

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

INFECCIONES POR CAMPYLOBACTER JEJUNI EN NIÑOS:
¿INFECCIONES RECURRENTE O PERSISTENTES?
COMPARACION DE CEPAS POR RIBOTIPIA

INFORME DE TESIS

PRESENTADO POR:

JOSE VICTOR LOPEZ RUANO

PARA OPTAR AL TITULO DE

QUIMICO BIOLOGO

GUATEMALA, FEBRERO DE 1994

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

457532

DL
96
†(1477)

**JUNTA DIRECTIVA DE LA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA**

DECANA	LICDA. CLEMENCIA DEL PILAR GALVEZ DE AVILA
SECRETARIO	LIC. JOSE FRANCISCO MONTERROSO SALINAS
VOCAL I	LIC. JORGE RODOLFO PEREZ FOLGAR
VOCAL II	LICDA. THELMA ESPERANZA ALVARADO DE GALLARDO
VOCAL III	LIC. MIGUEL ORLANDO GARZA SAGASTUME
VOCAL IV	BR. MARWIN ESTUARDO JIMENEZ BOJORQUEZ
VOCAL V	BR. SERGIO ARTURO ALMENGOR CORZO

ACTO QUE DEDICO

- A Dios:** Mi refugio y fortaleza en el camino de mi vida
- A mis Padres:** Marco Antonio López Barrios
Marina Mercedes Ruano Ayala de López
En recompensa a su amor y esfuerzo
- A mis hermanas:** Marta Julia y Ana Mercedes
Por su cariño y apoyo
- A mi sobrina:** Marina Haydeé
- A mis tíos y tías:** Especialmente a Haydeé Amparo Ruano Ayala
- A mis primos y primas:** Especialmente a José Samuel Ochoa Ruano
- A mis amigos:** En especial a Claudia Vargas, María Elena Estrada, Roberto Castillo, Carlos González, Elías Díaz y Giovanni Díaz.

TESIS QUE DEDICO

A Guatemala:

Con la esperanza de un mejor mañana para ella

A la Universidad de San Carlos de Guatemala

A la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia

A mis Catedráticos, Compañeros y Amigos

AGRADECIMIENTOS

A Licda. Olga Rebeca Torres de Matute

A Lic. Jorge Matute

Al INCAP por permitirme realizar este estudio

Al personal profesional y técnico de los Laboratorios Dr. Leonardo Mata, INCAP

A Laboratorio Especializado de Química y Bioquímica, INCAP

A Dora Inés Mazariegos, Liggia Barrios, Ingrid Cabrera

A todas las personas que de una u otra manera colaboraron en la realización de este estudio

INDICE

	# Pág
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCION	3
3. ANTECEDENTES	4
3.1 <u>Descripción General de la Bacteria</u>	4
3.2 <u>Patología y Enfermedad Clínica</u>	4
3.2.1 <u>Invasión</u>	5
3.2.2 <u>Enterotoxina</u>	6
3.2.3 <u>Citotoxina</u>	6
3.3 <u>Inmunidad del huésped</u>	6
3.4 <u>Epidemiología</u>	7
3.5 <u>Tratamiento</u>	7
3.6 <u>Cultivo y Aislamiento</u>	8
3.6.1 <u>Enriquecimiento y selectividad del medio de cultivo</u>	8
3.6.2 <u>Atmósfera de incubación</u>	9
3.6.3 <u>Temperatura de incubación</u>	9
3.7 <u>Tipificación de Campylobacter jejuni</u>	10
3.7.1 <u>Serología</u>	10
3.7.2 <u>Análisis molecular</u>	10
3.8 <u>Endonucleasas de restricción</u>	11
3.9 <u>Southern Blot, Hibridación, Ribotipia</u>	12
3.9.1 <u>Southern blot</u>	12
3.9.2 <u>Hibridación</u>	13
3.9.3 <u>Ribotipos</u>	14
3.10 <u>Métodos de Marcaje</u>	15
4. JUSTIFICACION	17
5. OBJETIVOS	18
6. HIPOTESIS	19
7. MATERIALES Y METODOS	20
8. RESULTADOS	39
9. DISCUSION DE RESULTADOS	41
10. CONCLUSIONES	43
11. RECOMENDACIONES	44
12. REFERENCIAS	45
13. ANEXOS.	50

1. RESUMEN

Las enfermedades diarreicas continúan siendo el problema de salud pública más importante en Guatemala. Su alta incidencia en poblaciones que viven bajo condiciones no privilegiadas está asociada a la gran variedad de microorganismos que pueden inducir a infección diarreica. Clásicamente, se considera los principales agentes etiológicos de gastroenteritis a *Shigella*, *Salmonella*, *Giardia*, *Entamoeba histolytica* y algunos tipos de *Escherichia coli* llamados enteropatógenos. En los últimos años se ha reconocido que otros agentes, tales como rotavirus, adenovirus, *Campylobacter*, *Cryptosporidium*, *E. coli* toxigénica y *E. coli* adherente pueden causar infección diarreica.

Dentro de la múltiple gama de enteropatógenos se encuentra *Campylobacter jejuni* que a partir de 1977, pasó a ubicarse dentro de los principales causantes de diarrea en muchas partes del mundo. En los países desarrollados, los niños y los adultos jóvenes muestran la mayor incidencia de la infección, en tanto que en los países en desarrollo la enfermedad afecta predominantemente a los niños menores de 2 años.

En el desarrollo del trabajo experimental de laboratorio se cultivaron y estudiaron setenta y cinco cepas de *Campylobacter jejuni* aisladas de los niños que participaron en el estudio y que excretaron este patógeno tres o más veces. Se verificó la pureza del cepario para seguridad de que el ADN genómico, obtenido por medio de la técnica de Pitcher-Saunders-Owen con Tiocianato de Guanidinio, proviniera de cultivo puro a partir de una colonia aislada de *C. jejuni*.

A los geles de agarosa obtenidos de la digestión de ADN de *Campylobacter jejuni* con Bgl I y Pst I se les preparaba para una transferencia del ADN digerido y separado por electroforesis a un soporte sólido.

Después de que el ADN se transfirió por capilaridad a un soporte sólido que puede ser una membrana de nitrocelulosa o de nylon (Ver Anexos 3 y 4) el ADN queda retenido en la nitrocelulosa, creándose una réplica del gel. Posteriormente el ADN se une covalentemente a la membrana, utilizando calor.

Una vez que el ADN se encuentra sobre un soporte sólido puede aplicarse una sonda marcada, la cual se hibrida con regiones homólogas. Por medio de lavados a altas temperaturas se elimina la sonda que no se ha unido, y se determina la posición en la que se ha producido una unión específica, por detección enzimática. Los residuos de digoxigenina incorporados al cADN obtenido de rARN 16S-23S por acción de transcriptasa

reversa, se detectan por un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado a fosfatasa alcalina. La fosfatasa alcalina forma un precipitado diazo azul-morado al reaccionar con el NBT y BCIP.

En el presente estudio se efectuó la comparación de 75 cepas de C. jejuni provenientes de diferentes aislamientos realizados en episodios diarreicos y no diarreicos de veinte niños de diferente familia. Los resultados indican que el aislamiento repetido de Campylobacter jejuni de un mismo niño refleja reinfección por cepas diferentes, presentando un 100% de variabilidad. Se categorizaron ocho diferentes ribotipos, de los cuales los patrones más comunes en las cepas estudiadas fueron: el ribotipo R3 presente en 19 cepas; el R2 en 15 cepas, el R4 en 15 cepas y el R1 en 9 cepas. De las 75 cepas estudiadas; 36 de ellas pertenecían a niños que habían presentado diarrea, 23 a niños que no presentaron diarrea y 16 a niños que se encontraban en período de convalecencia.

De las 36 cepas de C. jejuni que provenían de niños con diarrea, 11 de ellas presentaron en común el Ribotipo 3; mientras los niños que no presentaron diarrea presentaron el Ribotipo 2, en ocho casos de 23 cepas estudiadas. Los niños que se encontraban en período de convalecencia presentaron el Ribotipo 1 en cinco ocasiones, de 16 cepas estudiadas.

2. INTRODUCCION

La importancia que en los últimos años ha cobrado C.jejuni como agente causal de diarrea y gastroenteritis bacteriana en niños y adultos, ha sido notable en el mundo.

Estudios realizados por el Programa de Enfermedades Infecciosas que Afectan el Estado Nutricional del INCAP, tanto en áreas rurales como en áreas periurbanas de Guatemala han demostrado una alta incidencia de infección por C.jejuni.

En la colonia El Limón el 5.6% de los casos fueron asociados a diarrea por C.jejuni y el 66.6% de estos episodios diarreicos correspondieron a C. jejuni como único enteropatógeno.

En Santa Ma. de Jesús la tasa de aislamiento de niños enfermos fue superior a la de asintomáticos con 12.1% y 8.1% respectivamente. De 313 infecciones por Campylobacter jejuni resultaron con disentería 21 (7%), mientras 148 fueron asintomáticos y 144 (46%) fueron diarreicos. Diecisiete casos presentaron infección mixta con Shigella y C.jejuni. Los meses que más frecuentemente se aisló C.jejuni fueron Junio y Septiembre.

Con el objeto de determinar si las infecciones repetidas por C.jejuni en un mismo niño reflejan la persistencia del mismo microorganismo en los diferentes aislados o si el niño se re infecta con recurrencia por diferentes cepas, se tipificaron genéticamente los C.jejuni aislados de un mismo niño por digestión de ADN con enzimas de restricción seguidas de electroforesis, transferencia de Southern e hibridación con sondas de cADN sintetizado por transcriptasa reversa a partir de rARN 23S y 16S. Los resultados se evaluaron determinando diferencias entre las cepas aisladas por medio de huella digital cromosómica y de ribotipia.

3. ANTECEDENTES

3.1 Descripción General de la Bacteria

En 1963, se propuso crear el género Campylobacter para substituir a los antiguamente llamados Vibrios microaerofílicos. Las especies de Campylobacter son bacilos Gram negativo, caracterizados por su forma curva, espiral o en "S". Son microorganismos oxidasa positivo, microaerofílicos, móviles por un flagelo polar o, a veces, dos (uno por c/extremo), no fermentadores (asacarolítico), que crecen óptimamente a 37°C, pero su capacidad de crecer a 42°C facilita su aislamiento selectivo (1,2).

Las bacterias que ahora se encuentran dentro del género Campylobacter fueron por primera vez aisladas en 1909, las cuales eran consideradas como patogenicas solamente en animales (1).

Aunque las primeras infecciones humanas fueron reportadas en 1947, la importancia de Campylobacter como causa de infección intestinal, no fue ampliamente reconocida sino hasta los años 70 (1,3).

En la actualidad, Campylobacter jejuni y especies cercanamente relacionadas son una de las causas más importantes de diarrea y gastroenteritis bacteriana, tanto en países industrializados como del Tercer Mundo (1,4,5,6,7,8,9).

En diversos estudios realizados en Guatemala, Costa Rica, México, Chile y otros se ha encontrado que Campylobacter es tan o más frecuente como las infecciones por Shigella y Salmonella, especialmente en niños (4,10,11,12,13).

3.2 Patología y Enfermedad Clínica

Las infecciones por Campylobacter jejuni son en su mayoría una zoonosis, ya que el reservorio principal del microorganismo es el tracto gastrointestinal de diversas especies de animales, tales como aves, ovinos, bovinos y otros (1,3,6,12,14).

La gran mayoría de casos particularmente los brotes epidémicos, se originan por el consumo de leche cruda, carne de pollo mal cocida, agua y alimentos contaminados con heces fecales (12,14,15,16,17).

El período de incubación de enteritis por C.jejuni oscila de uno a siete días (1,3).

Aparentemente tanto el período de incubación como la gravedad del padecimiento dependen de la magnitud de la dosis infecciosa ingerida, así como de la virulencia del microorganismo y de la inmunidad específica del huésped. Se considera que la dosis mínima capaz de causar infección puede ir de 500 a 1.000,000 de células bacterianas (6,14).

Clínicamente, los signos y síntomas de una infección por C.jejuni no permiten diferenciarla de enfermedades causadas por otros patógenos (3).

En pacientes sintomáticos se excretan entre 10^6 a 10^9 organismos por gramo de heces, durante un período de dos a tres semanas. Las evacuaciones pueden ser líquidas, o de tipo exudativo con sangre y numerosos leucocitos (disentérica), pudiendo observarse desde cuadros benignos y de corta duración, hasta procesos graves y prolongados acompañados de deshidratación intensa que presentan clínicamente cuadros de pseudoapendicitis (3,14,18,19).

Con base en datos experimentales y observaciones clínicas se ha fundamentado la patogenicidad de C.jejuni en tres propiedades: invasividad, producción de enterotoxinas y citotoxicidad (20,21,22).

En pacientes con diarrea por C.jejuni se han observado dos síndromes distintos: uno es el episodio disentérico, asociado con invasividad y producción de citotoxina y el otro es la diarrea acuosa, relacionado con la acción de una enterotoxina (13,23).

3.2.1 Invasión

Numerosas cepas de C.jejuni, previa colonización del intestino invaden tempranamente el epitelio, principalmente a nivel del ileon terminal y el colon. La multiplicación del microorganismo en el epitelio origina un daño tisular parecido al que ocurre en la Shigellosis. En ocasiones hay adenitis mesentérica y proliferación de la bacteria en la lámina propia, que puede ir acompañada de bacteremia. En el último caso el proceso se asemeja al de algunas Salmonelosis (14,24).

La invasión de tejido y torrente sanguíneo han sido demostrados en varios modelos animales, y la penetración de células HeLa ha sido comprobada in vitro. Se ha evidenciado histológicamente la invasión a tejido humano por C. jejuni, sin embargo, los factores que confieren a Campylobacter el poder invasor no han sido definidos con claridad (25,26).

3.2.2 Enterotoxina

Se ha encontrado que algunas cepas de C.jejuni elaboran una toxina termolábil que posee características similares, aunque no es idéntica, a la enterotoxina del cólera y la toxina LT de E.coli (27).

La toxina tiene actividad citotónica en diversas líneas de tejido (CHO e Y-1). Se ha demostrado que la inoculación experimental del intestino con esta toxina origina la acumulación de líquidos y electrolitos en varios modelos animales. Apparentemente se trata de un activador de la adenil-ciclasa. Su acción es neutralizada por lo menos parcialmente, por la antitoxina del cólera; lo que indica una relación inmunológica (28,29).

