
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

CARACTERIZACION MOLECULAR DEL GEN
FLAGELAR *fliC* EN CEPAS DE *Escherichia coli* NO
TIPIFICABLES Y SU POSIBLE APLICACIÓN EN EL
ESQUEMA DE TIPIFICACIÓN FLAGELAR DE LA
BACTERIA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A

NANCY GARCÍA JUAREZ

MÉXICO, D.F.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

Presidente	Ma. Del Carmen Cortes Decuir
Vocal	Javier Plasencia de la Parra
Secretario	Luis Manuel Perea Mejía
1er sup.	Luciano Hernández Gómez
2do sup.	Norma Trejo Medina

Sitio donde se desarrollo el tema:

Laboratorio de Epidemiología Molecular. Tercer piso de la torre de investigación.
Departamento de Salud Pública, Facultad de Medicina, UNAM.

M. en C. LUIS MANUEL PEREA MEJIA
Asesor

M. en C. ALMA EDNA INZUNZA MONTIEL
Supervisor técnico

NANCY GARCIA JUÁREZ
Sustentante

Este trabajo forma parte del proyecto “Análisis molecular de los genes asociados a la virulencia de *Streptococcus pyogenes* de origen clínico y una colección de referencia” financiado por el PAPIIT de la DGAPA con clave IN218103-3

Dedicado a Dios y a mi mami

Por que fuiste el ser más importante de mi vida, contigo pase momento únicos e inolvidables. Te dedico este trabajo por que tu me enseñaste a ser todo lo que soy, me enseñaste a ser fuerte y a enfrentarme a grandes, gracias por darme las armas necesarias para salir adelante siempre, y por enseñarme a amar a Dios, a la vida y a mi misma.

Ahora que ya estas con Dios te amaré y recordare como tú me enseñaste.

AGRADECIMIENTOS

A Luis Manuel Perea: Tengo tantas cosas que agradecerle que enlistarlas me sería imposible, gracias por su confianza y paciencia, pero sobre todo por darme las herramientas para sentirme segura y por ser más que un mentor un amigo. Su apoyo para mí fue de mucha ayuda. Es usted un ejemplo de persona.

A Alma Edna Inzunza, gracias por su apoyo y a todas las enseñanzas que me dejó, no solo en lo académico sino también en lo personal.

A mi padre y hermanos, por apoyarme siempre, muy a su estilo cada uno. Les dedico este trabajo con mucho amor y gratitud y con los mejores deseos de que juntos salgamos adelante.

A mis cuñados y cuñadas, quienes han sido para mí amigos y casi hermanos, ustedes saben cuanto los quiero.

A mis pequeños y no tan pequeños sobrinitos, por aguantar a su tía cuando se ponía histérica y por darle sentido a mi vida, ustedes son una parte importantísima de mí.

A Victor Omar por estar siempre respaldándome y apoyándome incondicionalmente. Por prestarme su hombro para llorar y su mano para sostenerme en los peores momento de mi vida. A ti te debo gran parte de este trabajo y de mi carrera, siempre tuviste palabras de aliento cuando pensé en darme por vencida así que este triunfo tan importante en mi vida también es tuyo.

A *Rulo*, a tí debo agradecerte tantas cosas..... contigo compartí momentos muy especiales en mi vida y me has dado mucho mas de lo que te imaginas. Eres un ser maravilloso con el cual pase mucho tiempo en la facultad y tu siempre supiste como hacerme la vida mas divertida. Gracias por tu amistad y apoyo durante todo este tiempo.

Gracias muy especiales a Armando, Oscar, Klauss y Apolinar, ustedes me demostraron que son unas lindas personas con las que siempre puedo contar.

Gracias también a todas aquellas personas que se cruzaron por mi camino en la facultad y que sin duda dejaron una huella indeleble en mi vida. (Sergio, Rosa, Wen, Ernesto, Demetrio, Elvin, Jorge, Saúl, Toño, Micke, etc;) me seria imposible nombrarlos a todos, pero saben lo que los estimo.

ÍNDICE

1. RESUMEN DEL TRABAJO.....	1
2. ABREVIATURAS.....	3
3. INTRODUCCIÓN.....	5
3.1 Generalidades.....	5
3.2 Características bioquímicas y de cultivo.....	7
3.3 Importancia del estudio de <i>Escherichia coli</i>	8
3.3.1 Grupos diarreagénicos de <i>Escherichia coli</i>	8
3.3.2 Enfermedades extraintestinales causadas por <i>Escheichia coli</i>	14
3.4 Factores de virulencia.....	16
3.5 Métodos de tipificación bacteriana.....	19
3.5.1 Métodos fenotípicos.....	20
3.5.2 Métodos genotípicos.....	22
3.6 Serología.....	25
3.7 Antecedentes de la caracterización del flagelo.....	26
3.8 Flagelo.....	27
4. OBJETIVOS.....	32
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
5.1 Recuperación de las cepas.....	33
5.2 Conservación de las cepas.....	33
5.3 Identificación bioquímica de <i>Escherichia coli</i> mediante el sistema Vitek.....	54
5.4 Serología.....	35
5.4.1 Determinación de la movilidad.....	35
5.4.2 Tipificación serológica de <i>Escherichia coli</i> NT.....	35
5.4.3 Extracción del antígeno flagelar.....	36
5.4.4 Determinación del serogrupo H.....	38
5.5 Extracción del DNA.....	39
5.5.1 Evaluación del DNA aislado.....	39
5.6 Amplificación del gen <i>fliC</i>	40
5.6.1 Análisis de la calidad del amplificado del PCR.....	40
5.6.2 Digestión del gen <i>fliC</i> con la enzima <i>RsaI</i>	43

5.6.2.1 Análisis de la digestión enzimática.....	44
5.7 Purificación de los productos de PCR.....	44
5.8 Análisis y edición de las secuencias del gen <i>fliC</i>	45
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	46
6.1 Recuperación de las cepas.....	46
6.2 Identificación bioquímica mediante VITEK.....	48
6.3 Determinación del serogrupo H.....	50
6.4 Extracción del DNA.....	52
6.5 Amplificación del gen <i>fliC</i>	53
6.6 Digestión enzimática con la enzima <i>RsaI</i>	57
6.7 Análisis de la secuenciación del gen <i>fliC</i>	63
7. CONCLUSIONES.....	66
8. APENDICE I.....	68
9. APENDICE II.....	69
10. BIBLIOGRAFIA.....	70

1. RESUMEN DEL TRABAJO

Escherichia coli es un agente que se ha aislado de enfermedades infecciosas del tracto gastrointestinal, sistema urinario, circulatorio, respiratorio y sistema nervioso siendo esta especie de microorganismo parte de la flora normal, es importante identificar las variantes patogénicas de las no patógenas ya que pueden ser causa de brotes epidémicos. Dos componentes de superficie son la base para la identificación serológica: el antígeno O (LPS) y el antígeno H (flagelo). El gen *fliC* codifica para la proteína flagelina; principal componente del filamento flagelar bacteriano. Esta proteína tiene una estructura característica donde los extremos de la molécula son conservados mientras que la región central es variable y responsable de la diversidad antigénica. Aproximadamente el 10% de los aislamientos clínicos que se envían para tipificar al Laboratorio de Serología del Departamento de Salud Pública son “No Tipificables” (NT) debido a que dan reacción negativa con los 53 antisueros flagelares conocidos.

Este estudio pretende realizar la caracterización molecular del gen *fliC* en cepas de *Escherichia coli* No Tipificables por serología (H) y proponer una posible ampliación del esquema de tipificación flagelar.

El análisis comprendió 273 cepas de *Escherichia coli* NT procedentes del laboratorio de Referencia de Serología. La identificación se realizó en el equipo automatizado VITEK (VITEK 60, bioMérieux). El DNA se aisló con el kit QIAGEN. El gen *fliC* se amplificó por la técnica de la PCR y se sometió a corte de restricción con la enzima *RsaI* para comparar los patrones de corte (RFLP) determinados en el laboratorio para todos los serotipos flagelares. La secuencia completa del gen *fliC* se realizó por secuenciación automatizada del DNA. Las secuencias fueron comparadas con las reportadas en el GenBank.

Después de realizar un tamizaje de las 273 cepas, sólo 77 de ellas cumplieron con las características requeridas de las cepas NT. El gen *fliC* se logró amplificar en 59/77 de estos aislamientos NT. El análisis de los RFLPs y secuencia del gen *fliC*, permitió identificar 31 tipos flagelares reconocidos (grupo C). De las restantes; 15 fueron identificadas como un grupo cercano al serotipo H5 (grupo A), el análisis de la secuencia mostró un 99% de similitud con la de referencia; según el GenBank, pero en su RFLP con *Ddel* se vio variación al compararlo con el de las cepas de referencia, lo mismo sucede con las enzimas *HaeIII* y *HincII*. El análisis de la secuencia mostró que difiere de la cepa de referencia en 2 aa, lo que nos indica que estas cepas pueden corresponder a un subalelo de H5 y este cambio es suficiente para modificar la antigenicidad. Las 13 cepas restantes fueron identificadas con el gen *fliCH52* (Grupo B) presentando un patrón de corte diferente al de la cepa de referencia. Esto nos podría indicar al igual que en las cepas del grupo A la existencia de una variación subalélica. La secuencia mostró un 99% de similitud con diferencia en 1 aa; esta es suficiente para generar un RFLP diferente y como en el caso del grupo anterior una antigenicidad específica. Estos datos revelan que algunas cepas identificadas como "No Tipificables" pudieron ser tipificadas por serología y que la abundancia de las cepas que potencialmente representan nuevos tipos flagelares de *Escherichia coli* es baja en este lote de cepas analizadas; además este tipo de análisis puede ser utilizado como un control de calidad para las técnicas tradicionales de tipificación serológica. El análisis de los RFLP's y la secuencia completa del gen *fliC* en dos de nuestros grupos nos lleva a proponer la existencia de subalelos para los serotipos H5 y H52.

2. ABREVIATURAS

AE	Buffer de elusión
AW1	Buffer de lavado 1
AW2	Buffer de lavado 2
BHI	Medio de cultivo (Infusión de cerebro-corazón)
°C	Grados Celsius
CH	Colitis hemorrágica
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP's	Desoxirribonucleótidos trifosfato
ECEAgg	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
ECEI	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
ECEH	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
ECEP	<i>Escherichia coli</i> enteropatogena
ECET	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigenica
<i>fliC</i>	Gen que codifica para la flagelina de <i>Escherichia coli</i>
G -	Bacterias con tinción de Gram negativas
IgM	Inmunoglobulina M
ITU	Infecciones del tracto urinario
Lac +	Fermentador de lactosa
Lac -	No fermentador de lactosa
LPS	Lipolisacárido
LT	Toxina termolábil
mg	Miligramo

MgCl ₂	Cloruro de Magnesio
μL	Microlitro
mL	Mililitro
μm	Micrómetro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
NT	No Tipificables
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
RFLP	Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción
rpm	Revoluciones por minuto
SHU	Síndrome urémico hemolítico
ST	Toxina termoestable
TBE	Buffer de Tris-Boratos-EDTA
T _m	Temperatura de fusión
TSA	Agar de Soya y Tripticasa
UV	Luz ultravioleta

3. INTRODUCCIÓN

3.1 Generalidades

La familia Enterobacteriaceae es el grupo más grande y heterogéneo de bacilos gram negativos con importancia clínica. Se ha descrito un total de 32 géneros con más de 130 especies. Estos géneros se han clasificado según sus propiedades bioquímicas, estructura antigénica, estudios de hibridación y secuenciación de sus ácido nucleicos. A pesar de la complejidad de esta familia, menos de 20 especies son las responsables de más del 90% de las infecciones **(Murray, 1999)**.

La familia Enterobacteriaceae está constituida por una gran diversidad de microorganismos que se encuentran ampliamente distribuidos, en ella se incluyen tanto microorganismos de la vida libre (suelo, agua y vegetación) como de la flora autóctona del hombre y los animales (principalmente en intestino). Algunos de ellos están adaptados para vivir sólo en el humano y pueden producir una gran cantidad de enfermedades, encontrándose como responsables del 30 al 35% de las septicemias, más del 70% de las infecciones del tracto urinario (ITU) y diversas infecciones intestinales **(Wolfgang, 1996a)**.

Algunas enterobacterias se asocian siempre con alguna enfermedad, mientras que otras forman parte de la flora normal y pueden producir infecciones oportunistas (ej. *Escherichia coli*) dentro de la especie *Escherichia coli* existen cepas no patógenas y cepas patógenas (asociadas a gastroenteritis), estas últimas han adquirido por recombinación genética, genes que codifican factores de virulencia a partir de plásmidos, bacteriofagos o islas de patogenicidad.

Las infecciones por enterobacterias se pueden transmitir a partir de un reservorio animal, de un portador humano o de la diseminación endógena del microorganismo en un paciente susceptible, y pueden afectar a prácticamente cualquier parte del organismo **(Rodríguez, 2002)**.

Los miembros de esta familia son bacilos gram negativos de tamaño medio (0.3 a 1.0 x 1.0 a 6.0µm). Pueden ser móviles o inmóviles, con flagelos peritricos, y no forman esporas. Crecen rápidamente de forma aerobia o anaerobia (anaerobios facultativos) en medios enriquecidos (p.ej., agar sangre) y selectivos (p.ej., agar McConkey) **(Brener, 2005)**. La familia *Enterobacteriaceae* tiene requerimientos nutricionales sencillos: fermentan la glucosa, reducen los nitratos, son catalasa-positivos y oxidasa-negativos. La ausencia de actividad citocromo oxidasa es una característica importante, debido a que se puede medir mediante una prueba rápida (prueba de la oxidasa), que se utiliza para diferenciar a las enterobacterias de otros bacilos gram negativos fermentadores y no fermentadores **(Garza, 2003)**.

Los bacilos miembros de esta familia son capaces de causar enfermedades similares pero la epidemiología, la frecuencia, la gravedad y el tratamiento de estas enfermedades difieren para las distintas especies. Dentro de esta familia tenemos al género *Escherichia*, el cual comprende cinco especies: *Escherichia blataee*, *Escherichia coli*, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia hermannii* y *Escherichia vulneris*, siendo *Escherichia coli* la de mayor importancia clínica **(Koneman et al., 1985)**.

Escherichia coli fue descrita por primera vez por Theodor Escherich en el año de 1885 con el nombre de *Bacterium coli commune* aislado a partir de heces de infantes sanos, fue catalogado como un microorganismo comensal (no patógeno), aunque siempre generó sospechas de ser la responsable de enfermedades gastrointestinales. No fue hasta 1945 cuando Bray realizó un estudio para demostrar que *Escherichia coli* era en efecto un agente etiológico de la diarrea. *Escherichia coli* ha sido objeto de más investigación científica que cualquier otro microorganismo. Estudios subsecuentes han demostrado que ciertas cepas de *Escherichia coli* son patógenos intestinales importantes que causan una amplia variedad de enfermedades gastrointestinales **(Morris y Sojka, 1985)**.

3.2 Características bioquímicas y de cultivo

Escherichia coli se desarrolla bien en los medios de uso común. En los medios para aislamientos de bacilos entéricos la gran mayoría de las cepas aparecen como colonias fermentadoras de lactosa. Algunas cepas asociadas con infecciones del aparato urinario, pueden presentar hemólisis en agar-sangre **(Koneman et al., 1985)**.

Escherichia coli desarrolla bien en medios ricos como gelosa sangre y agar soya triptica, previa incubación de 24 horas a 35°C en condiciones tanto aerobias como anaerobias; sus colonias suelen ser blancas o grisáceas con dimensiones de 2 a 6 mm de diámetro, convexas de bordes regulares, aspecto húmedo y generalmente no hemolíticas en medios con sangre **(Brener, 2005)**.

