

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

UNIDAD DE POSTGRADO

**Asociación de variabilidad genética y fenotípica de
Escherichia coli enteropatógena (EPEC) con cuadros
de diarrea en niños menores de un año**

TESIS

para optar al grado académico de Magíster en Biología Molecular

AUTOR

Carmen Adriana Contreras García

Lima- Perú

2010

A MI MADRE:

Para la mujer que me apoyó todos estos años, por su infinito amor, comprensión y apoyo. Por soportar estos años lejos de ella, por acompañarme en los buenos y malos momentos, por ayudarme a que este momento llegara. Con todo amor y gratitud, gracias, por haberme dado lo mejor de tu existencia.

A NOELIA, ALEX y JULIO CÉSAR:

Por que son la razón de muchas sonrisas y alegrías.

A PUQUI:

Aunque no vayas a leer esto nunca, eres una parte importante de mi vida, contigo puedo ser yo misma sin reproches.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi familia por su amor, comprensión y apoyo incondicional siempre.

También quiero agradecer especialmente a la Dra Theresa Ochoa, quien me dió la oportunidad de pertenecer a su grupo de trabajo, por confiar en mí, por su tiempo, por su apoyo incondicional siempre, por sus valiosos consejos, por dejarme aprender de ella y sobretodo por su amistad.

A los doctores Pablo Ramirez (UNMSM), José Luis Puente (UNAM), Victor Bustamante (UNAM) por su apoyo, confianza, por permitirme trabajar a su lado, aprendiendo en cada momento de su experiencia, por sus sabios consejos y acertadas sugerencias durante el desarrollo de la tesis.

De manera especial quiero agradecer a Julio César, que con su apoyo y compañía hizo que los momentos de trabajo fueran confortables.

A la Red de Macrouiversidades de América Latina y el Caribe (RedMacro) por el apoyo para realizar una estancia de un semestre académico en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

De igual manera agradezco a mis compañeros y amigos del Instituto de Medicina Tropical A v H, Oscar Nolasco, David Durand, Michael Talledo, César Sanchez, Erick Mercado, Maribel Riveros, Angela Lluque y Salvador Briceño y del Instituto de Biotecnología-UNAM, Verónica Martinez, Francisco Santana, Miguel De la Cruz y Magdalena Wiesner, quienes compartieron conmigo sus conocimientos, amistad y experiencia.

A los profesores revisores y a los miembros del jurado: Mg Patricia Wollt, Mg. Ruth García, Mg. Débora Alvarado y Mg, Susana Guitierrez por sus sabias observaciones e indicaciones.

A la Sra. Dora Aguilar, por que gracias a su ayuda pude terminar los muchos trámites de la documentación correspondiente.

A mis amigos en general a quienes no menciono por el temor de olvidarme de alguno, quiero agradecerles por su sincera amistad y por los tantos recuerdos de momentos que vivimos juntos.

Carmen

ABREVIATURAS

aEPEC	EPEC atípica
Amp	Amperios
APS	Persulfato de amonio
BODIPI	boron-dipyrromethene
°C	Grados Celsius
DA	Patrón de Adherencia difusa
DAEC	<i>E. coli</i> difusamente adherente
DAPI	4,6'-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride
DEC	<i>E. coli</i> diarregogénicas
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
ADN	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxiribonucleósido trifosfato
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EAEC	<i>E. coli</i> enteroagregativa
EHEC	<i>E. coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>E. coli</i> enteroinvasiva
ETEC	<i>E. coli</i> enterotoxigénica
EPEC	<i>E. coli</i> enteropatogénica
FBS	Suero fetal de bovino
g	gramos
h	horas
IS	Fenotipo de cepas aisladas
HBSS	Solución salina tamponada de Hank's
HEp-2	Human epidermoid carcinoma cells
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HCl	Ácido clorhídrico
IS/NA	Patrón de adherencia de bacterias aislada o no adherencia
kb	Kilobases
kDa	Kilodaltons
L	Litro

LA	Patrón de adherencia localizada
LAL	Patrón de adherencia similar a la localizada
M	Molar
mA	Miliamperios
mL	Mililitro
mM	Milimolar
min	Minutos
pb	Pares de bases
rpm	Revoluciones por minuto
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
qPCR	PCR en tiempo real
RFLP	Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción
SDS	Dodecil Sulfato Sodio
seg	Segundos
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
T°	Temperatura
tEPEC	EPEC típica
µg	Microgramo
µL	Microlitro
V	Voltios

ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN.....	14
ABSTRACT	16
I.- INTRODUCCIÓN.....	18
II.-ANTECEDENTES.....	21
III. HIPÓTESIS.....	32
IV. OBJETIVOS	32
V.- METODOLOGÍA.....	33
V.1 Aislamiento e Identificación de EPEC	33
V.1.1 Descripción de la población	33
V.1.2 Aislamiento de EPEC	33
V.1.2 Análisis mediante multiplex PCR en tiempo real	34
V.1.3 Almacenamiento de las cepas de EPEC.....	36
V.2 Amplificación por PCR de los genes <i>eae</i>, <i>bfpA</i> y <i>perA</i>.....	36
V.2.1 Amplificación del gen <i>eae</i> (intimina)	37
V.2.2 Amplificación del gen <i>bfpA</i>.....	38
V.2.3 Amplificación del gen <i>perA</i>.....	39
V.2.4 Control interno de la PCR.....	41
V.3 Polimorfismo de Longitud de fragmentos de Restricción-RFLP	41
V.3.1 Identificación de los patrones de RFLP usando herramientas <i>in silico</i>	41
V.3.2 RFLP del gen <i>eae</i> (intimina).....	42
V.3.3 RFLP del gen <i>bfpA</i>.....	42
V.3.4 RFLP del gen <i>perA</i>.....	43
V.3.5 Controles positivos de los RFLP	44
V.4 Evaluación de los fenotipos de AE y Adherencia Localizada.....	44
V.4.1 Preparación de las células HEP-2	45
V.4.2 Preparación de la suspensión bacteriana.....	45
V.4.3 Infección de las células Hep-2.....	45
V.4.3.1 Tinción fluorescente de actina (FAS).....	46
V.4.3.2 Ensayo de patrón de adherencia a células HEp2	46
V. 5 Análisis del perfil de proteínas secretadas.....	47
V.5.1 Cultivo de bacterias	47

V.5.2 Extracción de proteínas secretadas	48
V.5.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS-PAGE	48
V.6 Construcción de fusiones transcripcionales usando el reportero CAT	49
V.6.1 Análisis de las resistencias a antibióticos.....	49
V.6.2 Cambio de marcador de selección en las fusiones.....	49
V.6.3 Extracción del casete de resistencia a kanamicina.....	51
V.6.4 Ligación.....	52
V.7 Transformación de las cepas de EPEC	52
V.8 Análisis de las transformantes.....	53
V.8.1 Purificación del ADN plasmídico.....	53
V.8.2 Extracción del fragmento insertado usando enzimas de restricción	54
V.8.3 Cepas y plásmidos usados	54
V.9 Medición de la actividad transcripcional de los promotores de LEE2 y <i>bfpA</i>	55
V.9.1 Ensayo de CAT	55
V.9.2 Cuantificación de proteínas	55
V.10 Análisis estadístico	56
V.11 Aspectos éticos.....	57
VI- RESULTADOS	58
VI.1 Identificación de EPEC	58
VI.2 Evaluación de la Amplificación por PCR de los genes <i>eae</i> , <i>bfpA</i> y <i>perA</i>	58
VI.3 Diferenciación de la población de EPEC	60
VI.4 Evaluación de la extracción de ADN.....	62
IV.5 Análisis de los RFLP	62
IV.6 Frecuencias de patrones de adherencia de las EPEC	73
IV.7 Evaluación de la capacidad para polimerizar actina	75
IV.8 Análisis del Perfil de Proteínas de Secreción	77
VI. 7 Evaluación de la actividad transcripcional usando el reportero CAT	83
VII.- DISCUSIÓN	93
VIII. CONCLUSIONES.....	103
IX. RECOMENDACIONES.....	105
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106
XI.- ANEXOS	114

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Fenotipo Adherencia y Efacelamiento causado por EPEC.....	21
Figura 2. Representación esquemática del mecanismo a través del cual Ler antagoniza la represión ejercida por H-NS sobre los promotores de la región LEE	29
Figura 3. Representación esquemática de la red reguladora que modula la expresión de <i>ler</i>	29
Figura 4. PerC y GrlA representan rutas alternativas de activación de <i>ler</i> en EPEC en respuesta a diferentes condiciones de crecimiento.....	31
Figura 5. Placas de agar MacConkey.	33
Figura 6. Multiplex PCR a tiempo real para el diagnóstico de las <i>E. coli</i> dirrogénicas.	34
Figura 7. Medios de almacenamiento de las cepas.....	36
Figura 8. Localización de lo cebadores para amplificar el gen <i>eae</i>	37
Figura 9. Localización de lo cebadores para amplificar el gen <i>bfpA</i>	38
Figura 10. Localización de lo cebadores del gen <i>perA</i>	39
Figura 11. Mapa génico del plásmido pKK232-8.....	50
Figura 12. Mapa génico del plásmido pUC4K, usado para la obtención de el casete de resistencia a kanamicina	51
Figura 13. Estandarización de temperatura de hibridación del gen <i>eae</i>	59
Figura 14. Estandarización de temperatura de hibridación del gen <i>bfpA</i>	59
Figura 15. Estandarización de temperatura de hibridación del gen <i>perA</i>	60
Figura 16. RFLP del gen <i>eae</i> con la enzima <i>AluI</i>	63
Figura 17. RFLP del gen de <i>eae</i> con la enzima <i>BstNI</i>	63
Figura 18. RFLP del gen <i>bfpA</i> con la enzima <i>AluI</i>	64
Figura 19. RFLP del gen <i>perA</i> con las enzimas <i>DdeI</i> y <i>Sau96I</i>	65
Figura 20. Distribución de los alelos de intimina (<i>eae</i>) de acuerdo a la duración del episodio de diarrea.	73
Figura 21. Patrones de adherencia encontrados en la población de EPEC.....	74
Figura 23. Perfiles de proteínas secretadas por cepas de EPEC aisladas de la población	78

Figura 24. Digestión del plásmido pUC4K con la enzima <i>Pst</i> I	84
Figura 25. Digestión de los plásmidos pCAT232 y pSEPZ11 con <i>Bam</i> H y <i>Hind</i> III.....	85
Figura 26. Digestión de los plásmido pUC4K, pCAT232 y pSEPZ11	86
Figura 27. Digestión parcial del plásmido pSEPZ11.....	86
Figura 28. Fragmentos purificados luego de la digestión con <i>Pst</i> I.....	87
Figura 29. Plásmidos con resistencia a kanamicina	88
Figura 30. Purificación de los plásmidos con resistencia a kanamicina.....	88
Figura 31. Plásmidos pCAT232 Km ^r y pSEPZ11 Km ^r digerido con <i>Pst</i> I.....	89
Figura 32. Actividades transcripcionales del operon LEE2 transformado con la fusión pSEPZ11 Km ^r	91
Figura 33. Actividades transcripcionales del operon <i>bfp</i> transformado con la fusión pCAT232 Km ^r	92

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Concentración de cada componente del <i>master mix</i> usado en el multiplex qPCR para las <i>E. coli</i> diarreogénicas.....	35
Tabla 2. Temperaturas y tiempos usados en el programa del multiplex qPCR para las <i>E. coli</i> diarreogénicas	35
Tabla 3. Concentración de componentes en el <i>master mix</i> para la PCR del gen <i>eae</i>	38
Tabla 4. Concentración de componentes en el <i>master mix</i> usados en la PCR del gen <i>bfpA</i>	39
Tabla 5. Concentración de componentes en el <i>master mix</i> usado en la PCR del gen <i>perA</i>	40
Tabla 6. Cebadores usados en el desarrollo de los protocolos de PCR para amplificar los genes <i>bfpA</i> , <i>eae</i> y <i>perA</i>	40
Tabla 7. Protocolos de PCR usados para la amplificación de los genes <i>bfpA</i> , <i>eae</i> , <i>perA</i> y <i>mdh</i>	41
Tabla 8. Concentración de componentes en la mezcla para el RFLP del gen <i>eae</i>	42
Tabla 9. Concentración de componentes en la mezcla para el RFLP del gen <i>bfpA</i>	43
Tabla 10. Concentración de componentes en la mezcla para el RFLP del gen <i>perA</i>	43
Tabla 11. Componentes de los geles de acrilamida usados en el SDS-PAGE	48
Tabla 12. Concentración de componentes en la mezcla usada en la ligación	52
Tabla 13. Concentración de componentes en la mezcla usada en la digestión de los plásmidos recombinates	54
Tabla 14. Total de cepas de EPEC aisladas de muestras de heces de niños con diarrea y controles sanos	58
Tabla 15. Total de cepas de EPEC diferenciadas en tEPEC y aEPEC de acuerdo a la presencia/ausencia del gen <i>bfpA</i>	61
Tabla 16. Distribución de genes de virulencia entre cepas tEPEC y aEPEC aisladas de diarreas y controles.....	61
Tabla 17. Distribución de cepas EPEC aisladas (Diarrea y Control) agrupadas por tipo de cultivo.....	62
Tabla 18. Frecuencia de alelos del gen <i>eae</i> encontrados en las EPEC de casos de diarrea y controles	66
Tabla 19. Frecuencia alélica del gen <i>bfpA</i> en casos de diarrea y controles de tEPEC.....	67

Tabla 20. Frecuencia alélica del gen <i>perA</i> en casos de diarrea y controles de tEPEC y aEPEC	67
Tabla 21. Tipos de EAF según la combinación de alelos de <i>bfpA</i> y <i>perA</i> en cepas de <i>E. coli</i> tEPEC y aEPEC.....	70
Tabla 22. Distribución de los alelos del gen <i>eae</i> de las cepas de EPEC de acuerdo a la duración del episodio.....	71
Tabla 23. Distribución de los alelos del gen <i>eae</i> de las cepas de EPEC por grupos etarios	71
Tabla 24. Características clínicas de los episodios de diarrea de cepas de tEPEC, agrupados de acuerdo a la presencia del gen <i>perA</i> *	72
Tabla 25. Características clínicas de los episodios de diarrea de cepas de EPEC, agrupados por alelos de <i>eae</i> **	72
Tabla 26. Tipo de patrones de adherencia de las cepas de EPEC aisladas en la población	75
Tabla 27. Polimerización de actina de las cepas de EPEC aisladas en la población	76
Tabla 28. Resumen del perfil de secreción de proteínas entre las cepas tEPEC y aEPEC	79
Tabla 29. Grupos de perfiles de proteínas de secreción según la condición de cultivo en agitación y en estático	80
Tabla 30. Perfil de proteínas secretadas de las cepas de EPEC estudiadas	82
Tabla 31. Frecuencia de proteínas secretadas dentro de la población de EPEC.....	83

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1: Número de acceso de las secuencias de ADN de los alelos de <i>eae</i>	114
Anexo 2. Patrones de restricción del producto de PCR <i>eae-escD</i> bajo un RFLP convencional con las enzimas <i>AluI</i> y <i>BstNI</i>	115
Anexo 3 A. Patrones de restricción del producto de PCR de <i>bfpA</i> obtenidos mediante un RFLP convencional.	116
Anexo 3 B. Patrones de restricción del producto de PCR de <i>perA</i> obtenidos mediante un RFLP convencional.	116
Anexo 4. RFLP del gen <i>eae</i> con <i>AluI</i> . Las muestras pertenecen a los casos de diarrea obtenidos en el estudio de cohorte.	117
Anexo 6. Lista de cepas prototipo usadas como control positivo en los ensayos de RFLP.	118
Anexo 7. Composición de los medios de cultivo celular usados.....	119
Anexo 8. Aprobación del Comité de Ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.....	120
Anexo 9: Perfiles de proteínas secretadas de cepas aisladas de población.....	121

RESUMEN

Escherichia coli enteropatógena (EPEC) se encuentra entre una de las principales causantes de diarrea en niños de países en vías de desarrollo, estas bacterias pueden ser clasificadas en típicas (tEPEC) y atípicas (aEPEC) dependiendo de la presencia o ausencia de un plásmido llamado EAF (*E. coli adherence factor*), respectivamente. El objetivo de este estudio fue describir la diversidad alélica de genes de virulencia de EPEC, el fenotipo, y su relación con las características clínicas. Se analizaron 120 cepas de EPEC aisladas de un estudio de cohorte en niños menores de un año en Lima. Utilizando la técnica de PCR-RFLP se caracterizaron los alelos de los genes *eae* (intimina), *bfpA* (proteína bundlina del *bundle-forming pilus*) y *perA* (*plasmid encoded regulator*). El fenotipo de EPEC fue evaluado mediante la precipitación de proteínas secretadas (EspA, EspB, EspD y EspC), el ensayo de adherencia y el ensayo de polimerización de actina (FAS). Las cepas aEPEC (*eae+*, *bfp-*) fueron más comunes, tanto en casos de diarrea (54/74, 73%) como en controles (40/46, 87%). Del total de cepas evaluadas se encontraron 13 alelos del gen *eae*; los más frecuentes fueron: beta (34/120, 28%), theta (24/120, 20%), kappa (14/120, 12%) y mu (8/120, 7%). Se encontraron 5 alelos de *bfpA*; los más frecuentes fueron: beta1/7 (10/26), alpha (7/26) y beta5 (3/26). El alelo gamma del gen *eae* fue el más frecuente entre los episodios de diarrea de larga duración (> 7 días) que en los de menos duración (3/26, 12% vs. 0/48, 0%, $p<0.05$). Por otro lado, el alelo kappa del gen *eae* está relacionado con un puntaje clínico más severos en comparación a otros alelos ($p<0.05$).

De los cuatro patrones de adherencia encontrados LA (adherencia localizada); LAL (similar a la LA); DA (adherencia difusa) y IS/NA (bacterias aisladas/no adherencia), el patrón LA se encontró muy frecuente en las tEPEC (*eae+*, *bfpA+*) versus las aEPEC dentro de los casos de diarrea (6/8, 75% vs. 2/38, 5%, $p<0.05$), mientras el patrón IS/NA estuvo relacionado a las aEPEC versus las tEPEC en los casos de diarrea (26/38, 68% vs. 1/8, 13%, $p<0.05$). Se encontró que la polimerización de actina estuvo más relacionada a las tEPEC que a las cepas aEPEC en los casos de diarrea (6/8, 75% vs. 1/38, 3%, $p<0.05$).

Se observó que las cepas EPEC que secretan todas las proteínas evaluadas están significativamente relacionadas a casos de diarrea, comparado con otros perfiles de secreción. La proteína secretada más frecuente fue EspB/D (23/42,

50%) y EspA estuvo más asociada a casos de diarrea que a los controles fue (21/42, 50% vs 0/15, 0%).

La evaluación del genotipo muestra que en niños peruanos los genes de virulencia de las cepas EPEC son altamente variables. La evaluación del fenotipo puede ayudar a determinar las EPEC más relacionadas a una alta virulencia. Se necesitan más estudios para evaluar marcadores de virulencia adicionales y determinar si existe alguna relación específica entre variantes y las características clínicas de la enfermedad.

Palabras clave: diarrea, EPEC, genes de virulencia, fenotipo y variabilidad.

ABSTRACT

Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) strains are amongst the major causes of infantile diarrhea in developing countries and can be classified as typical (tEPEC) atypical (aEPEC), depending on the presence or absence of the *E. coli* adherence factor plasmid (pEAF), respectively. The aim of this study was to describe the allelic diversity of critical virulence EPEC genes, phenotype; and the association of these results with clinical characteristics. 120 EPEC strains isolated from a cohort diarrhea study in Peruvian children were characterized for the allele of *eae* (intimin), *bfpA* (bundling pilin protein of bundle-forming pilus) and *perA* (plasmid encoded regulator) genes by PCR-restriction fragment length polymorphism. The EPEC phenotype was evaluated using, the protein precipitation assay (EspA, EspB, EspD y EspC), the adherence and the actin polymerization assay (FAS). aEPEC strains (*eae+*, *bfp-*) were the most common pathotype in diarrhea (54/74, 73%) and control samples from children without diarrhea (40/46, 87%). Overall there were 13 *eae* alleles; the most common were beta (34/120, 28%), theta (24/120, 20%), kappa (14/120, 12%) and mu (8/120, 7%). There were 5 *bfpA* alleles; the most common were beta1/7 (10/26), alpha3 (7/26) and beta5 (3/26). There were 3 *perA* alleles: beta (8/16), alpha (7/16) and gamma (1/16). The gamma-intimin allele was more frequently found in diarrhea episodes of longer duration (>7 days) than shorter (3/26, 12% vs. 0/48, 0%, $p<0.05$). The kappa-intimin allele had the highest clinical severity score in comparison to other alleles ($p<0.05$).

Of the four adherence patterns found: LA (localized adherence); LAL (LA-like); DA (diffuse adherence) and IS/NA (isolated strain/ not adherence); LA pattern was more related to tEPEC (*eae+*, *bfpA+*) than aEPEC in diarrhea cases (6/8, 75% vs. 2/38, 5%, $p<0.05$). The IS/NA pattern was related to aEPEC compared to tEPEC in diarrhea cases (26/38, 68% vs. 1/8, 13%, $p<0.05$). We found that the actin polymerization (P) was significantly associated to tEPEC in both, diarrhea (6/8, 75% vs. 1/38, 3%, $p<0.05$).

We observed that the strains that secreted all proteins were significantly related to diarrhea cases compared with other patterns. The protein more frequent in the

EPECstrains was EspB/D (23/42, 50%), but the protein that was significantly related to diarrhea than controls was EspA (21/42, 50% vs. 0/15, 0%).

The genotype analysis shown that, in Peruvian children the virulence genes of EPEC strains are highly variable. The measure of gene expression (phenotype analysis) can help to determine the feature of EPEC more related to high virulence. Further studies are needed to evaluate additional virulence markers to determine whether relationships exist between specific variants and their expression, and clinical features of disease.

Key words: diarrhea, EPEC, virulence genes, phenotype and variability.

I.- INTRODUCCIÓN

Escherichia coli enteropatógena (EPEC) es un problema actual en la salud, pues es la causante de un gran número de casos de diarrea infantil en países en vías de desarrollo (Nataro y Kaper, 1998). Han sido descritos dos fenotipos principales por los cuales EPEC causa la patogénesis en el hospedero, uno de ellos es la producción de una lesión histopatológica conocida como lesión A/E (*attaching and effacing*) y el fenotipo de adherencia localizada (LA). El fenotipo de la lesión AE consiste en una adherencia íntima de la bacteria a los enterocitos que produce cambios en la célula hospedera, los cuales involucran la destrucción de las vellosidades y la acumulación de actina polimerizada, formando una estructura parecida a una copa o pedestal (Jerse y col., 1990). La técnica de tinción fluorescente de actina (FAS), nos permite identificar las cepas de EPEC que causan la lesión AE, mediante la visualización de la actina polimerizada en los puntos donde las bacterias se unen a la célula hospedero.

Los genes involucrados en este fenotipo están codificados en un islote de patogenicidad llamado LEE (*locus enterocyte effacement*), que está compuesto por 41 genes agrupados en cinco operones policistrónicos. En el LEE se codifica el sistema de secreción tipo III (SSTT), el regulador maestro Ler, la intimina (*eae*) y Tir (*translocate intimin receptor*), (que son responsables de la adherencia íntima de la bacteria al hospedero) y además muchas proteínas secretadas y sus chaperonas. Las proteínas secretadas están divididas en efectoras (Tir, EspG, EspF, Map, y EspH), involucradas en la modificación del citoesqueleto de la célula hospedera, y translocadoras (EspA, EspD, y EspB), que son requeridas para la translocación de las moléculas efectoras dentro del hospedero (Deng y col., 2004).

El segundo fenotipo es el de adherencia localizada que involucra la adherencia de la bacteria en un área determinada de la superficie celular del hospedero, formando agregados compactos (microcolonias) que pueden ser visualizados luego de 3 h de contacto de la bacteria con la célula hospedero. El fenotipo de adherencia localizada está relacionado con la presencia del plásmido EAF (*E. coli adherence factor*) (Giron y col., 1991).

Las cepas de EPEC que poseen este plásmido pertenecen al grupo de las EPEC típicas (tEPEC) y las cepas que carecen de éste se encuentran en el grupo de las EPEC atípicas (aEPEC). En el plásmido EAF se encuentran dos operones, *per* y *bfp*, que codifican para un regulador transcripcional y el pilus tipo IV respectivamente (BFP) (Okeke y col., 2001). El BFP es importante por que interconecta a las bacterias dentro de la microcolonia sobre la célula hospedero promoviendo su estabilización (Cleary y col., 2004).

Las cepas tEPEC han sido clásicamente asociadas a los casos de diarrea, pero actualmente la situación epidemiológica de la infección producida por EPEC indica que las cepas aEPEC son las más comunmente aisladas, tanto en países desarrollados, como en los países en vías de desarrollo (Ochoa y col., 2008). Algunos autores indican que existe asociación de las aEPEC con los casos de diarrea (Afset y col., 2004), mientras otros plantean lo contrario (Vieira y col., 2001).

La formación del fenotipo de adherencia localizada y la lesión AE está influenciada por factores del ambiente de la bacteria, como la temperatura, el pH, la osmolaridad, la concentración de calcio y amonio, entre otros. La expresión de los genes involucrados en estos fenotipos es regulada principalmente por Ler (lesión AE) y PerA (adherencia localizada). Se conoce que la activación del regulador maestro Ler en un cultivo que crece en condiciones de agitación está mediada por GrlA (*Global regulator of LEE Activator*), mientras que cuando la bacteria crece en condiciones de saturación de CO₂ (crecimiento estático) es PerA el que activa al regulador Ler. Por lo tanto, para determinar los cambios en la expresión de los genes codificados en LEE, analizamos el comportamiento de nuestros aislados de EPEC bajo ambas condiciones de crecimiento.

A pesar de que el mecanismo por el cual EPEC causa diarrea es conocido, no es claro cómo algunos niños desarrollan una diarrea persistente, mientras otros no lo hacen. No se define si la duración y la severidad de la enfermedad son debidas a factores específicos del patógeno causante de la infección, o a la susceptibilidad del hospedero, o ambas. Estudios previos sólo han evaluado la

asociación de genes específicos de EPEC con la virulencia en varios sistemas modelos (Scaletsky y col., 1999; Vieira y col., 2001), sin embargo hay un vacío en la literatura que detalle la relación y relevancia de la variabilidad en el fenotipo y genotipo de factores de virulencia de EPEC y el desarrollo de diarrea prolongada y otras manifestaciones clínicas en humanos.

En este estudio el objetivo fue realizar una evaluación de los principales genes involucrados en la patogénesis (*eae*, *bfpA* y *perA*), de los fenotipos de adherencia localizada y lesión AE, y de variabilidad en la secreción de las proteínas del SSTT y su regulación, comparándolas con las características clínicas de los pacientes de los cuales fueron aisladas las EPEC.

Los resultados obtenidos en esta investigación son importantes porque nos muestran la situación epidemiológica de nuestra localidad. Indican que existe una relación entre algunos alelos de genes involucrados en la virulencia y características clínicas de mayor severidad en la diarrea, lo que podría ser usado como blanco de acción en la prevención de la enfermedad. Asimismo se determinó que un análisis de fenotipo nos puede indicar claramente que cepas están más relacionadas con una mayor virulencia. Se pudo observar que la secreción de una mayor cantidad de las proteínas Esp, está asociado a casos de diarrea. El análisis de la frecuencia de secreción de estas proteínas nos indica que las proteínas EspB/D son las que se secretan con mayor frecuencia, mientras EspA está significativamente asociada a casos de diarrea, pudiendo ser usadas éstas como un blanco en la fabricación de un compuesto vacunal. Los conocimientos generados en esta investigación nos muestran un panorama amplio de EPEC, tanto a nivel genotipo, como fenotipo, abriéndole paso a la generación de nuevas investigaciones basadas en las preguntas generadas durante su desarrollo, como la búsqueda de más factores genéticos adquiridos de otras bacterias que incrementan la virulencia de EPEC y la evaluación de las relaciones clonales de estas cepas.

II.-ANTECEDENTES

Las enfermedades diarreicas continúan siendo una de las mayores causas de muerte en niños a nivel mundial (Black y col., 2003; Bryce y col., 2005). En nuestro país es la tercera causa de muerte en niños menores de 5 años (Huicho y col., 2006). EPEC es uno de los principales patógenos asociados a diarrea, y es considerada un problema de salud por ser causante de altos niveles de mortalidad y morbilidad (Clarke y col., 2002) en niños de países en vías de desarrollo (Tarr y Whittam, 2002), aunque también ha sido asociada a diarrea en otros países (Trabulsi y col., 2002; Ochoa y col., 2008).

El mecanismo por el cual EPEC causa diarrea ha sido dilucidado en los últimos años, siendo un paso esencial en la patogénesis humana la producción de una lesión histopatológica conocida como “adherencia/efacelamiento” o lesión AE (Nataro y Kaper, 1998) y el fenotipo LA. El fenotipo de la lesión AE consiste en una adherencia íntima de la bacteria a los enterocitos, produciendo cambios en la célula hospedera, los cuales incluyen la destrucción de las vellosidades y la acumulación de actina polimerizada formando una estructura parecida a una copa o pedestal (Figura 1) (Gomez-Duarte y Kaper, 1995) que puede ser determinada a través de la polimerización de actina, visualizada mediante el ensayo FAS (Knutton y col., 1991).

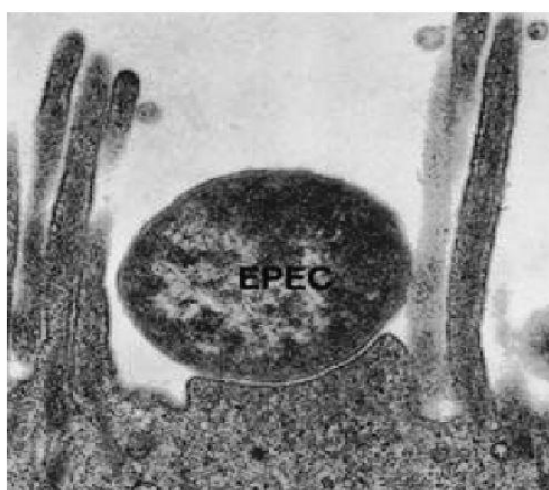


Figura 1. Fenotipo de Adherencia y Efacelamiento causado por EPEC. Se observa el fenotipo AE por micrografía electrónica (Frankel y col., 1998).

Los genes requeridos en el desarrollo de la lesión AE están codificados en el islote de patogenicidad LEE (McDaniel y Kaper, 1997).

Islote de Patogenicidad LEE.- Los genes de la región LEE están organizados en cinco operones policistrónicos (*LEE1-LEE5*), dos operones bicistrónicos (*espG-rorf2* y *grlRA*) y cuatro unidades transcripcionales (*rorf3*, *cesF*, *map* y *escD*). Los operones *LEE1*, *LEE2* y *LEE3* codifican proteínas componentes del SSTT (los genes *esc* y *sep*) y el regulador transcripcional denominado Ler (*LEE encoded regulator*); *LEE4* contiene genes que codifican las proteínas que forman el translocón como EspA, EspB y EspD; y en *LEE5* se encuentran los genes necesarios para la adherencia íntima al enterocito: *tir* (*Translocate intimin receptor*), *cesT* y *eae* (intimina) (Clarke y col., 2003). El islote de patogenicidad LEE también codifica para una proteína parecida a H-NS (H-NS-like protein), y GrlA, un miembro de una familia de activadores transcripcionales que controla positivamente la expresión de genes localizados en el LEE. Deng y colaboradores realizaron un análisis sistemático de la región LEE de *Citrobacter rodentium* [bacteria que produce el fenotipo de AE en ratones y posee todos los genes de la región LEE (Deng y col., 2001)] mediante la generación de mutaciones no polares en cada uno de los 41 genes que componen el LEE y el estudio de las mutantes correspondientes para determinar el efecto sobre diferentes fenotipos. Así, los mutantes fueron caracterizados en torno a la regulación transcripcional del LEE, SSTT, la habilidad para formar el pedestal en células epiteliales en cultivo, y virulencia en ratones. Los resultados indicaron que el LEE codifica para dos reguladores denominados GrlA y GrlR; que el SSTT, codificado por el LEE, secreta varios efectores adicionales que están codificados fuera del LEE en tres islas de patogenicidad; y que dos proteínas, SepD y SepL, accesorias del SSTT, forman un mecanismo que determina el orden espacial y temporal en el que son secretadas las proteínas que constituyen el translocón del SSTT, los efectores del LEE y los efectores codificados fuera del LEE (Deng y col., 2004).

Intimina.- La intimina es necesaria para la estrecha unión de la bacteria a la célula epitelial del hospedero, interaccionando con la proteína Tir que sirve como un receptor de la intimina luego que ésta es translocada a la membrana del hospedero (Jerse y col., 1990; Kenny y col., 1997a). Se ha demostrado que

mientras la región N-Terminal de 670 aminoácidos de todos los tipos de intimina están altamente conservados, la región C-Terminal de 280 aminoácidos, conocida como Int280, muestra una gran variabilidad en su secuencia y representa la región inmunogénica que se encuentra expuesta en la superficie celular, además contiene los sitios de unión a Tir y la célula epitelial del hospedero (Oswald y col., 2000; Tarr y Whittam, 2002; Ramachandran y col., 2003). Las caracterizaciones de esta región variable del gen de intimina (*eae*) muestran la existencia de diferentes variantes alélicas. Hasta el momento han sido identificadas 18 tipos y 9 subtipos (Ito y col., 2007), y se propone que las diferentes variantes de intimina pueden ser responsables de las diferencias observadas en el tropismo celular de la bacteria (Fitzhenry y col., 2002; Fitzhenry y col., 2003), asimismo esta diversidad estaría relacionada con los diferentes potenciales de patogenicidad de acuerdo a la distribución alélica en el hospedero.

Los estudios de los genes de virulencia muestran que a menudo estos genes se adquieren de manera horizontal pues no siempre presentan una variación alélica correspondiente con los grupos filogenéticos EPEC I y EPEC II o con los serogrupos (Okeke y col., 2001; Lacher y col., 2007) por lo que se tendría que buscar nuevos patrones de agrupamiento y así obtener datos epidemiológicos que nos ayuden en la clasificación de estas variantes patogénicas en comparación con los cuadros de diarrea producidos.

Plásmido EAF.- Por otro lado, el fenotipo conocido como “adherencia localizada”, que se caracteriza por la formación de microcolonias sobre la superficie de células epiteliales intestinales, se correlaciona con la expresión de una fimbria tipo IV, el BFP (*Bundle-forming pilus*) (Giron y col., 1991). Los genes requeridos para la biogénesis del BFP están codificados en el plásmido de virulencia EAF. Según la presencia del plásmido las EPEC se dividen en dos grandes grupos, clasificándose como tEPEC a aquellas que presentan el plásmido EAF y aEPEC a aquellas que carecen de éste. Los plásmidos de diferentes cepas pueden presentar considerable variación en su tamaño (~85 a 110 kb) y presumiblemente en su contenido de genes. Esta variación es debida a la presencia de elementos de inserción parciales o completos (Okeke y col., 2001). Sin embargo ciertas partes del plásmido muestran algún grado de

conservación particularmente en la región que codifica la fimbria BFP. Esta fimbria se expresa a partir de un operón con 14 genes, en el cual el gen *bfpA* codifica la principal subunidad estructural (bundlina). La presencia de este plásmido además incrementa la virulencia de EPEC, por lo tanto desde el punto de vista epidemiológico las cepas que contiene el plásmido EAF se asocian fuertemente a diarrea y también produce diarrea en estudios con voluntarios (Levine y col., 1985; Nataro y Kaper, 1998), aunque actualmente se conoce que las cepas aEPEC son también importantes y estarían más comúnmente relacionadas a episodios de diarrea (Ochoa y col., 2008). Actualmente se conocen 10 alelos del gen *bfpA* obtenidos por RFLP (Lacher et al., 2007).

