

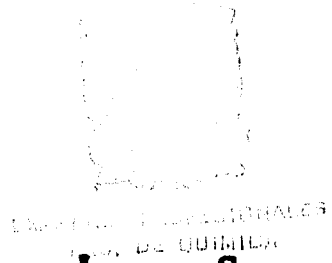
10
Ej.



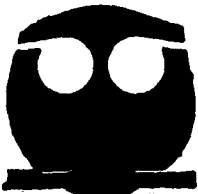
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

DETECCION DE *Escherichia coli*
ENTEROHEMORRAGICA EN
POBLACION INFANTIL



T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
FERNANDO JAVIER ARTEAGA CABELLO



MEXICO, D.F.

1995

FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

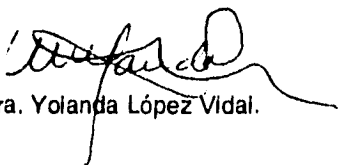
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE	Profra. Eida Peniche Quintana.
VOCAL	Profra. Yolanda López Vidal.
SECRETARIO	Profra. Marisol López López.
1er. SUPLENTE	Prof. Raúi Garza Velasco.
2do. SUPLENTE	Profra. Maite Astigarraga Zavaleta.

**SITIO DONDE SE
DESARROLLO EL TEMA** DEPARTAMENTO DE INFECTOLOGIA DEL INSTITUTO
NACIONAL DE LA NUTRICION "SALVADOR ZUBIRAN".

ASESOR DE LA TESIS


Dra. Yolanda López Vidal.

SUSTENTANTE


Fernando Javier Arteaga Cabello

**ESTE TRABAJO SE REALIZO EN EL DEPARTAMENTO DE INFECTOLOGIA
DEL INSTITUTO NACIONAL DE LA NUTRICION
BAJO LA DIRECCION DE LA DOCTORA
YOLANDA LOPEZ VIDAL**

Dedico este trabajo:

A mis padres, quienes me han brindado su paciencia, cariño y apoyo en todo momento.

A mis hermanos, por su comprensión y estímulo para seguir adelante.

A Elizabeth por su ayuda y amistad.

A la Dra. Yolanda López Vidal por su asesoría y paciencia en la elaboración de este trabajo.

A mis compañeros y amigos, con quienes he compartido gratos momentos.

A la U.N.A.M., Facultad de Química y Departamento de Infectología del INNSZ.

INDICE

	Página
INTRODUCCION	1
OBJETIVOS	3
I.- GENERALIDADES	4
1) <i>Escherichia coli</i>	4
2) <i>Escherichia coli</i> COMO PATOGENO ENTERICO	5
3) <i>Escherichia coli</i> ENTEROHEMORRAGICA	8
A) HISTORIA	9
B) GENERALIDADES	10
C) IMPORTANCIA (EPIDEMIOLOGIA)	10
D) DETERMINANTES DE SU PATOGENICIDAD	11
E) PATOGENESIS	15
F) MANIFESTACIONES CLINICAS	16
G) ASOCIACION DE LAS SLTs CON LA ENFERMEDAD	16
H) DIAGNOSTICO	18
I) TRATAMIENTO	19
II.- MATERIAL Y METODOS	21
1) MATERIAL	21
2) METODOLOGIA	24
A) HIBRIDACION DEL ADN DE COLONIAS DE <i>E. coli</i>	24
B) AMPLIFICACION POR PCR DE FRAGMENTOS DE LOS GENES QUE CODIFICAN PARA LA SLT-I Y SLT-II DE <i>E. coli</i>	31

	Página
III.- RESULTADOS	42
IV.- DISCUSION	51
CONCLUSIONES	56
ANEXO	57
V.- BIBLIOGRAFIA	59

INTRODUCCION

Escherichia coli enterohemorrágica (ECEH), se ha asociado a diarrea aguda con sangre y colitis hemorrágica (que en ocasiones progresa a Síndrome urémico hemolítico), principalmente en población infantil.

Se desconoce el inoculo mínimo para causar la enfermedad, sin embargo, se sabe que la vía de transmisión es la fecal-oral, principalmente a partir de alimentos contaminados, como carne mal cocida y lácteos.

ECEH induce diarrea con sangre por medio de la producción de grandes cantidades de una o dos toxinas, aunque se han propuesto otras estructuras en su mecanismo de patogénesis, se desconoce la relevancia de las mismas.

Las toxinas descritas para ECEH son de dos tipos: Una llamada "toxina semejante a Shiga I", que es antigénica y estructuralmente parecida a la toxina Shiga de *Shigella dysenteriae* y otra denominada "toxina semejante a Shiga II", que no cruza antigénicamente con la toxina Shiga. Ambas toxinas actúan sobre células epiteliales del intestino grueso (colitis hemorrágica) y células epiteliales del riñón (Síndrome urémico hemolítico).

Los principales métodos que se utilizan para la detección de ECEH, se basan en ensayos de citotoxicidad en células Vero, hibridación de ADN de colonias bacterianas con isótopos radioactivos, y la incapacidad de cepas de *E. coli* para fermentar el sorbitol.

En un 30 a un 50% de los episodios de diarrea con sangre, no se identifica al patógeno causal, lo que puede deberse a omisión en la búsqueda de algunos microorganismos, o a la falta de métodos adecuados para su identificación, y puede ser posible que ECEH sea responsable de una importante proporción de estos casos sin diagnóstico.

La detección de ECEH en población infantil con diarrea con sangre en México, se limita

principalmente a un solo grupo, el cual por medio de hibridación de colonias con isótopos radioactivos y ensayos de citotoxicidad, ha observado una prevalencia del 11%.

En el presente trabajo, la detección de ECEH se basó en métodos moleculares.

La selección de las herramientas moleculares para la detección de ECEH con oligonucleótidos para hibridación de ADN en colonias y cebadores para la reacción en cadena de la polimerasa, se llevó a cabo con los criterios de mayor sensibilidad en cuanto a la detección de un menor número de UFC/mg de heces; especificidad por su capacidad de detectar ambas toxinas, pero al mismo tiempo diferenciar una de otra; de reproducibilidad en la detección de ECEH en ensayos realizados por duplicado y en el número de reportes referidos por otros grupos que también utilizan las mismas herramientas.

Como objetivo principal, se observó la prevalencia de ECEH en muestras diarreicas agudas de una población infantil, obtenidas durante el período comprendido entre mayo y agosto de 1993 por los métodos de hibridación no radioactiva del ADN de colonias y la reacción en cadena de la polimerasa.

OBJETIVOS

A) OBJETIVO GENERAL.

Determinar la prevalencia de *E. coli* enterohemorrágica en un grupo de muestras de heces diarreicas provenientes de una población infantil, mediante los métodos de hibridación de ácidos nucleicos de colonias bacterianas y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

B) OBJETIVOS PARTICULARES.