Los medios más empleados para su aislamiento son selectivos y diferenciales (McConkey, EMB, Verde-Brillante, etc.), puesto que contienen inhibidores para bacterias gram positivas y adicionalmente, permiten diferenciar las colonias Lac+ y Lac- (**Garza, 2003**).

3.3 Importancia del estudio de *Escherichia coli*

Escherichia coli es un microorganismo comensal oportunista, este microorganismo comienza a colonizar el tracto gastrointestinal poco después del nacimiento, algunas cepas son patógenas y pueden producir infecciones entéricas (diarrea, disentería, colitis hemorrágica, síndrome urémico hemolítico, y otras de menor significancia clínica) o extraintestinales (infecciones del tracto urinario, septicemia, meningitis, peritonitis, mastitis e infecciones pulmonares y de heridas) (**Giono, 1994**). *Escherichia coli* provoca en los seres humanos cerca de 630 millones de casos de diarrea en el mundo y aproximadamente 775, 000 muertes al año, afectando principalmente a la población infantil de países subdesarrollados. Además de ser microorganismo oportunista frecuentemente asociado a infecciones de vías urinarias y septicemias en seres humanos (**Ryan, 2004**).

3.3.1 Grupos diarreagénicos de *Escherichia coli*

La diarrea es la manifestación clínica universal producida por diversos microorganismos, entre ellos se encuentran algunas cepas de *Escherichia coli* capaces de originar enfermedad intestinal (Tabla 1). La naturaleza de la diarrea varía según el mecanismo de patogenicidad. Las cepas patógenas de *Escherichia coli* se han englobado en diferentes

grupos; los cuales presentan mecanismos específicos de patogenicidad, con distintos serotipos y producen infecciones y síndromes diferentes. Dichos grupos son: *Escherichia coli* enterotoxigénica (ECET), *Escherichia coli* enteroinvasiva (ECEI), *Escherichia coli* enteropatogénica (ECEP), *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH), *Escherichia coli* enteroagregativa (ECEAgg) (Wolfgang y Joklik, 1996b).

Tabla 1. Resumen de infecciones producidas por los grupos diarreagénicos de *Escherichia coli*.

Grupo	Lugar de acción	Patología	Patogenia
ECET	Intestino delgado	Diarrea del viajero; diarrea infantil en países subdesarrollados; diarrea acuosa, espasmos abdominales, náuseas.	Enterotoxinas termoestables y/o termolábiles; mediadas por plásmidos, estimula la actividad guanilato o adenilato ciclasa con pérdida de líquidos y electrolitos.
ECEI	Intestino grueso	Fiebre, espasmos abdominales, diarrea acuosa seguida por cuadro disentérico con heces sanguinolentas escasas.	Invasión y destrucción de las células epiteliales que tapizan el colon mediadas por plásmidos.
ECEP	Intestino delgado	Diarrea infantil con fiebre, náuseas, vómitos, heces sin sangre.	Adherencia y destrucción de las células epiteliales mediada por plásmidos.
ECEH	Intestino grueso	Colitis hemorrágica con espasmos abdominales intensos, diarrea acuosa al principio, seguida por heces sanguinolentas, fiebre escasa o nula; síndrome urémico hemolítico (SHU).	Mediada por verotoxina citotóxica; mediada por bacteriofagos.
ECEAgg	Intestino delgado	Diarrea infantil persistente, a veces teñida con sangre, fiebre ligera.	Adherencia agregativa mediada por plásmidos de 60 MDa.

***Escherichia coli* enterotoxigénica (ECET).** A partir de los estudios de De y col. en 1956 en las que se observaron la distensión por edema de asas ligadas de intestino de conejos con ultrafiltrados de cultivos de ciertas cepas de *Escherichia coli*, (De et al., 1956) se demostró la capacidad para producir exotoxinas que al interactuar con las células epiteliales de la mucosa intestinal del hospedero, inducen aumento en la secreción de agua y electrolitos (Giono, 1994).

Las cepas que infectan a humano sintetizan las enterotoxinas LT (termolábil) y/o ST (termoestable) y poseen los factores de colonización CFA/I a CFA/IV, la enterotoxina LT es una proteína de peso molecular elevado, mientras que las termoestables son pequeños polipéptidos. Las enterotoxinas actúan incrementando la concentración de AMPc o GMPc en los enterocitos, lo que provoca una fuerte salida de agua y electrolitos al lumen intestinal **(Koneman et al., 1985)**.

***Escherichia coli* enteroinvasiva (ECEI).** Dupont en 1971 describió un grupo de cepas de *Escherichia coli* que provocan disentería en voluntarios, y que tenían la capacidad de invadir células del intestino grueso. Son pocos los estudios epidemiológicos en los que se ha estudiado el papel que juega ECEI. La mayor parte de los pacientes infectados desarrollan diarrea acuosa indistinguible de la provocada por otros grupos diarreagénicos de *Escherichia coli*. Solamente algunos pacientes presentan disentería, que se manifiesta con fiebre, moco y sangre en las heces. Las cepas de ECEI metabólicamente tienen características intermedias con el género *Shigella*, destaca su deficiente capacidad de utilizar lactosa y la carencia; en algunos casos de la expresión del flagelo que las hace inmóviles al igual que a las Shigellas. La relación estrecha entre *Escherichia coli* enteroinvasiva y *Shigella* no sólo se limita a su comportamiento bioquímico, sino que también se manifiesta en cuanto a sus características antigénicas y genéticas **(Morris y Sojka, 1985)**.

***Escherichia coli* enteropatógena (ECEP).** La identificación por serología de las cepas de *Escherichia coli* aisladas de casos esporádicos y brotes de diarrea en Estados Unidos e Inglaterra permitió, en la primera década de los años cincuenta asociar la diarrea infantil con un grupo de cepas de *Escherichia coli* pertenecientes a un limitado grupo de serotipos

a las que Neter denominó en 1955 *Escherichia coli* enteropatógenicos (ECEP) **(Neter et al., 1955)**. A pesar de que varios estudios realizados en la década de los cincuentas demostraron claramente que estas cepas eran capaces de producir diarrea, en los años setenta se demostró que las cepas de ECEP no producen enterotoxinas ni tienen capacidad enteroinvasiva, y se concluyó que dichas cepas no eran enteropatógenas. Hasta que Levine et al., en 1978 demuestra que las cepas EPEC no enterotoxigénicas ni enteroinvasivas, conservadas en el laboratorio durante más de siete años, todavía eran capaces de causar diarrea por mecanismos no conocidos **(Levine et al., 1978)**.

En los países en vías de desarrollo ECEP es considerada como una de las principales causas de diarrea infantil, predominando especialmente los serotipos O111:H12 y O119:H6 (Tabla 2). Las cepas de ECEP provocan una diarrea acuosa con dolores abdominales y fiebre moderada. Actualmente ya se conocen los mecanismos de patogenicidad de ECEP **(Rodríguez, 2002)**.

***Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH)**. El grupo enterohemorrágico propuesto por Levine en 1978, describe cepas de diferentes serotipos que presentan las mismas características clínicas, epidemiológicas y patogénicas que las del serotipo O157:H7, considerando a está como el prototipo del grupo **(Levine et al., 1978)**.

Posteriormente Tzipori utilizó un criterio más amplio para definir a este grupo, indicando la asociación de este grupo con la etiopatogenia de colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico. Las cepas causantes de estos cuadros tienen la capacidad para producir una o más citotoxinas **(Margall et al., 1997)**.

***Escherichia coli* enteroagregativa (ECEAgg).** Este grupo se han asociado con la diarrea infantil en países en vías de desarrollo, y están particularmente asociados con la diarrea persistente de más de 14 días de duración **(Rodríguez., 2002)** En países desarrollados no se han estudiado sistemáticamente, pero se sabe que se aíslan frecuentemente de niños y adultos con diarrea, provocando algunos brotes importantes y también pueden estar implicados en las diarreas crónicas que sufren pacientes infectados por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH).

Solamente algunos serogrupos de *Escherichia coli* son patógenos, y para ello debe conocerse la combinación de antígenos O:H. En la tabla 2 podemos observar los principales serogrupos patógenos de *Escherichia col.* **(Murray et al., 1999).**

Tabla 2. Serotipos asociados con *Escherichia coli* diarreagénicas (ONT: Antígeno somático No Tipificable; NM: cepas No Móviles)

ECET	ECEI	ECEP	ECEH		ECEAgg
O6: NM	O28:NM	O55:NM	O1:NM	O113:H21	O3:H2
O6:H16	O29:NM	O55:H6	O2:H6	O118:H2	O3:H3
O8:H9	O112:NM	O55:H7	O2:H7	O118:H12	O7:H-
O15:H11	O124:NM	O86:NM	O5:NM	O118:H16	O9:H10
O20:NM	O124:H7	O86:H34	O9:NM	O121:H19	O15:H1
O25:NM	O124:H30	O111:NM	O14:NM	O128:NM	O15:NM
O25:H42	O136:NM	O111:H2	O22:H5	O128:H2	O17:H18
O27:NM	O143:NM	O111:H12	O22:H8	O128:H45	O21:H21
O27:H7	O144:NM	O111:H21	O26:NM	O137:H41	O25:H9
O27:H20	O152:NM	O114:NM	O26:H11	O145:NM	O44:H18
O49:NM	O164:NM	O114:H2	O45:H2	O153:H2	O51:H11
O63:H12	O167:NM	O119:H6	O48:H21	O153:H25	O77:H18
O78:H11	ONT:NM	O125:H21	O50:H7	O157:NM	O78:H2
O78:H12		O126:NM	O55:H7	O157:H7	O78:H10
O128:H7		O126: H27	O79:H7	O163:H19	O85:H10
O148:H28		O127:NM	O83:H1	O165:NM	O86:H2
O153:H45		O127:H6	O91:NM	O165:H25	O86:H18
O159:NM		O127:H9	O91:H10	O172:NM	O92:H33
O159:H4			O91:H21	ONT:NM	O104:NT
O159:H20			O103:H2		O111:H21
O167:H5			O104:NM		O125:H9
O169:H41			O104:H21		O125:H21
			O111:NM		O127:H2
			O111:H2		O153:H2
			O111:H8		ONT:NM

3.3.2 Enfermedades extraintestinales causadas por *Escherichia coli*

Infecciones del tracto urinario (ITU). La mayoría de los bacilos gram negativos que producen ITU son parte de la flora normal del colon, contaminan la uretra, ascienden hasta la vejiga, y pueden migrar hasta el riñón o la próstata. La ITU es una infección ascendente, en contraposición con la infección producida por la diseminación hematógica del microorganismo hasta el tracto urinario. Aunque la mayoría de las cepas de *Escherichia coli* pueden producir ITU, la enfermedad es más frecuentemente causada por algunos serogrupos específicos. Estas cepas uropatógenas son especialmente virulentas por su capacidad para producir adhesinas que se unen a las células que recubren la vejiga y el tracto urinario superior y una hemolisina que lisa los eritrocitos y otros tipos celulares (llevando a la liberación de citosinas y a la estimulación de una respuesta inflamatoria) **(Wolfgang, 1996b).**

A este nivel pueden presentarse diversas infecciones, desde cistitis simple hasta infección total de las vías urinarias, que incluyen a la pelvis renal y al riñón (pielonefritis). Uno de los síntomas primarios de la cistitis es la micción frecuente, que tiene una calidad de dolor y ardor. En caso de la pielonefritis, hay fiebre, malestar general y dolor en el flanco. La cistitis suele ser autolimitada, pero la infección de las vías urinarias superiores entraña el riesgo de difundirse hacia la sangre siendo la causa principal de sepsis o choque séptico producido por microorganismos gram negativos **(Murray, 1999).**

Escherichia coli produce hasta el 90% de los más de siete millones de casos de cistitis y 250 000 de pielonefritis que se estima ocurren cada año en Estados Unidos. Las ITU son más frecuentes en las mujeres, y 40% de las que las sufren tienen una crisis durante su vida, por lo general cuando son sexualmente activas. El reservorio para esta infección por *Escherichia coli* es la propia flora intestinal de la paciente, que contamina las regiones perineal u uretral **(Riley, 2004)**.

Septicemia. De forma característica, la septicemia producida por bacilos gram negativos como *Escherichia coli* se origina de infecciones del tracto urinario o digestivo. La mortalidad que se asocia a la sepsis por *Escherichia coli* es elevada en pacientes cuya inmunidad está comprometida, o los casos en que la infección primaria está en el abdomen o en el sistema nervioso central **(Morris y Sojka, 1985)**.

Meningitis neonatal. *Escherichia coli* es el agente causal más frecuente de la meningitis neonatal, muchas características son semejantes a las de la enfermedad producida por Estreptococos del grupo B. *Escherichia coli* coloniza al lactante vía vaginal a causa de la rotura de las membranas amnióticas o durante el parto **(Murray, 1999)**. Desde luego, también influye la capacidad de los anticuerpos maternos protectores del grupo de la inmunoglobulina M (IgM) para cruzar la placenta, así como la susceptibilidad especial del neonato. Más del 75% de los casos se debe a cepas que poseen el polisacárido capsular K1, que contiene ácido siálico y es idéntico desde el punto de vista estructural al polisacárido capsular del serogrupo B de *Neisseria meningitidis*, causante también de meningitis **(Morris y Sojka, 1985)**.

Síndrome urémico hemolítico (SHU). Esta enfermedad es más común en los niños y se presenta frecuentemente después de una infección gastrointestinal (entérica), causada por un serotipo específico de *Escherichia coli* (*Escherichia coli* O157:H7). También se ha asociado a otras infecciones entéricas, incluyendo las causadas por Shigella y Salmonella y algunas infecciones no entéricas. Se encuentra principalmente en carnes de ganado vacuno y porcino, y en lácteos contaminados. Si la carne no está bien cocida, la bacteria sobrevive y entra a través de la vía digestiva, se anida en el colon y libera una toxina que destruye las células. La toxina pasa al torrente sanguíneo y daña los glóbulos rojos, produce anemia hemolítica y daño en los riñones provocando uremia, y, en los casos más graves, ataca las células cerebrales. Los niños pueden tener convulsiones y entrar en coma. Es una enfermedad que afecta principalmente al riñón llegando a causar insuficiencia renal, con otras alteraciones en la sangre, especialmente en los glóbulos rojos y plaquetas y en menor medida otros órganos como el hígado y cerebro (**Schmidt et al., 1999**).

Colitis hemorrágica (CH). Otra de las enfermedades que produce el serotipo O157:H7 es la colitis hemorrágica la cual es un tipo de gastroenteritis en la que *Escherichia coli* infecta el intestino grueso y produce toxinas que dañan el revestimiento de la mucosa y causan una diarrea súbita con sangre y a veces otras complicaciones graves pasando a flujo sanguíneo y afectando otro órganos como el riñón (**Sussman, 1985**).

3.4 Factores de virulencia

La virulencia bacteriana es un fenómeno multifactorial, *Escherichia coli* posee diferentes tipos de factores de virulencia que contribuyen conjuntamente a potenciar su patogenicidad **(Blanco et al., 1995)**.

Endotoxina. La endotoxina es un factor de virulencia que comparten todas las bacterias gram negativas aerobias y algunas anaerobias. La actividad de esta endotoxina depende del componente lípido A del lipopolisacárido bacteriano, que se libera en la lisis celular **(Blanco et al., 1995)**. Muchas de las manifestaciones sistémicas de infecciones por bacterias gram negativas se dan por la endotoxina, entre ellas: activación del complemento, liberación de citocinas, leucocitosis, coagulación intravascular diseminada, fiebre, disminución de la circulación periférica, shock y muerte **(Murray, 2002)**.