El segundo locus del plásmido EAF que está implicado con el elevado grado de virulencia de EPEC, es el operon Per (*plasmid-encoded regulador*), que está compuesto de tres genes (*perA*, *perB* y *perC*) (Puente y col., 1996; Tobe y col., 1996). El primer gen del locus *per* es *perA*, que codifica una proteína que pertenece a la familia de activadores transcripcionales AraC, y se conoce que activa genes dentro del operón *bfp* y el islote de patogenicidad LEE vía Ler (Deng y col., 2004); mientras que *perB* y *perC* codifican proteínas que aumentan la actividad de *perA*.

En un estudio con voluntarios (Bieber y col., 1998) se demostró que una cepa de EPEC con el gen *perA* mutado (nombrado como *bfpT*) fue menos virulenta que la cepa silvestre. Esto demostraría que *perA* juega un rol esencial en la regulación de genes de virulencia en EPEC. En tanto que, otro grupo de investigadores encontraron que la presencia de *per* se asocia a los grupos más virulentos relacionándose con la alta patogenicidad de la enfermedad (Okeke y col., 2001). En este momento se conocen 4 alelos de *perA* obtenidos por cortes con enzimas de restricción de amplicones de *perA* (Lacher y col., 2007). En nuestro estudio se propone evaluar la distribución alélica de tres genes de virulencia *eae*, *bfpA* y *perA* de EPEC aisladas de una cohorte de niños menores de un año con diferentes cuadros de duración y severidad de diarrea.

Distribución de factores de virulencia en EPEC y patrones de adherencia.- En general las cepas de tEPEC tienen sus características de

virulencia más homogéneas comparadas con el grupo de cepas aEPEC. Las cepas típicas pueden presentar factores de virulencia codificados en el LEE o en el plásmido EAF y en algunas ocasiones producen la toxina citoletal de distensión-CTD (*cytolethal distending toxin*) o toxina estable al calor-EAST1 (*heat stable toxin*) (Trabulsi y col., 2002). En cambio, las cepas aEPEC frecuentemente expresan factores de virulencia no codificados en la región LEE, como *hlyA* (hemolisina), Afa (*Afimbrial adhesin*), *efa/lifA* (linfoestatina), EAST1 y CTD (Trabulsi y col., 2002; Dulguer y col., 2003; Afset y col., 2006). Entre las cepas aEPEC se pueden encontrar dos tipos: aquellas que solo codifican factores de virulencia de la región LEE y las que codifican factores de virulencia de fuera y dentro del LEE. La presencia de más de un tipo de cepas atípicas dentro de un grupo clonal simple es una de las diferencias encontradas entre éstas y las cepas de tEPEC (Trabulsi y col., 2002).

Las cepas tEPEC y aEPEC también se diferencian por su patrón de adherencia a cultivos celulares. Las cepas típicas clásicamente están relacionadas con el patrón LA (*localized adherence* - adherencia localizada, los agregados de bacterias sobre las células son compactos y localizados, formando microcolonias), mientras las cepas aEPEC pueden presentar los patrones LAL (*localized adherence like* -adherencia similar a la localizada, en las cuales los agregados de bacterias no son tan compactos como en LA), DA (*diffuse adherence*-adherencia difusa, bacterias distribuidas de manera uniforme alrededor de la célula) (Mathewson y Cravioto, 1989), AA (*aggregative adherence*-adherencia agregativa, se aprecian conexiones entre las bacterias, a manera de un panal de abejas) (Nataro y col., 1987) y otros menos comunes observados luego de seis horas de infección tales como: el patrón LC (*loose cluster*-agrupamientos sueltos de varios tamaños sobre las células), patrón LCC (*loose and compact clusters*- a los agrupamientos sueltos se suman agrupamientos compactos) y el patrón IS (*isolated bacteria*-bacterias aisladas alrededor de las células) (Vieira y col., 2001). En el patrón LAL está involucrada principalmente la intimina (Pelayo y col., 1999) y en DA y AA la agregación bacteriana está mediada por el gen *afa* y la adhesina agregativa, respectivamente (Scaletsky y col., 1999).

El fenotipo de A/E es evaluado mediante una tinción fluorescente de la actina en la célula infectada, pudiéndose visualizar la polimerización de actina alrededor de la bacteria. En diversos estudios se ha visto que no todas las cepas de EPEC son capaces de polimerizar la actina *in vitro* (Knutton y col., 1991; Vieira y col., 2001), lo que indicaría que no sólo es necesaria la expresión de los genes de la región LEE, sino que el contacto con la superficie de la mucosa del hospedero promueve la expresión de manera coordinada de los factores de virulencia involucrados en el fenotipo A/E (Vieira y col., 2001). En este estudio evaluamos el patrón de adherencia y polimerización de actina que presenta cada cepa de EPEC sobre las células HEp-2.

Secreción de proteínas en EPEC.- Los patógenos A/E secretan proteínas codificadas en el LEE en medios de cultivo artificiales. Estas proteínas incluyen EspA, EspB, EspD, EspF, EspG, EspH, Tir, y Map (Deng y col., 2004); y se dividen en dos grupos, las moléculas efectoras (EspF, EspG, EspH, Tir, y Map) y las moléculas transportadoras (EspA, EspB, y EspD).

La secreción de factores de virulencia permite a las bacterias patógenas interactuar con sus receptores. EPEC secreta al menos seis proteínas entre efectoras y transportadoras (Kenny y Finlay, 1995); cuatro de estas proteínas son EspA (Kenny y col., 1996), EspD (Lai y col., 1997), EspB (Taylor y col., 1998), y EspF (McNamara y Donnenberg, 1998). Las *E. coli* secreted proteins (Esp) son secretadas por el SSTT. Las proteínas EspA, EspD, y EspB forman parte del translocón por donde se translocan las moléculas efectoras al citoesqueleto de la célula hospedera (Frankel y col., 1998). Otra molécula secretada es Tir, que luego de ser translocada se inserta en la membrana del hospedero y sirve como receptor de la intimina. Tir también participa en mecanismos de señalización celular y trastornos del citoesqueleto (Kenny y col., 1997b). Estas moléculas efectoras secretadas participan en el fenotipo A/E y las lesiones intestinales que caracterizan la enfermedad producida por EPEC.

Las EPEC también segregan una proteína de 110 kDa, EspC, que no requiere el SSTT para su translocación al espacio extracelular (Jarvis y col., 1995). Esta es una enterotoxina que está codificada en una segunda isla de

patogenicidad en el genoma de EPEC, esta proteína no se expresa en todas las EPEC y se propone que solo juega un rol complementario en la virulencia de algunas cepas de EPEC (Mellies y col., 2001). Adicionalmente los patógenos A/E secretan otras moléculas efectoras codificadas fuera del LEE llamadas efectores “*non LEE encoded*” (Nle) (Deng y col., 2004; Gruenheid y col., 2004; Mundy y col., 2004b). Un ejemplo es NleA/Espl, el cual tiene como blanco al aparato de Golgi, siendo crítico para la virulencia de estas bacterias (Mundy y col., 2004b). Espl fue sondeado en aislados clínicos de EPEC y EHEC y fué comunmente encontrado en casos de enfermedad más severa (Mundy y col., 2004a).

El mecanismo molecular que regula el control de la jerarquía entre la secreción del aparato translocador y de las moléculas efectoras en EPEC no está completamente entendido. Se conoce que el calcio modula la formación del TTSS (Kenny y col., 1997a). Cuando el medio de cultivo es suplementado con agentes quelantes de calcio se reduce la secreción de los translocadores del TTSS y aumenta la secreción de efectores como Tir (Kenny y col., 1997a). También SepL y SepD, dos proteínas codificadas en el LEE, regulan la jerarquía en la secreción de las proteínas translocadoras y efectoras en *C. rodentium*, EPEC y EHEC (O'Connell y col., 2004; Deng y col., 2005).

Regulación de factores de virulencia.- La regulación de los factores de virulencia en EPEC, como en cualquier patógeno, tiene como objetivo sincronizar la expresión de los mecanismos y herramientas que le dan la habilidad de ser un patógeno en el nicho y momento correcto. Por ejemplo, las fimbrias que permiten la adherencia de un patógeno a la superficie del epitelio que colonizan se expresan en respuesta a señales nutricionales o fisicoquímicas presentes en el hospedero. Similarmente, la expresión y secreción de proteínas a través del SSTT de EPEC parece responder a condiciones similares a las encontradas en el tracto gastrointestinal (Edwards y Puente, 1998; Iyoda y Watanabe, 2004).

Los genes del operón *bfp* se expresan selectivamente en medio de cultivo de células eucariotes (DMEM) durante la fase exponencial de crecimiento a 37°C, y se regulan negativamente a temperaturas por arriba o por debajo de 37°C y en presencia de sales de amonio (Puente y col., 1996). La expresión de este operón

requiere de la acción de la proteína PerA. Ésta también es requerida para la activación de su propio promotor, y se ha determinado la interacción directa de esta proteína con las regiones reguladoras de los operones *per* y *bfp* (Bustamante y col., 1998; Martínez-Laguna y col., 1999; Ibarra y col., 2003; Porter y col., 2004).

Por otro lado la proteína Ler, codificada por el primer gen del operón *LEE1*, regula positivamente la transcripción de todos los promotores del LEE, con excepción de su propio promotor, en donde se ha propuesto que revierte la regulación negativa ejercida por H-NS, y en el caso de *LEE5*, de un represor no identificado (Bustamante y col., 2001). Ler regula también al gen *espC*, codificado fuera del LEE, en otra isla de patogenicidad (Elliott y col., 2000). El modelo actual de regulación por Ler de los operones LEE2 y LEE3, y probablemente del resto de los operones, propone que éste desestabiliza el complejo nucleorepresor generado por H-NS (H-NS atrapa o impide el acceso de la RNA polimerasa en cada promotor del LEE). Esta modificación no se debe, aparentemente, a una competencia por los sitios primarios de unión al DNA, sino a cambios en la arquitectura del DNA a partir de la unión de Ler a sitios vecinos a los que se une H-NS (Figura 2).

Siendo Ler el regulador maestro de la expresión de los genes del LEE no sorprende que la regulación transcripcional del gen *ler* sea compleja e involucre un importante número de reguladores, tanto específicos de EPEC (y de las bacterias A/E), como es el caso de GrIA y GrIR (Barba y col., 2005) y PerC (Bustamante y col., 2001) o de reguladores globales tales como IHF (Friedberg y col., 1999), Fis (Goldberg y col., 2001), el regulador de "quorum sensing" QseA (Sperandio y col., 2002), la GTPasa BipA (Grant y col., 2003) y ppGpp con DksA (Nakanishi y col., 2006) como moduladores positivos, así como H-NS (Umanski y col., 2002) y Hha como reguladores negativos (Sharma y col., 2005) (Figura 3), entre otros.

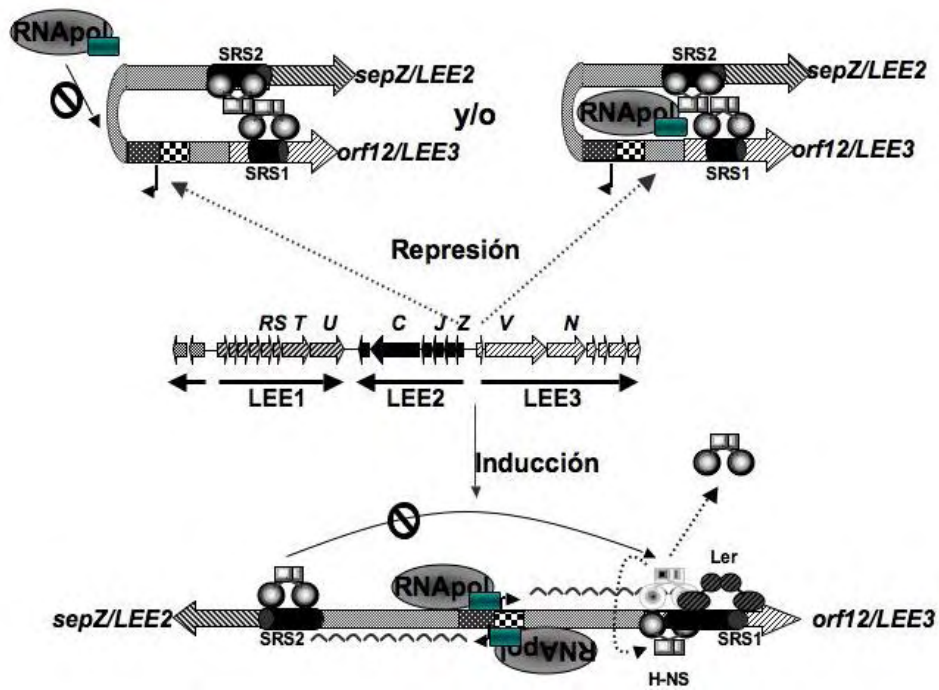


Figura 2. Representación esquemática del mecanismo a través del cual Ler antagoniza la represión ejercida por H-NS sobre los promotores de la región LEE. Se ilustra la represión sobre los promotores divergentes de los operones LEE-LEE3, los cuales están flanqueados por dos secuencias silenciadoras (SRS1 y SRS2) a las que se une H-NS. La unión específica de Ler al SRS1 desestabiliza el complejo abriendo paso a la RNA polimerasa y permite el inicio de la transcripción (Bustamante y col., datos no publicados).

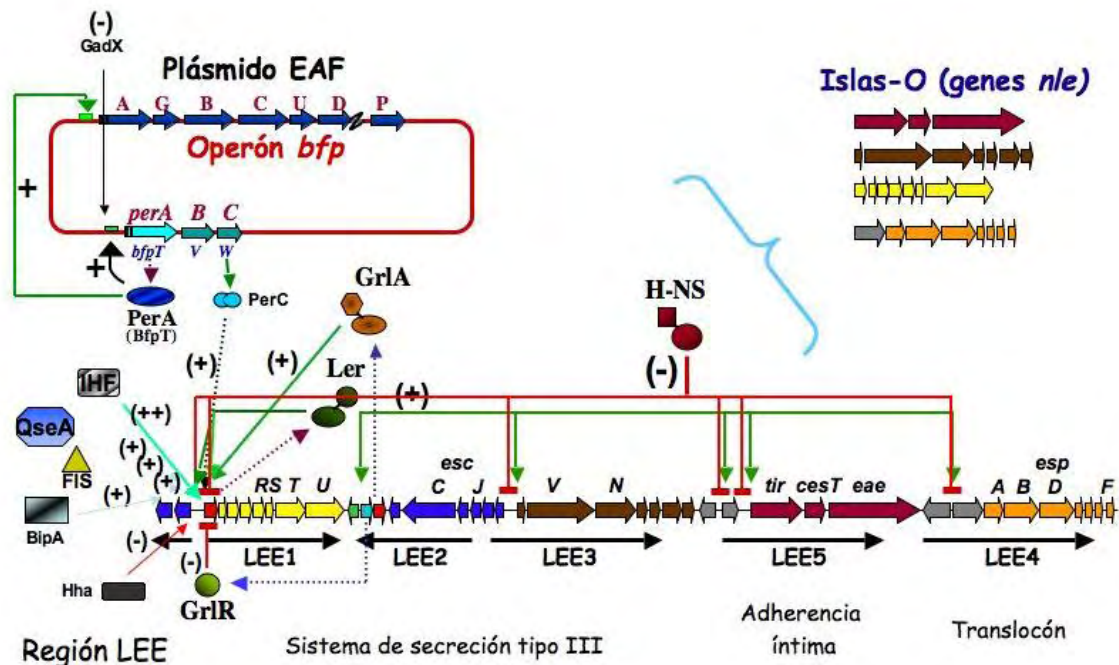


Figura 3. Representación esquemática de la red reguladora que modula la expresión de *ler*. El esquema muestra tanto los reguladores específicos a la fecha caracterizados en EPEC (o en EHEC y *C. rodentium*), como los globales que han sido involucrados en la regulación de *ler* y que están presentes en otras bacterias incluyendo *E. coli* comensal (Walters y col., 2006).

PerC es codificado por el tercer gen del operón *per* del plásmido EAF, el cual como se comentó también codifica PerA, el activador transcripcional del operón *bfp*. PerC activa directamente la transcripción de *ler*, ligando la expresión de *bfp* a la de la isla de patogenicidad LEE, lo cual sugiere que en etapas iniciales de la infección, EPEC es capaz de coordinar la expresión de diferentes factores de virulencia para hacer más eficiente la colonización desde las primeras etapas que involucran la adherencia no íntima mediada por la fimbria BFP. Sin embargo, resulta interesante la aparente redundancia funcional que PerC y GrlA tienen en torno a la activación de *ler*. Estudios de Puente y col. (comunicación personal) indicaron que si bien ambas proteínas son capaces de activar a *ler*, su función es esencial para dicha activación, y la de todos los genes regulados por Ler, en respuesta a diferentes señales ambientales. Esto sugiere que durante el tránsito de EPEC por el tracto intestinal, diferentes señales presentes en el hospedero determinarán que el LEE se exprese en diferentes etapas y/o nichos durante el establecimiento de una infección. Así, la presencia de dos reguladores aparentemente redundantes en esta bacteria, aseguran la activación de los genes que dan lugar a la interacción estrecha entre EPEC y la superficie de los enterocitos, etapa conocida como la adherencia íntima.

Como se muestra en la Figura 4, en ausencia de *grlA* la activación de genes del LEE se reduce drásticamente cuando la bacteria crece con agitación, mientras que cepas carentes de PerC o del plásmido EAF donde se encuentra el operón *per*, muestran niveles marcadamente reducidos en la expresión de genes del LEE cuando crecen en cultivos estáticos. Estos datos indican que la actividad de las proteínas GrlA y PerC, o su expresión, es regulada recíprocamente por señales ambientales que los cultivos agitados y estáticos mimetizan (Bustamante y col., comunicación personal). A la fecha, no es claro si se trata de los niveles de oxígeno, el pH, o cualquier otro factor que varía entre ambos tipos de cultivo, pero sí revela que la bacteria y dichos reguladores responden de manera diferencial a las condiciones de cultivo y muy probablemente a cambios percibidos durante una infección. El análisis de la cinética de expresión de ambos reguladores y de Ler, mostró también que la expresión de PerC disminuye significativamente en cultivos agitados, pero que la de GrlA es constante y se mantiene a lo largo del crecimiento en ambos tipos de cultivo. Esto indica que PerC, en ausencia de GrlA,

no es capaz de activar eficientemente a *ler* en cultivos agitados porque es en sí su expresión la que también está regulada negativamente en este tipo de cultivos. Por el contrario, en cepas carentes de PerC creciendo en cultivos estáticos, *ler* no se activa porque GrIA, a pesar de estar presente en concentraciones similares a las de los cultivos agitados, no es funcional. Estos datos indican que bajo ciertas condiciones existe un mecanismo capaz de inhabilitar a GrIA y, por tanto, al circuito de regulación recíproca que establecen Ler y GrIA.

En este trabajo caracterizamos los perfiles de proteínas de secreción como herramienta para la evaluación de la expresión de los componentes del SSTT bajo los sistemas de regulación caracterizados en dos condiciones de crecimiento: agitación y estático. Asimismo, se evaluaron los niveles de transcripción de cepas modelo dentro del grupo total usando una fusión transcripcional al gen reportero *cat*.

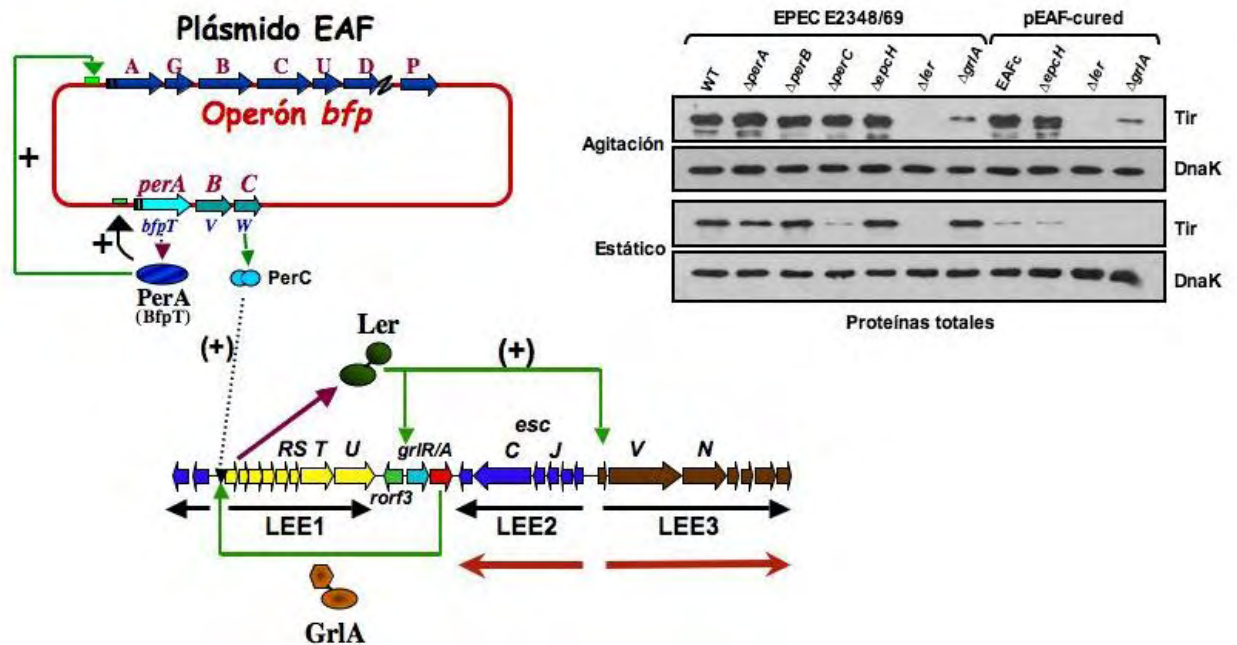


Figura 4. PerC y GrIA representan rutas alternativas de activación de *ler* en EPEC en respuesta a diferentes condiciones de crecimiento (Bustamante y col., comunicación personal).

III. HIPÓTESIS

Nuestra hipótesis es que las variaciones en los genes de virulencia de EPEC, principalmente los genes *eae*, *bfpA* y *perA*, y la expresión de éstos determinan las manifestaciones clínicas de infecciones intestinales en niños menores de un año.

IV. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo fue:

- Relacionar el genotipo y fenotipo de virulencia de las cepas de EPEC con las características clínicas de los episodios de diarrea de una cohorte de niños menores de 12 meses.

Con la finalidad de alcanzar el objetivo general se establecieron los siguientes objetivos específicos:

1. Determinar la frecuencia en la que se encuentran distribuidos los alelos de los genes *eae*, *bfpA* y *perA*.
2. Relacionar la variabilidad alélica de genes de virulencia de EPEC (*eae*, *bfpA* y *perA*) con la duración y severidad del cuadro de diarrea producida en niños.
3. Analizar el fenotipo de adherencia y AE de cepas representativas tanto de tEPEC como aEPEC.
4. Relacionar la variabilidad fenotípica (proteínas secretadas, tipos de adherencia y fenotipo AE) con la duración y severidad del cuadro de diarrea producida en niños.
5. Analizar el perfil de proteínas secretadas de cepas representativas tanto tEPEC como aEPEC a partir de cultivos estáticos y agitados.
6. Analizar la actividad transcripcional del operón *LEE2* en condiciones de crecimiento con agitación y estático, utilizando fusiones transcripcionales al gen reportero *cat*.
7. Analizar la actividad transcripcional del operón *bfp* usando la fusión *bfpA-cat* como control para determinar la presencia o ausencia del locus *per* en las cepas.

V.- METODOLOGÍA

V.1 Aislamiento e Identificación de EPEC

V.1.1 Descripción de la población

Las cepas de EPEC fueron colectadas de muestras de heces obtenidas en un estudio de cohorte conducido recientemente en los distritos de Chorrillos, Villa el Salvador, Villa María del Triunfo y San Juan de Miraflores ubicados al sur de Lima (Ochoa y col., 2009). Éste fue un estudio de vigilancia pasiva de casos de diarrea en 1034 niños seguidos de los 2 a los 12 meses de edad. En total fueron colectadas 1065 muestras de heces de los niños; en este estudio fueron ya reportadas las características clínicas (duración y severidad) de los episodios de diarrea. Como grupo control se evaluaron muestras de heces en un grupo de niños seleccionados aleatoriamente de la población de estudio en ausencia de diarrea (no diarrea una semana antes y después de la colección de la muestra).

V.1.2 Aislamiento de EPEC

Las muestras de heces de los niños con y sin diarrea (control) fueron sembradas en placas de agar MacConkey (MC) (Merck) e incubadas a 37°C. Luego del periodo de incubación, de cada placa se tomaron al azar 5 colonias lactosa positivas (color grosella) que fueron sub-cultivadas en una nueva placa de agar MC para tener colonias puras e individuales (Figura 5) que fueron usadas para la extracción de ADN y análisis mediante un multiplex PCR en tiempo real.

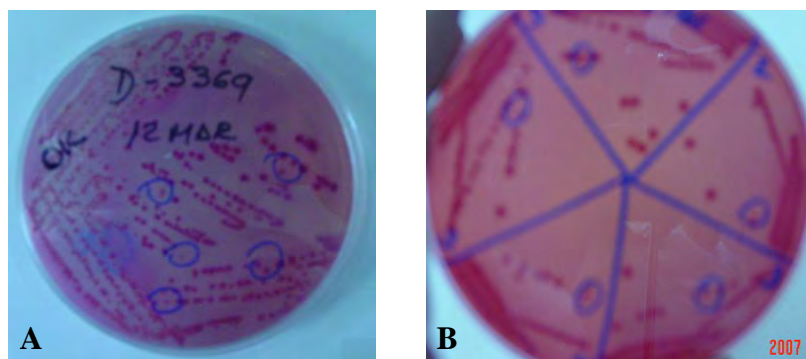


Figura 5. Placas de agar MacConkey. (A) placa de cultivo de la cual se eligieron las 5 colonias lactosa positivas que fueron sub-cultivadas en otra placa de agar MC (B).

V.1.2 Análisis mediante multiplex PCR en tiempo real

El multiplex PCR para diagnosticar *E. coli* diarreogénicas (DEC) fue desarrollado y validado en el Laboratorio de Enfermedades Entéricas y Nutrición del Instituto de Medicina Tropical-UPCH (Guion y col., 2008). Este PCR reconoce ocho genes de virulencia de 6 DEC (EAEC, EPEC, ETEC, STEC, EIEC y DAEC) en una sola reacción (Figura 6). Para reconocer EPEC se usaron cebadores para el gen *eae* (intimina): Fwd 5'-ATGCTTAGTGCTGGTTTAGG-3' y Rev 5'-GCCTTCATCATTTGCTTTC-3' que amplifica una región conservada del gen; la reacción se realizó en un volumen final de 25 µl siguiendo el protocolo de la Tabla 1 y bajo las condiciones de PCR (temperatura y tiempos) mostrados en la Tabla 2 (Guion y col., 2008).

La presencia de los diferentes genes sondeados se detecta mediante el pico de fluorescencia emitido por el SYBER-green y fluoresceína usados. Las temperaturas de desnaturalización (T_m - *melting temperature*) de los genes son diferentes, lo que ayuda a diferenciar los picos de fluorescencia de las sondas (Figura 6). Las cepas EPEC positivas fueron analizadas mediante un nuevo PCR con cebadores específicos para el gen *bfpA* que diferencian a las cepas de tEPEC (*bfpA*+) de las cepas aEPEC (*bfpA*-). Los cebadores y las condiciones de PCR como la concentración de reactivos y las condiciones de ciclaje (temperatura y tiempos) son las mismas que están descritas en el apartado V.2.2.

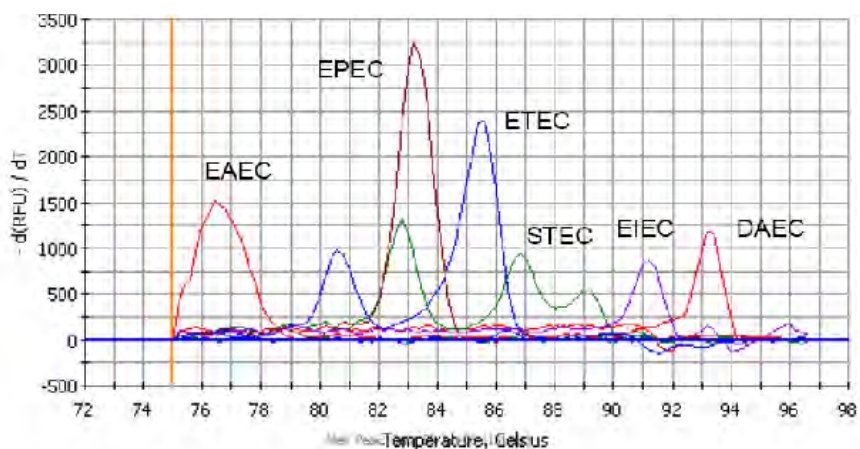


Figura 6. Multiplex PCR a tiempo real para el diagnóstico de las *E. coli* diarreogénicas. Se observa la diferencia en el T_m de cada gen (Ochoa, 2006).

Tabla 1. Concentración de cada componente del *master mix* usado en el multiplex qPCR para las *E. coli* diarreogénicas

<i>eae</i>	[Final]
5X <i>buffer</i>	1X
dNTP (10 mM each)	200 µM
MgCl ₂ (50 mM)	4.0 mM
stx1F	0.12 mM
stx1Rev	0.12 mM
stx2F	0.08 mM
stx2Rev	0.08 mM
ST1a LowTm fwd	0.26 mM
ST1b LowTm Fwd	0.26 mM
ST universal REV	0.26 mM
eLtFWD	0.36 mM
eLtRev	0.36 mM
WangEAEfwd	0.56 mM
WangEARev	0.56 mM
ipaHF	0.04 mM
ipaHR	0.04 mM
DAEC(ver2)FWD	0.50 mM
DAEC(ver2)REV	0.50 mM
72CTm AggR Left	0.44 mM
72CTm AggR Right	0.44 mM
ST1a LowTm fwd	0.12 mM
SBRG 100X	1X
Fluoresceina 2.5nM	10 nM
Phusion (New England BioLabs) (2 U/ul)	0.5 U
ddH ₂ O	9.77 µl
DNA (genomic) (~25 ng/µL)	2.0 µl

Tabla 2. Temperaturas y tiempos usados en el programa del multiplex qPCR para las *E. coli* diarreogénicas

Temperaturas	<i>eae</i>
Activación 98°C	30 seg
Denaturación 92°C	20 min. }
Hibridación 35 ciclos}	20 seg. } 60°C
Extensión 72°C	30 seg.}
Extensión final 72°C	7 min

V.1.3 Almacenamiento de las cepas de EPEC

Las cepas de EPEC se guardaron en dos medios de mantenimiento diferentes para su posterior análisis. El Agar Peptona (g/100mL): 2 de Peptona Bacteriológica, 0.5 de NaCl y 1 de Agar-agar para almacenar a T° ambiente (Figura 7A) y Medio Casaminoácidos-Extracto de levadura (CA-YE) suplementado con glicerol al 10% (v/v) para guardarlas a -70°C (Figura 7B).

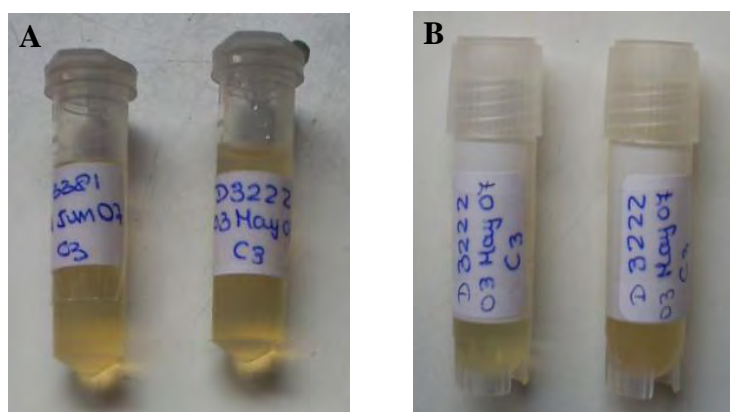


Figura 7. Medios de almacenamiento de las cepas. (A) Cepas de EPEC guardadas en Agar Peptona a T° ambiente y (B) Cepas de EPEC guardadas en Medio CA-YE a -70 °C.

V.2 Amplificación por PCR de los genes *eae*, *bfpA* y *perA*

Para los PCRs se eligió en todos los casos, una colonia positiva de las 5 colonias seleccionadas de las muestras de cada paciente. Este criterio de selección se basa en la premisa de que solo un tipo de EPEC estaría infectando a un paciente en un momento determinado, por lo cual la cepa elegida es representativa de la población de EPEC que infecta al hospedero.

El día anterior a la extracción de ADN, las cepas fueron sembradas en placas de agar MC a partir de muestras almacenadas en el criobanco (-70°C). La extracción de ADN se realizó a partir de una sola colonia (aislada) en la placa de agar MC (Figura 5B), esta colonia fue suspendida en 50 µL de agua destilada estéril (Fisher) y luego fue sometida a ebullición por 5 min; la suspensión se dejó reposar a temperatura ambiente durante 15 min y luego se centrifugó a 15600 x g por 15 min a T° ambiente. Se tomó el sobrenadante como ADN molde, tanto para ADN genómico como para ADN plasmídico.

V.2.1 Amplificación del gen *eae* (intimina)

El protocolo de la PCR para el gen *eae* fue modificado a partir de la metodología descrita por Lacher y col. (Lacher *et al.*, 2006). Con la PCR se busca amplificar una región altamente variable del gen *eae*, que está situada entre el dominio más conservado del gen *eae* y el extremo 3' del gen conservado *escD* (*E. coli* secreted component D) que se halla codificado en la hebra negativa (Figura 8). El tamaño del amplicón dependerá del alelo de intimina que se amplifique, y varían aproximadamente entre 1800 a 2000 pb de longitud.



Figura 8. Localización de los cebadores para amplificar el gen *eae*. El cebador *forward* (F) está localizado en la región central del gen de intimina (*eae*) y el cebador *reverse* (R) está localizado en la región conservada del gen *EscD*. El amplicón resultante fue de aproximadamente 1800-2000 pb dependiendo del alelo amplificado (Lacher y col., 2006).

En la PCR se emplearon 25 μL de reacción que contenía 2.5 μL de 10X *buffer* II (Applied Biosystems), 2.5 μL de dNTP (2 mM cada nucleótido), 2.0 μL de MgCl_2 (25 mM), 0.5 μL de cebadores (10 μM) (*eae*-F1: 5'-ACTCCGATTCCTCTGGTGAC-3' y *escD*-R1: 5'-GTATCAACATCTCCCGCCCA-3') (Fermentas), 0.3 μL de AmpliTaq Gold (1.5 U) (Applied Biosystems), 14.7 μL de ddH_2O y 2.0 μL de ADN molde (~ 50 ng/ μL) (Tabla 3). La PCR se llevó a cabo bajo las condiciones indicadas en la Tabla 7.

