

DetECCIÓN DE CEPAS DE *Escherichia coli* Shiga Toxigénica (STEC) y enteropatógena (EPEC) basada en PCR multiplex

Detection of Shiga Toxigenic *Escherichia coli* (STEC) and Enteropathogenic (EPEC) strains based on multiplex PCR

RESUMEN

Escherichia coli (STEC) y (EPEC) causan enfermedades gastrointestinales y pertenecen a los serogrupos O111, O157 y otros, frente a lo cual se planteó como objetivo implementar la técnica de PCR múltiplex para diagnosticar y caracterizar sus genes de virulencia. Se desarrollaron tres PCR multiplex: en la primera fueron empleados tres pares de iniciadores específicos de la región *rfbE* (codificante del antígeno O) del serotipo O157:H7, del gen *eaeA* que codifica la proteína intimina y del gen *hlyA* codificante de hemolisina, los cuales generaron productos de 259, 384 y 534 pb. En la segunda PCR se detectaron los genes de la sub-unidad A de las shigatoxinas *stx1*, *stx2*, incluidas las variantes de *stx2*, con amplicones de 180 y 255 pb. En la tercera se utilizaron iniciadores para *stx1*, *stx2*, *eaeA* y *hlyA*. Se determinó la selectividad de los iniciadores con cepas STEC, ATCC y se detectó hasta 1 UFC, lo cual demuestra su alta sensibilidad.

Palabras clave: Serogrupos, virulencia, iniciadores, intimina, hemolisina.

Mg. Sc. Oscar David Seni Pinoargote

Instituto de Investigaciones Científicas
Universidad técnica de Manabí
davseni@yahoo.com
oseni@utm.edu.ec

ABSTRACT

Escherichia coli (STEC) and (EPEC) cause gastrointestinal diseases. These bacteria belong to the serogroup O111, O157 and others. The stated objective is to implement the PCR multiplex technique to diagnose and characterize its virulence genes. Three PCR multiplex were developed; in the first one, three pairs of specific initiators were used from region *rfbE* (encoding of antigen O) of serotype O157:H7, of gen *eaeA* that encodes the intimin protein and gen *hlyA* encoding of hemolysin, which generates products of 259, 384 y 534 pb. In the second PCR the genes of subunit A of shigatoxins *stx1*, *stx2* (including variants of *stx2*) were detected, with amplicons of 180 and 255 bp. In the third PCR, initiators to *stx1*, *stx2*, *eaeA* and *hlyA* were used. The selectivity of initiators with strains STEC, ATCC was determined and it was detected up to 1 UFC, which demonstrates its high sensitivity.

Key words: serogroup, virulence, initiators, intimin, hemolysin.



Recibido: 8 de abril, 2015
Aceptado: 19 de octubre, 2015

1. INTRODUCCIÓN

Las cepas de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC), son la causa principal de diarrea en los países de escaso desarrollo económico, y llevan a la muerte a cerca de un millón de niños por año. Por otra parte la *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), también conocida como STEC, es productora de toxina de Shiga, causante del Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) (Paton & Paton, 1998) una patología grave que afecta especialmente a los niños. También ocasiona la enfermedad conocida como Púrpura Trombocitopénica Trombótica (PPT) (Kerner *et al.*, 2015).

La infección por (EHEC) fue reconocida por primera vez en EE.UU. (Riley *et al.* 1982). Esta cepa correspondió al serotipo O157:H7. Desde entonces, este serotipo ha sido asociado a numerosos brotes en distintas partes del mundo (Bettelheim, 2003; Karmali, 1989).

En Alemania, en el año 2011, se produjo un brote epidémico de síndrome urémico hemolítico causado por el serotipo O104:H4 de la bacteria *E. coli*, perteneciente al filo entero hemorrágica STEC. Este brote produjo la muerte de al menos 32 personas y más de un millar de infectados (OMS, 2011).

La fuente de infección por STEC es muy diversa y se relaciona con el consumo de alimentos como carnes, leche no pasteurizada, yogures artesanales, sándwiches de pollo, jugo de manzana no pasteurizado, agua de consumo y recreacional, entre otros productos agrícolas contaminados (Gómez *et al.*, 2002).

Como señala Gallegos y Morales (2009), la transmisión persona a persona también se puede dar en comunidades cerradas como guarderías, hogares de ancianos y escuelas, ya que con menos de 10 Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de *E. coli* O157:H7 se puede causar la enfermedad en humanos.

A escala mundial se han descrito brotes asociados a los serotipos O111:H-; O117:H4;

O121:H19; O145:H-; O26:H11, entre otros (Griffin & Tauxe, 1991). En Irán son muchos los casos de enfermedades diarreicas asociados a diferentes tipos de *E. coli* entre ellas EPEC y STEC (Haghi, Zeighami, Hajiahmadi, Khoshvaght & Bayat, 2014).

Esta bacteria presenta una gran diversidad genómica y puede, de esta forma, pasar de ser un organismo de vida libre a ser un comensal mutualista del colon en los animales de sangre caliente, hasta ser patógenos mortales en humanos (Kerner, *et al.*, 2015).

Debido a que las EPEC y STEC poseen características de colonización similares, se considera que STEC debe haberse originado como resultado de una cepa de EPEC que sufrió la infección por un bacteriófago portador del gen de la toxina de Shiga (Bailey & Scott, 2009)

La PCR puede dar un informe detallado de las cepas presentes y cuáles son los genes patógenos que contienen, ya que su estudio se centra en el material genético del microorganismo (Rodríguez, *et al.*, 2002). Sin embargo, existe la PCR multiplex que permite estudiar varios genes simultáneamente, ahorrando de esta manera tiempo y reactivos, sin perder su sensibilidad y especificidad. (Xu, Liu, Guan, Cui & Li, 2015).

En conjunto, los genes estudiados en esta investigación son Stx1, Stx2, eaeA, hlyA, y O157. Todos fueron analizados por PCR multiplex en cultivos puros, muestras biológicas, agua del río Portoviejo y agua potable de la misma ciudad, perteneciente a la tropical provincia de Manabí (Ecuador).