- 1.- Seleccionar la sonda y/o el oligonucleótido más adecuado, en base a su versatilidad, sensibilidad y especificidad, para detectar los genes que codifican para la SLT-I y SLT-II.
- 2.- Estandarizar el método de hibridación de ADN de colonias utilizando un marcaje no-isotópico para la detección de ECEH.
- 3.- Estandarizar el método de extracción de ADN bacteriano proveniente de heces para aplicarlo en la reacción en cadena de la polimerasa para la detección de ECEH.
- 4.- Valorar la sensibilidad y especificidad de la PCR en ADN de cultivos puros y en ADN extraído de heces.
- 5.- Determinar la utilización de los métodos estandarizados en el escrutinio y confirmación de muestras para la detección de ECEH.

I GENERALIDADES

1.- *Escherichia coli*.

La bacteria conocida actualmente como *Escherichia coli* fue descrita por primera vez por Escherich (1885) bajo el nombre de *Bacterium coli commune*, habiendo sido aislada de heces de niños sanos (50).

E. coli es el facultativo más común que se encuentra entre la flora que habita el intestino humano, desempeñando un papel importante en el mantenimiento de las funciones fisiológicas de este órgano; pero es también el principal patógeno Gram negativo en el hombre, responsable de meningitis en neonatos, infecciones del tracto urinario, septicemia, Síndrome urémico hemolítico, colitis hemorrágica, así como diversas formas de diarrea y disenterías que afectan diferentes poblaciones y grupos de edad en todo el mundo (31, 32, 50).

El término *E. coli* involucra un grupo muy diverso de microorganismos que infectan diferentes órganos y que producen una gran variedad de factores de virulencia, que van desde características estructurales hasta la producción de toxinas (46).

A) Morfología.

E. coli es un bacilo corto Gram negativo (0.5 por 3.0 μm), no esporulado, en ocasiones capsulado, y que puede ser móvil o inmóvil debido a la ausencia o presencia de flagelos periféricos (48, 50).

B) Características bioquímicas.

Como ya se mencionó, *E. coli* es un facultativo que crece fácilmente en medios de cultivo simples. Cuando se desarrolla en condiciones de anaerobiosis fermenta los carbohidratos, pero cuando hay suficiente oxígeno utiliza el ciclo de los ácidos tricarbónicos y el transporte de

electrones como fuente de energía (50).

C) Características de cultivo.

En medios sólidos producen colonias de 3 a 6 mm de diámetro, convexas, de bordes regulares, aspecto húmedo y color gris a blanco (50).

D) Características serológicas.

Se pueden utilizar una gran variedad de antígenos para tipificar cepas de *E. coli*, pero los más utilizados son el lipopolisacárido somático O, el antígeno capsular K y los antígenos flagelares (H). Estos antígenos forman el esquema de tipificación de Kauffmann que se utiliza ampliamente en todo el mundo. La serotipificación basada en las fimbrias de *E. coli* también se ha utilizado para complementar el esquema ya mencionado (48).

2.- *Escherichia coli* como un patógeno entérico.

Se han identificado cinco principales grupos de *E. coli* como patógenos entéricos basándose en sus propiedades de virulencia, su interacción con la mucosa intestinal, los diferentes síndromes clínicos que producen, su epidemiología y sus serotipos. Estas cinco categorías son: (1) *E. coli* enterotoxigénica (ECET), (2) *E. coli* enteroinvasiva (ECEI), (3) *E. coli* enteropatógena (ECEP), (4) *E. coli* enteroagregativa (ECEAgg) y (5) *E. coli* enterohemorrágica (ECEH) (16, 31, 32).

A) ECET.

Este microorganismo tiene la capacidad de adherirse y colonizar el intestino delgado de humanos y animales, en donde produce una toxina termolábil (LT) (que es estructural y

antigénicamente similar a la producida por *V. cholerae*), y/o una toxina termoestable (ST). Ambas toxinas se encuentran codificadas por plásmidos, así como sus factores de colonización, los cuales por lo regular son fimbrias que permiten la adhesión de la bacteria a la mucosa intestinal. En general ECET es muy común en países en desarrollo pero rara en los industrializados, aunque es una importante causa de diarrea del viajero. Los principales rasgos clínicos de la enfermedad son: diarrea acuosa, náuseas, calambres en el abdomen y fiebre ligera (16, 32).

La gran mayoría de estas cepas pertenecen a un grupo de serotipos determinado (46).

B) ECEI.

Esta categoría de *E. coli* se caracteriza por tener una gran similitud, en diversos aspectos, con cepas de *Shigella* (46).

Como *Shigella*, su principal característica es la de invadir y proliferar dentro de células epiteliales colónicas y causar muerte celular. Esta capacidad de invadir, al igual que en *Shigella*, depende tanto de genes cromosómicos como plasmídicos, los cuales codifican la producción de diversas proteínas de membrana externa. Estas bacterias son inmóviles y no fermentadoras o fermentadoras lentas de lactosa e incluso los antígenos somáticos O dan, en ocasiones, reacción cruzada (32, 46).

Las principales características de la enfermedad son fiebre, dolor abdominal severo y diarrea acuosa autolimitada que muchas veces va seguida de disentería (consistente de escasas heces y presencia de sangre con moco y leucocitos) (50).

En general, ECEI es poco frecuente tanto en países en desarrollo como desarrollados, aunque es posible que sea subestimada debido a la falta de métodos adecuados para su identificación (32).

C) ECEP.

Escherichia coli enteropatógena fue la primera *E. coli* asociada a diarreas y descrita en los años cuarentas por John Bray. Hoy en día se considera una importante causa de diarrea acuosa en países en desarrollo durante los meses de verano (32).

Durante muchos años esta bacteria se definió por serotipificación y por exclusión de aquellas cepas que pertenecen a ECEI y ECET. Actualmente, es más apropiado definir a ECEP en base a los determinantes genéticos que codifican para sus propiedades patogénicas (32, 46).

ECEP causa diarrea principalmente en niños menores de 1 año, siendo rara su asociación en diarreas de niños mayores de esta edad (14, 32, 50).

Entre las principales características de ECEP se encuentra su capacidad de adherirse en forma localizada a cultivos de células epiteliales HEp-2, propiedad que se asocia a la presencia de un plásmido de 60 MDa, que se ha denominado EAF "factor de adherencia de ECEP" (15, 51).

Cepas de ECEP son capaces de inducir profundas alteraciones en el citoesqueleto de células epiteliales del intestino en modelos animales, en cultivos celulares y en humanos. Este daño en los enterocitos se caracteriza por una pérdida dramática de las microvellosidades y un reordenamiento de elementos del citoesqueleto con una proliferación de compuestos de actina por debajo de las áreas de unión de la bacteria, a este fenómeno se le ha denominado lesiones de adherencia y esfaselamiento o lesiones A/E "attaching and effacing" y está determinado por la presencia del plásmido de 60 MDa ya mencionado y un gene cromosómico denominado *eae*. Aunque las lesiones A/E son características de ECEP, también se han descrito en ECEH (15, 23, 51).

