



## SEROTIFICACIÓN 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<sup>1</sup>; Navarro-Ocaña Armando<sup>2</sup>; Jorge Alberto Valencia de Lima<sup>3</sup>; Martínez-Laguna Ygnacio<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, ICUAP-BUAP. maguie10@gmail.com, ignacio.martinez@correo.buap.mx

<sup>2</sup>Facultad de Medicina, UNAM; México, D.F. arnava@servidor.unam.mx

<sup>3</sup>Licenciatura en Biomedicina, Facultad de Medicina, CICM BUAP. Puebla, Pue, México.

### RESUMEN

Dentro de las cepas de *E. coli* que causan diarrea (DAEC) en humanos se encuentra EHEC cuya prevalencia en nuestro país se desconoce ya que no se usan pruebas diagnósticas, EHEC cuenta con 2 factores de virulencia importantes: la familia de la fimbria polar larga (LPF), codificada por los genes *lpfA1* y *lpfA2*, que participan en la adherencia inicial y colonización y la íntima, codificada por *eae*, es requerida para la lesión intestinal de adherencia y destrucción (A/E) producida por EHEC. Las cepas de *Escherichia coli* patógenas analizadas fueron aisladas de procesos diarreagénicos en niños. Se diseñó un ensayo de PCR múltiple con el objetivo de detectar los genes *lpfA1* y *lpfA2*, así como los 4 alelos del gen *eae* que codifican para cuatro tipos de íntima:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y común (P2). Como controles se usaron EHECwt EDL 933 (íntima común,  $\gamma$ -íntima, *lpfA1* y *lpfA2*) y EHECwt cepa 86-24 (*eae*  $\beta$ ,  $\gamma$ , P2, *lpfA1* y *lpfA2*). El 84.6% de las cepas no pertenecen a serotipos reportados para los patotipos o categorías DAEC o extraintestinales (ExEC) y podrían representar nuevos serotipos patogénicos. El serogrupo O más frecuente fue el O11 con 11.5%, seguido por el O2 con 7.4%. Los serogrupos flagelares H18 y H4 se presentaron con una frecuencia de 13.5% y 11.5%. Tres cepas (5.8%) pertenecen al serotipo O11:H18 reportado como UPEC del grupo clonal A. La presencia de los genes *lpf* y aquel de la región conservada de la proteína íntima está relacionada con cepas DAEC y es más frecuente en el serotipo O2. El uso de la PCR convencional, múltiple y la secuenciación son importantes para identificar genes de virulencia, esto aunado a los resultados de serotipificación son herramientas para la identificación de los distintos patotipos de *E. coli*.

### 1. INTRODUCCIÓN

*Escherichia coli*, es una bacteria anaerobia facultativa que forma parte de la microbiota intestinal. En individuos sanos *E. coli* no produce ningún daño, sin embargo en personas inmunosuprimidas puede causar enfermedad, convirtiéndose en un microorganismo patógeno.

Las cepas de *E. coli* patógenas parecen haber evolucionado de cepas no patógenas, mediante la adquisición de nuevos factores de virulencia por medio de transferencia horizontal de genes (HGT), los cuales se encuentran con frecuencia organizados en islas de patogenicidad (PAIs) en el cromosoma, en plásmidos, en fagos o en transposones. Múltiples eventos HGT exponen a las bacterias a nuevas presiones selectivas, las cuales eventualmente seleccionan organismos más virulentos que se convierten en epidémicos (Croxen y Finlay, 2010). Para determinar a qué grupo patógeno pertenece *E. coli*, Kauffman desarrolló un esquema de serotipificación que continuamente varía y que actualmente tiene 176 antígenos somáticos (O), 112 flagelares (H) y 60 capsulares (K). El antígeno "O" es el responsable del serogrupo; la determinación del antígeno somático y flagelar (O:H) indica el serotipo, el cual en ocasiones se asocia con un cuadro clínico en particular (Rodríguez, 2002).



Las cepas de *E. coli* que causan diarrea de diversa gravedad en humanos se les conoce como *E. coli* diarreagénicas o ECDA y se dividen en 6 categorías principales: *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) y *E. coli* difuso-adherente (DAEC) (Puente y Finlay, 2001; Kaper *et. al.*, 2004). Las variantes de *E. coli* patógenas están representadas por cepas de serogrupo específico, que poseen un conjunto de factores de virulencia que responsables de las diferentes manifestaciones clínicas que caracterizan a las infecciones por *E. coli*.

Dentro de las cepas de *E. coli* que causan diarrea en humanos se encuentra EHEC, la cual cuenta con 2 factores de virulencia muy importantes. La fimbria polar larga (LPF), codificada por el gen *lpfA*, participa en la adherencia inicial y colonización. La adhesina íntima, codificada por el gen *eae* es requerida para la clásica lesión intestinal de adherencia y destrucción (A/E) producida por EHEC.

