

SEROTIPIFICACIÓN Y USO DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA PARA LA CARACTERIZACIÓN Y DETECCIÓN DE GENES INVOLUCRADOS EN LA ADHERENCIA DE *E. COLI* DIARREAGÉNICA.

Arenas-Hernández Margarita María de la Paz^{*1}; Navarro-Ocaña Armando²; Jorge Alberto Valencia de Lima³; Martínez-Laguna Ygnacio¹. ¹Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, ICUP-BUAP. ²Facultad de Medicina, UNAM; México, D.F. ³Licenciatura en Biomedicina, Facultad de Medicina, CICM BUAP. Puebla, Pue, México. maguie10@gmail.com



INTRODUCCION

Existen 5 categorías de *E. coli* que causan diarrea (ECDA) en humanos con diferente tropismo tisular e interacción al enterocito y cuya presencia y/o prevalencia en nuestro país se desconoce ya que no se usan pruebas diagnósticas de rutina. Dentro de ellas se encuentra EHEC, la cual cuenta con 2 factores de virulencia muy importantes, la familia de fimbria polar larga (LPF): *lpf1* y *lpf2*, que participan en la adherencia inicial y colonización. La adhesina intimina, codificada por el gen *eae* es requerida para la clásica lesión intestinal de adherencia y destrucción (A/E) producida por EHEC (FIG1). En este estudio se usaron dos colecciones de cepas de *Escherichia coli* patógenas aisladas de procesos diarreagénicos, las cuales fueron serotipificadas y se diseñó un ensayo de PCR múltiple con el objetivo de detectar la presencia de los genes *lpfA1*, *lpfA2* y los 4 alelos del gen *eae* que codifican para cuatro tipos de intimina: α , β , γ y común (P2).

