. Lim, E. T. Dimalanta, K. D. Potamouisis, J. Apodaca, T. S. Anantharaman, J. Lin, G. Yen, D. C. Schwartz, R. A. Welch y F. R. Blattner. 2001. Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature* **409**: 529-533.
- Reeves, P. R. 1992. Variation in O-antigens niche specific selection and bacterial populations. *FEMS Microbiol* **100**: 509-516.
- Reeves, P. R. 1993. Evolution of Salmonella O antigen variation by interspecific gene transfer on a large scale. *Trends Genet* **9**: 17-22.
- Reid, S. D, C. J. Herbelin, A. C. Bumbaugh, R. K. Selander, y T. S. Whittam. 2000. Parallel evolution of virulence in pathogenic *Escherichia coli*. *Nature* **406**: 64-67.
- Riley, L. W., R. S. Remis, S. G. Helgerson, H. B. McBee, J. G. Wells, B. R. Davies, R. J. Hbert, E. S. Olcott, L. M. Johnson, N. T. Hargrett, P. A. Blake y M. L. Cohen. 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N Engl J Med* **308**: 682-685.
- Riley, M. y M. H. Serres. 2000. Interim report on genomics of *Escherichia coli*. *Annu Rev Microbiol* **54**: 341-411.
- Rocha, M.G. 1999. Plásmidos en *Escherichia coli* y su importancia en la evolución de la patogénesis. Tesis para obtener el grado académico de Maestra en Ciencias. Fac. de Ciencias. UNAM, México.
- Selander, R. K. y B. R. Levin. 1980. Genetic diversity and structure in *Escherichia coli*. *Science* **210**: 545-547.
- Selander, R. K., D. A. Caugant y T. S. Whittam. 1987. Genetic structure and variation in natural population of *Escherichia coli*. In *Escherichia coli* and Salmonella typhimurium. Vol 2. Ed. F. C. Neidhardt, J. L. Ingraham, K. Brooks Low, B. Magasanik M. Schaechter and H. E. Umbarger. ASM, Washington, D.C.
- Shauer, D. B. y S. Falkow. 1993. Attaching and effacing locus of a *Citrobacter freundii* biotype that causes transmissible murine colonic hyperplasia. *Infect Immun* **61**: 2486-2492.
- Sohel, I., J. L. Puente, S. W. Ramer, D. Bieber, C. Wu y G. K. Schoolnik. 1996. Enteropathogenic *Escherichia coli*: Identification of a gene cluster coding for bundle-forming pilus morphogenesis. *J Bacteriol* **178**: 2613-2628.
- Southern, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**: 503.

- Souza, V., M. Rocha, A. Valera y L. E. Eguiarte. 1999. Genetic structure of natural populations of *Escherichia coli* in wild hosts on different continents. *Appl Environ Microbiol* **65**: 3373-3385.
- Stone, K. D., H. Zhang, L. K. Carlson y M. S. Donnenberg. 1996. A cluster of fourteen genes from enteropathogenic *Escherichia coli* is sufficient for the biogenesis of a type IV pilus. *Molec Microbiol*. **20**: 325-337.
- Tobe, T., G. K. Schoolnik, I. Sohel, V. H. Bustamante y J. L. Puente. 1996. Cloning and characterization of *bfpTVW*, genes required for the transcriptional activation of *bfpA* in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **21**(5): 963-975.
- Whittam, T.S. 1990. ETDIV and ETCLUS programs, Pennsylvania State University.
- Woese, C.R. 1987. Bacterial Evolution. *Microbiol Rev* **51**: 221-271.
- Yu, J. y J. B. Kaper. 1992. Cloning and characterization of the *eae* gene of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Mol Microbiol* **6**: 411-417.
- Zhang H. y M. S. Donnenberg. 1996. DsbA is required for stability of the type IV pilin of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **21**: 787-797.

TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Número y porcentaje (en paréntesis) de cepas de *E. coli* clasificadas por serotipos que amplificaron dos marcadores del LEE (genes *cesT/ee* y *espB*).

Serotipo	N	<i>cesT/ee</i>	<i>cesT/ee</i> solamente	<i>espB</i>	<i>espB</i> solamente	Ambos marcadores	Ningún marcador
EAEC	5	5(100.0)	2(40.0)	3(60.0)	0	3(60.0)	0
EAEC en animales	4	4(100.0)	2(50.0)	2(50.0)	0	2(50.0)	0
EAEC en humanos	1	1(100.0)	0	1(100.0)	0	1(100.0)	0
EHEC	7	6(85.7)	2(28.5)	4(57.1)	0	4(57.1)	1(14.3)
EHEC en animales	2	2(100.0)	1(50.0)	1(50.0)	0	1(50.0)	0
EHEC en humanos	5	4(80.0)	1(20.0)	3(60.0)	0	3(60.0)	1(20.0)
EIEC (sólo en humanos)	4	0	0	0	0	0	4(100.0)
EPEC	19	18(94.7)	1(5.3)	17(89.5)	0	17(89.5)	1(5.3)
EPEC en animales	6	6(100.0)	0	6(100.0)	0	6(100.0)	0
EPEC en humanos	13	12(92.3)	1(7.7)	11(84.6)	0	11(84.6)	1(7.7)
ETEC	8	0	0	0	0	0	8(100.0)
ETEC en animales	3	0	0	0	0	0	3(100.0)
ETEC en humanos	5	0	0	0	0	0	5(100.0)
UTI (sólo en humanos)	4	1(25.0)	1(25.0)	0	0	0	3(75.0)
NP (no patogénicos)	75	11(14.7)	4(5.3)	26(34.7)	19(25.3)	7(9.3)	43(60.0)
NP en animales	71	10(14.1)	3(4.2)	25(35.2)	18(25.4)	7(9.9)	43(60.6)
NP en humanos	4	1(25.0)	1(25.0)	1(25.0)	1(25.0)	0	2(50.0)
Total	122	41(33.6)	10(8.2)	50(40.9)	19(15.6)	31(25.4)	62(50.8)

Los números en negritas son los totales

Tabla 2. Número y porcentaje (en paréntesis) de cepas de *E. coli* clasificadas por el orden del hospedero que amplificaron dos marcadores del LEE (genes *cesT/eae* y *espB*).

Orden	N	<i>cesT/eae</i>	<i>cesT/eae</i> solamente	<i>espB</i>	<i>espB</i> solamente	Ambos marcadores	Ningún marcador
Artiodactyla	6	0	0	3(50.0)	3(50.0)	0	3(50.0)
Carnivora	20	12(60.0)	3(15.0)	11(55.0)	2(10.0)	9(45.0)	6(30.0)
Cetacea	3	0	0	0	0	0	3(100.0)
Chiroptera	7	3(42.9)	1(14.3)	3(42.9)	1(14.3)	2(28.6)	3(42.9)
Lagomorpha	5	0	0	0	0	0	5(100.0)
Marsupialia	3	1(33.3)	1(33.3)	0	0	0	2(66.7)
Perissodactyla	6	0	0	1(16.7)	1(16.7)	0	5(83.3)
Primates	40	22(55.0)	5(12.5)	19(47.5)	2(5.0)	17(42.5)	16(40.0)
Rodentia	28	3(10.7)	0	13(46.4)	10(35.7)	3(10.7)	15(53.6)
Sirenida	2	0	0	0	0	0	2(100.0)
Xenarthra	2	0	0	0	0	0	2(100.0)
Total	122	41(33.6)	10(8.2)	50(40.9)	19(15.6)	31(25.4)	62(50.8)

Tabla 3. Número y porcentaje (en paréntesis) de cepas de *E. coli* clasificadas según la dieta del hospedero que amplificaron dos marcadores del LEE (genes *cesT/eae* y *espB*).

Dieta	N	<i>cesT/eae</i>	<i>cesT/eae</i> solamente	<i>espB</i>	<i>espB</i> solamente	Ambos marcadores	Ningún marcador
Carnívoros	10	7(70.0)	3(30.0)	4(40.0)	0	4(40.0)	3(30.0)
Granívoros	12	0	0	6(50.0)	6(50.0)	0	6(50.0)
Hematófagos	2	2(100.0)	1(50.0)	1(50.0)	0	1(50.0)	0
Herbívoros	27	3(11.1)	1(3.7)	7(25.9)	5(18.5)	2(7.4)	19(70.4)
Insectívoros	2	0	0	1(50.0)	1(50.0)	0	1(50.0)
Nectarívoros	3	1(33.3)	0	1(33.3)	0	1(33.3)	2(66.7)
Omnívoros	63	28(44.4)	5(7.9)	30(47.6)	7(11.1)	23(36.5)	28(44.4)
Piscívoros	3	0	0	0	0	0	3(100.0)
Total	122	41(33.6)	10(8.2)	50(40.9)	19(15.6)	31(25.4)	62(50.8)

Tabla 4. Resultados del PCR e hibridación de tipo Southern en una sub-muestra de 25 cepas de *E. coli* asociadas a mamíferos silvestres y humanos.