## 2. TEORÍA

EHEC es un patógeno no invasivo que después de ser ingerido, pasa a través del estómago y coloniza el intestino grueso en los seres humanos y es a menudo el agente causante de los brotes de gastroenteritis grave en los países desarrollados. Por lo tanto la adherencia es el primer mecanismo que usa EHEC para causar enfermedad, mientras está creciendo en el intestino, EHEC produce toxinas Shiga (Ho *et. al.*, 2008; Croxen y Finlay, 2010). En algunas personas, particularmente en niños menores de 5 años de edad y en adultos de la 3ª edad, la infección por EHEC puede ir de una colitis hemorrágica, con dolor abdominal grave, diarrea con sangre, sin fiebre o con febrícula a causar síndrome urémico hemolítico (Torres, 2008). La ingestión de un inóculo que contenga menos de 100 bacterias puede producir la enfermedad. La enfermedad por EHEC es más frecuente en los meses cálidos, y su mayor incidencia se registra en los niños menores de 5 años. En la mayoría de los casos la infección por EHEC se han atribuido al consumo de carne de res o de otros productos cárnicos crudos o mal cocinados; por otra parte el agua, la leche no pasteurizada o zumos de frutas, verduras crudas, frutas, rábano, lechuga, col, salami, yogurt e incluso el agua clorada también son fuentes que permiten la infección (Puente y Finlay, 2001). En México no se conoce la incidencia real de la infección por EHEC y otras categorías de ECDA.

Fimbria Polar Larga (LPF). EHEC posee dentro de su cromosoma dos regiones homologas con el operón fimbrial *lpf* de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) (Bäumler y Heffron, 1995). Por lo anterior uno de los factores de adherencia más importantes de EHEC hasta ahora descrito se ha denominado: LPF (Long Polar Fimbriae) (Fitzhenry *et. al.*, 2006).

Los dos operones (*lpf1* y *lpf2*) están localizados en diferentes regiones del cromosoma de EHEC O157:H7. El operón *lpf1* (5.9-kb), se localiza en la isla O-141 entre los genes *yhjX* y *yhjW* y está constituido por los genes *lpfABCC'D*. Mientras que *lpf2* (6.9-kb) está en la isla O-154 entre *glmS* y *pstS* y se encuentra conformado por los genes *lpfABCD'D'2*. Mutaciones en uno o ambos loci *lpf* de cepas de *E. coli* O157:H7 han ayudado a demostrar que esta fimbria está involucrada en la colonización del intestino en varios modelos animales (cerdos y ovejas). No se observaron diferencias entre la cepa silvestre y la mutante *lpfA1* con respecto a la excreción fecal y la formación de lesiones A/E. En contraste la doble mutante (*lpfA1* y *lpfA2*) tuvo un menor número de bacterias excretadas que la cepa silvestre y los tejidos de los animales gnotobióticos infectados presentaron una reducción significativa en la lesiones A/E; además de que su presencia influye en el tropismo tisular de *E. coli* O157:H7 en el intestino humano (Torres, 2008).

Íntima. El primer paso en la patogénesis de EHEC involucra una fuerte adherencia de la bacteria a las células epiteliales mediante cambios en el citoesqueleto de la célula huésped, lo que conlleva a la formación subsecuente de la lesión A/E. Esta íntima fase de adhesión es



mediada por una proteína conocida como intimina (Torres *et. al.*, 2004). La mayoría de EHEC y todas las cepas de EPEC producen la adhesina intimina, una proteína de membrana externa de aproximadamente 94 a 97-kDa codificada por el gen *eae* que está localizado dentro de la isla cromosomal LEE. El receptor para la intimina, Tir (Translocated intimin receptor) también está codificado en la isla LEE y se cree que las interacciones entre la proteína intimina y su receptor Tir, regulan la adhesión "intima", promoviendo la polimerización de actina en las células huésped, lo que resulta en la formación del pedestal (Torres *et. al.*, 2005; Ho *et. al.*, 2008).

Se ha demostrado que intimina como factor de adherencia juega un papel importante en la colonización intestinal en modelos animales *in vivo* (Deng *et. al.*, 2004). La existencia de una clara variación en el tropismo celular, entre EHEC que coloniza intestino grueso con EPEC que coloniza el intestino delgado (ambas posee intimina), respaldado por pruebas que sugieren que las diferencias presentes en las secuencias de aminoácidos de las proteínas intimina influyen en el patrón de colonización y tropismo de los tejidos del huésped, así como que los diferentes alelos de intimina se encuentran preferencialmente asociados con serotipos definidos de EHEC y EPEC (Fitzhenry *et. al.*, 2006).