Hoy en día es necesario considerar la presencia de algunos genes, plásmidos y patrones de adherencia a líneas celulares para clasificar a una *E. coli* dentro de las ECEP, pero cabe

señalar que es una categoría en la que aún hay mucho por investigar para poder comprender su patogénesis (46).

D) ECEAgg.

De entre las cinco categorías de *E. coli*, la reconocida en forma más reciente es *E. coli* enteroagregativa, bacteria asociada a diarreas persistentes de niños en Sudamérica, Centroamérica, India, Bangladesh e Inglaterra (16, 32, 46).

Esta bacteria es semejante a ECET en el sentido de que se adhiere a células del Intestino delgado, no es invasiva, y no causa cambios histológicos en las células a las que se une. Su principal diferencia con respecto a ECET es que no se adhiere en forma uniforme sobre la superficie de la mucosa intestinal, sino que tiende a agruparse en pequeños agregados (de ahí su nombre). En cultivos de líneas celulares HEp-2 y en portaobjetos libres de células presentan también una adherencia agregativa en forma de ladrillos apilados muy característica. ECEAgg produce una toxina semejante a la termoestable y una hemolisina, las cuales no se han caracterizado completamente. Hasta la fecha sólo se ha podido identificar una fimbria llamada de adherencia agregativa I y, al parecer, se asocia a la propiedad que tienen estas cepas a hemaglutinar con eritrocitos humanos (16, 32).

El número de serogrupos prevalentes en esta categoría no se ha determinado aún y su importancia como causa de enfermedad sigue siendo motivo de controversia (46).

3.- *Escherichia coli* enterohemorrágica.

Debido a que los objetivos del presente trabajo se enfocan principalmente al estudio de esta categoría de *E. coli*, se profundizará sobre las generalidades de la misma.

A) Historia.

En 1982, dos brotes de colitis hemorrágica en diferentes estados de la Unión Americana, atrajeron la atención a un síndrome clínico poco común de diarrea y a un nuevo patógeno entérico; el microorganismo causal era *E. coli* O157:H7, serotipo que no se había asociado previamente a diarreas. En 1983, un reporte similar realizado en Canadá, indico también que las cepas responsables producían un tipo de toxina previamente reportada como "Shiga like toxin" (SLT) o "toxina semejante a Shiga". En el mismo año, se reportaron evidencias de que infecciones por *E. coli* productoras de este tipo de toxinas, desarrollaban casos esporádicos de Síndrome urémico hemolítico en Canadá (10, 32, 39, 47).

Mientras que la asociación de cepas productoras de SLT con diarrea y colitis hemorrágica se realizó hasta 1983, el primer reporte de una cepa de *E. coli* productora de SLT se realizó en 1977, en donde se identificó una cepa O26:H11 capaz de producir una citotoxina que afectaba líneas celulares Vero (riñón de mono verde africano) y que se denominó "toxina Vero" (VT). Posteriormente en 1982 O'Brien y cols al trabajar con la misma cepa de *E. coli*, descubrieron que la toxina era inhibida con anticuerpos dirigidos contra la toxina de *Shigella dysenteriae* tipo 1 y, con pruebas de inmunodifusión, dedujeron que la citotoxina de *Shigella* y de *E. coli* eran semejantes antigénicamente, por lo que la denominaron "toxina semejante a Shiga" (39, 47).

En 1985, investigadores ingleses informaron sobre una cepa de *E. coli* O157:H7, que producía dos variantes antigénicas de VT, la primera fue neutralizada por el suero anti-Shiga y propusieron que se llamara VT1, la segunda no fue neutralizada por dicho antisuero y la denominaron VT2; además, se estableció que las dos variedades pudieran estar presentes en una sola cepa. Subsecuentemente, en 1986, investigadores norteamericanos al trabajar con otra cepa de *E. coli* O157:H7 (933) también obtuvieron dos citotoxinas, la SLT-I y otra que no fue neutralizada por anticuerpos contra la SLT-I y que designaron como "toxina semejante a Shiga

II" (SLT-II). Estudios posteriores demostraron que tanto las SLTs como las VTs eran las mismas toxinas (10, 39, 47).

En 1987, se describió una tercera variante de citotoxinas producidas por *E. coli*; esta se obtuvo de una cepa aislada de cerdos con enfermedad edematosa porcina (EEP) y se le denominó "toxina semejante a Shiga-II variante" (SLTIIv) (47).

En la actualidad, tanto el término de toxina Vero como el de toxina semejante a Shiga se utilizan indistintamente para referirse al mismo tipo de toxina (10, 39, 47).

B) Generalidades.

De las categorías de *E. coli* diarreogénicas, la denominada como *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH) que incluye un número limitado de serotipos, se ha asociado a diarreas agudas, diarreas agudas con sangre y colitis hemorrágica, las cuales en ocasiones progresan a una enfermedad conocida como Síndrome urémico hemolítico (SUH). ECEH tiene dos características especiales de importancia patogénica. En primer lugar, es capaz de producir altos niveles de una o dos de las toxinas SLTs y, en segundo lugar, poseen un gene altamente homólogo al gene *eae* de adherencia y esfaselamiento de ECEP que actúa en forma análoga en ECEH. Al parecer la combinación del fenómeno A/E y la producción de SLT dañan la mucosa intestinal y dan como resultado las manifestaciones de la colitis hemorrágica. El serotipo más común en los E.U.A. es el O157:H7, pero se hallan otros como O111, O113, O121, O145 y el O26, el cual se encuentra con mayor frecuencia en otras partes del mundo (5, 32, 46, 48).

C) Importancia. (Epidemiología).

E. coli enterohemorrágica causa epidemias y enfermedades esporádicas de diarrea, colitis hemorrágica y Síndrome urémico hemolítico, y puede ser transmitida primariamente como una

zoonosis al ser humano. El microorganismo se aísla comúnmente de ganado vacuno y el origen de diversas epidemias, principalmente en E.U.A y Europa se ha relacionado a hamburguesas y carnes poco cocidas, pero también se ha asociado al consumo de leche, yogurt y aguas contaminadas (36, 48).

La incidencia de infecciones por ECEH en países industrializados como Canadá, Inglaterra y Estados Unidos es alta y predomina principalmente en población infantil y de edad avanzada. Hasta la fecha, hay pocos estudios acerca de la asociación de esta bacteria con casos de diarrea aguda de niños en países en desarrollo (8, 11, 18, 22, 33, 36, 52, 53).

D) Determinantes de su patogenicidad.

d.1 Toxinas semejantes a Shiga (SLTs).

a) Introducción.

La familia de toxinas SLT, se ha identificado a partir de cepas de *E. coli* enterohemorrágicas y de *E. coli* que causan enfermedad edematosa porcina y se caracterizan por presentar una actividad biológica similar a la de la toxina Shiga. Como ya se mencionó, estas cepas, pueden producir una o ambas de dos toxinas antigénicamente distintas llamadas toxina semejante a Shiga I o toxina Vero I y toxina semejante a Shiga II (SLT-II) o toxina Vero II. Este último grupo de SLT-II se ha subdividido debido a la identificación de algunas variantes de esta toxina (SLT-IIv, SLT-IIvp y SLT-IIvh) (47).

b) Estructura de la toxina Shiga y las SLTs.