Para verificar la calidad del producto amplificado, todos los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa 1.0%, corridas a 80V por 40 min en *buffer* TAE 1X (40 mM Tris-Acetato, 1 mM EDTA). Se usó como control positivo de este PCR la cepa prototipo EPEC E2348/69 y como control negativo la *E. coli* C600 no patógena.

Tabla 3. Concentración de componentes en el *master mix* para la PCR del gen *eae*

<i>eae</i>	[Final]	Volumen (1 Rx)
10X <i>buffer</i>	1X	2.5 µL
dNTP (2.5 mM cada uno)	0.25	2.5 µL
MgCl ₂ (25 mM)	1 mM	2.0 µL
<i>eae</i> F	0.2 µM	0.5 µL
<i>escD</i> R	0.2 µM	0.5 µL
AmpliTaq Gold (1.5 U)	1.5 U	0.3 µL
ddH ₂ O	14.7	14.7 µL
DNA (genómico) (~25 ng/µL)	--	2.0 µL

V.2.2 Amplificación del gen *bfpA*

Los cebadores usados para la amplificación del gen fueron *bfpA*_114F: 5'-GTCTGCGTCTGATTCCAATA-3' y *bfpA*_512R: 5'-TCAGCAGGAGTAATAGC-3' amplifican una región interna conservada del gen *bfpA* (Figura 9) que pertenece al operon *bfpABC*. El amplicon varía de 408 a 414 pb dependiendo del alelo amplificado (Lacher y col., 2006).

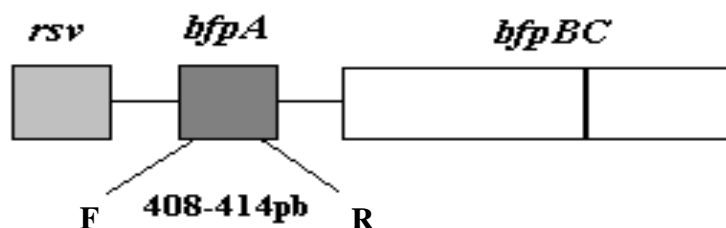


Figura 9. Localización de los cebadores para amplificar el gen *bfpA*. El cebador *forward* (F) está localizado en el extremo izquierdo del gen (~170pb) y el cebador *reverse* (R) está localizado una la región conservada del gen (~580). Los amplicones resultantes fueron de aproximadamente 408-414 pb dependiendo del alelo amplificado (Sohel y col., 1996).

En la PCR se emplearon 25 µL de reacción que contenía 2.5 µL de 10X *buffer* II (Applied Biosystems), 2.5 µL de dNTP (2 mM cada uno), 2.0 µL de MgCl₂ (25 mM), 0.5 µL (10 µM) de cada cebador, 0.2 µL de AmpliTaq Gold (1.0 U) (Applied Biosystems), 14.8 µL de ddH₂O y 2.0 µL de ADN molde (~50 ng/µL) (Tabla 4). La PCR se llevó a cabo bajo los parámetros que se indican en la Tabla 7.

Tabla 4. Concentración de componentes en el *master mix* usados en la PCR del gen *bfpA*

<i>bfpA</i>	[Final]	Volumen (1 Rx)
10X <i>buffer</i>	1X	2.5 µL
dNTP (2.5 mM each)	0.25	2.5 µL
MgCl ₂ (25 mM)	1 mM	2.0 µL
<i>bfpA</i> F	0.2 µM	0.5 µL
<i>bfpA</i> R	0.2 µM	0.5 µL
AmpliTaq Gold (1.0 U)	1U	0.2 µL
ddH ₂ O	14.8	14.8 µL
DNA (genomic) (~25 ng/µL)	--	2.0 µL

V.2.3 Amplificación del gen *perA*

Los cebadores usados para el gen *perA* (Lacher *et al*, 2006) amplifican una región de 586pb, empezando por el nucleótido ~20 pb del inicio del gen y termina en el nucleótido ~566 (Figura 10). Esta zona de variabilidad es considerablemente menor comparada con las encontradas en los dos primeros genes descritos.

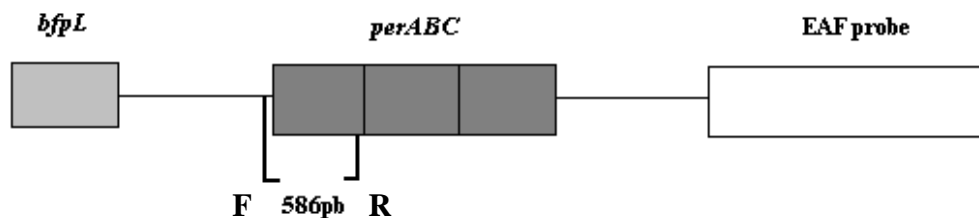


Figura 10. Localización de los cebadores del gen *perA*. El cebador *forward* (F) está localizado en el extremo izquierdo al inicio del gen (~20pb) y el cebador *reverse* (R) está localizado en una región conservada del gen (~586). El amplicón resultante fue de aproximadamente 586 pb (Trabulsi y col., 2002).

En la PCR se emplearon 25 µL reacción que contenía 2.5 µL de 10X *buffer* II (Applied Biosystems), 2.5 µL de dNTP (2 mM cada uno), 2.0 µL de MgCl₂ (25 mM), 0.5 µL de (10 mM) de cada cebador (*perA*_24F: 5'-AACAAACGCGCATGAAGGTG-3' y *perA*_562R: (5'-TGACATCGCCTAGTTTCCAGTTTT-3')), 0.2 µL AmpliTaq Gold (1.0 U) (Applied Biosystems), 14.8 µL de ddH₂O y 2.0 µL ADN molde (~50 ng/µL) (Tabla 5). La PCR se llevó a cabo bajo los parámetros mostrados en la Tabla 7.

Tabla 5. Concentración de componentes en el *master mix* usado en la PCR del gen *perA*

<i>perA</i>	[Final]	Volumen (1 Rx)
10X <i>buffer</i>	1X	2.5 µL
dNTP (2.5 mM each)	0.25	2.5 µL
MgCl ₂ (25 mM)	1 Mm	2.0 µL
<i>perA</i> F	0.2 µM	0.5 µL
<i>perA</i> R	0.2 µM	0.5 µL
AmpliTaq Gold (1.0 U)	1U	0.2 µL
ddH ₂ O	14.8	14.8 µL
DNA (genomic) (~25 ng/µL)	-	2.0 µL

Para verificar la calidad del producto amplificado (*bfpA* y *perA*), todos los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa 1.5%, corridas a 80V por 40 min en *buffer* TAE 1X. Se usó como control positivo de esta PCR la cepa EPEC E2348/69 y como control negativo la *E. coli* C600. Los cebadores y los protocolos seguidos en el desarrollo de esta tesis se resumen en las tablas 6 y 7.

Tabla 6. Cebadores usados en el desarrollo de los protocolos de PCR para amplificar los genes *bfpA*, *eae* y *perA*

Gen	Nombre	Secuencia	PM (pb)	Referencia
<i>bfpA</i>	<i>bfpA</i> -F	5'- GTCTGCGTCTGATTCCAATA -3'	408 a 414	Lacher <i>et al</i> , 2007
	<i>bfpA</i> -R	5'- TCAGCAGGAGTAATAGC -3'		Lacher <i>et al</i> , 2007
<i>eae</i>	<i>eae</i> -F	5'-ACTCCGATTCCCTCTGGTGAC-3'	1800 a 2000	Lacher <i>et al</i> , 2006
	<i>escD</i> -R	5'-GTATCAACATCTCCCGCCCA-3'		Lacher <i>et al</i> , 2006
<i>perA</i>	<i>perA</i> -F	5'- AACAAACGCGCATGAAGGTG -3'	586	Lacher <i>et al</i> , 2007
	<i>perA</i> -R	5'- TGACATCGCCTAGTTTCCAGTTTT -3'		Lacher <i>et al</i> , 2007

PM, tamaño del amplicón en pares de bases

Tabla 7. Protocolos de PCR usados para la amplificación de los genes *bfpA*, *eae*, *perA* y *mdh*

	Temperaturas	<i>bfpA</i>	<i>eae</i>	<i>perA</i>	<i>mdh</i>
Etapas	Activación 94°C	10 min	10 min	10 min	10 min
	Desnaturaliz. 92°C	1 min. }	1 min. }	1 min. }	1 min. }
	Hibridac. 40 ciclos	45 seg. } 58°C	1 min. } 56°C	45 seg. } 61°C	45 seg. } 52°C
	Extensión 72°C	30 seg.}	2 min. }	30 seg.}	30 seg.}
	Ext. final 72°C	7 min	7 min	7 min	7 min

V.2.4 Control interno de la PCR

Para el control interno se amplificó el gen de la malato deshidrogenasa (*mdh*) que se expresa en todas las cepas de *E. coli*. En la PCR se emplearon 25.0 µL de reacción que contenía 2.5 µL de 10X *buffer* II (Applied Biosystems), 2.5 µL de dNTP (2 mM cada uno), 2.0 µL de MgCl₂ (25 mM), 0.5 µL (10 mM) de los cebadores *mdh*-F41: 5'-AGGCGCTTGCACTACTGTTA-3' y *mdh*_R875: 5'-AGGCGCTTCTGTTCAAATG-3', 0.2 µL AmpliTaq Gold (1.0 U) (Applied Biosystems), 14.8 µL ddH₂O y 2.0 µL de ADN molde (~50 ng/µL). El tamaño del fragmento esperado fue de aproximadamente 835 pb. La PCR se llevó a cabo siguiendo las condiciones indicadas en la Tabla 7. El producto de PCR fue visualizado en un gel de agarosa de 1.5%. Se usó como control positivo de este PCR la cepa EPEC E2348/69.

V.3 Polimorfismo de Longitud de fragmentos de Restricción-RFLP

V.3.1 Identificación de los patrones de RFLP usando herramientas *in silico*

Para *bfpA* y *perA*, las enzimas de restricción elegidas se encuentran descritas previamente en la literatura (Lacher y col., 2007). Para el gen *eae* las enzimas que se usaron fueron sugeridas por el Dr. David Lacher (U.S Food and Drug Administration – Michigan State Univesity).

Los patrones de corte (tamaño de los fragmentos) obtenidos con las enzimas de restricción elegidas se obtuvieron con el programa de RFLP *in silico* del

servidor EcMLST (<http://www.shigatox.net/cgi-bin/mlst7/index>). En este programa se ingresaron las secuencias de los genes mostrados en el anexo 1 y las enzimas de restricción elegidas. El programa predice los tamaños de los fragmentos luego de una digestión, basado en la búsqueda de las secuencias blanco que cada enzima reconoce en la secuencia de ADN deseada. En las tablas de los anexos 2 y 3A y B se observan los perfiles de restricción de cada gen.

V.3.2 RFLP del gen *eae* (intimina)

En el proceso de digestión se usaron las enzimas de restricción *AluI* y *BstNI*, cada enzima fue usada de manera independiente en una mezcla de reacción de la siguiente manera: 1.0 µL de *AluI* (10 unidades) y 3.0 µL de *buffer* 10X y 2.0 µL de agua destilada, a esta mezcla se le agregó 24.0 µL del producto amplificado de PCR y se incubó toda la noche a 37°C.

En el caso de *BstNI* la mezcla de reacción contenía 1.0 µL de *BstNI* (10 U), 3.0 µL de *buffer* 10X, 0.3 µL de seroalbúmina bovina (SAB) 100X y 1.7 µL de agua destilada, donde a 6.0 µL de la solución se le agregó 24.0 µL de el producto de PCR, la mezcla se incubó toda la noche a 60°C (Tabla 8).

Tabla 8. Concentración de componentes en la mezcla para el RFLP del gen *eae*

<i>eae</i>	<i>AluI</i>	<i>BstNI</i>
H ₂ O	2.0 µL	1.7 µL
<i>Buffer</i> 10X	3.0 µL	3.0 µL
BSA	---	0.3 µL
Enzima (10U)	1.0 µL	1.0 µL
Producto de PCR	24.0 µL	24.0 µL
Temperatura	37 °C	60 °C

V.3.3 RFLP del gen *bfpA*

En el proceso de digestión se usaron las enzimas de restricción *AluI*, *BfaI* y *BstNI*, cada enzima fue usada de manera independiente en una mezcla de reacción de la siguiente manera: 1.0 µL de *AluI* y *BfaI* (10 U) y 3.0 µL de *buffer*

10X y 3.0 µL de agua destilada, a esta mezcla se le agregó 23.0 µL del producto de PCR, se incubó toda la noche a 37°C.

En el caso de *Bst*NI, la mezcla de reacción tuvo 1.0 µL *Bst*NI (10 U), 3.0 µL de *buffer* 10X, 0.3 µL de SAB 100X y 2.7 µL de agua destilada, donde a 7.0 µL de la solución se le agregó 23.0 µL de producto de PCR, y se incubó toda la noche a 60°C (Tabla 9).

Tabla 9. Concentración de componentes en la mezcla para el RFLP del gen *bfpA*

<i>bfpA</i>	<i>AluI</i>	<i>BfaI</i>	<i>Bst</i> NI
H ₂ O	3.0 µL	3.0 µL	2.7 µL
<i>Buffer</i> 10X	3.0 µL	3.0 µL	3.0 µL
BSA	---	---	0.3 µL
Enzima (10U)	1.0 µL	1.0 µL	1.0 µL
Producto de PCR	23.0 µL	23.0 µL	23 µL
Temperatura	37 °C	37 °C	60 °C

V.3.4 RFLP del gen *perA*

En el proceso de digestión se usaron las enzimas de restricción *DdeI* y *Sau96I*, cada enzima fue usada de manera independiente en una mezcla de reacción de la siguiente manera: 1.0 µL de *DdeI* y *Sau96I* (10 U), 3.0 µL de *buffer* 10X y 6.0 µL de dH₂O estéril, a esta mezcla se le agregó 20.0 µL del producto de PCR, y se incubó toda la noche a 60°C (Tabla 10).

Tabla 10. Concentración de componentes en la mezcla para el RFLP del gen *perA*

<i>perA</i>	<i>DdeI</i>	<i>Sau96I</i>
H ₂ O	6.0 µL	6.0 µL
<i>Buffer</i> 10X	3.0 µL	3.0 µL
Enzima (10U)	1.0 µL	1.0 µL
Producto de PCR	20.0 µL	20.0 µL
Temperatura	37 °C	37 °C

Todas las enzimas de restricción fueron New England BioLabs Inc. (Ipswich, MA), y los *buffer* usado en cada reacción fueron provistos con cada enzima.

Los amplicones del gen *eae*, *bfpA* y *perA* obtenidos de las muestras fueron corridos en geles de 102 pocillos, utilizando 300 mL de agarosa al 3 % (*eae*) y 2 % (*bfpA* y *perA*) durante 2 horas en *buffer* TAE al 1X y visualizados luego de una tinción con bromuro de etidio.

Para el análisis de los geles se usó el programa Quantity One (Bio Rad) que es un analizador de imágenes que extrapola el peso de los fragmentos obtenidos basados en un estándar de peso molecular que se corre en cada gel. Solo se consideró como correcto un alelo cuando el resultado fue corroborado por el uso de ambas enzimas. Se muestra un ejemplo en los anexos 4 y 5.

V.3.5 Controles positivos de los RFLP

Para los ensayos de RFLP se usaron como control positivo cepas prototipo. Para el gen *eae*, se utilizaron 7 cepas que codifican para siete alelos diferentes. Para el gen *bfpA* se usaron 10 cepas prototipo que codificaban cada una de ellas para los alelos conocidos. Entre estas cepas también encontramos aquellas que codifican para los 4 alelos conocidos del gen *perA*. Toda la colección fue donada por el Dr. Michel Donnemberg (Universidad de Maryland, USA) y los detalles de cada una de estas cepas esta detallada en el anexo 6.

V.4 Evaluación de los fenotipos de AE y Adherencia Localizada

La capacidad de EPEC para unirse y polimerizar la actina de la célula huésped como parte del fenotipo de A/E, puede medirse usando una tinción fluorescente de la actina en un cultivo de EPEC con células HEp-2 (Ochoa y col., 2003), mientras el fenotipo de LA puede visualizarse mediante una tinción con Giemsa.

V.4.1 Preparación de las células HEP-2

Se prepararon cultivos celulares con un tiempo de incubación de 3 días en el que no se debe observar confluencia entre las células. Luego estas células fueron removidas usando Tripsina (1x, 0.025% EDTA) durante 3 min (37°C). Para evitar que la tripsina deteriore las células, después de este tiempo se agrega nuevamente medio de cultivo celular (MCC), el cual contiene Suero Fetal de Bovino (FBS) que inactivará a la tripsina. Tras un paso de centrifugación se colectaron las células que fueron resuspendidas en MCC, para su conteo. Las células luego fueron colocadas en placas de cultivo celular de 24 pozos, en las cuales previamente fueron colocados cubreobjetos de cultivo celular (Nalgene Nunc Internationak, New York, USA), (donde crecerán las células Hep2. En cada pozo se colocó 10^4 - 10^5 células. La descripción de los componentes del MCC están detallados en el anexo 7.

V.4.2 Preparación de la suspensión bacteriana

Las bacterias fueron cultivadas toda la noche en 5 mL de LB y luego subcultivadas en 50 mL de medio LB fresco, el cual se incubó durante 3 h. Posteriormente se midió la población bacteriana mediante la absorbancia a 600nm (OD_{600}), que debe ser 0.3.

Se tomaron 4 mL de cada suspensión bacteriana, los cuales fueron lavados una vez con PBS (1X) y resuspendidos en medio de adherencia (MA). En los casos en que fue necesario, se ajustó la absorbancia mediante un incremento o disminución de cultivo en los pasos de lavado.

V.4.3 Infección de las células Hep-2

Las células Hep2 fueron lavadas. Luego se colocó 1 mL de suspensión bacteriana en MA en cada pocillo. Todos los ensayos se hicieron por duplicado.

V.4.3.1 Tinción fluorescente de actina (FAS)

Luego del periodo de incubación de 3 h las células fueron lavadas 3 veces con HBSS para desprender las bacterias no adheridas, luego fijadas con formol 4% en PBS y permeabilizadas durante 5 min con Triton-100X 0.1%. Luego se realizó una tinción con BODIPI *phalloidin* (Invitrogen) y DAPI (Invitrogen) para hacer un examen en microscopio de fluorescencia de la actina polimerizada (fluorescencia verde) y el ADN de doble hebra del núcleo (fluorescencia azul) respectivamente.

V.4.3.2 Ensayo de patrón de adherencia a células HEp2

El fenotipo de adherencia localizada fue visualizado mediante una tinción con Giemsa, distinguiéndose los siguientes patrones en orden de frecuencia: Adherencia difusa (DA), Adherencia localizada (LA) y el patrón similar a la adherencia localizada llamado “localizad adherence like” (LAL) (Scaletsky y col., 1999).

La metodología es la misma descrita para el FAS, pero luego de los lavados con HBSS para desprender las bacterias no adheridas, se fija con metanol durante 10 min y luego se agrega el colorante Giemsa para teñir las bacterias adheridas sobre la superficie de las células HEp2 durante 20 min.

Controles

Para los procedimientos anteriores (V.4.3.1 y V.4.3.2) se usó la cepa E2348/69 (*ea*⁺, *bfpA*⁺, LA⁺) como control positivo de la adherencia localizada y la polimerización de actina. Como control negativo se usó la cepa C600 (K12) que carece de factores de virulencia que le confiera la capacidad de formar el fenotipo de adherencia localizada o del fenotipo de A/E evidenciado por la polimerización de actina.

V. 5 Análisis del perfil de proteínas secretadas

El análisis de los perfiles de proteínas secretadas por EPEC se realizó bajo dos condiciones de cultivo, en agitación (500 x g), donde la expresión de Ler (regulador positivo de la expresión de genes del LEE) es dependiente de GrIA; y en estático (incubación con 5% de atmósfera de CO₂), donde la expresión de Ler es mediada por *perC*.

V.5.1 Cultivo de bacterias

Los cultivos fueron realizados en caldo Luria-Bertani (LB) (Sambrook *et al.*, 1989) a 37°C y DMEM [glucosa (0.45% (p/v) y L-glutamina (584 mg/L), sin piruvato de sodio; Gibco Life Technologies] a 37°C en dos condiciones, de agitación y cultivo estático.

Un día anterior al ensayo se sembró una colonia aislada, de una placa de agar MC (no más de una semana de antigüedad), a un tubo con 5 mL de LB, y se incubó toda la noche a 37°C en agitación rotatoria (~300 x g). Este paso fue el mismo, tanto para cultivos en agitación como en cultivos estáticos. Se colocaron 50 mL de DMEM en matraces de 200 mL (2 matraces para cada cepa), un grupo fue pre-equilibrado en una incubadora de CO₂, mientras el otro se dejó a T° ambiente hasta su uso. Luego, los 50 mL de DMEM (suplementado con 1 mL de caldo LB) fueron inoculados con 500 µL de un cultivo *overnight* de cada cepa y se incubó durante 8 h (~2 OD₆₀₀) a 37°C.

En este ensayo se usaron las cepas E2348/69 Stp^r y E2348/69 Δ*ler*::Km^r como controles positivo y negativo de la secreción de proteínas. La primera secreta las proteínas EspC, EspB/D y EspA, mientras en la segunda la secreción se ve interrumpida por la mutación en el gen *ler*. El medio de cultivo debe estar suplementado con 100 mg/mL de estreptomicina para E2348/69 Stp^r y 40 mg/mL de kanamicina para E2348/69 Δ*ler*::Km^r.

V.5.2 Extracción de proteínas secretadas

Se tomó 1.8 mL del cultivo bacteriano (estático y agitación) y las células se colectaron por centrifugación a 16400 x *g*. Se recuperó 1.3 mL del sobrenadante a un tubo nuevo, se le agregó 0.145 mL de ácido tricloroacético (TCA) (10% v/v) y se incubó a 4°C durante toda la noche. Las proteínas se concentraron por centrifugación a 16400 x *g* a 4°C durante 30 min.

Seguidamente el precipitado fué resuspendido en 25.0 µL de *buffer* de carga para electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) 4X [Glicerol 47.6%, SDS 4%, β-mercaptoetanol 0.1%, (v/v), Tris-HCl a pH 6.8 0.24% (v/v) y azul de bromofenol 0.02% (p/v)]. El pH de la solución se tornó ácido, y la suspensión cambió a un color amarillo o naranja, por lo que se agregó 1 µL de *buffer* Tris saturado para neutralizar el TCA residual. Las soluciones deben reposar 15 min a temperatura ambiente para que los precipitados se resuspendan en el *buffer*.

V.5.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS-PAGE

Una vez resuspendidas las proteínas en el *buffer* de muestra, se hirvieron durante 5 min y luego fueron sometidas a agitación en vortex durante 1 min para homogenizarlas. Posteriormente, fueron analizadas mediante SDS-PAGE (Tabla 11).

Tabla 11. Componentes de los geles de acrilamida usados en el SDS-PAGE

Componentes	Gel Inferior 12% (20 mL)	Gel Superior 5% (10 mL)
Acrilamida (30:0.8)	8.0 ml	1.5 mL
Tris-HCl/SDS 1.5M pH 8.8	5.0 mL	---
Tris-HCl/SDS 0.5M pH 6.8	---	2.5 mL
H ₂ O MQ	7.0 mL	6.0 mL
APS 10%	100.0 µL	50.0 µL
TEMED	14.0 µL	10.0 µL

Se usaron 12 mA durante 5 horas en cada corrida, como *buffer* de corrida se usó Tris Glicina 1X (Tris 0.025M, Glicina 0.192M, SDS 0.1%). Los geles fueron teñidos usando azul de Coomasie para la visualización de las bandas.

V.6 Construcción de fusiones transcripcionales usando el reportero CAT

V.6.1 Análisis de las resistencias a antibióticos

Las cepas de EPEC usadas en este estudio fueron sembradas en placas de agar LB suplementada con cuatro antibióticos (un antibiótico en cada placa): ampicilina 100 mg/mL, kanamicina 40 mg/mL, estreptomina 100 mg/mL y cloranfenicol 25 mg/mL. Se determinaron como resistentes a un determinado antibiótico aquellas cepas que crecieron en la respectiva placa.

V.6.2 Cambio de marcador de selección en las fusiones

Las cepas de EPEC analizadas en este estudio presentaron un elevado porcentaje de resistencia a ampicilina, por esta razón el siguiente paso fue cambiar el marcador de selección en los plásmidos que llevan las fusiones transcripcionales ya existentes (Ap^r) para seleccionar las cepas transformadas.

Los plásmidos con las fusiones transcripcionales usadas en esta tesis fueron modificados a partir de los plásmidos ya existentes en el Laboratorio del Dr Puente (Universidad Nacional Autónoma de México), en los que tuvimos como objetivo cambiar la resistencia de ampicilina por kanamicina. Para esto se interrumpió el casete de resistencia a ampicilina y se insertó el de resistencia a kanamicina.

Las fusiones transcripcionales fueron construidas clonando las regiones reguladoras de los operones LEE2 y *bfp* en el vector de clonamiento y expresión pKK232-8 (Farmacia LKB Biotechnology), el cual contiene el gen reportero *cat* que carece de promotor (Figura 11).

Para medir el nivel de expresión del operón *bfpABC* se usó la fusión transcripcional *bfpA-cat* (pCAT232) (Puente y col., 1996) (Figura 11 B), y contiene toda la región reguladora necesaria para la expresión del operón *bfpABC*, esta región fue insertada entre los sitios de corte de las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III.

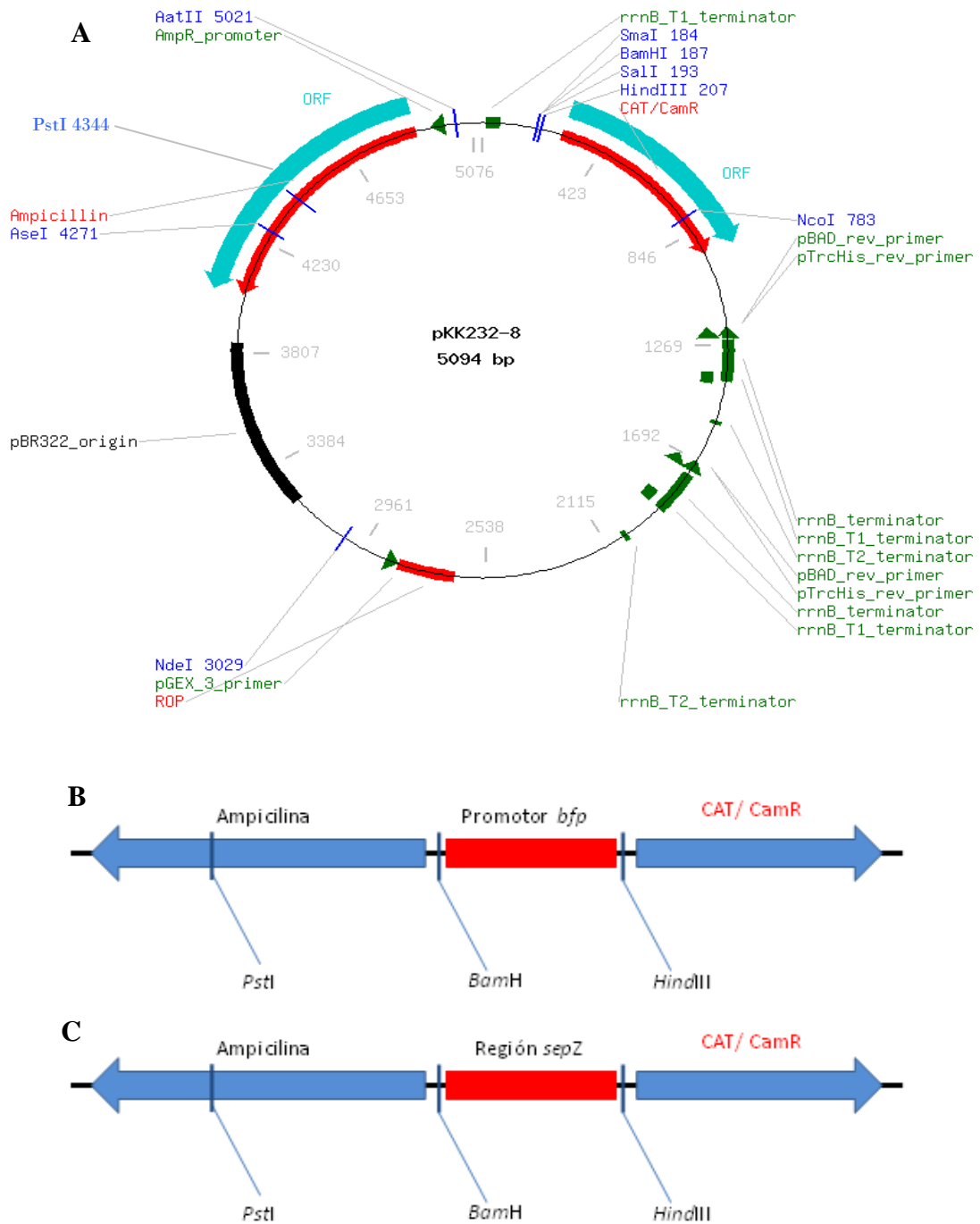


Figura 11. (A) Mapa g3nico del pl3smido pKK232-8, usado para el clonamiento de los promotores de los operones LEE2 y *bfpABC*. Este pl3smido tiene un casete de resistencia a ampicilina y la presencia del gen *cat*, le confiere resistencia a Cloranfenicol (Cam^r). (B) Esquema de la construcci3n del plasmido pCAT232 Ap^r y (C). Esquema de la construcci3n del pl3smido pSEPZ11 Ap^r.

Para medir el nivel de expresi3n del oper3n LEE2 del islote de patogenicidad LEE se us3 la fusi3n transcricional de *sepZ-cat* (pSEPZ11) (Figura 11 C) y

contiene un segmento entre los nucleótidos -469 y +121 (Bustamante y col., 2001). El operón LEE2 fue elegido por ser el promotor más fuerte del LEE. Los plásmidos pCAT232 y pSEPZ11 fueron mantenidos en la cepa *E. coli* DH5 α .

La extracción de los plásmidos usados en los pasos siguientes se realizó usando la metodología descrita en el apartado V.8.1

V.6.3 Extracción del casete de resistencia a kanamicina

El casete de resistencia a kanamicina fue obtenido del plásmido pUC4K Km^r Ap^r (Pharmacia LKB Biotechnology) (Figura 12), mediante una digestión con la enzima de restricción *Pst*I (Invitrogene), usando el siguiente protocolo: 80 μ L de plásmido, 1 μ L de enzima y 9 μ L *buffer* 10X. La mezcla fue incubada por 2 h a 37°C.

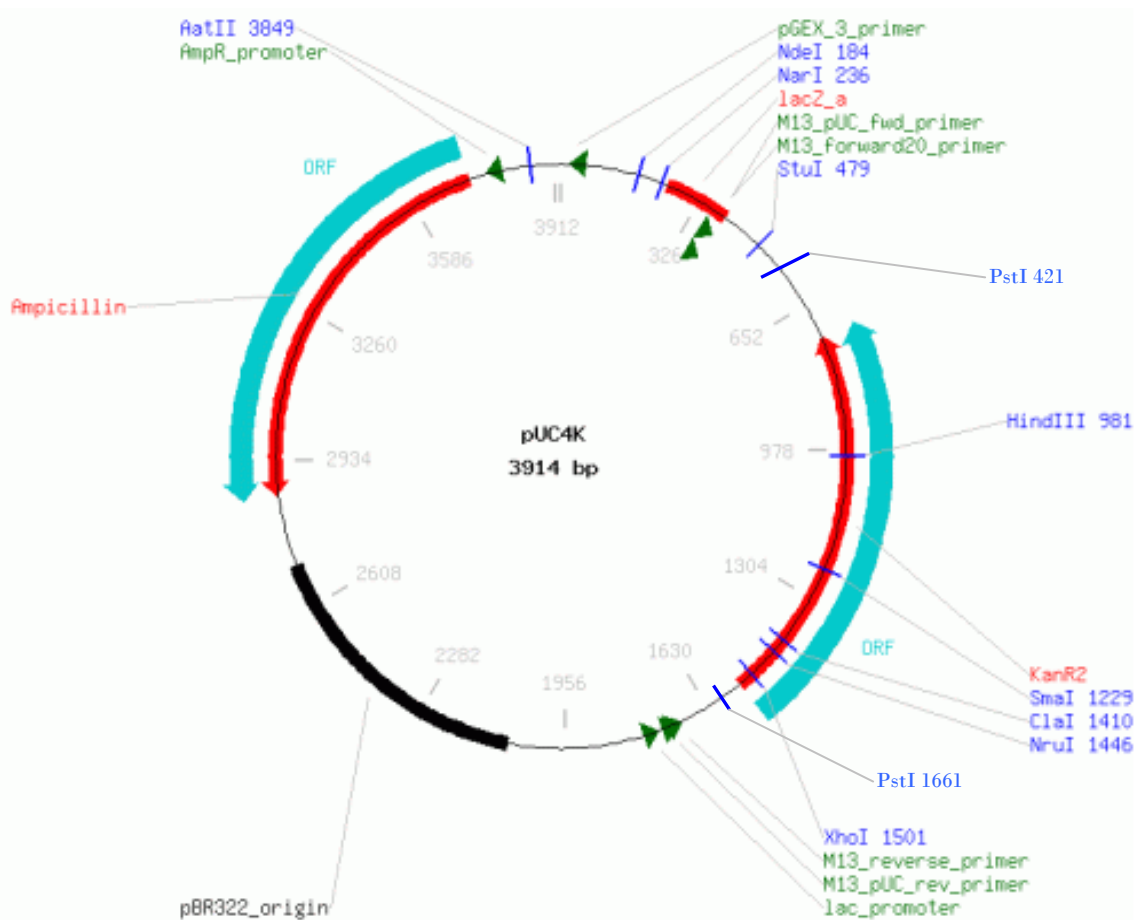


Figura 12. Mapa genético del plásmido pUC4K, usado para la obtención del casete de resistencia a kanamicina (~1200 pb).

V.6.4 Ligación

El siguiente paso fue la preparación de los plásmidos con resistencia a kanamicina; primero se linearizaron los plásmidos ya existentes usando el sitio de restricción de *Pst*I dentro del casete de ampicilina. Para linearizar pCAT232 se siguió el mismo protocolo que para el plásmido pUC4K usando la enzima *Pst*I, mientras para la fusión pSEPZ11 se realizó una digestión parcial, ya que la región reguladora insertada tiene un sitio de corte para *Pst*I.

En el proceso de ligación se usaron como vector las fusiones ya existentes (linearizadas) y el inserto que corresponde al casete de resistencia a kanamicina según la reacción mostrada en la Tabla 12.

Tabla 12. Concentración de componentes en la mezcla usada en la ligación

Componentes	Volumen (1 Rx)
Vector	9.0 μ L
Inserto	9.0 μ L
Buffer 5X	5.0 μ L
H ₂ O	1.0 μ L
T4 DNA ligasa (Invitrogen)	1.0 μ L

La reacción se incubó toda la noche a 4°C. Para el control de esta reacción de ligación se usó el vector solo, sin inserto, para verificar si el proceso de ligación se llevó de manera correcta.

V.7 Trasformación de las cepas de EPEC

La transformación se llevó a cabo en cepas *E. coli* DH5 β y DH10 β competentes (50 μ L) que fueron transformadas con 10 μ L de cada ligación (pCAT232 Km^r y pSEPZ11 Km^r), usando un equipo Gene Pulser (Bio-Rad). El protocolo para la transformación de bacterias de este equipo fue: 2.5 kV, 25 pF, y 200 Q. La transformación de la bacteria competente solo con agua se usó como control de la esterilidad del proceso (contaminación).