A pesar de que no se ha logrado precisar la participación que esta toxina juega en la patogenia de la infección, se maneja la hipótesis que puede ser la responsable de la diarrea secretoria que se observa en una proporción importante en las infecciones por C.jejuni (14).

3.2.3 Citotoxina

Campylobacter jejuni también produce una toxina extracelular, cuya actividad citóxica se expresa en cultivos de células CHO, Vero y HeLa, en forma parecida a la toxina del bacilo de Shiga; aunque su actividad no es neutralizada por el suero anti-Shiga (14,29,30). Varios estudios han intentado correlacionar el perfil toxigénico de aislamientos de C.jejuni con la enfermedad clínica. Algunos investigadores han determinado que diarrea acuosa sin leucocitos fecales fue asociada con cepas productoras de enterotoxinas, mientras que la diarrea sanguinolenta está relacionada con cepas productoras de citotoxina (31).

3.3 Inmunidad del huésped

Diversos estudios epidemiológicos, así como los resultados obtenidos en re-inoculaciones experimentales realizadas en voluntarios humanos, indican que la infección previa por Campylobacter resulta en inmunidad específica que protege contra nuevas infecciones (19,32). Los aislamientos de C.jejuni, son generalmente susceptibles a la actividad bactericida presente en el suero normal, pues la sensibilidad del microorganismo a esta acción es variable, encontrándose cepas sensibles y cepas resistentes. Bacterias aisladas de sitios extraintestinales exhiben mayor resistencia que aislamientos gastrointestinales. Hipotéticamente se piensa que las cepas resistentes tienen mayor capacidad para provocar bacteremia e infección sistémica (14,33-36).

3.4 Epidemiología

Campylobacter jejuni es un importante patógeno en niños y adultos en muchas partes del mundo (37).

A pesar del uso de la terapia de rehidratación oral; la mortalidad asociada con disentería y con episodios persistentes de gastroenteritis sigue siendo alta (38,39).

La mayoría de los casos de disentería en el medio estudiado, están asociados con especies de Shigella y con Campylobacter jejuni. Es importante hacer notar que E. histolytica no es importante en este contexto (40,41).

Sin embargo, no todas las infecciones producidas por estos patógenos conducen a disentería; una proporción de los individuos infectados son asintomáticos y otros desarrollan diarrea no disintérica (42).

En países desarrollados es más frecuente observar en los pacientes deposiciones sanguinolentas, moco y leucocitos fecales; mientras en países en vía de desarrollo es más común la infección asintomática (1,43).

En lugares donde C.jejuni es endémico, las infecciones asintomáticas se deben al desarrollo de una IgA sérica específica, cuyos niveles aumentan con la edad. Además en esas áreas la seroconversión hacia antígenos de superficie celular se ha reportado tanto en brotes y estudios en voluntarios como en pacientes infectados con C.jejuni (32,44,45,46).

A pesar que toda la información que sugiere que las infecciones por C.jejuni son un problema de menor envergadura en los países en vía de desarrollo que en los países industrializados, este causa diarrea severa en niños menores de un año de edad, especialmente en aquellos que no son amamantados o que no tienen anticuerpos específicos anti-Campylobacter al momento del nacimiento (1,17,43,47,48).

Los estudios de Santa María de Jesús, comunidad rural de Guatemala y de la colonia El Limón Zona 18 de esta capital, indican que las infecciones por Campylobacter son un problema serio en nuestro medio (49,50).

3.5 Tratamiento

Como ocurre en la inmensa mayoría de las enfermedades diarréicas, el tratamiento fundamental de las infecciones causadas por C.jejuni consiste en la prevención y corrección de la deshidratación, así como el manejo adecuado de la alimentación que contrarreste las pérdidas originadas por un metabolismo acelerado,

junto a las alteraciones de la absorción intestinal propias de la infección. Por lo general, no se recomienda el uso de antibióticos, y cuando se recurre al mismo, este debería basarse en el diagnóstico bacteriológico. En consecuencia, se aconseja reservar su uso solamente para aquellos enfermos que presenten cuadros graves o prolongados (más de una semana) o del tipo disenteriforme, previa eliminación de la presencia de Shigellosis. El antibiótico de elección, es la eritromicina. En los niños se recomienda una dosis de 30 a 50 mg/kg/día, dividida en cuatro tomas, por un período de 5 a 7 días (51,52).

Es importante tener presente que casi todas las cepas de C.jejuni son resistentes a los antibióticos de uso común, tales como las ampicilinas, trimetoprim-sulfametoxazol y cefalosporinas (52).

3.6 Cultivo y Aislamiento

Hay varios factores importantes para el aislamiento de C.jejuni, los cuales se mencionan a continuación:

- Enriquecimiento y selectividad del medio de cultivo.
- Concentración de oxígeno y dióxido de carbono en la atmósfera de incubación.
- Temperatura de incubación.

3.6.1 Enriquecimiento y selectividad del medio de cultivo

Hay varios medios de cultivo que se emplean para el aislamiento primario de Campylobacter spp., entre ellos están:

- Agar Butzler-Virion
- Base de Agar Columbia
- Sangre de carnero al 7%
- Bacitracina 25 U.I/ml
- Novobiocina 5 µg/ml
- Cicloheximida 50 µg/ml
- Sulfato de Colistina 10 U/ml
- Cefazolina 15 µg/ml (53).

- Agar Skirrow
 - Base de Agar Brucella
 - Sangre lisada de caballo al 7%
 - Vancomicina 10 $\mu\text{g/ml}$
 - Sulfato de Polimixina B 2.5 U.I./ml
 - Lactato de Trimetropin 5 $\mu\text{g/ml}$ (54).
- Medio Campy-BAP
 - Base de Agar Brucella
 - Sangre de carnero al 10%
 - Vancomicina 10 $\mu\text{g/ml}$
 - Sulfato de Polimixina B 2.5 U.I./ml
 - Lactato de Trimetropin 5 $\mu\text{g/ml}$
 - Cefalotina 15 $\mu\text{g/ml}$
 - Anfotericina B 2 $\mu\text{g/ml}$ (53,55).

3.6.2 Atmósfera de incubación

Campylobacter jejuni es un organismo microaerofílico, que necesita una atmósfera de incubación que contenga una baja concentración de oxígeno del 3-5%, 10% de dióxido de carbono y el 80-90% de nitrógeno (2,12,53).

Esta atmósfera de incubación puede obtenerse mediante el empleo de varios sistemas:

- Uso de jarra y sobre generador de Gas-Pak sin catalítico (BBL)
- Uso del sistema Campy-Pak II (BBL)
- Uso del frasco de extinción con candela (53).

3.6.3 Temperatura de incubación

Campylobacter jejuni crece óptimamente a 37°C; sin embargo, la temperatura de incubación para aislamiento es de 42°C durante 24 a 48 horas, pues hace las condiciones más selectivas aún, inhibiendo en parte el resto de la microbiota entérica (2,14).

3.7 Tipificación de Campylobacter jejuni

3.7.1 Serología

Existen dos tipos de serología de C. jejuni, uno se basa en antígenos termolábiles y el otro en antígenos termoestables (56).

La serotipificación de C. jejuni y C.coli puede ser alcanzada en base a los antígenos termolábiles por la técnica de aglutinación en lámina y con hemaglutinación pasiva con lipopolisacáridos termoestables usados como antígenos (2,56).

En el caso de Campylobacter jejuni los métodos serológicos son sumamente laboriosos, no hay reactivos disponibles comercialmente y son técnicas de difícil estandarización, por lo que solo se realizan en dos o tres laboratorios en el mundo (56,57,58).

3.7.2 Análisis molecular

Durante los últimos años, la biología molecular ha alcanzado avances importantes y realmente notables. La tecnología del ADN recombinante y las técnicas moleculares novedosas, han tenido gran impacto en el entendimiento de la epidemiología y patogénesis de muchas enfermedades infecciosas.

En el análisis epidemiológico de bacterias generalmente se determina el género, especie, serotipo, pruebas bioquímicas y patrón de resistencia antibiótica. Sin embargo, estas son pruebas fenotípicas, que requieren de la expresión genética para detectar un resultado positivo. Esta expresión implica que muchos pasos de una cadena se lleven óptimamente, lo cual a menudo no sucede en los laboratorios clínicos de rutina. En muchos casos estas pruebas carecen de sensibilidad y especificidad suficiente para encontrar diferencias entre bacterias muy similares; por lo que se hace necesario la utilización de técnicas con mayor poder discriminante. Los métodos de ADN no necesitan de métodos complejos de expresión genética, y son procedimientos estándar que con muy pocas modificaciones se aplican a diversos géneros, por lo que se han implementado en los laboratorios de muchos hospitales de países desarrollados para el monitoreo de infecciones hospitalarias (12,59).

Esto nos conduce al empleo de la tecnología de análisis de ADN para detectar diferencias moleculares mínimas a nivel de ADN genómico.

La huella digital cromosómica de ADN es una técnica molecular, cuyo propósito es la tipificación y diferenciación de cepas muy parecidas de microorganismos de enorme importancia en microbiología clínica. Esta técnica se basa en la digestión del cromosoma bacteriano con endonucleasas de restricción, el cual posteriormente es separado por medios electroforéticos. Es una tarea laboriosa y de difícil aplicación en un laboratorio clínico de rutina, debido a los altos costos de material y equipo especializado así como también a la falta de personal calificado, pero común como herramienta de investigación (60,61,62).

Los fragmentos de ADN generados por la digestión con enzimas de restricción, son separados de acuerdo a su tamaño, por medio de electroforesis en geles de agarosa dejando así una serie de bandas agrupadas de forma característica para cepas similares que constituyen la "huella digital". Las técnicas electroforéticas resuelven fragmentos ordenados entre un rango de cien a veinte mil bases. La interpretación de esta prueba es difícil, por lo que recientemente se ha optado por transferir el ADN a papel o membranas de nylon e hibridarlo con sondas específicas para obtener un número menor de bandas y facilitar así la interpretación (60,63,64).

Otra alternativa es la electroforesis en campo ortogonal, que tiene mayor poder resolutivo, pero que requiere de equipo excesivamente caro.

3.8 Endonucleasas de restricción

Las desoxirribonucleasas son fosfodiesterasas que actúan sobre el ADN. Pueden dividirse en exonucleasas (con una actividad 5'-3' o bien 3'-5') y en endonucleasas, dentro de las cuales destaca una subclase muy importante constituida por las endonucleasas de restricción. Estas últimas son reactivos muy útiles en el laboratorio de moléculas de ADN.

Las endonucleasas de restricción son producidas principalmente por bacterias, y se denominan de acuerdo con la abreviatura del organismo productor, seguida de una letra que indica la cepa y de un número romano que indica el orden de descubrimiento de la enzima en dicha cepa. Por ejemplo BgIII proviene de la bacteria Bacillus globigii y fue la segunda en orden de descubrimiento. La secuencia de reconocimiento de esta enzima es:

A ↓ GATCT en donde la flecha indica el sitio de corte (65).
T CTAGA ↑

El término endonucleasa de restricción deriva originalmente de la observación de la capacidad de ciertas bacterias para bloquear la infección de determinados virus mediante la destrucción del ADN viral. Las bacterias que poseen esta capacidad se denominan anfitriones restrictivos. Cada especie de bacteria y cada cepa individual posee sus propias endonucleasas de restricción, altamente específicas (66).

Las endonucleasas de restricción pueden dividirse en dos tipos generales. Las endonucleasas de restricción tipo I catalizan tanto la metilación del ADN como el corte de un ADN no metilado en secuencias específicas. La metilación del ADN propio lo protege de hidrólisis por las endonucleasas de restricción propias; por el contrario, el ADN viral invasivo no está metilado y va ser reconocido e hidrolizado por las endonucleasas de restricción del anfitrión. Por tanto, las endonucleasas de restricción tipo I reconocen una secuencia en el ADN no metilado. Si la secuencia está metilada en una de las cadenas de la hélice, estas enzimas metilan la secuencia complementaria que descansa en la otra cadena (66).

Las endonucleasas de restricción tipo II son más simples, ya que poseen sólo actividad nucleotídica. Estas reconocen una secuencia nucleotídica, y si el ADN no está metilado lo rompen en una localización específica o en las proximidades de la secuencia reconocida. Cabe destacar que casi todas las secuencias nucleotídicas reconocidas por estas enzimas poseen un eje de simetría binario, es decir, la lectura de las secuencias en ambas direcciones es idéntica (en las hebras complementarias) o, lo que es lo mismo, son palíndromos (66).

Por convención, la actividad de la unidad de endonucleasa de restricción es usualmente definida como la cantidad de enzima requerida para digerir completamente $1\mu\text{g}$ de ADN estándar (usualmente de bacteriófago lambda). Para que los resultados del rompimiento del ADN específico sean reproducibles deben considerarse ciertos factores que conciernen a las reacciones de las enzimas de restricción como son: pureza y características físicas del substrato de ADN, reactivos usados en la reacción, ensayos de volumen y los errores asociados, tiempo y temperatura de incubación (66).

3.9 Southern Blot, Hibridación, Ribotipia

3.9.1 Southern blot : El "Southern blotting" es uno de los primeros métodos desarrollados a mediados de la década de 1970. Básicamente la técnica consiste en la transferencia del ADN digerido y separado por

electroforesis a un soporte sólido. Se desnaturaliza in situ introduciendo el gel en hidróxido sódico y después de neutralizarlo se transfiere por capilaridad a una membrana utilizando una solución alcalina, de alta concentración salina. Mediante este proceso se consigue que el ADN quede retenido en la membrana o nitrocelulosa, creándose una réplica del gel. Posteriormente el ADN se une covalentemente al filtro de nitrocelulosa, utilizando calor o radiación ultravioleta. Una vez el ADN se encuentra sobre un soporte sólido (membrana o nitrocelulosa) puede aplicarse una sonda marcada, la cual se hibrida con regiones homólogas. Por medio de lavados, se elimina la sonda que no se ha unido, y se determina la posición en la que se ha producido una unión específica detectando el marcador ya sea por autorradiografía de la membrana, en caso de marcaje con radioisótopos o luciferasa, o bien por detección enzimática en los otros casos. El patrón de hibridación se puede comparar directamente con la región del gel original (una o unas pocas bandas) en la que están las secuencias de ADN que interesan (67).