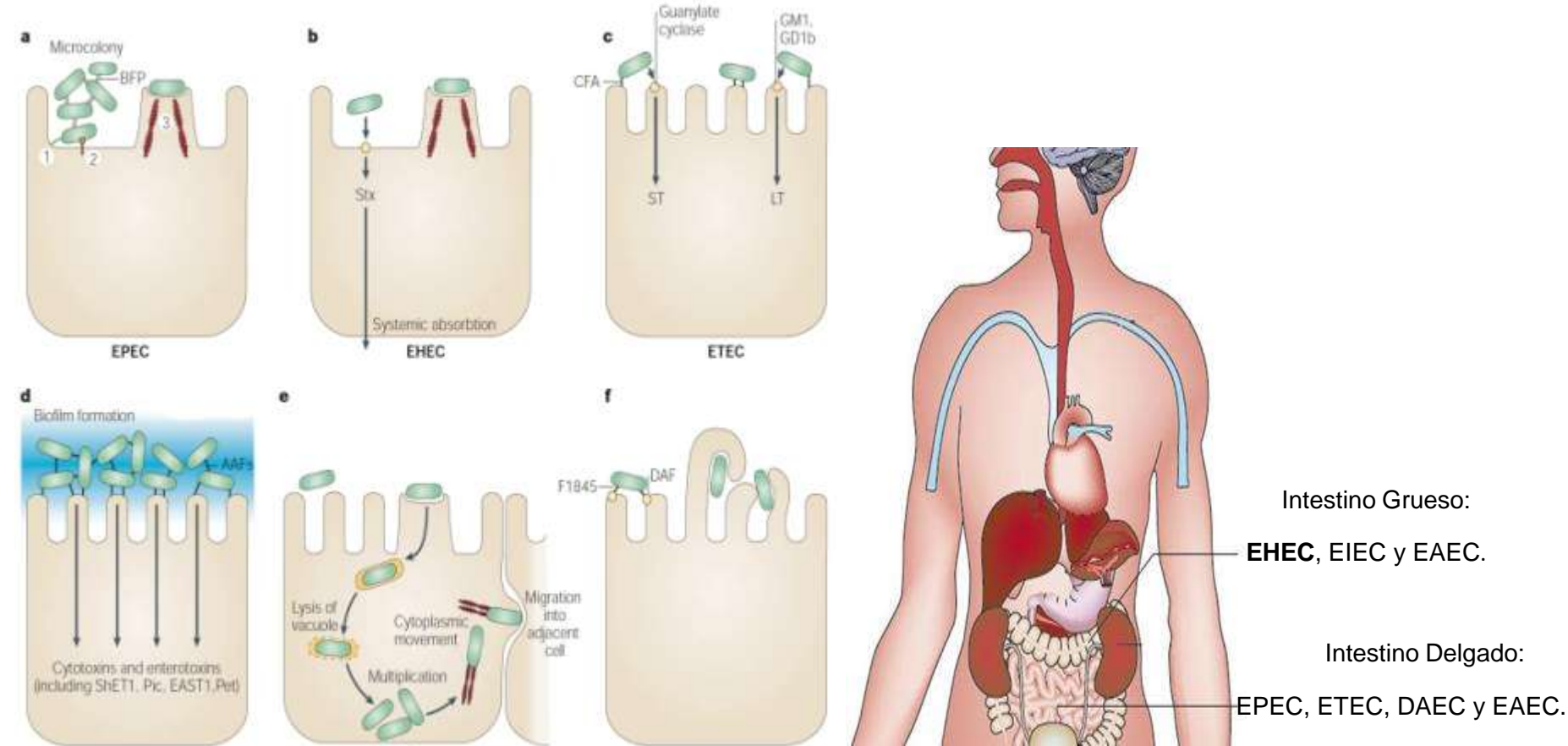