Luego del proceso de transformación las bacterias fueron incubadas en 1 mL de medio SOC (2 g de Bacto Triptona; 0.5 g de Extracto de Levadura; 0.2 mL NaCl (1.5M); 0.25 mL de KCl (1M); 1 mL de MgCl₂ (1M); 1 mL de MgSO₂ (1M) y 0.36 g de Glucosa) durante una hora (1 h) a 37°C y con una agitación constante de 250 rpm. Luego 100 µL de esta suspensión fue sembrada sobre placas de agar LB suplementado con kanamicina a una concentración de 40 mg/mL. Las colonias que crecieron en cada placa luego e un periodo de incubación de 18 a 24 h fueron resembradas en una placa de agar LB suplementado con ampicilina a una concentración de 100 mg/mL.

Las colonias elegidas en cada caso fueron aquellas que crecieron frente a kanamicina más no frente a ampicilina. De cada ensayo de transformación se seleccionó al azar 5 colonias que fueron cultivadas en caldo LB para la posterior verificación de la inserción del plásmido deseado.

V.8 Análisis de las transformantes

Las cepas transformadas fueron analizadas para corroborar que lleven el plásmido insertado y contengan la región de resistencia a kanamicina y las regiones reguladoras.

V.8.1 Purificación del ADN plasmídico

Para la purificación del ADN plasmídico se usó el kit QIAprep[®] Miniprep (Quiagen). El kit fue preparado agregando 700 µL de RNasa a 70 mL del *buffer* P1 y 220 mL de etanol absoluto al *buffer* PE. Se colectó el precipitado de 4 mL de cultivo en medio LB por centrifugación. Luego este precipitado fue resuspendido en 250 µL de *buffer* P2, y se mezcló por inversión (6 veces) e incubó por 5 min a T° ambiente. Seguidamente, se agregó 350 µL de *buffer* N3 y mezcló por inversión (6 veces) hasta obtener una suspensión homogénea. Esta suspensión fue centrifugada y el sobrenadante fue colocado en una columna que atrapó el ADN, se lavó con el *buffer* PE y luego fue eluido con 40 µL de agua MQ estéril.

V.8.2 Extracción del fragmento insertado usando enzimas de restricción

Los plásmidos extraídos fueron digeridos con la enzima de restricción *Pst*I para corroborar que el fragmento de resistencia a kanamicina se hubiera insertado dentro del vector, para lo cual se siguió el procedimiento que se indica en la Tabla 13.

Tabla 13. Concentración de componentes en la mezcla usada en la digestión de los plásmidos recombinantes

Componentes	Volumen (1 Rx)
Plásmido	30.0 μ L
Enzima <i>Pst</i> I	1.0 μ L
<i>Buffer</i> 10X	4.0 μ L
H ₂ O MQ	5.0 μ L

La mezcla maestra se incubó por 2 h a 37°C y luego se analizó en una electroforesis en gel de agarosa al 1%, en *buffer* TAE 1X.

V.8.3 Cepas y plásmidos usados

DH5 α :

F⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ 80d/*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*)U169, hsdR17(*r*_K⁻ *m*_K⁺), λ -.

DH10 β :

F⁻ endA1 recA1 galE15 galK16 nupG rpsL Δ *lacX*74 Φ 80*lacZ* Δ M15 araD139 Δ (*ara,leu*)7697 mcrA Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) λ .

pUC4K:

Número de acceso al GenBank: X06404

PM: 3914 pb

pKK232-8:

Número de acceso al GenBank: U13859

PM: 5094 pb

V.9 Medición de la actividad transcripcional de los promotores de LEE2 y *bfpA*

V.9.1 Ensayo de CAT

La actividad de la enzima cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) fue medida usando la metodología descrita por Puente y col., (1996). Se preparó un extracto crudo de bacterias, a partir de un cultivo de ~6h que alcanzó 1 OD₆₀₀ (agitación a 37°C). Las células fueron colectadas por centrifugación (16400 x g) y luego lavadas con 1 mL de *buffer* TDTT (50 mM de Tris-HCl a pH 7.8, y 30 pM de dithiothreitol). Luego se lisaron por sonicación (a máximo nivel) sobre hielo hasta observarse que la turbidez del medio se pierda y las soluciones se tornen más translúcidas. Las muestras luego fueron centrifugadas a 16400 x g y 4°C durante 15 minutos para eliminar las células intactas y los residuos de células rotas que quedan luego de la sonicación, el sobrenadante fue trasferido a un microtubo limpio para el ensayo CAT.

El ensayo de CAT se realizó por duplicado en una placa de 96 pocillos. En cada reacción se agregó 5 µL de cada extracto y 200 µL de una solución que contiene 1 mM DTNB [5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid)] (Boehringer Mannheim)/0.1 M Tris-HCl pH 7.8, 10.1 mM acetyl-CoA (Pharmacia LKB)/0.1 mM cloranfenicol (Sigma Chemical Co). La lectura de la cinética enzimática se realizó a 412 nm durante 5 minutos usando el MAXline Microplate Reader y el software SOFTmax (Molecular Devices Corporation). En esta cinética se mide al cambio en los niveles de absorbancia como resultado del consumo de sustrato y cambio de coloración en el medio. La medición de la actividad es realizada por el programa, que extrapola de los datos obtenidos para cada muestra a una curva estándar que está incluida en los experimentos. Esta curva estándar contiene diluciones seriadas (1-1000 U_{mL}⁻¹) de cloranfenicol-acetiltransferasa purificados.

V.9.2 Cuantificación de proteínas

La cuantificación de la concentración de proteínas en el extracto celular usado en el ensayo de CAT fue determinada usando el Protein Assay Kit (Pierce). Con los valores de concentración de proteínas obtenidos se calculó la actividad

específica de la enzima. Para la curva estándar usada para la cuantificación de proteínas se usó SAB. Para la cuantificación de proteínas también se usaron placas de 96 pocillos y un total de 10 µL de extracto celular (por duplicado) y como blanco el *buffer* TDTT. Los ensayos de CAT y la cuantificación de proteínas fueron realizados por duplicado (dos ensayos independientes) en todos los casos.

V.10 Análisis estadístico

Los alelos y el fenotipo de las cepas fueron agrupados como datos de frecuencia. Los datos clínicos de duración y severidad se trataron como variables dicotómicas utilizándose los siguientes rangos:

Duración:

- **Diarrea persistente:** aquellas que tuvieron una duración mayor de 14 días.
- **Diarrea no persistente (aguda):** aquellas que tuvieron una duración menor de 14 días.

Severidad:

Usamos el *score* de Vesikari modificado (Ruuska y Vesikari, 1990). Se usó una medida numérica de 0 a 14 puntos de acuerdo a las características clínicas del paciente que incluyen: duración del episodio de diarrea en días (0-3 puntos), número máximo de deposiciones/día durante el episodio (1-3), presencia de vómitos (0-1), número máximo de vómitos/día durante el episodio (0-3), presencia de fiebre (0-1), deshidratación (0-1) y tratamiento (0-2).

- **Diarrea severa:** *score* de Vesikari mayor (>) a 7 puntos.
- **Diarrea no severa:** *score* de Vesikari menor o igual (\leq) a 7

Para la correlación de los alelos de *intimina* con los cuadros clínicos y fenotipos obtenidos usamos Chi-cuadrado, la prueba de T-student y pruebas no paramétricas.

La frecuencia alélica de los alelos de intimina y las tablas de contingencia para la segregación de los alelos de los tres genes (*eae*, *bfpA* y *perA*) de las cepas típicas fueron analizadas usando el programa GenAlex6 (<http://mailman.anu.edu.au/pipermail/genalex6/2005-August/000005.html>).

V.11 Aspectos éticos

El estudio de las cepas de EPEC previamente aisladas de niños con y sin diarrea, contó con la revisión y exoneración por parte del Comité de Ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (SIDISI 51783) (Anexo 8).

VI- RESULTADOS

VI.1 Identificación de EPEC

Durante el periodo Octubre 2006 a Diciembre 2007 (15 meses) se aislaron un total de 120 cepas de EPEC; de las cuales 74 cepas fueron aisladas de 936 muestras de heces de niños con diarrea (7.9%), mientras 46 cepas (10.8%) fueron aisladas de 424 muestras de heces de controles sanos (Tabla 14). La identificación de las cepas de EPEC se realizó por multiplex PCR en tiempo real.

Tabla 14. Total de cepas de EPEC aisladas de muestras de heces de niños con diarrea y controles sanos

D/C	Positivos (%)	Negativos (%)	Total (%)
Diarrea	74 (7.9)	862 (92.1)	936 (100)
Control	46 (10.8)	378 (89.1)	424 (100)
Total	120 (100)	1240 (100)	1360 (100)

VI.2 Evaluación de la Amplificación por PCR de los genes *eae*, *bfpA* y *perA*

Amplificación del gen *eae*

El ensayo fue llevado a cabo bajo las condiciones mencionadas en la metodología. En la estandarización del método se varió la temperatura de hibridación como se muestra en la Figura 13, desde 53 a 62°C. La temperatura escogida para el desarrollo de los PCR fue de 56°C ya que a ésta se obtuvo la mayor concentración del amplificado. La elección de la temperatura más alta evitó la formación de productos inespecíficos.

Amplificación del gen *bfpA*

El ensayo fue llevado a cabo bajo las condiciones mencionadas en la metodología, y con fines de estandarización se varió la temperatura de hibridación como se muestra en la Figura 14, desde 50 a 64°C. La temperatura escogida para el desarrollo de los PCR fue de 58°C ya que a ésta se obtuvo la mayor concentración del amplificado. La elección de la temperatura evitó la formación de productos inespecíficos.

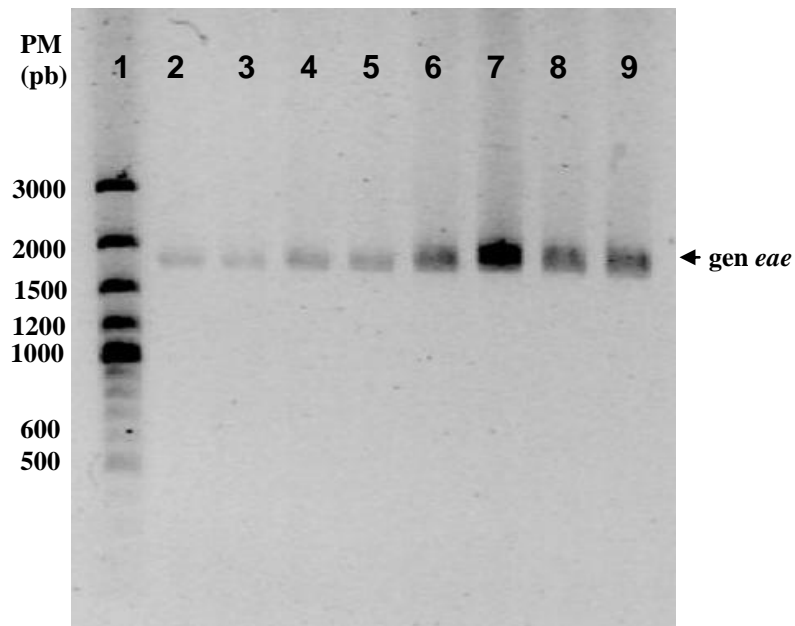


Figura 13. Estandarización de temperatura de hibridación del gen *eae*. Carriles (1) marcador de peso molecular de 100bp (Fermentas) (2 a 9) Se observan los productos de la PCR del gen *eae* (1.8 a 2 Kb) a diferentes temperaturas de hibridación: 62, 61, 60, 59, 57, 55, 54 y 53°C respectivamente. La electroforesis fue llevada a cabo en agarosa al 1% en *buffer* TAE 1X. La cepa usada en el ensayo fue la cepa tEPEC prototipo E 2348/69.

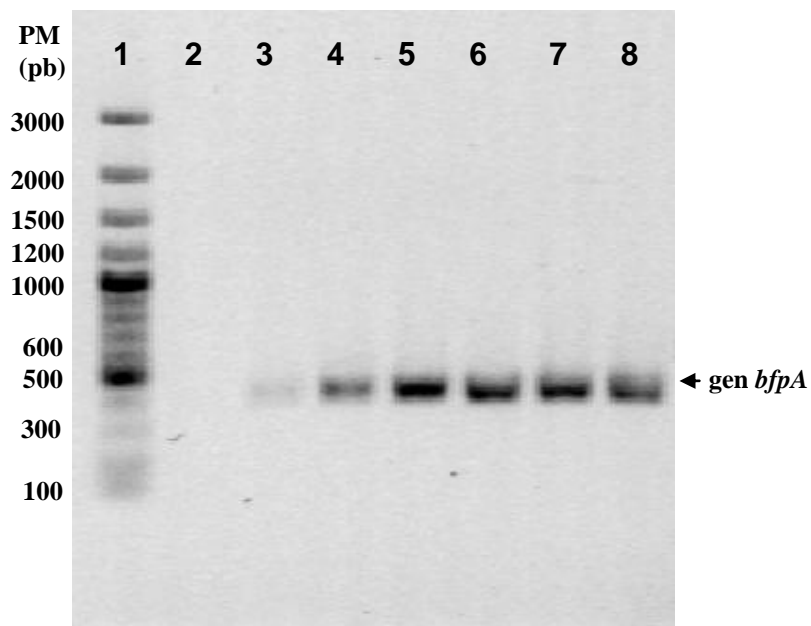


Figura 14. Estandarización de temperatura de hibridación del gen *bfpA*. Carriles (1) marcador de peso molecular de 100bp (Fermentas), (2 a 9) se observan los productos de la PCR del gen *bfpA* (408-414 bp) a diferentes temperaturas de hibridación: 64, 63, 61, 58, 55, 52 y 50°C respectivamente. La electroforesis fue llevada a cabo en agarosa al 1.5 % en *buffer* TAE 1X. La cepa usada en el ensayo fue la tEPEC prototipo E 2348/69.

Amplificación del gen *perA*

El ensayo fue llevado a cabo bajo las condiciones mencionadas en la metodología, y sólo se varió la temperatura de hibridación como se muestra en la Figura 15, desde 58 a 65°C. La temperatura escogida para el desarrollo de los PCR fue el de 61°C que se encuentra entre las 2 temperaturas más altas donde se obtuvo el producto de PCR de alta concentración, sin la formación de productos inespecíficos.

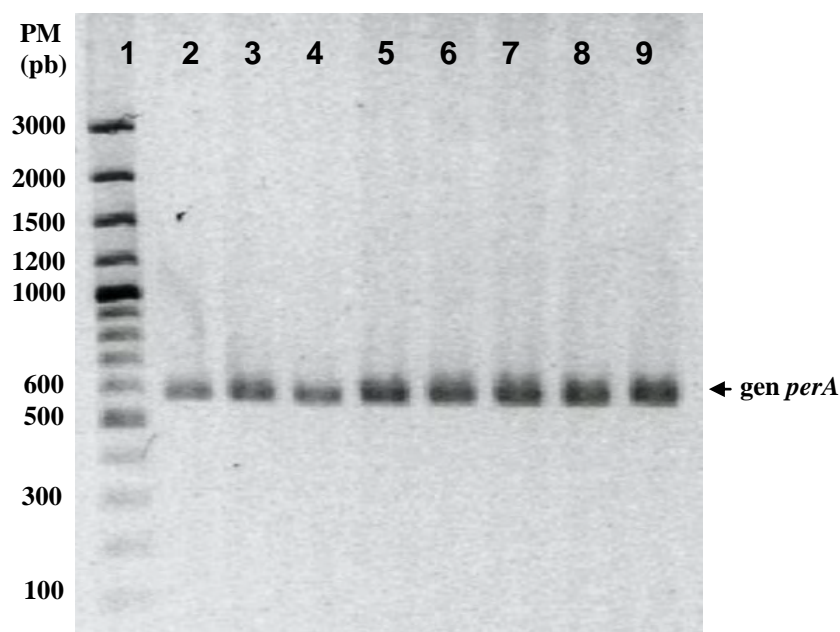


Figura 15. Estandarización de temperatura de hibridación del gen *perA*. Carriles (1) marcador de peso molecular de 100bp (Fermentas), (2 a 9) se observan los productos de la PCR del gen *perA* (586 bp) a diferentes temperaturas de hibridación: 65, 64, 63, 62, 61, 60, 59 y 58 °C. La electroforesis fue llevada a cabo en agarosa al 1.5 % en *buffer* TAE 1X. La cepa usada en el ensayo fue la tEPEC prototipo E 2348/69.

VI.3 Diferenciación de la población de EPEC

Para discriminar entre las cepas tEPEC (*bfpA*+) y aEPEC (*bfpA*-), al total de EPEC aisladas se les realizó un PCR para el gen *bfpA*. Se identificaron 20 cepas tEPEC de un total de 74 muestras de diarrea (27.02%), mientras 6 cepas tEPEC fueron aisladas en controles (13.04%) (Tabla 15). No se encontró diferencia significativa entre la frecuencia de tEPEC de los niños del grupo control y diarrea,

mientras un análisis del total de la población muestra que las cepas aEPEC son significativamente más comunes en controles sanos (40/424, 9.4%) comparado con el grupo diarrea (54/936, 5.8%) ($p < 0.05$).

Tabla 15. Total de cepas de EPEC diferenciadas en tEPEC y aEPEC de acuerdo a la presencia/ausencia del gen *bfpA*

D/C	tEPEC (%)	aEPEC (%)	Total
Diarrea	20 (27.02)	54 (72.9)	74
Control	6 (13.04)	40 (86.9)	46
Total	26 (21.7)	94 (78.3)	120

Entre las cepas tEPEC, el gen *perA* está presente en 55% (11/20) en las cepas aisladas de los casos de diarrea comparado con las cepas aisladas de los controles sanos, 83% (5/6) (Tabla 16). Mientras que en las aEPEC la prevalencia de *perA* fue observada en un 7.4% (4/54) en las cepas aisladas de los casos de diarrea y 2.5% (1/40) en los controles sanos (Tabla 16).

Tabla 16. Distribución de genes de virulencia entre cepas tEPEC y aEPEC aisladas de diarreas y controles

Gen de virulencia	Total de EPEC, n (%)		aEPEC, n (%)		tEPEC, n (%)	
	Diarrea (n=74)	Control (n=46)	Diarrea (n = 54)	Control (n = 40)	Diarrea (n = 20)	Control (n = 6)
<i>eae</i>	74 (100)	46 (100)	54 (100)	40 (100)	20 (100)	6 (100)
<i>bfpA</i>	20 (27)	6 (13)	0 (0)	0 (0)	20 (100)	6 (100)
<i>perA</i>	15 (20.3)	6 (13)	4 (7.4)	1 (2.5)	11 (55)	5 (83.3)

eae, intimina; *bfpA*, bundlina; *perA*, plasmid-encoded regulator

En la Tabla 17 se muestra la distribución de las cepas de EPEC, según si la muestra fue positiva sólo a EPEC (patógeno único), o si EPEC fue aislada en coinfección con otros patógenos entéricos (patógeno mixto).

Tabla 17. Distribución de cepas EPEC aisladas (Diarrea y Control) agrupadas por tipo de cultivo

D/C	tEPEC (N=26)		aEPEC (N=94)	
	Patógeno único n (%)	Patógeno mixto n (%)	Patógeno único n (%)	Patógeno mixto n (%)
Diarrea	8 (30.8)	12 (46.2)	39 (41.5)	15 (15.9)
Control	6 (23.1)	0 (0)	32 (34)	8 (8.5)

VI.4 Evaluación de la extracción de ADN

La extracción del ADN fue llevado a cabo a partir de una colonia de EPEC aislada en una placa de agar MC, mediante el *shock* térmico. En esta técnica, el calentamiento a 100°C rompe las paredes celulares y deja libre al DNA total que luego es separado de los restos celulares por medio de centrifugación. El ADN obtenido tuvo la calidad esperada para los PCR, y fue corroborado mediante la PCR de control interno (*mdh*).

En todos los casos en los que no se obtuvieron productos de PCR se usó el control interno de la PCR, amplificando el gen *mdh*, con lo cual corroboramos la calidad del ADN extraído y descartamos errores en el proceso de extracción, de este modo descartamos la contaminación con agar, que es conocido inhibidor de la PCR.

IV.5 Análisis de los RFLP

RFLP del gen *eae*. Para el gen *eae* se contó con 7 cepas prototipo, en las cuales el alelo de intimina está bien caracterizado. Los alelos fueron determinados según los patrones de fragmentos obtenidos luego de la digestión con dos enzimas, *AluI* (Figura 16) y *BstNI* (Figura 17), usadas de manera independiente.

AluI sólo diferencia 23 de 26 subtipos. Con esta enzima no se puede diferenciar de manera concluyente los subtipos gamma1.1, gamma1.2; iota 1.1, iota1.2 y zeta1.1, zeta1.2 (Anexo 2) pues los patrones de corte son iguales en entre éstos. *BstNI* también distingue sólo 23 de 26 subtipos, no se pueden diferenciar epsilon1.2 de epsilon1.3; iota 1.1 de iota1.2 y zeta1.1 de zeta1.2.

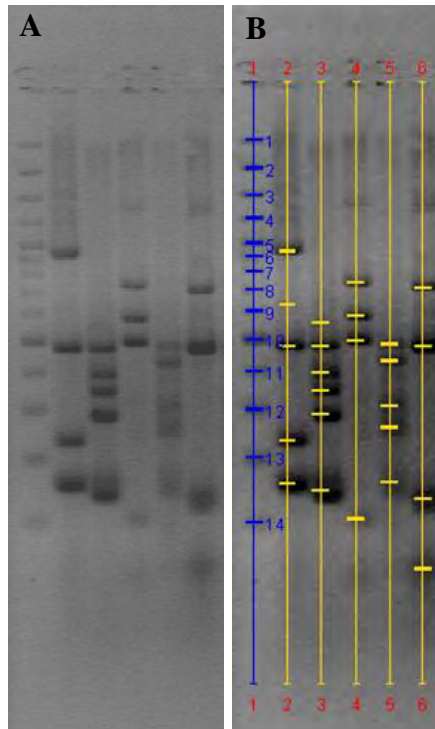


Figura 16. (A) RFLP del gen *eae* con la enzima *AluI*. (B) análisis del patrón de digestión con el programa Quantity One (Bio Rad). Carriles (1) marcador de peso molecular de 100bp (Fermentas), (2) alelo alpha1 (E2348/69), (3) kappa (HSP19/4), (4) beta (R119/1), (5) beta2 (cepa 10), (6) mu (MA55119). La electroforesis fue llevada a cabo en agarosa al 3.0% en *buffer* TAE 1X.

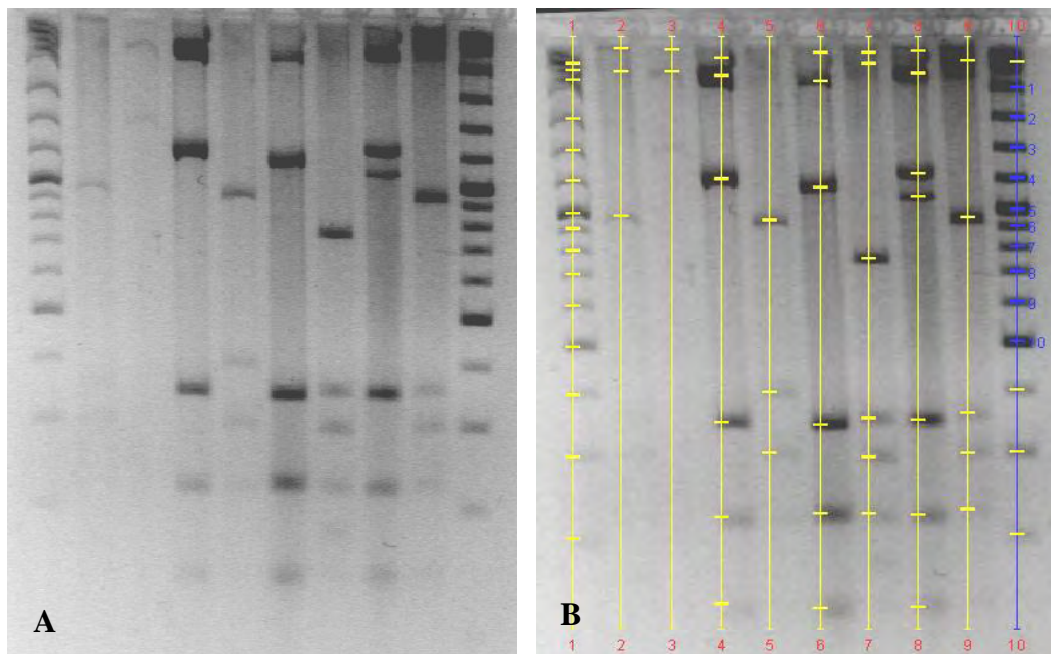


Figura 17. (A) RFLP del gen de *eae* con la enzima *BstNI*. (B) análisis del patrón de digestión con el programa Quantity One (Bio Rad). Carriles (1 y 10) marcador de peso molecular de 100bp (Fermentas), (2) kappa (HSP19), (3) alpha (2348/69), (4) iota (TB227C), (5) beta2 (10), (6) beta (009-271082), (7) mu (Ma551/4), (8) eta (012/050982) y (9) beta2 (Z188/93). La electroforesis fue llevada a cabo en agarosa al 3% en *buffer* TAE 1X.

Los patrones de corte del grupo de alelos: epsilon 1.1, 1.2 y 1.3; gamma1.2 y rho; mu y theta presentaron patrones similares con la enzima *Bst*NI pero se pueden diferenciar con la enzima *Alu*. En general los patrones de corte obtenidos por la enzima *Alu*, nos dan una mejor resolución y nos permiten diferenciar una mayor cantidad de alelos.

RFLP del gen *bfpA*. Para el análisis de los alelos de este gen se contó con 9 cepas de EPEC prototipo (Figura 18). Con la enzima *Alu*, *Bfa*I y *Bst*NI se obtienen cortes que permiten diferenciar los alelos buscados. Los alelos beta1 (Figura 18A, carril4) y beta7 (Figura 18A, carril7) obtenidos con la enzima *Alu* no pueden ser distinguidos en una electroforesis convencional. Resultados similares se obtienen con la enzima *Bfa*I (Figura 18A, carril 13 y Figura 18B, carril 3).

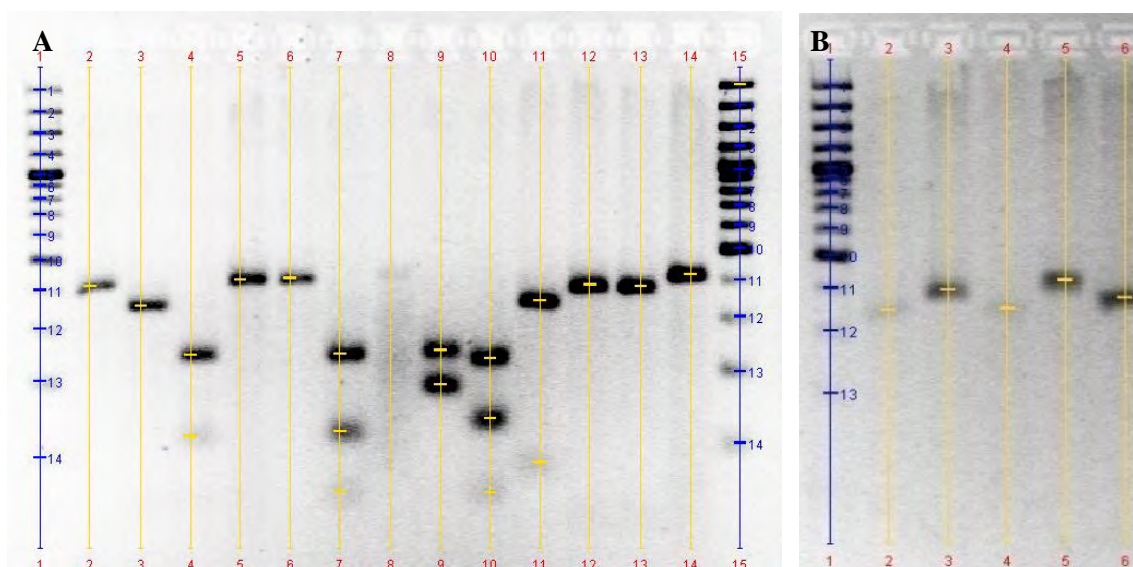


Figura 18. (A) RFLP del gen *bfpA* con la enzima *Alu*I y (B) *Bfa*I analizado con Quantity One (Bio Rad). A, Carriles: (1 y 15) Marcador de peso molecular de 100bp (Fermentas), (2) alpha2 (009-271082), (3) beta3 (CA89-4221), (4) beta1 (012-050982), (5) alpha1 (HSP 19/4), (6) alpha3 (010-511082), (7) beta7 (TB227C), (8) indeterminado, (9) beta2 (Z188/93), (10) beta5 (C771), Digestión con *Bfa*I, (11) alpha2 (009-271082), (12) beta 3 (CA89-4221), (13) beta1 (012-050982), (14) alpha1(HSP 19/4). B) (1) Marcador de peso molecular 100 bp, (2) alpha3 (010-511082), (3) beta7 (TB227C), (4) indeterminado, (5) beta2 (Z188/93) y (6) beta5 (C771). La electroforesis fue llevada a cabo en agarosa al 3% en *buffer* TAE 1X.

RFLP para el gen *perA*. En el análisis del gen *perA* se usó como controles 4 cepas de EPEC prototipo (Figura 19). Con este gen se observan patrones de restricción simples, que no presentaron mayor dificultad para distinguirlos.

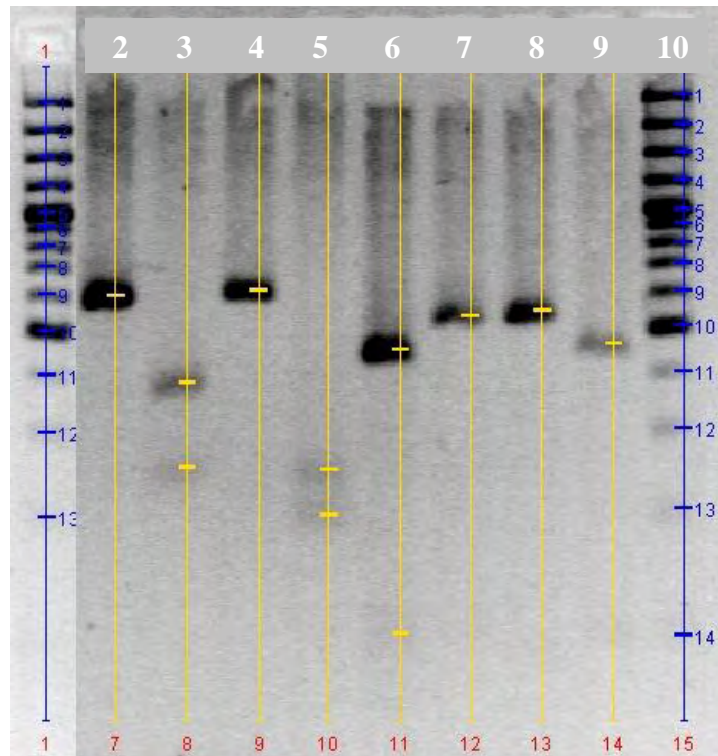


Figura 19. RFLP del gen *perA* con las enzimas *DdeI* y *Sau96I*. Analizado con Quantity One (Bio Rad). Carriles: (1 y 10) Marcador de peso molecular de 100bp (Fermentas). *DdeI*: (2) alpha (HSP 19/4), (3) delta (Z188/93), (4) beta (RN410/1), (5) gamma (CA89-4221), *Sau96I*: (6) alpha (HSP 19/4), (7) delta (Z188/93), (8) beta (RN410/1), (9) gamma (CA89-4221). La electroforesis fue llevada a cabo en agarosa al 3% en *buffer* TAE 1X.

IV. 5 Análisis de frecuencias alélicas

Del total de 120 cepas de EPEC sólo se pudo determinar el alelo del gen *eae* en 113 cepas. Se encontraron un total de 13 alelos diferentes; los resultados de frecuencias en porcentaje de cada alelo obtenido se muestran en la tabla 18. Como se observa, el alelo beta fue el más frecuente (28.3%) tanto en el grupo de pacientes con diarrea (31.1%) como en los controles sanos (23.9%). Seguidos de los alelos theta (20.0%), kappa (11.7%) y mu (6.7%). En toda la población no se identificaron los alelos alpha2, eta, nu, rho y tau (Tabla 18).

No se observó una asociación significativa entre un alelo de *eae* con las poblaciones evaluadas, pero en algunos casos se encontraron alelos del gen *eae*: beta2 (2 cepas) y zeta (una cepa) sólo presentes en los casos de diarrea. No se encontró diferencia significativa entre la distribución alélica en ambas poblaciones.

Tabla 18. Frecuencia de alelos del gen *eae* encontrados en las EPEC de casos de diarrea y controles

Alelo	Diarrea, n (%) N=74	Control, n (%) N=46	Total, n (%) N=120
alpha	0 (0)	2 (4)	2 (2)
beta	23 (31)	11 (24)	34 (28)
beta2	2 (3)	0 (0)	2 (2)
epsilon	3 (4)	4 (9)	7 (6)
gamma	3 (4)	2 (4)	5 (4)
iota	2 (3)	1 (2)	3 (3)
kappa	10 (14)	4 (9)	14 (12)
lambda	1 (1)	3 (7)	4 (3)
mu	6 (8)	2 (4)	8 (7)
omicron	2 (3)	1 (2)	3 (3)
theta	13 (18)	11 (24)	24 (20)
xi	5 (7)	1 (2)	6 (5)
zeta	1 (1)	0 (0)	1 (1)
no tipificable	3 (4)	4 (9)	7 (6)

Entre las cepas de tEPEC (*bfpA+*) podemos apreciar que los alelos más frecuentes para el gen *bfpA* son *bfpA*-beta1/7 (38 %), seguido de *bfpA* - alpha3 (27 %). El alelo *bfpA*-beta1/7 se encontró significativamente relacionado con los casos de diarrea ($p=0.053$) (Tabla 19).

Para el gen *perA*, se encontraron con mayor frecuencia los alelos *perA*-beta (31%) seguido de *perA*-alpha (27 %) (Tabla 20). Entre los cuales el alelo *perA*-beta se encuentra relacionado de manera significativa con los controles sanos ($p=0.051$).

Tabla 19. Frecuencia alélica del gen *bfpA* en casos de diarrea y controles de tEPEC

Alelos <i>bfpA</i>	Diarrea n (%) (N=20)	Control n (%) (N=6)	Total n (%) (N=26)
<i>bfpA</i> alpha 1	1 (5)	1 (17)	2 (8)
<i>bfpA</i> alpha 3	4 (20)	3 (50)	7 (27)
<i>bfpA</i> beta 1/7	10 (50)	0 (0) ^a	10 (38)
<i>bfpA</i> beta 5	1 (5)	2 (23)	3 (12)
no tipificable	4 (20)	0 (0)	4 (15)

^a, $p=0.053$ Prueba exacta de Fisher

Tabla 20. Frecuencia alélica del gen *perA* en casos de diarrea y controles de tEPEC y aEPEC

Alelos de <i>perA</i> en cepas tEPEC			
Alelos <i>perA</i>	Diarrea n (%) (N=20)	Control n (%) (N=6)	Total n (%) (N=26)
<i>perA</i> alpha	6 (30)	1 (17)	7 (27)
<i>perA</i> beta	4 (20)	4 (67) ^a	8 (31)
<i>perA</i> gamma	1 (5)	0 (0)	1 (4)
Negativo	9 (45)	1 (17)	10 (38)
Alelos de <i>perA</i> en cepas aEPEC			
Alelos <i>perA</i>	Diarrea n (%) (N=54)	Control n (%) (N=40)	Total n (%) (N=94)
<i>perA</i> alpha	4 (7.4)	0 (0)	4 (4.3)
<i>perA</i> gamma	0 (0)	1 (2.5)	1 (1.1)

^a, $p=0.051$ Prueba exacta de Fisher

La combinación de los alelos de *bfpA* y *perA* nos indica un tipo de EAF definido. Actualmente están descritos 11 tipos (Lacher y col., 2007), de los cuales encontramos 5 tipos entre nuestros aislados de EPEC.