N	Hospedero (nombre común)	*PCR		**Hibridación tipo Southern				Tipo patógeno	Serotipo
		<i>cesT/</i> <i>eae</i>	<i>espB</i>	A <i>rorf1/</i> <i>rorf2</i>	B <i>esc sep</i>	C <i>eae</i>	D <i>espB</i>		
36	<i>Leptonycteris nivalis</i> (murciélago)	1	1	1	1	1	1	EPEC	O8:H-
68	<i>Sigmodon másotensis</i> (ratón)	1	1	1	0	0	1	NP	O37:H21
90	<i>Canis latrans</i> (coyote)	1	1	0	1	0	0	EAEC	O77:H18
95	<i>Peromyscus megalops</i> (ratón)	1	1	1	1	1	1	EPEC	O2:H6
97	<i>Peromyscus boylii</i> (ratón)	0	1	0	0	0	0	NP	O79:H1
270	<i>Panthera onca</i> (puma)	1	1	1	1	1	1	EPEC	O159:H46
271	<i>Panthera onca</i> (puma)	1	1	1	1	1	1	EPEC	O159:H46
272	<i>Urocyon cinereoargenteus</i> (zorra gris)	1	1	1	1	0	0	EAEC	O77:H18
286	<i>Dipodomys merriami</i> (ratón)	0	1	1	0	0	1	NP	O132:H28
288	<i>Dipodomys merriami</i> (ratón)	0	1	1	0	0	1	NP	O132:H28
808	<i>Equus caballus</i> (caballo)	0	0	1	0	0	0	NP	O19:H-
815	<i>Bassariscus astutus</i> (comadreja)	1	1	1	1	1	1	NP	O145:H34
816	<i>Bassariscus astutus</i> (comadreja)	1	1	1	1	1	1	NP	O145:H34
820	<i>Perognathus penicillanus</i> (ratón)	0	1	1	0	0	1	NP	O88:H9
830	<i>Canis latrans</i> (coyote)	1	1	1	1	1	1	EHEC	O55:H7

1639 <i>Alovatta palliata</i> (mono aullador)	1	1	1	1	1	1	EPEC	O127:H?
2055 <i>Tayassu tajacu</i> (pecari)	0	1	0	0	0	0	NP	O8:H11
2395 <i>Dasypus sp</i> (armadillo)	0	0	1	0	0	1	EPEC	O6:H16
3517 <i>Homo sapiens</i>	1	1	0	0	0	1	EPEC	O142:H?
3645 <i>Homo sapiens</i>	0	0	0	0	0	0	UTI	O75:H5
3653 <i>Homo sapiens</i>	1	1	1	1	0	1	EPEC	O125:H?
3681 <i>Homo sapiens</i>	0	0	1	0	0	1	EHEC	O157:H7
3689 <i>Homo sapiens</i>	1	1	1	1	1	1	EHEC	O4:H-
3693 <i>Homo sapiens</i>	1	1	1	1	1	1	EPEC	O55:H6
5063 <i>Homo sapiens</i>	1	1	1	1	1	1	EPEC	O127:H6
Total 25 cepas	16	21	20	14	11	19		

*Regiones amplificadas por PCR c (*cesT/ea*) and d (*espB*) miden 333 y 387 pb de largo.

**Sondas del Southern A, B, C and D miden 2870, 2948, 1050 and 2300 pb de largo respectivamente.

Tabla 5- Pruebas de independencia para encontrar posibles asociaciones entre los marcadores de patogénesis del LEE y el serotipo bacteriano (Tabla 1), el orden (Tabla 2) y dieta (Tabla 3) del hospedero y la genealogía de *E. coli* (grupos genéticos I, II y III).

	χ^2	G.L	P
LEE-serotipo	91.99	18	<0.00001
LEE-orden hospedero	53.15	30	0.0057
LEE-dieta hospedero	44.29	21	0.0021
LEE-genealogía <i>E. coli</i>	18.57	6	0.0049

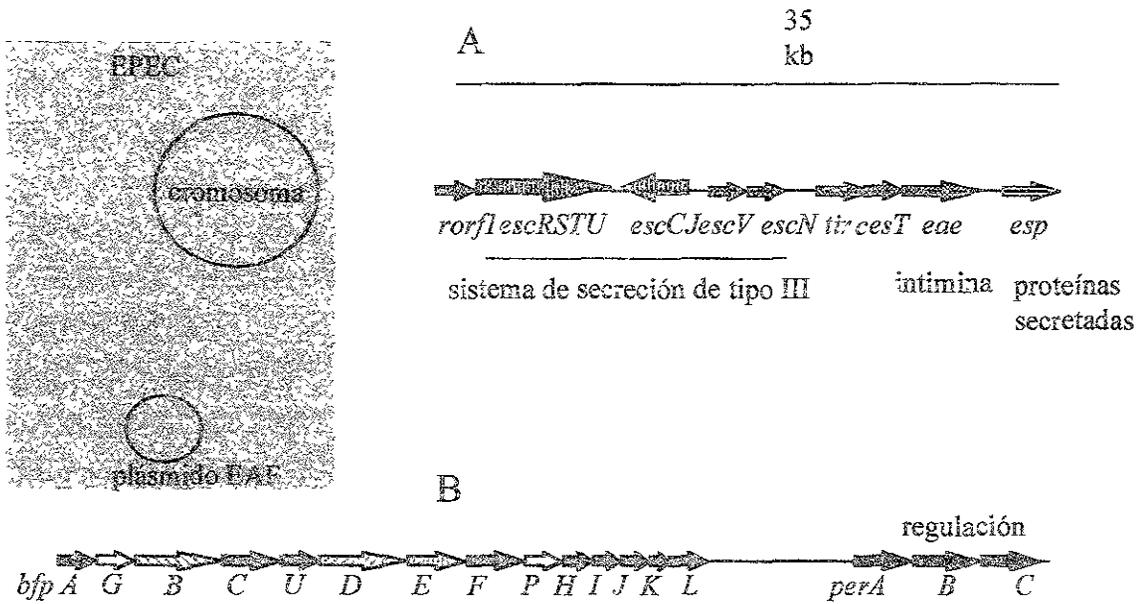


Fig. 1 Genes asociados al locus LEE de *E. coli* (Nataro y Kaper, 1998).
 A.- Genes cromosomales asociados al locus LEE.
 B.- Genes plasmídicos asociados a la patogénesis de EPEC.

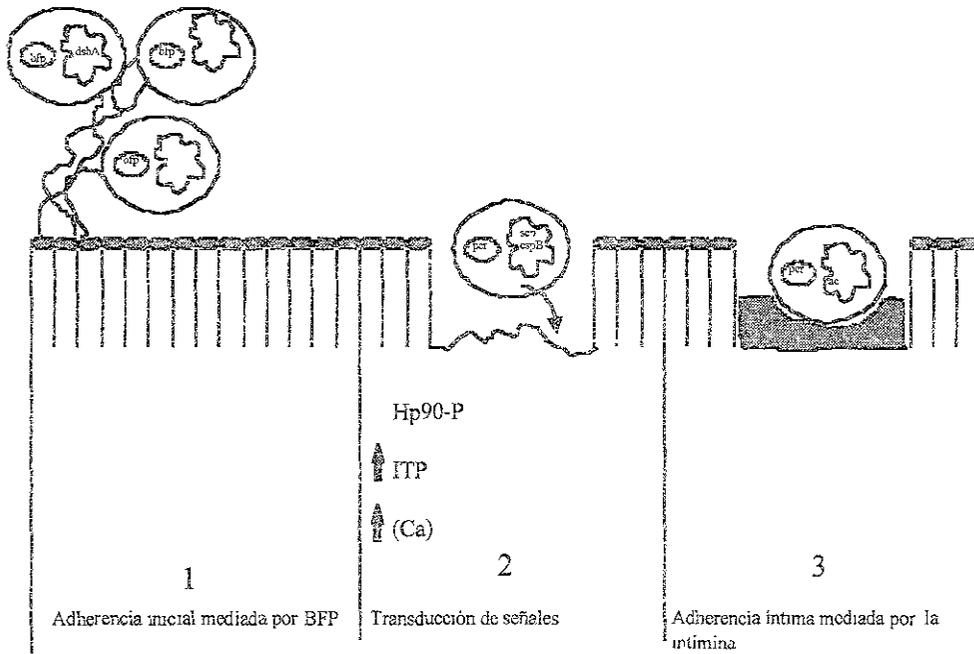


Fig. 2 Modelo en tres etapas de la patogénesis de EPEC (Nataro y Kaper, 1998).