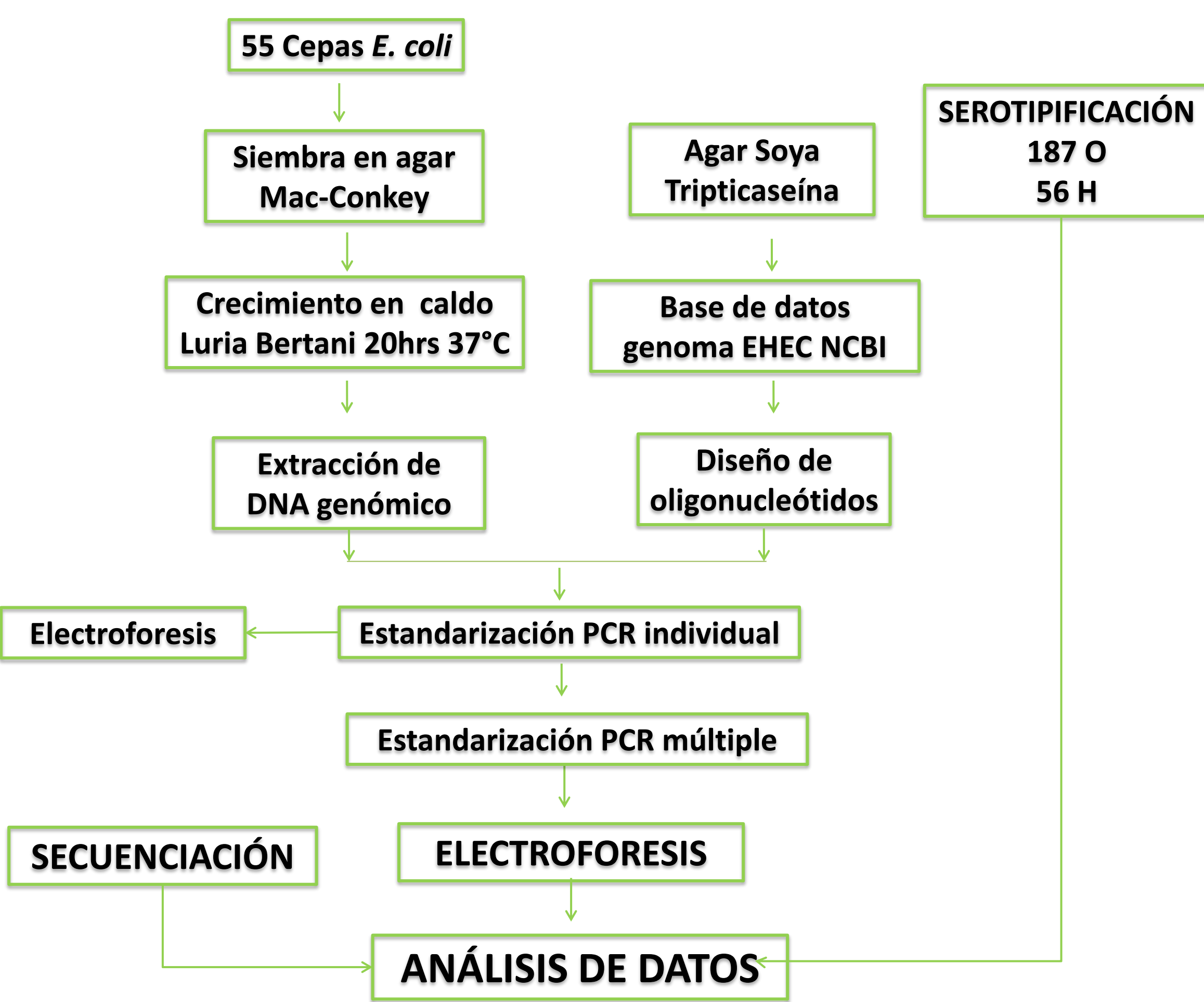