Mientras la relación entre los genes *bfpA* y *perA* del plásmido EAF tiende a ser conservada, no parece existir una relación estable entre éstos y los alelos de *eae*, pues para cada tipo de EAF no se observa un alelo específico de *eae* y

éste tiende a ser muy variable en todos los casos y se muestra disperso entre los diferentes tipos de EAF encontradas.

La tabla 22 nos muestra la distribución de los alelos del gen *eae* de acuerdo a la duración del episodio de diarrea, tomando como punto arbitrario 8 días para definir una diarrea de larga duración, observamos que el alelo gamma está significativamente asociado a episodios de larga duración. El alelo épsilon sólo se encuentra presente en episodios de corta duración, mientras los otros alelos no muestran una diferencia significativa de distribución entre los episodios.

Al analizar la distribución de los alelos de acuerdo a la edad del niño (≤ 6 y >6 meses) no se encontró una tendencia de distribución de algún alelo respecto a la edad, sólo se observó que los casos de infección de EPEC son mayores en niños mayores de 6 meses, y tiene un mayor número de alelos que no se encuentran asociados significativamente a este grupo etario (Tabla 23).

Para correlacionar los datos clínicos como la severidad y duración de la diarrea con los alelos del gen *eae*, tomamos los datos de las características clínicas de las cepas de EPEC que se presentaron como patógeno único al momento de su aislamiento (Tabla 17) y se obtuvieron los resultados que se presentan en la tabla 25.

Se observa como dato sobresaliente que los porcentajes de presencia de mayor número de vómitos están relacionados a los alelos beta (82%) y kappa (100%) y en un análisis general basado en el score de Vesikari modificado observamos que el alelo kappa está asociado significativamente a los episodios de diarrea más severos en comparación con los otros alelos.

De los casos antes descritos sólo 4 casos se reportaron como diarrea persistente según la definición clínica, en la que la duración de la diarrea debe ser mayor o igual a 14 días. Estos casos de diarrea persistente se encontraron relacionados a los alelos beta (16 y 24 días), theta (22 días) y lambda (15 días) (Figura 20).

La comparación de la variabilidad observada en los alelos de intimina con los días de duración de la diarrea como una variable continua nos muestra que la mayor diversidad alélica está relacionada con episodios de diarrea cortos (5-10 días), mientras los casos de diarrea de mayor duración están relacionados con pocas variantes de intimina, como son beta y theta (Figura 20). El alelo beta se encuentra distribuido de manera homogénea entre los diferentes cuadros de duración de diarrea.

Así mismo, analizando sólo el total de las cepas tEPEC encontradas en los episodios de diarreas (n=20), se observó que mientras las cepas tEPEC *bfpA+/perA-* causaban episodios de diarrea 7.4 (3-12), las tEPEC *bfpA+/perA+* están relacionadas a episodios de diarrea de 5.8 (1-17). El score de Vesikari promedio de las cepas tEPEC *bfpA+/perA+* [8 (± 2.9)] no fue estadísticamente diferente frente a el grupo tEPEC *bfpA+/perA-*, pero características clínicas como los porcentajes de fiebre [7/11 (64 %)] y vómitos [8/11 (73 %)] de las cepas del grupo tEPEC que tiene el gen *perA+*, son mayores frente a las presentadas por las cepas tEPEC que carecen de este gen, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente diferentes (Tabla 24).

Tabla 21. Tipos de EAF según la combinación de alelos de *bfpA* y *perA* en cepas de *E. coli* tEPEC y aEPEC

Tipo de EAF	<i>bfpA</i>	<i>perA</i>	Número de EPEC		Alelos de intimina (n)
			Diarrea	Control	
1 ^a	alpha1	alpha	1	0	kappa (1)
3 ^a	alpha3	beta	4	3	beta (4), beta2 (1), theta (1) y no tipificable (1)
4 ^a	beta1/7 ^b	alpha	2	0	beta (1) y kappa (1)
8 ^a	beta5	alpha	1	1	mu (2)
11 ^a	negativo	gamma	0	1	iota (1)
12	alpha1	beta	0	1	alpha (1)
13	beta5	negativo	0	1	no tipificable (1)
14	beta1/7 ^b	negativo	8	0	beta (3), xi (2), epsilon (1), gamma (1) y no tipificable (1)
15	no tipificable	alpha	2	0	beta (1) y iota (1)
16	no tipificable	gamma	1	0	theta (1)
17	no tipificable	negativo	1	0	theta (1)
18	negativo	alpha	4	0	mu (3) y no tipificable (1)

^aTipo de EAF previamente reportado; ^b Los alelos beta1 y beta7 no pueden ser distinguidos en una electroforesis convencional; (n) número de aislamientos.

Tabla 22. Distribución de los alelos del gen *eae* de las cepas de EPEC de acuerdo a la duración del episodio

Alelos	N	Cepas de EPEC, n (%)	
		≤ 7 d (N= 48)	> 8d (N=26)
beta	23	12 (25)	11 (42)
theta	13	11 (23)	2 (8)
kappa	10	5 (10)	5 (19)
mu	6	3 (6)	3 (12)
xi	5	4 (8)	1 (4)
epsilon	3	3 (6)	0 (0)
gamma	3	0 (0)	3 (12) ^b
otros ^a	11	10 (21)	1 (4)

^a Incluye 3 cepas no tipificables; ^b comparación entre los episodios de diarrea de larga y corta duración $p < 0.05$

Tabla 23. Distribución de los alelos del gen *eae* de las cepas de EPEC por grupos etarios

Alelos	≤6 m de edad (N=21)	> 6 m de edad (N=99)
	n (%)	n (%)
alpha	1 (4.8)	1 (1.0)
beta	8 (38.2)	26 (26.2)
beta2	0 (0)	2 (2.0)
epsilon	1 (4.8)	6 (6.1)
gamma	0 (0)	5 (5.1)
iota	0 (0)	3 (3.0)
kappa	2 (9.6)	12 (12.1)
lambda	1 (4.8)	3 (3.0)
mu	2 (9.6)	6 (6.1)
omicron	0 (0)	3 (3.0)
theta	3 (14.4)	21 (21.2)
xi	1 (4.8)	5 (5.1)
zeta	0 (0)	1 (1)
no tipificable	2 (9.6)	5 (5.1)

Tabla 24. Características clínicas de los episodios de diarrea de cepas de tEPEC, agrupados de acuerdo a la presencia del gen *perA**

Alelos	N	Sangre n (%)	Fiebre n (%)	Duración Media (rango)	Vómitos n (%)	Vómitos ^a Media (rango)	Deposiciones ^b Media (rango)	SRO ^c n (%)	Score Vesikari ^d Media (±DS)
bfp+/per-	9	1 (11)	3 (33)	7.4 (3-12)	3 (33)	0 (0-3)	6 (4-9)	5 (56)	6.8 (±2.2)
bfp+/per+	11	1 (9)	7 (64)	5.8 (1-17)	8 (73)	1 (0-5)	5 (3-11)	6 (55)	8 (±2.9)

Tabla 25. Características clínicas de los episodios de diarrea de cepas de EPEC, agrupados por alelos de *eae***

Alelos	N	Sangre n (%)	Fiebre n (%)	Duración Media (rango)	Vómitos n (%)	Vómitos ^a Media (rango)	Deposiciones ^b Media (rango)	SRO ^c n (%)	Score Vesikari ^d Media (±DS)
beta	11	1 (9)	5 (46)	8 (1-24)	9 (82)	1 (0-9)	5 (4-8)	6 (55)	8.8 (±1.8)
theta	10	0 (0)	5 (50)	2.5 (1-22)	4 (40)	0 (0-9)	6 (4-12)	6 (60)	7.0 (±3.1)
mu	5	0 (0)	0 (0)	7 (1-10)	1 (20)	0 (0-3)	5 (4-7)	3 (60)	6.6 (±3.2)
kappa	4	1 (25)	2 (50)	7 (3-10)	4 (100)	5.5 (1-7)	5.5 (5-11)	2 (50)	10.5 (±1.9) ^f
xi	3	0 (0)	1 (33)	5 (1-8)	1 (33)	0 (0-5)	6 (6-8)	1 (33.3)	7.3 (±4.9)
otros ^e	14	0 (0)	6 (43)	3.5 (1-15)	4 (29)	0 (0-4)	4 (3-11)	5 (36)	5.7 (±2.6)

*, **. ^a número máximo de vómitos /día durante el episodio; ^b número máximo de deposiciones/día durante el episodio; ^cSRO, suero de rehidratación oral; ^d score Vesikari modificado; ^e Incluye beta2, epsilon, gamma, iota, lambda, omicron, zeta y 2 cepas no tipificables; ^f comparación entre kappa y otros alelos $p < 0.05$ según prueba exacta de Student.

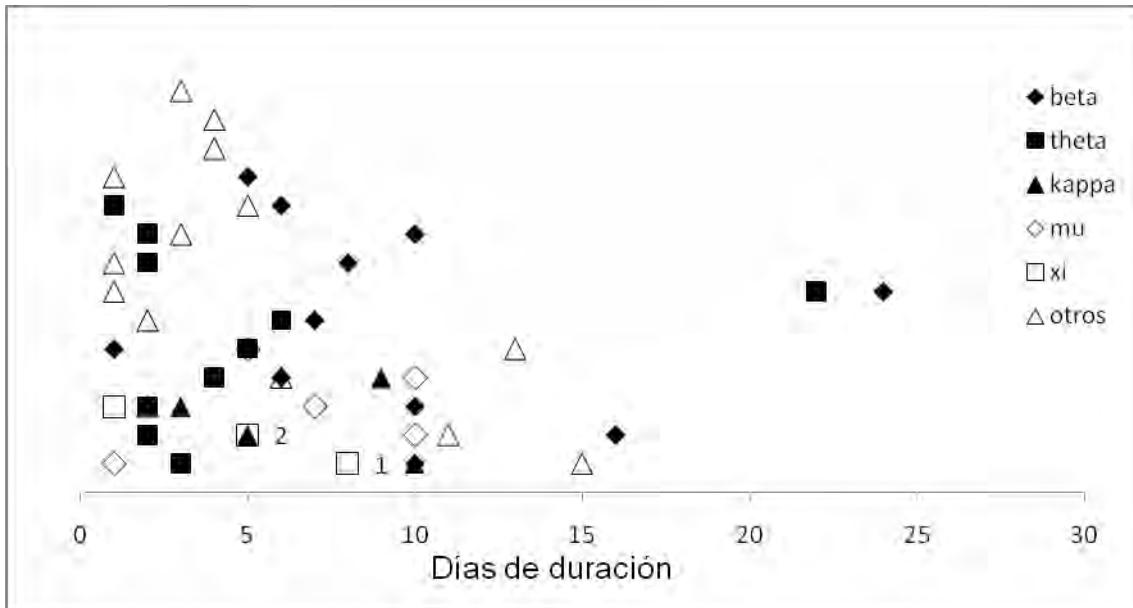


Figura 20. Distribución de los alelos de intimina (*eae*) de acuerdo a la duración del episodio de diarrea.

IV.6 Frecuencias de patrones de adherencia de las EPEC

Para evaluar el patrón de adherencia de nuestra población de aislados de EPEC se usaron las células HEp-2 para hacer las infecciones, y se usó como control positivo del patrón LA a la cepa prototipo E2348/69. El análisis se realizó en una sub-población de cepas, en el que se incluyeron sólo las EPEC que fueron aisladas como patógeno único tanto en los casos de diarrea como en los controles.

La adherencia localizada es el patrón típico descrito para las cepas de tEPEC mientras los patrones LAL, DA, EA e IS han sido descritos principalmente en cepas de aEPEC. En el último patrón se agruparon también a aquellas cepas que no se adhirieron a las células HEp-2, entonces el nuevo grupo IS/NA incluye las células con pocas o ninguna bacteria adherida sobre su superficie (Figura 21). Entre la población de EPEC estudiada no se encontró el patrón AE.

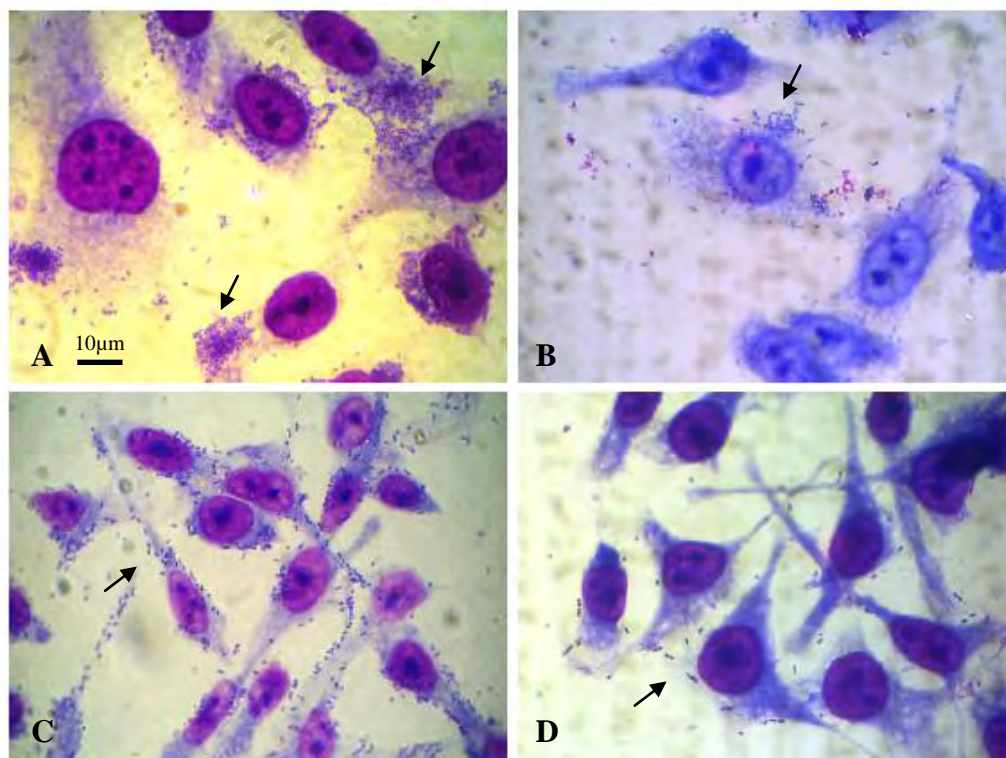


Figura 21. Patrones de adherencia encontrados en la población de EPEC. A, patrón de adherencia localizada (LA); B, patrón de adherencia similar a la localizada (LAL); C, patrón de adherencia difusa (DA) y D, patrón de bacterias aisladas sobre las células (IS). 1000 aumentos.

En la población analizada encontramos que, en el grupo de cepas aisladas de pacientes, 6 de 8 cepas tEPEC (75 %) presentaron el patrón de LA; 1 cepa presentó el patrón de DA (D7081 17 may 07) y otra el patrón IS (D3264 14 nov 07) (Tabla 26). En la cepa que presentó el patrón de DA el score de Vesikari modificado que usamos para medir el grado de severidad del cuadro de diarrea fue de 8, y el episodio es considerado como severo, además esta cepa polimerizó actina, visualizado mediante la tinción fluorescente de la actina; mientras que la cepa que tuvo el patrón de IS presentó un score de 5, y el episodio es considerado como moderado y la cepa no polimerizó la actina de la célula HEp-2. Entre las cepas aEPEC aisladas de casos de diarrea se puede observar que hay diferentes patrones de adherencia, siendo el principal el IS/NA [26/38 (68%)], y luego el DA [7/38 (18%)]. De las dos cepas que presentan el patrón de LA (3538 28 mar 07 y la 3351 25 oct 07), la primera tiene un score de Vesikari de 8, y no polimeriza actina, mientras la segunda cepa presenta un score de Vesikari de 4.

Tabla 26. Tipo de patrones de adherencia de las cepas de EPEC aisladas en la población

Fenotipo	N (%) de cepas de EPEC					
	Diarrea			Control		
Tipo de patrón de adherencia	tEPEC (n=8)	aEPEC (n=38)	Total (n=46)	tEPEC (n=5)	aEPEC (n=18)	Total (n=23)
LA	6 (75) ^a	2 (5)	8 (17)	1 (20)	0 (0)	1 (4)
LAL	0 (0)	3 (8)	3 (7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
DA	1 (13)	7 (18)	8 (17)	0 (0)	1 (6)	1 (4)
IS/NA	1 (13)	26 (68) ^b	27 (59)	4 (80)	17 (94)	21 (91) ^c

LA, adherencia localizada; LAL, adherencia similar a la localizada, DA, adherencia difusa e IS/NA, pocas o ninguna bacteria adherida sobre la célula. ^a, $p=0.0001$ tEPEC vs. aEPEC según prueba exacta de Fisher; ^b, $p=0.005$ tEPEC vs aEPEC según prueba exacta de Fisher; ^c, $p=0.01$ diarrea vs control según el test de χ^2 .

En general, dentro del grupo de cepas aisladas de los pacientes el patrón AL se encuentra significativamente distribuido entre las cepas tEPEC ($p<0.05$), mientras el patrón IS/NA se encuentra relacionado con las aEPEC ($p<0.05$). Del total de aislamientos, el patrón IS/NA se encuentra significativamente relacionado a las cepas de control en comparación con las cepas aisladas de los pacientes.

IV.7 Evaluación de la capacidad para polimerizar actina

El fenotipo A/E fue evaluado mediante la medición de la polimerización de actina en las células HEp-2, y se usó como control positivo a la cepa prototipo E2348/69. La visualización de la actina polimerizada se hizo mediante la técnica de FAS (Figura 22).

El análisis se realizó en una sub-población de cepas, en el que se incluyeron sólo las EPEC que fueron aisladas como patógeno único tanto en los casos de diarrea como en los controles.

Tabla 27. Polimerización de actina de las cepas de EPEC aisladas en la población

Fenotipo	N (%) de cepas de EPEC					
	Diarrea			Control		
Polimerización de actina	tEPEC (n=8)	aEPEC (n=38)	Total (n=46)	tEPEC (n=5)	aEPEC (n=18)	Total (n=23)
P	6 (75) ^a	1 (3)	8 (17)	2 (40) ^b	0 (0)	2 (9)
NP	2 (25)	37 (97)	38 (83)	3 (60)	18 (100)	21 (91)

^a, existe diferencia significativa entre el grupos tEPEC y aEPEC según el test de χ^2 ($p=0.0001$); ^b, diferencia significativa entre el grupos tEPEC y aEPEC según el test de χ^2 ($p=0.056$); P, polimerizan y NP, no polimerizan.

Dentro del grupo de cepas de EPEC aisladas de los pacientes observamos que 6/8 (75 %) cepas tEPEC polimerizaron actina, característica que estuvo significativamente asociada a las cepas tEPEC dentro de nuestro grupo diarrea ($p<0.05$), mientras que en las cepas tEPEC aisladas de los controles sólo mostraron una tendencia a la asociación ($p=0.056$) con la polimerización. Asimismo, 37/38 (97 %) aEPEC no polimerizaron actina. La única cepa aEPEC dentro del grupo diarrea que polimeriza actina (D3207 23 abr 07) presentó un patrón de adherencia difusa (DA) y tuvo un score de Vesikari de 10, es decir el episodio de diarrea fue severo. Dentro del grupo control se observó polimerización sólo en 2/5 (40 %) de tEPEC, mientras el total de aEPEC no polimerizan actina (Tabla 27).

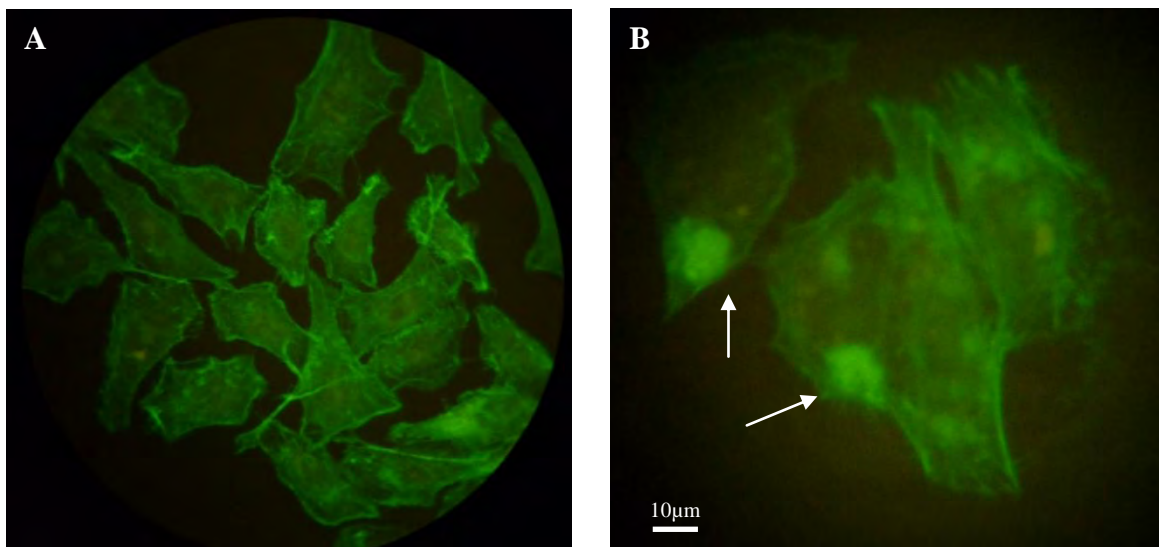


Figura 22. Visualización de actina mediante la técnica de FAS. **A**, esqueleto de actina de la célula HEp-2 y **B**, célula con la actina polimerizada después de la infección con EPEC (flecha). 1000 aumentos.

IV.8 Análisis del Perfil de Proteínas de Secreción

Se conoce que el perfil de proteínas que son secretadas por EPEC difieren entre las cepas EPEC prototipo estudiadas, por ejemplo la cepa prototipo B171-8 no secreta EspC (no tiene el gen que codifica para esta proteína), a diferencia de la cepa E2348/69; por esta razón al evaluarse un grupo de cepas aisladas de una población se espera que la variación entre los perfiles sea mayor.

Para este análisis se sub-agrupó la población de 120 cepas de EPEC, escogiendo sólo aquellas que se presentaron como patógeno único en el aislamiento, en ambos grupos, diarrea y control. Además en éstos grupos se incluyeron aquellas cepas que tuvieron un patrón definido de alelo de intimina (se excluyeron los alelos no determinados), tratando de agrupar la mayor variabilidad de alelos de intimina en cada grupo.

En total se analizaron 57 cepas, 42 cepas aisladas de casos de diarrea y 15 cepas de los controles sanos. Se usó como patrón de comparación los perfiles de la cepa prototipo E2348/69, tanto en cultivo estático como en agitación, y el criterio de selección usado para considerar a un perfil como nuevo se basó en encontrar diferencias ya sea de presencia o ausencia de bandas con respecto al perfil de la cepa prototipo. Fueron consideradas dentro de un mismo perfil aquellas cepas que presentaran el mismo patrón de secreción en sus respectivos cultivos en condiciones de agitación o estáticos. Basados en este criterio de selección se encontraron 11 perfiles diferentes al perfil de la cepa prototipo E2348/69, los cuales fueron numerados del 1 al 11 (Figura 23, Tabla 28). Las características de cada uno de los perfiles se describen en el anexo 9.

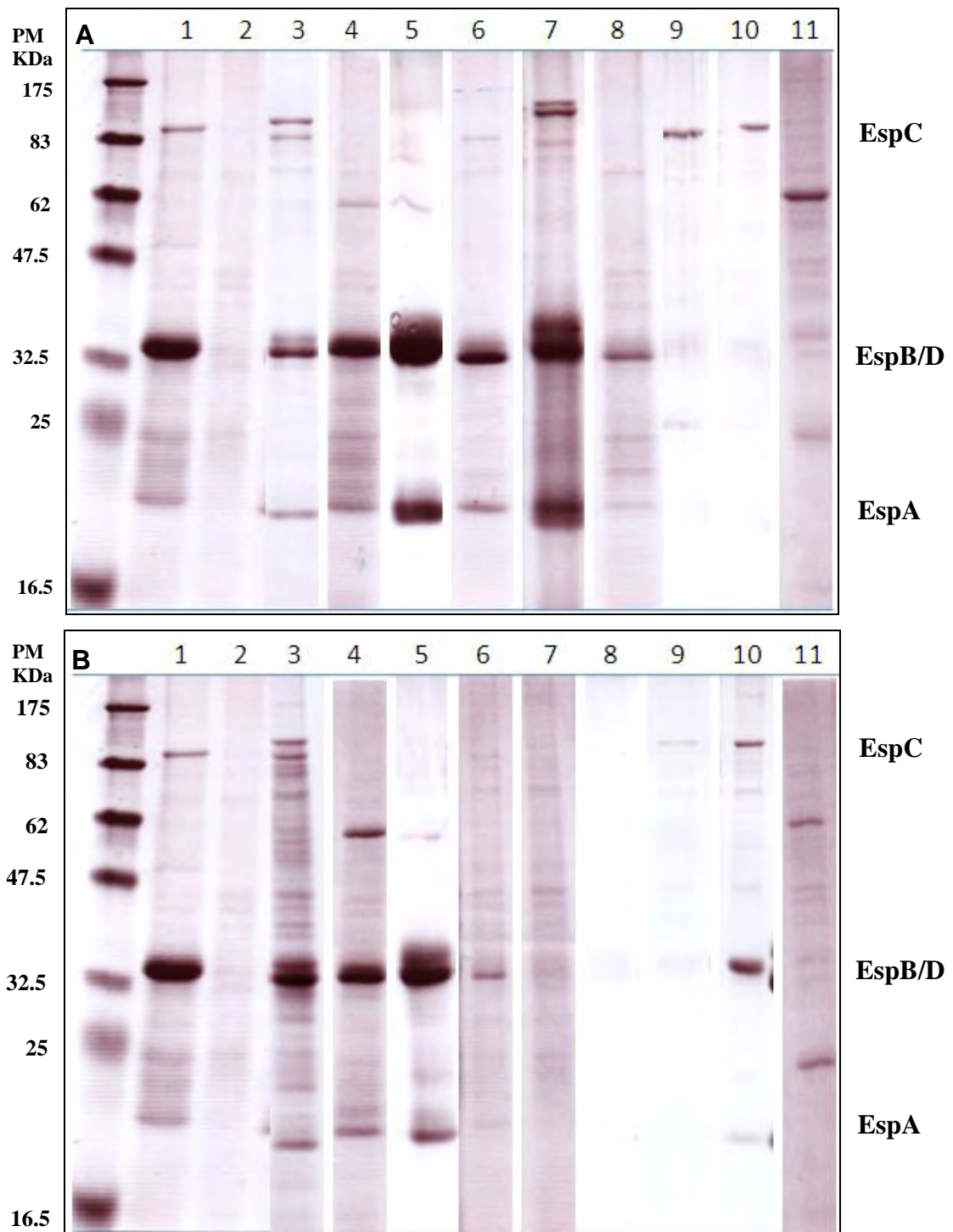


Figura 23. Perfiles de proteínas secretadas por cepas de EPEC aisladas de la población. Se observan 11 tipos de perfiles, que van numeradas desde el 1 al 11. (A) Corresponde a cultivo en agitación, y (B) a cultivos en condiciones estáticas.

Tabla 28. Resumen del perfil de secreción de proteínas entre las cepas tEPEC y aEPEC

Proteínas Secretadas	Perfiles de Proteínas secretadas n (%)										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10 ^e	11
	N=8	N=23	N=2	N=1	N=5	N=1	N=1	N=4	N=3	N=5	N=4
EspC	+	-	+ ^a	-	-	-	-	-	+	+	-
EspB/D	+	-	+ ^b	+	+ ^b	+	+ ^b	+	-	-	-
EspA	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Otras	-	-	-	-	-	-	+ ^c	-	-	-	+ ^d
tEPEC, N=10	1 (13)	3 (13)	0 (0)	1 (100)	2 (40)	1 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (40)	0 (0)
<i>perA+</i>	1 (13)	2 (9)	0 (0)	1 (100)	2 (40)	1 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (40)	0 (0)
aEPEC, N=47	7 (88)	20 (87)	2(100)	0 (0)	3 (60)	0 (0)	1(100)	4(100)	3(100)	3 (60)	4(100)
<i>perA+</i>	3 (38)	1(4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

^a, se observa una banda doble de EspC; ^b, se observan las bandas de EspB y EspD separadas; ^c, banda doble de mayor peso molecular que EspC; ^d, banda de ~ 60KDa; ^e, en condiciones de cultivo estático no secreta proteínas.

Las cepas con Perfil 1 tienen el mismo patrón de la cepa prototipo E2348/69, mientras las cepas con los Perfiles 3, 4, 5 y 6 no secretan EspC, a excepción del perfil 3 que secreta EspC y una proteína de peso molecular mayor. Además, en el Perfil 6 (n=1) no se aprecia la banda de la proteína EspA, que es la principal unidad del complejo aguja del SSTT (Ogino y col., 2006), lo que indicaría que el complejo aguja estaría afectado en esta cepa. Éstos perfiles se agruparon dentro del grupo 1 (perfiles 1, 3, 4, 5 y 6), tal como se muestra en la tabla 29, que tiene como característica principal que existe secreción de proteínas tanto en cultivos en agitación como estáticos, que es una característica de las tEPEC (*bfp+*) que poseen el operón *per*. Este grupo 1 se encuentra distribuido sólo en casos de diarrea (17 vs 0, $p < 0.05$) (Tabla 29), y está presente tanto en tEPEC (5/17, 29.4 %) como en aEPEC (12/17, 70.6%). Todas las cepas tEPEC fueron positivas al gen *perA* 5/17, 29.2 % (Tabla 28).

Tabla 29. Grupos de perfiles de proteínas de secreción según la condición de cultivo en agitación y en estático

Grupos	N (%) de muestras aisladas			P
	Diarrea N=42	Control N=15	Total N=57	
1	17 (19) ^a	0 (0)	17 (14)	0.009
2	15 (36)	8 (53)	23 (40)	0.4
3	5 (12)	3 (20)	8 (14)	0.36
4	3 (7)	2 (13)	5 (9)	0.59
5	2 (5)	2 (13)	4 (7)	0.28

^a, $p < 0.05$ diarrea vs. control según la prueba exacta Fisher. Grupo 1: perfiles 1, 3, 4, 5 y 6; grupo 2: perfil 2; grupo 3: perfiles 7, 8 y 9; grupo 4: perfil 10 y grupo 5: perfil 11.

Los perfiles 7, 8 y 9 (Grupo 3 de la tabla 29) sólo secretan proteínas en cultivos en agitación; todas estas cepas de EPEC no tuvieron el gen *perA*, y se encuentran distribuidas entre cepas de aEPEC (diarrea=5 y control=3). En el perfil 7 (n=1) se observa la secreción de EspB/D y EspA, mas una banda de alto peso molecular que EspC, resultado coincidente al reportado para la proteína EspP (~135.7 KDa) de EHEC (Deng y col., 2005). En el perfil 8, sólo se observa la presencia de las proteínas EspB y EspD en cultivos en agitación, y en uno de las

cepas estas proteínas se observaron separadas (D3028 03 ago 07). En el perfil 9 (n=3) sólo se observó la secreción de la proteína EspC en dos cepas, mientras que en otra cepa se observó sólo la presencia de una banda doble de ~135.7 kDa similar a la reportada en el perfil 7 (EspP).

El Perfil 10 (n=5) (grupo 4 de la tabla 29) sólo se observaron secreción de proteínas en los cultivos estáticos. Sólo en una cepa de EPEC (D3193 22 ago 07) se observó la secreción de EspC en cultivos en agitación. Este perfil lo presentaron 3 aEPEC aisladas de casos de diarrea y 2 tEPEC (*bfpA+* y *perA+*) aisladas de controles.

En el perfil 11 (n=4) (grupo 5 de la tabla 29) se observaron bandas diferentes a la del perfil de proteínas secretadas por la cepa prototipo E2348/69. Estos fragmentos son observados tanto en cultivos en agitación como en cultivos estáticos. Este perfil fue observado tanto en EPEC aisladas en casos de diarrea (n=2) como en controles sanos (n=2), todas estas cepas fueron atípicas (*bfpA-* y *perA-*).

En la tabla 30 se resume la cantidad de cepas que presentaron los perfiles de proteínas antes descritos. El perfil 2 (23/57, 40%) se presentó con mayor frecuencia en la población analizada, siguiéndole en importancia el perfil 1 (8/57, 14%), el perfil 10 (5/57, 9%) y el perfil 5 (5/57, 9%). Esta observación sugiere que la mayor cantidad de cepas circulantes en la población no secretaría proteínas durante la infección. El gen *perA* es el regulador transcripcional relacionado con la expresión de los genes cuando las bacterias crecen en condiciones estáticas. Entre las cepas de EPEC evaluados, 9 cepas tEPEC y una cepa aEPEC (perfil 2) fueron positivas a este gen. Podemos observar que *perA* se encuentra distribuido entre los perfiles 1 (n=1), 2 (n=4), 4 (n=1), 5 (n=2), 6 (n=1) y 10 (n=2), en los que se observó secreción de proteínas en condiciones en condiciones estáticas, a excepción del perfil 2, en los que las cepas no secretan bajo ninguna condición de crecimiento. Así mismo se observó claramente que en los perfiles en los cuales sólo hay secreción en condiciones de agitación (perfiles 7, 8 y 9) el gen *perA* no se encontró presente (Tabla 30).

Tabla 30. Perfil de proteínas secretadas de las cepas de EPEC estudiadas

Perfil	Diarrea N=42 n (%)	Control N=15 n (%)	tEPEC N=10; n (%)	aEPEC N=47; n (%)	<i>perA+</i> N=11, n (%)	Total N=57 n (%)
1	8 (19)	0 (0)	1 (10)	7 (15)	1 (9)	8 (14)
2	15 (36)	8 (53)	3 (30)	20 (43)	4 (36)	23 (40)
3	2 (5)	0 (0)	0 (0)	2 (4)	0 (0)	2 (4)
4	1 (2)	0 (0)	1 (10)	0 (0)	1 (9)	1 (2)
5	5 (12)	0 (0)	2 (20)	3 (6)	2 (18)	5 (9)
6	1 (2)	0 (0)	1 (10)	0 (0)	1 (9)	1 (2)
7	1 (2)	0 (0)	0 (0)	1 (2)	0 (0)	1 (2)
8	2 (5)	2 (13)	0 (0)	4 (9)	0 (0)	4 (7)
9	2 (5)	1 (7)	0 (0)	3 (6)	0 (0)	3 (5)
10	3 (7)	2 (13)	2 (20)	3 (6)	2 (18)	5 (9)
11	2 (5)	2 (13)	0 (0)	4 (9)	0 (0)	4 (7)

Cabe resaltar que en todos los casos sólo se consideró como presentes las bandas que estuvieran claramente definidas (comparación con la cepa prototipo E2348/69), las bandas tenues como las observadas en la descripción del perfil 2, se consideran como “fondo” y son restos de componentes celulares como producto de la ruptura de las bacterias en el momento de la manipulación. Cuando en el procedimiento se extraen una mayor cantidad de restos celulares se obtienen bandas de mayor intensidad como las observadas en la descripción del perfil 3 o 6, que no fueron tomadas en cuenta al momento de hacer el análisis.