El proceso de Southern blot también permite utilizar sondas de ácidos nucleicos como herramientas de diagnóstico de muchas alteraciones genéticas, investigando con estas sondas el ADN genómico de individuos afectados y de miembros de su familia (68).

3.9.2 Hibridación: La Hibridación de ácidos nucleicos es una poderosa aplicación de la especificidad con que las moléculas de ARN y ADN forman estructuras dúplex estables. Hibridación significa apareamiento de bases complementarias; esta técnica puede usarse para identificar y determinar la localización de secuencias de ácidos nucleicos específicas dentro de grandes secuencias, como pueden ser un genoma, moléculas de ADN recombinantes o mezclas de moléculas de ARN por medio de sondas marcadas. La estabilidad del dúplex está directamente relacionada con la complementariedad de las dos cadenas de ácidos nucleicos (68).

Muchas sondas de ADN están constituidas por fragmentos de restricción que, contenidas en plásmidos recombinantes pueden ser extraídas, marcadas y usadas en procedimientos de hibridación o en Southern blots para diferenciar entre cepas de las mismas especies. Las condiciones físicas en las que se lleva a cabo la hibridación pueden modificarse (se puede alterar su rigurosidad), reducir o incrementar la probabilidad de encontrar secuencias complementarias. En las condiciones más rigurosas, que incluyen el uso de altas temperaturas y una concentración salina baja, una sonda sólo se hibridará con su complemento perfecto (2,68).

La hibridación en condiciones menos rigurosas es útil para detectar secuencias deseadas que son parcialmente semejantes, pero que no son idénticas, como puede ser el caso cuando se utiliza una sonda de ADN y un ADN blanco de diferentes especies. Se han desarrollado varias técnicas semejantes, aplicando la propiedad de hibridación de los ácidos nucleicos, buscar y aislar secuencias específicas. La mayoría de estas técnicas emplean una réplica del ADN que interesa inmovilizada en un soporte sólido, como puede ser una membrana de nylon o de nitrocelulosa (68).

3.9.2.1 Exigencias de hibridación

Es la combinación de las condiciones bajo las cuales la sonda se hibrida y su relación con la facilidad o dificultad de permitir la hibridación.

baja exigencia = condiciones que favorecen la hibridación

(10x SSC, 37°C)

alta exigencia = condiciones que permiten la hibridación pero solamente entre polinucleótidos con alto grado de complementaridad (homólogos)

(5x SSC, 50% formamida, 42°C) (69).

3.9.3 Ribotipos: Stull y colaboradores fueron los primeros en reportar la utilidad del uso del ARN ribosomal de E.coli (molécula altamente conservada) como sonda para ADN cromosómico en Southern blots para tipificar cepas bacterianas (70).

Recientemente, diferentes métodos basados en ARNr han sido propuestos para la identificación de organismos. Grimont y Grimont sugieren que los modelos de restricción de genes ARNr proveen de una amplia información para la descripción y tipificación de diferentes especies de bacterias (71).

La ribotipia ha sido el más sensible de los 10 métodos usados para la discriminación entre grupos epidemiológicamente definidos de cepas de Campylobacter (57).

Las sondas basadas en ARNr proveen un sistema versátil, aplicable a la epidemiología molecular de diversas bacterias. Los cistrones ARNr presentan marcadores genómicos valiosos, ya que se conservan en la bacteria, pero difieren entre las especies en número y localización (72,73).

La ribotipia ha probado ser útil para diferenciar cepas de Haemophilus influenzae, Pseudomonas cepacia, E. coli, Providencia stuartii, Salomonella typhi, Campylobacter jejuni y otras (70,72-77).

Al variar la(s) enzimas de restricción se puede seleccionar el sistema con mayor poder discriminante.

El patrón de banda-híbrido resultante provee un patrón único y reproducible descrito como el ribotipo o ribotipia. La ventaja de la ribotipia es que reduce en gran cantidad el número de bandas en la huella digital cromosómica y facilita así las comparaciones entre cepas muy similares (59).

3.10 Métodos de Marcaje

Tradicionalmente las sondas eran marcadas radioactivamente con ^{32}P proceso por el cual la ADNasa I es usada para romper el esqueleto de ADN mientras la ADN polimerasa I subsecuentemente repara las hebras colocando nuevas bases de nucleótidos, incluyendo CTP marcado radioactivamente, en las regiones dañadas (78).

En este método llamado "nick translation" por lo menos 1 de 4 bases de nucleótidos usadas en el proceso de reparación estaba marcada con ^{32}P de tal forma que la molécula reparada llegaba a ser radioactiva. Aunque es efectivo para marcar fragmentos largos de nucleótidos, sondas de menos de 200 bases de largo no eran marcadas eficientemente (78).

Un método más novedoso llamado "random priming" usa segmentos de hexanucleótidos al azar de ADN y ADN polimerasa I para sintetizar nuevos fragmentos de ADN de una hebra, incorporando bases radioactivas en el nuevo ADN. Este método es útil para sondas relativamente cortas (<100 nucleótidos) y sondas largas. Tanto el "nick translation" como el "random priming" usan nucleótidos etiquetados con marcas radioactivas tales como ^{32}P o digoxigenina. Ambas técnicas pueden incorporar nucleótidos marcados con enzimas no radioactivas como biotina, estreptavidina o fosfatasa alcalina, sirviendo así como alternativas a los radioisótopos (78).

El ADN también puede ser marcado con biotina, la cual después de que la reacción de hibridación se ha terminado, reacciona con conjugados enzima-avidina o enzima estreptavidina. Un problema con la biotina es que está presente naturalmente en muchos organismos incluyendo bacterias. Como resultado de esto se requieren prolongados lavados o procedimientos de desproteinización para liberar a las células de biotina

endógena antes de la aplicación de los conjugados avidina o estreptavidina. Las sondas de oligonucleótidos por otra parte, pueden ser marcados con polinucleótidoquinasa y varios sustratos o enzimas tales como la fosfatasa alcalina pueden ser conjugados directamente a sondas vía brazos de enlace, o bien por medio de incorporación de dig-d-11-UTP en un proceso de amplificación genética por medio de la reacción de polimerasa en cadena, o de acción de la transcriptasa reversa al convertir ARN en cADN (64,80). Los insumos para esta tecnología se encuentran disponibles comercialmente y funcionan en forma muy efectiva y reproducible (64,80).

4. JUSTIFICACION

Las enfermedades diarreicas son uno de los principales problemas de salud en Guatemala. El presente trabajo contribuirá al conocimiento de la epidemiología de C. jejuni. Partiendo del conocimiento aquí generado, pueden proponerse intervenciones educativas para reducir la alta tasa de infección por C. jejuni en niños del área rural de Guatemala.

5. OBJETIVOS

GENERAL

Determinar si las infecciones repetidas por C. jejuni, en un mismo niño, reflejan la persistencia de una cepa en particular o si se deben a reinfecciones por diferentes cepas.

ESPECIFICOS

Determinar los ribotipos de C. jejuni asociados con diarrea y con cepas de C. jejuni no patógena aislados en el estudio de diarrea persistente en la comunidad de Santa María de Jesús.

Implementar y Estandarizar las técnicas de huella digital cromosómica y ribotipia para el análisis de la epidemiología de C. jejuni en nuestro país.

6. HIPOTESIS

Los niños que excretan C. jejuni en repetidas ocasiones, sufren de reinfecciones por diferentes cepas de esta bacteria.

7. MATERIALES Y METODOS

7.1 Universo de trabajo:

Este trabajo se realizó utilizando 75 cepas de C. jejuni, aisladas de niños con y sin diarrea en la comunidad de Santa María de Jesús en el estudio longitudinal de diarrea persistente realizado por el INCAP entre 1987 y 1989, bajo la dirección del Dr. José R. Cruz (50).

Las cepas recolectadas fueron aisladas e identificadas por el personal de los laboratorios Dr. Leonardo Mata del INCAP, éstas fueron guardadas en stocks en leche descremada a -70°C para el estudio genético posterior.

7.2 Recursos

7.2.1 Humanos

- Br. José Víctor López Ruano (tesista)
- Licda. Olga Rebeca Torres de Matute (asesora)
- Dr. José R. Cruz (coordinador del programa de enfermedades infecciosas del INCAP)
- Personal del Programa de Nutrición e Infección del INCAP.

7.2.2 Institucionales

Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP)

División de Nutrición e Infección, Laboratorios Dr. Leonardo Mata.

7.2.3 Físicos

7.2.3.1 Materiales

7.2.3.1.1 Materiales de laboratorio

- cajas de Petrí 100x15mm
- asas bacteriológicas no calibradas
- pipetas serológicas
- micropipetas automáticas
- puntas para micropipetas (tips)
- hisopos

- bolsas plásticas
- gradillas de metal
- servilletas de papel
- papel parafinado
- papel aluminio
- parafilm
- tubos plásticos 13x100
- tubos Eppendorf
- agitador magnético
- papel filtro
- papel para Cromatografía Whatman 3MM
- membranas de nylon MSI Magnagraph #NJ 4 HY 320F5
- guantes de látex
- papel plástico

7.2.3.1.2 Cristalería

- beakers de 25, 100, 250, 500 ml
- erlenmeyer de 250, 500, 1000, 2000 ml
- balones aforados de 10, 50, 100, 250, 500, 1000 ml
- probetas de 10, 50, 100, 500, 1000 ml
- embudos
- viales
- vidrios cuadrados de diferentes tamaños
- pipetas pasteur
- tubos de ensayo 13x100 con tapón de rosca

7.2.3.1.3

Equipo

- autoclave (Castle Steam Sterilizer)
- campana bacteriológica
- horno (Willco) y horno microondas
- balanza (AND FX 3200)
- incubadora (Thelco 32M) a 37°C y 42°C
- vortex (Super-Mixer Cat. No. 1997310)
- refrigeradora
- congeladores (Pro-Scientific) a -70°C y -20°C
- centrífuga refrigerada (Sorvall Super Speed RC-2)
- microcentrífuga 5415C
- rotador automático (Eberbach Corporation)
- baño maría con agitación a 37°C y 65°C (Blue M Electric Company)
- cámara para electroforesis horizontal (Hoefer Scientific)
- fuente de poder para la electroforesis (Hoefer Scientific)
- bomba de vacío (Fisher Scientific)
- unidad de extracción de sangre y desfibrinización
- pipetores (Hot Line #24587 Drumont pipet-aid)
- sellador de bolsas plásticas (Dazey micro-seal)
- transiluminador (Fotodyne)/cámara fotográfica polaroid

7.2.3.1.4

Medios de cultivo

- agar columbia base (sangre de carnero al 7%)
- suplemento de antibióticos para el aislamiento selectivo de C. jejuni Oxoid SR 085E Lote 88936

7.2.3.1.5 Reactivos

Electroforesis de ADN.

- Agarosa de alta pureza (FMC Bioproducts, Rockland, Marine) 0.7-1.0% en buffer TBE 1x
- Buffer TBE 10x (Tris-boratos-EDTA)
- EDTA 0.5 M pH 8
- Buffer TE 10 mM-Hcl pH 8, 1mM EDTA pH 8
- Buffer Tris-Hcl 1M pH 8
- Buffer TAE (Tris-acetato-EDTA)
- Bromuro de etidio (Sigma) Stock: 10 mg/ml
- Dodecil sulfato de sodio 10% (SDS)

Purificación de ADN por medio de diálisis por centrifugación.

- Sefarosa CL6B: LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden, Cat. No.17-0160-01
- Perlas de vidrio silanizadas: (200-300 μ m) Baxter, MacGraw Park, IL. Cat.No. #3640

Extracción de ADN con tiocianato de guanidinio.

- Reactivo GES Stock: tiocianato de guanidinio 5M, EDTA 100 mM, 0.5% sarkosyl
- Agua destilada estéril y agua para HPLC
- EDTA 0.5 M pH 8
- Sarkosyl al 10%
- Acetato de amonio 7.5 M
- Cloroformo/2-pentanol
- Isopropanol
- EtOH al 70%

Digestión de ADN con enzimas de restricción.

- Agarosa de alta pureza
- Bromuro de etidio (Sigma)
- Enzimas de restricción Bgl I, Bgl II, Pst I

- Buffer de reacción No. 3 (BRL)
- Marcadores de peso molecular ADN escalera 1KB (Gibco BRL, Gaithersburg, Md) y/o ADN lambda (BRL)

Southern blotting.

- HCl 1 M
- Agua desmineralizada estéril
- NaOH 0.5 M
- NaCl 1.5 M
- Tris-Hcl 0.5 M
- Buffer 20X SSC sol. stock
- Buffer 2X SSC
- Buffer 6X SSC
- Bromuro de etidio

Marcación de ARN con digoxigenina. Transcripción reversa de rARN en cADN.

- Cebos 10x: Vial 5, kit Genius 1 (Labelling & Detection) de Boehringer Mannheim, No.de Catálogo 1093657
- Buffer de reacción 5x: Vial de buffer 10x para AMV-RT de Promega, No. de Catálogo M5151
- rARN: ARN ribosomal 16S y 23S de E. coli. Boehringer Mannheim No. de Catálogo 206938
- dNTPs 10x: Vial 6, kit Genius 1 (Labelling & Detection) de Boehringer Mannheim No. de Catálogo 1093657
- Transcriptasa reversa: (AMV-RT) de Promega No. de Catálogo M5151, almacenada a -70 °C.
- LiCl 4M: Merck No. de Catálogo 5679 (80).

El resto son los reactivos grado biología molecular usados rutinariamente.

Marcación de ADN de escalera y lambda con digoxigenina. Priming al azar

- Standar de escalera: BRL No. de catálogo 5615 SA/SB, a -70 °C
- Lambda: ADN sin cortar, Sigma No. de catálogo D 9768, alicuotado a -70 °C

- Cebos 10x: Vial 5 kit Genius 1 (Labelling & Detection) de Boehringer Mannheim, No. de catálogo 1093657
- dNTPs 10x: Vial 6, kit Genius 1 (Labelling & Detection) de Boehringer Mannheim No. de catálogo 1093657
- Enzima Klenow: Vial 7, kit Genius 1 (Labelling & Detection) de Boehringer Mannheim No. de catálogo 1093657
- LiCl: Merck No. de catálogo 5679 (64).

Cómo estimar el rendimiento del ADN marcado con digoxigenina.