Las técnicas de biología molecular permiten detectar estas cepas y la toma adecuada de medidas de control, por lo que la PCR múltiple puede diagnosticar y caracterizar diferentes genes de virulencia de *E. coli* Shiga Toxigénicas (STEC) y enteropatógena (EPEC). La importancia de esta prueba molecular radica en su alta especificidad y sensibilidad, con resultados obtenibles en menos de 48 horas para la identificación de estas cepas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Las cepas de puras de *E. coli* empleadas en el estudio fueron 0157:H7, ATCC 25922, ATCC 35150, La cepa 9136 provino de un aislado de heces de niño de 1 año y 3 meses. También fueron utilizadas cepas provenientes de pacientes como la 5048 y la 1001. Además, de cepas de *Shigella spp.*, *Salmonella spp.* y *Vibrio spp.* Todas estas fueron proporcionadas por el Instituto Nacional de Higiene Leopoldo Izquieta Pérez (hoy Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública).

Todas estas cepas fueron utilizadas para probar la especificidad de los *primers*, los cuales también fueron probados en muestras ambientales provenientes del río Portoviejo. Como control negativo se utilizó el agua potable.

Mantenimiento de cepas

Las cepas se cultivaron a 37°C durante 24 horas en medios de cultivo sólidos LB Agar (37g/L) y McConkey (50 g/L), con el fin de obtener colonias aisladas, a partir de las cuales se iniciaron cultivos en caldo LB (25 g/L), necesarios para la obtención de ADN genómicos. Todas las cepas se conservaron en congelación a -80°C en medio LB suplementado con 15 % de glicerol, para su posterior utilización.

Toma de muestras de agua de río y potable

Las muestras de agua del río Portoviejo se tomaron en cuatro tramos localizados en los

sitios Mejía (parroquia Picoazá), Puente Rojo y Hospital Verdi Cevallos Balda. Se colectó un volumen aproximado de 100 ml a 30 centímetros de profundidad, que fue colocado en frascos estériles. Se tomaron cuatro muestras de agua potable, para lo cual se abrieron grifos durante cinco minutos previos a la colecta de 100 ml.

Aislamiento de bacterias a partir de muestras de agua. Se tomó una muestra de 50 ml de agua y se pasó por filtros de 1,2, y 0,22 μ, sucesivamente. Las bacterias retenidas sobre el filtro de 0,22 μ fueron cultivadas en matraz con caldo LB. Posteriormente se extrajo el ADN y se realizó la PCR.

Desarrollo de las pruebas moleculares. El ADN genómico se obtuvo por el método de miniextracción y purificación del ADN genómico (Ausubel *et al.*, 1989).

Método de extracción por ebullición. Se tomaron 1 500 μl de cultivo bacteriano, se centrifugaron durante cinco minutos a 12 000 rpm; se eliminó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 200 μL de agua bidestilada. Se sometió a ebullición durante 10 minutos y se colocó en hielo durante el mismo tiempo, luego se centrifugó por cinco minutos a 12 000 rpm. Finalmente, se tomó 1 μL de una dilución 1/10 para utilizar en la PCR.

Análisis del ADN en geles de electroforesis. La calidad y cantidad del ADN obtenido fue migrado en geles de agarosa al 1 %, en

Tabla 1. Lista descriptiva de los iniciadores utilizados, secuencias reconocidas y tamaño de los amplicones.

Iniciadores	Secuencia 5' → 3'	Especificidad	Producto
stx1F	ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC	nt 454–633 of A subunit coding region	180pb
stx1R	AGAACGCCCACTGAGATCATC	of <i>stx1</i>	
stx2F	GGCACTGTCTGAAACTGCTCC	nt 603–857 of A subunit coding region	255pb
stx2R	TCGCCAGTTATCTGACATTCTG	of <i>stx2</i> (including <i>stx2</i> variants)	
eaeAF	GACCCGGCACAAGCATAAGC	nt 27–410 of <i>eaeA</i> (this region is	
eaeA	CCACCTGCAGCAACAAGAGG	conserved between EPEC and STEC)	384pb
hlyAF	GCATCATCAAGCGTACGTTCC	nt 70–603 of EHEC <i>hlyA</i>	534pb
hlyAR	AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT		
O157F	CGGACATCCATGTGATATGG	nt 393–651 of <i>rfbE</i> O157:H7	259pb
O157R	TTGCCTATGTACAGCTAATCC		

presencia de bromuro de etidio (0,5 mg/ml), luego de una migración a 70 V. La observación se realizó bajo luz ultravioleta (312 nm) en un transluminador.

Elección y diseño de los iniciadores. Se utilizaron los iniciadores descritos por Patón y Patón (1998).

Por medio del programa informático BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) y el Vector NTI, se confirmó la especificidad y los parámetros de utilización de las diferentes secuencias, respectivamente.

Implementación de la PCR. Para los diferentes juegos de iniciadores se establecieron las condiciones de reacción más apropiadas. La PCR fue llevada a cabo en un volumen final de reacción de 50 µl, constituido por buffer de PCR a 1X, Cloruro de magnesio entre 1.5mM a 3mM, nucleótidos a 200 µM, iniciadores a 20 pmol y 1u de Taq DNA polimerasa.

b.- Programación del termociclador.- Las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo en un termociclador Techne Genius y Biometra, con la siguiente programación estándar.

Tabla 2. Programación del termociclador.

1 ciclo de	Desnaturalización	94°C	4 min.
35 ciclos de	Desnaturalización	94°C	45 seg
	Hibridación	55°C	45 seg
	Polimerización	72°C	1 min.
1 ciclo de	Polimerización final	72°C	7 min.
	Conservación	4°C	infinito

La temperatura de hibridación fue cambiada de acuerdo con los diferentes juegos de iniciadores con el fin de determinar la mejor condición de amplificación.

Prueba de especificidad de los iniciadores. Los diferentes juegos de iniciadores fueron probados con ADN extraído de varias cepas bacterianas *E. coli* (*Shigella spp.*, *Salmonella spp.*, *Vibrios spp.*), con el fin de confirmar su especificidad.

Prueba de sensibilidad de los iniciadores.

Con este fin, se realizaron diluciones sucesivas de ADN bacteriano obtenido a partir de un cultivo puro, llevado a una densidad óptica a 600 nm de longitud de onda, equivalente a 0,5, lo que corresponde a 5^{10} UFC/ml, y se sometió a una PCR simple.