Las proteínas secretadas que se encuentran con mayor frecuencia en los aislados de EPEC fueron las proteínas EspB/D, 23 de 42 casos de diarrea (55%) y 4 de 15 casos de controles (27%) presentan esta proteína. Entre las cepas tEPEC y aEPEC también se observó a estas proteínas como las más frecuentes, con una frecuencia de 7/10 (70%) y 20/47(43%) respectivamente. La proteína EspA se encuentra significativamente más frecuente en la población de EPEC aisladas de casos de diarrea comparada con los controles ($p<0.05$); mientras la frecuencia de esta proteína entre las cepas tEPEC y aEPEC fue similar. La proteína EspC se encuentra distribuida de manera homogénea entre nuestra población de EPEC y su frecuencia es de 15/42 (36%) en casos de diarrea y 3/15 (20%) en casos de control (Tabla 31).

Tabla 31. Frecuencia de proteínas secretadas dentro de la población de EPEC

	Diarrea N=42	Controles N=15	tEPEC N=10	aEPEC N=47
Proteínas	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
EspC	15 (36)	3 (20)	3 (30)	15 (32)
EspB/D	23 (55)	4 (27)	7 (70)	20 (43)
EspA	21 (50) ^a	0 (0)	5 (50)	16 (34)

^a,Diferencia significativa entre el grupo diarrea y control según la prueba de χ^2

VI. 7 Evaluación de la actividad transcripcional usando el reportero CAT

Con el objetivo de analizar la regulación de los activadores transcripcionales Ler y PerA se midió la actividad transcripcional de los operón *LEE2* y *bfp*

respectivamente, en condiciones de crecimiento: agitación y estático, utilizando fusiones transcripcionales al gen reportero *cat*.

El casete de kanamicina fue obtenido del plásmido pUC4K usando la enzima de restricción *Pst*I que corta en los extremos del casete, el fragmento obtenido tuvo un peso molecular de 1200 pb (Figura 24).

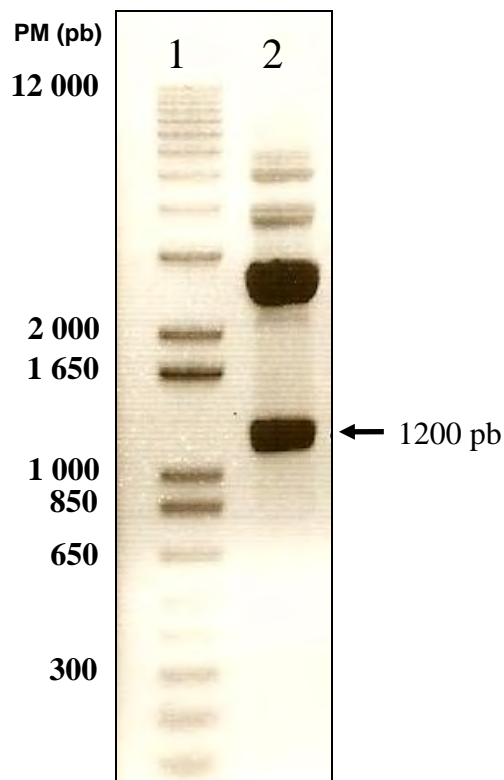


Figura 24. Digestión del plásmido pUC4K con la enzima *Pst*I. Carriles (1): Marcador de peso molecular 1Kb (NEB) y (2): fragmento liberado que corresponde al casete de resistencia a kanamicina (flecha).

En la figura 25 se presenta a los plásmidos pCAT232 y pSEPZ11 con sus respectivas regiones reguladoras liberadas después del corte con las enzimas de restricción *Bam*H y *Hind*III.

En el caso de la fusión pCAT232 la enzima cortó en la posición +4344 dentro del casete de ampicilina, de esta manera este casete queda inactivado, y así el único marcador de selección fue la resistencia a kanamicina (Figura 26 carril 3). Sólo en el caso de fusión pSEPZ11 se tuvo que realizar una digestión parcial con

la enzima *Pst*I debido a que la región reguladora del operon LEE2 también tiene un sitio de corte para la enzima *Pst*I (Figura 26 carril 4). En un primer ensayo se emplearon tiempos a partir de 2 min, pero incluso con este tiempo de incubación se obtuvo un fragmento de aproximadamente 1200 pb como producto del corte entre el casete de ampicilina y la región reguladora del operon LEE2 (flecha larga) y la cantidad de plásmido sin digerir o linearizado tenía poca concentración (flecha corta). En un segundo ensayo se determinó que el tiempo óptimo para la digestión fue de 5 segundos seguido de un periodo de inactivación de la enzima a 80°C durante 5 min (Figura 27). Con este procedimiento se logró obtener una banda que representaba al plásmido abierto en un solo punto de corte, que pudo estar ubicado tanto en la posición +4344 (casete de ampicilina) como dentro de la región reguladora de LEE2. Por lo que el paso siguiente luego de la inserción del casete de kanamicina fue revisar que la resistencia a ampicilina quedara inactiva; por lo tanto, sólo se seleccionaron aquellas construcciones en las que el casete de kanamicina interrumpió el gen de resistencia a ampicilina.

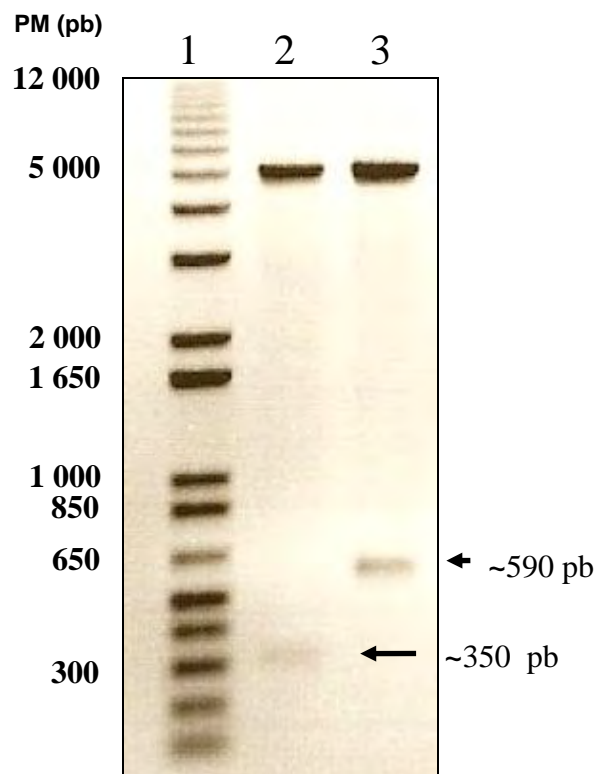


Figura 25. Digestión de los plásmidos pCAT232 y pSEPZ11 con *Bam*H y *Hind*III. Carriles (1): marcador de peso molecular, (2) pKK232 linearizado y región reguladora del operon *bfp* (~350 pb), y (3) pKK232 linearizado y región reguladora del operon LEE2 (~ 590 pb).

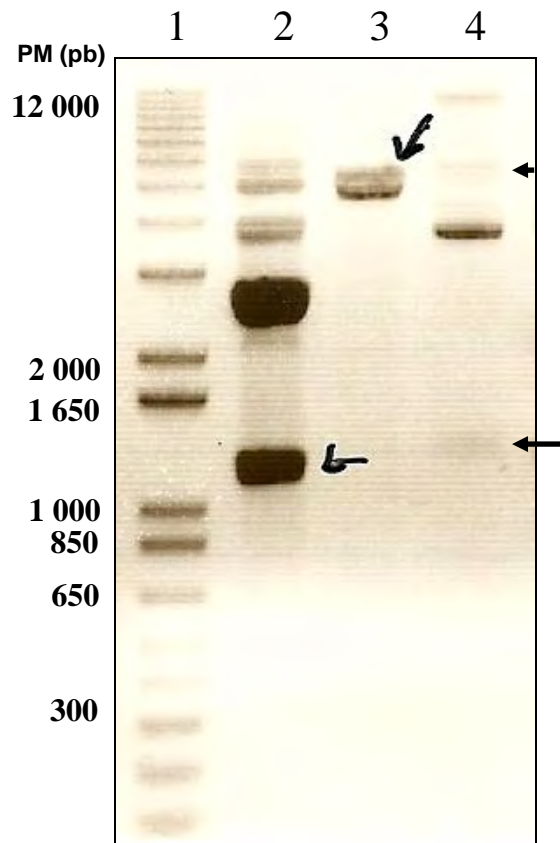


Figura 26. Digestión de los plásmido pUC4K, pCAT232 y pSEPZ11. Carriles (1): Marcador de peso molecular, (2): pUC4K digerido, (3): pCAT232 lineal y (4): Digestión parcial de pSEPZ11 con periodos de incubación de 2 min.

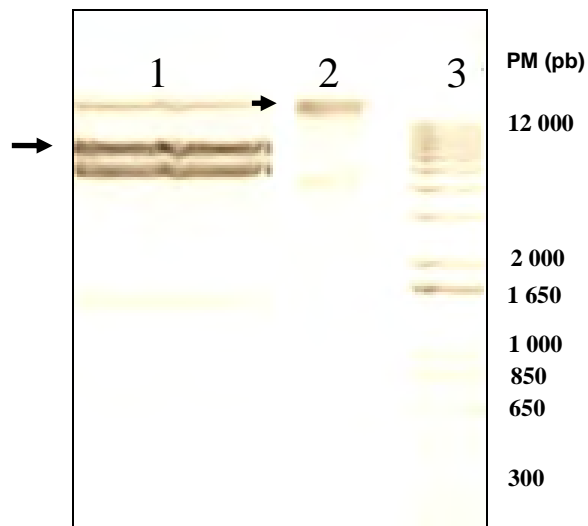


Figura 27. Digestión parcial del plásmido pSEPZ11. Carriles (1): Digestión del plásmido con un periodo de incubación de 5 seg (dos carriles unidos, flecha grande); (2): Plásmido pSEPZ11 sin digerir (flecha corta) y (3): Marcador de peso molecular 1Kb (NEB).

Los fragmentos obtenidos mediante la digestión con *Pst*I, luego fueron purificados del gel de agarosa usando el kit comercial QUIAquick Gel Extraction (QUIAGEN) y corridos en un nuevo gel de agarosa para verificar su pureza y para cuantificar de manera visual su concentración, determinando como adecuada la extracción en la que la banda del inserto y del vector se observará bien definida y sin bandas adicionales que pudieran contaminar el ensayo (Figura 28).

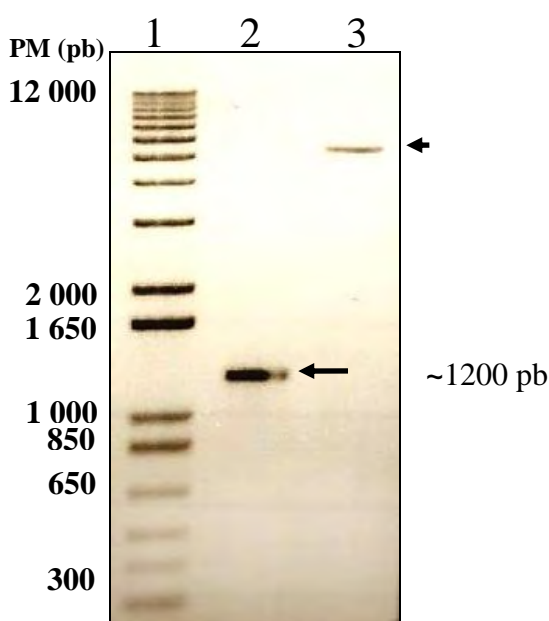


Figura 28. Fragmentos purificados luego de la digestión con *Pst*I. Carriles (1): Marcador de peso molecular 1Kb (NEB); (2): Casete de kanamicina (flecha grande); y (3): pSEPZ11 linear (flecha corta).

Luego de obtenidos el inserto y el vector, éstos se ligaron en la proporción molar de 5:1 respectivamente, los plásmidos resultantes son mostrados en la figura 29. A partir de las colonias Km^r y Ap^s se realizaron extracciones de los plásmidos con el kit comercial QUIAquick Gel Extraction (QUIAGEN). La calidad y pureza del ADN plasmídico obtenido luego fue analizada en un gel de agarosa al 1 % donde se pudo corroborar el peso molecular del plásmido obtenido y su pureza (Figura 30).

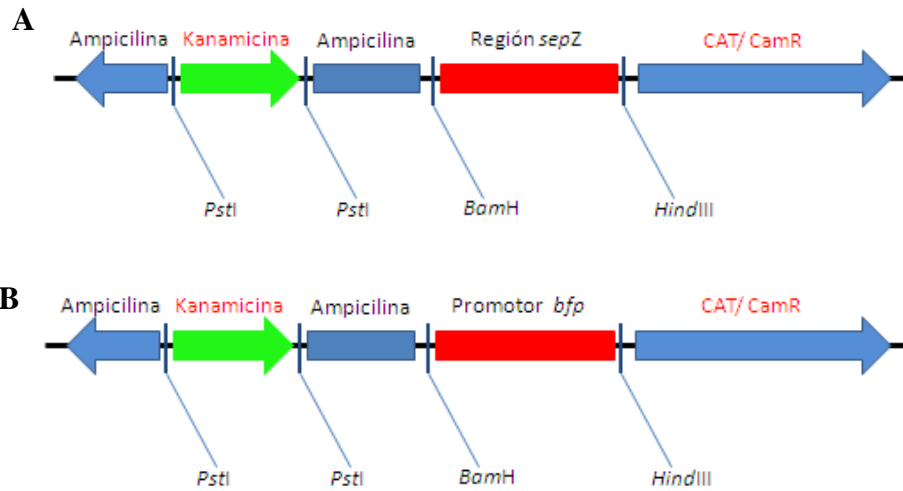


Figura 29. Plásmidos con resistencia a kanamicina.(A) pSEPZ11 Km^r. (B) pCAT232 Km^r. Se observa el casete de ampicilina interrumpido por la inserción del casete de kanamicina en ambos plásmidos.

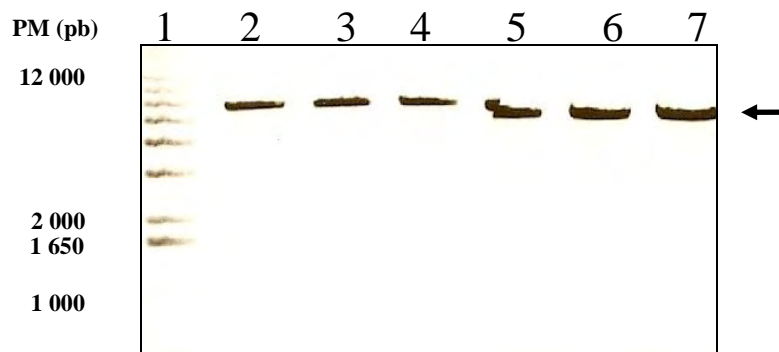


Figura 30. Purificación de los plásmidos con resistencia a kanamicina. Carriles (1): Marcador de peso molecular; (2, 3 y 4): pSEPZ11 Km^r de 3 cepas seleccionadas al azar y (5, 6 y 7): pCAT232 Km^r de 3 cepas seleccionadas al azar (flecha).

Luego los plásmidos fueron digeridos con la enzima *PstI* para que liberen el inserto (casete de kanamicina) (Figura 31), observándose dos bandas, la de mayor peso molecular corresponde al vector (flechas larga) y la segunda, de menos peso molecular, al inserto (flechas corta).

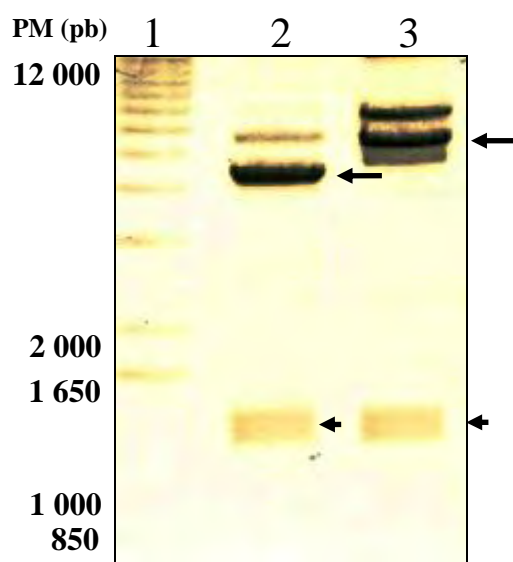


Figura 31. Plásmidos pCAT232 Km^r y pSEPZ11 Km^r digerido con *Pst*I. Carriles (1): marcador de peso molecular, (2): pCAT232 con el casete de kanamicina liberado (flecha corta) y (3): pSEPZ11 con el casete de kanamicina liberado (flecha corta) (~1200 pb).

Medición de la actividad transcripcional de promotores de *bfpA* y LEE2

De las cepas analizadas en el ensayo de perfiles de proteínas secretadas se escogió una cepa (diarrea) que representara cada perfil. La actividad transcripcional se midió bajo dos condiciones diferentes de crecimiento: agitación y estático. La fusión pSEPZ11 tiene la región reguladora del operón LEE2 del islote de patogenicidad LEE, en cuya regulación está involucrada *ler*, por lo tanto de manera indirecta el sistema nos indicaría si *ler* está regulando la expresión de genes en LEE; mientras que la fusión pCAT232 contiene la región reguladora del operón *bfp* que es activado sólo por el regulador transcripcional *per*, por lo tanto de esta manera se mide indirectamente si *per* está regulando la expresión de genes en EPEC.

Para caracterizar la actividad transcripcional del perfil1 se escogió a la cepa prototipo E2348/69 que al mismo tiempo fue usada como referente para medir el nivel de actividad transcripcional mostrado por cada cepa. También se escogieron cepas representantes de los perfiles 2, 4, 5, 7, 8, 9, 10 y 11 dentro del grupo diarrea, y dentro del grupo control se tuvieron cepas que representaran a los perfiles 2, 8, 10 y 11.

Las cepas control de los perfiles 1, 4, 5, 7 y 9 no pudieron ser transformadas con éxito, principalmente se observó que éstas no crecían en agar LB suplementado con 40mg/mL de kanamicina. Este resultado puede explicarse por dos razones principales, la primera hace referencia a una mala transformación, en donde el plásmido no logró ser insertado en la bacteria, esta explicación fue descartada, pues el proceso se repitió tres veces, en las que no se tuvo éxito. La segunda explicación estaría relacionada con la viabilidad de las bacterias antes y luego de ser transformadas. Se observó que durante la preparación de las cepas competentes, la población disminuía durante los tratamientos de centrifugación, no observándose un precipitado notorio al igual que el resto de bacterias, lo que indica que hubo abundante muerte de la población, por que la bacteria es muy lábil ante los procedimientos empleados.

De las cepas procesadas obtuvimos los resultados mostrados en las figuras 32 y 33. La figura 32 nos muestra las actividades transcripcionales de las bacterias transformadas con el plásmido pSEPZ11 km^r. En este ensayo esperábamos obtener algún nivel de transcripción en todas las cepas. Las cepas pertenecientes a los perfiles 4, 8 y 9 (aEPEC), no mostraron un nivel de transcripción en los cultivos en agitación, a pesar de que estos perfiles representan cepas que secretan proteínas en condiciones de agitación (perfil 4, 8 y 9). En el perfil 9 sólo se aprecia la secreción de EspC, que no es secretada por el SSTT, pero su expresión si es regulada via Ler. La cepa que pertenece al perfil 4, además muestra secreción en condiciones estáticas, como se observó en su perfil de secreción y es concordante con el nivel de transcripción observado bajo estas condiciones.

En las cepas de los perfiles 5 (tEPEC), 10 y 11 (aEPEC) se observa un nivel de transcripción mayor que el mostrado en la cepa prototipo, probablemente estas cepas cuenten con activadores transcripcionales no caracterizados hasta el momento, o en estas cepas los represores estan mutados o delecionados. En los cultivos en condiciones estáticas en las cepas de los perfiles 5 y 11 se mantiene el mismo patrón, mientras en la cepa del perfil 10 la actividad transcripcional es notablemente menor en el cultivo en condiciones estáticas, característica observada en una aEPEC, que no cuenta con el regulador *per*, responsable de la

regulación en las condiciones de crecimiento estático.

El nivel de transcripción observado en la cepa del perfil 7 coincide con el descrito de una cepa atípica (*perA*-), pues en condiciones estáticas el nivel de expresión baja. El nivel de transcripción observado en la cepa del perfil 2 (tEPEC *bfpA*+, *perA*+) nos muestra un nivel de transcripción mayor al de la cepa prototipo, bajo las condiciones de crecimiento en agitación y estático. Mientras en el SDS-page no se observa ninguna proteína secretada, este resultado que nos indicaría que la secreción de proteínas está afectada a nivel postraduccional, o el sistema de secreción (SSTT) está afectado, pues las proteínas no llegan a secretarse al exterior de la bacteria.

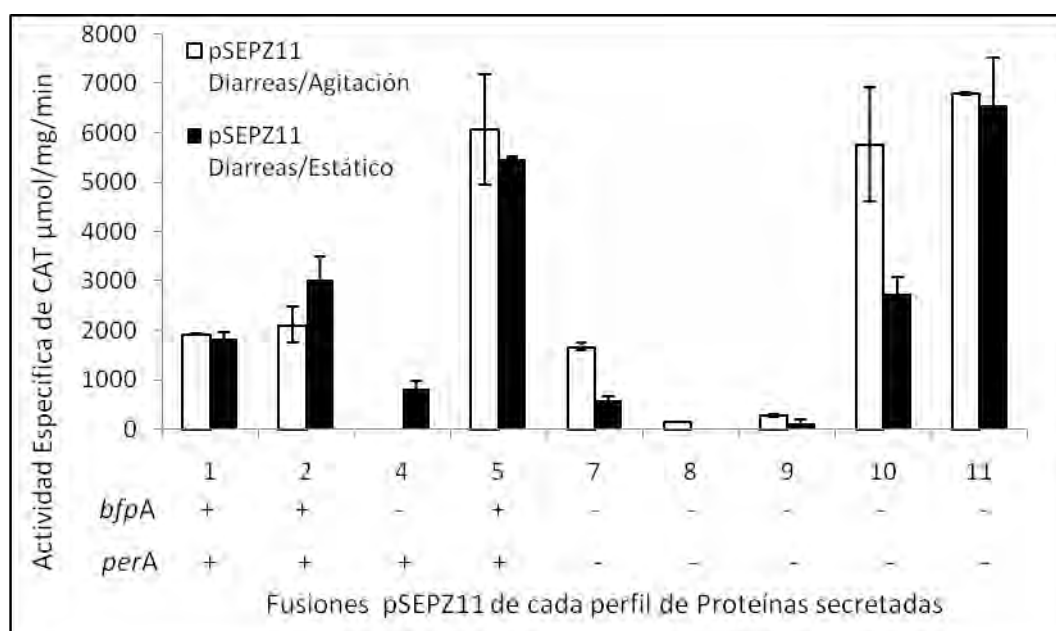


Figura 32. Actividades transcripcionales del operon LEE2 transformado con la fusión pSEPZ11 Km^r. Se observan las actividades de las cepas pertenecientes al grupo de diarrea en dos tipos de cultivo: Agitación y estático.

La fusión pCAT232 Km^r nos sirvió para evaluar la actividad transcripcional regulada por *perA*. En la figura 33 podemos observar que las cepas que pertenecen a los perfiles 1, 2 y 5 muestran actividad tanto en cultivos en agitación como en estáticos y es congruente con la presencia de los genes *bfpA* y *perA* en estas cepas. En el caso de la cepa del perfil 8 (*bfpA*-, *perA*-) que presenta una elevada actividad transcripcional en el cultivo en condiciones estáticas, esto podría deberse a que tiene un regulador positivo no caracterizado o a que esta

cepa tiene nuevo alelo del gen *perA* que no pudo ser reconocido mediante PCR.

El nivel de expresión de la cepa que pertenece al perfil11 es considerado como ruido de fondo, comparado con la cepa prototipo que sirve como referente, cuyo valor es de aproximadamente 2000 $\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{mL}$.

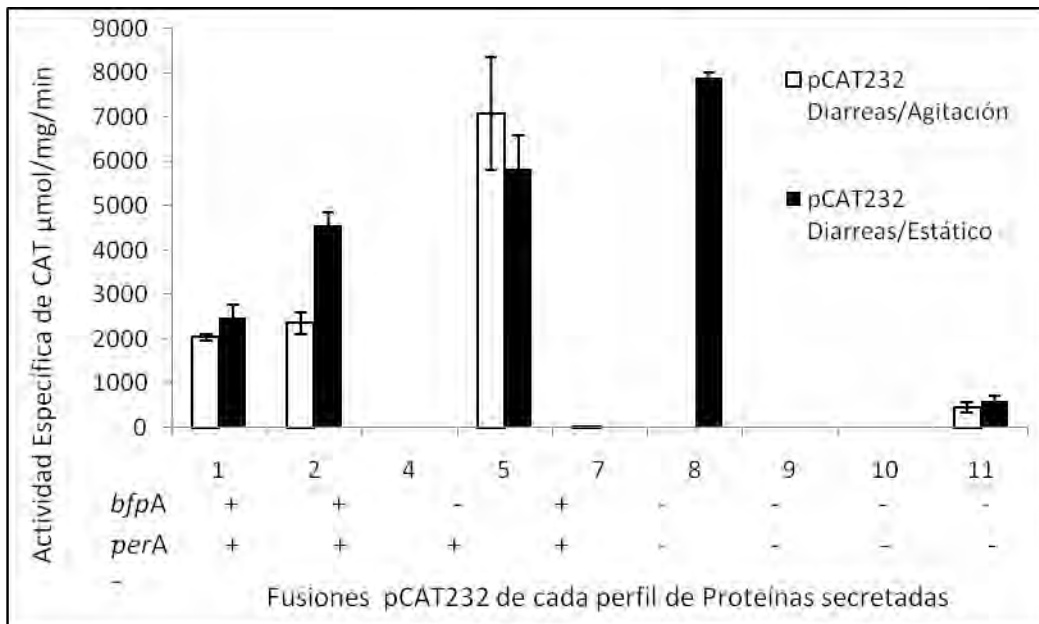


Figura 33. Actividades transcripcionales del operon *bfp* transformado con la fusión pCAT232 Km^r. Se observan las actividades de las cepas pertenecientes al grupo de diarrea en dos tipos de cultivo: agitación y estático.

Estos resultados hay que tomarlos con cuidado, ya que existen diversos factores que pueden estar involucrados en la expresión de los genes y en un futuro son necesarios más ensayos que nos ayuden a dilucidar las rutas de expresión y factores involucrados en estas cepas.

VII.- DISCUSIÓN

En este estudio fueron analizadas 120 cepas de EPEC (típicas y atípicas) aisladas de 1034 niños con y sin diarrea durante un estudio epidemiológico. Del total de cepas, 74/936 (7.9%) EPEC fueron aisladas del grupo diarrea y 46/424 (10.8%) EPEC fueron aisladas del grupo control; éstos porcentajes de aislamiento son similares a los reportados por otros investigadores (Afset y col., 2003) y así mismo muestran una alta prevalencia comparada con otros reportes (Knutton y col., 2001; Vieira y col., 2001). Por otro lado, en un estudio conducido en Vietnam se reportaron 44.9% (111/247) de aislamientos de EPEC en casos de diarrea y 7.2% (80/1108) de aislamientos en controles sanos (Alikhani y col., 2006); en este estudio la identificación se realizó por aglutinación, usando 12 antisueros diferentes; de este total de aislamientos sólo 45/247 (18.2) y 16/1108 (1.4%) cepas fueron positivas a EPEC en los pacientes y controles usando un PCR para el gen *eae*, por lo que las frecuencias reales de aislamiento de EPEC son similares a las obtenidas en nuestro proyecto. Este resultado además indica que la detección del gen *eae* por PCR es la prueba más confiable para el diagnóstico de EPEC, ya que los serotipos son compartidos por los diferentes patotipos de *E. coli* y es difícil asignar un determinado grupo "O" o "H" para el diagnóstico de EPEC.

La presencia del gen *bfpA*, analizado en nuestro estudio, por mucho tiempo se ha relacionado con cuadros de diarrea severos (Levine y col., 1985; Bieber y col., 1998), pues codifica para una fimbria que está involucrada en la adherencia inicial de la bacteria al hospedero y además está relacionada con el fenotipo de adherencia localizada de EPEC. La presencia de este gen divide a las cepas en tEPEC (*bfp+*) y aEPEC (*bfp-*); y mientras en algunos estudios la frecuencia de aislamientos de cepas tEPEC indica que están significativamente asociados a diarrea (Dulguer y col., 2003; Alikhani y col., 2006). En nuestro estudio la prevalencia de las cepas tEPEC (*bfp+*) 26/120 (22%) fue menor comparada con la frecuencia de aislamiento de las cepas aEPEC (*bfp-*) 94/120 (78%) (Tabla 15), siendo este resultado consistente con los obtenidos previamente por otros investigadores (Knutton y col., 2001; Afset y col., 2003).

La asociación de las aEPEC con la diarrea no es clara aún; algunos estudios reportan que estas cepas están significativamente asociadas a diarrea endémica (Scaletsky y col., 1999; Vieira y col., 2001; Dulguer y col., 2003) y brotes epidémicos (Hedberg y col., 1997; Yatsuyanagi y col., 2002; Jenkins y col., 2003) mientras otros reportes indican que no existe asociación con casos de diarrea (Knutton y col., 2001; Afset y col., 2004). Sin embargo, la mayoría de estos estudios indican que existe una alta prevalencia de niños con diarrea causada por aEPEC comparados con las tEPEC. Esto sugiere que las aEPEC expresan otros factores de virulencia que compensan la ausencia del plásmido EAF y hace que estas bacterias sean más virulentas frente al hospedero. Vieira y colaboradores (2001) analizaron la asociación de 15 genes de virulencia (*hyl*, enterohemolisina de EHEC; *aggA*, subunidad de la fimbria de adherencia de EAEC; *astA*, toxina de EAEC; entre otros) con la diarrea, el gen *hyl* fue el más frecuente (44.1%) en su población analizada. Asimismo, Dulguer y colaboradores (2003) analizaron un subconjunto de genes que codifican para factores de virulencia, entre ellos el gen *astA* estuvo significativamente asociado a casos de diarrea, mientras Afset y colaboradores (2006), mediante un estudio de *microarrays* determinaron asociación significativa entre los genes *efa1/lifA*, *set/ent*, *nleB*, *nleE* a casos de diarrea. Basados en nuestros resultados y en los antecedentes conocidos planteamos la importancia de investigar nuevos marcadores moleculares genéticos que sirvan como un indicador de mayor virulencia en EPEC.

El grupo de las cepas tEPEC es más homogéneo en sus factores de virulencia que las cepas atípicas principalmente en los genes codificados en el plásmido EAF, *bfpA* y *perA*. Mientras la presencia del operón *bfp* es necesario para clasificar este subgrupo de EPEC, el operón *per* puede estar ausente o deletado en alguno de sus componentes (Okeke y col., 2001; Vieira y col., 2001; Dulguer y col., 2003). En nuestro estudio dentro del grupo de cepas tEPEC sólo 16/26 (61.5%) de cepas fue positivo al PCR para el gen *perA*, mientras que dentro del grupo de cepas aEPEC 5/96 (5.2%) fueron *perA* positivas. Este alto número de cepas *per* negativas en nuestra población tiene dos posibles explicaciones, una de ellas es que los cebadores usados en la PCR fallaron en el reconocimiento de nuevos alelos presentes en la población. Otra posibilidad es

que el factor de virulencia codificado por este gen no sea importante en la patogénesis y que otros reguladores compensen su ausencia.

La técnica de RFLP usada nos permitió diferenciar los alelos del gen de *eae* y fue fácil de implementar en un laboratorio de investigación, además presentó mayores ventajas frente a las técnicas que se usan otros investigadores para reconocer los alelos de *eae*, entre las técnicas usadas se pueden mencionar los *microarrays*, HMA y RFLP (Ramachandran y col., 2003; Garrido y col., 2006; Ito y col., 2007), técnicas con las que no se pueden diferenciar el total de alelos conocidos, y es necesario usar más de un par de cebadores para poder incluir la totalidad de alelos. Con el RFLP usado en este estudio encontramos una alta variabilidad entre los genes *eae*, *bfpA* y *perA*. Para el gen *eae* encontramos 13 alelos, entre ellos, los más frecuentes fueron los alelos beta [34/120 (28%)], kappa [14/120 (12%)] y theta [24/120, (20%)] (Tabla 18). Por otro lado los alelos menos frecuentes fueron alpha (2/120) y beta2 (2/120), además los alelos alpha2, eta, nu, rho y tau no fueron encontrados y siete cepas tuvieron un patrón indeterminado de intimina.

En estudios relacionados donde evaluó la variabilidad alelica del gen *eae* de EPEC se observan como frecuentes en la población los alelos beta, theta, gamma y mu (Dulguer y col., 2003; Blanco y col., 2006a; Blanco y col., 2006b; Jenkins y col., 2006; Kozub-Witkowski y col., 2008), lo que indica que nuestros resultados están de acuerdo con la situación epidemiológica reportada en otras localidades. En estos estudios no se evaluaron todos los grupos de alelos conocidos hasta este momento, en algunos casos (Vieira y col., 2001; Dulguer y col., 2003) sólo usaron cebadores específicos para los alelos alpha, beta, gamma y delta, por lo que no se conocen los porcentajes de frecuencia del resto de alelos en muestras humanas, pues sólo son reportados como no determinados, lo que no nos permitió comparar con los datos obtenidos en nuestra población.

Al comparar la distribución de los alelos de *eae* entre la población de diarrea y los controles se observó que no existen diferencias significativas entre ambas poblaciones. La comparación de la distribución alélica entre la población de cepas tEPEC y aEPEC, no nos otorgaría un resultado correcto, porque se estaría

comparando una población de mayor número de cepas (aEPEC, n=74), contra una que tiene un número más pequeño (tEPEC, n=26), y el tamaño de la población puede ser una limitante de la poca variabilidad observada.

La distribución y frecuencia de los alelos de los genes *bfpA* y *perA* en las tEPEC fue similar a la reportada en la literatura (Lacher y col., 2007). Entre estos alelos encontramos que *bfpA*-beta1/7 está significativamente relacionado con casos de diarrea (50% vs. 0%, $p < 0.05$) (Tabla 19). Mientras que el alelo *perA*-beta tiende a estar más relacionado a los controles (20% vs. 67%, $p < 0.05$) (Tabla 20). Estos resultados se presentan como nuevos entre los reportes, pues no hay estudios caso-control que comparen la frecuencia alelica de estos genes.