Cápsula. Las enterobacterias capsuladas se protegen de la fagocitosis mediante los antígenos capsulares hidrofílicos, que repelen la superficie hidrofóbica de la célula fagocítica **(Brener, 2005)**. Estos antígenos interfieren con la unión de los anticuerpos a las bacterias y son poco inmunógenos o poco activadores del complemento. Sin embargo, el papel antifagocítico de la cápsula se ve disminuído si el paciente desarrolla anticuerpos anticapsulares específicos **(Murray, 2002)**.

Variación de fase antigénica. La expresión del antígeno capsular K y del flagelar H están bajo control genético del microorganismo. Cada uno de estos antígenos pueden expresar alternativamente dos fases o no expresarse (variación de fase), una característica que protege a las bacterias de la muerte celular mediada por anticuerpos.

Sistema de secreción tipo III. Distintas bacterias (Yersinia, Salmonella, Shigella, Escherichia, Pseudomonas, Chlamidia) tienen el mismo efector para transportar sus genes de virulencia a las células diana. Este sistema, conocido como el sistema de secreción tipo III, está formado por alrededor de 20 proteínas que facilitan la secreción de los factores de virulencia bacterianos a las células huésped. Aunque los factores de virulencias y sus efectos son diferentes en los distintos bacilos gram negativos, el mecanismo general por el que se introducen los factores de virulencia es el mismo. En ausencia del sistema de secreción tipo III, las bacterias pierden su virulencia. **(Wolfgang, 1996a).**

Secuestro de los factores de crecimiento. En los medios de cultivo enriquecidos se les proporcionan nutrientes a los microorganismos, pero cuando crecen *in vivo*, las bacterias tienen que competir por los nutrientes. El hierro es un importante factor de crecimiento para las bacterias, (en el humano el hierro está unido a las proteínas hemo o a las proteínas quelantes del hierro). Las bacterias contrarrestan esta unión mediante la producción de sus propios compuestos que compiten en la quelación del hierro. El hierro se puede liberar también desde las células del huésped mediante hemolisinas producidas por las bacterias **(Murray, 1999).**

Resistencia al efecto bactericida del suero. Mientras que muchas bacterias se pueden eliminar rápidamente de la sangre, los microorganismos virulentos que son capaces de producir infecciones sistémicas son con frecuencia resistentes a la capacidad bactericida del suero. Aunque la cápsula bacteriana puede proteger a los microorganismos de este efecto bactericida, hay otros factores de virulencia que evitan la unión de los componentes del complemento a las bacterias y la posterior eliminación mediada por el complemento **(Blanco et al., 1995).**

Resistencia antimicrobiana. Con la misma rapidez con la que se introducen nuevos antibióticos, los microorganismos desarrollan resistencia a estos. Esta resistencia puede estar codificada en plásmidos o transposones transferibles e intercambiables entre especies, géneros e incluso familias de bacterias **(Blanco et al., 1995)**.

3.5 Métodos de tipificación bacteriana

Los métodos de tipificación se dividen en dos amplias categorías: fenotípicos y genotípicos (Tabla 3) **(Zhang, et al., 2000)**. Los primeros son aquellos que caracterizan los productos de la expresión génica para diferenciar las cepas, estudiando sus propiedades bioquímicas, antigénicas, sensibilidad a fagos y a antimicrobianos. Estas propiedades, tienden a variar con las condiciones de cultivo, fase de crecimiento, y ocurrencia de mutaciones espontáneas, debido a que son el resultado de la expresión génica **(Wang et al., 2003)**.

Por otra parte, los métodos genotípicos están basados en el análisis de la estructura genética de un organismo, e incluyen polimorfismos en los patrones de restricción del DNA con endonucleasas, perfiles de amplificación génica, análisis de secuencias y perfiles plásmidicos. Estos métodos están menos sujetos a variación natural, aunque pueden afectarse por inserciones o deleciones de DNA extracromosomal o mutaciones espontáneas que puedan cambiar la secuencia del DNA.

Tabla 3. Métodos más comunes de tipificación bacteriana

Métodos fenotípicos	Métodos genotípicos
Biotipificación	RAPD
Identificación BQ	E. campos pulsados
Sensibilidad a antimicrobianos	PCR-RFLP
Fagotipificación	Ribotipificación
Serología	PCR

3.5.1 Métodos fenotípicos

La aplicación de los métodos tradicionales de la tipificación bacteriana juega un rol esencial en la investigación epidemiológica y en el estudio de brotes causados por un mismo serotipo. En el caso de *Salmonella* y *Escherichia coli* la aplicación de estos métodos ha sido de gran utilidad.

Biotipificación. La identificación bioquímica de las bacterias clínicamente significativas aisladas de procesos infecciosos, es una herramienta fundamental para un manejo eficiente del paciente infectado. La rapidez en el diagnóstico y el tratamiento reduce no solo la morbi-mortalidad sino también la propagación de la infección.

Durante las últimas décadas se han desarrollado aparatos automatizados que permiten obtener resultados preliminares de identificación y sensibilidad en un período que oscila entre 2 y 7 horas comparado con los 5 a 7 días que habitualmente demoran los métodos tradicionales. El sistema VITEK (VITEK 60, bioMérieux) es un sistema automatizado de identificación bacteriana y determinación de sensibilidad antimicrobiana. La identificación de las bacterias se basa en la inoculación de una suspensión del microorganismo en tarjetas con diferentes paneles de reacciones bioquímicas (Apéndice II). La sensibilidad antimicrobiana se lleva cabo de manera similar a través de tarjetas que contiene diluciones estandarizadas (**Jordá et al., 2005**).

En algunos casos, sienta una base de conocimiento para dirigir la investigación epidemiológica con otros métodos como serotipificación, por ejemplo, en el caso de cepas de *Escherichia coli* negativas a la descarboxilación de la lisina, para la búsqueda de serotipos pertenecientes a ECEI, o las cepas negativas a la fermentación del sorbitol que orientan a la búsqueda de cepas de ECEH O157:H7 (**Van Belkum et al., 2001**).

Sensibilidad a antimicrobianos. La tipificación por perfiles de sensibilidad antimicrobianos es de bajo poder discriminatorio, ya que la resistencia a antimicrobianos muchas veces es codificada por plásmidos que son fácilmente transferibles entre cepas y dependen de factores de selección para su estabilidad, por lo que a veces se pierden en los cultivos. Por esto no es viable esta determinación para ser utilizada como único método de tipificación (**Murray et al., 1999**).

Fagotipificación. La fagotipificación implica la caracterización de cepas basada en la susceptibilidad a la infección por un panel definido de bacteriófagos. Resulta un método con importante poder discriminatorio, aunque ha sido demostrado que ciertos fagotipos pueden cambiar debido a procesos como la adquisición de plásmidos de resistencia o transposones **(Wolfgang., 1996a)**.

Serología. La serotipificación es uno de los métodos clásicos utilizados para el estudio epidemiológico de muchas especies bacterianas. Para estudios de *Escherichia coli* continua siendo un método clave para su tipificación. La principal limitante consiste en mantener el stock de antisueros necesarios. Esta técnica es descrita más adelante debido a la importancia para este estudio **(Gross y Rowe., 1985)**.

3.5.2 Métodos genotípicos

En los últimos 30 años se han desarrollado una gran variedad de sistemas genotípicos para la caracterización de cepas, que permiten de forma rápida y sencilla obtener, a partir del análisis de DNA, resultados acerca de las cepas de nuestro interés **(Wang et al., 2003)**.

Entre ellas podemos mencionar:

PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). La reacción en cadena de la polimerasa, ha sido utilizada durante mucho tiempo para la detección directa de varios agentes infecciosos en muestras clínicas, ha sido adaptada como herramienta de tipificación. La PCR permite reproducir millones de copias de un segmento de DNA con alta fidelidad en aproximadamente 3 horas. El procedimiento requiere de un molde de DNA, dos

oligonucleótidos que flanquean la secuencia a ser amplificada y una enzima DNA polimerasa estable al calor. En cada ciclo se generan dos nuevas copias de DNA doble cadena a partir del molde original por lo que luego de 30 ciclos pueden sintetizarse teóricamente un billón de copias **(Dieffenbach., 1995)**.

RAPD (Random Amplification Polymorphic DNA). Es una PCR en la que se utiliza oligonucleótidos arbitrarios y de tamaño corto (típicamente de 10 pb), el cual por requerir baja temperatura de hibridación se une a múltiples sectores del cromosoma bacteriano iniciando en diferentes sitios la síntesis de DNA **(Vogel et al., 2000)**. Cuando un oligonucleótido se une en la cadena complementaria, se sintetiza un fragmento de DNA que será amplificado en los ciclos posteriores. Los productos de la amplificación consisten en una variedad de fragmentos que varían de tamaño y pueden ser separados y visualizados por electroforesis en gel de agarosa **(Dieffenbach., 1995)**.

PFGE (Electroforesis en campo pulsado). Es un sistema de electroforesis en gel de agarosa que permite separar fragmentos de DNA de mayor tamaño que la electroforesis tradicional. Esto es posible gracias a que se utilizan 3 sets de electrodos distribuidos hexagonalmente alrededor del gel, que aplican corriente primero desde uno de los sets de electrodos, luego desde el segundo en un corto período de tiempo (pulsado) y luego desde el tercero **(Olive y Bean., 1999)**. Esto causa que el DNA se mueva en el gel hacia delante y hacia atrás consecutivamente aumentando el poder de la resolución de la electroforesis y permitiendo separar fragmentos de más de 1000 Kb. El genoma bacteriano, que contiene entre 2000 y 5000 Kb es cortado con enzimas de restricción que reconozcan un bajo número de sitios de corte, generando entre 10 y 30 fragmentos. Todas las especies son tipificables por esta técnica (PFGE) **(Tenover et al., 1995)**.

Detección mediante la secuenciación del gen *fliC*. La secuenciación de ácidos nucleicos para la identificación y tipificación de la bacteria es una herramienta de la biología molecular de mucha precisión y utilidad, es una técnica bastante discriminatoria y con un rango de confiabilidad muy elevado. Para *Escherichia coli* determinar la secuencia de la región central del gen *fliC* nos permite identificar el serotipo flagelar al que corresponde, esta región es altamente polimórfica y característica de cada serotipo H, siendo de esta manera como una huella digital. Hoy en día se conoce la secuencia completa del gen *fliC* para los 53 serotipos flagelares (**Whittam y Reid, 1999**).

La secuenciación de los ácidos nucleicos se realiza mediante la amplificación del gen *fliC* con un par de oligonucleotidos, posteriormente son purificados y sometidos a una secuenciación automatizada (**Schoenhals y Withfield, 1993**).

Tipificación mediante PCR-RFLP's. Fields y cols., desarrollaron una técnica para la identificación y caracterización del gen *fliC* (**Fields et al., 1997**). La técnica consiste en someter el producto de amplificación del gen *fliC* a un corte de restricción con la endonucleasa *Rsal*, obteniendo un patrón de corte (RFLP) que permite identificar el respectivo antígeno H (**Dauga et al., 1998**). Esta técnica es sencilla y permite suplir algunas deficiencias de la serología convencional, además de que puede realizarse en cualquier laboratorio que cuente con un termociclador (**Dávila et al., 2003**). Machado en el año 2000 publicó un trabajo similar al de Fields, manejando la enzima *HhaI*, en la que al igual que con la enzima *Rsal* se encontró una buena correlación entre los RFLP's obtenidos y los serotipos flagelares H (**Machado et al., 2000**).

3.6 Serología.

Los antígenos O, K y H son empleados en la clasificación de *Escherichia coli* en múltiples serotipos que se designan con el número y la letra del antígeno específico. Esta nomenclatura antigénica se limita a las estructuras disponibles, ya que algunas especies carecen de cápsula, flagelo o ambas estructuras (**Gross y Rowe, 1985**).

En 1947 Kauffman propone una forma de diferenciar las cepas de *Escherichia coli* con base a la determinación de los antígenos superficiales O (somáticos), K (capsulares) y H (flagelares) (**Vogel et al, 2000**). Esta forma de clasificación serológica resultó muy útil en los estudios epidemiológicos y de patogénesis de *Escherichia coli*, facilitando la diferenciación entre cepas patógenas y no patógenas (**Gross y Rowe, 1985**).

El antígeno O es un polisacárido termoestable que forma parte del lipopolisacárido (LPS) presente en la membrana externa de la pared celular. El antígeno K es un polisacárido capsular que envuelve a la pared celular y enmascara al antígeno O inhibiendo su aglutinación. Existen dos tipos de antígenos K (KA y KL) que se inactivan al ser calentados. Por último, los antígenos flagelares H son de naturaleza proteica y son termolábiles, de forma que se inactivan al calentarlos a 100°C por 30 minutos. Actualmente se reconocen 173 antígenos O (O1 a O181), 72 antígenos K (K1 a K103) y 53 antígenos H (H1 a H56) y aunque existen numerosas combinaciones de los serotipos O:K:H, tan sólo son algunas las reconocidas como cepas patógenas. La determinación de los antígenos O y H se realiza por técnicas de aglutinación, mientras que la identificación del antígeno K es recomendable que se realice por contraelectroforesis (**Gross y Rowe, 1985**).

3.7 Antecedentes de la caracterización del flagelo

La historia de la tipificación de *Escherichia coli* se remonta al año de 1945 cuando Bay realiza por primera vez un estudio en una epidemia en infantes con diarrea, y describe a esta bacteria como al agente etiológico responsable de esta epidemia, además de que descubre que todas las cepas aisladas de las heces de los niños enfermos correspondían al serogrupo O111. Esto fue la base para que Kauffman en el año de 1947 propusiera por primera vez una forma de diferenciar las cepas de *Escherichia coli* patógenas de las no patógenas basada en la serotipificación de los antígenos superficiales somático O, flagelar H y capsular K. La necesidad de encontrar técnicas más sencillas y que implicaran menor tiempo llevaron a realizar diversos estudios sobre la caracterización de *Escherichia coli* (Vogel et al., 2000), en el año de 1977 Lawn describe la comparación de los diferentes morfotipos flagelares de *Escherichia coli* por medio de microscopía electrónica, observó una considerable variación en la estructura superficial de los diferentes serotipos y propone la existencia de seis morfotipos (A, B, C, D, E y F) (Lawn, 1977). En el año de 1986 Kuwajima describe las secuencias de aminoácidos de la región terminal del gen flagelar *fliC*, (Kuwajima et al., 1986) desde hace mucho tiempo se ha estudiado el flagelo bacteriano. Más adelante Schoenhals publicó un análisis de la secuencia de la flagelina y describió el polimorfismo del gen *fliC* en la región central de la molécula y mostró que los extremos de esta son altamente conservados (Kanto et al., 1991. Schoenhals y Whitfiel, 1993). En estudios más recientes Lei Wang con la ayuda de técnicas moleculares (PCR y secuenciación automatizada) describió la secuencia completa de los alelos del gen *fliC* en cepas de *Escherichia coli* (Wang et al, 2003). Se han realizado también estudios para tratar de facilitar la caracterización del gen *fliC* o y poder brindar una herramienta alterna a los

laboratorios que no cuentan con la infraestructura para realizar una serotipificación convencional. Machado describió la tipificación del gen flagelar mediante cortes de restricción con la endonucleasa *HaeIII* del producto amplificado del gen *fliC*, y creó una base de datos de los RFLP obtenidos **(Machado et al., 2000)**.

Los RFLP están íntimamente relacionado con los diferentes serotipos flagelares H, en este estudio logró tipificar cepas de *Escherichia coli* no móviles que al no expresar el flagelo no pueden ser tipificadas por serología. Un poco mas adelante Rita Prager realiza una investigación similar a la de Machado y reporta los patrones de RFLP's obtenidos al someter el amplificado del gen con la enzima de restricción *RsaI* **(Prager et al, 2003)**. Esta última técnica es la más utilizada hoy en día, y permite diferenciar con un alto grado de confiabilidad los diferentes alelos del gen y una excelente correlación con los 53 serotipos flagelares

Las técnicas de biología molecular se han desarrollado de manera rápida con el objetivo de facilitar cada vez más las técnicas de tipificación bacteriana y poder diferenciar las cepas no patógenas de las que si lo son, sustituyendo así las técnicas fenotípicas **(Ryan, 2004)**.