La toxina Shiga es una holotoxina formada por una sola subunidad A (componente enzimático) compuesta de 293 aminoácidos con un peso molecular aproximado de 32 KDa y un pentámero de subunidades B (involucradas en la unión de la toxina al receptor glicolipídico de

las células blanco) compuestos de 69 aminoácidos y correspondientes a un peso molecular aproximado de 7.7 KDa cada una (20, 39, 47).

Comparaciones entre la secuencia de aminoácidos de la toxina Shiga y las SLTs revelan que el tamaño de las subunidades y la posición del único puente disulfuro intercadena de cada subunidad está altamente conservado, así como la existencia de 2 regiones de secuencia limitada y que son completamente homólogas en las subunidades A de todos los miembros de esta familia de toxinas. Otra observación importante con respecto a que la conformación terciaria de los péptidos individuales es altamente conservada, se basa en que las subunidades de las toxinas Shiga/SLT-I, SLT-II y SLT-III pueden reensamblarse en un híbrido citotóxico funcional (47).

Como otras bacterias citotóxicas, el péptido A de la familia de toxinas se activa por un proceso proteolítico. Una proteasa corta la subunidad A en un fragmento enzimático A₁ (de aproximadamente 27 KDa) y un fragmento en el extremo carboxilo terminal A₂ (4 KDa) que permanece unido por un puente disulfuro hasta que el fragmento enzimático es liberado y entra al citosol de la célula blanco. El sitio en que se realiza el corte se encuentra entre la alanina 253 y serina 254 del péptido de 293 aminoácidos (10, 39, 47)

c) Genética de las SLTs.

La fagoconversión es un mecanismo que se ha asociado a la producción de varias toxinas importantes como son la diftérica, la eritrogénica del estreptococo, la botulínica y la enterotoxina A del estafilococo (39).

Los fagos convertidores de toxina, contienen genes que son esenciales para la toxigenesis y las bacterias que son susceptibles y se convierten en lisogénicas para dichos fagos, adquieren la capacidad de producir la toxina correspondiente (39).

Las toxinas producidas por ECEH son también determinadas por fagos específicos en las bacterias productoras de las mismas. Esto no es general para todas las *E. coli* productoras de SLT, ya que algunas cepas productoras de variantes de SLT-II que producen enfermedad edematosa porcina, tienen codificados los genes para dichas toxinas en el cromosoma (20, 39).

La comparación en la secuencia de aminoácidos entre el operón que codifica para la toxina Shiga (*stx*) y el operón de la SLT-I (*slt-I*), revela que son esencialmente idénticos y que sólo difieren en un aminoácido de la subunidad A. Los operones *slt-II* y *slt-III* tienen una homología del 90% entre cada uno, mientras que su homología con respecto a *stx/slt-I* es del 55% (figura 5). Los operones de cada miembro de la familia de las toxinas Shiga se encuentran organizados en forma idéntica, teniendo a los genes de las subunidades A y B ordenados uno tras otro con el promotor del gene de la subunidad A al inicio y separado del gene de la subunidad B por un espacio de 12 a 15 nucleótidos. Aunque no se ha identificado un promotor para el gene de la subunidad B, se ha observado que clones a las cuales se les suprimió el promotor y parte del gene de la subunidad A, continúan expresando la subunidad B, sugiriendo que este gene puede ser transcrito a partir de un segundo promotor (10, 37, 39, 47).

d) Actividad biológica.

Los experimentos efectuados tanto *in vitro* como *in vivo* con la toxina Shiga y las SLTs, han demostrado diversas propiedades biológicas como son:

- a) Citotoxicidad hacia ciertas líneas celulares (principalmente Vero y Hela).
- b) Enterotoxicidad, provocando la acumulación de fluido en asas de intestino ligado de ratones.
- c) Efecto paralizante y letal cuando se inyectan en forma intravenosa en conejos y ratones (40, 47).

e) Mecanismo de acción.

Tanto la toxina Shiga como las SLTs actúan inhibiendo la síntesis proteica en células eucariotas como resultado de su actividad ARN N-glicosídica, que remueve una adenina de una adenosina específica en el ARN 28s de la subunidad ribosomal 60s. Este residuo de adenosina se localiza en el vértice del asa que forma el ARN 28s cerca del extremo 3'. La liberación de esta adenina provoca que no se realice la unión del factor de elongación 1, el cual es de suma importancia para la unión del aminoacil-ARN_i a los ribosomas y se lleve a cabo la síntesis proteica (39, 40, 47).

Por medio de mutagénesis dirigida, se ha logrado implicar al ácido glutámico 167 como sitio activo de la toxina. También es importante mencionar el hecho de que ribosomas eucariotes completos son mucho más sensibles a la actividad de la toxina que fragmentos de ARN aislados, sugiriendo que la toxina reconoce estructuras adicionales en el ribosoma (47).

La unión de la toxina a células eucariotes se debe a la interacción de las subunidades B a un glicolípido de membrana de la familia de las globoséridos llamada globotriaosilceramido o Gb₃. Dentro de la molécula del glicolípido, el disacárido terminal gal- α 1 \rightarrow 4-gal aparece como el determinante mínimo necesario para la unión de la toxina (10, 40, 47).

La internalización de la toxina a las células es aparentemente mediada por un receptor que interviene en la endocitosis. Las vesículas, una vez internalizadas, pueden fusionarse con los lisosomas y ser translocadas al citosol. En el proceso de translocación intracelular, es cuando la subunidad A puede sufrir una ruptura proteolítica en un sitio sensible a tripsina cerca del amino terminal (10, 39).

d.2 Gene *eae*.

Como ya se mencionó, la presencia del gene *eae* "*Escherichia coli* attaching and effacing"

es el responsable del daño característico que produce ECEP sobre las células epiteliales del intestino humano llamado de adherencia y esfaselamiento "A/E attaching and effacing"; este mismo gene posteriormente se ha identificado en cepas de ECEH y se ha determinado que comparte un 86% de homología con respecto al gene de ECEP (14, 15, 23, 51, 55, 57)

Aunque no ha sido dilucidado por completo el mecanismo por el cual ECEP y ECEH producen las lesiones A/E, se ha propuesto un mecanismo patogénico consistente en tres etapas:

- 1) Una adherencia no íntima entre la bacteria y las microvellosidades mediada por la presencia de pilis codificados por plásmidos.
- 2) En el segundo estadio, la bacteria se adhiere y provoca la activación de tirosinocinasas, las cuales desencadenan una elevación de Ca^{2+} intracelular. Durante esta fase también da inicio el daño al citoesqueleto.
- 3) En la última fase, una proteína de membrana codificada por el gene cromosómico *eae* llamada intimina, provoca un contacto íntimo con las células epiteliales, de esta aproximación las alteraciones al citoesqueleto se amplifican dando lugar a la formación de pedestales con aspecto de copas compuestos de fibras de actina y que se producen por debajo de las zonas donde se encuentran adheridas las bacterias (14, 15, 46, 51, 55).