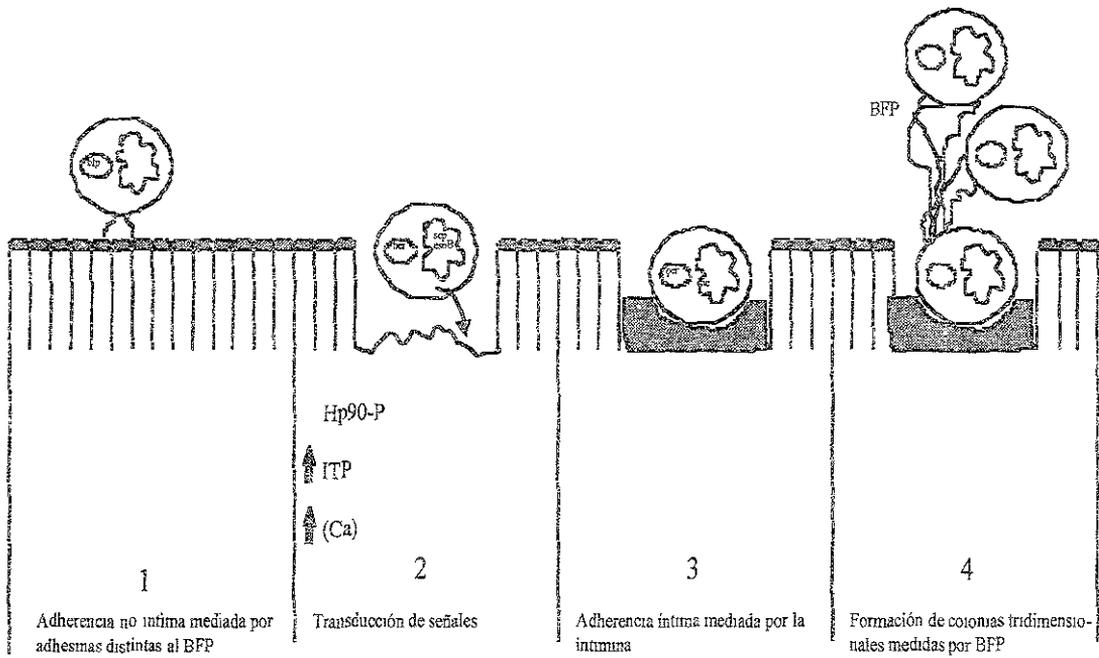


Fig. 3 Modelo en cuatro etapas de la patogénesis de EPEC (Hicks *et al.*, 1998).

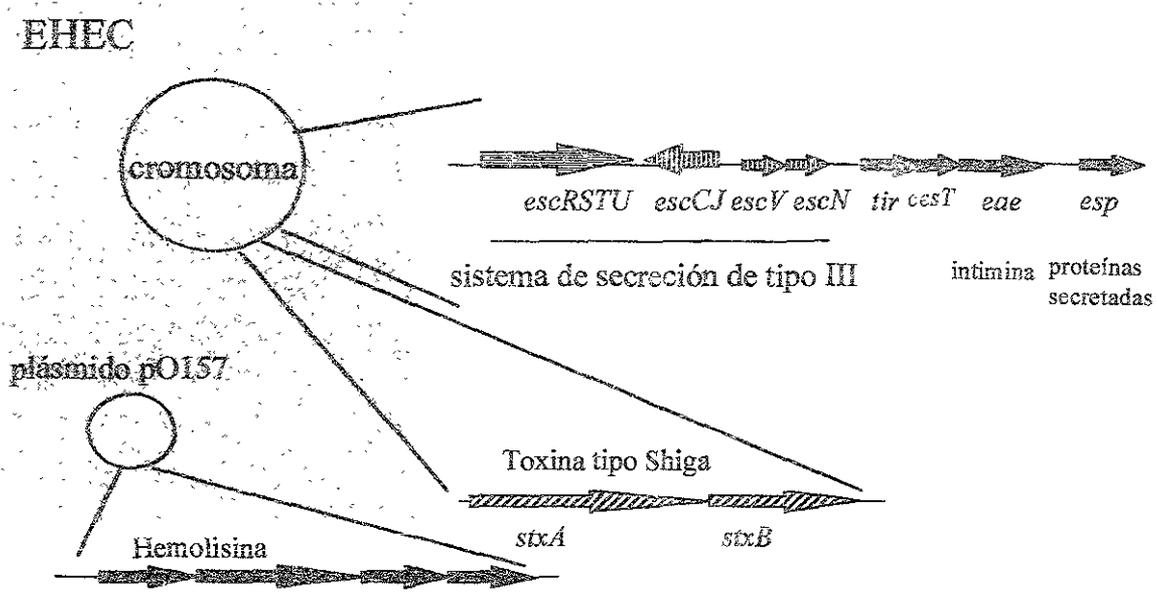


Fig. 4. Genes asociados al locus LEE de *E. coli* (Nataro y Kaper, 1998).

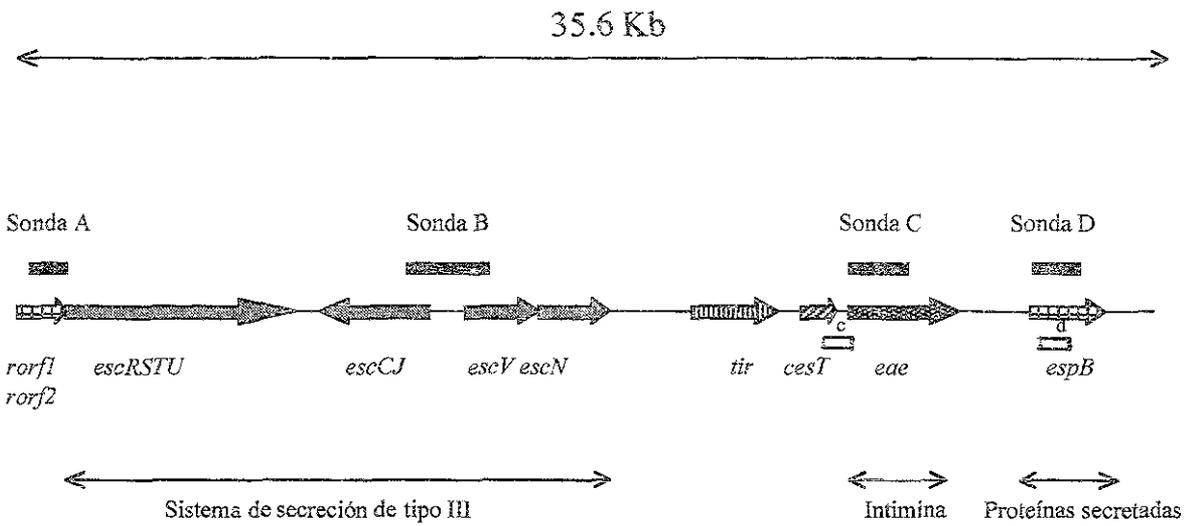


Fig. 5 Esquema del locus LEE mostrando los sitios de hibridación (barras sólidas) y los fragmentos de PCR (barras blancas).

Fig. 6

a.- Productos de PCR de 14 cepas de *E. coli* de mamíferos silvestres y humanos, amplificados con los oligos para la región (c) del LEE. El marcador de tamaño molecular (LA) es un ladder de 100 pb (Boehringer-Mannheim).

b.- Autoradiografía de hibridización Southern usando la sonda C (gen *eae*) para las mismas cepas usadas arriba. El marcador de tamaño molecular (LA, lambda DNA/*Hind*III, Gibco BRL) se dibujó sobre la fotografía utilizando el mismo patrón de los geles de agarosa.