Implementación de la PCR múltiplex. Con base en los resultados de las PCR simple se realizaron combinaciones con los diferentes juegos de iniciadores considerando que la temperatura de hibridación de los iniciadores sea compatible y que el tamaño de los amplicones sea discriminado.

Para determinar la sensibilidad de la PCR múltiplex se realizaron dos pruebas: una tomando como referencia ADN extraído de un cultivo previamente llevado hasta una densidad DO 600 nm = 0,5 (5,108 UFC/ml), el cual fue diluido en serie (1/10) hasta 10^{-8} , y extraído el ADN a partir de precultivos provenientes de inóculos en 50 ml de caldo LB e incubado por 10 horas correspondientes a concentraciones de 1000-5000 UFC/ml, 100-500 UFC/ml, 10-50 UFC/ml, 1-5 UFC/ml, respectivamente. A partir de 1mL de cultivo se obtuvo ADN con el método de extracción por ebullición.

3. RESULTADOS

Análisis de las propiedades termodinámicas de los iniciadores. Utilizando el Vector NTI Advance 10, se analizaron las propiedades termodinámicas de los diferentes juegos de iniciadores para confirmar las temperaturas de fusión (T_m) y la presencia de dímeros y de estructuras secundarias de tipo tallo-bucle (hairpin-loop).

Extracción del ADN genómico. A partir de las cepas puras de *E. coli*, se realizaron cultivos en caldo LB con los cuales se elaboró un banco de ADN genómico para la evaluación de los diferentes juegos de iniciadores (Figura 1).

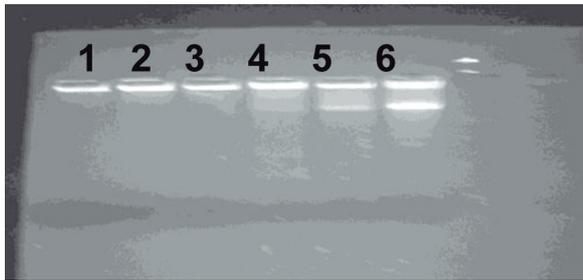


Figura 1. Extracción de ADN genómico de *Escherichia coli*. Línea 1-2: cepa 9136. Línea 3-4: Cepa ATCC 25922. Línea 5-6: cepa 5048

Este método permitió obtener una buena calidad de ADN de las diferentes cepas. Para el análisis a mayor escala de muestras ambientales, se estudió la calidad del ADN extraído de cultivos pre-enriquecidos por un método de extracción por ebullición. Este método fue desarrollado durante la investigación y permite obtener ADN con una pureza menor que el de mini extracción de Ausubel, pero con una duración inferior a una hora, además de permitir su visualización en geles de electroforesis en agarosa. Informes de este método no se pudo encontrar en la literatura consultada.

Implementación de la PCR simple para los diferentes genes de virulencia. Antes de iniciar las pruebas de PCR múltiplex fue necesario analizar que los diferentes juegos de iniciadores permitieron identificar su secuencia blanco en pruebas individuales utilizando cepas de *E. coli* puras, y posteriormente en bacterias cultivadas a partir de muestras de agua del río Portoviejo.

Aplicación de la PCR sobre diferentes aislados. La aplicación de la PCR con cada juego de primer individuales se realizó con un protocolo estándar trabajando a las temperaturas de hibridación más adecuadas para cada juego. Los iniciadores fueron probados individualmente con una cepa de *E. coli* ATCC 35150, la cual es positiva para todos los genes, y 3 cepas no *E. coli* (Figura 2).

Los genotipos estudiados muestran la presencia de dos cepas tipo O157 identificadas como O157:H7 y ATCC 35150. Dos negativas para los genes stx1 y stx2 corresponden a cepas EPEC, identificadas como aislado de orina 5048 y ATCC 25922. Finalmente, dos cepas dieron perfiles correspondientes a STEC, la 9136 y la 1001. (Tabla 3 y Figura 3)

Análisis de sensibilidad de los diferentes juegos de iniciadores

Con el objetivo de estudiar la sensibilidad de cada juego de iniciadores, se realizó un cultivo a partir de la cepa ATCC 35150 hasta alcanzar una DO = 0,5, que corresponde a una suspensión que contenía 5,10 UFC/ml. El ADN fue extraído a partir de 1 ml de esta suspensión y fue diluido en serie (1/10) hasta la dilución 10⁻⁸. Los resultados de las PCR pueden ser visualizadas a partir de 10⁻⁶ para los iniciadores eaeAF/R, hlyAF/R, con 10⁻⁵ para O157F/R, Stx1F/R y finalmente el menos fue Stx2F/R 10⁻⁴. Estos datos demuestran la sensibilidad de esta técnica (Figura 4).

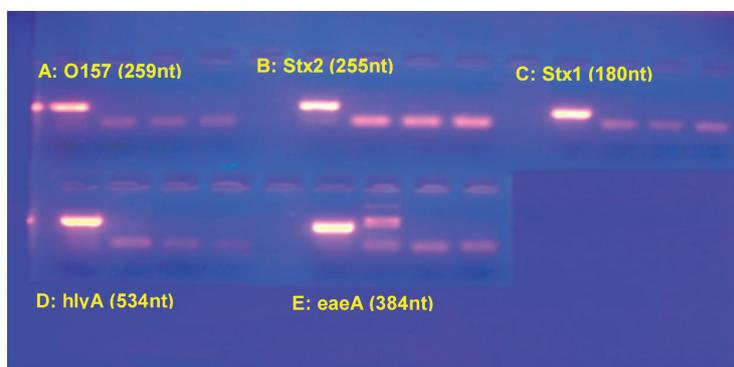


Figura 2. Amplificación con los diferentes juegos de iniciadores (O157, stx2, stx1, hlyA y eaeA) en reacciones individuales sobre ADN de *E. coli* (línea 1 *E. coli* de cada reacción) y cepas no *E. coli* (línea 2 a 4 de cada reacción). Se indican los tamaños de los amplicones respectivos.