E) Patogénesis.

a) Ingreso y multiplicación.

ECEH coloniza las regiones terminales del intestino donde permanece limitada a la superficie de la mucosa y no invade en forma sistémica. Dentro del colon, los microorganismos se adhieren a las células epiteliales y se multiplican localmente. La enfermedad, en general es autolimitada, pero no se han definido los mecanismos para el control de la infección (48).

b) Daño.

Los microorganismos adheridos en cualquier parte del colon causan una lesión estructural en la membrana de las células epiteliales superficiales. Esto se debe a los efectos del gene *eae*, que provoca la lesión de adherencia y esfaselamiento de las microvellosidades. Además, la producción de las SLTs promueve la inflamación de la mucosa colónica, lo que da como resultado exudados purulentos y hemorragias focales. La posible absorción de las SLTs provoca las manifestaciones sistémicas (SUH). Estos síndromes representan la respuesta clínica al daño endotelial en los glomérulos y el sistema nervioso central (40, 46, 48).

F) Manifestaciones clínicas.

Colitis hemorrágica.- Se caracteriza por dolor abdominal severo con calambres, seguido dentro de las 24 h siguientes, por diarrea acuosa que progresa a diarrea con sangre en abundancia, sin presencia de leucocitos fecales y casi siempre en ausencia de fiebre. La recuperación se realiza en los días siguientes sin complicaciones o terapia específica (32, 46).

Síndrome urémico hemolítico.- El SUH es una causa común de falla renal aguda en niños de diversas partes del mundo, y se define por la presencia de anemia hemolítica microangiopática y trombocitopenia en asociación con falla renal aguda (25, 46).

G) Asociación de las SLTs con la enfermedad.

Las observaciones clínicas han demostrado que durante brotes de disentería bacilar o colitis hemorrágica causadas por ECEH, un porcentaje de pacientes que van de un 3% a 53% desarrollan secuelas que involucran el sistema nervioso central o los riñones. Estudios histopatológicos en humanos y animales sugieren que la característica común, tanto en las enfermedades colónicas como en las manifestaciones secundarias de infecciones causadas por

Shigella dysenteriae y ECEH, son el daño al endotelio vascular de los órganos afectados (20, 40, 47).

Estas observaciones llevan a la hipótesis de que las células del endotelio vascular en ciertos órganos pueden ser el blanco específico de las toxinas (40, 47).

Las células endoteliales juegan un papel crítico al mantener un estado no trombogénico necesario para un buen flujo de la sangre. Un daño sobre células del endotelio vascular puede facilitar, no sólo un estado procoagulante, sino también, provocar la liberación de sustancias vasoactivas y citocinas. Estos mediadores endógenos pueden aumentar el daño celular, alterando el control homeostático y actuando como atrayentes de células del sistema inmune (24, 40).

Los síntomas de alteraciones neurológicas son manifestaciones clínicas de disentería bacilar y colitis hemorrágica e incluyen letargia, dolor de cabeza severo, convulsiones, y encefalopatía. Estudios histopatológicos en modelos animales han sugerido la posibilidad de que las toxinas no actúan como una neurotoxina directamente, sino que, más que un daño neuronal, actúan sobre el endotelio de los capilares que irrigan el sistema nervioso central causando este tipo de alteraciones (40, 47).

Quizás la secuela de mayor importancia debida a infecciones con *S. dysenteriae* y ECEH es el desarrollo del SUH. Numerosos estudios epidemiológicos han demostrado una correlación entre la infección con ECEH productora de altos niveles de toxina y el desarrollo del SUH (24, 25, 40).

Estos mismos estudios también revelaron que las cepas aisladas de colitis hemorrágica frecuentemente son productoras de las dos toxinas o sólo de la SLT-II, mientras que cepas productoras solamente de SLT-I no son comunes (5, 40).

Así mismo, utilizando modelos animales para tratar de dilucidar el papel de las SLTs en

la enfermedad, se hallaron evidencias que sugieren que la toxina SLT-II pueda ser el principal factor citotóxico que contribuye a la enfermedad colónica y al desarrollo de la falla renal (40, 47).

Los exámenes histopatológicos de riñón en pacientes con SUH frecuentemente demuestran profundas alteraciones estructurales en el glomérulo (unidad básica de filtración del riñón). Algunas células endoteliales del glomérulo aparecen inflamadas y desprendidas de la membrana basal. De esta forma, componentes de la matriz subendotelial pueden quedar expuestas y servir como sitios de adherencia plaquetaria y activación, mientras que los microtrombos se depositan en la luz capilar y se realiza un influjo de células inflamatorias (24, 25, 40).

Otros hallazgos en relación a la cantidad de Gb₃ presentes en diferentes células indican:

- 1) Hay una correlación directa entre el contenido membranar de Gb₃ y la susceptibilidad a las toxinas SLTs.
- 2) Células dentro del riñón humano, posiblemente células endoteliales del glomérulo, pueden estar enriquecidas con los receptores de las toxinas, explicando en parte porque el riñón es el órgano más afectado después de que las toxinas entran al torrente sanguíneo (24, 40).

Aunque el SUH es un síndrome complejo y dinámico, no es poco probable que el efecto citotóxico de las toxinas sobre el endotelio glomerular pueda desencadenar el daño, el cual progresa debido a una cascada de eventos procoagulantes y proinflamatorios característicos del SUH (24, 40).

H) Diagnóstico.

El diagnóstico de una infección por ECEH, es relativamente fácil cuando la produce el serotipo O157, ya que éste no tiene la capacidad de fermentar el sorbitol, característica que contrasta con más del 99% de las cepas de *E. coli* aisladas de heces y que sí fermentan el

sorbitol. Esta propiedad se aprovecha con el uso del medio MacConkey al cual se la ha sustituido la lactosa por sorbitol. Las colonias de *E. coli* que crecen en este agar y que son sorbitol negativas se eligen como ECEH positivas y se confirman como pertenecientes al serogrupo O157 con pruebas de aglutinación con látex. Este método no detecta ECEH fermentadoras de sorbitol, por lo que se han desarrollado otras técnicas como la hibridación de sondas y oligonucleótidos de ADN, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ensayos Inmunoenzimáticos, ensayos de citotoxicidad, etc. (17, 24, 25, 34, 48).