Figura 6 a

LA

3693 272 271 270 830 1744 2055 1639 LA 90 95 97 816 815 3689 (-)

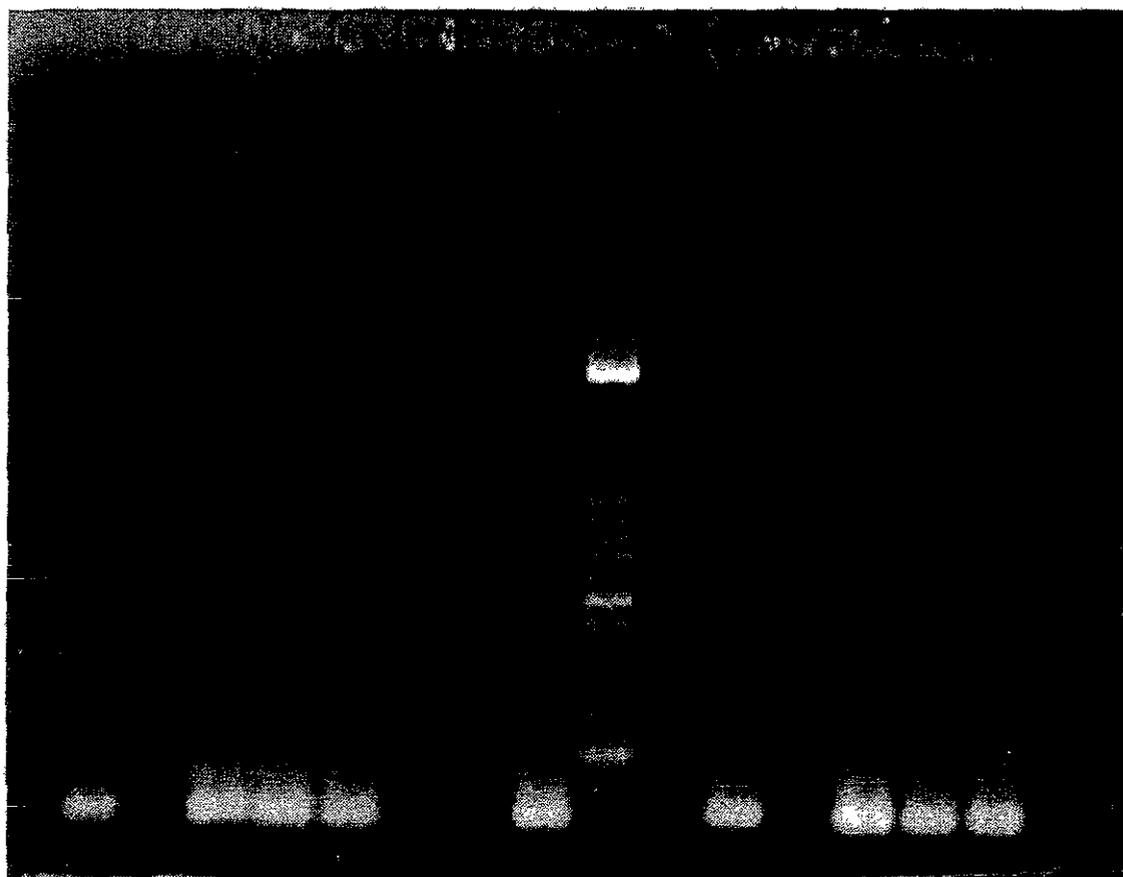


Figura 6 b

LA

3693 272 271 270 830 1744 2055 1639 LA 90 95 97 816 815 3689

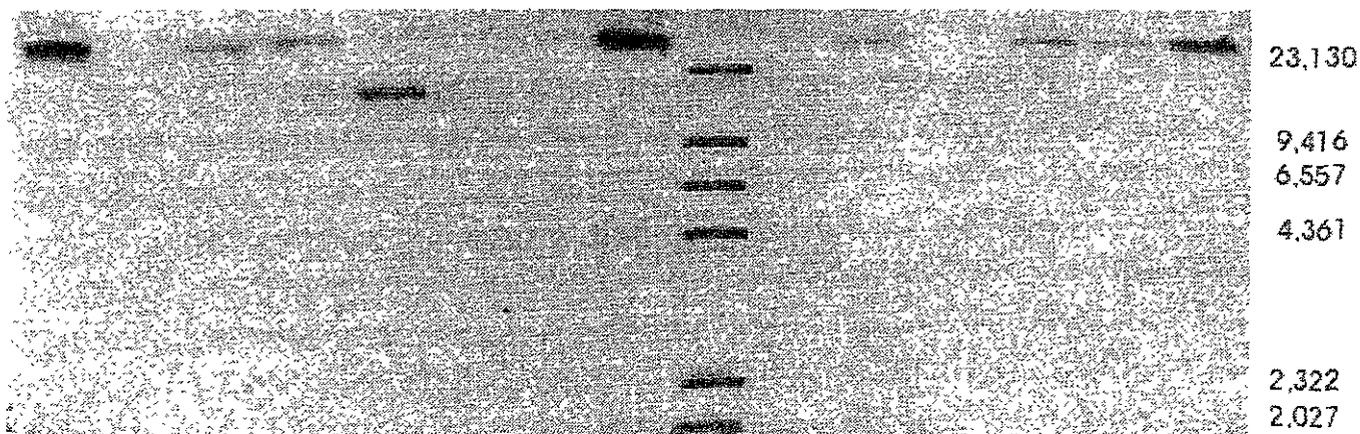
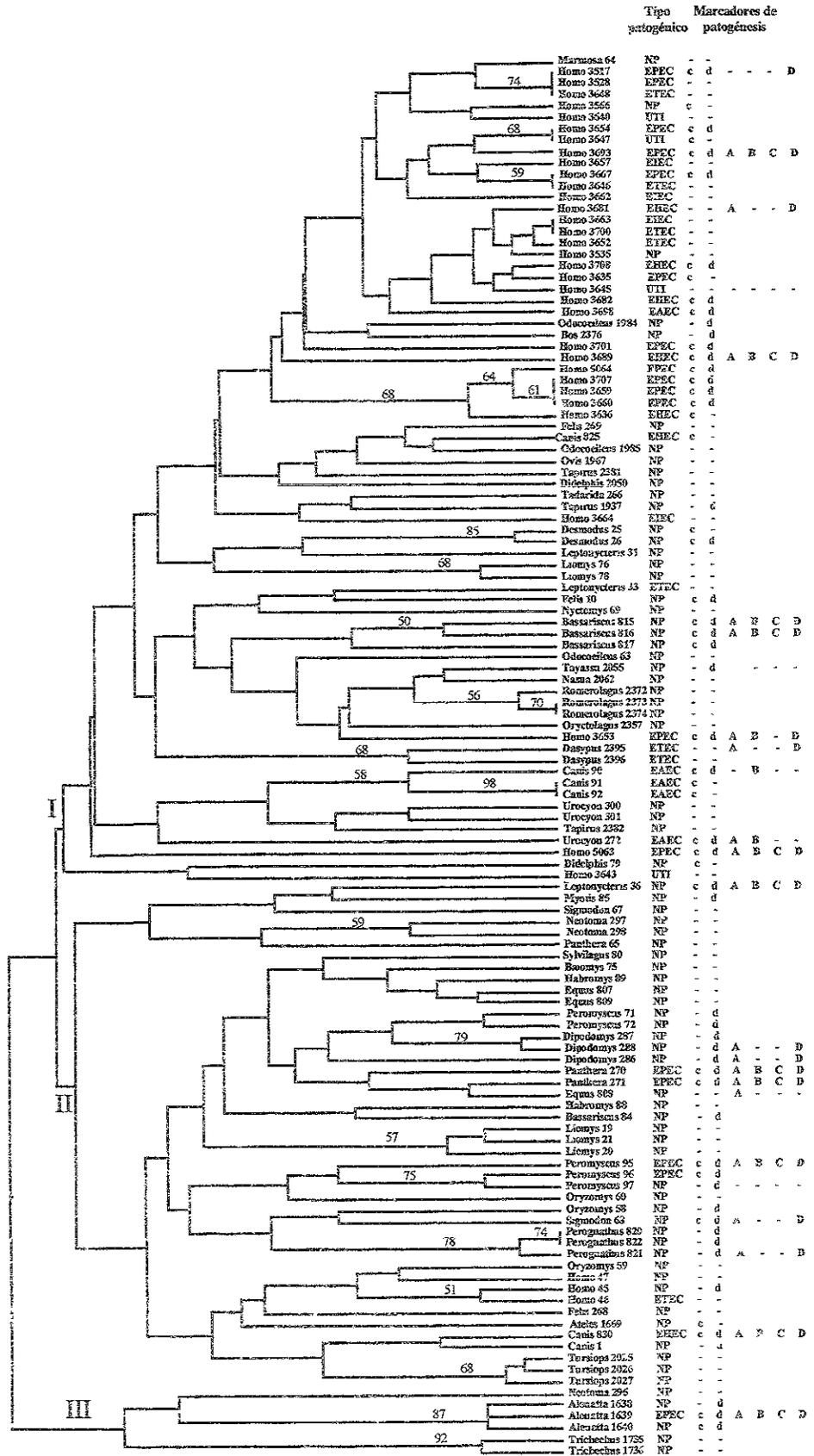


Fig. 7 Dendrograma UPGMA mostrando las relaciones genealógicas entre las 122 cepas de *E. coli* asociadas a mamíferos silvestres y humanos. El dendrograma fue deducido a partir de distancias genéticas de 11 loci alozímicos. Marcadores de patogénesis de PCR e hibridación de tipo Southern se muestran en letras minúsculas y mayúsculas respectivamente.