Tabla 3. Caracterización del genotipo de las diferentes cepas de *E. coli*

CEPAS	EaeA (EPEC – STEC)	HlyA (EHEC)	O157 (rfb E0157H7)	Stx1 (shiga toxina 1)	Stx2 (shiga toxina 2 y variantes)
Aislados de coprocultivos 9136	P	P	N	P	P
Aislado de orina 5048	P	P	N	N	N
<i>E. coli</i> 1001	P	P	N	P	P
ATCC 25922	P	P	N	N	N
O157:H7	P	P	P	P	P
ATCC 35150	P	P	P	P	P
<i>Shigella</i> spp	N	N	N	N	N
<i>Salmonella</i> spp	N	N	N	N	N
<i>Vibrio</i> spp	N	N	N	N	N

P= POSITIVO N= NEGATIVO

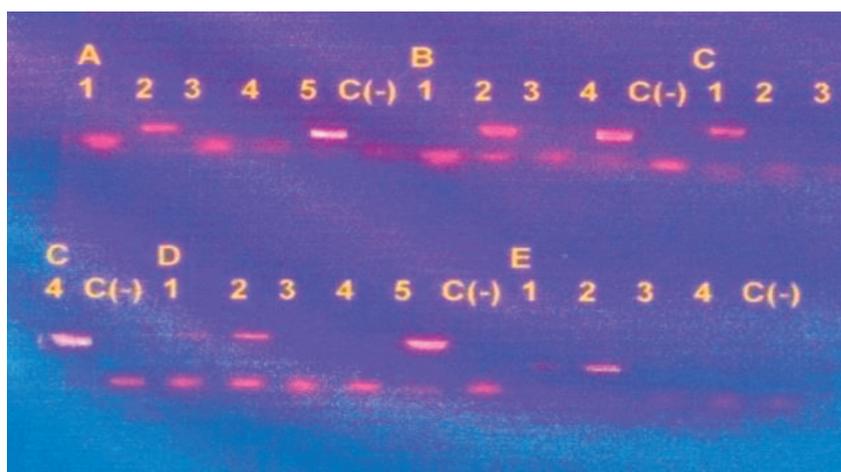


Figura 3. Prueba de amplificación con los juegos de iniciadores sobre diferentes cepas de *E. coli*. A: stx1 F/R, B: stx2 F/R, C: eaeA F/R, D: hlyA F/R, y E: O157F/R. Las líneas 1 a 5 corresponden a las cepas 9136, O157:H7, 1001, ATCC 25922 y ATCC 35150 respectivamente. C- corresponde al control negativo.

Tabla 4. Evaluación de la sensibilidad de los iniciadores sobre ADN diluido. Iniciadores

Diluciones de ADN extraído de una suspensión con 5×10^8 UFC/mL								
Iniciadores	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}
O157F/R	P	P	P	P	P	N	N	N
Stx1F/R	P	P	P	P	P	N	N	N
Stx2F/R	P	P	P	N	N	N	N	N
eaeAF/R	P	P	P	P	P	P	N	N
hlyAF/R	P	P	P	P	P	P	N	N

P= POSITIVO N= NEGATIVO

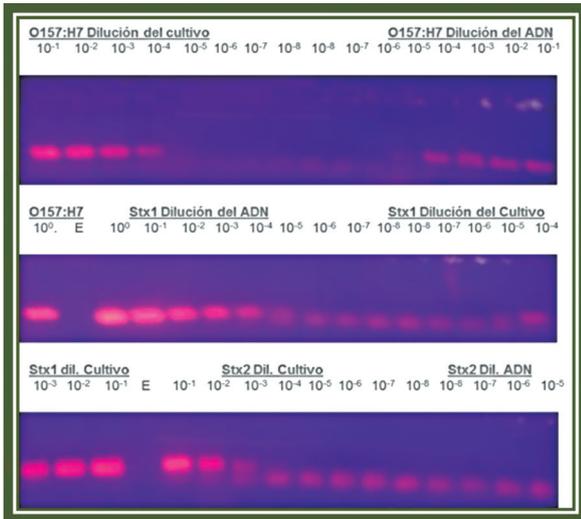


Figura 4. Prueba de sensibilidad de los diferentes juegos de iniciadores utilizados sobre ADN diluido en serie, obtenido de un cultivo que tenía 5x10⁸ UFC/mL, y sobre ADN extraído de suspensiones bacterianas diluidas en serie.

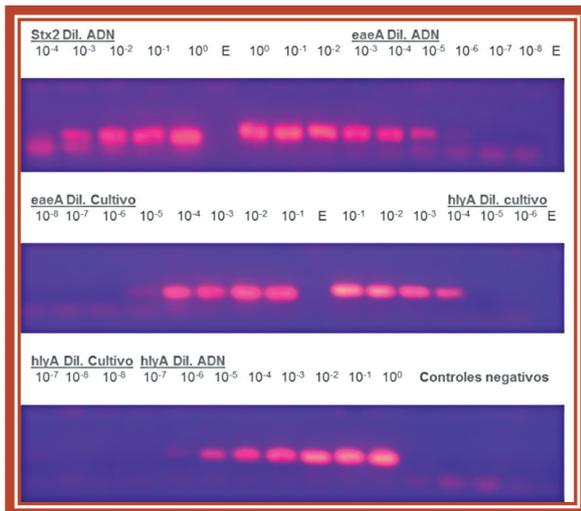


Figura 5. Evaluación de la sensibilidad de cada juego de iniciadores sobre el ADN extraído a partir de suspensiones de bacterias diluidas en serie.

De la misma forma se evaluó la sensibilidad de cada juego de iniciadores a partir del ADN extraído sobre diluciones de suspensiones bacterianas. Se realizó un cultivo a partir de la cepa ATCC 35150 hasta alcanzar una DO= 0,5 que corresponde a una suspensión que contenía 5,10⁸ UFC/mL. La suspensión bacteriana fue diluida en serie (1/10) hasta la dilución 10⁻⁸ y de cada mililitro de suspensión se procedió a extraer el ADN.

Los resultados obtenidos demuestran una alta sensibilidad de 10⁻⁵ para O157F/R y eaeAF/R; de 10⁻⁴ para Stx1F/R y hlyAF/R; de 10⁻³ para Stx2 F/R. Datos similares fueron obtenidos con diferentes iniciadores por Paton (1998) (Tabla 5 y Figura 5).

Aplicación de la PCR a partir de muestras de agua del río Portoviejo

Los resultados dieron positivo en todas las muestras del río Portoviejo para el gen de virulencia eaeA, el cual representa un posible factor accesorio de virulencia (la intimina) y en una de las muestras para el gen hlyA, que corresponde a la presencia del plásmido que codifica la enterohemolisina en las cepas de tipo enteropatógena (EPEC). Ninguna salió positiva para otros iniciadores. Esto demuestra que la mayoría de las cepas EPEC encontradas en el río Portoviejo tiene un grado bajo de virulencia para los humanos.