En general, los principales criterios para diagnosticar una infección por ECEH son:

- 1.- Presencia de SLTs en extractos fecales por neutralización con anticuerpos específicos (ensayos de citotoxicidad con extractos fecales) (24, 45).
- 2.- Aislamiento de cepas de *E. coli* productoras de SLTs (ensayos de citotoxicidad) (24, 13).
- 3.- Determinación de la presencia de los genes que codifican para las SLTs en cepas aisladas de heces (hibridación de ADN y PCR) (3, 7, 9, 21, 24, 26, 27, 28, 38, 41, 42, 44, 56).
- 4.- Presencia por ELISA de SLTs en heces o colonias aisladas (24, 2).
- 5.- Un aumento de cuatro veces los títulos de anticuerpos séricos contra SLT-I y/o SLT-II (ELISA) (24, 29, 53).
- 6.- Demostración por serología que una *E. coli* sorbitol-negativa pertenece al serotipo O157:H7 (MacConkey con sorbitol) (5, 24, 34, 45, 52).

I) Tratamiento.

El tratamiento de las infecciones por ECEH no se ha establecido. Hay cierta controversia

por el momento, ya que algunos investigadores han sugerido que la antibioticoterapia puede incrementar la probabilidad del SUH. No hay pruebas de esta hipótesis ni un motivo plausible por el cual esto debería ser de este modo. Por otro lado la otra postura describe que los pacientes que desarrollan el SUH pueden estar clínicamente peor y tener más probabilidades de ser tratados con antibióticos, de modo que se observa una asociación aparente entre el uso de antibióticos y el SUH. El tratamiento con líquidos es relativamente simple porque las grandes pérdidas de volumen asociadas con deshidratación, no constituyen el cuadro típico de la enfermedad por ECEH. El principal desafío es el tratamiento de las complicaciones de la infección por ECEH, como el SUH, para las cuales están indicadas medidas de sostén, incluyendo diálisis si es necesario, debido al desarrollo de insuficiencia renal. La recuperación, en general es completa, si bien pueden producirse secuelas significativas en algunos pacientes, incluida la insuficiencia renal crónica que lleva a la necesidad de un trasplante (5, 25, 48).

II. MATERIAL Y METODOS

1.- MATERIAL.

Equipo.

UV Crosslinker (Hoefer Scientific Instruments).

Transiluminador de luz ultravioleta modelo TM-36 (UVP, Inc.).

Termociclador modelo 9600 (Perkin-Elmer Cetus).

Baño metabólico modelo 183 (Precision).

Microcentrífuga (Beckman).

Estufa a 37°C (Precision).

Espectrofotómetro modelo 360 (Beckman).

Balanza analítica R160D (Sartorius, Research).

Camara fotográfica Polaroid (Tominon, Copal)

Material.

Membranas de Nylon Z-Probe (Bio-Rad).

Micropipetas de 0.5, 10, 40 y 200 μ l (Labsystems)

Tubos para microcentrífuga de 0.5 y 1.5 ml (Eppendorf).

Selladora de plástico

Cajas Petri desechables (Technicare)

Reactivos.

Acido maleico (Sigma).

Alcohol etílico (J.T Baker).

Alcohol isoamílico (J.T. Baker).

Citrato de sodio (J.T. Baker).

Cloroformo, grado Biología Molecular (Sigma)

Cloruro de magnesio (Sigma).

Cloruro de sodio (Baker).

Dimetil formamida, grado Biología Molecular (Sigma).

Dodecil sulfato de sodio (SDS) (Sigma).

Estuche de marcaje de oligonucleótidos en la posición 3'terminal. (DIG Oligonucleotide 3'-End Labeling Kit. Boehringer Mannheim).

Estuche de detección de ADN. (DIG Nucleic Acid Detection Kit. Boehringer Mannheim).

Hidróxido de sodio (J.T. Baker).

Lauril sarcosinato de sodio, grado Biología Molecular (Sigma).

Tiocianato de guanidina, grado Biología Molecular (Sigma).

Tris HCl (Sigma).

Soluciones. (Ver anexo).

Cepas utilizadas.

a) Aislados y muestras clínicas.

El presente estudio se realizó con muestras diarreicas y ciento veintiocho cepas de *E. coli* obtenidas de 64 de estos episodios (dos colonias por muestra), los cuales se presentaron durante los meses de verano de 1993, en niños menores de 2 años provenientes de una comunidad suburbana al sur de la ciudad de México denominada San Pedro Mártir. Las cepas se obtuvieron a partir de colonias que se desarrollaron con morfología característica de *E. coli* (lactosa positivas) en medio de MacConkey y se confirmaron con bioquímicas convencionales.

Las muestras de heces se conservaron a -70°C desde el día de su recolección hasta el momento de ser utilizadas para la extracción del ADN.

b) De referencia.

Un total de 7 cepas de referencia se utilizaron como controles (tabla 1).

TABLA 1. CEPAS DE *E. coli* DE REFERENCIA UTILIZADAS COMO CONTROLES EN LOS ENSAYOS DE HIBRIDACION Y PCR.

Serotipo	Origen	Categoría	Hibridación de ADN	Producto de PCR
O157:H7	ATCC 933	ECEH*	POSITIVO	POSITIVO
O157:H7	Silvestre	ECEH*	POSITIVO	POSITIVO
O157:H7	Silvestre	ECEH*	POSITIVO	POSITIVO
N.C.	CDC	ECEI	NEGATIVO	NEGATIVO
O3:NM	CDC	ECEAgg	NEGATIVO	NEGATIVO
O127:H6	CDC	ECEP	NEGATIVO	NEGATIVO
O9:H4	CDC	HS*	NEGATIVO	NEGATIVO

N.C.= No conocido.

PCR= Reacción en cadena de la polimerasa

* Productoras de SLT-I y SLT-II.

*No enteropatógena.

2.- METODOLOGIA

A) Hibridación del ADN de colonias de *E. coli* "Colony blot".

La hibridación de colonias se dividió en dos partes; en la primera se realizó la estandarización del método, mientras que en la segunda se aplicó el método ya estandarizado a ciento veintiocho colonias de *E. coli* aisladas de 64 muestras diarreicas con el objetivo de identificar las pertenecientes al grupo de ECEH.

A.1. Estandarización

Fijación del ADN de colonias de *E. coli* a membranas de nylon.

Las colonias se sembraron por picadura en cajas de agar Luria y se incubaron durante 18 h a 37°C. Una vez obtenidas las colonias, se colocó una membrana de nylon sobre ellas manteniendo el contacto durante 5 min, posteriormente la membrana se retiró y depositó con las colonias hacia arriba sobre papel filtro impregnado de solución de lisis (0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl) por 15 min. Una vez realizada la lisis, la membrana se neutralizó colocándola sobre papel filtro impregnado de solución de neutralización (1.0 M Tris-HCl, pH=8; NaCl 1.5 M) por un período de 15 min. Por último, se secó la membrana a temperatura ambiente y se expuso por un lapso de 3 min a luz ultravioleta ($\lambda=312$ nm) "cross-linker" con el fin de fijar el ADN a la membrana (35).

Oligonucleótido utilizado para la hibridación de colonias.

La secuencia del oligonucleótido utilizado en la hibridación de colonias es homóloga a un segmento del gene de la subunidad A de la SLT-I (12) y difiere solamente en un oligonucleótido con respecto al gene de la SLT-II y SLT-III (tabla 2, figura 2 y figura 5). El oligonucleótido lo sintetizaron en el Instituto Nacional de Biotecnología (Cuernavaca, Mor.).