Estudios iniciales utilizando enfoques genéticos e inmunológicos, aportaron pruebas de la existencia de al menos cuatro tipos distintos de intimina conocidos como intimina  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ . Un estudio posterior reveló la presencia de un quinto tipo, intimina  $\epsilon$ , en cepas de *E. coli* del serogrupo O103. (Torres *et. al.*, 2009).

Se han identificado varios polimorfismos dentro del gen *lpfA*, los cuales se utilizaron para clasificar al gen de la subunidad principal de la fimbria en diferentes variantes, *lpfA1* (1,2,3,4,5) y *lpfA2* (1,2,3). De esta manera se logró determinar que *lpf* no solo se encuentra en EHEC O157:H7, si no que puede estar presente en una variedad de cepas y serotipos específicos. Lo anterior sugiere la existencia de una relación entre el tipo *lpfA* y el grupo filogenético bacteriano. Por otra parte en el mismo estudio se demostró que los genes de LPF, en combinación con los diferentes alelos de intimina ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) son marcadores confiables para la identificación de EHEC O157:H7 y otras cepas patógenas de *E.coli* (Torres *et. al.*, 2009).

### 3. PARTE EXPERIMENTAL

**Material Biológico.** Las cepas que se utilizaron como controles positivos en los ensayos de PCR múltiple fueron: EPEC prototipo (WT), cepa E2348/69 serotipo, O127: H6, EHEC prototipo (WT), cepa EDL933 serotipo O157: H7 y EHEC prototipo (WT), EHEC 86-24, serotipo O157:H7. De los estudios de Maldonado (2004) y Villegas (2005), se trabajaron 52 cepas de *E. coli* aisladas de niños menores de 5 años que cursaban con procesos diarreicos

**Cultivos Bacterianos.** Se inocularon 5 ml de medio LB con 10  $\mu$ l de cultivos almacenados en crioviales. También se usó agar MacConkey para verificar la morfología colonial. El cultivo en caldo se incubó a una temperatura de 37°C en agitación continua durante 20 horas.

**Serotipificación.** Se tomó una colonia y se resembró en Agar Soya Trypticase (TSA). Se dejó incubando (sin agitación) toda la noche a 37°C. Se siguió el método propuesto por Orskov (1984) y recientemente actualizado por Scheutz *et. al.*, 2004. Se usaron 181 antisueros somáticos y 56 anti-flagelares que corresponden al esquema antigénico de *E. coli*,

**Extracción de DNA.** La extracción de DNA genómico se realizó mediante la técnica de Tiocinato de Guanidina. Se obtuvo un paquete celular a partir de 5 ml de LB crecido en agitación a 37 °C durante toda la noche. Al finalizar la extracción la pastilla se resuspendió en un volumen final de 75  $\mu$ l en Agua Pura estéril.

**Electroforesis de DNA genómico.** Las muestras del DNA genómico se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 0.7 %. El corrimiento electroforético se realizó a un voltaje de 90 voltios por 1 hora en buffer TAE 0.5 X. Finalizada la corrida los geles fueron colocados en Bromuro de Etidio (GIBCO BRL Life Technologies, Grand Island, N.Y.) para revelar los



patrones de ADN, los cuales se observaron con ayuda de un transiluminador de luz ultravioleta (UVP inc.) conectado a un sistema de cómputo.

Oligonucleótidos. El diseño y las características de los oligonucleótidos como son la secuencia, el tamaño del amplicón, la temperatura de fusión ( $T_m$ ), el % de guanina-citosina (%G-C), la formación de dímeros y de horquillas fueron calculadas a través del programa Primer Select del software DNASTar. A partir de la secuencia genética del NCBI, se diseñaron 2 pares de oligonucleótidos para amplificar los genes *lpfA1* (132587B04 y 132587B05) y *lpfA2* (132587B06 y 132587B07). Los oligonucleótidos de *lpfA1* amplificaron un fragmento de 639 pb; los de *lpfA2* amplificaron un fragmento de 716 pb. Los oligonucleótidos reversos *eae* P2, *Eco*  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  respectivamente y el oligonucleótido delantero común *eae* P1, fueron usados en la PCR para identificar los alelos del gen *eae* que codifican para Intimina  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  (Reid *et. al.*, 1999). Todos los oligonucleótidos se prepararon a una concentración de 25  $\mu$ M. Las alícuotas se almacenaron a  $-20$  °C hasta el momento de su utilización.