La muestra de agua potable proveniente de la llave resultó ser negativa para cualquiera de los genes estudiados (Tabla 6).

Tabla 5. Evaluación de la sensibilidad de cada juego de iniciadores sobre el ADN extraído a partir de suspensiones de bacterias diluidas en serie.

Diluciones de una suspensión bacteriana con 5x10 ⁸ UFC/mL								
Iniciadores	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸
	5.107UFC	5.106UFC	5.105UFC	5.104UFC	5.103UFC	5.102UFC	5.101UFC	5UFC
O157F/R	P	P	P	P	P	N	N	N
Stx1F/R	P	P	P	P	N	N	N	N
Stx2F/R	P	P	P	N	N	N	N	N
eaeAF/R	P	P	P	P	P	N	N	N
hlyAF/R	P	P	P	P	N	N	N	N

P= POSITIVO N= NEGATIVO

Tabla 6. Análisis de muestras provenientes del río Portoviejo por PCR simple utilizando diferentes juegos de iniciadores dirigidos a factores de virulencia de *E. coli*.

SECTOR	INICIADORES				
	eaeA	hlyA	O157	Stx1	Stx2
Hospital					
Verdi Cevallos	+	-	-	-	-
Puente Rojo	+	+	-	-	-
Picoaza	+	-	-	-	-
Mejía	+	-	-	-	-
Agua Potable	-	-	-	-	-

Implementación de la PCR multiplex. Una vez confirmada la funcionalidad de la técnica, se procedió a ensayar combinaciones con los diferentes juegos de iniciadores tomando en cuenta la temperatura de hibridación y el tamaño de los amplicones, los cuales son fácilmente distinguibles en un gel de electroforesis.

Tabla 7. Combinaciones con los diferentes juegos de iniciadores considerando la temperatura de hibridación y el tamaño de los amplicones.

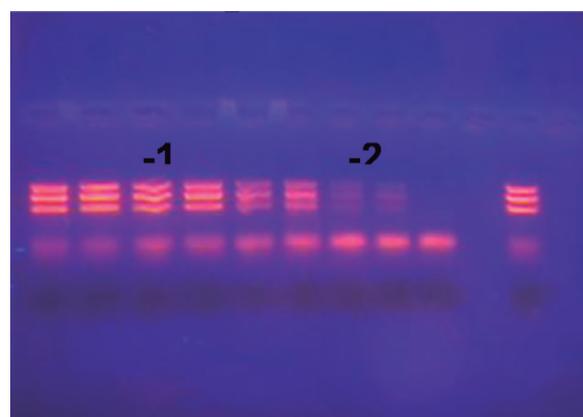
Múltiplex 1	Múltiplex 2	Múltiplex 3
eaeA	STX1	STX1
hlyA	STX2	STX2
O157		eaeA
		hlyA

Prueba de sensibilidad con la PCR multiplex

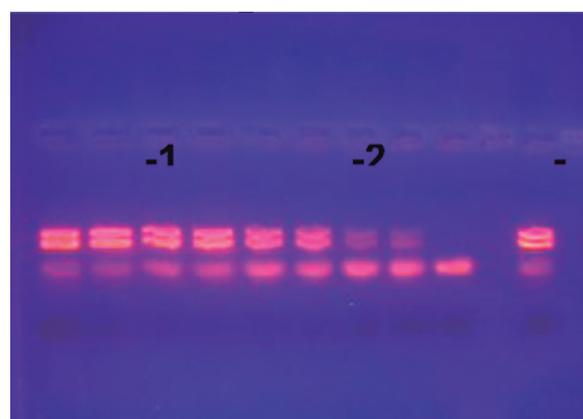
Con la finalidad de realizar pruebas para detectar la sensibilidad con la PCR multiplex, se procedió con tres tipos de ensayos.

- **Sobre ADN diluido.** Una primera evaluación de la sensibilidad de la PCR múltiplex fue realizada sobre el ADN obtenido de un cultivo llevado hasta una densidad de 0,5 correspondiente a una suspensión que contenía cerca de 5×10^8 UFC/ml. En diluciones seriadas del ADN extraído fue posible observar amplificaciones hasta la dilución 10^{-4} para la triplex y cuádruplex, y hasta la 10^{-5} para la dúplex. Estos resultados demuestran que existe un efecto de la cantidad de productos de PCR y la sensibilidad de detección, ya que a medida que aumenta el número de amplicones por reacción, se pierde sensibilidad, observándose detección hasta 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} para las cuádruplex, triplex y dúplex, respectivamente.

(A) Múltiplex 1



(B) Múltiplex 2



(C) Múltiplex 3

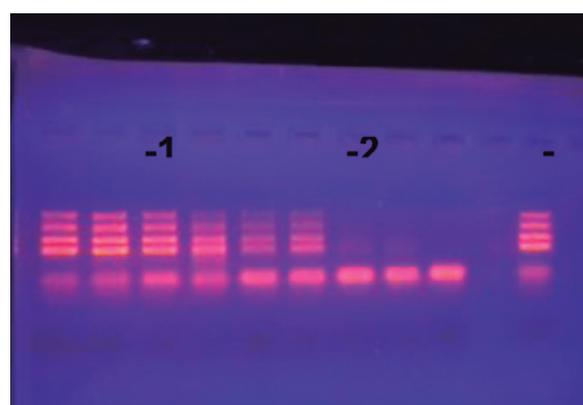


Figura 6. Resultados de la PCR múltiplex con los diferentes juegos de iniciadores. (A): triplex O157, eaeA y hlyA; (B) dúplex: stx1 y stx2, y (C) cuádruplex: stx1, stx2, eaeA y hlyA, sobre diluciones seriadas de ADN aislados de *E. coli* cepa ATCC 31150. Línea 9 control negativo y Línea 10 control positivo (*E. coli* O157:H7). Cada muestra está representada en duplicado Detección hasta la dilución 10^{-4}