FIG. 1. A. Interacción del enterocito con las diversas categorías de *E. coli* diarreagénicas, B. Sitios de colonización de *E. coli* enteropatógenas (Kaper et al., 2004; Croxen and Finlay, 2010).

OBJETIVOS

Determinar los diferentes patotipos presentes en una colección de cepas de *E. coli* aisladas de procesos gastrointestinales en niños, a través de la determinación del serotipo y de la presencia de los genes *lpf1*, *lpf2*, *eae*.

METODOLOGÍA



RESULTADOS

| Producto | Nombre del gen | Tamaño pb |
|--|----------------------------|-----------|
| <i>lpfA1</i> | Fimbria Polar Larga A1 | 639 |
| <i>lpfA2</i> | Fimbria Polar Larga A2 | 716 |
| <i>eae</i> (región NH ₂ terminal) | Intimina región conservada | 917 |
| <i>eae</i> α | Intimina alelo alfa | 1648 |
| <i>eae</i> γ | Intimina alelo gama | 1770 |
| <i>eae</i> β | Intimina alelo beta | 1926 |

Tabla1. Nombre y tamaño esperado en pares de bases de los productos de amplificación por PCR de los genes *lpfA1*, *lpfA2* y *eae* involucrados en la adherencia de EHEC

| SEROGRUPO "O" | Fc | NOMBRE DE LA CEPA |
|---------------|----|--|
| NT | 11 | PA 12, PA14, PV23, PA49, DIM 24, PV95-1, PV 95-3, PV 92-1, PV 195, PV195-2, PV 137-3 |
| OR | 1 | PV 96-3 |
| O2 | 4 | PA 3, PA 30, DIM 40, PV 184-4 |
| O3 | 1 | HUP 3 |
| O4 | 1 | PA 16 |
| O7 | 1 | PA 25 |
| O8 | 2 | DIM 27, PA13 |
| O11 | 6 | PA 1, PA 15, PA 11, PA 20, PV 92, PV159-1 |
| O18 ac | 2 | DIM 18, DIM 48 |
| O23 | 1 | HUP 22 |
| O25 | 2 | PA 40, HUP 21 |
| O27 | 1 | PA 76 |
| O33 | 1 | PA 24 |
| O44 | 1 | PA 10 |
| O51 | 1 | PV 18 |
| O53 | 1 | PV 200 |
| O55 | 1 | PV 170 |
| O65 | 1 | DIM 33 |
| O73 | 2 | PV 200-1, PV158-4 |
| O86 | 2 | PA 33, PA 18 |
| O105 ab | 1 | PV 200-2 |
| O115 | 1 | PA 41 |
| O117 | 1 | PA 17 |
| O118 | 1 | DIM 20 |
| O120 | 1 | DIM 29 |
| O140 | 1 | HUP 24 |
| O153 | 1 | PA 2 |
| O167 | 1 | HUP 26 |
| O169 | 1 | HUP 25 |

Tabla 2. Serogrupos O de *E. coli* aisladas de procesos diarreicos.