- Solución de NBT (Vial 9 Kit Genius 1)
(Nitro Azul de tetrazolio)
- Solución de BCIP (x-fosfato) (Vial 10 Kit Genius 1)
(5-bromo 4-Cloro Indoil-fosfato)
- ADN control marcado (Vial 4 kit Genius 1)
- Buffer de dilución del ADN (Vial 3 kit Genius 1)
- Anti-DIG-fosfatasa alcalina (Vial 8 kit Genius 1)
- Reactivo de bloqueo (Vial 11 kit Genius 1)
- Buffer Genius 1
- Buffer Genius 2
- Buffer Genius 3 (80).

Prehibridación, Hibridación y Lavados.

- Solución de hibridación: 5x SSC, 1.0% reactivo de bloqueo, 0.1% sarkosyl, 0.02% SDS
- Solución de lavado "A": 2x SSC, 0.1% SDS
- Solución de lavado "B": 0.1% SSC, 0.1% SDS
- Buffer #1: Tris-Hcl 100mM, pH 7.5; NaCl 150 mM
- Reactivo de bloqueo: Vial #11 en el kit Genius 1 de marcación y detección de ADN, Boehringer Mannheim No. de catálogo 1093657

- Buffer #2: agregue 1.0 de reactivo de bloqueo a 200 ml de buffer 1
- Buffer #3: Tris-Hcl 100 mM, pH 9.5; NaCl 100 mM, MgCl₂ 50mM
- NBT (75 mg/ml): Vial 4 en Genius 3 Boehringer Mannheim No. de catálogo 1175 041.
- BCIP (50 mg/ml): Vial 5 en Genius 3 Boehringer Mannheim No. de catálogo 1175 041. (64).

7.3 Procedimientos

7.3.1 Aislamiento e identificación de Campylobacter jejuni.

A partir de las muestras tomadas durante el episodio de diarrea o c/dos semanas si el niño estaba sano, se inoculó un medio de transporte de Cary-Blair el cual permaneció en refrigeración hasta llegar a los laboratorios centrales del INCAP.

Allí se inoculó en medios de cultivos apropiados, incluyendo un medio de Butzler-Virion el cual se colocó en jarra anaeróbica con sobre gas-pak sin catalizador y se incubó a 42°C por 48 horas. Las colonias típicas de C. jejuni se observaron planas, mucoides, pequeñas, color blanco-grisáceo, no hemolíticas que tienden a seguir la línea de inoculación. Su identificación se realizó por medio de una coloración de Gram, oxidasa, catalasa, pruebas bioquímicas, reducción de nitratos, sensibilidad al ác. nalidíxico, resistencia a la cefalotina y otras pruebas (53). (ver Anexo # 1).

7.3.2 Confirmación de pureza y recuperación de cultivos stock.

Después del aislamiento e identificación de la cepa de Campylobacter, ésta se preservó por inoculación del cultivo puro en stocks conteniendo leche descremada y posterior congelación a -70°C.

Para trabajar de nuevo con estas cepas mantenidas en congelación, se sacó un grupo de viales donde se encontraban las cepas y se tomaba una asada de cada uno de ellos con el asa hirviendo para subcultivarlo en el medio selectivo a 37°C por 48 hrs. Se debe tener el cuidado de devolver los viales rápidamente a los congeladores, ya que los cambios bruscos de temperatura pueden matar a la bacteria.

A continuación se describen las técnicas que se utilizaron en todo el desarrollo del trabajo experimental.

7.3.3 Extracción de ADN de Campylobacter jejuni con Tiocianato de Guanidinio.

Se usó crecimiento de C. jejuni de 1/2 caja de Petri pequeña (100X15mm)

- Se recolectó crecimiento con un hisopo estéril
- Se resuspendió las células en 100 ul de buffer TE.
- Se agregó 0.5 ml de reactivo GES, mezclar con Vortex.
- Se incubó a 37°C x 10-15 o hasta que la lisis sea completa.
- Se enfrió el lisado en hielo x 5.
- Se agregó 0.5 ml de acetato de amonio 7.5 M frío y mezclar.
- Se incubó en hielo x 10
- Se agregó 0.5 ml de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1).
- Se mezcló cuidadosamente.
- Se centrifugó a 19,000 g x 10 min
- Se transfirió la fase líquida a tubos Eppendorf y medir vol exacto
- Se precipitó el ADN con 0.54 volúmenes de Isopropanol frío.
- Se invirtió x 1 min para mezclar.
- Se precipitó x centrifugación a 6,500 g x 20 segundos.
- Se lavó los botones 5 x con EtOH al 70% (13,000 x 4 min c/u)

Notas:

1. Se usaron guantes para pesar el tiocianato de Guanidinio y para preparar y manipular el GES.
2. Se preparó 50 ml de sarkosyl (Sigma) al 10% y esterilizó por autoclave.
3. En el paso 12, se midió exactamente el volumen de sobrenadante conteniendo el ADN, se multiplicó por 0.54 y se obtenía el volumen de isopropanol que debía usarse (81).

7.3.4 Chequeo de la calidad del ADN por el método de minigel.

- Se preparó un gel de agarosa con al 0.7%, en buffer TBE 1x con 2 peines, para tener una fila de pozos al inicio y otra al medio.
- Luego que se solidificó la agarosa, se cortó por la mitad para tener 2 geles de chequeo de ADN.
- Se inoculó 10 μ l de muestra + 10 μ l de buffer de carga en el pozo correspondiente.
- Se dejó correr con buffer TBE 1x, por espacio de 2 horas a 40 miliamperios; se colocó el gel con bromuro de etidio para verificar la calidad de c/muestra de ADN antes de realizarse la restricción con endonucleasas (69).

7.3.5 Purificación de ADN por medio de diálisis por centrifugación.

- Se hizo un agujero en el fondo de un tubo de centrifuga (Eppendorf) de 1.5 ml con una aguja No. 25 ó 26. Se cortó la tapadera del tubo con una tijera.
- Se agregó 25 μ l de perlas de vidrio de 200-300 μ m, silanizadas (como no se puede medir en las puntas de las pipetas automáticas, usando una pipeta Pasteur y calculando el volumen).
- Se agregó 10 veces el volumen de ADN a purificar de resina CL6B (60% CL6B en TE), hasta un máximo de 1ml. Si solo necesita correr un gel con el ADN, use 50 μ l de ADN y 500 μ l de resina.
- Se colocó una columna en un segundo tubo de microcentrifuga y se centrifugó en rotor de columpio, hasta que la columna estaba seca pero no "excesivamente seca". Se usó 1200-1300 rpm durante 3 minutos o 70% del máximo durante 2 minutos en una centrifuga clínica.
- Se transfirió la columna a un tubo nuevo y se agregó la muestra de ADN.
- Se centrifugó de nuevo en las mismas condiciones el volumen que eluye de la columna debe ser el mismo que se agregó al inicio (64). (Ver Anexo #2)

7.3.6 Digestión de ADN con enzimas de restricción.

- Se cortó el ADN con la enzima deseada (Bgl II, ó Bgl I y Pst I) en el buffer apropiado; a la temperatura óptima, siguiendo las instrucciones del fabricante de la enzima. Ejemplo: a un

ependorf estéril agregue 14 μ l de agua, 3 μ l de ADN, 1 μ L de Bgl II, 2 μ L de buffer de reacción No. 3 (BRL). Incube a 37°C en baño de Ma. por un mínimo de 2 horas. Agregue más enzima y prolongue la incubación si no corta completamente en este período. La tabla siguiente contiene ejemplos de los volúmenes que nosotros usamos más frecuentemente:

μ L de ADN	μ L de enzima	μ L Buffer 10x	μ L H2O LP	Volumen final μ L
10	1	2	7	20
15	1	2	2	20
20	1	3	6	30
25	1	3	1	30
30	1	4	5	40

- Electroforesis de muestras: se preparó agarosa al 0.7% en 1x TBE. Usando la unidad de electroforesis horizontal coloque un peine de 15 pozos y 2mm de grosor. Instale la fuente de poder para correr a 20V y permita que la electroforesis continúe hasta que el frente de color azul alcanza 2/3 del largo del gel (\approx 20h).
- Verifique que el ADN se haya migrado y separado bien y fotografíe. Use tiempo de 30 segundos, exposición F5.6 para film Polaroid tipo 667 (ASA 3000) (69).

7.3.7 Electroforesis de ADN.

7.3.7.1 Gel de agarosa.

Se preparó un gel de agarosa al 0.7% de la sig. manera:

- Se pesó 0.7g de agarosa (ó 1.05g para 150 ml de gel)
- Se agregó 10 ml de buffer TBE 10X (estéril, en refrigeración y para geles de 150 ml, use 15 ml de TBE 10X).

- Se completó el volumen a 100 ml con agua desmineralizada (6 150, según requiera).
- Se hirvió hasta que se disolvieron todos los cristales de agarosa (3 minutos en high en el horno de microondas son suficientes).
- Se dejó enfriar a 55 °C.
- Se agregó 10µl de bromuro de etidio con guantes.
- Se vertió en el molde con el/los peine(s) apropiado(s), evitando formar burbujas.
- Se dejó solidificar 30' y se colocó a 4 °C durante otros 30' en una superficie plana.

7.3.7.2 Inoculación de Muestras.

- Se agregó 900 ml de buffer TBE 1X al tanque horizontal.
- Se mezcló 10 µl de muestra con 10 µl de buffer de carga sobre un pedazo de parafilm.
- Se inoculó en el pozo correspondiente sin formar burbujas.
- Se incluyó std sin cortar en el pozo inicial del gel.
- Se tapó el tanque cuidando que el polo negativo (negro) esté cerca de las muestras y el polo positivo (rojo) en el extremo opuesto.
- Se corrió a 20 µamps si se trata de ADN genómico y si el gel es de chequeo correr a 40 µamps.

7.3.7.3 Revelado del gel.

- Se para la fuente de poder cuando el frente azul llega a una pulgada del final del gel.
- Utilizando guantes y con cuidado de no botar el gel, se sacó y llevó al cuarto oscuro, con la máscara protectora contra luz U.V. puesta, se colocó el gel sobre el transiluminador (fotodyne), se observó el gel y si el resultado era satisfactorio, se tomó una fotografía Polaroid.

7.3.7.4 Fotografías de ADN.

- Se colocó la cámara con el adaptador sobre el gel.
Asegúrese que tenga rollo. (un número sale del extremo derecho, que indica el No. de foto del rollo inserto).
- La apertura debe ser de 5.6 y el tiempo de un segundo. Si queda muy negro, use 8 de apertura por ½ segundo.

- Se oprime el botón verde hasta que escuche "click".
- Se sacó la fotografía horizontalmente, a los 45 segundos se levantó la cubierta protectora (69).

7.3.8 Blots de Southern.

7.3.8.1 Preparación del gel para blot de southern.

- Se depurinó el ADN, introduciéndolo en 250 ml de HCl 0.25M durante 5-10 min.
- Se lavó el gel 2-3 veces con agua (5 segundos por lavado).
- Se trató el gel con 250ml de NaOH 0.5M, NaCl 1.5M durante 30 minutos para desnaturalizar el ADN.
- Se descartó la solución desnaturalizante, sin lavar el gel.
- Se neutralizó con Tris-HCl 0.5M, NaCl 1.5M durante 30 minutos.

7.3.8.2 Procimiento para Southern blotting.

- Se cortaron 4 pedazos de papel Whatman 3mm con el tamaño y forma del gel. Se cortó un pedazo de papel filtro un poco más ancho que el gel y del largo de la bandeja donde se va a poner el blot
- Se mojó la membrana de nylon en 2xSSC durante 15 minutos.
- Se llenó el fondo de la bandeja con 20XSSC y se mojó el papel filtro en esta solución.
- Se colocó el papel filtro sobre el soporte. Se agregó suficiente 20x SSC para asegurarse que los extremos del papel filtro estaban sumergidos. Se invirtió el gel y se colocó sobre el papel filtro. Con una pipeta, se eliminaron las burbujas.
- Se colocó la membrana sobre el gel, marcando el extremo derecho superior del lado opuesto de la membrana. Se sacaron las burbujas con una pipeta.
- Se mojó cada pedazo de papel Whatman 3mm en 2x SSC y se colocó sobre la membrana. Se sacaron las burbujas después de cada pieza.
- Se envolvieron las orillas del sandwich de gel y membrana papel plástico. Se cortó y eliminó el papel plástico sobre el papel 3MM y se colocó luego una pila de toallas de papel sobre el sandwich. Se colocó un vidrio como soporte sobre las toallas de papel, un peso sobre éste (un frasco de un litro de buffer) (400-1000g). Se dejó que la transferencia ocurriera durante la noche.

- Después de la transferencia nocturna, se removió la membrana del gel, lavándola en 6X SSC. Se sacó completamente (0.5-1 hora).
- Después de que la membrana se secó al aire, se horneó a 80°C durante 30 minutos, para fijar el ADN a la membrana.
- Se colocó la membrana en una bolsa y se almacenó a 4°C en la oscuridad, hasta que se hibridizó.
- Se tiñó el gel con bromuro de etidio para asegurarse que la transferencia fue completa (69). (Ver Anexos # 3 y 4).

7.3.9 **Marcación de ARN con digoxigenina. Transcripción reversa de rARN en cADN.**

NOTA: Se usaron guantes estériles mientras se manipuló el ARN.

Todas las cantidades y soluciones están calculadas para filtros de 400 cm².

ESTE PROCEDIMIENTO SINTETIZA SUFICIENTE SONDA PARA HIBRIDAR DOS FILTROS DE 400 CM². Los filtros desarrollados tuvieron 250 cm²

- A un eppendorf estéril se agregó:
 - 2μL de primers 10x (Vial 5 -hexanucleotide- de Genius 1 a -20°C), 4μL de buffer de reacción 5x (Buffer 5x para AMV-transcriptasa reversa a -20°C, verificar la concentración de cada lote nuevo, porque varían), 0.25μL rARN (a 4°C, Boehringer Mannheim), 12.75 μL de agua desionizada estéril. Se mezcló durante tres segundos en la microcentrífuga.
- Se calentó a 68°C durante 5 min, luego se enfrió **lentamente** a temperatura ambiente.
- Se agregaron: 2μL de dNTPs 10x (Vial 6 de Genius 1 a -20°C), 3.0 μL de transcriptasa reversa (AMV-RT a -20°C), se mezclaron centrifugando tres segundos. Se necesitaban 20-30 U de AMV-RT por sonda, se calculó el volumen dependiendo de la concentración de la enzima.
- Se incubó a 42°C por una hora.
- Se precipitó la sonda agregando 2μL de LiCl y 50μL de etanol frío al 95% (-20°C). Se mezcló por agitación en el fondo del tubo.