Lacher y colaboradores (2007) encontraron 11 combinaciones de los alelos de los genes *bfpA* y *perA* dentro del plásmido EAF; entre los cuales se observó que cada alelo del gen *bfpA* está relacionado sólo a un alelo de *perA*, por lo que concluye que los genes dentro del plásmido EAF son conservados (Lacher y col., 2007). Nosotros encontramos 12 combinaciones, siete de las cuales son nuevas (Tabla 21). Entre las combinaciones nuevas destaca el alelo alpha1-*bfpA* que está asociado a 2 alelos de *perA* (beta y alpha), éste es un dato no reportado previamente, pues en la literatura se describen que existen relaciones genéticas estables entre los genes de los operones *per* y *bfp* (Lacher y col., 2007). Si bien es cierto el número de tEPEC es muy reducido para hacer conclusiones sobre relaciones de ciertos tipos de alelos con la enfermedad, cabe resaltar que en este estudio se ha encontrado una gran variabilidad en estos genes de virulencia, lo que nos lleva a sugerir que la heterogeneidad en sus secuencias y los patrones de combinación de los mismos podría estar relacionado con la severidad y duración de la diarrea. Se requiere un tamaño muestral más grande para poder obtener datos más representativos que contribuirían a conocer la epidemiología de esta enfermedad en nuestro medio.

Así mismo, la distribución de los tipos de intiminas aisladas a partir de diferentes hospederos sugieren que la especificidad por el tipo de hospedero y/o la diferencia en el tropismo celular de las diferentes EPEC está determinado por el tipo de intimina expresada (Fitzhenry y col., 2002; Fitzhenry y col., 2003),

haciendo que los patrones de colonización varíen (Phillips y Frankel, 2000), esto podría explicar la presencia de algunos tipos de intimina en episodios de diarrea más prolongada y además podría estar relacionado con la severidad de un episodio de diarrea (Tabla 25, Figura 20). Nosotros agrupamos los datos clínicos de los episodios de acuerdo al alelo de intimina, y observamos que el alelo kappa (n=4) está más relacionado con episodios de diarrea más severos (Tabla 25). A pesar de que este alelo se encuentra distribuido de manera homogénea entre los episodios de diarrea de corta y larga duración (Tabla 22), hace falta sumar a esta característica otros síntomas clínicos causados por la enfermedad para evaluar el episodio. Sólo una de estas cepas polimerizó actina y tuvo adherencia localizada (tEPEC *bfpA+/perA-*), mientras las 3 restantes no tuvieron un patrón de adherencia definido y tampoco polimerizaron actina (aEPEC), pero estas cepas causan una diarrea severa, por lo que no podemos desestimar que en estas cepas no solo juegan un rol importante en su virulencia los genes analizados en este estudio, sino, como se mencionó antes hace falta evaluar un mayor número de factores de virulencia, como son las fimbrias, toxinas y otros efectores, así como otros genes codificados dentro del LEE que incrementan la virulencia.

La presencia del operon *bfp* es reportado clásicamente como responsable de incrementar la virulencia de EPEC (Nataro y Kaper, 1998; Okeke, 2001, Lacher *et al.*, 2007), nosotros observamos que entre nuestras 20 cepas de tEPEC pertenecientes al grupo diarrea, las tEPEC (*bfpA+/perA-*) causaban diarreas de corta duración, mientras las cepas tEPEC (*bfpA+/perA+*) tienden a estar más asociadas a episodios de diarrea de larga duración, siendo éstas a su vez más severos (Tabla 24). Vieira y colaboradores (2001) determinaron que cuando dos o más factores de virulencia evaluados en su estudio no se expresaban, la patogenicidad de las cepas de EPEC disminuía, similar comportamiento observamos en nuestras cepas tEPEC (*bfpA+/perA-*) que podrían presentar total o parcialmente deletado el operon *per*.

El fenotipo de adherencia localizada está influenciada por diversas condiciones ambientales como la fuente de carbono, temperatura y fase de crecimiento de la bacteria (Mellies y col., 2007). De esta manera se determinó que en el medio DMEM se reproducían favorablemente las condiciones que

necesita EPEC para reproducir el fenotipo LA. También existe un control a nivel traduccional y transcripcional de la expresión de estos genes. Entre los sistemas involucrados se pueden mencionar al sistema de dos componentes Cpx; si este sistema no está activado, el BFP no se ensambla (Nevesinjac y Raivio, 2005) y por lo tanto no hay adherencia localizada, a pesar de estar presentes los genes del operon *bfp*. Este fenómeno explicaría por que en nuestra población tenemos cepas tEPEC (*bfpA+* y *perA+*) que no presentan el patrón de LA (Tabla 26). El gen *perA* es el único activador de los genes del operon *bfp* entre ellos el *bfpA*, por lo tanto, al estar mutado éste los genes que están involucrados con el fenotipo de LA no se expresan (Bustamante y col., 2001). Esta afirmación es congruente con lo que observamos en los patrones de adherencia, 8/8 cepas de tEPEC evaluadas tienen el gen *perA* y 75% (6/8) de estas cepas presenta el patrón LA, de las dos cepas que no presentan este patrón una de ellas presenta el patrón DA y la otra no presenta adherencia a las células HEp-2. A diferencia de nuestro resultado, Dulger y colaboradores (2003) encontraron que todas las tEPEC presentan un patrón LA. En nuestra población las cepas tEPEC aisladas de los controles sólo presentan un caso de LA, el resto presenta el patrón IS/NA, que es un resultado esperado al tratarse de cepas aisladas de controles sanos.

En las cepas aEPEC también se evaluó el patrón de adherencia a las células HEp-2, siendo el patrón más representativo de esta población el IS/NA. En otros estudios para las aEPEC se ha reportado como prevalente el patrón LAL (Dulguer y col., 2003); también se han descrito algunos patrones nuevos como LC y LCC (Vieira y col., 2001); la frecuencia de estos patrones diferentes y/o derivados del patrón LA en las aEPEC tiene relación con la ausencia del gen *bfpA* en estas cepas. En otro estudio conducido por Vieira y col. (2001), donde se evaluaron las características fenotípicas y genotípicas de aEPEC se encontró un patrón LA al que denomina LA6 luego de un periodo de infección de 6 horas sobre células HeLa y Caco-2. El tiempo de infección óptimo para EPEC es de 3 h, el uso de 6 h en el periodo de infección fue empleado para permitir la detección del fenotipo AE en cepas de EHEC que no presentan adherencia localizada (Knutton y col., 1991), por lo tanto al incrementar durante 3 h el periodo de infección estamos induciendo un tipo de adherencia que no tendría relación con el patrón de LA de las cepas tEPEC, que requieren la expresión del gen *bfpA* y la formación del pilus tipo IV

BFP. En la población analizada por Vieira y col. (2001) se también se encontró dos cepas *bfpA+* (tEPEC) que no presentaron un patrón LA, sino un patrón en el que los agregados se encuentran sueltos, denominado LC (*loose cluster*).

Al igual que para la formación del fenotipo de LA, para el fenotipo AE la bacteria también responde a las condiciones de su ambiente y es regulado principalmente en respuesta a la temperatura y fase de crecimiento de la misma (Mellies y col., 2007). La medición de la expresión del fenotipo AE se realizó mediante la visualización de la polimerización de actina en la célula hospedero, como parte de los cambios ocasionados luego de la infección por EPEC. Entre la población de tEPEC se observó que dos cepas no polimerizaban actina, una de ellas (3264 14 nov 07) presenta un patrón de adherencia IS/NA. La otra cepa (D3080 12 feb 07) a pesar de tener el patrón de LA, no polimeriza actina. Vieira y col. (2001) encontraron resultados similares en su estudio. Dentro del grupo de cepas que no polimerizaban actina en células HeLa, cuatro cepas si lo hicieron en Caco-2 por lo que el grupo postula que una variante en el tipo de intimina hace que ésta sea inactiva para polimerizar actina en las células HeLa, este hallazgo reforzaría la propuesta de que la afinidad por el tipo de hospedero, en este caso el tipo de cultivo celular usado en el ensayo, estaría determinado por intimina (Fitzhenry y col., 2002; Fitzhenry y col., 2003). Dentro de los mecanismos de regulación que influyen en la expresión del fenotipo AE podemos mencionar a la regulación maestra ejercida por Ler, que al estar inactivada, los genes involucrados en la formación del fenotipo AE no se expresan, entre ellos principalmente la intimina. Se observó que en cepas de EPEC donde no se apreciaba polimerización de actina, tampoco se podía observar la expresión de intimina mediante wester blot, o en algunos casos los niveles de expresión eran bajos (Vieira y col., 2001). También cabe resaltar que los factores de virulencia necesitan tener contacto con la mucosa organizada del hospedero para que algunos genes se expresen y muchas veces los sistemas *in vitro* no emulan completamente el sistema de infección *in vivo*.

Consistente con el control de temperatura para la formación del fenotipo AE, la secreción de proteínas via SSTT ocurre a 37°C y pH 7. Nosotros evaluamos los perfiles de secreción de proteínas de EPEC como otro tipo de medición de los

factores de virulencia expresados por EPEC (fenotipo). Entre las EPEC estudiadas, el mayor porcentaje (40%) de cepas no secreta proteínas durante su cultivo y pueden considerarse diversos mecanismos involucrados en el bloqueo de la expresión de estas proteínas (EspA, B, D y C). Deng y col. (2004) observaron que una mutación en el gen *ler* inhibe la secreción de las proteínas EspB y Tir y por lo tanto del resto de proteínas codificadas dentro de los operones donde se encuentran los genes respectivos. Dos de las cepas que no secretaban proteínas (Perfil 2) dentro del grupo diarrea eran tEPEC y polimerizaban actina, lo que nos estaría indicando que los genes del LEE si se están expresando, por lo que en estos casos el bloqueo de la secreción de proteínas debe estar relacionado con una falla en la formación del SSTT.

Similares resultados de inhibición de la secreción fueron observados al estar mutados los genes *SepL* y *SepD* (Deng y col., 2005) que funcionan como un *switch* molecular que controla la secreción de proteínas efectoras y translocadoras. Cuando estos genes mutados se inhibe la secreción de proteínas translocadoras y aumenta la secreción de proteínas efectoras. Otro gen que está involucrado en la regulación de la secreción de proteínas en EPEC es la chaperona CesT (Thomas y col., 2005) inicialmente relacionada con Tir y Map, pero que ahora se conoce que es necesaria para la secreción eficiente de efectores codificados en el LEE (EspA, B, D y Tir) así como codificados fuera del LEE (NleA y EspC). Como podemos observar son muchos los factores involucrados en el buen funcionamiento del SSTT, por lo tanto nos sería difícil establecer cuál de éstos es el responsable de la deficiencia en secreción de cada caso particular. También se debe considerar que los genes de las proteínas de secreción pueden estar mutados o deletados en el genoma bacteriano lo que causa de su ausencia del perfil de secreción. La secreción de EspC es independiente del SSTT, por lo tanto la ausencia de esta proteína en el perfil de proteínas secretadas por las cepas de EPEC no indica que el SSTT esté funcionando mal.

Además se evaluó la secreción de proteínas bajo dos condiciones de crecimiento, en agitación y en estático (sistema saturado de CO₂), en el primer sistema GrlA es el activador de Ler, mientras que en el segundo el activador de

Ler es el PerA, por lo que se espera que las cepas de EPEC que presenten el gen *perA* secreten proteínas bajo ambas condiciones de crecimiento. Bajo esta premisa se evaluó la población de EPEC, observando que en las cepas del grupo 1 (Perfiles 1, 3, 4, 5 y 6) (secreción en ambas condiciones de crecimiento) sólo 8 de 17 cepas (47%) presentaron el gen *perA* (Tabla 28 y 29). Existirían dos posibles explicaciones a este hecho: que en estas cepas estuviera codificado un alelo del gen *perA* que no pudo ser captado por los cebadores usados en el estudio, o que existen otros activadores del Ler involucrados en este sistema. Por otro lado, entre las cepas de EPEC que no secretaron proteínas en condiciones de crecimiento estático no se observa el gen *perA*. Para las cepas del grupo 4 (Perfil 10) en las que sólo se observó secreción en condiciones estáticas, la regulación estaría directamente relacionada al gen *perA*, este grupo está compuesto por 2 cepas tEPEC (*perA+*) y 3 aEPEC (*perA-*), por lo que en este caso también se postulan las mismas posibilidades antes mencionadas para el grupo 1, mientras que la falta de secreción en condiciones de agitación sería explicada por una falta de GrIA en el sistema o una sobreexpresión del regulador GrIR en estas cepas.

Un ensayo complementario a las evaluaciones antes descritas fué la medición de la actividad transcripcional de dos operones involucrados en la patogénesis causada por EPEC, *bfp* y LEE2. Con la medición de la actividad del primer operon se evalúa la regulación de la expresión de genes a partir de PerA y con la medición de la actividad del segundo operon se evalúa la regulación mediada por Ler. Se evaluó un número reducido de cepas, entre las que se incluyó una cepa representante de cada perfil de proteínas secretadas para evaluar las actividades transcripcionales. Se esperaba que las cepas pertenecientes a los perfiles 1, 4 y 5 presentaran actividad transcripcional con la fusión pSEPZ11 en condiciones de crecimiento estático y en agitación, pues estas cepas secretan proteínas en ambas condiciones, pero la cepa del perfil 4 no presentó actividad en condiciones de agitación, y la actividad que mostró en crecimiento estático fue muy baja (831 $\mu\text{mol/mg/min}$) comparada con el nivel promedio de la cepa prototipo E2348/69 (2000 $\mu\text{mol/mg/min}$). Similares resultados se observaron con las cepas de los perfiles 8 y 9 que no mostraron actividad en condiciones de agitación. No se obtuvo éxito en la transformación de estas cepas, por lo que las actividades no reflejaron los resultados encontrados en los perfiles de secreción de proteínas. En

el caso de la cepa del perfil 10 se observó actividad transcripcional en ambos tipos de cultivo, aunque sólo hubo secreción de proteínas en condiciones de crecimiento estático; mientras en condiciones de agitación sólo se observó la secreción de EspC, por lo que se cree que en este caso los genes del LEE no pueden ser activados por Ler por una acción de represores como el HN-S que se une directamente a los operones del LEE (Mellies y col., 2007), pero para poder obtener una conclusión acerca del comportamiento de este grupo es necesario evaluar la presencia del gen *ler* en todas las cepas y observar si el patrón es constante en todas.

Por otro lado, las transformaciones con las fusiones pCAT232 fueron congruentes con la presencia del gen *perA*, aunque en el caso de la cepa del perfil 8 se observó una elevada actividad (7872 $\mu\text{mol/mg/min}$), a pesar que esta cepa no tiene el gen *perA*, y al no estar descritos otros activadores involucrados en la activación de *bfp* (Bustamante y col., 2001), se cree que el gen *perA* no fue detectado en esta cepa. En el caso de la cepa del perfil 4, la transformación no tuvo éxito, al igual que con la fusión pSEPZ11. En base a estos resultados debemos resaltar que existen diversos factores que pueden estar involucrados en la expresión de los genes y en un futuro son necesarios realizar más ensayos que nos ayuden a dilucidar las rutas de expresión y factores involucrados en estas cepas; y así mismo se deben incluir nuevas cepas en cada grupo para evaluar si los resultados son similares en todas y si se observa una tendencia en el comportamiento de los niveles de transcripción.

VIII. CONCLUSIONES

- La frecuencia de aislamientos de cepas EPEC tanto en el grupo control como en el grupo diarrea fue similar.
- La frecuencia de aislamiento de cepas aEPEC fue alta; estos resultados fueron similares tanto en el grupo control como en el grupo diarrea.
- Existe una gran variabilidad de alelos en los genes *eae*, *bfpA* y *perA* evaluados en la población de EPEC estudiada.
- Los alelos de intimina más frecuentes fueron beta, kappa1 y theta tanto en el grupo diarrea como en el grupo control, mientras que para los genes *bfpA* y *perA* los alelos más frecuentes fueron *bfpA*-beta1/7 y *perA*-beta, respectivamente.
- Se encontraron 4 patrones de adherencia, LA, LAL, DA e IS/NA. El patrón de adherencia más frecuente fue IS/NA.
- La polimerización de actina estuvo relacionado significativamente a las cepas tEPEC tanto en casos de diarrea como en controles.
- Se encontraron 11 patrones de perfiles de secreción, entre los cuales el más frecuente fue el perfil2, que se caracterizó por no secretar ninguna proteína durante su crecimiento.
- Las cepas que secretan todas las proteínas evaluadas en el estudio están relacionadas a los casos de diarrea.
- Las proteínas EspB/D son las más frecuentes entre las cepas de EPEC evaluadas.
- La proteína EspA esta significativamente relacionada a los casos de diarrea.

- Los resultados de las actividades transcripcionales del operón LEE2 no se relacionaron con los resultados de los perfiles de proteínas de secreción.
- Las actividades transcripcionales del operón *bfpA* al estar reguladas sólo por el regulador *perA*, son congruentes con los datos de presencia o ausencia de este gen y con el perfil de proteínas secretadas observado.

IX. RECOMENDACIONES

El ADN obtenido por *shock* térmico sólo debe usarse durante 3 meses, pues pasado este tiempo tiende a degradarse y para obtener un producto de PCR de concentración y calidad deseados el ADN molde debe estar íntegro.

Para obtener una conclusión acerca de la distribución de la frecuencia de alelos de genes de virulencia circulantes en la población se debe contar con un tamaño muestral grande. Con los resultados mostrados en este trabajo se puede conocer la frecuencia de aislamiento de EPEC en nuestra población que se puede extrapolar a la población infantil peruana.

En el ensayo de infección de los cultivos celulares HEp-2 con bacterias, se debe procurar trabajar con un número reducido de cepas, ya que es una técnica que implica mucho tiempo de trabajo y un cálculo exacto de población bacteriana agregada a los cultivos celulares para que los resultados sean comparables entre una y otra cepa.

Los estudios de genotipo siempre deben estar ligados a un estudio de fenotipo para poder relacionar los resultados de presencia/ausencia de genes, con su expresión, ya que muchas veces la presencia del gen no siempre indica que ésta sea activo en la bacteria estudiada.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFSET, J.E.; BERGH, K.; BEVANGER, L.** (2003) High prevalence of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in Norwegian children with diarrhoea. *J Med Microbiol* **52**, 1015-1019.
- AFSET, J.E.; BEVANGER, L.; ROMUNDSTAD, P.; BERGH, K.** (2004) Association of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) with prolonged diarrhoea. *J Med Microbiol* **53**, 1137-1144.
- AFSET, J.E.; BRUANT, G.; BROUSSEAU, R.; HAREL, J.; ANDERSSSEN, E.; BEVANGER, L.; BERGH, K.** (2006) Identification of Virulence Genes Linked with Diarrhea Due to Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* by DNA Microarray Analysis and PCR. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 3703-3711.
- ALIKHANI, M.Y.; MIRSALEHIAN, A.; ASLANI, M.M.** (2006) Detection of typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in Iranian children with and without diarrhoea. *J. Med. Microbiol.* **55**, 1159-1163.
- BARBA, J.; BUSTAMANTE, V.H.; FLORES-VALDEZ, M.A.; DENG, W.; FINLAY, B.B.; PUENTE, J.L.** (2005) A Positive Regulatory Loop Controls Expression of the Locus of Enterocyte Effacement-Encoded Regulators *Ler* and *GrlA*. *J. Bacteriol.* **187**, 7918-7930.
- BIEBER, D.; RAMER, S.W.; WU, C.-Y.; MURRAY, W.J.; TOBE, T.; FERNANDEZ, R.; SCHOOLNIK, G.K.** (1998) Type IV Pili, Transient Bacterial Aggregates, and Virulence of Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science* **280**, 2114-2118.
- BLACK, R.E.; MORRIS, S.S.; BRYCE, J.** (2003) Where and why are 10 million children dying every year? *Lancet* **361**, 2226-2234.
- BLANCO, M.; BLANCO, J.E.; DAHBI, G.; ALONSO, M.P.; MORA, A.; COIRA, M.A.; MADRID, C.; JUAREZ, A.; BERNARDEZ, M.I.; GONZALEZ, E.A.; BLANCO, J.** (2006a) Identification of two new intimin types in atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Int Microbiol* **9**, 103-110.
- BLANCO, M.; BLANCO, J.E.; DAHBI, G.; MORA, A.; ALONSO, M.P.; VARELA, G.; GADEA, M.P.; SCHELOTTO, F.; GONZALEZ, E.A.; BLANCO, J.** (2006b) Typing of intimin (*eae*) genes from enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolated from children with diarrhoea in Montevideo, Uruguay: identification of two novel intimin variants (β and β 2B). *J Med Microbiol* **55**, 1165-1174.
- BRYCE, J.; BOSCHI-PINTO, C.; SHIBUYA, K.; BLACK, R.E.** (2005) WHO estimates of the causes of death in children. *Lancet* **365**, 1147-1152.
- BUSTAMANTE, V.H.; CALVA, E.; PUENTE, J.L.** (1998) Analysis of cis-Acting Elements Required for *bfpA* Expression in Enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **180**, 3013-3016.
- BUSTAMANTE, V.H.; SANTANA, F.J.; CALVA, E.; PUENTE, J.L.** (2001) Transcriptional regulation of type III secretion genes in enteropathogenic *Escherichia coli*: *Ler* antagonizes H-NS-dependent repression. *Mol Microbiol* **39**, 664-678.

- CLARKE, S.C.; HAIGH, R.D.; FREESTONE, P.P.; WILLIAMS, P.H.** (2002) Enteropathogenic *Escherichia coli* infection: history and clinical aspects. *Br J Biomed Sci* **59**, 123-127.
- CLARKE, S.C.; HAIGH, R.D.; FREESTONE, P.P.E.; WILLIAMS, P.H.** (2003) Virulence of Enteropathogenic *Escherichia coli*, a Global Pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* **16**, 365-378.
- CLEARY, J.; LAI, L.-C.; SHAW, R.K.; STRAATMAN-IWANOWSKA, A.; DONNENBERG, M.S.; FRANKEL, G.; KNUTTON, S.** (2004) Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adhesion to intestinal epithelial cells: role of bundle-forming pili (BFP), EspA filaments and intimin. *Microbiology* **150**, 527-538.
- DENG, W.; LI, Y.; HARDWIDGE, P.R.; FREY, E.A.; PFUETZNER, R.A.; LEE, S.; GRUENHEID, S.; STRYNAKDA, N.C.J.; PUENTE, J.L.; FINLAY, B.B.** (2005) Regulation of Type III Secretion Hierarchy of Translocators and Effectors in Attaching and Effacing Bacterial Pathogens. *Infect. Immun.* **73**, 2135-2146.
- DENG, W.; LI, Y.; VALLANCE, B.A.; FINLAY, B.B.** (2001) Locus of Enterocyte Effacement from *Citrobacter rodentium*: Sequence Analysis and Evidence for Horizontal Transfer among Attaching and Effacing Pathogens. *Infect. Immun.* **69**, 6323-6335.
- DENG, W.; PUENTE, J.L.; GRUENHEID, S.; LI, Y.; VALLANCE, B.A.; VÁZQUEZ, A.; BARBA, J.; IBARRA, J.A.; O'DONNELL, P.; METALNIKOV, P.; ASHMAN, K.; LEE, S.; GOODE, D.; PAWSON, T.; FINLAY, B.B.** (2004) Dissecting virulence: Systematic and functional analyses of a pathogenicity island. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 3597-3602.
- DULGUER, M.V.; FABBRICOTTI, S.H.; BANDO, S.Y.; MOREIRA-FILHO, C.A.; FAGUNDES-NETO, U.; SCALETSKY, I.C.** (2003) Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains: phenotypic and genetic profiling reveals a strong association between enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin and diarrhea. *J Infect Dis* **188**, 1685-1694.
- EDWARDS, R.A.; PUENTE, J.L.** (1998) Fimbrial expression in enteric bacteria: a critical step in intestinal pathogenesis. *Trends Microbiol* **6**, 282-287.
- ELLIOTT, S.J.; SPERANDIO, V.; GIRON, J.A.; SHIN, S.; MELLIES, J.L.; WAINWRIGHT, L.; HUTCHESON, S.W.; MCDANIEL, T.K.; KAPER, J.B.** (2000) The Locus of Enterocyte Effacement (LEE)-Encoded Regulator Controls Expression of Both LEE- and Non-LEE-Encoded Virulence Factors in Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **68**, 6115-6126.
- FITZHENRY, R.J.; REECE, S.; TRABULSI, L.R.; HEUSCHKEL, R.; MURCH, S.; THOMSON, M.; FRANKEL, G.; PHILLIPS, A.D.** (2002) Tissue Tropism of Enteropathogenic *Escherichia coli* Strains Belonging to the O55 Serogroup. *Infect. Immun.* **70**, 4362-4368.
- FITZHENRY, R.J.; STEVENS, M.P.; JENKINS, C.; WALLIS, T.S.; HEUSCHKEL, R.; MURCH, S.; THOMSON, M.; FRANKEL, G.; PHILLIPS, A.D.** (2003) Human intestinal tissue tropism of intimin epsilon O103 *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* **218**, 311-316.

- FRANKEL, G.; PHILLIPS, A.D.; ROSENSHINE, I.; DOUGAN, G.; KAPER, J.B.; KNUTTON, S.** (1998) Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. *Mol Microbiol* **30**, 911-921.
- FRIEDBERG, D.; UMANSKI, T.; FANG, Y.; ROSENSHINE, I.** (1999) Hierarchy in the expression of the locus of enterocyte effacement genes of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **34**, 941-952.
- GARRIDO, P.; BLANCO, M.; MORENO-PAZ, M.; BRIONES, C.; DAHBI, G.; BLANCO, J.; BLANCO, J.; PARRO, V.** (2006) STEC-EPEC Oligonucleotide Microarray: A New Tool for Typing Genetic Variants of the LEE Pathogenicity Island of Human and Animal Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC) and Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) Strains. *Clin Chem* **52**, 192-201.
- GIRON, J.A.; HO, A.S.; SCHOOLNIK, G.K.** (1991) An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science* **254**, 710-713.
- GOLDBERG, M.D.; JOHNSON, M.; HINTON, J.C.; WILLIAMS, P.H.** (2001) Role of the nucleoid-associated protein Fis in the regulation of virulence properties of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **41**, 549-559.
- GOMEZ-DUARTE, O.G.; KAPER, J.B.** (1995) A plasmid-encoded regulatory region activates chromosomal *eaeA* expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **63**, 1767-1776.
- GRANT, A.J.; FARRIS, M.; ALEFOUNDER, P.; WILLIAMS, P.H.; WOODWARD, M.J.; O'CONNOR, C.D.** (2003) Co-ordination of pathogenicity island expression by the BipA GTPase in enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). *Mol Microbiol* **48**, 507-521.
- GRUENHEID, S.; SEKIROV, I.; THOMAS, N.A.; DENG, W.; O'DONNELL, P.; GOODE, D.; LI, Y.; FREY, E.A.; BROWN, N.F.; METALNIKOV, P.; PAWSON, T.; ASHMAN, K.; FINLAY, B.B.** (2004) Identification and characterization of NleA, a non-LEE-encoded type III translocated virulence factor of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Mol Microbiol* **51**, 1233-1249.
- GUION, C.E.; OCHOA, T.J.; WALKER, C.M.; BARLETTA, F.; CLEARY, T.G.** (2008) Detection of Diarrheagenic *Escherichia coli* by Use of Melting-Curve Analysis and Real-Time Multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* **46**, 1752-1757.
- HEDBERG, C.W.; SAVARINO, S.J.; BESSER, J.M.; PAULUS, C.J.; THELEN, V.M.; MYERS, L.J.; CAMERON, D.N.; BARRETT, T.J.; KAPER, J.B.; OSTERHOLM, M.T.** (1997) An outbreak of foodborne illness caused by *Escherichia coli* O39:NM, an agent not fitting into the existing scheme for classifying diarrheagenic *E. coli*. *J Infect Dis* **176**, 1625-1628.
- HUICHO, L.; TRELLES, M.; GONZALES, F.** (2006) National and sub-national under-five mortality profiles in Peru: a basis for informed policy decisions. *BMC Public Health* **6**, 173.
- IBARRA, J.A.; VILLALBA, M.I.; PUENTE, J.L.** (2003) Identification of the DNA Binding Sites of PerA, the Transcriptional Activator of the *bfp* and *per* Operons in Enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **185**, 2835-2847.

ITO, K.; IIDA, M.; YAMAZAKI, M.; MORIYA, K.; MOROISHI, S.; YATSUYANAGI, J.; KURAZONO, T.; HIRUTA, N.; RATCHTRACHENCHAI, O.-A. (2007) Intimin Types Determined by Heteroduplex Mobility Assay of Intimin Gene (eae)-Positive Escherichia coli Strains. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 1038-1041.

IYODA, S.; WATANABE, H. (2004) Positive effects of multiple pch genes on expression of the locus of enterocyte effacement genes and adherence of enterohaemorrhagic Escherichia coli O157 : H7 to HEp-2 cells. *Microbiology* **150**, 2357-2571.

JARVIS, K.G.; GIRÃ³N, J.A.; JERSE, A.E.; MCDANIEL, T.K.; DONNENBERG, M.S.; KAPER, J.B. (1995) Enteropathogenic Escherichia coli contains a putative type III secretion system necessary for the export of proteins involved in attaching and effacing lesion formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 7996-8000.

JENKINS, C.; LAWSON, A.J.; CHEASTY, T.; WILLSHAW, G.A.; WRIGHT, P.; DOUGAN, G.; FRANKEL, G.; SMITH, H.R. (2003) Subtyping intimin genes from enteropathogenic Escherichia coli associated with outbreaks and sporadic cases in the United Kingdom and Eire. *Mol Cell Probes* **17**, 149-156.

JENKINS, C.; SMITH, H.R.; LAWSON, A.J.; WILLSHAW, G.A.; CHEASTY, T.; WHEELER, J.G.; TOMPKINS, D.S. (2006) Serotypes, intimin subtypes, and antimicrobial resistance patterns of atypical enteropathogenic Escherichia coli isolated in England from 1993 to 1996. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **25**, 19-24.

JERSE, A.E.; YU, J.; TALL, B.D.; KAPER, J.B. (1990) A genetic locus of enteropathogenic Escherichia coli necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**, 7839-7843.

KENNY, B.; ABE, A.; STEIN, M.; FINLAY, B.B. (1997a) Enteropathogenic Escherichia coli protein secretion is induced in response to conditions similar to those in the gastrointestinal tract. *Infect. Immun.* **65**, 2606-2612.

KENNY, B.; DEVINNEY, R.; STEIN, M.; REINSCHEID, D.J.; FREY, E.A.; FINLAY, B.B. (1997b) Enteropathogenic E. coli (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell* **91**, 511-520.

KENNY, B.; FINLAY, B.B. (1995) Protein secretion by enteropathogenic Escherichia coli is essential for transducing signals to epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 7991-7995.

KENNY, B.; LAI, L.C.; FINLAY, B.B.; DONNENBERG, M.S. (1996) EspA, a protein secreted by enteropathogenic Escherichia coli, is required to induce signals in epithelial cells. *Mol Microbiol* **20**, 313-323.

KNUTTON, S.; PHILLIPS, A.D.; SMITH, H.R.; GROSS, R.J.; SHAW, R.; WATSON, P.; PRICE, E. (1991) Screening for enteropathogenic Escherichia coli in infants with diarrhea by the fluorescent-actin staining test. *Infect. Immun.* **59**, 365-371.

KNUTTON, S.; SHAW, R.; PHILLIPS, A.D.; SMITH, H.R.; WILLSHAW, G.A.; WATSON, P.; PRICE, E. (2001) Phenotypic and genetic analysis of diarrhea-associated

Escherichia coli isolated from children in the United Kingdom. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **33**, 32-40.

KOZUB-WITKOWSKI, E.; KRAUSE, G.; FRANKEL, G.; KRAMER, D.; APPEL, B.; BEUTIN, L. (2008) Serotypes and virutypes of enteropathogenic and enterohaemorrhagic Escherichia coli strains from stool samples of children with diarrhoea in Germany. *J Appl Microbiol* **104**, 403-410.

LACHER, D.W.; STEINSLAND, H.; BLANK, T.E.; DONNENBERG, M.S.; WHITTAM, T.S. (2007) Molecular Evolution of Typical Enteropathogenic Escherichia coli: Clonal Analysis by Multilocus Sequence Typing and Virulence Gene Allelic Profiling. *J. Bacteriol.* **189**, 342-350.

LACHER, D.W.; STEINSLAND, H.; WHITTAM, T.S. (2006) Allelic subtyping of the intimin locus (eae) of pathogenic Escherichia coli by fluorescent RFLP. *FEMS Microbiol Lett* **261**, 80-87.

LAI, L.C.; WAINWRIGHT, L.A.; STONE, K.D.; DONNENBERG, M.S. (1997) A third secreted protein that is encoded by the enteropathogenic Escherichia coli pathogenicity island is required for transduction of signals and for attaching and effacing activities in host cells. *Infect. Immun.* **65**, 2211-2217.

LEVINE, M.M.; NATARO, J.P.; KARCH, H.; BALDINI, M.M.; KAPER, J.B.; BLACK, R.E.; CLEMENTS, M.L.; O'BRIEN, A.D. (1985) The diarrheal response of humans to some classic serotypes of enteropathogenic Escherichia coli is dependent on a plasmid encoding an enteroadhesiveness factor. *J Infect Dis* **152**, 550-559.

MARTINEZ-LAGUNA, Y.; CALVA, E.; PUENTE, J.L. (1999) Autoactivation and environmental regulation of bfpT expression, the gene coding for the transcriptional activator of bfpA in enteropathogenic Escherichia coli. *Mol Microbiol* **33**, 153-166.

MATHEWSON, J.J.; CRAVIOTO, A. (1989) HEp-2 cell adherence as an assay for virulence among diarrheagenic Escherichia coli. *J Infect Dis* **159**, 1057-1060.

MCDANIEL, T.K.; KAPER, J.B. (1997) A cloned pathogenicity island from enteropathogenic Escherichia coli confers the attaching and effacing phenotype on E. coli K-12. *Mol Microbiol* **23**, 399-407.

MCNAMARA, B.P.; DONNENBERG, M.S. (1998) A novel proline-rich protein, EspF, is secreted from enteropathogenic Escherichia coli via the type III export pathway. *FEMS Microbiol Lett* **166**, 71-78.

MELLIES, J.L.; BARRON, A.M.S.; CARMONA, A.M. (2007) Enteropathogenic and Enterohemorrhagic Escherichia coli Virulence Gene Regulation. *Infect. Immun.* **75**, 4199-4210.

MELLIES, J.L.; NAVARRO-GARCIA, F.; OKEKE, I.; FREDERICKSON, J.; NATARO, J.P.; KAPER, J.B. (2001) espC Pathogenicity Island of Enteropathogenic Escherichia coli Encodes an Enterotoxin. *Infect. Immun.* **69**, 315-324.

MUNDY, R.; JENKINS, C.; YU, J.; SMITH, H.; FRANKEL, G. (2004a) Distribution of espI among clinical enterohaemorrhagic and enteropathogenic Escherichia coli isolates. *J Med Microbiol* **53**, 1145-1149.

MUNDY, R.; PETROVSKA, L.; SMOLLETT, K.; SIMPSON, N.; WILSON, R.K.; YU, J.; TU, X.; ROSENSHINE, I.; CLARE, S.; DOUGAN, G.; FRANKEL, G. (2004b) Identification of a Novel Citrobacter rodentium Type III Secreted Protein, EspI, and Roles of This and Other Secreted Proteins in Infection. *Infect. Immun.* **72**, 2288-2302.