| NOMBRE | Identidad | Categoría* | SEROTIPO O | H | PATOTIPO/CATEGORIA |
|--------------|----------------|------------------|------------|------|--------------------|
| 1. DIM 18 | <i>E. coli</i> | <i>lt</i> | O18 ac | H21 | - |
| 2. DIM 20 | <i>E. coli</i> | <i>lt</i> | O118 | H8 | - |
| 3. DIM 24 | <i>E. coli</i> | <i>lt</i> | NT | NM | - |
| 4. DIM 27 | <i>E. coli</i> | <i>lt</i> | O8 | H3 | UPEC |
| 5. DIM 29 | <i>E. coli</i> | <i>lt</i> | O120 | H25 | - |
| 6. DIM 33 | <i>E. coli</i> | <i>lt/st</i> | O65 | H49 | - |
| 7. DIM 40 | <i>E. coli</i> | <i>lt</i> | O2 | H6 | STEC |
| 8. DIM 48 | <i>E. coli</i> | <i>lt</i> | O18 ac | H2 | - |
| 9. HUP 3 | <i>E. coli</i> | <i>lt</i> | O3 | H3 | - |
| 10. HUP 21 | <i>E. coli</i> | <i>lt/st</i> | O25 | H4 | ExEC |
| 11. HUP 22 | <i>E. coli</i> | <i>lt</i> | O23 | H8 | - |
| 12. HUP 24 | <i>E. coli</i> | <i>lt</i> | O140 | H2 | - |
| 13. HUP 25 | <i>E. coli</i> | <i>LT/escD</i> | O169 | NM | STEC |
| 14. HUP 26 | <i>E. coli</i> | <i>escD</i> | O167 | NM | - |
| 15. PA 1 | <i>E. coli</i> | <i>lt</i> | O11 | H18* | - |
| 16. PA 2 | <i>E. coli</i> | <i>lt</i> | O153 | H40 | - |
| 17. PA 3 | <i>E. coli</i> | <i>lt</i> | O2 | H3 | - |
| 18. PA 4 | <i>E. coli</i> | <i>lt</i> | NT | H10 | - |
| 19. PA 5 | <i>E. coli</i> | <i>lt</i> | NT | H10 | - |
| 20. PA 10 | <i>E. coli</i> | <i>lt</i> | O44 | H18 | EAEC |
| 21. PA 11 | <i>E. coli</i> | <i>lt</i> | O11 | H18* | - |
| 22. PA 12 | <i>E. coli</i> | <i>lt</i> | NT | H19 | - |
| 23. PA 13 | <i>E. coli</i> | <i>lt</i> | O8 | H4 | - |
| 24. PA 14 | <i>E. coli</i> | <i>lt</i> | NT | H9 | - |
| 25. PA 15 | <i>E. coli</i> | <i>lt</i> | O11 | H10 | - |
| 26. PA 16 | <i>E. coli</i> | <i>lt</i> | O4 | H5 | UPEC |
| 27. PA 17 | <i>E. coli</i> | <i>lt</i> | O117 | H30 | - |
| 28. PA 18 | <i>E. coli</i> | <i>lt</i> | O86 | H30 | - |
| 29. PA 20 | <i>E. coli</i> | <i>lt</i> | O11 | H18* | - |
| 30. PA 24 | <i>E. coli</i> | <i>lt</i> | O33 | H19 | - |
| 31. PA 25 | <i>E. coli</i> | <i>lt</i> | O7 | H4 | UPEC |
| 32. PA 30 | <i>E. coli</i> | <i>lt</i> | O2 | H4 | UPEC |
| 33. PA 33 | <i>E. coli</i> | <i>lt</i> | O86 | H18 | - |
| 34. PA 39 | <i>E. coli</i> | <i>lt</i> | NT | NM | - |
| 35. PA 40 | <i>E. coli</i> | <i>lt</i> | O25 | H4 | ? |
| 36. PA 41 | <i>E. coli</i> | <i>lt</i> | O115 | H5 | - |
| 37. PA 76 | <i>E. coli</i> | <i>st/lt</i> | O27 | H51 | - |
| 38. PV 18 | <i>E. coli</i> | <i>escD</i> | O51 | H49 | - |
| 39. PV 23 | <i>E. coli</i> | <i>escD</i> | NT | H9 | - |
| 40. PV 92 | <i>E. coli</i> | <i>hlyA</i> | O11 | H2 | - |
| 41. PV 92-1 | <i>E. coli</i> | <i>escD/hlyA</i> | NT | H21 | - |
| 42. PV 95-1 | <i>E. coli</i> | <i>escD</i> | NT | NT | - |
| 43. PV 95-3 | <i>E. coli</i> | <i>escD</i> | NT | H51 | - |
| 44. PV 96-3 | <i>E. coli</i> | <i>escD</i> | OR | H33 | - |
| 45. PV137-3 | <i>E. coli</i> | <i>escD</i> | NT | H21 | STEC |
| 46. PV154-1 | <i>E. coli</i> | <i>escD</i> | NT | NT | - |
| 47. PV 158-4 | <i>E. coli</i> | <i>escD</i> | O73 | H55 | - |
| 48. PV 159-1 | <i>E. coli</i> | <i>escD</i> | O11 | H18 | - |
| 49. PV 170 | <i>E. coli</i> | <i>hlyA</i> | O55 | NM | STEC |
| 50. PV 184-4 | <i>E. coli</i> | <i>escD</i> | O2 | H16 | - |
| 51. PV 195 | <i>E. coli</i> | <i>hlyA</i> | NT | H4 | - |
| 52. PV 195-2 | <i>E. coli</i> | <i>escD</i> | NT | NT | - |
| 53. PV 200 | <i>E. coli</i> | <i>escD</i> | O53 | H16 | - |
| 54. PV 200-1 | <i>E. coli</i> | <i>escD</i> | O73 | H18 | - |
| 55. PV 200-2 | <i>E. coli</i> | <i>escD</i> | O105ab | H16 | - |