- Se centrifugó a 13,000 RPM durante 15 minutos. Se removió el sobrenadante. Se lavó el botón con 100 μ L de etanol al 70%. Se centrifugó durante 4 minutos. Se removió el sobrenadante.
- Se secó durante 15 minutos al vacío.
- Se resuspendió el botón en 20 μ L de TE. El botón puede ser difícil de disolver. En ese caso se agregó SDS al 0.1% al TE e incubó hasta por 30 minutos a 37°C. Se congeló a -20°C.
- Antes de usar la sonda: hiérvala durante 10 minutos y luego enfríe en hielo durante 5-10 minutos. Se transfirió la sonda a 10 mL de solución de hibridación.
- Se agregó la solución de hibridación conteniendo la sonda a la bolsa con el filtro pre-hibridado.

La sonda se reusó hasta cinco veces, descongelándola a temperatura ambiente o 37°C, seguido de ebullición durante 10 minutos y enfriamiento brusco, en hielo durante 5-10 minutos.

Instrucciones especiales: Los reactivos deben sacarse del congelador inmediatamente antes de usar, colocarse en una hielera con hielo picado y usar rápidamente en forma aséptica. Únicamente use tips nuevos, estériles, nunca re-introduzca un tip usado a un vial. Estos reactivos son **sumamente caros**, no deben arriesgarse por ahorrar un tip, sólo use tips nuevos, **nunca los deje fuera del congelador**, guárdelos inmediatamente después de usarlos (64).

7.3.10 Marcación de Estándares de ADN en escalera y lambda con digoxigenina. Priming al azar.

Para poder incluir estándares de peso molecular apropiado, detectables por el conjugado anti-digoxigenina-fosfatasa alcalina, estos deben marcarse.

- A un eppendorf estéril se agregó:
 - 1 μ l de escalera de 1KB
 - 1 μ l de Lambda
 - 1 μ l de agua destilada desionizada estéril
- Se hirvió durante 10 minutos y enfrielo en hielo durante 5 minutos.
- Se agregaron: 2 μ l de primers 10x, 2 μ l de dNTPs, 1 μ l de enzima Klenow (mezcle en la microcentrífuga 3 seg).

- Se incubó a 37°C durante un mínimo de 60 minutos.
- Se paró la reacción agregando 2µl EDTA 0.2M a pH 8.0
- Se precipitó el ADN marcado con 2µl de LiCl 4M y 60 µl de etanol frío (- 20°C).
Mezclando golpeando el fondo del tubo. La muestra se mantuvo a -70°C por un mínimo de 30 minutos, o a -20°C durante 2 hrs.
- Se centrifugó durante 5 minutos a 13,000 rpm.
Se removió el sobrenadante durante 4 min. a 13,000 rpm. Se descartó el sobrenadante. Se secó al vacío durante 15 min. y se disolvió en 50 µl de TE a pH 8.0
- Se transfirió 10µl de la suspensión ADN-TE a un tubo conteniendo 10 ml de solución de hibridación y sonda de ARNr (64,80).

7.3.11 Cómo estimar el rendimiento del ADN marcado con digoxigenina.

Los kits Genius 1, 2 y 3 contienen ADN control marcado, que puede usarse en un ensayo directo para estimar el rendimiento de ADN marcado con DIG. Se recomienda que el rendimiento de ADN marcado con DIG de cada reacción de primers al azar se estime de acuerdo con el procedimiento siguiente.

Este proceso confirma que la reacción de marcación fue exitosa y que produjo suficiente muestra para aplicaciones subsiguientes y familiariza al usuario con la metodología básica de detección del sistema Genius.

Procedimiento:

- Se mezcló 45 µL de NBT y 35 µL de BCIP en 10 mL de buffer Genius 3). **Este substrato de color debe prepararse fresco y usarse en el último paso. Proteja de la luz directa, guardándolo en una gaveta antes de usarlo.**
- Se hicieron diluciones seriadas del ADN marcado control en buffer de dilución de ADN.

ADN marcado Control	ADN/Buffer	Concentración	Dilución
Concentración Inicial	Dilución	Total	Final
5 ng/ μ L	1 μ L/4 μ L	1 ng/ μ L (A)	1:5
1 ng/ μ L (dilución A)	1 μ L/9 μ L	100 pg/ μ L (B)	1:50
100 pg/ μ L (dilución B)	1 μ L/9 μ L	10 pg/ μ L (C)	1:500
10 pg/ μ L (dilución C)	1 μ L/9 μ L	1 pg/ μ L (D)	1:5,000
1 pg/ μ L (dilución D)	1 μ L/9 μ L	0.1 pg/ μ L (E)	1:50,000

Las diluciones A-E pueden guardarse a -20°C por un mínimo de un año.

- Se colocó 1 μ L de las diluciones B-E en una membrana nylon cargada positivamente, marcando la membrana débilmente con un lápiz para identificar cada dilución.
- Se hicieron diluciones seriadas de la sonda recién marcada (de concentración inicial desconocida) en buffer de dilución de ADN de acuerdo a la tabla del paso dos, hasta llegar a una dilución de 1:50,000.
- Se colocó 1 μ L de cada una de las diluciones preparadas en el inciso 4 sobre la misma membrana de nylon, marcando débilmente con un lápiz para identificar cada dilución.
- Se fijaron los ADNs a la membrana horneando durante 30 minutos a +80°C.
- Se humedeció la membrana con una pequeña cantidad de buffer 1.
- Se incubó la membrana en buffer 2 por 5 minutos a temperatura ambiente.
- Se diluyó el conjugado digoxina-fosfatasa alcalina 1:5,000 en buffer 2.
- Se incubó la membrana en el anticuerpo diluido durante 5 minutos a temperatura ambiente.
El anticuerpo diluido debe cubrir toda la membrana.
- Se lavó la membrana 2x, 5 min/lavado, en buffer 1 a temperatura ambiente.

- Se incubó la membrana en buffer 3 durante 2 minutos. La aplicación de este buffer "activa" la fosfatasa alcalina conjugada al anticuerpo.
- Se removió el buffer 3 y se agregó el sustrato de color, permitiendo que el color se desarrollara en la oscuridad durante 30-60 minutos, monitoreando ocasionalmente.
- Se comparó la intensidad de las manchas del control y de las diluciones de la sonda para estimar la concentración de la sonda preparada (64,80). El cuadro siguiente permite realizar dicha comparación:

pmol	.25	.025	.0025	.00025
ADN control	●	●	●	●
Sonda				
Experimental	●	●	●	●
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}

7.3.12 Prehibridación, Hibridación y Lavados.

7.3.12.1 Prehibridación.

Los volúmenes están calculados para 250cm². Ajuste conforme se cambie el tamaño de la membrana.

Se preparó la solución de hibridación y se colocó en baño de María con agitación hasta que el reactivo de bloqueo se disolvió. Esto toma por lo menos una hora. Después de que el reactivo de bloqueo se ha disuelto se agregó 50 mL de solución de hibridación a una bolsa conteniendo el filtro (si trabaja con dos filtros colóquelos "espalda con espalda", de manera que el lado que contiene el ADN mire hacia afuera. Permita que se prehibridice en baño de María a 68°C, con agitación por lo menos durante una hora.

La solución de hibridación puede prepararse con anticipación y almacenarse congelada hasta que se necesite.

7.3.12.2 Hibridación.

- Se removió la solución de pre-hibridación de la bolsa. Se hizo rodar una pipeta sobre la bolsa para remover cualquier solución remanente.
- Se agregó 10 mL de solución de hibridación conteniendo la sonda marcada a la bolsa. La solución de hibridación conteniendo la sonda **debe desnaturalizarse (hervir durante 10 minutos) y enfriarse en hielo (durante 5 minutos) antes de ser agregada a la bolsa.**
- Se sacaron las burbujas rodando una pipeta y se selló la bolsa con calor. Se Verificó que estuviera bien sellada y se incubó a 68°C en baño de Ma. durante la noche con agitación.

7.3.12.3 Lavados.

NOTA: Se usaron guantes todo el tiempo

Se prepararon las soluciones de lavado A y B con un día de anticipación y se dejaron disolver a 37°C durante la noche.

- Se cortó una esquina de la bolsa, y se removió la sonda. Se guardó la sonda en un tubo plástico estéril y almacene a -20°C (puede usarse 5 veces).
- Se vertieron 60 mL de solución de lavado A en la bolsa, desagüe y descarte.
- Se cortaron los lados de la bolsa y se sacó el filtro.
- Se transfirió el filtro a una bandeja limpia, destinada exclusivamente para lavados. Se colocó el filtro con la "cara" hacia arriba, (el lado del ADN hacia arriba). Se lavó con 300 mL de solución de lavado A, 5 min. a temperatura ambiente con agitación. Se repitió una vez más.
- Se lavó el filtro con 300 mL de solución de lavado B, 15 minutos a 68°C en un baño de agua con agitación. Se repitió una vez más.
- Se transfirió el filtro a una bandeja pequeña, (si hay más de uno debe hacerse individualmente).

TODOS LOS LAVADOS SUBSIGUIENTES SE EFECTUAN A TEMPERATURA AMBIENTE CON AGITACION LEVE:

- Se agregaron 60 mL de buffer # 1, se lavó brevemente durante un minuto.
- Se incubó el filtro durante 30 minutos en 125 mL de buffer # 2.
- Se preparó el conjugado agregando 10 μ L de conjugado de antidigoxigenina a 50 mL de buffer # 1. Se incubaron los filtros durante 30 minutos.
- Se lavó con 60 mL de buffer # 1 por 15 min. Se repitió una vez más.
- Se equilibraron los filtros durante dos minutos con 50 mL de buffer # 3. (**Prepararlo inmediatamente antes de usar**).
- Se preparó la sol. de color en el buffer # 3. Se agregaron 180 μ L de NBT y 140 μ L de BCIP a 40 mL de buffer # 3.
- Se transfirió el filtro a una bolsa limpia de hibridación. Se agregaron 40 mL de solución de color. Se sacaron las burbujas, selló la bolsa. Se incubó en la obscuridad a temperatura ambiente sin agitación.
- Se paró el desarrollo de la reacción de de color lavando el filtro en 60 mL de TE durante 5 minutos. Se lavaron en bandejas individuales. Se almacenaron en bolsas ziplock pequeñas para mantener el filtro húmedo, en caso de que se necesite re-sondear (64,80). (Ver Anexo # 5).

7.4 **Diseño Experimental.**

7.4.1 Diseño del Estudio

El estudio fue prospectivo con una duración de 2 años.

7.4.2 Población

Se estudiaron veinte niños entre 0 - 36 meses, que excretaron C. jejuni en 3-5 ocasiones, con o sin diarrea.

7.4.3 Análisis de Resultados

Se realizó un análisis de tipo descriptivo, determinando si las diferentes cepas aisladas de un mismo niño son iguales o no, por medio del análisis del patrón de ribotipia. Se estableció un porcentaje de persistencia y uno de recurrencia.

8. RESULTADOS

Se llevó a cabo la comparación de setenta y cinco cepas de Campylobacter jejuni provenientes de los diferentes aislamientos realizados en episodios diarreicos y no diarreicos de veinte niños. Se determinó que las infecciones por Campylobacter jejuni en un mismo niño, reflejaron reinfecciones por diferentes cepas, presentando un 100% de variabilidad, ya que los ribotipos obtenidos de las cepas aisladas de un mismo niño, fueron diferentes para cada una de ellas (ver Tabla # 1). Es importante hacer notar que algunos niños presentaron infecciones mixtas por otros microorganismos como Shigella, Salmonella y otros.

Se categorizaron ocho diferentes ribotipos. (Ver Anexo 6). Los pesos moleculares de las bandas de cada uno de ellos aparecen a continuación:

R1= 3 bandas (PM bp): 12.1, 11.1, 2.2

R2= 4 bandas (PM bp): 11.5, 10.3, 6.2, 2.3

R3= 5 bandas (PM bp): 16.0, 15.4, 12.7, 10.1, 3.6

R4= 6 bandas (PM bp): 12.0, 11.1, 10.1, 8.2, 6.2, 2.2

R5= 7 bandas (PM bp): 15.1, 14.0, 12.2, 11.0, 10.0, 2.7, 2.4

R6= 8 bandas (PM bp): 12.2, 11.1, 10.1, 9.1, 8.0, 6.2, 5.2, 2.6

R7= 9 bandas (PM bp): 15.1, 15.3, 12.1, 11.5, 11.0, 10.1, 9.1, 6.3, 2.4

R8= 10 bandas (PM bp): 15.1, 12.3, 10.2, 8.0, 8.4, 6.2, 5.3, 4.4, 4.2, 2.5

Los patrones más comunes de las 75 cepas estudiadas fueron: el ribotipo R3 presente en 19 cepas; el R2 en 15 cepas, el R4 en 15 cepas y el R1 en 9 cepas del total de cepas trabajadas.

De las setenta y cinco cepas estudiadas, treinta y seis de ellas pertenecían a niños que habían presentado diarrea al momento de la toma de muestra; veintitrés a niños que no presentaban diarrea y dieciséis a niños que se encontraban en período de convalecencia.

De las treinta y seis cepas de C. jejuni que provenían de niños con diarrea, once de ellas presentaron el Ribotipo 3 (5 bandas); mientras los niños que no presentaban diarrea presentaron el Ribotipo 2 (4 bandas), en ocho casos de veintitrés cepas estudiadas. Los niños que se encontraban en período de

convalecencia después de haber sufrido episodios diarreicos presentaron el Ribotipo 1 (3 bandas) en cinco ocasiones, de dieciseis cepas estudiadas que pertenecían a este período.

Este trabajo fue realizado como un complemento del estudio longitudinal de Diarrea Persistente en la comunidad de Santa María de Jesús realizado por el INCAP entre 1987 a 1989 bajo la dirección del Dr. José Ramiro Cruz en el Programa de Nutrición e Infección del INCAP.