NAKANISHI, N.; ABE, H.; OGURA, Y.; HAYASHI, T.; TASHIRO, K.; KUHARA, S.; SUGIMOTO, N.; TOBE, T. (2006) ppGpp with DksA controls gene expression in the locus of enterocyte effacement (LEE) pathogenicity island of enterohaemorrhagic Escherichia coli through activation of two virulence regulatory genes. *Mol Microbiol* **61**, 194-205.

NATARO, J.P.; KAPER, J.B. (1998) Diarrheagenic Escherichia coli. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**, 142-201.

NATARO, J.P.; KAPER, J.B.; ROBINS-BROWNE, R.; PRADO, V.; VIAL, P.; LEVINE, M.M. (1987) Patterns of adherence of diarrheagenic Escherichia coli to HEp-2 cells. *Pediatr Infect Dis J* **6**, 829-831.

NEVESINJAC, A.Z.; RAIVIO, T.L. (2005) The Cpx Envelope Stress Response Affects Expression of the Type IV Bundle-Forming Pili of Enteropathogenic Escherichia coli. *J. Bacteriol.* **187**, 672-686.

O'CONNELL, C.B.; CREASEY, E.A.; KNUTTON, S.; ELLIOTT, S.; CROWTHER, L.J.; LUO, W.; ALBERT, M.J.; KAPER, J.B.; FRANKEL, G.; DONNENBERG, M.S. (2004) SepL, a protein required for enteropathogenic Escherichia coli type III translocation, interacts with secretion component SepD. *Mol Microbiol* **52**, 1613-1625.

OCHOA, T.J. (2006) Diarrea producida por Escherichia coli. *Revista Peruana de Enfermedades Infecciosas y Tropicales* **5**, 17-21.

OCHOA, T.J.; BARLETTA, F.; CONTRERAS, C.; MERCADO, E. (2008) New insights into the epidemiology of enteropathogenic Escherichia coli infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **102**, 852-856.

OCHOA, T.J.; ECKER, L.; BARLETTA, F.; MISPIRETA, M.; GIL, A.; CONTRERAS, C.; MOLINA, M.; AMEMIYA, I.; VERASTEGUI, H.; HALL, E.R.; CLEARY, T.G.; LANATA, C.F. (2009) Age-related susceptibility to infection with diarrheagenic E. coli in infants from peri-urban areas of Lima, Peru. *Clinical Infection Disease* **in press**.

OCHOA, T.J.; NOGUERA-OBENZA, M.; EBEL, F.; GUZMAN, C.A.; GOMEZ, H.F.; CLEARY, T.G. (2003) Lactoferrin Impairs Type III Secretory System Function in Enteropathogenic Escherichia coli. *Infect. Immun.* **71**, 5149-5155.

OGINO, T.; OHNO, R.; SEKIYA, K.; KUWAE, A.; MATSUZAWA, T.; NONAKA, T.; FUKUDA, H.; IMAJOH-OHMI, S.; ABE, A. (2006) Assembly of the Type III Secretion Apparatus of Enteropathogenic Escherichia coli. *J. Bacteriol.* **188**, 2801-2811.

- OKEKE, I.N.; BORNEMAN, J.A.; SHIN, S.; MELLIES, J.L.; QUINN, L.E.; KAPER, J.B.** (2001) Comparative Sequence Analysis of the Plasmid-Encoded Regulator of Enteropathogenic Escherichia coli Strains. *Infect. Immun.* **69**, 5553-5564.
- OSWALD, E.; SCHMIDT, H.; MORABITO, S.; KARCH, H.; MARCHES, O.; CAPRIOLI, A.** (2000) Typing of Intimin Genes in Human and Animal Enterohemorrhagic and Enteropathogenic Escherichia coli: Characterization of a New Intimin Variant. *Infect. Immun.* **68**, 64-71.
- PELAYO, J.S.; SCALETSKY, I.C.A.; PEDROSO, M.Z.; SPERANDIO, V.; GIRON, J.A.; FRANKEL, G.; TRABULSI, L.R.** (1999) Virulence properties of atypical EPEC strains. *J. Med. Microbiol.* **48**, 41-49.
- PHILLIPS, A.D.; FRANKEL, G.** (2000) Intimin-mediated tissue specificity in enteropathogenic Escherichia coli interaction with human intestinal organ cultures. *J Infect Dis* **181**, 1496-1500.
- PORTER, M.E.; MITCHELL, P.; ROE, A.J.; FREE, A.; SMITH, D.G.; GALLY, D.L.** (2004) Direct and indirect transcriptional activation of virulence genes by an AraC-like protein, PerA from enteropathogenic Escherichia coli. *Mol Microbiol* **54**, 1117-1133.
- PUENTE, J.L.; BIEBER, D.; RAMER, S.W.; MURRAY, W.; SCHOOLNIK, G.K.** (1996) The bundle-forming pili of enteropathogenic Escherichia coli: transcriptional regulation by environmental signals. *Mol Microbiol* **20**, 87-100.
- RAMACHANDRAN, V.; BRETT, K.; HORNITZKY, M.A.; DOWTON, M.; BETTELHEIM, K.A.; WALKER, M.J.; DJORDJEVIC, S.P.** (2003) Distribution of Intimin Subtypes among Escherichia coli Isolates from Ruminant and Human Sources. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 5022-5032.
- RUUSKA, T.; VESIKARI, T.** (1990) Rotavirus disease in Finnish children: use of numerical scores for clinical severity of diarrhoeal episodes. *Scand J Infect Dis* **22**, 259-267.
- SCALETISKY, I.C.A.; PEDROSO, M.Z.; OLIVA, C.A.G.; CARVALHO, R.L.B.; MORAIS, M.B.; FAGUNDES-NETO, U.** (1999) A Localized Adherence-Like Pattern as a Second Pattern of Adherence of Classic Enteropathogenic Escherichia coli to HEp-2 Cells That Is Associated with Infantile Diarrhea. *Infect. Immun.* **67**, 3410-3415.
- SHARMA, V.K.; CARLSON, S.A.; CASEY, T.A.** (2005) Hyperadherence of an hha mutant of Escherichia coli O157:H7 is correlated with enhanced expression of LEE-encoded adherence genes. *FEMS Microbiol Lett* **243**, 189-196.
- SOHEL, I.; PUENTE, J.L.; RAMER, S.W.; BIEBER, D.; WU, C.Y.; SCHOOLNIK, G.K.** (1996) Enteropathogenic Escherichia coli: identification of a gene cluster coding for bundle-forming pilus morphogenesis. *J. Bacteriol.* **178**, 2613-2628.
- SPERANDIO, V.; LI, C.C.; KAPER, J.B.** (2002) Quorum-Sensing Escherichia coli Regulator A: a Regulator of the LysR Family Involved in the Regulation of the Locus of Enterocyte Effacement Pathogenicity Island in Enterohemorrhagic E. coli. *Infect. Immun.* **70**, 3085-3093.

- TARR, C.L.; WHITTAM, T.S.** (2002) Molecular Evolution of the Intimin Gene in O111 Clones of Pathogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **184**, 479-487.
- TAYLOR, K.A.; O'CONNELL, C.B.; LUTHER, P.W.; DONNENBERG, M.S.** (1998) The EspB Protein of Enteropathogenic *Escherichia coli* Is Targeted to the Cytoplasm of Infected HeLa Cells. *Infect. Immun.* **66**, 5501-5507.
- THOMAS, N.A.; DENG, W.; PUENTE, J.L.; FREY, E.A.; YIP, C.K.; STRYNADKA, N.C.; FINLAY, B.B.** (2005) CesT is a multi-effector chaperone and recruitment factor required for the efficient type III secretion of both LEE- and non-LEE-encoded effectors of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **57**, 1762-1779.
- TOBE, T.; SCHOOLNIK, G.K.; SOHEL, I.; BUSTAMANTE, V.H.; PUENTE, J.L.** (1996) Cloning and characterization of bfpTVW, genes required for the transcriptional activation of bfpA in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **21**, 963-975.
- TRABULSI, L.R.; KELLER, R.; TARDELLI GOMES, T.A.** (2002) Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis* **8**, 508-513.
- UMANSKI, T.; ROSENSHINE, I.; FRIEDBERG, D.** (2002) Thermoregulated expression of virulence genes in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology* **148**, 2735-2744.
- VIEIRA, M.A.; ANDRADE, J.R.; TRABULSI, L.R.; ROSA, A.C.; DIAS, A.M.; RAMOS, S.R.; FRANKEL, G.; GOMES, T.A.** (2001) Phenotypic and genotypic characteristics of *Escherichia coli* strains of non-enteropathogenic *E. coli* (EPEC) serogroups that carry EAE and lack the EPEC adherence factor and Shiga toxin DNA probe sequences. *J Infect Dis* **183**, 762-772.
- WALTERS, M.; SIRCILI, M.P.; SPERANDIO, V.** (2006) AI-3 Synthesis Is Not Dependent on luxS in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **188**, 5668-5681.
- YATSUYANAGI, J.; SAITO, S.; SATO, H.; MIYAJIMA, Y.; AMANO, K.-I.; ENOMOTO, K.** (2002) Characterization of Enteropathogenic and Enteroaggregative *Escherichia coli* Isolated from Diarrheal Outbreaks. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 294-297.

XI.- ANEXOS

Anexo 1. Número de acceso de las secuencias de ADN de los alelos de *eae* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez/>).

Gen	Nº acceso	Gen	Nº acceso
<i>eae-α</i>	M58154 AJ879902	<i>eae-η2</i>	AJ876652
<i>eae-α2</i>	AF530555	<i>eae-θ</i>	AF449418 AJ876652
<i>eae-β</i>	AF200363	<i>eae-ι</i>	AJ308551
<i>eae-β2</i>	AJ715407 AF530556	<i>eae-ι2</i>	AF530553 AJ308551
<i>eae-β3</i>	AJ876651	<i>eae-κ</i>	AJ308552
<i>eae-γ</i>	AF071034	<i>eae-λ</i>	AF530557 AJ715409
<i>eae-γ2</i>	AF025311 AF449418	<i>eae-μ</i>	AJ705049
<i>eae-δ</i>	AJ875027	<i>eae-ν</i>	AJ705050
<i>eae-ε</i>	AF116899	<i>eae-ξ</i>	AJ705051
<i>eae-ε2</i>	AF530554	<i>eae-ο</i>	AJ584841, parcial
<i>eae-ε3</i>	AJ876650	<i>eae-π</i>	AJ705052
<i>eae-ε4</i>	AJ876651	<i>eae-ρ</i>	AJ748082
<i>eae-ζ</i>	AF449417 AJ271407	<i>eae-σ</i>	AJ781125
<i>eae-η</i>	AJ308550		

Anexo 2. Patrones de restricción del producto de PCR *eaε-escD* bajo un RFLP convencional con las enzimas *AluI* y *BstNI*

alelo Intimina	Amplicon (bp)	Patrones de digestión con <i>AluI</i>	Patrones de digestión con <i>BstNI</i>
alpha	1952	4, 149, 155, 226, 476, 942	5, 48, 138, 171, 217, 289, 346, 738
alpha 2	1952	7, 16, 139, 149, 250, 334, 476, 581	5, 48, 138, 171, 217, 346, 1027
beta	1950	39, 100, 492, 581, 738	138, 217, 294, 394, 907
beta 2	1940	16, 79, 139, 141, 161, 247, 261, 420, 476	5, 48, 138, 217, 289, 346, 897
epsilon 1.1	2036	139, 190, 270, 355, 492, 590	138, 217, 394, 1287
epsilon1.2	2142	139, 190, 228, 233, 270, 492, 590	138, 217, 394, 1393
epsilon 1.3	2142	139, 233, 270, 418, 492, 590	138, 217, 394, 1393
epsilon 2	2137	16, 456, 476, 1189	8, 48, 138, 189, 217, 346, 1191
eta	2140	16, 100, 177, 190, 227, 232, 270, 452, 476	56, 64, 87, 102, 138, 307, 1386
gamma 1.1	1984	16, 134, 139, 476, 1219	138, 217, 365, 394, 870
gamma 1.2	1984	16, 134, 139, 476, 1219	138, 217, 394, 1235
iota 1.1	1824	16, 139, 447, 476, 746	48, 138, 217, 346, 1075
iota 1.2	1824	16, 139, 447, 476, 746	48, 138, 217, 346, 1075
iota 2	1831	16, 21, 57, 100, 186, 476, 975	87, 102, 138, 307, 1197
kappa 1.1	1939	16, 138, 139, 162, 282, 342, 384, 476	48, 138, 222, 346, 1185
kappa 1.2	2716	16, 17, 114, 138, 139, 162, 167, 282, 342, 367, 476, 496	48, 138, 214, 222, 346, 1748
lambda	2665	7, 16, 22, 34, 45, 89, 112, 112, 139, 151, 219, 225, 232, 366, 420, 476	138, 217, 394, 1916
mu	2006	16, 47, 121, 139, 474, 476, 733	5, 48, 138, 217, 346, 1252
nu	1944	16, 97, 229, 277, 353, 476, 496	56, 64, 87, 102, 138, 307, 1190
omicron	2020	16, 26, 36, 43, 54, 87, 127, 240, 263, 277, 375, 476	17, 64, 87, 138, 158, 307, 466, 783
rho	2013	16, 18, 139, 162, 191, 199, 222, 476, 590	138, 217, 394, 1264
theta	2011	14, 16, 21, 81, 138, 146, 163, 165, 395, 872	48, 138, 217, 346, 1262
tau	1942	16, 25, 127, 221, 277, 357, 443, 476	64, 138, 158, 289, 394, 899
xi	2141	139, 227, 233, 492, 1050	138, 193, 217, 394, 1199
zeta 1.1	1946	16, 38, 125, 341, 476, 950	48, 138, 346, 411, 1003
zeta 1.2	1946	16, 38, 125, 341, 476, 950	48, 138, 346, 411, 1003

Anexo 3 A. Patrones de restricción del producto de PCR de *bfpA* obtenidos mediante un RFLP convencional.

Alelo <i>bfpA</i>	Patrones de digestión (pb) ^a		
	<i>AluI</i>	<i>BfaI</i>	<i>BstNI</i>
alpha1	408	408	155, 253
alpha2	408	75, 333	155, 253
alpha3	408	75, 333	408
beta1/7	<u>16</u> , <u>54</u> , 113, 231 (225 ^b)	<u>39</u> , 375	414
beta2	<u>16</u> , 170, 228	414	414
beta3	<u>16</u> , <u>54</u> , 344	<u>39</u> , 375	414
beta4	<u>16</u> , 177, 215	<u>39</u> , 369	408
beta5	<u>16</u> , <u>54</u> , 113, 225	<u>39</u> , 369	408
beta6	<u>16</u> , 392	<u>39</u> , 369	408

^a, pares de bases

^b, tamaño de banda del alelo beta7

_, las bandas que están marcadas con guión bajo no son detectadas por una electroforesis convencional.

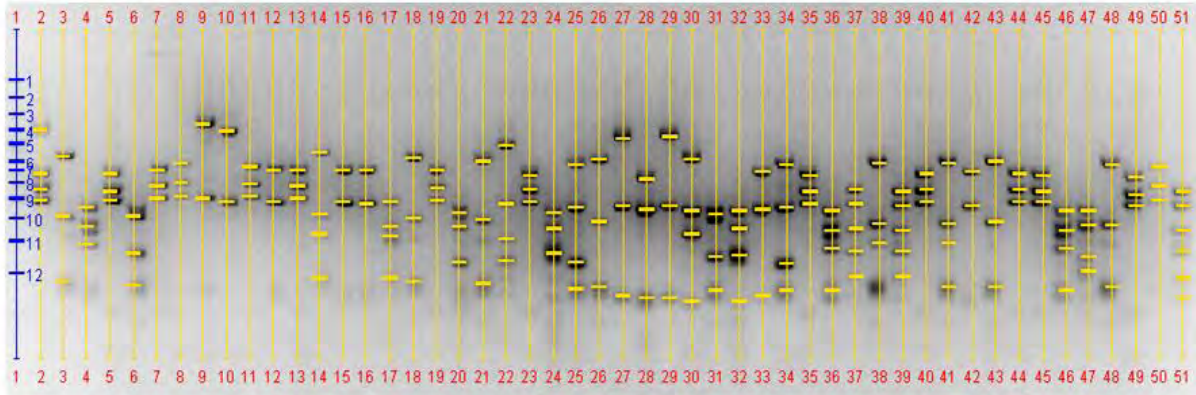
Anexo 3 B. Patrones de restricción del producto de PCR de *perA* obtenidos mediante un RFLP convencional.

Alelos de <i>perA</i>	Patrones de digestión (pb) ^a	
	<i>DdeI</i>	<i>Sau96I</i>
alpha	<u>13</u> , 74, 82, 417	586
beta	<u>13</u> , 74, 499	586
gamma	82, 87, 417	174, 186, 226
delta	87, 499	226, 360

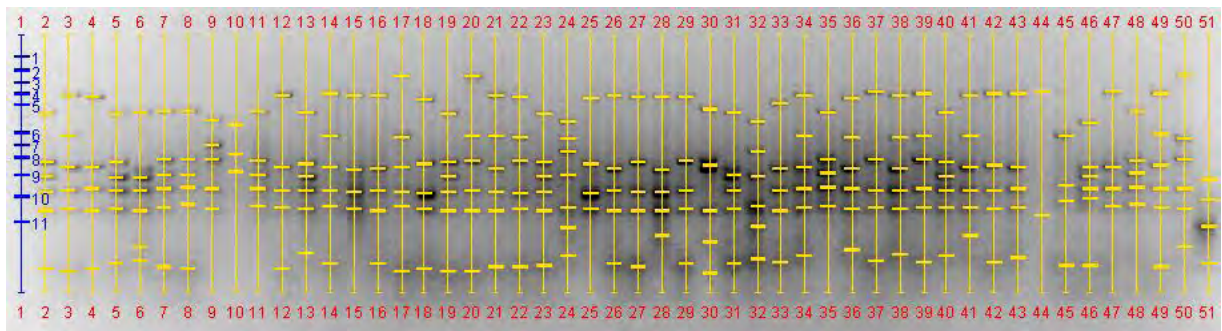
^a, pares de bases

_, las bandas que están marcadas con guión bajo no son detectadas por una electroforesis convencional.

Anexo 4. RFLP del gen *eae* con *AluI*. Las muestras pertenecen a los casos de diarrea obtenidos en el estudio de cohorte.



Anexo 5. RFLP del gen *eae* con *BstNI*. Las muestras pertenecen a los casos de diarrea obtenidos en el estudio de cohorte.



Anexo 6. Lista de cepas prototipo de EPEC, usadas como control positivo en los ensayos de RFLP.

N	Código	Alelo <i>eae</i>	Alelo <i>bfpA</i>	Alelo <i>perA</i>	O	H
1	Beta	alpha	alpha 1	alpha 3	55	6
2	E990	kappa	alpha 1	Alpha	86	[h34]
3	E2348/69	alpha	alpha 1	alpha 1.1	127	6
4	HSP19/4	kappa	alpha 1	Alpha	86	[h34]
5	009-271082	beta	alpha 2	Alpha	111	[h2]
6	2309-77	beta	alpha 2	alpha 5.1	111	2
7	DIF 043256	beta	alpha 2	Alpha	111	2
8	Stoke W	beta	alpha 2	Alpha	111	[h2]
9	RN191/1	beta	alpha 2	Alpha	111	2
10	10	beta 2	alpha 3	Beta	119	6
11	0659-79	beta 2	alpha 3	beta 1	119	6
12	010-311082	mu	alpha 3	beta 1	76	51
13	RN410/1	beta 2	alpha 3	Beta	119	6
14	012-050982	eta	beta 1	alpha 4	142	[h21]
15	Z188-93	beta 2	beta 2	delta 1	110	6
16	CA89-4221	alpha	beta 3	gamma 2	142	6
17	E56/54	beta	beta 4	alpha 8	128	2
18	C771	alpha	beta 5	alpha	142	6
19	E851/71	alpha	beta 5	alpha 10	142	6
20	MA551/1	mu	beta 5	alpha 9	55	[h51]
21	RN587/1	alpha	beta 6	beta 2	157	[h45]
22	PT91-2	iota	beta 7.2	Beta	86	[h8]
23	TB227C	iota	beta 7.2	beta 1	86	[h8]
24	830542	alpha	beta 7.1	beta 3	157	[h45]

Anexo 7. Composición de los medios de cultivo celular usados

Medio de Cultivo Celular (MCC)

DMEM (Dulbecos modification Eagle Médium).....	5.0 mL
Antibióticos,.....	5.0 mL
L-glutamina (100 mM).....	5.0 mL
Piruvato de sodio (100 mM).....	5.0 mL
Suero fetal bovino.....	50.0 mL

Medio de Adherencia (MA)

DMEM.....	500 mL
HEPES 100 mM (pH=7.0).....	11.9 g (PM 238.3)
D-manosa1%	5.0 g

Anexo 8. Aprobación del Comité de Ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

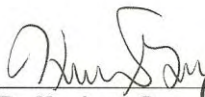
Vicerrectorado de Investigación
Dirección Universitaria de Investigación,
Ciencia y Tecnología - DUIICT


CONSTANCIA

El que suscribe, Presidente del Comité Institucional de Ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia certifica que el Protocolo de investigación versión 2 del 31 de mayo de 2006 titulado: **Estudio de la diarrea causada por conformes (*E. coli*) y otras causas en niños menores de un año de edad en Lima, Perú**, código de inscripción 50908, presentado por la Investigadora Principal **Dra. Theresa Ochoa**, ha sido revisado y **APROBADO** en sesión del CIE de fecha 27 de junio del 2006. No habiéndose encontrado objeciones de acuerdo a los estándares propuestos por la Universidad.

Esta aprobación tendrá **vigencia hasta 27 de junio del 2007**. Los trámites para su renovación deberán iniciarse por lo menos 30 días previos a su vencimiento.

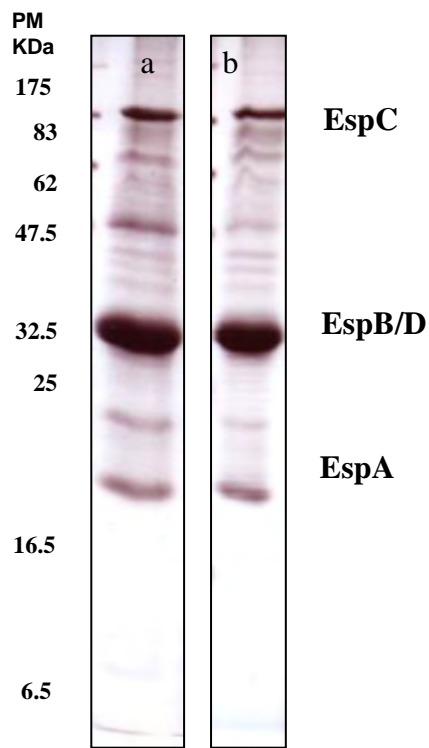
Lima, 12 de setiembre de 2006


Dr. Humberto Guerra
Presidente
Comité Institucional de Ética

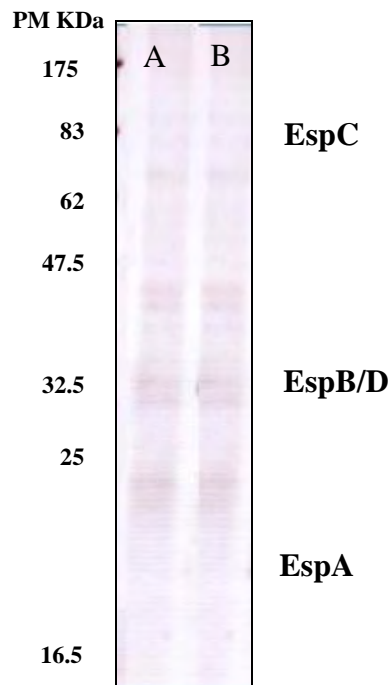


/Esperanza

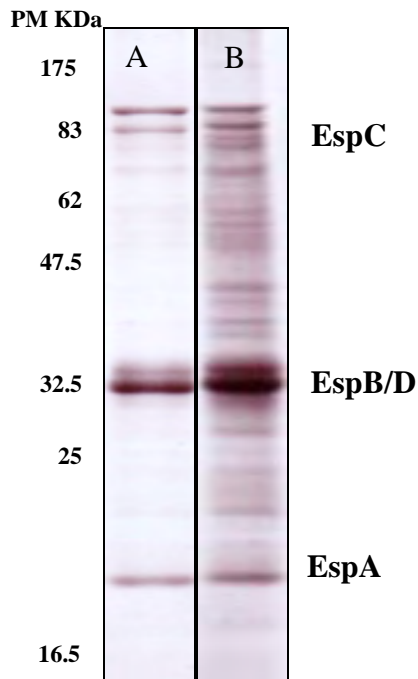
Anexo 9. Perfiles de proteínas secretadas de cepas aisladas de población



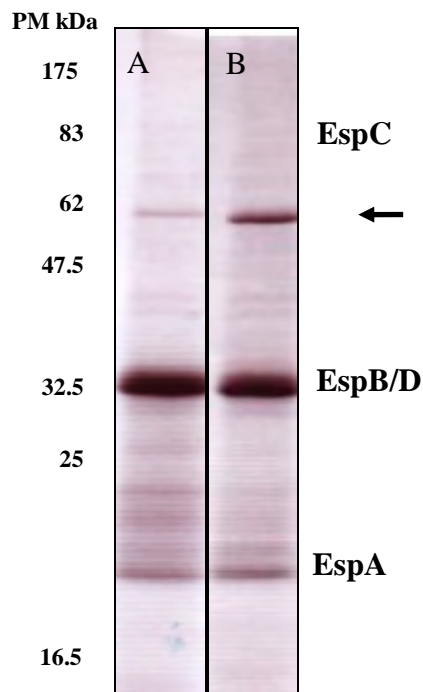
Perfil1: este perfil es similar por el presentado por la cepa prototipo EPEC E2348/69, en el que se observan las bandas que corresponden a las proteínas EspC, EspB/D y EspA en cultivos con agitación (a) y en estático (b).



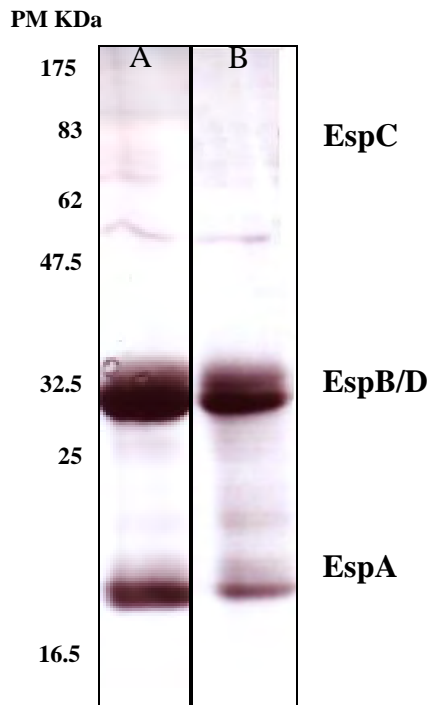
Perfil2: En este perfil no se aprecian proteínas secretadas y corresponde a una cepa mutante en el gen *ler* (E2348/69 Δ *ler*), en cultivos con agitación (A) y en estático (B).



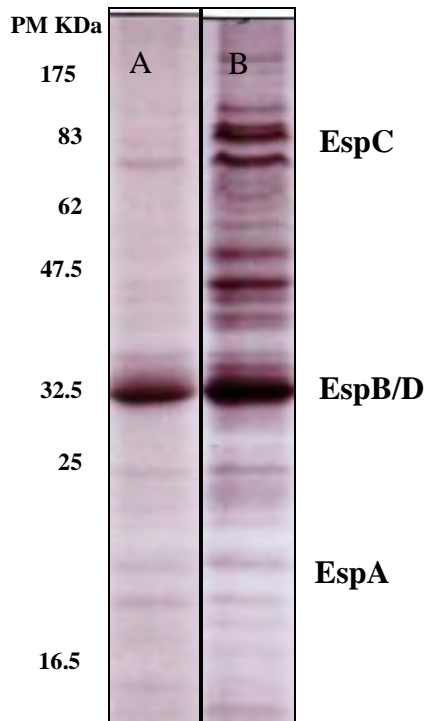
Perfil 3: En este perfil la banda de EspC se muestra como una doble banda, la segunda banda es ligeramente de menor peso molecular en ambos tipos de cultivo. El resto del perfil de proteínas de secreción se mantiene igual en ambos tipos de cultivo. No obstante la banda correspondiente a las proteínas EspB/D aparece separada, siendo EspD la de mayor peso molecular. Estas características se observan en cultivos con agitación (A) y en estático (B).



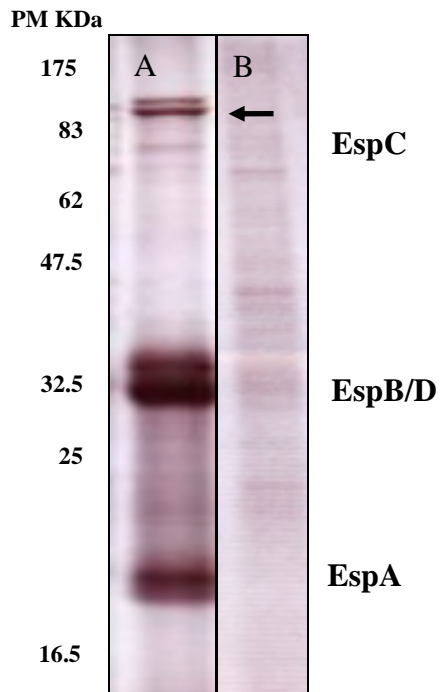
Perfil 4: En este perfil no se aprecia la banda de EspC, pero si se aprecia EspB/D y EspA. Así mismo aparece una banda nueva de aproximadamente 55KDa (flecha), en cultivos con agitación (A) y en estático (B).



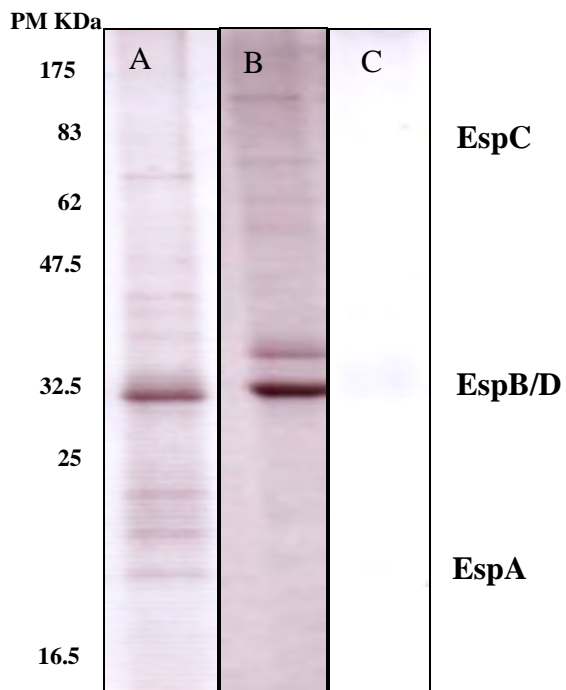
Perfil 5: En este perfil no se observa la banda de EspC en las dos condiciones de crecimiento. Se observan las proteínas EspB y EspD separados. También aparece la banda EspA. El patrón se repite en cultivos con agitación (A) y en estático (B).



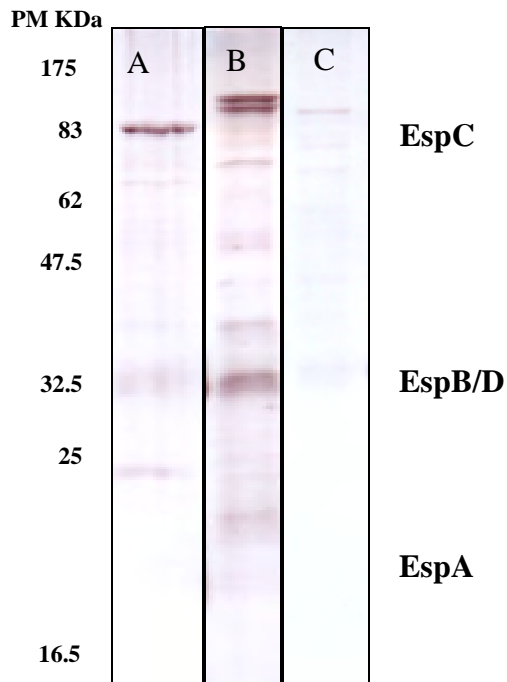
Perfil 6: En este perfil en el cultivo no se expresa EspA en las dos condiciones de crecimiento. Mientras EspB/D es secretada en cultivos con agitación (A) y en estático (B). La banda EspC aparece solo en cultivo estático.



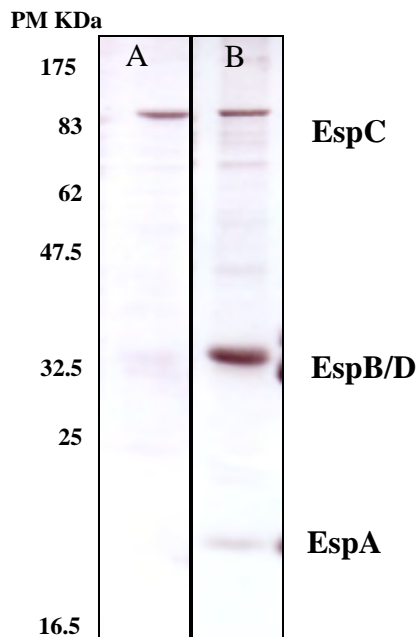
Perfil 7: En este perfil la banda de EspC no aparece, en cambio se observa una banda que se muestra como un doblete, de mayor peso molecular (flecha). El resto del perfil de proteínas de secreción se mantiene igual sólo en agitación (A), pues en el cultivo estático (B) no hay secreción de proteínas.



Perfil 8: en este perfil sólo en el cultivo en agitación se aprecia la banda de EspB/D como una banda simple (A) o separada (B), mientras en el cultivo estático no se observa secreción de proteínas (C).



Perfil 9: En este perfil sólo se observa la banda de EspC o una doble banda de mayor peso molecular en el cultivo en agitación (A y B) más no en cultivo estático (C).



Perfil 10: En este perfil en el cultivo en agitación (A) sólo se observa la secreción de EspC o en alguna variante incluso puede estar ausente; mientras en el cultivo estático (B) el perfil es similar a la de la cepa prototipo, EspC (puede estar ausente, dependiendo si aparece o no en el cultivo en agitación), EspB/D, y EspA.

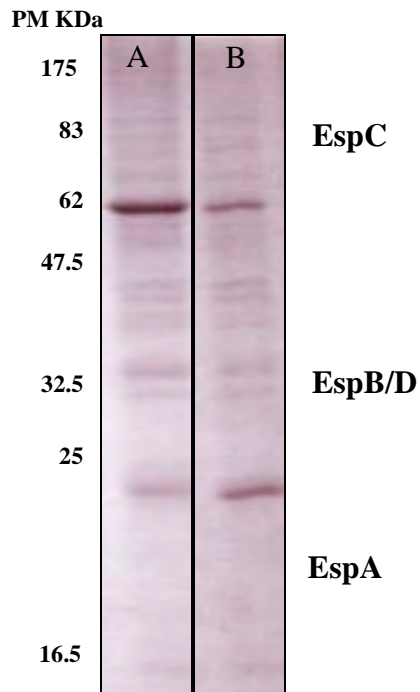


Figura 11. Perfil 11. En este perfil sólo se aprecia una banda de aproximadamente 60KDa en ambos cultivos. En una variante aparece además una banda de aproximadamente de 25KDa. Cultivos con agitación (A) y en estático (B).