Fig. 7



ANEXOS

ANEXO A Serotipos asociados a *Escherichia coli* diarreagénica (Nataro y Kaper, 1998)

Tipo	Seregrupo	Antígeno H asociado
ETEC	O6	H16
	O8	H9
	O11	H27
	O15	H11
	O2	NM
	O25	H42, NM
	O27	H7
	O78	H11, H12
	O128	H7
	O148	H28
	O149	H10
	O159	H20
	O173	NM
	EPEC	O55
O86		H34, NM
O111		H2, H12, NM
O119		H6, NM
O125		H21
O126		H27, NM
O127		H6, NM
O128		H2, H12
O142		H6
O159		H46
EHEC	O26	H11, H32, NM
	O55	H7
	O111	H8, NM
	O113	H21
	O117	H14
	O157	H7
EAEC	O3	H2
	O15	H18
	O44	H18
	O86	NM
	O77	H18
	O111	H21
	O127	H2
	O?	H10
EIEC	O28	NM
	O29	NM
	O112	NM
	O124	H30, NM
	O136	NM
	O143	NM
	O144	NM
	O152	NM
	O159	H2, NM
	O164	NM
O167	H4, H5, NM	

ANEXO B Nombre, orden y dieta de los hospederos de las cepas de *Escherichia coli* usadas en este estudio. Serotipos de *E. coli* y marcadores de PCR.

Hospedero	Orden del hospedero	Dieta del hospedero	Serotipo	Tipo patogénico	PCR [‡]	
					<i>cesT/ea</i> (c)	<i>espB</i> (d)
<i>Bos taurus</i> 2376*	Artiodactyla	Herb	O18:H40	NP	0	1
<i>Odocoileus virginianus</i> 1984*	Artiodactyla	Herb	O7:H7	NP	0	1
<i>Odocoileus virginianus</i> 1985*	Artiodactyla	Herb	O37:H40	NP	0	0
<i>Odocoileus virginianus</i> 63*	Artiodactyla	Herb	O141:H28	NP	0	0
<i>Ovis aries</i> 1967*	Artiodactyla	Herb	O166:H15	NP	0	0
<i>Tayassu tajacu</i> 2055*	Artiodactyla	Herb	O8:H11	NP	0	1
<i>Bassariscus astutus</i> 815*	Carnivora	Omni	O145:H34	NP	1	1
<i>Bassariscus astutus</i> 816*	Carnivora	Omni	O145:H34	NP	1	1
<i>Bassariscus astutus</i> 817*	Carnivora	Omni	O145:H34	NP	1	1
<i>Bassariscus astutus</i> 84*	Carnivora	Omni	O8:H14	NP	0	1
<i>Canis familiaris</i> 1*	Carnivora	Omni	O?:H-	NP	0	1
<i>Canis latrans</i> 825*	Carnivora	Carn	O55:H7	EHEC	1	0
<i>Canis latrans</i> 830*	Carnivora	Carn	O55:H7	EHEC	1	1
<i>Canis latrans</i> 90*	Carnivora	Carn	O77:H18	EAEC	1	1
<i>Canis latrans</i> 91*	Carnivora	Carn	O77:H18	EAEC	1	0
<i>Canis latrans</i> 92*	Carnivora	Carn	O77:H18	EAEC	1	0
<i>Felis catus</i> 10*	Carnivora	Omni	O?:H-	NP	1	1
<i>Felis concolor</i> 268*	Carnivora	Carn	O11:H15	NP	0	0
<i>Felis concolor</i> 269*	Carnivora	Carn	O8:H51	NP	0	0
<i>Nasua narica</i> 2062*	Carnivora	Omni	O39:H28	NP	0	0
<i>Panthera onca</i> 65*	Carnivora	Carn	O141:H28	NP	0	0
<i>Panthera onca</i> 270*	Carnivora	Carn	O159:H46	EPEC	1	1
<i>Panthera onca</i> 271	Carnivora	Carn	O159:H46	EPEC	1	1
<i>Trocyon cinereoargenteus</i> 301*	Carnivora	Omni	O112:H21	NP	0	0
<i>Trocyon cinereoargenteus</i> 272*	Carnivora	Omni	O77:H18	EAEC	1	1
<i>Trocyon cinereoargenteus</i> 300*	Carnivora	Omni	O37:H21	NP	0	0
<i>Fursiops truncatus</i> 2025*	Cetacea	Pisc	O141:H4	NP	0	0
<i>Fursiops truncatus</i> 2026*	Cetacea	Pisc	O141:H4	NP	0	0

<i>Tursiops truncatus</i> 2027*	Cetacea	Pisc	O141:H4	NP	0	0
<i>Desmodus rotundus</i> 25*	Chiroptera	Hem	O149:H7	NP	1	0
<i>Desmodus rotundus</i> 26*	Chiroptera	Hem	O149:H7	NP	1	1
<i>Leptonycteris nivalis</i> 31*	Chiroptera	Nect	O78:H49	NP	0	0
<i>Leptonycteris nivalis</i> 33*	Chiroptera	Nect	O8:H-	ETEC	0	0
<i>Leptonycteris nivalis</i> 36*	Chiroptera	Nect	O125:H-	EPEC	1	1
<i>Myotis veilfer</i> 85	Chiroptera	Insc	O7:H?	NP	0	1
<i>Tadarida brasiliensis</i> 266*	Chiroptera	Insc	O125:H?	NP	0	0
<i>Oryctolagus cuniculus</i> 2357*	Lagomorpha	Herb	O170:H7	NP	0	0
<i>Romerolagus diazi</i> 2372*	Lagomorpha	Herb	O19:H16	NP	0	0
<i>Romerolagus diazi</i> 2373*	Lagomorpha	Herb	O19:H16	NP	0	0
<i>Romerolagus diazi</i> 2374*	Lagomorpha	Herb	O19:H16	NP	0	0
<i>Sylvilagus</i> sp. 80*	Lagomorpha	Herb	O155:H4	NP	0	0
<i>Didelphis virginiana</i> 2050*	Marsupialia	Omn	O54:H2	NP	0	0
<i>Didelphis virginiana</i> 79*	Marsupialia	Omn	O8:H40	NP	1	0
<i>Marmosa canescens</i> 64*	Marsupialia	Omn	O8:H7	NP	0	0
<i>Equus caballus</i> 807*	Perissodactyla	Herb	O19:H-	NP	0	0
<i>Equus caballus</i> 808*	Perissodactyla	Herb	O19:H-	NP	0	0
<i>Equus caballus</i> 809*	Perissodactyla	Herb	O21:H-	NP	0	0
<i>Tapirus bairdii</i> 1937*	Perissodactyla	Herb	O8:H7	NP	0	1
<i>Tapirus terrestris</i> 2381*	Perissodactyla	Herb	O153:H-	NP	0	0
<i>Tapirus terrestris</i> 2382*	Perissodactyla	Herb	O153:H-	NP	0	0
<i>Alouatta palliata</i> 1638*	Primates	Herb	O123:H?	NP	0	1
<i>Alouatta palliata</i> 1639	Primates	Herb	O127:H?	EPEC	1	1
<i>Alouatta palliata</i> 1640*	Primates	Herb	O123:H7	NP	1	1
<i>Ateles geoffroyi</i> 1669*	Primates	Herb	O36:H40	NP	1	0
<i>Homo sapiens</i> 45*	Primates	Omn	O19:H25	NP	0	1
<i>Homo sapiens</i> 46*	Primates	Omn	O78:H-	ETEC	0	0
<i>Homo sapiens</i> 47*	Primates	Omn	O19:H25	NP	0	0
<i>Homo sapiens</i> 3517*	Primates	Omn	O142:H?	EPEC	1	1
<i>Homo sapiens</i> 3528*	Primates	Omn	O126:H27	EPEC	0	0
<i>Homo sapiens</i> 3535*	Primates	Omn	O8:H30	NP	0	0
<i>Homo sapiens</i> 3566*	Primates	Omn	O86:H12	NP	1	0
<i>Homo sapiens</i> 3635*	Primates	Omn	O114:H2	EPEC	1	0
<i>Homo sapiens</i> 3636*	Primates	Omn	O157:H7	EHEC	1	0
<i>Homo sapiens</i> 3640*	Primates	Omn	O117:H27	UTI	0	0