Amplificación por PCR. Los oligonucleótidos se diseñaron para amplificar simultáneamente los 2 genes *lpfA* (*lpfA1* y *lpfA2*), así como 4 alelos del gen de Intimina (P1,  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ) en una sola reacción. Para ello se creó un programa para PCR individual basado tanto en las condiciones de amplificación descritas por Reid (1999) así como en las estandarizadas en nuestro grupo de trabajo en ensayos previos. Posteriormente, se establecieron las condiciones de reacción para amplificar todos los genes mediante PCR múltiple. En la electroforesis en gel de agarosa se usaron 4  $\mu$ l del producto de PCR más 2  $\mu$ l de buffer de carga. Para corroborar el tamaño de los fragmentos obtenidos, se utilizaron los marcadores de peso molecular Gene Ruler Plus 100 pares de bases y Gene Ruler 1 kb de Fermentans.

Secuenciación. Algunas muestras de PCR individual fueron purificadas y resuspendidas en un volumen final de 40  $\mu$ l, utilizando tubos de Microcon YM-10 (10,000 NMWL) o precipitación con glucógeno. Los oligonucleótido LPFA1PCRM-61F y LPFA1PCRM+578R se utilizaron para la secuenciación del gen *lpfA1* (cepa Dim 22). Los oligonucleótidos LPFA2PCRM-73F y LPFA2PCRM-643R se usaron para secuenciar el gen *lpfA2*. La secuenciación automatizada de DNA, se llevó a cabo en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

#### 4. CONCLUSIONES

- El serogrupo O más frecuente fue el O11 y O2
- 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 serotipos.
- La presencia de los genes *lpfA2* está relacionada con cepas que poseen los genes *st*, *lt* o *st/lt*.
- Los fragmentos de *lpfA1* o *lpfA2* obtenidos por PCR corresponden a las secuencias de bases de los genes respectivos en el genoma de EHEC.
- 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 patogénicas de *E. coli*.

#### BIBLIOGRAFÍA

1. Croxen, M.A., and Finlay, B.B. 2010. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature*. 8:26–38.
2. Deng, W., Puente, J.L., Gruenheid, S., Li, Y., Vallance, B.A., Barba, A.V.J., Ibarra, J.A., O'Donnell, P., Metalnikov, P., Ashman, K., Lee, S., Goode, D., Pawson, T.,





- and Finlay, B.B. 2004. Dissecting virulence: Systematic and functional analyses of a pathogenicity island. *PNAS*. 101:3597–3602.
3. Fitzhenry, R., Dahan, S., Torres, A.G., Chong, Y., Heuschkel, R., Much, S.H., Thomson, M., Kaper, J.B., Frankel, G., and Phillips, A.D. 2006. Long polar fimbriae and tissue tropism in *Escherichia coli* O157:H7. *Microbes Infect.* 8:1741–1749.
  4. Ho, T.D., Davis, B.M., Ritchie, J.M., and Waldor, M.K. 2008. Type 2 secretion promotes enterohemorrhagic *Escherichia coli* adherence and intestinal colonization. *Infect. Immun.* 76:1858–1865.
  5. Jordan, D. M., Cornick, N., Torres, A.G., Dean-Nystrom, E.A., Kaper, J.B., and Moon, H.W. 2004. Long polar fimbriae contribute to colonization by *Escherichia coli* O157:H7 in vivo. *Infect. Immun.* 72:6168–6171.
  6. Kaper, J.B., Nataro J.P., and Mobley, H.L.T. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews*. 2:123–140.
  7. Maldonado, L.F. 2004. Uso de la PCR múltiple para la identificación de *Escherichia coli* diarreagénicas. Tesis de Licenciatura. BUAP. 1–97.
  8. Puente, J.L., and Finlay, B.B. 2001. Pathogenic *Escherichia coli*. p. 387–457. In E. A. Groisman (ed.). *Principles of Bacterial Pathogenesis*. Academic Press, San Diego, Calif.
  9. Reid, S.D., Betting, D.J., and Whittam, T.S. 1999. Molecular detection and identification of intimin alleles in pathogenic *E. coli* by Multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 37:2719–2722.
  10. Rodríguez, A.G. 2002. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pública*. 44:464–475.
  11. Torres A.G., Zhou, X., and Kaper, J.B. 2005. Adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* strains to epithelial cells. *Infect. Immun.* 73:18–29.
  12. Torres, A.G. 2008. Intestinal pathogenic *Escherichia coli*. Elsevier Inc., Chapter 5:1003–1020.
  13. Torres, A.G., Blanco, M., Valenzuela, P., Slater, T.M., Patel, S.D., Dahbi, G., Lopez, C., Fernandez, B.X., Blanco, J.E., Gomes, A.T., Vidal, R., and Blanco, J. 2009. Genes related to long polar fimbriae of pathogenic *Escherichia coli* strains as reliable markers to identify virulent isolates *J. Clin. Microbiol.* 47:2442–2451.
  14. Villegas, R.M. 2005. Frecuencia de agentes diarreagénicos en una población pediátrica de la ciudad de Puebla. Tesis de Master de Laboratorio Clínico. BUAP. 1–57.