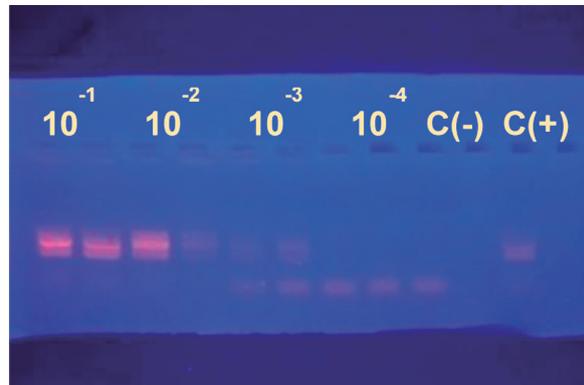
- Sobre ADN extraído de cultivos cuantificados.** Una segunda evaluación de la sensibilidad fue realizada a partir de ADN obtenido de suspensiones bacterianas cuantificadas y diluidas sucesivamente. Una alícuota de las suspensiones fue sembrada en placas Petri para cuantificar el número de unidades formadoras de colonias contenidas en cada suspensión bacteriana. En la figura 7 se observan los resultados obtenidos con las suspensiones diluidas 10^{-1} hasta 10^{-4} que correspondía a $5 \cdot 10^7$ hasta $5 \cdot 10^4$ UFC/mL, respectivamente. Vaughan Vaughan, Maki, Benson y Collins (2003) obtuvieron menor sensibilidad en pruebas similares 10^{-1} .

Estos resultados demuestran un alto grado de sensibilidad que solo pueden ser superados por la PCR en tiempo real sobre los genes *stx1* y *stx2*, según lo confirman los trabajos de Heijnen y Medema (2006).

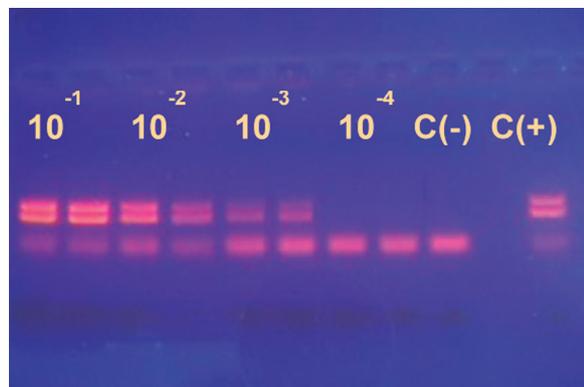
- Sobre ADN extraído de cultivos enriquecidos.** Una tercera evaluación de la sensibilidad fue realizada a partir de ADN extraído de cultivos enriquecidos en suspensiones que contenían una baja carga bacteriana con base en un cultivo de *E. coli* llevado hasta una DO - 0.5 (5×10^8 UFC/ml), se realizó una dilución sucesiva hasta 108 correspondiente a una densidad de 1 a 5 UFC/ml. 1 ml de las diluciones 1/10 correspondientes a concentraciones de 1000-5000 UFC/ml, 100-500 UFC/ml, 10-50 UFC/ml, 1-5 UFC/ml, respectivamente, fueron inoculadas en 50 ml de caldo LB e incubado por 10 horas a 37°C .

En la figura 8 se aprecia que las amplificaciones dieron resultados positivos hasta la dilución 10^{-1} (1-5 UFC/ml), pero con la presencia de los amplicones de menor tamaño que corresponden a los genes *stx1* y *stx2*. En las múltiplex 1 y 3 (triplex y cuádruplex, respectivamente), todos los fragmentos esperados fueron observados hasta la muestra de la suspensión que tenía de 10 a 50 UFC/ml.

(A) Múltiplex 1



(B) Múltiplex 2



(C) Múltiplex 3

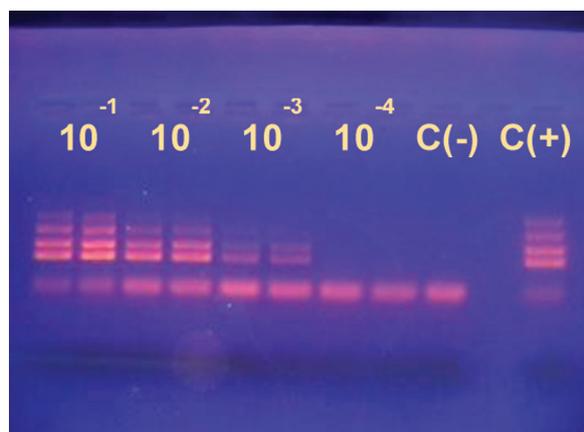
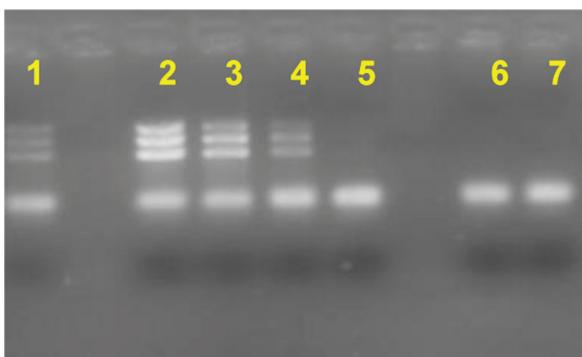
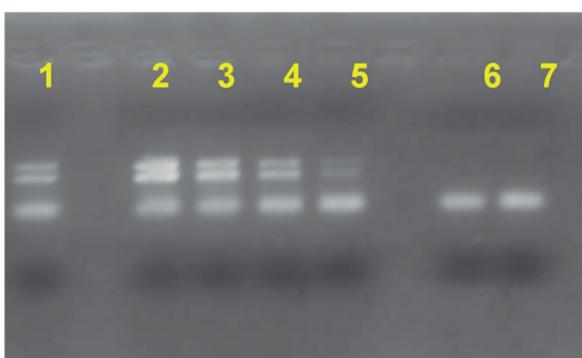


Figura 7. Amplificación por PCR múltiplex con (A). triplex O157, *eaeA* y *hlyA*, (B). duplex *stx1* y *stx2*, y (C) cuádruplex: *stx1*, *stx2*, *eaeA* y *hlyA*; sobre ADN aislados de suspensiones de *E. coli* cepa 13150 diluidas en serie. Cada muestra está representada en duplicado con $10^{-1} = 5 \cdot 10^7$ UFC/ml, $10^{-2} = 5 \cdot 10^6$ UFC/ml, $10^{-3} = 5 \cdot 10^5$ UFC/ml y $10^{-4} = 5 \cdot 10^4$ UFC/ml. Línea 9 control negativo y Línea 10 control positivo.