3.8 Flagelo

La estructura del flagelo es bastante conservada en procariontes, se observan tres partes diferenciadas: 1) Filamento helicoidal largo, que es la única parte visible a microscopía óptica; esta conectado a un corto segmento curvado denominado 2) Codo o gancho, que a su vez esta unido al 3) Corpúsculo basal (Figura 1). El corpúsculo basal esta inmerso en la membrana citoplasmática y en la pared celular. Se a dicho que el papel del flagelo bacteriano es el de dar movilidad a la bacteria pero actualmente se encuentran realizando

estudios en *Salmonella enterica* serovar typhimurium en la que se trata de demostrar la contribución del flagelo bacteriano a la virulencia de la bacteria, si esto logrará demostrarse podría resaltar aún con mayor fuerza la importancia de caracterizar el flagelo bacteriano y distinguir de la cepas patógenas de las que no lo son. (Macban, 1996)

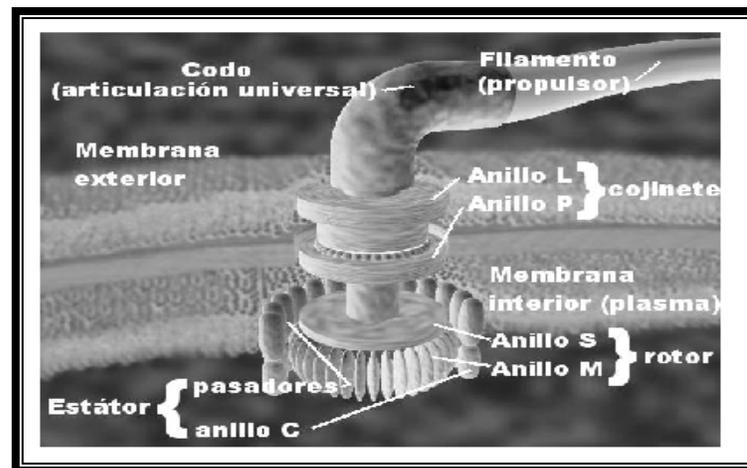


Figura 1. Estructuras más importantes del flagelo en bacterias gram negativas

Filamento. El filamento es la parte visible del flagelo y representa hasta el 95% de la masa total de éste. Es de longitud variable pero su diámetro está bien definido que es de 20 nm. Los flagelos están compuestos de sólo un tipo de proteína denominada flagelina. La flagelina de la bacteria es una proteína globular elongada, con pesos moleculares variados, según la especie; desde unos 15 kDa en algunos *Bacillus* hasta unos 62 kDa en algunas enterobacterias (Macban, 1996). Tanto la flagelina nativa aislada como los filamentos intactos son buenos antígenos, constituyendo el llamado antígeno flagelar H, específico para cada especie. En enterobacterias la porción central del gen *fliC* (flagelina) es altamente variable, lo cual parece representar una respuesta evolutiva de tipo adaptativo, que les permite enfrentarse mejor al sistema inmune de sus hospedadores, esta región de la molécula se encuentra expuesta de forma que representa la parte antigénica (Figura 2). Las células flageladas reaccionan *in vitro* con antisueros específicos, dando una

aglutinación bastante típica (serotipificación). Esta reacción de aglutinación es empleada en la caracterización de serotipos de *Escherichia coli* (**Macban, 1996**).

Codo o gancho. Es una estructura curva de unos 80 nm de longitud y unos 22 nm de diámetro, que conecta el filamento al corpúsculo basal, compuesto de una proteína elongada distinta a la flagelina (Figura 2). El codo actúa a modo de juntura universal o flexible entre el filamento y el corpúsculo basal. Entre el codo y el filamento existen dos discos de proteínas accesorias del codo (HAP1 y HAP3). Cada uno de los discos consiste en dos giros de hélice, e intervienen en el control del ensamblaje del flagelo. Son estructuras adaptadoras que permiten la correcta interacción entre el filamento y el codo. (**Macban, 1996**)

Corpúsculo basal. Estructura que está inmersa en la membrana citoplasmática y la pared celular, ancla el filamento flagelar a la célula y se relaciona con la función del motor. En bacterias gram negativas la estructura típica consta de dos pares de anillos atravesados por un cilindro. Los 2 anillos se denominan L y P, y están relacionados con la membrana externa y el peptidoglucano respectivamente. Estos 2 anillos están conectados por una pared cilíndrica que enmascara la porción del cilindro central. Los 2 anillos interiores denominados S y M, están conectados al corpúsculo basal donde se localizan varias proteínas importantes en la función del motor y para el sentido del giro (**Macban, 1996**)

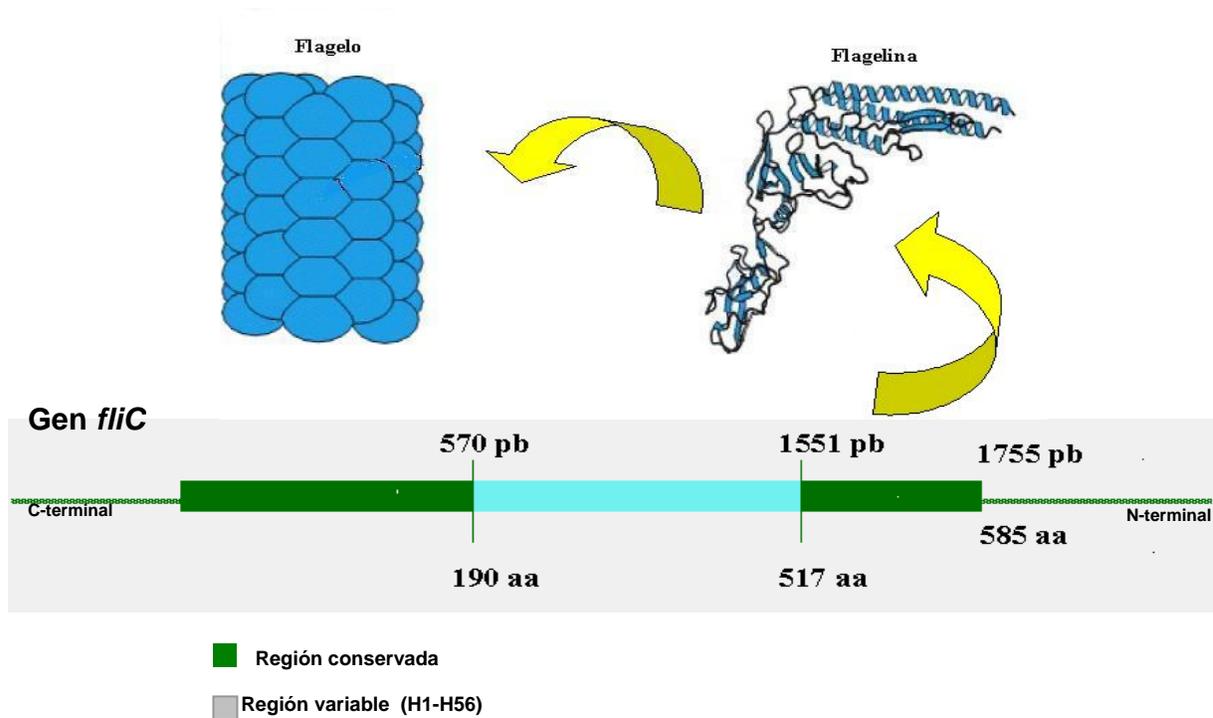


Figura 2. Representación esquemática del gen *fliC* que codifica para la proteína flagelina.

Como se describió anteriormente, podemos darnos cuenta de la importancia que representa la identificación temprana de serotipos, está es de importancia clínica, taxonómica y epidemiológica. Los métodos actualmente disponibles y utilizados para detectar y serotipificar a las bacterias se han desarrollado muy rápido en los últimos años. Las técnicas fenotípicas y genotípicas nos ayudan a tener un resultado certero con un margen de error cada vez más pequeño; un ejemplo claro es la caracterización del gen flagelar en *Escherichia coli*, hasta hace algunos años las cepas “No Móviles” y “No Tipificables” por serología no podían ser caracterizadas, hoy en día existen publicaciones en las que se ha podido caracterizar el gen flagelar de las cepas NM con ayuda de técnicas moleculares, tomando como base estas publicaciones, nuestro interés se centra en el

estudio de una población de cepas NT; estas cepas son de particular interés, debido a que podrían representar un alelo nuevo del gen *fliC* ya que no se lograron tipificar mediante la serología convencional, esto nos estaría dando la pauta para estudiar la presencia de modificaciones importantes en la secuencia del gen *fliC* que modifican la antigenicidad de la proteína flagelina y por ello es que no son reconocidas por los sueros específico de ninguno de los 53 serotipos flagelares identificados hoy en día.

4. OBJETIVOS

Objetivo general

Caracterizar por técnicas de biología molecular el gen flagelar *fliC* en cepas de *Escherichia coli* identificadas como No Tipificables por pruebas de tipificación serológica.

Objetivos específicos

- Determinar el gen *fliC* por técnicas convencionales y por técnicas de biología molecular en cepas de *Escherichia coli* No Tipificables.
- Establecer los patrones de restricción del gen *fliC* que presentan las cepas de *Escherichia coli* No Tipificables.
- Demostrar la presencia de nuevas variantes flagelares mediante el análisis de la secuencia del gen *fliC* en cepas de *Escherichia coli* NT
- Proponer una posible ampliación al esquema de tipificación flagelar de *Escherichia coli*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

En el presente estudio se trabajo con una cantidad de 273 cepas de *Escherichia coli* identificados previamente como NT por serología del antígeno flagelar. Las cepas provinieron del laboratorio de serología del Departamento de Salud Pública.

5.1 Recuperación de las cepas

Las cepas fueron proporcionadas por el laboratorio de serología, este laboratorio cuenta con un cepario, cuyo medio de conservación es el medio Dorsett a temperatura ambiente. La recuperación se realiza mediante una resiembra en un medio rico como la gelosa sangre con el objetivo de permitir un desarrollo masivo de la cepa, posteriormente es resembrada en un medio selectivo para bacterias gram negativas como agar MacConkey para asegurar que la cepas que vamos a manejar se encuentre libre de contaminación.

5.2 Conservación de las cepas

Es importante contar con una de las cepas a trabajar, que permita tener al microorganismo en condiciones óptimas para poder disponer de él en cualquier momento. Para este estudio las cepas recuperadas fueron conservadas en un caldo de BHI con glicerol al 15%, el cual se incubó a una temperatura de 37°C por dos horas para permitir el crecimiento. Transcurridas el tiempo de incubación las cepas se almacenan a una temperatura de – 72°C.

5.3 Identificación bioquímica de *Escherichia coli* mediante VITEK

La identificación bioquímica de la bacteria es necesaria para corroborar que la cepa de interés sea *Escherichia coli* y no otra enterobacteria. La identificación se realizó mediante el equipo automatizado VITEK (VITEK 60, BioMérieux®) el cual se basa en la inoculación de una suspensión de microorganismos en tarjetas con 30 paneles de reacciones bioquímicas. La utilización de este sistema nos permite tener resultados confiables y con mayor rapidez que con los tradicionales de identificación bioquímica (**Jordá et al., 2005**).

La determinación mediante el sistema VITEK se realiza de acuerdo al siguiente procedimiento:

1. Sembrar la bacteria a identificar en placas de agar MacConkey y Gelosa sangre con el objetivo de determinar pureza de la cepa.
2. Una vez verificada su pureza se resiembra en una placa de agar soya y trpticasa (TSA). El cultivo con el cual se va a trabajar tiene que ser de 24 hr de desarrollo.
3. A partir de la placa de TSA se ajusta en una solución salina una suspensión correspondiente al tubo 0.5 en la escala de MacFarland, con la ayuda un colorímetro (Vitek colorimeter pr-100®, Harch company).
4. Llenar las tarjetas con la suspensión antes elaborada.
5. Meter las tarjetas al equipo y esperar de 2 a 4 horas para poder tener un resultado.
6. Transcurridas 8 hr se almacenan los resultados en el software del equipo.

5.4 Serología

5.4.1 Determinación de la movilidad

Esta determinación es necesaria para demostrar que en la bacteria esta presente y se expresa el gen flagelar. Esta prueba se lleva acabo en un medio semisólido para movilidad (Apéndice 1) y requiere de una incubación de por lo menos 14 días a una temperatura de 50°C en una atmósfera húmeda. (Figura 3)

1. Tomar una colonia pura a partir del medio TSA e inocular en el tubo con medio semisólido; el cual esta adaptado con un tubo de vidrio en el centro dentro del cual se realiza la inoculación.
2. Incubar a 50°C por lo menos 14 días y revisar el desarrollo.
3. Revisar los tubos bajo la luz de una lámpara para determinar si las cepas son o no móviles. La movilidad se observa a manera de ramificaciones e incluso se puede observar la formación de una nata blanca en la superficie del medio fuera del tubo (Figura 3). Se debe observar la migración de la bacteria.

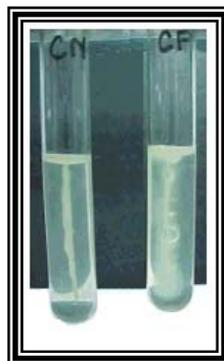


Figura 3. Imagen de la prueba de movilidad para las cepas de *Escherichia coli* NT; donde CN es el control negativo y CP es el control positivo.

5.4.2 Tipificación serológica de *Escherichia coli* NT

Se realizó una tipificación serológica reciente con el objetivo de comprobar que las cepas recuperadas correspondían a cepas NT; es decir, que no reaccionaban con ninguno de los 53 antisueros reconocidos (**Vogel et al., 2000**). La determinación de los antígenos H se hizo por aglutinación en microplaca con antisueros específicos hiperinmunes de conejo. Los antígenos H fueron preparados para todas las bacterias móviles en caldo biotriptasa a 37°C y se examinaron después de adicionar formalina para tener una concentración final de 0.5%. El test de aglutinación se realizó en microplacas con fondo en U usando los 53 antisueros H en diluciones 1:100. (**Kauffman, 1947**).

La lectura de la aglutinación se realizó a las 4 horas después de una incubación en atmósfera húmeda a 50°C.

5.4.3 Extracción del antígeno flagelar

Seguido de la determinación de la movilidad se preparó el antígeno flagelar para poder enfrentarlo con los 53 antisueros flagelares conocidos.

1. Una vez que se determinó que la bacteria era móvil, se sembró la cepa en medio líquido de biotriptasa y se incubó a 37°C por 24 horas.
2. Transcurridas las 24hrs de incubación se aforó el tubo con solución de formalina al 0.5%.
3. Posteriormente se enfrentó con los sueros para la determinación del antígeno flagelar.