Tabla 3. Serotipos de *E. coli* aisladas de procesos diarreicos.

* Determinada por amplificación de genes *st*, *lt* (ETEC), *escD* (EPEC), *hly A*(EHEC). Maldonado, 2004; Villegas 2005.

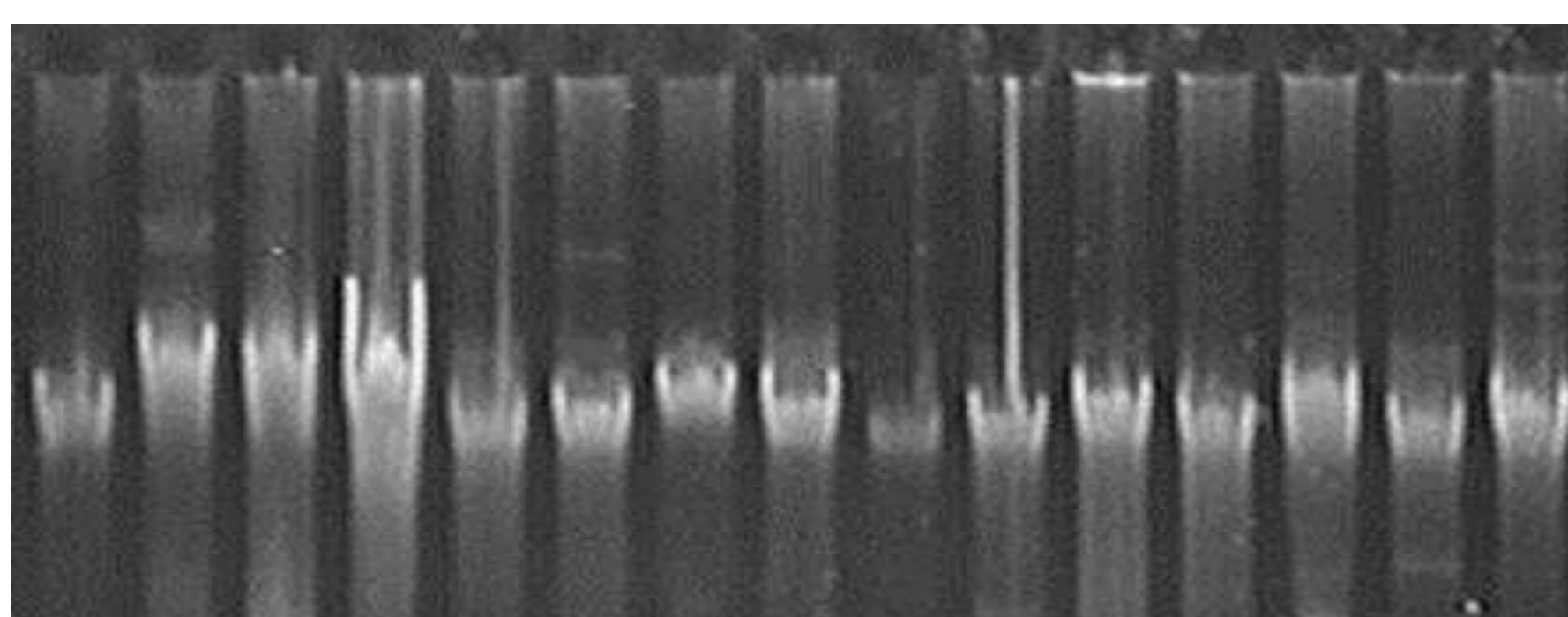


Figura 2. OBTENCIÓN DE DNA TEMPLADO. Electroforesis de DNA genómico en gel de agarosa al 0.7% extraído de cepas de *E. coli* aisladas de procesos diarreicos en niños menores de 5 años.