<i>Homo sapiens</i> 3643 ⁺	Primates	Omn	O6:H10	UTI	0	0
<i>Homo sapiens</i> 3645 ⁻	Primates	Omn	O75:H5	UTI	0	0
<i>Homo sapiens</i> 3646 ⁺	Primates	Omn	O8:H-	ETEC	0	0
<i>Homo sapiens</i> 3647 ⁺	Primates	Omn	OR:H-	UTI	1	0
<i>Homo sapiens</i> 3648 ⁻	Primates	Omn	O8:H9	ETEC	0	0
<i>Homo sapiens</i> 3652 ⁺	Primates	Omn	O27:H7	ETEC	0	0
<i>Homo sapiens</i> 3653 ⁻	Primates	Omn	O125:H-	EPEC	1	1
<i>Homo sapiens</i> 3654 ⁻	Primates	Omn	O125:H-	EPEC	1	1
<i>Homo sapiens</i> 3657 ⁺	Primates	Omn	O136:H-	EIEC	0	0
<i>Homo sapiens</i> 3659 ⁻	Primates	Omn	O111:H-	EPEC	1	1
<i>Homo sapiens</i> 3660 ⁺	Primates	Gran	O114:H2	EPEC	1	1
<i>Homo sapiens</i> 3662 ⁺	Primates	Omn	O164:H-	EIEC	0	0
<i>Homo sapiens</i> 3663 ⁻	Primates	Omn	O167:H-	EIEC	0	0
<i>Homo sapiens</i> 3664 ⁻	Primates	Omn	O152:H-	EIEC	0	0
<i>Homo sapiens</i> 3667 ⁻	Primates	Omn	O111:H-	EPEC	1	1
<i>Homo sapiens</i> 3681 ⁻	Primates	Omn	O157:H7	EHEC	0	0
<i>Homo sapiens</i> 3682 ⁺	Primates	Omn	O157:H7	EHEC	1	1
<i>Homo sapiens</i> 3689 ⁺	Primates	Omn	O4:H-	EHEC	1	1
<i>Homo sapiens</i> 3693 ⁺	Primates	Omn	O55:H6	EPEC	1	1
<i>Homo sapiens</i> 3698 ⁻	Primates	Omn	O44:H18	EAEC	1	1
<i>Homo sapiens</i> 3700 ⁺	Primates	Omn	O78:H12	ETEC	0	0
<i>Homo sapiens</i> 3701 ⁻	Primates	Omn	O55:H-	EPEC	1	1
<i>Homo sapiens</i> 3707 ⁺	Primates	Omn	O111:H-	EPEC	1	1
<i>Homo sapiens</i> 3708 ⁺	Primates	Omn	O26:H11	EHEC	1	1
<i>Homo sapiens</i> 5063(E2348/69)	Primates	Omn	O127:H6	EPEC	1	1
<i>Homo sapiens</i> 5064(B171-8)	Primates	Omn	O111:H-	EPEC	1	1
<i>Baiomys musculus</i> 75 [*]	Rodentia	Herb	O103:H1	NP	0	0
<i>Dipodomys merriami</i> 286 [*]	Rodentia	Gran	O132:H28	NP	0	1
<i>Dipodomys merriami</i> 287 [*]	Rodentia	Gran	O132:H28	NP	0	1
<i>Dipodomys merriami</i> 288 [*]	Rodentia	Gran	O132:H28	NP	0	1
<i>Habromys</i> sp. 88 [*]	Rodentia	Omn	O103:H-	NP	0	0
<i>Habromys</i> sp. 89 [*]	Rodentia	Omn	O103:H-	NP	0	0
<i>Liomys pictus</i> 19 [*]	Rodentia	Gran	O22:H28	NP	0	0
<i>Liomys pictus</i> 20 [*]	Rodentia	Gran	O22:H28	NP	0	0
<i>Liomys pictus</i> 21 ⁻	Rodentia	Gran	O22:H28	NP	0	0
<i>Liomys pictus</i> 76 [*]	Rodentia	Gran	O?H2	NP	0	0

<i>Liomys pictus</i> 78*	Rodentia	Gran	O112:H12	NP	0	0
<i>Neotoma albigula</i> 296*	Rodentia	Herb	O19:H?	NP	0	0
<i>Neotoma albigula</i> 297*	Rodentia	Herb	O19:H?	NP	0	0
<i>Neotoma albigula</i> 298*	Rodentia	Herb	O19:H?	NP	0	0
<i>Nyctomys</i> sp. 69*	Rodentia	Gran	O37:H21	NP	0	0
<i>Oryzomys</i> sp. 58*	Rodentia	Omn	OR:H5	NP	0	1
<i>Oryzomys</i> sp. 59*	Rodentia	Omn	OR:H5	NP	0	0
<i>Oryzomys</i> sp. 60*	Rodentia	Omn	OR:H5	NP	0	0
<i>Perognathus penicillatus</i> 820*	Rodentia	Gran	O88:H9	NP	0	1
<i>Perognathus penicillatus</i> 821*	Rodentia	Gran	O88:H9	NP	0	1
<i>Perognathus penicillatus</i> 822*	Rodentia	Gran	O88:H9	NP	0	1
<i>Peromyscus megalops</i> 95*	Rodentia	Omn	O?:H6	EPEC	1	1
<i>Peromyscus</i> sp.71*	Rodentia	Omn	O8:H16	NP	0	1
<i>Peromyscus</i> sp.72*	Rodentia	Omn	O8:H16	NP	0	1
<i>Peromyscus boylii</i> 96*	Rodentia	Omn	O?:H6	EPEC	1	1
<i>Peromyscus boylii</i> 97*	Rodentia	Omn	O79:H1	NP	0	1
<i>Sigmodon mascotensis</i> 67*	Rodentia	Omn	O37:H21	NP	0	0
<i>Sigmodon mascotensis</i> 68*	Rodentia	Omn	O37:H21	NP	1	1
<i>Trichechus manatus</i> 1735*	Sirenida	Herb	O?H?	NP	0	0
<i>Trichechus manatus</i> 1736*	Sirenida	Herb	O?H?	NP	0	0
<i>Dasyopus</i> sp. 2395*	Xenarthra	Omn	O6:H16	EPEC	0	0
<i>Dasyopus</i> sp. 2396*	Xenarthra	Omn	O6:H16	EPEC	0	0

Dieta del hospedero: Carn (carnívoros), Gra (granívoros), Hem. (hematófagos), Herb (herbívoros), Insc (insectívoros), Nect (nectarívoros), Omn (omnívoros), Pisc (piscívoros)

Marcadores de PCR: 0 ausencia, 1 presencia

ANEXO C Características bioquímicas de *Escherichia coli* utilizadas para su identificación

Características	Respuesta
Gas en TSI*	+
Acido en TSI*	+
H ₂ S en TSI*	-
Rojo de metilo*	+
Voges-Proskauer*	-
Movilidad*	+
Lactosa*	+
Citrato*	-
Ureasa*	-
Arabinosa*	+
Sorbitol	+
Maltosa	+
manitol	+
Adonitol	-
Inositol	-
Sucrosa	-
Lisina	+
Fenilalanina	-

Según Ewing, 1986 y manual DIFCO, 1984

* Pruebas realizadas en este trabajo

ANEXO D Reactivos específicos para la tinción de las enzimas (electroforesis de isoenzimas)

ADH (Alcohol deshidrogenasa)

0.6 ml Tris HCl, pH=7.0*
1.5 ml NAD
5 gotas de MTT
3 gotas de etanol
5 gotas de PMS**
2 ml de agar

ARK (Arginina quinasa)

0.5 ml Tris HCl, pH=8.0*
1.5 ml NAD
5 gotas de MgCl
5 gotas de fosfo-L-arginina
5 gotas de solución de ADP
5 gotas de MTT
5 gotas de PMS
10 ml de hexoquinasa**
10 ml de G6PDH**
2 ml de agar

G6PDH (Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa)

0.6 ml Tris HCl, pH=8.0*
1.5 ml NADP
12 gotas de D-glucosa-6-fosfato
5 gotas de MTT
5 gotas de PMS
6 gotas de MgCl
2 ml de agar

IDH (Isocitrato deshidrogenasa)

1 ml Tris HCl, pH=7.0*
1.5 ml NADP
15 gotas de DL-ácido isocítrico
8 gotas de MgCl
5 gotas de MTT
5 gotas de PMS**
2 ml de agar

MDH (Malato deshidrogenasa)

1 ml Tris HCl, pH=8.0*
1.5 ml NAD
13 gotas de sustrato málico
5 gotas de MTT
5 gotas de PMS**
2 ml de agar

ME (Enzima málica)