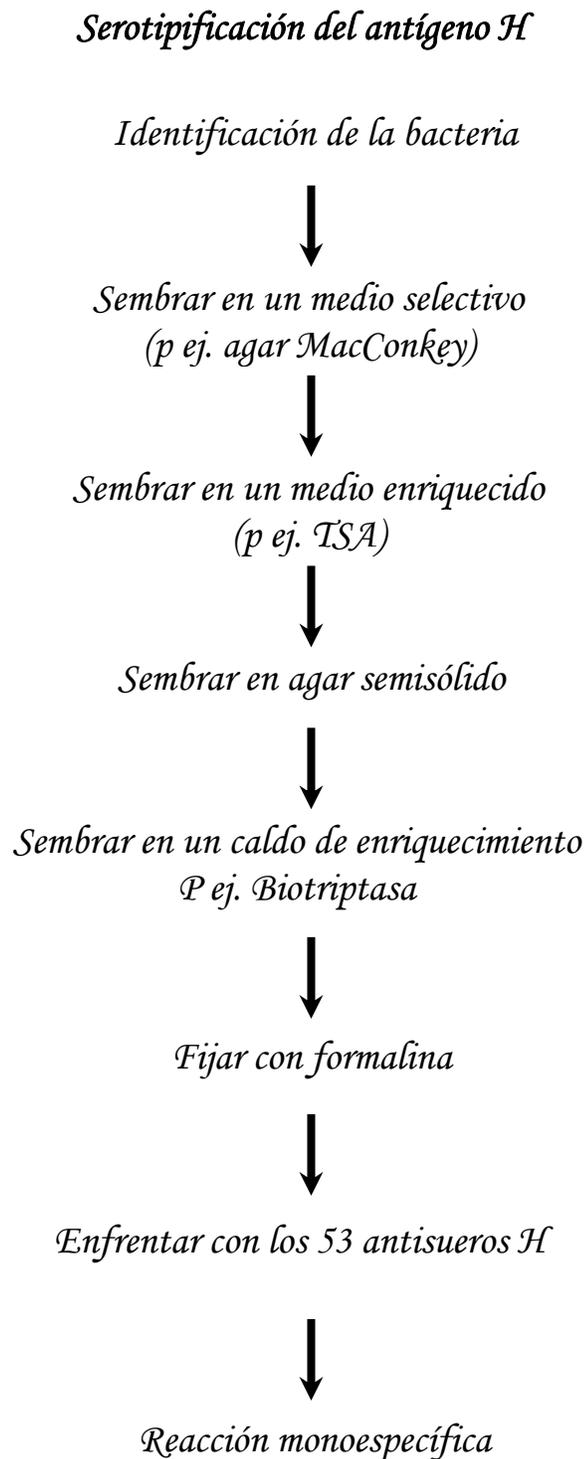


Figura 4. Resumen de la tipificación del antígeno H por serología clásica.

5.4.4 Determinación del serogrupo H

El antígeno se debe enfrentar a los 53 sueros para determinar el antígeno flagelar al que pertenece (Figura 5).

1. Enfrentar el antígeno con cada uno de los sueros polivalentes e incubar por cuatro horas a 50°C
2. La reacción positiva estará dada por la presencia de un flóculo compacto en el fondo del pozo.
3. En el caso de aquellas que den reacción cruzada; es decir que de positivo para dos o más tipos flagelares, se enfrentará posteriormente a un suero específico para determinar el serogrupo flagelar del que se trata y el título del mismo.
4. El título del antígeno se determina haciendo una dilución seriada del antisuero que al inicio cuenta con una dilución de 1:100.
5. Comparar al final con el título de su homólogo.

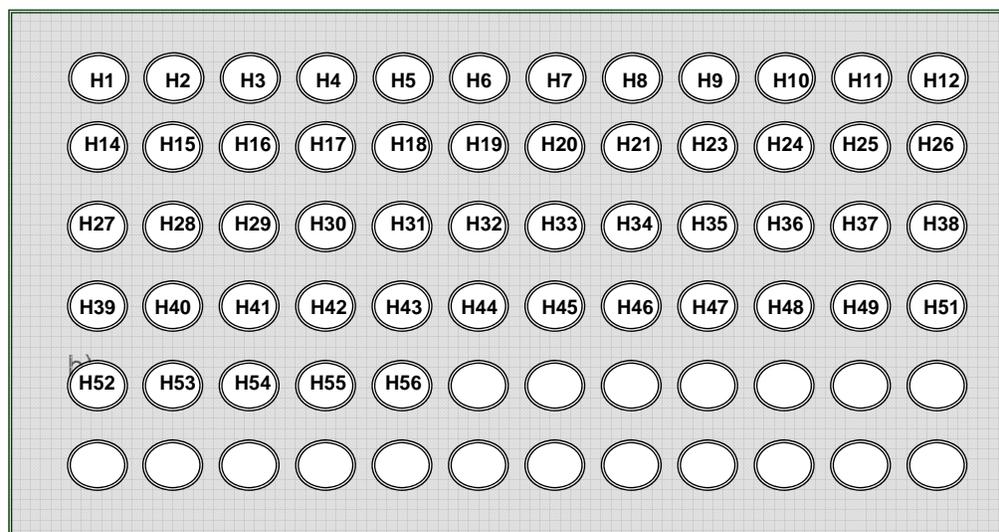


Figura 5. Distribución de antisueros utilizada para la microtitulación serológica del serotipo flagelar H

5.5 Extracción del DNA

La extracción de DNA para las cepas de *Escherichia coli* se realizó con el kit comercial DNeasy® Tissue (QIAGEN®) de acuerdo a las indicaciones del proveedor.

1. A partir de un cultivo líquido en BHI; con una concentración máxima de 2×10^9 células/mL, centrifugar 10 minutos a 7500 rpm (5000 x g).
2. Desechar el sobrenadante y resuspender el pellet de bacterias en 180 μ L de buffer ATL.
3. Adicionar 20 μ L de proteinasa K.
4. Mezclar con vortex e incubar a 55°C hasta observar su completa lisis.
5. Adicionar 4 μ L de RNasa A (100 mg/mL), agitar con vortex, e incubar por dos minutos a temperatura ambiente.
6. Agitar en vortex por 15 segundos y adicionar 200 μ L de buffer AL, agitar nuevamente en el vortex e incubar 10 minutos a 70°C.
7. Adicionar 200 μ L de etanol (96-100%) frío y agitar con vortex.
8. Transferir a la mini-columna DNeasy todo el contenido. Centrifugar a 8000 rpm por un minuto. Desechar el sobrenadante.
9. Adicionar a la columna 500 μ L de buffer AW1, y centrifugar por un minuto a 8000 rpm. Desechar el sobrenadante.
10. Adicionar 500 μ L de buffer AW2 y centrifugar por 3 minutos a 8000 rpm.
11. Transferir la columna a un tubo nuevo para colectar el DNA ya aislado. Adicionar a la columna 200 μ L de buffer AE y dejar incubar por un minuto a temperatura ambiente.

12. Centrifugar 1 minuto a 8000 rpm, recolectar el DNA en tubos de 1.5 y 0.5 mL.

5.5.1 Evaluación del DNA aislado

Después del aislamiento del DNA se evalúa la calidad del mismo mediante una electroforesis en gel de agarosa (Research Orgsnics®) al 0.8% en buffer de Tris-Boratos-EDTA (TBE 1X); utilizando Bromuro de etidio (Research Organics®, 10 mg/mL) como revelador, para poder observar las bandas del DNA en presencia de luz UV (Transiluminador MacroVue Uvis-20, Hoefer®).

5.6 Amplificación del gen *fliC*

La amplificación del gen *fliC* a partir del DNA extraído mediante la técnica de PCR. La reacción de la PCR consta de treinta ciclos y cada ciclo consta a su vez de tres etapas: desnaturalización, alineamiento y extensión. Las temperaturas manejadas para cada etapa se muestran en la tabla 4.

Dicha reacción se llevo acabo en el termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems®).

Tabla 4. Condiciones de reacción para la PCR del gen *fliC*.

Etapa	Temperatura °C	Duración
Desnaturalización inicial	94	5 min
* Desnaturalización	94	1 min
* Alineamiento	47	1 min
* Extensión	72	120 seg
Extensión final	72	7 minutos

La PCR se inicia con una temperatura de 94°C para lograr la desnaturalización de la doble cadena de DNA la cual tiene un tiempo de un minuto, la etapa de alineamiento se lleva acabo durante un minuto a 47°C y por último tenemos la etapa de extensión a 72°C por 2 minutos. (Figura 6).

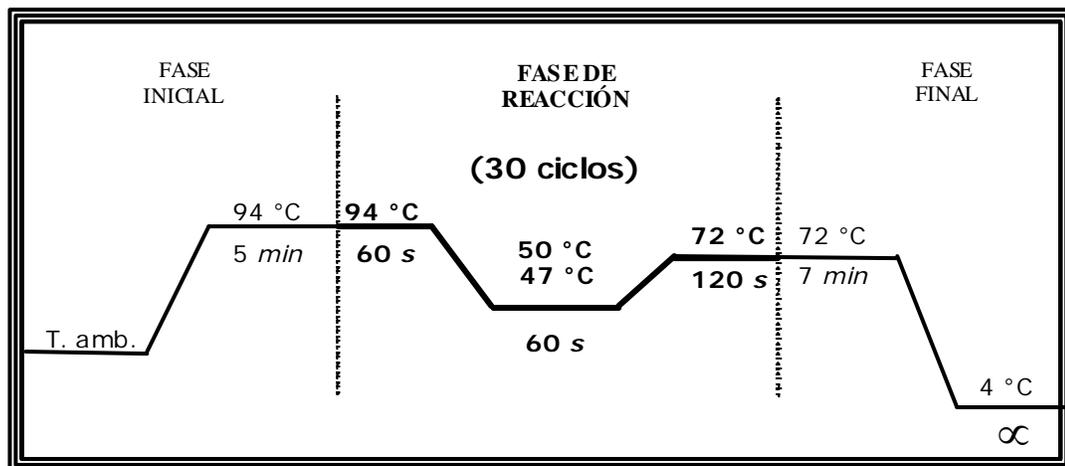


Figura 6. Diagrama de las diferentes temperaturas utilizadas en la PCR.

El objetivo de repetir esta etapa por 30 ciclos, es poder obtener una buena cantidad de amplificado para su posterior corte enzimático y/o purificación y secuenciación. La mezcla de reacción para la amplificación del gen *f1/C* se muestra en la tabla 5.

Tabla 5. Mezcla maestra en una reacción de PCR. Se incluye en cada ensayo un control negativo y un control positivo

REACTIVO	VOLUMEN (μ L)
H ₂ O	33.6
Buffer para PCR con MgCl ₂ (1.5mM)Roche®	5.0
dNTP´s (10mM de cada dNTP) Applied Biosystems®	8.0
fliC A (10 mM) Biosynthesis®	1.0
fliC B(10 mM) Biosynthesis®	1.0
DMSO Stratagen®	0.2
Taq Polimerasa (5U/mL Roche®)	0.2
DNA	1.0

Los primer utilizados en la reacción de amplificación del gen *fliC* con el DNA de las cepas de *Escherichia coli* NT se muestran en la tabla 6, los cuales son descritos previamente por Schoenhals y Withfield (**Schoehals y Withfield, 1993**).

Tabla 6. Primers descritos por Schoenhals utilizados para la amplificación del gen *fliC* en *Escherichia coli*.

Primer	Sentido	Secuencia de 5' a 3'	Tm (°C)
<i>fliC A</i>	Forward	CCG AAT TCA TGG CAC AAG TCA TTA ATA C	69.1
<i>fliC B</i>	Reverse	CCG AAT TCT TAC CCT GCA GTA GAG ACA	69.6

5.6.1 Análisis de la calidad del amplificado del PCR

La amplificación del producto de PCR se hace evidente mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en buffer TBE utilizando como revelador bromuro de etidio (Research Organics®, 10mg/mL), para visualizar el producto bajo la luz UV (Transiluminador MacroVue Uvis-20, Hoefer®).

Los productos obtenidos se analizan con la ayuda de un software Kodak® 1D 3.5v. El tamaño de los amplificados se estimó con la ayuda de un marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas®).

5.6.2 Digestión del gen *fliC* con la enzima *RsaI*

Para la digestión enzimática del gen *fliC* utilizamos la enzima de restricción *RsaI* (Invitrogen®), una endonucleasa que corta el DNA en la secuencia 5'-GT↓AC-3'. El volumen para la reacción fue de 40 µL, ver Tabla 7, la mezcla de reacción se incubó por 24 horas a 37°C.

Tabla 7. Mezcla de reacción utilizada para un corte enzimático del gen *fliC*.

REACTIVO	VOLUMEN (µL)
Buffer	4.0
Enzima <i>RsaI</i>	0.3
DNA	35.7

5.6.2.1 Análisis de la digestión enzimática

Una vez transcurrido el tiempo de digestión se realizó una electroforesis utilizando una agarosa al 2.5% (Invitrogen®) para visualizar los patrones de corte, cabe mencionar que para realizar la electroforesis los productos de la digestión fueron ordenados por tamaño para poder tener las muestras lo más homogéneas posibles y que éstas quedaran agrupadas para facilitar su análisis. Se tomó una foto digital y se analizaron los RFLPs obtenidos de la digestión con la enzima *RsaI* (Invitrogen®) y comparándolos con los RFLPs de las cepas de referencia.

5.7 Purificación de los productos de PCR

La purificación de los productos de PCR se hizo por filtración con el kit comercial Microcon® (Millipore®) siguiendo las indicaciones del proveedor. La purificación de las muestras se realizó para su posterior secuenciación de la siguiente manera:

1. Colocar el filtro en un tubo eppendorf 1.5 µL previamente rotulados.
2. Adicionar a la columna 360 µL de H₂O destilada y esterilizada.
3. Transferir el producto de PCR al filtro. (1er lavado)
4. Centrifugar por 14 minutos a 2500 rpm. Descartar el agua.
5. Agregar 390 µL de H₂O destilada y esterilizada al filtro azul.(2do lavado)
6. Centrifugar por 14 minutos a 2500rpm.
7. Descartar el agua nuevamente e invertir el filtro azul en tubo nuevo.
8. Centrifugar 30 segundos a 10 000 rpm.
9. Adicionar aproximadamente 15 µL de H₂O ultrapura.

10. Correr un gel de agarosa para determinar la concentración final del producto puro de PCR, utilizando como referencia el marcador de peso molecular Low Mass (Invitrogene®). Se cargan 2 μ L de marcador y 3 μ L de muestra.
11. Determinar la concentración de la muestra con ayuda del software Kodak 1D 3.5v.

El producto de PCR purificado y cuantificado, se envía al Instituto de Fisiología Celular para ser analizado mediante un secuenciador automatizado (ABI-3100, Applied Biosystems®) utilizando como iniciadores los primers *fliCA* y *fliCB*, para obtener la secuencia de los extremos del gen *fliC*

5.8 Análisis y edición de las secuencias del gen *fliC*

Una vez que se secuenció el producto de PCR del gen *fliC* se obtuvo secuencia de forma electrónica impresa en un cromatograma, dado que el gen *fliC* es de tamaño grande entre 1000 pb y 2000 pb, se requiere secuenciar por ambos lados, el primer *fliC A* nos permite tener la secuencia “forward” y *fliC B* la secuencia “reverse”, la secuencia obtenida con el primer *fliCB* se editó en el software EDITSEQ® (DNASTAR®, Madison Wis), y se invirtió la secuencia para ser empalmada con la obtenida con el primer *fliCA* y de esta forma obtener la secuencia completa del gen *fliC*. Para evitar ambigüedades la secuencia electrónica completa es comparada con la información en el cromatograma.

Por último la secuencia es comparada en el software MEGALING® (DNASTAR®, Madison Wis.) con las secuencias de todos los serotipos flagelares H descritas en el GenBank.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente estudio se trabajo con una cantidad inicial de 273 cepas de *Escherichia coli* “No Tipificables” por serología flagelar procedentes del laboratorio de serología del Departamento de Salud Pública.

6.1 Recuperación de las cepas

Este paso en el desarrollo del trabajo fue de gran importancia debido a que las cepas seleccionadas como No tipificables han sido almacenadas por períodos largos, algunas de ellas por más de 20 años. En esta etapa un considerable porcentaje de las cepas fueron eliminadas por diferentes causas (Tabla 8), que llevaron a que no fuera recuperadas; es decir, la cepa ya no creció en la resiembra, o se encontró contaminada, y/o se observaba más de una cepa con la morfología característica de *Escherichia coli*. Algunos de los medios de conservación se observaron en mal estado, tal vez por un sellado deficiente y el paso del aire genero la descomposición de este y con ello la muerte de la bacteria, en esta etapa se perdió el 27.1% de las cepas.