(A) Múltiplex 1



(B) Múltiplex 2



(C) Múltiplex 3

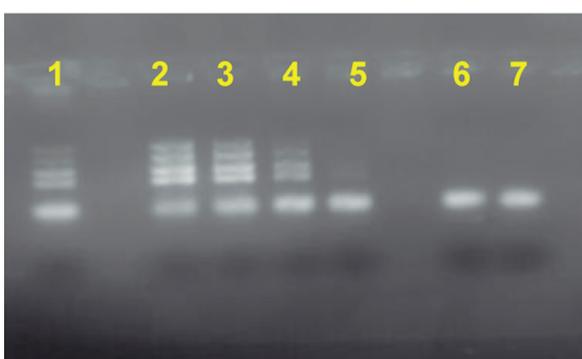


Figura 8. Resultados de la amplificación por PCR múltiplex con iniciadores (A): 0157, eaeA y hlyA, (B): i stx1 y stx2, y (C): stx1, stx2, eaeA y hlyA, sobre: Línea 1: control positivo de ADN de *E. coli*. Línea 2 a 5: ADN extraído de cultivos de 10 horas obtenidos a partir de los inoculos correspondientes a 1000- 5000 UFC/mL, 100-500 UFC/ml, 10-50 UFC/mL, 1-5 UFC/mL respectivamente. Línea 6: control negativo de extracción y Línea 7: control negativo de PCR.

4. DISCUSIÓN

Los resultados indican que existe una diferencia de 10,1 grados centígrados entre los iniciadores de mayor y menor T_m . Esto implica que, en la reacción, al escoger una temperatura de hibridación cerca del T_m menor, existirían apareamientos no específicos para aquellos que tienen un T_m más elevado.

Se seleccionó como temperatura óptima 55°C, que mantuvo una astringencia de hibridación alta para la amplificación del factor de virulencia de 0157F, y una temperatura poco astringente para el gen hlyA. Los resultados de la PCR no mostraron la presencia de dímeros. También se realizó el análisis Oligoduplex que permite evaluar las posibilidades de dimerización entre diferentes iniciadores, pero el nivel fue bajo, alrededor de 2 a 4 dímeros.

Análisis de las secuencias con los bancos de datos.- Utilizando el programa BLAST se confirmó la especificidad de los iniciadores con sus genes blancos. Este análisis fue realizado *on line* por lo cual es difícil presentar todos los resultados obtenidos

Es necesario destacar que, de los genes identificados por los iniciadores empleados, el eaeA y el hlyA se encuentran presentes tanto en la *E. coli* entero hemorrágica como en la enteropatógena; mientras que los genes stx1, stx2 y variantes son específicos de la enterohemorrágica (Zangari, Melton & Celsa, 2014). Así, las cepas 9136, 1001 y 0157:H7, al poseer los genes stx, pertenecen al grupo de las entero hemorrágicas, en tanto que la 5048 y la ATCC 25922 son enteropatógenas por no poseer los genes stx (Dutta, *et al.*, 2011; Bugarel, *et al.*, 2011). Esto implica que las muestras tomadas del agua del río Portoviejo son entero patógenas, por lo que la técnica desarrollada no solo detecta a la *E. coli* enterohemorrágica sino que también a la enteropatógena, independientemente si la muestra proviene de cepas pura (ATCC 25922), de muestras biológicas (aislado de orina 5048) y muestras ambientales (agua del río Portoviejo).

Es necesario mencionar que las *E. coli* EHEC y EPEC son las que más comparten serotipos O:H genes de virulencia y otras características fenotípicas (Bugarel *et al.*, 2011). Autores como Paton (1998), trabajando con similares primers pero con diferentes combinaciones, consideraron a todas ellas como EHEC, mientras que en el presente trabajo, y al igual que lo descrito por Mellies Barron y Carmona (2007), establecen claras diferencias entre estos dos serogrupos; así, la EPEC provoca diarrea acuosa. No poseen la toxina Stx, pero cuenta con la cantidad de bacterias necesarias para causar la infección (esta entre 10^8 a 10^{10}), atacando al intestino delgado.

Contrariamente, las bacterias EHEC causan diarrea con o sin sangre y en un bajo porcentaje produce Síndrome Urémico Hemolítico (SUH). Poseen las toxinas Stx y para provocar la infección se necesitan menos de 100 UFC. Infecta el intestino grueso.

Con base en esta información, se ha considerado como EPEC a las que no poseen la toxina Stx, mientras que a las que poseen se las clasifica como EHEC (Dutta *et al.*, 2011). Utilizando 4 de los *primers* empleados en este trabajo también se pudo diferenciar a las EPEC de las EHEC basado en la toxina Stx. Sin embargo, se ha descrito un tipo de *E. coli*. O26: H32 como una EHEC que es Stx negativo (Piazza, Delannoy & Halha, 2013).

La especificidad es otro de los factores que presenta la técnica. Las bacterias por lo general intercambian material genético incluso con otras especies diferentes, así, las toxinas *shiga stx* están presente en *E. coli* y *Shigella*, por lo cual los primer fueron probados en bacterias diferentes de la *E. coli* como la *salmonella spp*, *Shiguella spp* y *Vibrio spp*. Esta última también puede presentar el gen *hlyA* y en todos ellos el resultado fue negativo, lo cual implica que los primers ensayados son específicos de *E. coli*.

Otro de los factores de mayor importancia es la sensibilidad de la técnica para detectar *E. coli* en muestras biológicas, ya que se considera que las *E. coli* EHEC y EPEC pueden infectar a personas con cantidades inferiores a 10 UFC, no detectadas por las pruebas convencionales como las bioquímicas y serológicas (Ochoa, Mercado & Durand, 2011), mientras que los iniciadores probados tanto en la PCR simple como en las multiplex llegaron a detectar hasta 1 UFC con cultivos pre enriquecidos durante 10 horas, tanto en cepas puras como en muestras biológicas. Además, existe otro método molecular que permite identificar los genes de *stx* en un periodo aproximado de nueve horas (Lamber y Carrillo, 2015).