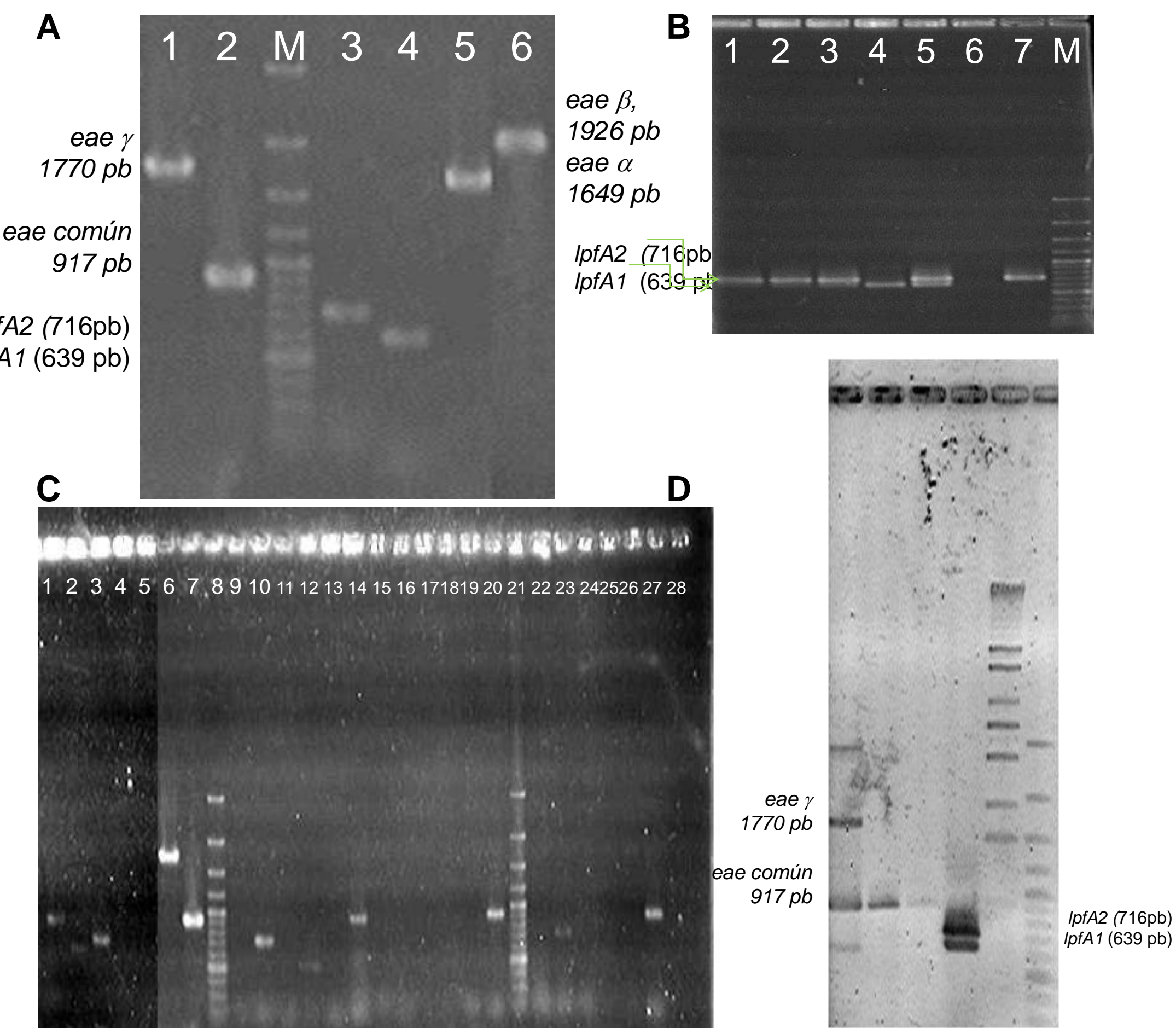


Fig 3. Identificación de factores de adherencia de EHEC por PCR. Geles representativos de PCR individual y múltiple de *lpfA1*, *lpfA2* y *eae* para la cepas control de EPEC E2348, EHEC EDL 933 y 86-24 y cepas problema. A. carril 1, gen *eae* γ (EHEC EDL933); carril 2, gen *eae* común (EDL 933); carril 3 y carril 4, *lpfA2* y *lpfA1* respectivamente (EDL 933); carril 5, gen *eae* α (EPEC E2348/69) y carril 6, gen *eae* β (EHEC 86-24). Carril M, marcador 1 kb (Gene Ruler). B. Electroforesis de PCR múltiple de *lpfA1* y *lpfA2* controles y problema a diversos volúmenes de reacción, carril 1 y 7, *lpfA2* (716 pb) (12.5 y 50 μ l) cepa DIM 22; carril 4, *lpfA1* (639 pb) DIM22 (50 μ l); carril 2 y 3, *lpfA2* (12.5 μ l) cepas Pa-30 y Pa-40; carril 5, *lpfA2* y *lpfA1* (50 μ l) EDL 933; carril 8, 100 pb (Gene Ruler). C. carriles 3 y 10, *lpfA2* (716 pb) cepas DIM 29 y DIM 40. En los carriles 1, 14, 20 y 27, gen *eae* común (917 pb) cepas DIM 27, DIM 33, DIM 29 y DIM 40; carriles 2, 6 y 7, genes *lpfA1*, *eae* γ y *eae* común (EHEC EDL933); carriles 8 y carril 21, 100 pb (Gene Ruler Plus). D. PCR múltiple de *eae* γ y *eae* común carril1, EDL; carril 2, Pa 30; carril3, Pa-3; carril4, PCR múltiple *lpfA2* y *lpfA1*, DIM-22; carril 5, NSty; carril 6, 100pb

| NOMBRE | gen Previamente reportado | SEROTIPO | Intimina | | LPF | |
|------------|---------------------------|----------|-------------------|---------|--------------|--------------|
| | | | Región Conservada | β | <i>lpfA1</i> | <i>lpfA2</i> |
| DIM 22 | <i>lt/st</i> | O96:H46 | | | ✓ | ✓ |
| DIM 27 | <i>lt</i> | O8:H3 | ✓ | | | ? |
| DIM 29 | <i>lt</i> | O120:H25 | ✓ | | | ✓ |
| DIM 33 | <i>lt/st</i> | O65:H49 | ✓ | | | - |
| DIM 40 | <i>lt</i> | O2:H6 | ✓ | | | ✓ |
| CICM-PA 3 | <i>lt</i> | O2:H3 | ✓ | | | ✓ |
| CICM-PA 24 | <i>lt</i> | O33:H19 | ✓ | | | ✓ |
| CICM-PA 30 | <i>lt</i> | O2:H4 | ✓ | ✓ | | ✓ |
| CICM-PA 33 | <i>lt</i> | O86:H18 | | | | ✓ |
| CICM-PA 40 | <i>lt</i> | O25:H4 | | | | ✓ |
| CICM-HUP25 | <i>escD/lt</i> | O169:NM | ✓ | | | ✓ |
| CICM-HUP26 | <i>escD</i> | O167:NM | ✓ | | | ✓ |
| PV-18 | <i>escD</i> | O51:H49 | | ✓ | | - |
| PV-92 | <i>hlyA</i> | O11:H2 | ✓ | | | - |
| PV-184-4 | <i>hlyA</i> | O2:H16 | ✓ | | | - |
| TOTAL | 15 cepas | | 11 | 2 | 1 | 8 |

Tabla 4. Características de cepas de ECDA que amplificaron los genes *lpfA1*, *lpfA2* y *eae*.