Por ello es necesario implementar un sistema de revisión periódica del estado y viabilidad de las cepas almacenadas bajo estas condiciones; para evitar la pérdida de tan valioso material biológico, como lo fue en el caso de las cepas NT que lamentablemente no lograron ser recuperadas y se perdió junto con ellas información valiosa.

Tabla 8. En la tabla se enlistan las cepas que no lograron ser recuperadas del cepario del Laboratorio de Serología.

Cepa	Sero H	Sero O	Cepa	Sero H	Sero O
3	NT	O29	104(2)	NT	OR
14	NT	O19	107	NT	O148
15	NT	O?	109	NT	O32
17	NT	O25	110	NT	O148
20	NT	O157	111	NT	O21
21	NT	O?	112	NT	OR
22	NT	O?	113	NT	O16
24	NT	O?	114	NT	O?
28	NT	O?	116	NT	O89
36	NT	O79	120	NT	O23
40	NT	O152	124	NT	O16
41	NT	O89	128	NT	O16
44	NT	O20	129	NT	O2
46	NT	OR	130	NT	O138
48	NT	O?	133	NT	O3
51	NT	O25	134	NT	O?
60	NT	O4	135	NT	O?
61	NT	OR	136	NT	O?
64	NT	O19	138	NT	O55
65	NT	O168	139	NT	O86
67	NT	O?	140	NT	O25
69	NT	O?	142	NT	O?
73	NT	O?	144	NT	O55
74	NT	O135	147	NT	O174
76	NT	O159	148	NT	O169
77	NT	O141	150	NT	O20
78	NT	O22	151	NT	O58
79	NT	O165	154	NT	O19
80	NT	O91	195	NT	O128
81	NT	O5	196	NT	O41
82	NT	O35	208	NT	O70
83	NT	O71	223	NT	O91
84	NT	OR	230	NT	O65
85	NT	O?	231	NT	O97
86	NT	O?	233	NT	O7
89	NT	Dys 8b	237	NT	OR
100	NT	O41	246	NT	OR

6.2 Identificación bioquímica mediante VITEK

La identificación bioquímica de las cepas mediante el equipo automatizado Vitek (VITEK 60, BioMerieux®) fue un paso importante en este estudio; ya que debemos asegurarnos de que las cepas recuperadas eran *Escherichia coli* y no otro microorganismo; **(Jordá et al., 2005)** evitando resultados falsos, ya que dentro de la familia de las enterobacterias existen microorganismos con metabolismos muy parecido al de *Escherichia coli*, y mediante un juego de bioquímicas convencionales nos sería mas difícil discernir entre ellos; tomando en cuenta que existe un pequeño grupo de cepas que puede presentar una variación en las pruebas bioquímicas, según el manual Bergey. **(Brener 2005)** De tal manera que un análisis bioquímico en este equipo nos da un resultado muy confiable en un corto tiempo. Con las 30 pruebas bioquímicas que se incluyen en el equipo Vitek (Vitek 60, BioMerieux®) se identificó con precisión el tipo de microorganismo probado (Apéndice II). De las 199 cepas recuperadas 181 fueron identificadas como *Escherichia coli* por esta técnica.

Las 18 cepas restantes no correspondieron a *Escherichia coli*, 6 se identificaron dentro del género *Enterobacter*, 6 en *Citrobacter*, 1 a *Acinetobacter* y 5 especies de *Escherichia* diferentes de *coli* (Tabla 9).

Tabla 9. Bacterias diferentes a *Escherichia coli* identificadas mediante el sistema Vitek (VITEK 60, BioMerieux).

No cepa	Sero H	sero O	Microorganismo
168	H?	O4	<i>Acinetobacter iwoffii</i>
258	H?	OR	<i>Citrobacter amalonaticus</i>
88	H?	Dys 8b	<i>Citrobacter brakii</i>
4	H?	O78	<i>Citrobacter freundii</i>
12	H?	O	<i>Citrobacter freundii</i>
68	H?	O19	<i>Citrobacter freundii</i>
72	H?	O23	<i>Citrobacter freundii</i>
45	H?	O?	<i>Enterobacter intermedium</i>
104	H?	OR	<i>Enterobacter intermedium</i>
122	H?	OR	<i>Enterobacter intermedium</i>
250	H?	OR	<i>Enterobacter intermedium</i>
251	H?	OR	<i>Enterobacter intermedium</i>
252	H?	OR	<i>Enterobacter intermedium</i>
70	H?	O73	<i>Escherichia fergusonii</i>
202	H?	O77	<i>Escherichia fergusonii</i>
153	H?	O?	<i>Escherichia fergusonii</i>
18	H?	O?	<i>Escherichia hermannii</i>
16	H?	OR	<i>Escherichia vulneris</i>

Para poder realizar una nueva serología flagelar y demostrar que las cepas de *Escherichia coli* no reaccionan con ninguno de los 53 antisueros flagelares (cumpliendo así las características de las cepas “No Tipificables”), se determinó la movilidad para cada una de las cepas, esperando que todas fuera móviles debido a que fueron previamente tipificadas y determinadas como NT.

De las 181 cepas sometidas a este análisis 30 fueron no móviles (Tabla 10), Este grupo de cepas fue eliminado para los análisis posteriores ya que no se pudo realizar una serología reciente, para comprobar que las cepas eran “No Tipificables”. Tal vez por la manipulación

del cultivo, el tiempo de conservación, así como las condiciones ambientales que pudieron provocar la pérdida en la expresión del flagelo.

Tabla 10. Cepas de *Escherichia coli* que mostraron movilidad negativa durante el estudio.

Cepa	Cepa	Cepa
32	181	212
54	183	214
169	184	218
170	187	221
173	189	228
174	191	236
175	193	238
176	194	255
177	203	256
178	207	257

6.3 Determinación del serogrupo H

La determinación ha sido de gran utilidad para la caracterización de las cepas patógenas de las que no lo son y se ha empleado por mucho tiempo como el estándar en la tipificación del antígeno flagelar H; aunque es importante reconocer que tiene algunas limitaciones como la dependencia de la expresión del flagelo o el uso de sueros no estandarizados; por ello fue de utilidad realizar una serología reciente para comprobar que la reacción negativa con los sueros flagelares es debida a diferencias antigénicas eran diferentes a los serotipos ya conocidos.

De las 151 que se sometieron a la serotipificación, 77 pudieron ser tipificadas por esta técnica (Figura 7). Esta cantidad de cepas representó un porcentaje elevado (28%), disminuyendo significativamente nuestro lote de cepas NT. Por lo tanto una cantidad importante de cepas fueron eliminadas en este paso del estudio. Así de un total de 273 cepas solo 74 de ellas cumplieron con el perfil para los propósitos de nuestro estudio. Esto podría sugerir de que un porcentaje importante de las cepas que el laboratorio de serología cataloga como No Tipificables, realmente no lo son, la reacción negativa de los antígenos flagelares de las cepas puede ser debida a un retraso en la expresión del flagelo provocada por las condiciones de cultivo de la cepa o el medio de transporte, el tiempo de almacenamiento de la cepa, así como también es de considerarse la variación en la metodología entre el personal técnico, la falta temporal de algún antisuero en el momento del estudio o la estandarización de la técnica. No podemos pensar en una mutante debido a que la serotipificación confirmatoria que se realizó, dio positiva para alguno de los serotipos H.

Estos resultados muestran algunas de las dificultades a las que se puede enfrentar la serotipificación clásica del antígeno H y la importancia de buscar alternativas que permitan subsanar estas deficiencias; como es el uso de las técnicas moleculares.

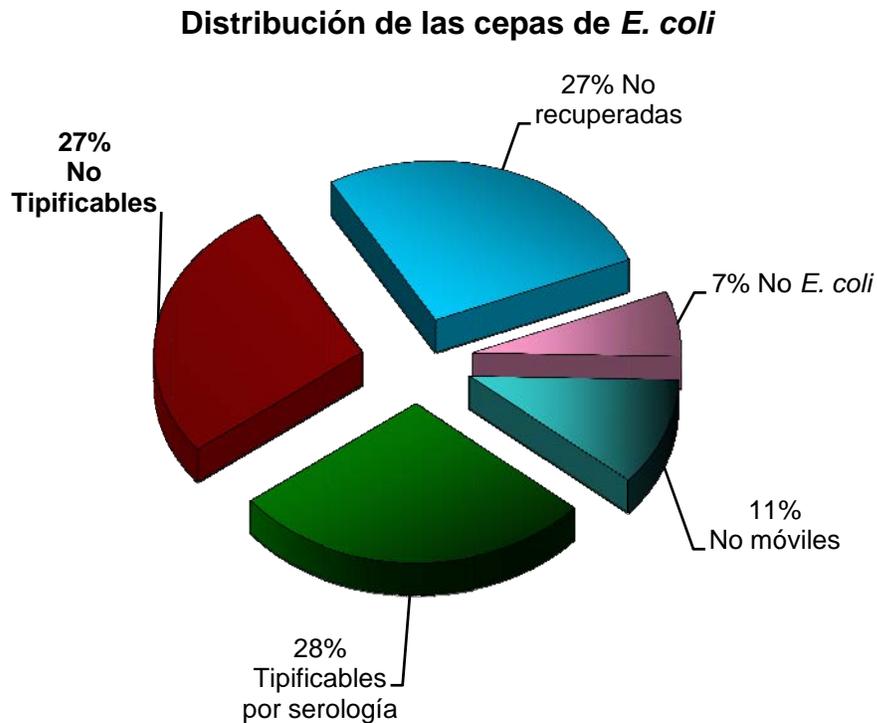


Figura 7. Distribución de las 273 cepas de *Escherichia coli* seleccionadas para el estudio.

6.4 Extracción del DNA

Una vez identificadas las cepas de nuestro interés, hicimos uso de las técnicas moleculares para determinar el porque estas cepas no pueden ser tipificadas por serología. El DNA obtenido debía ser de buena calidad por que a partir de él se realizó todo el análisis molecular. El aislamiento del DNA mediante el kit comercial QIAGEN nos permitió obtener de manera eficiente, sencilla y rápida el DNA en las 74 cepas de *Escherichia coli* identificadas como No Tipificables.

En la figura 8 podemos observar una muestra de DNAs aislados y la calidad de los mismos, los DNAs deben observarse como una banda intensa y sin barrido debajo de ellas; si la banda se ve muy débil, es necesario volver a aislar el DNA; pero la extracción con el kit QIAGEN es muy efectiva y en las 74 muestras las bandas se observaron intensas.

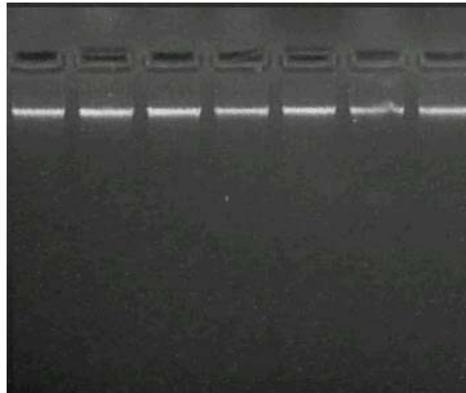


Figura 8. Corrimiento electroforético en gel de agarosa al 0.8% mostrando algunos DNA extraídos de las cepas NT mediante el kit QIAGEN

6.5 Amplificación del gen *fliC*

Los productos de PCR del gen *fliC* encontrados en este estudio presentan un tamaño variable (Figura 9); que va desde 1.0 hasta 2.2 kpb, esta diferencia de tamaño es dada por el polimorfismo del gen. La región amino (–N) y carboxilo (–C) terminal del gen se encuentran conservados entre los diferentes tipos H, mientras que la región central es altamente variable, así de acuerdo al serotipo al que nos estemos refiriendo será el tamaño del producto de PCR; por lo tanto, el tamaño del amplificado esta relacionado con el tipo H de *Escherichia coli* (Prager et al, 2003).

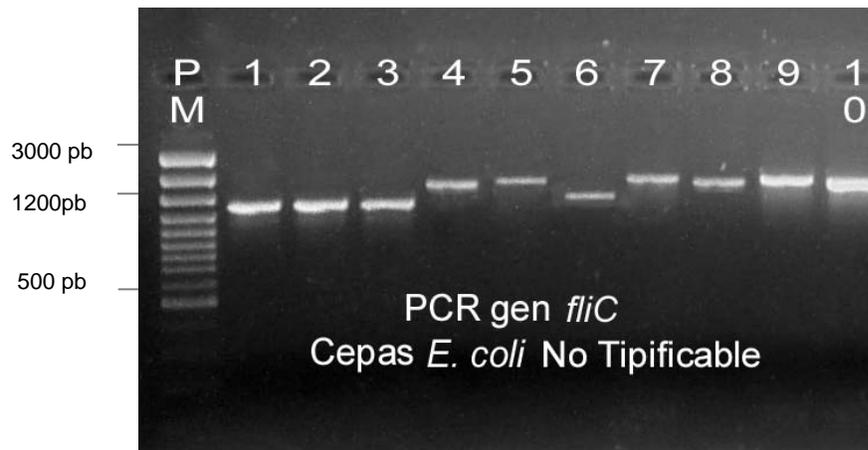


Figura 9. Amplificados del gen *fliC* de cepas de Escherichia coli NT, obsérvese el polimorfismo del ge (PM, marcador 100 pb).

En la mayoría de las cepas se logró la amplificación el gen *fliC* utilizando las condiciones descritas en la tabla 4, en los casos donde no se obtuvo amplificado, se probaron diferentes temperaturas de alineamiento, usando temperaturas bajas hasta de 38°C y además se agregaron algunos reactivos que favorecen el alineamiento en la reacción, como MgCl₂ 1.5mM hasta 2mM y DMSO al 5%v/v. Para algunas de las cepas se logró amplificar el gen *fliC* bajo estas nuevas condiciones, pero en 18 cepas no se logró la amplificación del gen.

Este resultado negativo no podemos atribuirlo a la ausencia del gen ya que las cepas al ser resembradas en medio semisólido nos permitió poner en evidencia la presencia del flagelo y con ellos del gen, así que ésta reacción negativa pudo ser debida a una mutación en la región conservada, ya que es en esta zona donde los primers se alinean, y por ellos no logró amplificarse el gen.

De acuerdo a nuestros objetivos éste grupo de cepas se eliminaron de éste estudio, pero es importante mencionar que representa un grupo de interés para posterior estudio.

Una vez amplificado el gen *fliC* y con ayuda del software de Kodak se determinó el tamaño para cada producto de PCR (Tabla 11) y sabiendo que los diferentes serotipos H presentan un tamaño característico, se agruparon las cepas con base a este parámetro. Al ser cepas No Tipificables no esperamos un resultado ya conocido pero de esta manera nuestras cepas estaban ordenadas de forma más homogénea para facilitar el estudio.

Tabla 11. Cepas de *Escherichia coli* NT, cuyos amplificadores del gen *fliC* se les determinó el tamaño con el software Kodak 3.5v.