Durante dos años se le dió seguimiento a la población en estudio, mantenida bajo vigilancia epidemiológica por personal de campo que visitaba los hogares de los niños del estudio dos veces por semana. Durante estas visitas se tomaban datos sobre diarrea, otras enfermedades, hábitos alimenticios e ingesta de medicamentos. Al detectar un caso de diarrea, se anotaba la fecha del episodio y se tomaban muestras fecales para cultivo bacteriano, investigación parasitológica y virológica.

9. DISCUSION DE RESULTADOS

La gran variabilidad de las cepas de Campylobacter jejuni en los niños estudiados corroboró la hipótesis planteada que las reinfecciones por Campylobacter jejuni son causadas por diferentes cepas de esta bacteria en un mismo niño.

Existió cierta tendencia entre algunas cepas aisladas de niños con diarrea, sin diarrea y en período de convalecencia, a presentar un determinado ribotipo; el cual pudieramos asociarlo a cepas patógenas o no. Ya que el R3 se presentaba en once cepas de niños con diarrea, el R2 en ocho cepas de niños sin diarrea y el R1 se encontró en cinco cepas de niños en convalecencia. Los análisis estadísticos realizados por medio de tablas de 2x2 y determinación de X^2 usando Epi Info, no demostraron asociación estadísticamente significativa en ninguno de los casos. Sin embargo esto puede deberse al número relativamente pequeño de niños que excretaron C. jejuni en repetidas ocasiones. A pesar de que el estudio prospectivo incluyó a 179 niños, únicamente 20 excretaron 3 o más veces C. jejuni. Los análisis estadísticos se complementaron con el uso del programa stat-Xact, pero aún así no se encontró asociación estadísticamente significativa. Se les realizó serología solamente a 25 cepas de C. jejuni, las cuales fueron enviadas al Dr. H. Lior en el laboratorio del Centro de Control de Enfermedades Tunney's Pasteure Ottawa, Ontario en Canadá, para su análisis serológico.

De las 25 cepas analizadas serológicamente que correspondían específicamente a C. jejuni presentaron los serogrupos siguientes: #36 (6 cepas), #45 (4), #22 (2), #11 (2), #79 (1), #23 (1), #19 (1), #2 (1). En la actualidad existen más de 100 serogrupos de Campylobacter, por lo que existe una gran variedad de cepas. Hubiera sido interesante comparar la serología de las cepas de C. jejuni estudiadas con los diferentes ribotipos obtenidos para determinar si existía correlación entre ambos.

En Guatemala no se cuenta con métodos serológicos para C. jejuni ya que son sumamente laboriosos y de difícil estandarización, además que no hay reactivos disponibles comercialmente. Solamente existen dos o tres laboratorios en el mundo que se encargan de realizar serología a cepas de Campylobacter, uno de ellos es el anteriormente mencionado.

En muchos casos las pruebas convencionales para tipificación de bacterias carecen de sensibilidad y especificidad suficientes, para encontrar diferencias entre bacterias muy similares. Por lo que se hace necesario la utilización de técnicas sofisticadas para el análisis de ADN de bacterias para detectar diferencias sutiles entre aislados bacterianos.

Debido al ambiente tan fecalizado, la extrema pobreza, la falta de agua potable, drenajes y otras necesidades básicas de la población de Santa María de Jesús, propician la propagación de múltiples enfermedades especialmente intestinales, por diferentes microorganismos.

Durante visitas realizadas a la comunidad, se pudo comprobar que animales domésticos como perros, gatos, aves, equinos, porcinos y otros convivían con los residentes de las viviendas, los cuales depositaban sus excretas dentro de las mismas, generando así una poderosa fuente de infección de Campylobacter jejuni, ya que el reservorio principal del microorganismo es el tracto gastrointestinal de los animales anteriormente mencionados.

10. CONCLUSIONES

- 10.1 El patrón de ribotipos fue diferente en las cepas aisladas de un mismo niño, reflejando reinfecciones por diferentes cepas de esta bacteria.
- 10.2 Se establecieron ocho diferentes ribotipos categorizados por PM y No. de bandas quedando así: R1= 3 bandas, R2= 4 bandas, R3= 5 bandas, R4= 6 bandas, R5= 7 bandas, R6= 8 bandas, R7= 9 bandas y R8= 10 bandas.
- 10.3 Los patrones más comunes en las setenta y cinco cepas estudiadas, fueron 19 cepas con el ribotipo R3, 15 cepas con el R2, 15 cepas con el R4, y 9 cepas con el R1.
- 10.4 El patrón de ribotipos R3 fue el más común en los niños que presentaron diarrea, 11 de ellos (30.55%) se encontraron presentes en 36 cepas estudiadas de este tipo.
- 10.5 El patrón de ribotipos R2 fue el más común en niños que no presentaron diarrea, 8 de ellos (34.78%) se encontraron presentes en 23 cepas estudiadas de este tipo.
- 10.6 El patrón de ribotipos R1 fue el más común en niños que se encontraban en período de convalecencia, 5 de ellos (31.25%) se encontraron presentes en 16 cepas estudiadas de este tipo.
- 10.7 La ribotipia reduce en gran cantidad el número de bandas que en la huella digital cromosómica se presentaron para su diferenciación.
- 10.8 La ribotipia provee una huella única y facilita considerablemente las comparaciones entre cepas muy similares.

11. RECOMENDACIONES

- 11.1 Cuando se realiza el procedimiento de extracción de ADN según la técnica de Pitcher-Saunders-Owen, si no precipita el ADN después de agregado el etanol absoluto, deje refrigerado a 4°C durante toda la noche y revise al día siguiente si el ADN se encuentra en el fondo del tubo.
- 11.2 Verificar el rendimiento del ADN marcado con digoxigenina siempre que se prepare sonda nueva, para determinar si el ensayo es sensible.
- 11.3 La utilización de guantes todo el tiempo durante el desarrollo de técnicas en las que se manipule ADN.
- 11.4 Implementar medidas higiénicas a nivel de la comunidad de Santa María de Jesús.
- 11.5 Investigar los Ribotipos R1, R2, R3 en un número mayor de niños con o sin diarrea, que excretan Campylobacter jejuni.

12. REFERENCIAS

1. Cover TL, Blaser MJ. The pathobiology of Campylobacter in humans. *Ann Rev Med.* 1989; 40:269-285
2. Balows A. et al. *Manual of Clinical Microbiology.* 5ed. Washington D.C.: American Society for Microbiology, 1991. X + 1317 p. (p.402-409)
3. Mandal BK, De Mol P, Butzler JP. Clinical aspects of Campylobacter infections in humans. p.22-30 (In Butzler JP. Campylobacter infection in man and animals. Boca Raton CRC Press Inc, 1984. XVII + 227 p.)
4. Tauxe RV, et al. Illnes asociated with Campylobacter laridis, a newly recognized Campylobacter species. *J Clin Microbiology.* 1985; 21:222
5. Mata LJ, Fernández K, and Urrutia JJ. Infección del intestino por bacterias enteropatógenas en niños de una aldea de Guatemala, durante los tres primeros años de vida. *Rev Lat Am Microbiol Parasitol.* 1970; 11:102-109
6. Torregosa L, et al. Enfermedades diarréicas del niño; Diarrea por Campylobacter. 9ed. México: Ediciones Médicas del Hospital infantil Federico Gómez, 1988. p.201-206
7. Svedhem A, Kaijser B. Campylobacter fetus subspecies jejuni: A common cause of diarrhea in Sweden. *J Infect Dis.* 1980; 142:353
8. Blaser MJ, et al. Isolation of Campylobacter fetus subsp jejuni from Bangladesh children. *J Clin Microbiol.* 1980; 142:744
9. Pazzaglia G, et al. Campylobacter jejuni versus Campylobacter coli in developing countries: How accurate are prevalence estimates? *J Infect Dis.* 1990; 162:570
10. Prado V, et al. Infección intestinal por Campylobacter jejuni en lactantes chilenos. *Rev Med Chile* 1985; 113:521-527
11. Olarte J, Pérez GI. Campylobacter jejuni in children with diarrhea in México city. *Pediatric Infect Dis.* 1983; 2:18
12. Maggi L, et al. Campylobacter jejuni y Campylobacter coli: Marcadores epidemiológicos en cepas aisladas en Santiago. *Rev Med Chile* 1988; 116:1105-1110
13. Mata L, Simhou A, Padilla R. Diarrhea associated rotaviruses, enterotoxigenic E. coli, Campylobacter and other agents in Costa Rica children. *Am J Trop Med Hyg.* 1976-1981; 32:146-153
14. Walker RI, et al. Pathophysiology of Campylobacter enteritis. *Microbiol Reviews.* 1986; 50:81
15. Korlath JA, et al. A point-source outbreak of Campylobacteriosis associated with consumption of raw milk. *J Infect Dis.* 1985; 152:592-596
16. Metzling LD. Water outbreaks of Campylobacter enteritis in Central Sweden: *Lancet* 1981; 2:352-359
17. Blaser MJ, Taylor ON, Feldman RA. Epidemiology of Campylobacter jejuni infections. *Epidemiol Rev.* 1983; 5:157-163
18. Blaser MJ, Reller LB. Campylobacter enteritis. *N Engl J of Med.* 1981; 305:1444-52

19. Glass RL, *et al.* Epidemiologic and clinical features of endemic Campylobacter jejuni infection in Bangladesh. *J Infect Dis.* 1983; 148:292
20. Tenover FC, *et al.* Use of auxotyping for epidemiological studies of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli infections. *Infect Immun.* 1985; 48:384-391
21. Johnson WM, Lior H. Toxins produced by Campylobacter jejuni and Campylobacter coli. *Lancet* 1984; 1:239-243
22. Ruiz Palacios GM, Escamilla E, Torres N. Experimental Campylobacter diarrhea in chickens. *Infect Immun.* 1981; 34:250-255
23. Yeen WO, Puthucheany SD, Pang T. Demonstration of a cytotoxin from Campylobacter jejuni. *J Clin Pathol.* 1983; 36:1237-1242
24. Blaser MJ, Parson RB, Wang WL. Acute colitis caused by Campylobacter fetus ss jejuni. *Gastroenterology* 1980; 78:448
25. Mannihen KI, Prescott FF, Dohoo IR. Pathogenicity of Campylobacter jejuni isolates from animals and humans. *Infect Immun.* 1982; 38:46-52
26. Price AB, *et al.* Detection of Campylobacter by immunofluorescence in stools and rectal biopsies of patients with diarrhea. *J Clin Pathol.* 1984; 37:1007-1013
27. Ruiz Palacios GM, *et al.* Cholera-like enterotoxin, produced by Campylobacter jejuni. Characterization and clinical significance. *Lancet* 1983; 2:250
28. Klipstein FA, Engert RF. Properties of Crude Campylobacter jejuni heat-labile enterotoxin. *Infect Immun.* 1984; 45:314-319
29. Johnson WM, Lior H. Cytotoxic and Cytotonic factors produced Campylobacter jejuni, C. coli and C. lariidis. *J Clin Microbiol.* 1986; 24:275
30. Guerrant RL, *et al.* Production of a unique cytotoxin by Campylobacter jejuni. *Infect Immun.* 1987; 25:26-30
31. Klipstein FA, *et al.* Pathogenic properties of Campylobacter jejuni: assay and correlation with clinical manifestations. *Infect Immun.* 1985; 50:43-49
32. Blaser MJ, Black RE, Duncan DJ. Campylobacter jejuni-specific antibodies are elevated in healthy Bangladesh in children. *J Clin Microbiol.* 1985; 21:164
33. Blaser MJ, Smith PF, Kohler PF. Susceptibility of Campylobacter isolates in the bacterial activity of human serum. *J Infect Dis.* 1985; 151:227
34. Pérez-Pérez GI, Blaser MJ. Lipopolysaccharide characteristic of pathogenic Campylobacters. *Infect Immun.* 1985; 47:353
35. Pennie RA, *et al.* Susceptibility of Campylobacter jejuni to strain-specific bactericidal activity in serum of infected patients. *Infect Immun.* 1985; 52:702-706

36. Blaser MJ, *et al.* Extraintestinal Campylobacter jejuni and Campylobacter coli infections: host factors and strain characteristics. *J Infect Dis.* 1986; 153: 552-559
37. Feachem R, Koblinsky M. Interventions for the control of diarrheal diseases among young children: promotion of breastfeeding. *Bull WHO.* 1984; 62:271-91
38. Bhandari N, *et al.* Mortality associated with acute watery, dysentery and persistent diarrhea in rural North India. *Acta Paediatr.* 1992; Suppl 381:3-6
39. Victora CG, *et al.* Deaths due to dysentery, acute and persistent diarrhea among Brazilian infants. *Acta Paediatr.* 1992; Suppl 381:7-11
40. Kensch GT, Bennish ML. Shigellosis: recent progress, persisting problems and research issues. *Pediatr Infect Dis J.* 1989; 8:713-9
41. Guerrant RL, Bobak DA. Bacterial and protozoal gastroenteritis. *N Engl J Med.* 1991; 325:327-40
42. Cohen D, *et al.* Immunglobulin M, A, and G antibody response to lipopolysaccharide O antigen in symptomatic and asymptomatic Shigella infections. *J Clin Microbiol.* 1989; 27:162-7
43. Taylor D, *et al.* Influence of strain characteristics and immunity on the epidemiology of C.jejuni infections in Thailand. *J Clin Microbiol.* 1988; 26:863-68
44. Pérez-Pérez G, *et al.* Clinical and immunologic significance of Cholera-like toxin and cytotoxin production by Campylobacter species in patients with acute inflammatory diarrhea in USA. *J Inf Dis.* 1989; 160:460-68
45. Blaser M, Sazie E, Williams L. The influence of immunity on raw-milk associated Campylobacter infections. *J Am Med Assoc.* 1987; 257:43-46
46. Black R, *et al.* Experimental Campylobacter jejuni infections in humans. *J Infect Dis.* 1988; 157:472-79
47. Butzler J. Campylobacter infection in Man and animals. 2ed. USA. Boca Raton CRC Press Inc., 1984. XVII + 227p. (p.25-58)
48. Figueroa G, *et al.* Prospective study of Campylobacter jejuni infections in Chilean infants. *J Clin Microbiol.* 1989; 27:1040-1044
49. Cruz JR, *et al.* Etiología de diarrea aguda en infantes en áreas marginales de Guatemala. INCAP, Doc. Tec. E-1199, 1992. 53p. (p.48-49)
50. Cruz JR, *et al.* Epidemiology of persistent diarrhea among Guatemalan rural children. *Acta Paediatr. Suppl.* 1992; 381:22-6
51. Salazar-Lindo E, *et al.* Early treatment with erythromycin of C. jejuni associated dysentery in children. *J Pediatric.* 1986; 109:355
52. Fekety R. Recent advances in management of bacterial diarrhea. *Rev Infect Dis.* 1983; 5:246
53. Lennette EH, *et al.* Manual of Clinical Microbiology. 4ed. Washington D.C.: American Society for Microbiology, 1985. XIII + 110p. (p.302-308)