TABLA 2. SECUENCIA DEL OLIGONUCLEOTIDO UTILIZADO EN LA HIBRIDACION DE COLONIAS.

Oligonucleótido	Secuencia	Localización ^a
SLT(s) ^b	5'-ATACTGAATTGTCATCATCA-3'	1013-1032

^a La localización corresponde a la posición de las bases con respecto a la secuencia de los genes de la *slt-I* y *slt-II* (figura 5) (37).

^b Secuencia derivada de los genes de la *slt-I* y *slt-II* (figura 5) (9).

Marcaje del oligonucleótido.

Tanto el oligonucleótido utilizado para la hibridación de colonias como los utilizados para corroborar los productos de PCR se marcaron por el mismo método, consistiendo en la incorporación de un díeoxinucleótido marcado con digoxigenina (la digoxigenina es un hapteno, que puede ser inmuno-detectado por un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina) en el extremo 3' con ayuda de la enzima transferasa terminal.

Se adicionaron los siguientes reactivos en un microtubo (en hielo) siguiendo el mismo orden:

4 μ l	Amortiguador de reacción (Cacodilato de potasio, 1 mol/l; Tris-HCl, 0.125 mol/l; albúmina sérica bovina, 1.25 mg/ml; pH 6.6).
4 μ l	CoCl ₂ (25 mmol/l)
x μ l	Oligonucleótido (100 pmoles)
1 μ l	Sol. digoxigenina-11-ddUTP (1 mmol/l)
1 μ l	Transferasa terminal (50 U)
10-x μ l	H ₂ O
<hr/>	
20 μ l	Vol. final

Se centrifugó brevemente e incubó a 37°C durante 15 min. Posteriormente se colocó en hielo, se detuvo la reacción añadiendo 2 μ l de EDTA (0.2M; pH 8.0) y se adicionaron 28 μ l de agua destilada estéril. El oligonucleótido se almacenó a -20°C antes de ser diluído en el amortiguador de prehibridación.

Para estimar la cantidad de oligonucleótido marcado se procedió a semicuantificarlo de la siguiente forma. Se realizaron cuatro diluciones seriadas (de 1:10 a 1:10,000) del oligonucleótido marcado y de un oligonucleótido control (previamente marcado) cuya concentración se conoce (2.5 pmol/ μ l). Se colocó 1 μ l de cada dilución en una membrana de nylon en forma consecutiva y se fijó con luz ultra-violeta. Posteriormente se siguió el procedimiento de revelado de hibridación (ver más adelante) y una vez desarrollado el color de las diluciones del oligonucleótido control, se procedió a comparar la intensidad de color entre las diluciones del oligonucleótido marcado y las del control, determinando de esta manera la cantidad de oligonucleótido marcado (6).

Condiciones de hibridación.

Una vez obtenida la membrana con el ADN de las colonias, se colocó en una bolsa de plástico y se adicionó la solución de prehibridación (20 ml por cada 100 cm²). Se cerró por completo la bolsa y se incubó a 45°C durante 1 h. Concluída la incubación, se eliminaron los desechos celulares limpiando suavemente la superficie de la membrana con una gasa húmeda evitando que la membrana se seque. Se incubó nuevamente la membrana en solución de prehibridación a la misma temperatura durante 1 h y posteriormente se reemplazó la solución de prehibridación por la de hibridación (5 pmol del oligonucleótido por ml), utilizando 10 ml por cada 100 cm² de membrana e incubando durante toda la noche a 45°C (al final de la hibridación se conservó la solución a -20°C ya que se puede utilizar nuevamente).

Una vez concluida la hibridación se lavó la membrana dos veces con amortiguador SSC 5X durante 30 min a 45°C y una vez con amortiguador SSC 2X a temperatura ambiente durante 5 min (9).

Detección de la hibridación de ADN de *E. coli*.

Posterior a la hibridación, la membrana se lavó con amortiguador 1 durante 1 min para después incubarse durante 30 minutos a temperatura ambiente y con agitación en amortiguador 2, con el objeto de bloquear la membrana. Una vez concluido lo anterior, la membrana se incubó durante 30 min en amortiguador 2 con los anticuerpos anti-Digoxigenina conjugados con fosfatasa alcalina diluidos 1:5,000 (150 mU/ml). Finalizada esta incubación, los anticuerpos no unidos se eliminaron mediante dos lavados de 15 min cada uno con 100 ml de amortiguador 1. Por último, la membrana se equilibró con amortiguador 3 durante dos minutos y se incubó con substrato de color durante 1 a 2 horas en la obscuridad y sin agitación. (Se utilizaron 10 ml de substrato de color por 100 cm² de membrana).

Una vez que los controles se detectaron, la membrana se lava durante 5 min con amortiguador TE para detener la reacción. Debido a que las membranas pueden utilizarse para otros ensayos, la imagen se capturó por computadora para registrar los resultados.

REUTILIZACION DE LAS MEMBRANAS CON ADN DE *E.coli* FIJADO.

a) Desteñido.

Las membranas se incubaron en dimetil-formamida (DMF) a una temperatura de 50 a 60°C hasta que el color se disolvió, siendo en ocasiones necesario cambiar la solución. Se utilizaron aproximadamente 50 ml de DMF por cada 100 cm² de membrana. Una vez desteñidas, las membranas se lavaron con abundante agua y se procedió al desacoplamiento del

oligonucleótido (6).

b) Desacoplamiento del oligonucleótido de la membrana.

Se probaron tres diferentes métodos para desacoplar el oligonucleótido del ADN bacteriano, consistiendo cada una de ellos de los siguientes pasos.

1) La membrana se incubó a 37°C durante 1 h en solución desacoplante (formamida 30%, SDS 1%, Tris 10mM), y lavada con abundante agua (18).

2) Se realizó una incubación de 30 min a 37°C con solución desnaturalizante (0.2 N NaOH; 0.1% SDS), y 3 lavados de 15 min a temperatura ambiente con por lo menos 30 ml de una solución de SSC 2X por cada 100 cm² de membrana (6).

3) La membrana se lavó en dos ocasiones (durante 20 min c/u) con una solución de SDS 0.5% y SSC 0.1% a 95°C, posterior a la incubación, la membrana se enjuagó con bastante agua (30).

Las membranas se conservaron en amortiguador TE a 4°C hasta su reutilización.

Para utilizar nuevamente la membrana, sólo es necesario prehibridar durante 1 h antes de hibridar nuevamente.

A.2. Detección de ECEH en cepas aisladas de muestras clínicas.

Una vez estandarizado el método, se probaron las 128 cepas de *E. coli* provenientes de muestras diarreicas, con la finalidad de determinar aquéllas pertenecientes a la categoría de ECEH. Se utilizó como control positivo la cepa 933 y como controles negativos cepas de ECEI, ECEAgg, ECEP, ETEC y una *E. coli* no enteropatógena. Se inocularon 36 cepas por cada caja Petri en hileras de 6 x 5, y se transfirieron a membranas de 7 x 5 cm.