No. Cepa	PCR	Tamaño (pb)	No. Cepa	PCR	Tamaño (pb)
2	+	1471	90	+	1810
5	+	1500	123	+	1938
6	+	1478	137	+	2025
8	+	1500	16	+	2067
23	+	1457	7	+	1898
26	+	1479	11	+	1897
31	+	1457	34	+	1879
33	+	1404	35	+	1856
53	+	1450	38	+	2004
53(2)	+	1492	42	+	1633
55	+	1480	43	+	1393
59	+	1471	75	+	1700
204	+	1471	102	+	1843
225	+	1457	92	+	1856
239	+	1500	94	+	1856
50	+	1343	271	+	2067
132	+	1363	272	+	2000
163	+	1388	101	+	1690
164	+	1340	103	+	1429
259	+	1340	115	+	1641
260	+	1380	240	+	1116
261	+	1320	270	+	1714
262	+	1272	161	+	1756
263	+	1357	186	+	1588
264	+	1359	192	+	1647
265	+	1330	209	+	2156
266	+	1387	210	+	1749
267	+	1418	229	+	1130
25	+	1937	234	+	1625
27	+	2000			

6.6 Digestión enzimática con la enzima *RsaI*

El agrupar las cepas de acuerdo al tamaño de los productos amplificados del gen *fliC* nos permitió obtener grupos de cepas más homogéneos. Un primer grupo al cual se le llamo A, no logró generar ningún patrón al ser cortados con la enzima *RsaI*, de tal suerte que estas cepas bien podrían corresponder al comportamiento reconocido para H5, ya que ésta característica sólo se ha observado para el gen de este tipo flagelar (Tabla 12), para confirmar esto, se probó cortar el gen *fliC* con otras enzimas: *DdeI*, *HincII* y *HaeIII* (Figura 10).

Tabla 12. Grupo A, cepas con gen *fliC* cercano al serotipo flagelar H5; en la que podemos apreciar que el tamaño del producto de PCR es muy cercano entre las cepas NT y las cepa de referencia H5.

No cepa	Tamaño (pb)
2	1471
5	1500
6	1478
8	1500
23	1457
26	1479
31	1457
33	1403
53	1450
53(2)	1492
55	1480
59	1471
204	1471
225	1457
239	1500
H5	1400

Los resultados que obtuvimos podemos observarlos en las siguientes fotografías.

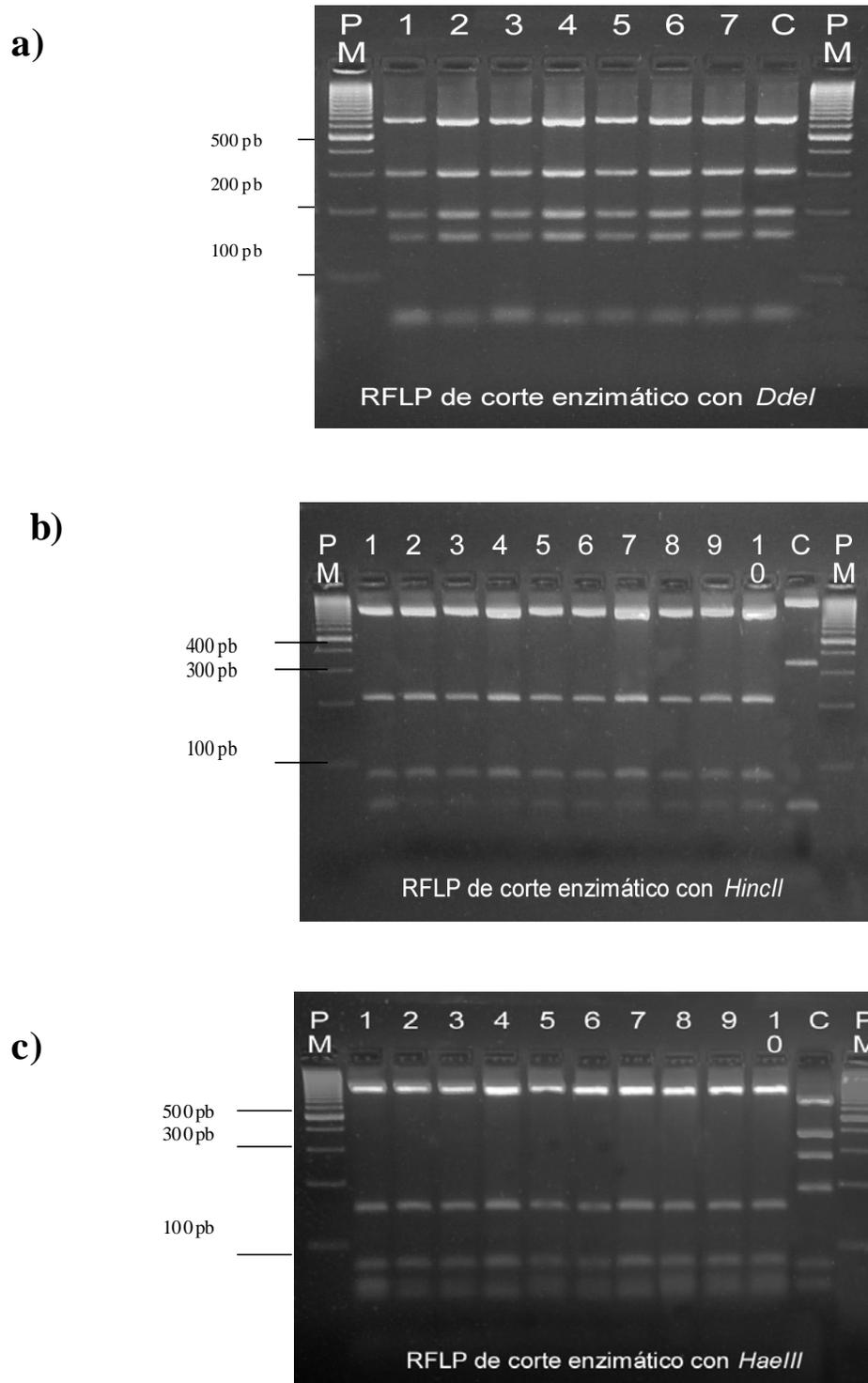


Figura 10. Imágenes digitales donde se comparan los corrimientos electroforéticos de los cortes de restricción del gen *fliC* en las cepas del grupo A de *Escherichia coli* NT (carril 1-10) y la cepa de referencia H5 (carril C) utilizando las enzimas de restricción *RsaI* (imagen a), *HincII* (imagen b) y *HaeIII* (imagen C). (PM, marcador 100 pb).

En la figura 10 a) podemos observar que las cepas de referencias H5 (carril C) mostró el mismo patrón de corte que las cepas problema con la enzima *Ddel*. En la 10 b) podemos observar que las cepas NT al ser sometidas a un corte de restricción con la enzima *HincII* mostraron un patrón de corte diferente al de H5, en ambas podemos ver dos bandas importantes (considerando sólo las de tamaño mayor a 100 pb); pero en el caso de la cepa H5 la segunda banda es de mayor tamaño; de aproximadamente 350 pb mientras que la banda que se observa para el grupo A es de 200 pb y por último al comparar los patrones obtenidos del gen *fliC* con la enzima *HaeIII* (figura 10 c), en las cepas de referencia se observó cuatro bandas; mientras que las muestras del grupo A igual que con *HincII* sólo hubo dos bandas. Para poder nosotros corroborar que las cepas NT son realmente diferentes al de las H5 se amplificó de nuevo el gen *fliC* y se envió a secuenciar.

El segundo lote de cepas se le nombró grupo B (Tabla13), este grupo mostró un RFLP diferente a los ya descritos previamente, este RFLP fue comparado con todos los patrones del gen *fliC* de los diferentes serotipos flagelares de *Escherichia coli*, determinados en el laboratorio de epidemiología (Dávila, et al., 2003) y aparentemente no correspondió a ninguno de los alelos del gen *fliC* descritos hasta el momento (Figura 11), de tal suerte que este grupo; conformado por 13 cepas NT, puede ser un nuevo alelo del gen *fliC* y al no ser reconocido por ningún atisero de referencia puede representar un nuevo serotipo flagelar.

Tabla 13. Grupo B, cepas con gen *fliC* cercano al serotipo flagelar H52 (relacionado por secuencia); en la que podemos apreciar que el tamaño del producto de PCR es muy cercano entre las cepas NT y la cepa de referencia H52.

No cepa	Tamaño (pb)
50	1343
132	1363
163	1388
164	1430
259	1340
260	1380
261	1320
262	1372
263	1357
264	1359
265	1330
266	1387
267	1418
H52	1400

Genotípicamente no se asoció con ninguno de los serotipos H descritos en la literatura, por lo que se realizó una secuenciación del gen completo para su análisis.

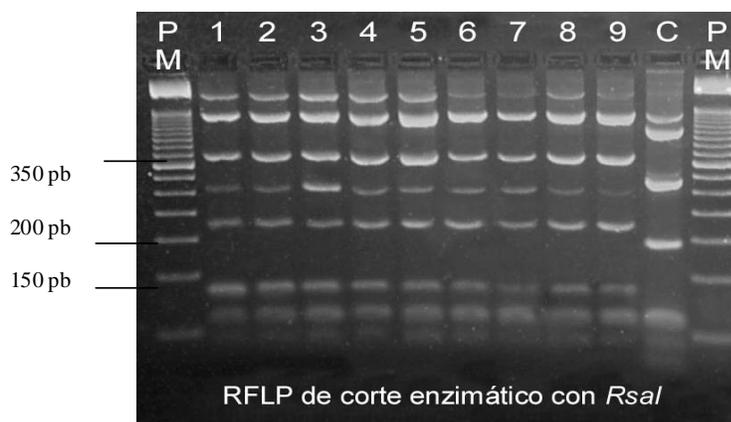


Figura 11. RFLP del gen *fliC* en el grupo B de *Escherichia coli* NT con la enzima *RsaI*, en los carriles 1-9 podemos observar los patrones de corte de las cepas del grupo B y en el carril C la cepa de referencia H52. (PM, marcador 50pb).

El último grupo de cepas analizadas mostraron un patrón de corte conocido (grupo C), y lograron identificarse mediante RFLP y la secuencia de estos corresponde en un 100% con la secuencia de las cepas de referencia, este número de cepas fue bastante significativo; en la tabla 12 podemos observar la distribución de los alelos del gen *fliC*, los tipos predominantes fueron: el gen *fliCH12* seguida de *fliCH23* y *fliCH40*, mientras que el resto muestra una distribución bastante diversa. Estos resultados podrían deberse a una débil expresión del gen flagelar dando una pobre reacción de aglutinación en la serotipificación; en estos casos se debe realizar una nueva extracción del antígeno flagelar, enfrentarlo nuevamente con los antisueros correspondientes para poder demostrar que estas cepas son en realidad tipificables por serología y que la reacción negativa antes observada fue debida a una extracción débil del antígeno flagelar.

Los tamaños obtenidos del gen *fliC* se corresponden con el serotipo H asignado, de tal manera que podemos asegurar que estas cepas son tipificables por métodos moleculares, esto nos confirma que la serología convencional a pesar de ser un método utilizado actualmente como estándar en la caracterización del serotipo H, deja fuera del esquema a cepas que pueden ser tipificadas de forma sencilla y rápida por métodos moleculares. Estas técnicas representan una buena opción para aquellos laboratorios que no cuenten con la infraestructura necesaria para realizar la serología convencional (**Ramos et al., 2006**).

Tabla 12. Grupo C; cepas de *Escherichia coli* “No Tipificables” identificadas mediante sus RFLP’s del gen *fliC* con la enzima *Rsal*.

No cepa	gen <i>fliC</i>	Sero O	Tamaño del gen <i>fliC</i> (pb)
25	<i>fliCH12</i>	OR	1937
27	<i>fliCH12</i>	O39	2000
90	<i>fliCH12</i>	O56	1810
123	<i>fliCH12</i>	O152	1938
137	<i>fliCH12</i>	O63	2025
16	<i>fliCH12</i>	OR	2067
94	<i>fliCH23</i>	O175	1856
271	<i>fliCH23</i>	O103	2067
272	<i>fliCH23</i>	O149	2000
42	<i>fliCH40</i>	O16	1633
115	<i>fliCH40</i>	O41	1641
192	<i>fliCH40</i>	OR	1647
34	<i>fliCH18</i>	O155	1879
35	<i>fliCH18</i>	O20	1856
75	<i>fliCH45</i>	O?	1700
102	<i>fliCH45</i>	O15	1843
7	<i>fliCH49</i>	O168	1897
11	<i>fliCH49</i>	O20	1923
240	<i>fliCH53</i>	O8	1115
229	<i>fliCH53</i>	O103	1130
210	<i>fliCH7</i>	O83	1749
209	<i>fliCH9</i>	O1	2156
92	<i>fliCH14</i>	O51	1856
38	<i>fliCH19</i>	O33	2004
101	<i>fliCH21</i>	O91	1690
186	<i>fliCH27</i>	O81	1588
161	<i>fliCH32</i>	O20	1756
43	<i>fliCH33</i>	O?	1393
103	<i>fliCH38</i>	O168	1429
234	<i>fliCH48</i>	OR	1625

6.7 Análisis de la secuenciación del gen *fliC*

Las secuencias completas del gen *fliC* después de analizarlas y editarlas se enviaron por internet al GenBank para compararlas con las ya reportadas, además de que se alinearon con las secuencias electrónicas con las que se cuentan en el laboratorio. Esta comparación nos permitió demostrar que la cepas que integran el grupo A presentan una variación de alrededor de 10 pb y que traducido en aminoácidos corresponde a un 99% de similitud con el serotipo H5 reportado en el GenBank, esta variación de tan sólo dos aminoácidos podría parecer de primera instancia insignificante, pero al análisis previo de su RFLP y el resultado de serología nos está indicando que estas diferencias es suficiente para modificar la antigenicidad de la molécula de flagelina. Dado el parecido con el serotipo H5 no podríamos proponerlo como un alelo nuevo, pero tal vez sí como un subalelo de este serotipo. Un análisis en la secuencia de aminoácidos de los diferentes serotipos flagelares revela que la homología genética más cercana se presenta entre los serotipos H1 y H12, mostrando diferencia entre ellos de 10 aminoácidos solamente, aunque en estas cepas se encuentran cercanas filogenéticamente, esta pequeña variación en el número de aminoácidos es suficiente para representar un alelo y serotipo nuevo, lo que nos indica el grado de especificidad del antígeno H.

Al comparar la secuencia en pares de bases del grupo A y de grupo B con las de referencia, se observan varias diferencias, pero al ser traducidos a aminoácidos las variaciones son menores, así al comparar la secuencia de aminoácidos del serotipo H5 con nuestro grupo, encontramos que en la posición 175 hay una sustitución de GTA → ACA y en la posición 293 encontramos la segunda sustitución de AAC → AAA. En el caso del grupo B encontramos algo curioso ya que presenta de acuerdo al GenBank 99% de

identidad con la secuencia del serotipo H52, la diferencia radica solo en la sustitución de un aminoácido en la posición 263 (ACA → AAA), estas evidencias de sustituciones parecieran ser pequeña pero al esta generando un impacto importante sobre la antigenicidad de la molécula de la flagelina.

En la figura 12 tenemos un resumen de las cepas analizadas a lo largo de este trabajo, en el cual podemos ver claramente la secuencia de cómo se fue desarrollando el tamizaje de las cepas hasta llegar a agruparlas. Se determinó la presencia de dos grupos que representan dos variantes alelicas, así como un tercer grupo el cual resulta importante analizar posteriormente; que es de las cepas que no amplificaron y un cuarto grupo al que no se logró identificar su serotipo H por medio de serología convencional; pero que al realizar su identificación mediante técnicas de PCR-RFLP lograron ser tipificadas.