54. Bolton FJ, Hutchinson DN, Coates D. Blood-tree selective medium for isolation of Campylobacter jejuni from feces. J Clin Microbiol. 1984; 19:169-171
55. Martin WT, et al. Selective enrichment broth medium for isolation of C. jejuni. J Clin Microbiol. 1983; 17:853-855
56. Lior H, et al. Serotyping of Campylobacter jejuni by slide agglutination based on heat-labile antigenic factors. J Clin Microbiol. 1982; 15: 761-768
57. Patton CM, Wachsmuth IK, Enius GM. Evaluation of 10 methods to distinguish epidemic-associated Campylobacter strains. J Clin Microbiol. 1991; 29:680-688
58. Bradbury WC, et al. Investigation of Campylobacter jejuni outbreak by serotyping and chromosomal restriction endonuclease analysis. J Clin Microbiol. 1984; 19:342-346
59. Wachsmuth K. Molecular Epidemiology of Bacterial Infections. Examples of Methodology and of Investigations of Outbreaks. Rev Infect Dis. 1986; 8:682-692
60. Owen RJ. Chromosomal DNA fingerprinting -a new method of species and strain identification applicable to microbial pathogens. J Med Microbiol. 1989; 30:89-99
61. Owen RJ, Costas ON, Dawson C. Application of different Chromosomal DNA Restriction Fingerprints to Specific and Subspecific Identification of Campylobacter isolates. J Clin Microbiol. 1989; 27:2338-2343
62. McGeer A, et al. Use of Molecular typing to study the Epidemiology of Serratia marcescens. J Clin Microbiol. 1990; 28:55-58
63. Andrews AT. Electrophoresis; theory, techniques and biochemical and clinical applications. 2ed. Inglaterra: Oxford Clarendon Press, 1986. XIII + 440
64. Popovic TB, et al. Rypotyping in Molecular Epidemiology. p.1-22 (In Persing D. Diagnostic Molecular Microbiology. American Society for Microbiology. Washington, D.C. 1993. II + 22p.)
65. Freifelder D. Molecular Biology. 2ed. California, E.E.U.U.: Jones and Bartlett Publishers, Inc. 1987. 834p. (p.126-129)
66. Ray WV, Grossman M. Methods in Enzimology. London: Academic Press Inc., Vol.100 1983.
67. Southern, EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J Mol Biol. 1975; 98:503-517
68. Rawn. Bioquímica. España: McGraw Hill-Interamericana, Vols.2, Vol.2, 1989. XXXIII + 1107p.
69. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 2ed. Part E5-7. Cold Spring Harbor Laboratory. New York, 1989
70. Stull TL, LiPuma JJ, and Edlind TD. A broad spectrum probe for molecular epidemiology of bacteria: ribosomal RNA. J Infect Dis 1988; 157:280-286
71. Grimont F, Grimont PA. Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. Ann Inst Pasteur/Microbiol. 1986; 137B, 165-175

72. Kielhbauch JA, et al. Restriction fragment length polymorphisms in the Ribosomal Genes for species identification and subtyping of Aerotolerant Campylobacter species. J Clin Microbiol. 1991; 29:1670-1676
73. Moureau P, et al. Campylobacter species identification based on polymorphism of DNA encoding rRNA. J Clin Microbiol. 1989; 27:1514-1517
74. Owen RJ, et al. Detection of genomic variation in Providencia stuartii clinical isolates by analysis of DNA restriction fragment length polymorphisms containing rRNA cistrons. J Clin Microbiol. 26:2161:2166
75. Altwegg M, Hickman Brenner FW, and Farmer JJ. Ribosomal RNA gene restriction patterns provide increased sensitivity for typing Salmonella typhi strains. J Infect Dis. 1989; 160:145-149
76. Hernández J, Owen RJ, Fayos A. Biotypes and DNA ribopatterns of thermophilic Campylobacters from faeces and sea water in eastern Spain. J Clin Microbiol. 1991; 13:207-211
77. Wachsmuth IK, et al. The use of plasmid profiles and nucleic acid probes in epidemiologic investigations of food-borne diarrheal diseases. International J Food Microbiol. 1991; 12:77-90
78. Rigby PW, et al. Labelling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase. J Mol Biol. 1977; 113:237-251
79. Jablonski E, et al. Preparation of oligodeoxynucleotide-alkaline phosphatase conjugates and their use as hybridization probes. Nucleic Acids Res. 1986; 14:6115-6128
80. Boehringer Mannheim Biochemicals. The Genius System user's guide for filter hybridization, version 2.0. USA, 1992; p.64-65.
81. Pitcher DG, Saunders NA, Owen RJ. Rapid extraction of bacterial genomic DNA w/guanidinium thiocyanate. Lett Appl Microbiol. 1989; 8:151-156

13. ANEXOS.

TABLA No. 1
RESULTADOS DE LAS COMPARACIONES DE CEPAS DE LOS NIÑOS ESTUDIADOS.

IDENTIFICACION			# MUESTRA	RIBOTIPOS	OBSERVACIONES
# FAMILIA	# NIÑO	# AISLAM.			
1	1	1	70-0187	R7	Diarrea. <u>C. jejuni</u> + otro patógeno
		2	70-1213	R1	Convaleciente. <u>C. jejuni</u> + otro patógeno
		3	70-2654	R5	Diarrea. <u>C. jejuni</u> + otro patógeno
		4	70-5004	R2	No diarrea. <u>C. jejuni</u>
50	2	1	70-3048	R2	No diarrea. <u>C. jejuni</u>
		2	70-3918	R6	No diarrea. <u>C. jejuni</u>
		3	70-4390	R3	No diarrea. <u>C. jejuni</u>
		4	70-5191	R4	No diarrea. <u>C. jejuni</u>
105	3	1	70-3033	R3	Diarrea. <u>C. jejuni</u>
		2	70-4014	R2	Diarrea. <u>C. jejuni</u>
		3	70-4566	R1	Diarrea. <u>C. jejuni</u>
		4	70-4674	R4	Convaleciente. <u>C. jejuni</u>
153	4	1	70-0635	R3	Diarrea. <u>C. jejuni</u>
		2	70-0700	R4	Diarrea. <u>C. jejuni</u> + otro patógeno
298	5	1	70-4606	R2	Diarrea. <u>C. jejuni</u> + otro patógeno
		2	70-4861	R1	Convaleciente. <u>C. jejuni</u>
		3	70-4937	R3	Diarrea. <u>C. jejuni</u> + otro patógeno
		4	70-5121	R5	No diarrea. <u>C. jejuni</u>
415	6	1	70-3953	R5	Convaleciente. <u>C. jejuni</u>
		2	70-4449	R2	Convaleciente. <u>C. jejuni</u>
		3	70-4703	R3	No diarrea. <u>C. jejuni</u>
		4	70-5125	R4	No diarrea. <u>C. jejuni</u> + otro patógeno

IDENTIFICACION			# MUESTRA	RIBOTIPOS	OBSERVACIONES
# FAMILIA	# NIÑO	# AISLAM.			
472	7	1	70-3888	R6	Diarrea. <u>C. jejuni</u>
		2	70-4191	R2	No diarrea. <u>C. jejuni</u> + otro patógeno
		3	70-5186	R3	No diarrea. <u>C. jejuni</u>
		4	70-5276	R4	No diarrea. <u>C. jejuni</u>
498	8	1	70-0527	R3	Diarrea. <u>C. jejuni</u> + otro patógeno
		2	70-2585	R1	Convaleciente. <u>C. jejuni</u> + otro patógeno
		3	70-2706	R4	Diarrea. <u>C. jejuni</u> + otro patógeno
		4	70-4294	R2	No diarrea. <u>C. jejuni</u>
571	9	1	70-1470	R3	Diarrea. <u>C. jejuni</u>
		2	70-0269	R4	Diarrea. <u>C. jejuni</u> + otro patógeno
		3	70-1160	R2	No diarrea. <u>C. jejuni</u> + otro patógeno
		4	70-4237	R1	No diarrea. <u>C. jejuni</u> + otro patógeno
582	10	1	70-0530	R2	Diarrea. <u>C. jejuni</u> + otro patógeno
		2	70-1183	R4	No diarrea. <u>C. jejuni</u> + otro patógeno
		3	70-0025	R3	Diarrea. <u>C. jejuni</u> + otro patógeno
		4	70-3904	R1	No diarrea. <u>C. jejuni</u>
624	11	1	70-0028	R1	Convaleciente. <u>C. jejuni</u> + otro patógeno
		2	70-0198	R2	Diarrea. <u>C. jejuni</u>
		3	70-1016	R3	Diarrea. <u>C. jejuni</u> + otro patógeno

IDENTIFICACION			# MUESTRA	RIBOTIPOS	OBSERVACIONES
# FAMILIA	# NIÑO	# AISLAM.			
725	12	1	70-0240	R3	Convaleciente. <u>C. jejuni</u> + otro patógeno
		2	70-0659	R1	Diarrea. <u>C. jejuni</u>
		3	70-1091	R4	No diarrea. <u>C. jejuni</u> + otro patógeno
		4	70-5221	R2	No diarrea. <u>C. jejuni</u>
790	13	1	70-2003	R3	Convaleciente. <u>C. jejuni</u> + otro patógeno
		2	70-2290	R2	Diarrea. <u>C. jejuni</u>
837	14	1	70-0526	R2	Convaleciente. <u>C. jejuni</u> + otro patógeno
		2	70-0713	R6	Convaleciente. <u>C. jejuni</u> + otro patógeno
		3	70-2506	R3	Diarrea. <u>C. jejuni</u> + otro patógeno
955	15	1	70-0276	R5	Convaleciente. <u>C. jejuni</u> + otro patógeno
		2	70-3668	R3	Diarrea. <u>C. jejuni</u> + otro patógeno
		3	70-2602	R2	No diarrea. <u>C. jejuni</u> + otro patógeno
		4	70-3851	R4	Diarrea. <u>C. jejuni</u>
1016	16	1	70-2013	R2	Diarrea. <u>C. jejuni</u> + otro patógeno
		2	70-2339	R4	Diarrea. <u>C. jejuni</u> + otro patógeno
		3	70-2475	R5	Diarrea. <u>C. jejuni</u>
		4	70-2680	R3	Convaleciente. <u>C. jejuni</u>
1618	17	1	70-4124	R2	Diarrea. <u>C. jejuni</u>
		2	70-4310	R5	Diarrea. <u>C. jejuni</u>
		3	70-4620	R4	Diarrea. <u>C. jejuni</u>
		4	70-4707	R3	Diarrea. <u>C. jejuni</u>

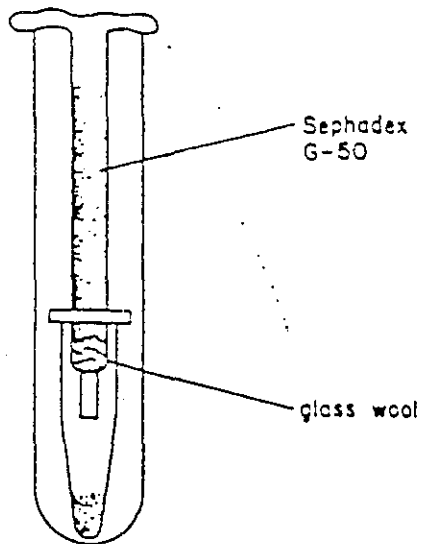
IDENTIFICACION			# MUESTRA	RIBOTIPOS	OBSERVACIONES
# FAMILIA	# NIÑO	# AISLAM.			
1659	18	1	70-1319	R7	No Diarrea. <u>C. jejuni</u>
		2	70-3629	R4	Diarrea. <u>C. jejuni</u>
		3	70-3751	R8	Diarrea. <u>C. jejuni</u>
		4	70-4513	R3	Convaleciente. <u>C. jejuni</u>
1672	19	1	70-3339	R4	Diarrea. <u>C. jejuni</u> + otro patógeno
		2	70-3518	R1	Convaleciente. <u>C. jejuni</u> + otro patógeno
		3	70-3829	R5	Diarrea. <u>C. jejuni</u>
		4	70-4059	R3	No diarrea. <u>C. jejuni</u>
		5	70-4950	R2	No diarrea. <u>C. jejuni</u>
1675	20	1	70-3817	R2	Diarrea. <u>C. jejuni</u>
		2	70-4583	R4	Convaleciente. <u>C. jejuni</u> + otro patógeno
		3	70-4697	R3	Diarrea. <u>C. jejuni</u>
		4	70-4989	R5	No diarrea. <u>C. jejuni</u>