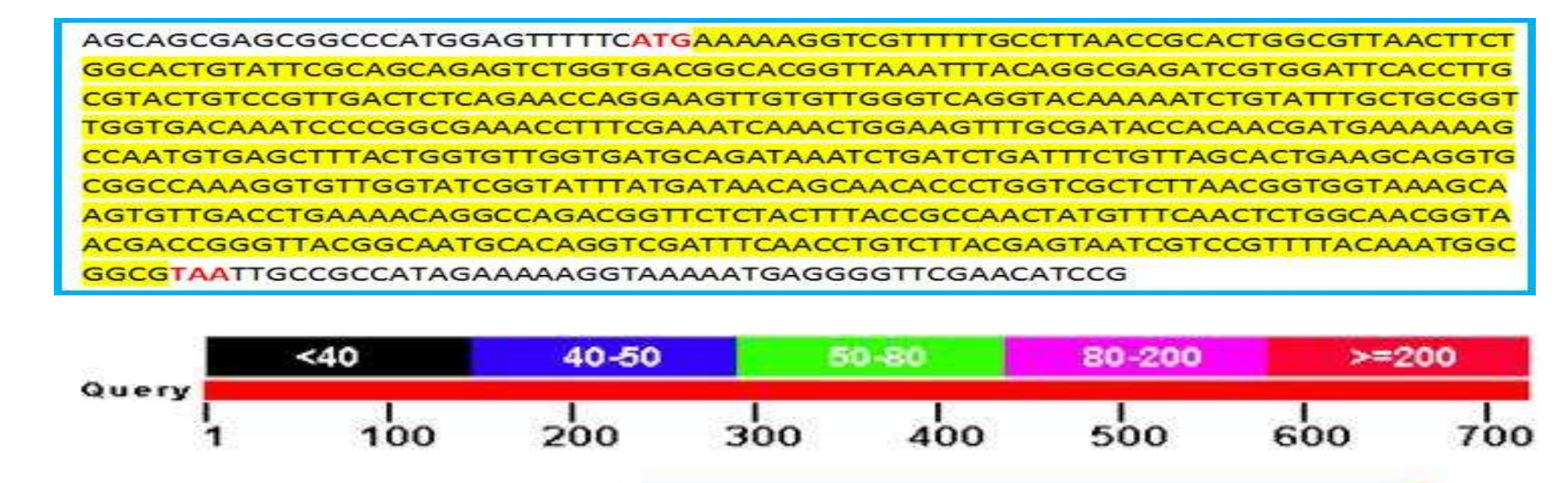


Figura 4. Resultados representativo de secuenciación del producto de PCR *lpfA1* de la cepa DIM 22 y análisis tipo BLAST con el genoma de EHEC O157:H7. ATG: Codón de inicio; TAA: Codón de Paro, secuenciación con oligonucleótido reverso, *lpfA1* con 639 pb. Identidad = 509/526 (97%).

CONCLUSIONES

1. El serogrupo O más frecuente fue el O11 y O2
2. El 82% de las cepas de *E. coli* aisladas de procesos diarreicos en niños, no pertenecen a serotipos reportados para ECDA o ExEC y podrían representar nuevos seropatótipos.
3. La presencia de los genes *lpfA2* está relacionada con cepas que poseen los genes *st*, *lt* o *st/lt*.
4. Los fragmentos de *lpfA1* o *lpfA2* obtenidos por PCR corresponden a las secuencias de bases de los genes respectivos en el genoma de EHEC.
5. Existe una alta probabilidad de que se estén llevando a cabo mecanismos de intercambio genético entre cepas DAEC y ExEC conduciendo al surgimiento de nuevas variantes patógenas de *E. coli*.