5. CONCLUSIONES

- Los iniciadores seleccionados mostraron ser específicos para sus genes blancos en pruebas realizadas con ADN extraído de cepas de *E. coli* y otras bacterias como *Shigella*, *Salmonella* y *Vibrios*.
- La temperatura de hibridación óptima fue de 55°C, lo que mantuvo una astringencia de hibridación alta para la amplificación del factor de virulencia de O157 y una temperatura poco astringente para el gen *hlyA*. Los resultados de la PCR no mostraron la presencia de dímeros.
- La PCR simple para cada juego de iniciadores mostró un grado de sensibilidad para diluciones entre $1,10^{-3}$ y $1,0^{-6}$ del ADN puro, y entre $5,10^{-5}$ y $5,10^{-3}$ UFC en suspensiones de ADN cuantificadas. Para lograr la máxima sensibilidad fue necesario realizar un pre-enriquecimiento de la suspensión bacteriana o de la muestra, permitiendo así detectar hasta 1 UFC/ml de suspensión.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ausubel, F., Brent, R., & Kingston, R., *et al.* editors. (1992). *Short Protocols in Molecular Biology. Compendium of Methods from Current protocols in Molecular Biology*. Second Edition. Harvard Medical School.
- Bailey & Scott. (2009). *Infecciones del Aparato Gastrointestinal. En Diagnóstico Microbiológico*. (pp 999). Argentina: Editorial Médica Panamericana.
- Bettelheim, K.A. (2003). Non O-157 Verotoxin-producing *Escherichia coli*. A problem, paradox and paradigm. *Exp. Biology and Medicine*. 228: 333 – 344.
- Bugarel, Martín, Fach & Beutin. (2011). La virulencia de genes de perfiles de enterohemorrágica (ECEH) y enteropatógena (EPEC) *Escherichia coli* cepas: una base para la evaluación de riesgos molecular de cepas típicas y atípicas EPEC *BMC Microbiology*, 11 : 142 doi: 10.1186 / 1471-2180-11-142
- Dutta C.T., Roychoudhury P., Bandyopadhyay, Wani S.A., & Hussain yo. (2011). Detección y caracterización de la toxina Shiga *Escherichia coli* (STEC) y *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) en las aves de corral con diarrea. 133: 541-5. 1 Departamento de Microbiología Veterinaria, Facultad de Ciencias Veterinarias y Zootecnia de la Universidad Central de Agricultura, Aizawl, Mizoram, la India.
- Gallegos & Morales. (2009). Caracterización de Aislados de *Escherichia coli* O157:H7 en canales de bovinos y porcinos mediante PCR. *Revista Científica, FCV-LUZ* / 19(2): 139 – 146.
- Gómez D., Miliwebsky E., Fernandez Pascua C., Baschkier A., Manfredi E., Zotta M., Nario F., Piquin A., Sanz M., Etcheverría A., Padola N., Parma A., & Rivas M. (2002). Aislamiento y caracterización de *Escherichia coli* productora de verotoxina de hamburguesas congeladas y quesos blandos. *Rev Argent Microbiol*. 34(2):66-71.
- Griffin P.M., & Tauxe R.V. (1991). The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiol Rev*; 13: 60-98
- Haghi, Zeighami, Hajiahmadi, Khoshvaght & Bayat. (2014). Frequency and antimicrobial resistance of diarrhoeagenic *Escherichia coli* from young children in Iran.- *Journal of Medical Microbiology* 63, 427-432
- Heijnen & Medema. (2006). Quantitative detection of *E. coli* O157 and other shiga toxin producing *E. coli* in water samples using a culture method combined with real-time PCR.
- Karmali, M.A. (1989). Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clinical Microbiological Reviews*. 2, 15–38.
- Kerner Bridger, & Gabriele Köpf. (2015). Evaluación de la seguridad biológica in vitro e inmunogenicidad in vivo de recombinante *Escherichia coli* Shiga toxoides como vacunas candidatas en el ganado. BioMed Central.
- Lambert & Carrillo. (2015). GeneSippr: un enfoque rápido de todo el genoma para la identificación y caracterización de patógenos de transmisión alimentaria como prioridad Shiga toxigénicos *Escherichia coli*.- PMC.
- Mellies Barron & Carmona. (2007). *Enteropatógena y enterohemorrágica Escherichia colivirulencia Regulación Génica*. American Society for Microbiology. All Rights Reserved.
- Paton, A.W., & Paton, J.C. (1998). Detection and characterization of Shiga toxigenic *E. coli* by using multiplex PCR assays for stx1, stx2 , eaeA, Enterohemorrhagic *E. coli* hlyA, rfbO11, and rfbO157. *J Clin Microbiol*; 36(2):598-602
- Piazza, & Delannoy Halha. (2013). Molecular and Phenotypic Characterization of *Escherichia coli* O26:H8 among Diarrheagenic *E. coli* O26 Strains Isolated in Brazil. *Appl Environ Microbiol*. 79(22): 6847-6854.
- Ochoa, Mercado, & Durand. (2011). Frecuencia y patotipos de *Escherichia coli* diarrogénicas en niños peruanos con y sin diarrea.- *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*.
- Organización Mundial de la Salud. (2011). Brote de síndrome hemolítico urémico en Alemania. Descargado de: http://www.who.int/csr/don/2011_05_27/es/
- Riley, L.W., Remis, R.S., Helgerson, S.D., McGee, H.B., Wells, J.G., & Davis, B.R. *et al.*, (1983). Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N Engl J Med*;308:681-685.
- Rodríguez-Angeles G. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli* *Salud Pública Mex*;44:464-475.
- Vaughan, Maki, Benson, & Collins. (2003). Direct PCR detection of *Escherichia coli* O157:H7. *Letters in Applied Microbiology*. 37, 239–243.
- Xu, Liu, Guan, Cui & Li. (2015). Dual priming oligonucleotide (DPO)-based multiplex PCR assay for specific detection of four diarrhoeagenic *Escherichia coli* in food. *Lett Appl Microbiol*.):146-52. doi: 10.1111/lam.12426..
- Zangari, Melton & Celsa. (2014) La virulencia mejorada de la *Escherichia coli* O157: H7 Espinaca-Asociado cepa del brote en dos modelos animales se asocia con niveles más altos de Stx2 Producción después de la inducción con ciprofloxacina.- *Infection and Immunity*.