0.6 ml Tris HCl, pH=8.0*
1.5 ml NADP

12 gotas de sustrato málico
5 gotas de MTT
5 gotas de PMS**
2 gotas de MgCl
2 ml de agar

MPI (Manosa-6-fosfato isomerasa)

1 ml Tris HCl, pH=8.0*
1.5 ml NAD
5 gotas de D-manosa-6-fosfato
5 gotas de MTT
5 gotas de PMS**
5 ml de PGI**
20 ml de G6PDH
2 ml de agar

PEP (Peptidasa)

2 ml de 0.02M Na₂HPO₄, pH=7.5
4 gotas de peroxidasa
8 gotas de o-dianisidina
2gotas de MgCl
8 gotas de péptido (leu-ala)
4 gotas de l-amino ácido oxidasa**
2ml de agar

PGM (Fosfoglucomutasa)

1 ml Tris HCl, pH=8.0*
1.5 ml NAD
5 gotas de solución de glucosa 1-fosfato
5 gotas de MTT
5 gotas de PMS**
5 gotas de MgCl
20 ml de G6PDH**
2 ml de agar

XDH (Xantina deshidrogenasa)

1 ml Tris HCl, pH=8.0*
1.5 ml NAD
20 gotas de hipoxantina
5 gotas de MTT
5 gotas de PMS**
2 ml de agar

ANEXO E Tabla de electrotipos

Hospedero/ No. de cepa	IDH	PEI	PGM	ARK	ME1	ME2	MP1	ADH1	MDH	6G	XDH1
<i>Odocoileus virginicus</i> 63	2	2	3	2	2	7	3	3	2	3	1
<i>Ovis aries</i> 1967	3	3	5	3	2	5	5	0	3	3	4
<i>Odocoileus virginicus</i> 1984	5	4	4	2	3	6	3	3	3	3	3
<i>Odocoileus virginicus</i> 1985	3	3	4	2	2	6	4	0	3	3	4
<i>Tayassu tajacu</i> 2055	1	3	3	2	3	7	3	3	3	3	3
<i>Bos taurus</i> 2376	5	3	4	2	3	7	4	3	2	3	4
<i>Canis familiaris</i> 1	2	3	3	4	3	3	6	5	3	3	4
<i>Felis catus</i> 10	4	3	3	2	3	3	3	3	3	3	3
<i>Panthera onca</i> 65	3	3	4	2	2	7	5	3	6	4	3
<i>Bassariscus astutus</i> 84	4	4	2	3	4	4	0	4	5	3	4
<i>Canis latrans</i> 90	3	4	4	3	4	4	4	3	2	4	1
<i>Canis latrans</i> 91	3	4	4	3	3	5	4	4	3	4	1
<i>Canis latrans</i> 92	3	4	4	3	3	5	4	4	3	4	1
<i>Felis concolor</i> 268	3	3	2	3	2	6	4	3	1	3	2
<i>Felis concolor</i> 269	3	3	3	2	1	6	5	3	3	3	0
<i>Panthera onca</i> 270	3	3	4	2	3	3	3	4	6	3	3
<i>Panthera onca</i> 271	3	3	3	2	3	5	3	6	6	3	0
<i>Urocyon cinereoargenteus</i> 272	4	4	4	3	1	1	0	3	3	3	1
<i>Urocyon cinereoargenteus</i> 300	4	4	4	2	3	5	5	5	3	3	4
<i>Urocyon cinereoargenteus</i> 301	4	4	4	3	3	5	5	5	4	3	2
<i>Bassariscus astutus</i> 815	2	4	3	2	3	5	4	3	4	4	2
<i>Bassariscus astutus</i> 816	2	4	3	2	3	5	4	3	2	3	2
<i>Bassariscus astutus</i> 817	2	4	2	2	3	3	4	2	2	3	2
<i>Canis latrans</i> 825	3	3	3	3	3	6	4	3	3	3	4
<i>Canis latrans</i> 830	0	3	3	4	3	3	4	5	3	3	3
<i>Nasua narica</i> 2062	2	3	3	2	3	7	2	2	3	3	3
<i>Tursiops truncatus</i> 2025	2	3	3	3	3	6	4	5	3	2	4
<i>Tursiops truncatus</i> 2026	2	3	3	4	3	6	4	5	3	2	4
<i>Tursiops truncatus</i> 2027	2	3	2	4	3	6	4	5	3	2	4
<i>Desmodus rotundus</i> 25	4	2	0	4	3	5	1	3	2	3	4
<i>Desmodus rotundus</i> 26	4	2	2	4	3	5	1	3	2	3	5
<i>Leptonycteris nivalis</i> 31	3	2	2	2	3	5	1	2	2	2	3
<i>Leptonycteris nivalis</i> 33	3	2	2	2	3	3	3	2	4	3	2
<i>Leptonycteris nivalis</i> 36	3	1	3	2	3	5	5	2	6	4	2
<i>Myotis veillfer</i> 85	0	2	5	2	3	4	5	2	6	0	1
<i>Tadarida brasiliensis</i> 266	4	1	3	3	2	6	2	3	3	3	4
<i>Sylvilagus</i> sp. 80	3	3	3	3	4	6	4	7	4	0	4
<i>Oryzolagus cuniculus</i> 2357	2	5	3	2	4	8	3	3	2	3	4
<i>Romerolagus diazi</i> 2372	2	3	3	2	3	6	3	3	2	3	4
<i>Romerolagus diazi</i> 2373	2	3	3	2	3	7	3	3	2	3	4
<i>Romerolagus diazi</i> 2374	2	3	3	2	3	7	3	3	2	3	4
<i>Marmosa canescens</i> 54	4	3	5	3	3	7	3	3	2	3	4
<i>Didelphis virginiana</i> 79	5	3	5	3	2	5	4	7	2	4	4
<i>Didelphis virginiana</i> 2050	3	3	5	3	4	7	5	0	2	3	4
<i>Equus caballus</i> 807	3	2	4	2	3	5	4	6	5	3	4
<i>Equus caballus</i> 808	4	2	3	2	3	5	3	7	6	3	4

<i>Equus caballus</i> 809	3	2	3	2	3	6	4	6	5	3	4
<i>Tapirus bairdii</i> 1937	2	1	3	0	3	6	3	4	2	3	4
<i>Tapirus terrestris</i> 2381	4	3	4	3	2	7	4	4	3	4	4
<i>Tapirus terrestris</i> 2382	4	3	4	3	3	5	5	3	3	4	3
<i>Homo sapiens</i> 45	3	2	2	3	3	5	4	0	3	3	3
<i>Homo sapiens</i> 46	4	2	2	3	2	5	4	0	3	3	3
<i>Homo sapiens</i> 47	1	2	3	3	2	5	4	0	3	3	3
<i>Alouatta palliata</i> 1638	1	4	4	2	4	6	6	5	2	3	3
<i>Alouatta palliata</i> 1639	2	4	4	2	4	6	6	5	2	3	4
<i>Alouatta palliata</i> 1640	1	4	4	2	4	6	6	5	2	3	5
<i>Ateles geoffroyi</i> 1669	0	2	2	2	2	6	3	5	4	4	2
<i>Homo sapiens</i> * 3517	2	0	4	3	2	0	2	3	3	3	3
<i>Homo sapiens</i> * 3528	2	0	4	3	2	7	2	3	3	3	3
<i>Homo sapiens</i> * 3535	2	0	4	3	2	7	2	3	3	3	3
<i>Homo sapiens</i> * 3566	2	0	4	3	2	7	2	3	3	3	3
<i>Homo sapiens</i> * 3635	2	0	4	3	2	7	2	3	3	3	3
<i>Homo sapiens</i> * 3636	4	4	3	3	3	7	1	3	3	2	4
<i>Homo sapiens</i> * 3640	4	0	4	3	2	7	2	3	3	3	3
<i>Homo sapiens</i> * 3643	5	0	4	3	2	7	2	3	3	4	3
<i>Homo sapiens</i> * 3645	2	0	4	3	2	7	2	3	3	3	3
<i>Homo sapiens</i> * 3646	4	3	5	2	3	7	2	3	3	3	4
<i>Homo sapiens</i> * 3647	2	0	4	3	2	7	2	3	3	3	3
<i>Homo sapiens</i> * 3648	2	0	4	3	2	7	2	3	3	3	3
<i>Homo sapiens</i> * 3652	2	0	4	1	2	6	2	2	3	3	2
<i>Homo sapiens</i> * 3653	4	0	4	1	2	7	2	2	3	3	2
<i>Homo sapiens</i> * 3654	4	0	4	3	2	0	4	3	3	3	3
<i>Homo sapiens</i> * 3657	6	3	5	2	3	7	2	3	3	3	4
<i>Homo sapiens</i> * 3659	4	4	2	3	3	7	2	3	3	2	4
<i>Homo sapiens</i> * 3660	4	4	2	3	3	7	2	3	3	2	4
<i>Homo sapiens</i> * 3662	4	3	5	2	3	7	4	2	3	3	4
<i>Homo sapiens</i> * 3663	2	0	4	3	2	7	2	3	3	3	3
<i>Homo sapiens</i> * 3664	2	0	4	3	2	7	2	3	3	3	3
<i>Homo sapiens</i> * 3667	2	0	4	3	2	7	2	3	3	3	3
<i>Homo sapiens</i> * 3681	2	0	3	3	2	7	4	3	3	3	3
<i>Homo sapiens</i> * 3682	2	0	3	3	2	7	2	3	3	3	3
<i>Homo sapiens</i> * 3689	2	0	3	5	3	0	4	5	4	3	4
<i>Homo sapiens</i> * 3693	3	0	4	3	2	7	2	3	3	3	3
<i>Homo sapiens</i> * 3698	3	3	5	3	2	7	1	3	2	3	4
<i>Homo sapiens</i> * 3700	2	0	4	1	2	7	2	3	3	3	3
<i>Homo sapiens</i> * 3701	4	4	5	2	2	7	2	3	1	3	4
<i>Homo sapiens</i> * 3707	4	4	2	3	3	7	2	3	3	2	4
<i>Homo sapiens</i> * 3708	1	0	4	3	2	7	2	3	3	3	3
<i>Homo sapiens</i> * 5063	4	5	2	2	3	5	3	4	4	2	5
<i>Homo sapiens</i> * 5064	4	4	2	3	3	0	2	3	2	2	4
<i>Liomys pictus</i> 19	5	3	3	2	3	5	4	6	5	3	2
<i>Liomys pictus</i> 20	5	3	3	4	3	3	4	6	5	3	2
<i>Liomys pictus</i> 21	5	3	3	4	3	5	4	6	5	3	2
<i>Oryzomys</i> sp. 58	2	5	3	2	3	3	6	3	6	4	4
<i>Oryzomys</i> sp. 59	2	2	3	3	2	5	4	5	2	4	4
<i>Oryzomys</i> sp. 60	2	2	3	3	2	5	4	6	6	3	5
<i>Sigmodon mascotensis</i> 67	1	3	4	2	3	5	5	3	5	3	2
<i>Sigmodon mascotensis</i> 68	2	3	3	2	3	3	5	3	5	3	5
<i>Nyctomys</i> sp. 69	1	3	3	2	3	3	1	3	4	3	4
<i>Peromyscus</i> sp. 71	3	2	3	2	3	3	4	4	5	3	4