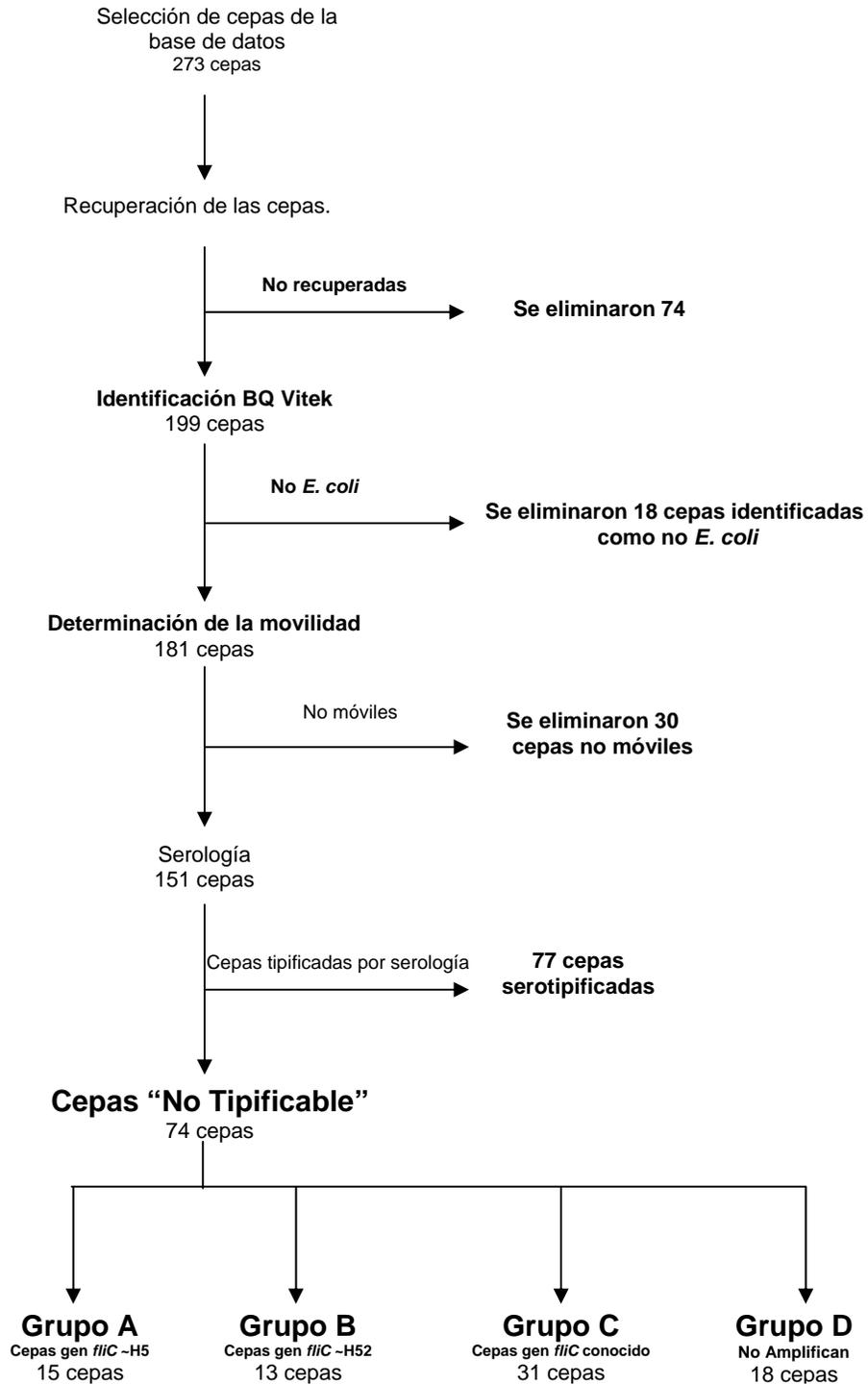


Figura 12. Distribución de las cepas durante el trabajo de caracterización del gen flagelar *fliC*.

7. CONCLUSIONES

- ❖ En este estudio en el lote de cepas seleccionadas e identificadas como “No Tipificables”. La existencia de nuevas variantes flagelares fue baja.
- ❖ En las cepas NT de *Escherichia coli* se encontraron dos subalelos del gen *fliC*, para el caso del grupo A corresponde a un subalrlo del gen *fliCH5*, mientras que en el caso del grupo B corresponde a uno del gen *fliCH52*.
- ❖ La tipificación molecular del gen flagelar en cepas de *Escherichia coli* nos permitió caracterizar y tipificar cepas inicialmente identificadas como “NT”.
- ❖ La metodología utilizada para este análisis nos permite identificar la presencia de nuevas variantes flagelares, así como de un número importante de cepas que por diversos motivos no logran ser tipificados por serología convencional.
- ❖ La serología convencional presenta algunas limitaciones que pueden ser complementadas por las técnicas de biología molecular e incluso estas últimas pueden ser utilizadas como un control de calidad para la técnica tradicional de serotipificación.
- ❖ La identificación bioquímica primaria de las cepas a trabajar es de gran importancia; ya que la semejanza metabólica tan estrecha entre los miembros de la familia Enterobacteriaceae nos da lugar a poder confundir un microorganismo con otro y generar un resultado erróneo en la caracterización de la bacteria.

- ❖ La utilización de técnicas moleculares permiten a los laboratorios que no cuentan con la infraestructura necesaria para realizar serología, contar con una herramienta para poder tipificar las cepas de *Escherichia coli* con resultados confiables, ya que la correlación PCR-RFLP con la serotipificación convencional es muy buena.

APENDICE I

FORMULACIÓN DE MEDIO SÓLIDO PARA MOVILIDAD

Componentes para preparar un litro de agar semisólido para movilidad.

Peptona de caseina (o triptona)	10 g
Extracto de carne	3g
Gelatina bacteriológica	80 g
NaCl	5 g
Agar-agar (Shared-agar)	4 g
Agua destilada	1000 mL

Calentar el agua y disolver los componentes, mantener en ebullición por dos minutos después de que los componentes se hayan disuelto y ajustar el pH a 6.9. Distribuir en los tubos. Esterilizar el medio.

APENDICE II

Tarjeta de identificación de enterobacterias y otros gram negativos GNI (bioMérieux VITEK. INC)

Prueba	Resultado	Prueba	Resultado	Prueba	Resultado
DP3	-	PXB	-	COU	+
OFG	+	LAC	+	H2S	-
GC	+	MLT	+	ONP	+
ACE	-	MAN	+	RHA	+
ESC	-	XYL	+	ARA	+
PLI	-	RAF	+	GLU	+
URE	-	SOR	+	ARG	-
CIT	-	SUC	+	LYS	+
MAL	-	IND	-	ORN	+
TDA	-	ADO	-	OXI	-

Pruebas bioquímicas utilizadas para la identificación de la familia Enterobacteriaceae, mostrando los resultados para *Escherichia coli*.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Blanco M., Blanco J., Blanco J.E., Alonso P, Albalia I., Rodríguez E., Bilbao J., Umaran A.** (1995) "Factores de virulencia y serogrupos O de *Escherichia coli* causantes de infecciones en vías urinarias comunitarias" Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 13:236-41.
2. **Brener J.**, (2005) "Enterobacteriales" pp 587-628. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Springer. USA
3. **Dauga C., Zabroskaia A., Grimont P.** (1998) "Restriction fragment length polymorphism analysis of some flagellin genes of *Salmonella enterica*". J. Clin. Microbiol. 10:2835-43.
4. **Dávila R., Perea Mejía LM.,Inzunza Montiel A.E., Navarro A., Cravioto A.** Variation in *RsaI* restrictions patterns of flagellin gene (*fliC*) in *Escherichia coli* flagellar types. American Society for Microbiology Meeting. Washington D.C. USA. Del 18 al 22 de mayo del 2003.
5. **De S. N.**, Bhattachary A. K., Sarkar J. K. (1956) "A study of pathogenicity of strains of *Bacterium coli* from acute and and chronic enteritis". J. Pathol. Bacteriol. 71:201-6.
6. **Dieffenbach C.** (1995) "PCR primer a laboratory manual" Pp 79-157 Cold Spring Harbor Laboratory Press. London.

-
-
7. **Fields, P.I., K. Blom, H.J., Hughes, L.O., Hesel, P. Feng., B. Swaminathan.** (1997) "Molecular characterization of the gene encoding H antigen in *Escherichia coli* and development of a PCR-restriction length polymorphism test for identification of *Escherichia coli* O157:H7 and O157:NM". J. Clin. Microbiol. 35:1066-70.
 8. **Garza V. R.** (2003) "Enterobacterias y Pseudomonas". p.73-81 Manual de Prácticas de Bacteriología. Faculta de Química. UNAM.
 9. **Giono C. S.** (1994) Fundamentos del diagnostico bacteriológico de infecciones gastrointestinales. p. 251-60. En: Giono C.S., Escobar G. A., Valdespino G. J. Diagnóstico de laboratorio de infecciones gastrointestinales. Secretaria de Salud. México.
 10. **Gross R.J., Rowe B.** (1985) "Serotyping of *Escherichia coli*". p. 345-64 En: Sussman M. The virulence of *Escherichia coli*. Academic Press. London.
 11. **Jordá L., Vila A., Lanza A., Bonvehi P., Nazar J., Mikietuk A., Labat R., Smayevsky J.** (2005) "Utilidad del sistema VITEK en la identificación bacteriana y estudios de sensibilidad antimicrobiana" Act. Bioquím. Clín. L. 39:19-25.
 12. **Kanto S., Okino H., Aizawa S.,** (1991) "Amino acids responsible for flagellar shape are distributed in terminal region of flagelin", J. Mol. Biol. 219:471-80.
 13. **Kauffman F.** (1947) "The serology of the coli group". *J. Immunol.* 57:71-100.

-
-
- 14.. **Koneman E., Dowell V. R., Sommers H. M., Stephen D. Allen.** (1985) "Enterobacterias". p. 152-85. En: Koneman E. W, *Dianóstico Microbiológico*. Editorial Medica Panamericana. México
15. **Kuwajima G., Asaka J., Fujiwara Tamio, Fujiwara Takashi, Node K., Kondo E.** (1986). "Nucleotide séquence of the hag gene encoding flagellin of *Escherichia coli*". J. Bacteriol. 168:1479-83.
16. **Lawn A. M.** (1977). "Comparison of the flagellins from different flagellar morphotypes of *Escherichia coli*". J. Gen. Microbiol. 101:112-30.
17. **Levine M. M.** (1978) "*Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherent". J. Infect. Dis. 155:377-89.
18. **Machado J., Grimont F., and Grimont P.** (2000) "Identification of *Escherichia coli* flagellar types by restriction of the amplified *fliC* gene" Res. Microbiol. 151:535-46.
19. **MacNab, R. M.** (1996) "Flagella and motility" p. 123-145 In: F.C. Neidhardt. *Escherichia coli* and *Salmonella*, cellular and molecular biology. Vol 1. 2nd Ed., ASM Press, Washington D.C.
20. **Margall N., Domínguez A., Prats G., Salleras L.** (1997) "*Escherichia coli* Enterohemorrágica" Rev. Esp. S. Púb. 71:437-43.

-
-
21. **Morris J.A., Sojka W.j.** (1985) "Escherichia coli as a pathogen in animals" The virulence of *Escherichia coli*. En: Sussman M., London. Society for General Microbiology. Pp 47-78.
22. **Murray P., Bopp C. A., Brenner F. W., Wells J. G., Strockbine N.** (1999). "Escherichia, Shigella and Salmonella". p.459-74. En: Murray P., Baron E., Pfaller M., Tenover F., Tenover F., Tenover F., Yolke R., Pfaller M. A. "Manual of clinical microbiology" ASM Press.
23. **Murray P., Rosenthal K., Kabayashi G., and Pfaller M.** (2002). "Enterobacteriaceae" p. 262-76. En: Murray P., Rosenthal K., Kabayashi G., and Pfaller M. Microbiología medica. Elsevier Science.
24. **Neter E., Westphal O., Luderitz O., Gino R. M., Gorzunck E. A.** (1955). "Demonstration of antibodies against enteropathogenic *Escherichia coli* in sera of children of various ages. Paediatrics. 16:801-7
25. **Olive D. M., Bean P.** (1999) "Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organism" J. Clin. Microbiol. 37:1661-9.
26. **Prager R., Strutz U., Fruth A., Tschäpe H.** (2003) "Subtyping of pathogenic *Escherichia coli* strains using flagellar (H)- antigens: serotyping versus *fliC* polymorphisms" J. Med. Microbiol. 292:477-86.
27. **Ramos M. A., Cabilio G. B., Baquerizo M.** (2006) "Can the *fliC* PCR-restriction length polymorphism technique replace classic serotyping methods for characterizing

-
-
- the H antigen of Enterotoxigenic *Escherichia coli* strains?" J. Clin. Microbiol. 44:1453-8.
28. **Ratiner Y. A.** (1999) "Temperature-dependent flagellar antigen phase variation in *Escherichia coli*" Res. Microbiol. 150:457-63.
29. **Reid S., Selander R., Whittam T.** (1999) "Sequence diversity of flagellin (*fliC*) alleles pathogenic *Escherichia coli*". J. Bacteriol. 153-60.
30. **Riley L. W.** (2004) "Molecular epidemiology of infectious diseases" Distinguishing Psthovars from Nonpathovars: Escherichia coli. ASM PRESS. Washington, D.C.
31. **Rodríguez G.** (2002) "Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*" S. Púb. M. 44:464-75.
32. **Ryan K.** (2004). "Enterobacteriaceae". p. 373-404. En: Ryan K. J., Ray C. G. Sherris. Microbiología Médica: Una introducción a las enfermedades infecciosas. McGraw Hill. México.
33. **Schmidt H., Scheef J., Huppertz H. I., Frosch M., Karch H.** (1999) "*Escherichia coli* O157:H7 and O157:H- strains that do not produce Shiga toxin: phenotypic and genetic characterization of isolates associated with diarrhea and hemolytic-uremic syndrome" J. Clin. Microbiol. 37:3491-96.

-
-
34. **Schoenhals G., Whitfield C.** (1993). "Comparative analysis of flagellin sequences from *Escherichia coli* possessing serologically distinct flagellar filaments with a shared complex surface pattern". J. Bacteriol. 175: 5397-402.
35. **Surdeanu M., Pencu E., Tonciu M, Mihai I and Ciudin L.** (2000). "Differentiation of *Shigella* strains by plasmid profile analysis, serotyping and phage typing". Roum. Arch Microbiol Immunol; 59:103-17.
36. **Sussman M.** (1985). "*Escherichia coli* in Human and animal disease" p 7-46. En: Sussman M. The virulence of *Escherichia coli*. London. Society for General Microbiology.
37. **Tenover F., Arbeit R., Goering RV., Mickelsen PA, Myrray BE., Persing DH and Swaminathan B.** (1995). "Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulse-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial typing". J. Clin. Microbiol 33(9):2233-9.
38. **Van Belkum, A., Struelens, M., De visser A., Verbruugh H and Tibayrenc M.** (2001). "Role of genomic typing in taxonomy, evolutionary genetics and microbial epidemiology reviews" J. Clin. Microbiol. 14:547-60.
39. **Vogel L., Van Oorschot E., Mass HM., Minderhoud B., Dijkshoorn L.** (2000). "Epidemiology typing of *Escherichia coli* using RAPD analysis, ribotyping and serotyping" Clin. Microbiol. Infect. 6:82-7.

-
-
40. **Wang L., Rothmund D., Curd H., Reeves P.** (2003) "Species-wide variation in the *Escherichia coli* flagellin (H-antigen) gene" J. Bacteriol. 185:2936-943.
41. **Whittam T., McGraw E., Reid S.** (1998) *Escherichia coli* O157:H7: A model for emerging infectious diseases". p. 163-83. En: Emerging infectious. USA. Academic Press.
- 44 b) **Wolfgang K., Joklik D.** (1996a). "Enterobacteriaceae: características generales". p. 736-43. 20^a Ed. En: Zinsser. Microbiología medica. Editorial Médica Panamericana. Argentina.
- 45 **Wolfgang K., Joklik D.** (1996b). "Enterobacteriaceae oportunistas". p. 743-58. En: Zinsser. Microbiología Medica. 20^a Ed. Editorial Medica. Panamericana. Argentina.
- 46 **Zhang W., Bielaszewska M., Liesegang A., Tschäpe., Schmidt H., Bitzan H., Karch H.** (2000) "Molecular characteristics and epidemiological significance of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26 strains". J. Clin. Microbiol. 38:2134-40.