ANEXO # 1
 RESULTADO DE LAS PRUEBAS CONFIRMATORIAS UTILIZADAS
 EN LA IDENTIFICACION DE CAMPYLOBACTER

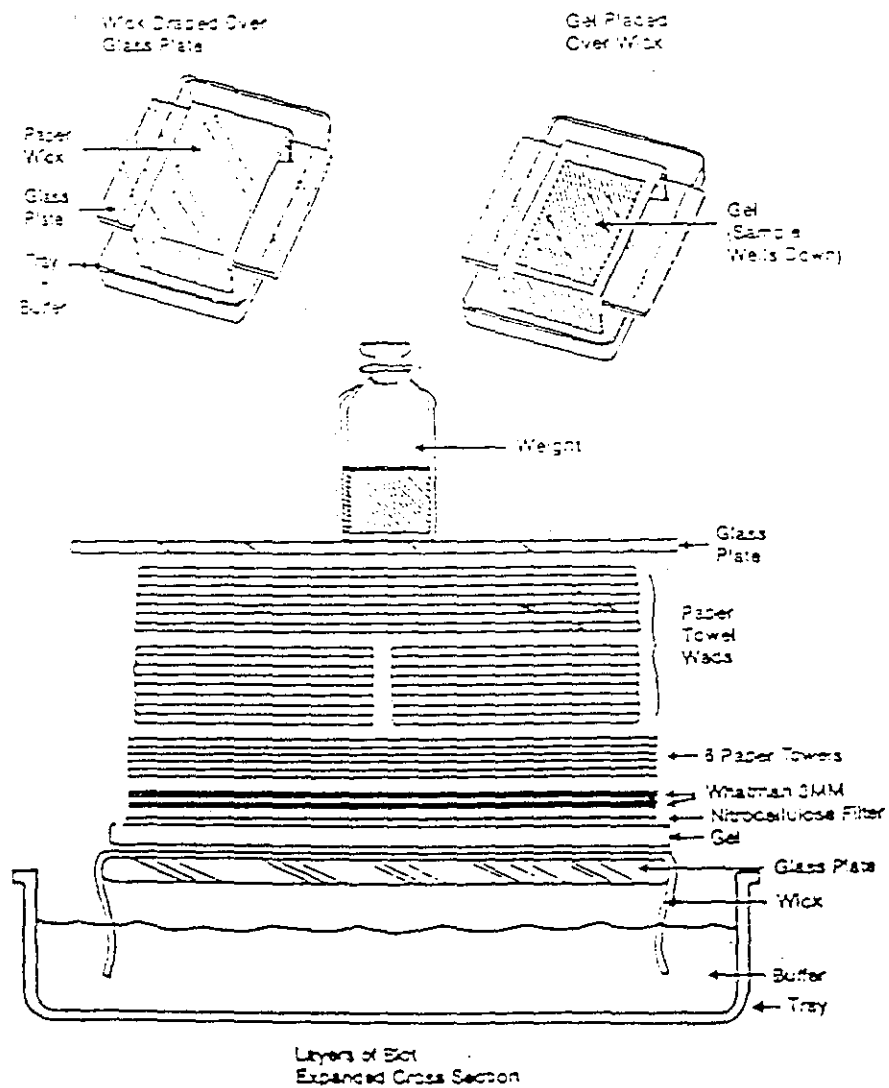
Prueba	Resultado
Oxidasa	+
Catalasa	+
Movilidad	+
Reducción de nitratos	+
Sensibilidad al ácido nalidíxico (discos de 30 µg)	S
Sensibilidad a la cefalotina (discos de 30 µg)	S
H ₂ S en medio conteniendo hierro	R
H ₂ S en tiras de acetato de plomo	-
Crecimiento en:	+
glicina al 1%	+
NaCl al 3.5%	+
bilis al 1%	-
Crecimiento a:	+
25 °C	-
37 °C	-
42 °C	+
	+

+ = reacción positiva
 - = reacción negativa
 S = sensible
 R = resistente

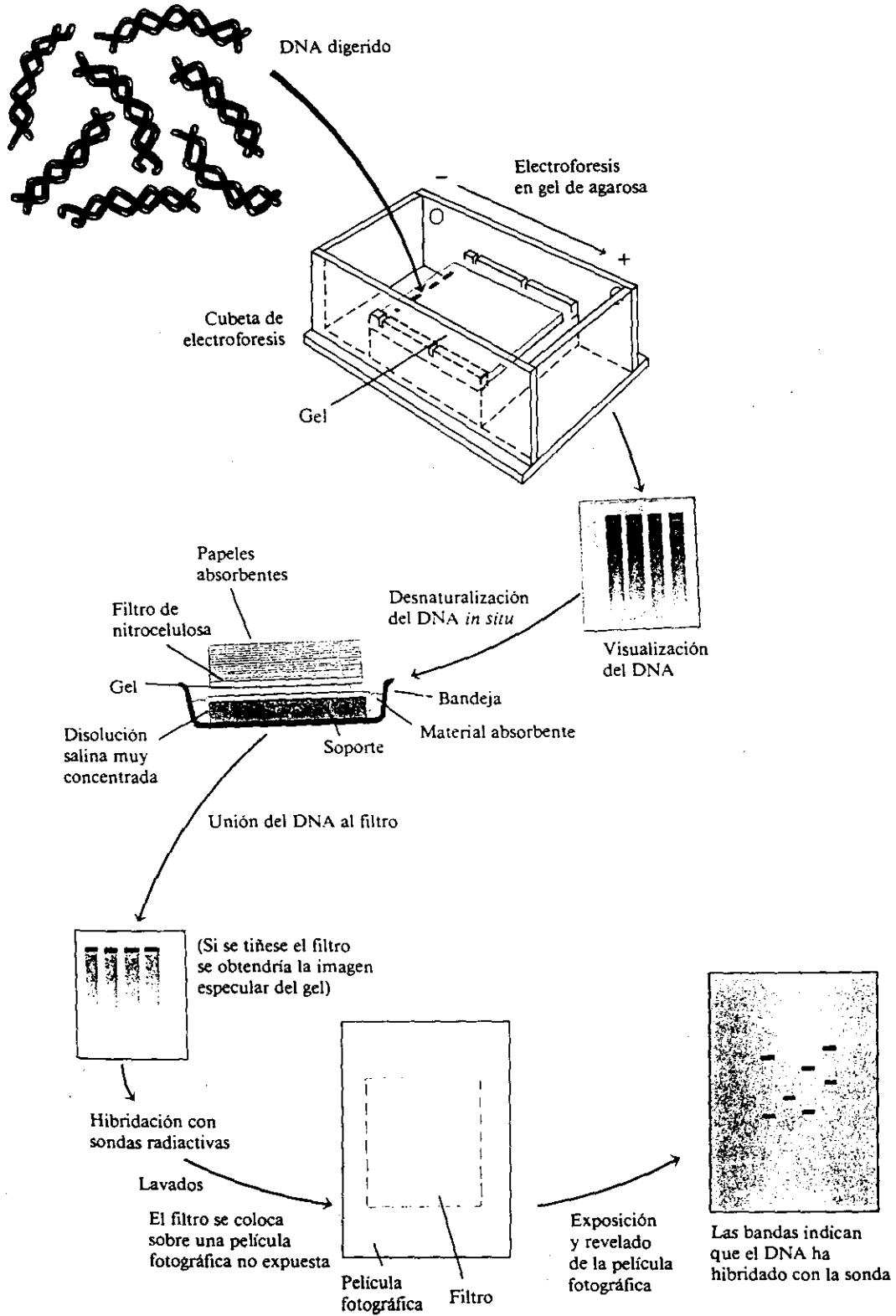
ANEXO #2
PURIFICACION DE ADN POR MEDIO DE DIALISIS POR CENTRIFUGACION



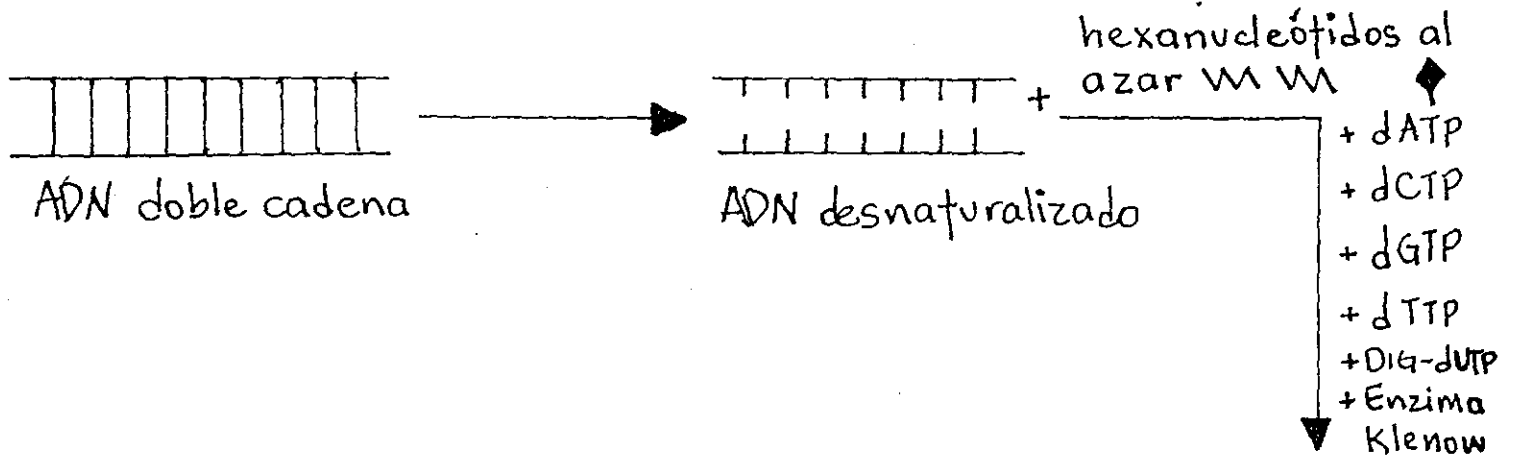
ANEXO #3
 DETALLE DE TRANSFERENCIA DE SOUTHERN BLOT



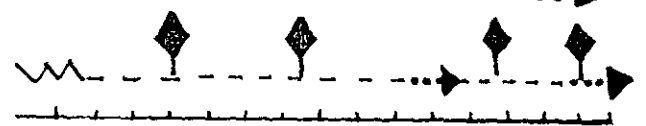
ANEXO #4
 PROCEDIMIENTO PARA SOUTHERN BLOTTING



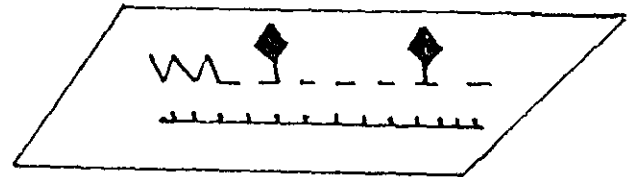
ANEXO #5
 MARCACION NO RADIOACTIVA DE ADN CON DIGOXIGENINA



Síntesis de ADN marcado.



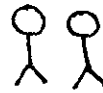
Filtro-ligado
 ADN homólogo
 + ADN marcado



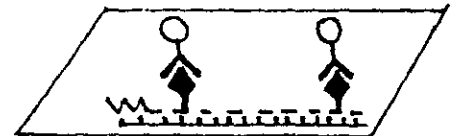
Hibridación



+ anti-digoxigenina - fosfatasa alcalina



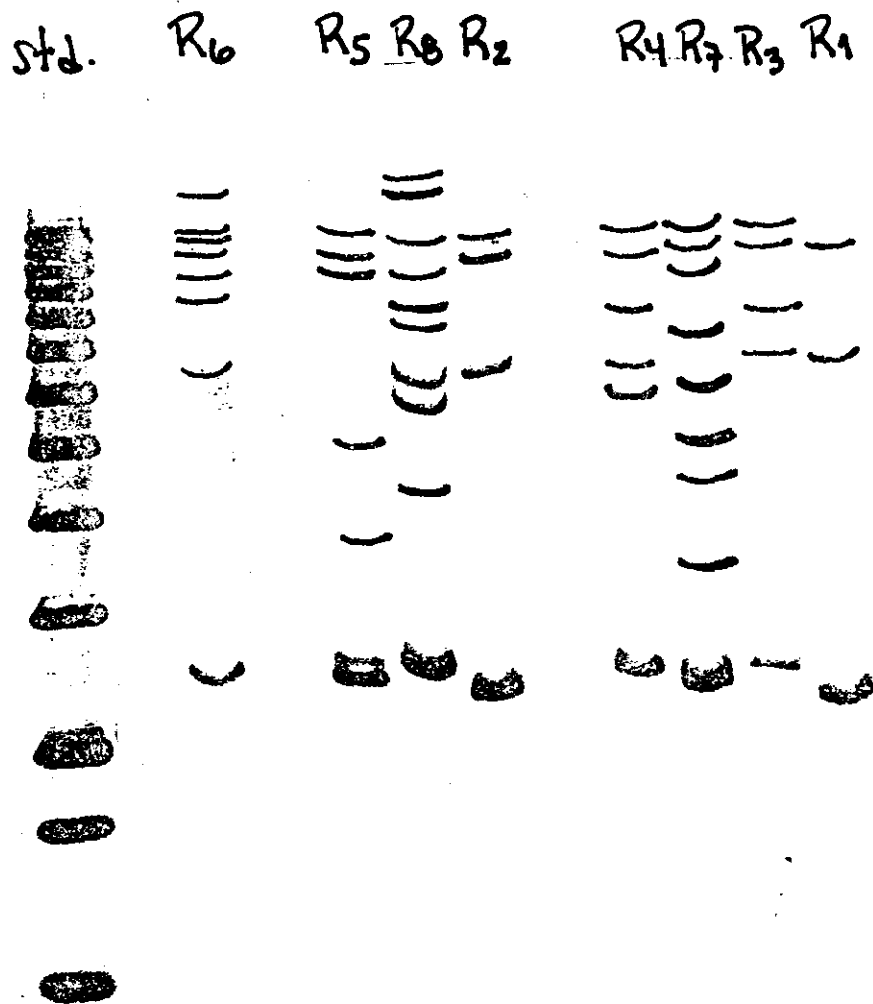
Complejo hapteno-Ac

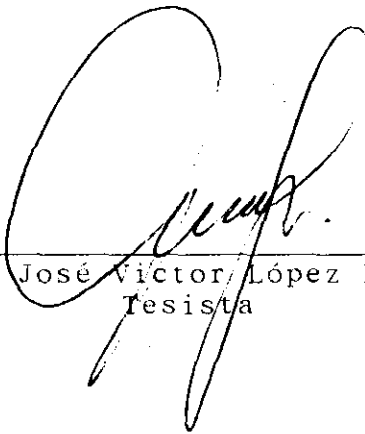


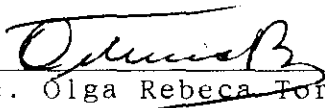
+ BCIP + NBT
 Reacción de color

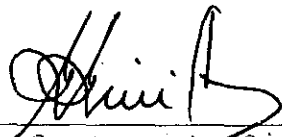



ANEXO #6
 DIFERENTES RIBOTIPOS ENCONTRADOS DE LAS CEPAS ESTUDIADAS



(f) 
José Víctor López Ruano
Resista

Vo. Bo. (f) 
Lic. Olga Rebeca Torres de Matute
Asesora

Vo. Bo. (f) 
Lic. Gustavo A. Gini
Director

Vo. Bo. (f) 
Lic. Clemencia Galvez de Avila
Decana