<i>Peromyscus</i> sp. 72	3	2	3	4	3	3	4	4	5	3	4
<i>Baiomys musculus</i> 75	3	2	3	2	3	5	5	6	4	4	4
<i>Liomys pictus</i> 76	3	2	3	3	2	6	1	3	5	3	4
<i>Liomys pictus</i> 78	3	2	3	4	2	6	1	3	5	4	4
<i>Habromys</i> sp. 88	4	3	3	2	4	4	5	5	5	4	4
<i>Habromys</i> sp. 89	3	3	3	2	3	5	5	8	5	3	4
<i>Peromyscus megalops</i> 95	2	3	3	3	2	5	6	3	5	3	4
<i>Peromyscus boylii</i> 96	2	3	4	3	3	5	6	5	6	3	4
<i>Peromyscus boylii</i> 97	1	3	4	3	3	5	6	6	6	3	4
<i>Dipodomys merriami</i> 286	3	2	3	3	3	6	3	5	5	2	3
<i>Dipodomys merriami</i> 287	3	2	3	3	3	3	2	5	5	2	4
<i>Dipodomys merriami</i> 288	3	2	3	3	3	3	3	5	5	2	4
<i>Neotoma albigula</i> 296	4	2	4	2	3	7	7	5	4	3	4
<i>Neotoma albigula</i> 297	3	2	3	2	2	8	4	3	5	3	2
<i>Neotoma albigula</i> 298	6	2	3	2	2	8	4	3	5	3	3
<i>Perognathus penicillatus</i> 820	2	2	3	2	3	3	7	5	4	3	4
<i>Perognathus penicillatus</i> 821	2	2	3	2	3	3	7	4	4	3	0
<i>Perognathus penicillatus</i> 822	2	2	3	2	3	3	7	5	4	3	0
<i>Trichechus manatus</i> 1735	4	5	6	5	3	6	7	0	2	3	3
<i>Trichechus manatus</i> 1736	4	5	6	3	3	6	7	0	2	3	3
<i>Dasypus</i> sp 2395	3	3	1	1	2	6	3	2	3	3	2
<i>Dasypus</i> sp 2396	1	3	1	1	2	7	3	2	3	4	2

ANEXO F SOLUCIONES Y REACTIVOS

Purificación de DNA total

BUFFER TE (TRIS-EDTA)

Para un volumen final de 1 lt.

TRIS 1M, pH=8.0

121.14 gr. de trisma base

Aforar con H₂O bidestilada a 1 lt.

Ajustar el pH con HCl

Filtrar y esterilizar en autoclave

EDTA 0.25M, pH=8.0

93.05gr. de EDTA(Na₂)

Aforar a 1 lt. con H₂O

Ajustar el pH con NaOH

Filtrar y esterilizar

PRONASA

5 mg. de pronasa en 1 ml de TRIS-EDTA 50:20, pH=8.0. Digerir 1 hora 37°C

RNAasa

Disolver 30 mg. de RNAasa en 1 ml de agua HPLC, digerir 10' a 95°C.

SATURACION DE FENOL

Añadir a una botella de fenol 100 ml de TE 10:1, pH=8.0. dejar en agitación hasta obtener una emulsión.

MEZCLA FENOL:CLOROFORMO:ALCOHOL ISO-AMILICO

Mezclar 24 ml de fenol, 24 ml de cloroformo y 1 ml de alcohol iso-amilico. Almacenar en un frasco ámbar a 4°C.

BUFFER TRIS-ACETATOS (TA) 1X

48.4 gr. de Trisma base

11.42 ml de ácido acético

20 ml de EDTA 0.5M a pH=8.0

Aforar con agua bidestilada a 1000 ml

Digestiones con enzimas de restricción

SONDA C

Para un volumen final de 50 µl.

10 µl de DNA (2ng)

5 µl de buffer

2 µl de *Hind* III (20 u)

33 µl. de agua bidestilada y esterilizada

SONDA D

Para un volumen final de 50 µl.

5 µl de DNA (2ng)

5 µl de buffer Neb 4 (Biolab)

2 µl de *Sma* I (20 u)

2 µl de *Xba* I (20 u)

36 µl. de agua bidestilada y esterilizada

Transferencia

HCl 0.25M

20.4 ml de HCl

Aforar con agua bidestilada a 1000 ml

NaOH 0.5M, NaCl 1.5M

19.99gr. de NaOH

87.6 gr de NaCl

Aforar con agua bidestilada a 1000

Tris-HCl 0.5M, NaCl 1.5M, pH=7.4
60.57 gr. de Trisma base
87.6 gr. de NaCl
Aforar con agua bidestilada a 1000

SSC 20X
88.2 gr. de citrato de sodio
175.2 gr. de NaCl
Aforar con agua bidestilada a 1000

Southern blot con dioxigenina

SSX 20X
SDS

SOLUCIONES DE LAVADO

1.-SSC 2X/SDS 0.1% (vol. final de 200 ml)
20 ml de SSC 20X
2 ml de SDS al10%
178 ml de agua bidestilada

2.-SSC 0.1X/SDS 0.1%
1 ml de SSC 20X
1 ml de SDS al10%
197 ml de agua bidestilada

BUFFER DE HIBRIDACION

Para un volumen final de 100 ml
25 ml de SSC 20X
0.1 gr de n-lauril sarcosina
10 ml de solución de bloqueo Dig High Prime (Mannheim-Boehringer)
64.8 ml de agua destilada estéril
200 ml de SDS al 10%

BUFFER DE MALEICO

Para un volumen final de 500ml
5.8 gr. de ácido maleico
4.38 gr. de Na Cl
Aforar a 500 ml y ajustar el pH a 7.5

BUFFER DE LAVADO

400 ml de buffer de maleico
1.2 ml de Tween 20v7v

BUFFER DE EQUILIBRAR

Para un volumen final de 200ml
20 ml de Tris-base-HCl 1M
4 ml de NaCl 5M
5 ml de MgCl 1M
Aforar a 200 ml con agua destilada
Ajustar el pH a 9.5
Prepara al momento de usar