HIBRIDACION DE ADN DE COLONIAS DE ECEH.

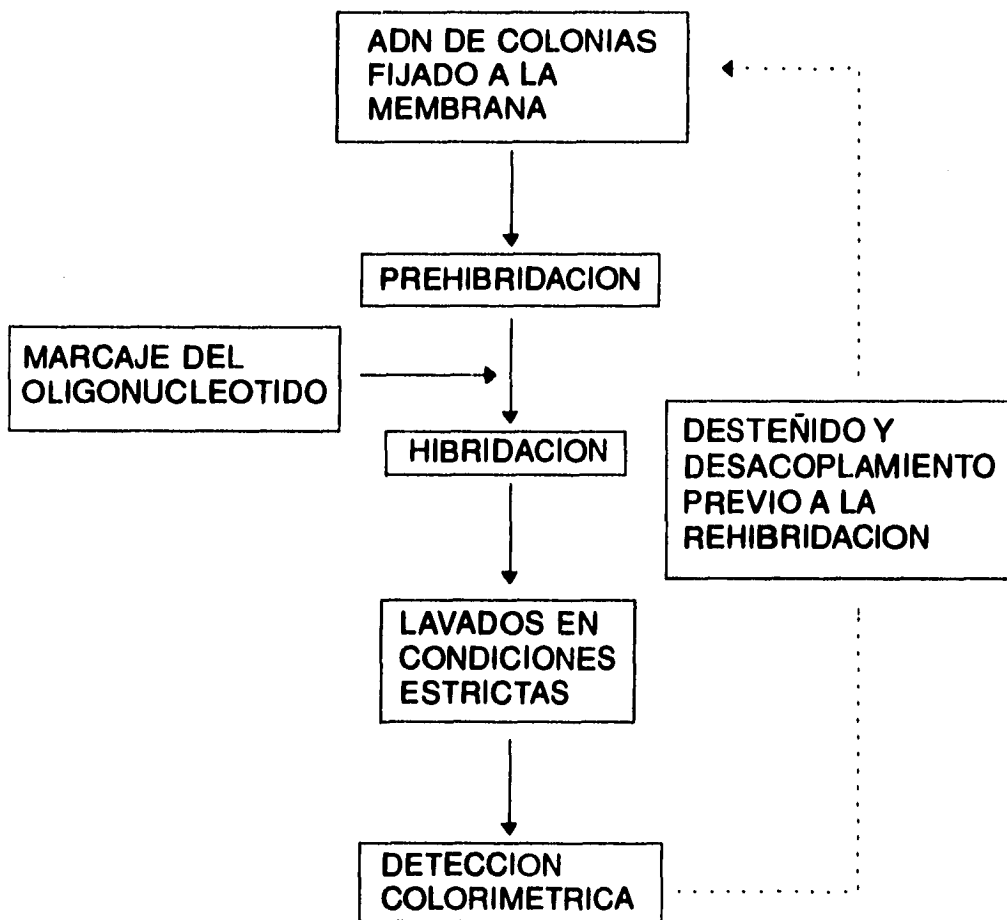


Figura 1.

REGIONES UTILIZADAS EN LAS HIBRIDACIONES DENTRO DEL OPERON DE LAS SLTs.

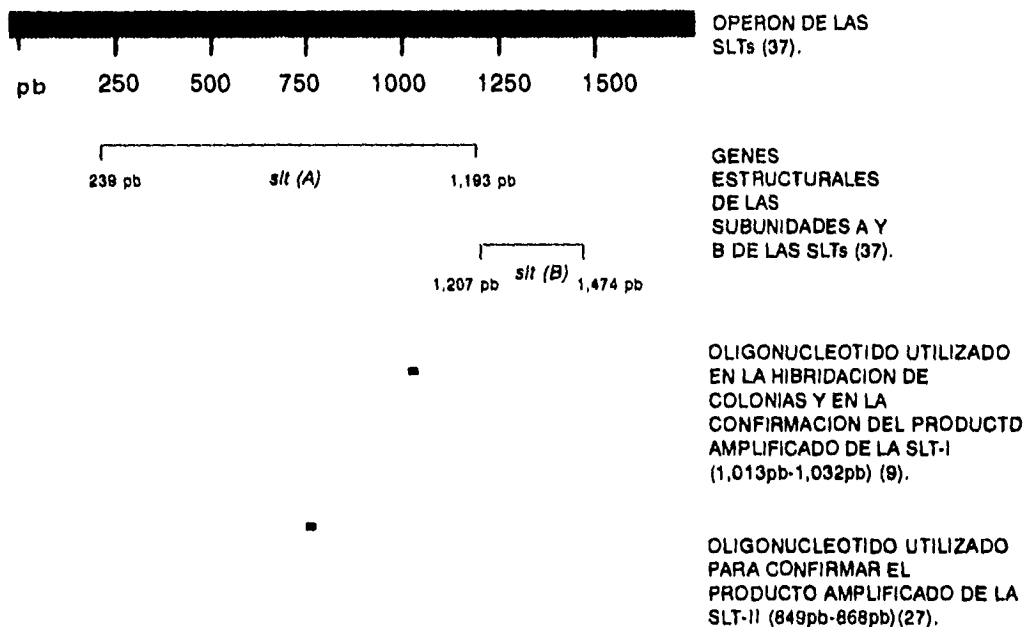


Figura 2

B) Amplificación por PCR de fragmentos de los genes que codifican para la SLT-I y SLT-II de ECEH.

Para los ensayos de PCR, primeramente se calculó la sensibilidad del método tanto con ADN de cepas puras como de muestras fecales a las que se les adicionó la cepa control y, posteriormente, se aplicó a muestras clínicas.

En la última parte del trabajo de PCR, se extrajo ADN de 10 muestras diarreicas (nueve negativas por hibridación de colonias y una positiva) para analizarlas por PCR.

Los productos de PCR se confirmaron mediante hibridación con oligonucleótidos específicos marcados con digoxigenina (9, 27).

B.1. Estandarización.

Extracción de ADN total de cepas de *E. coli*.

La cepa 933 se cultivó en 10ml de caldo Luria durante 18h a 37°C con agitación, posteriormente el cultivo se centrifugó durante 5 min a 6,000 rpm y se resuspendió en 500 µl de una solución 5M de tiocianato de guanidina (EDTA 0.1 M), transfiriéndose posteriormente a un microtubo con 25 µl de lauril sarcosinato de sodio al 10%. Se incubó durante 10 min a temperatura ambiente y se adicionaron 250 µl de acetato de amonio (7.5M) frío, incubándose durante 10 min a 4°C. Una vez concluido lo anterior se añadieron 550 µl de una solución de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), se agitó durante 5 min y se centrifugó durante 15 min a 14,000 rpm; se separó la fase acuosa (superior) en otro microtubo y se agregó 0.54 de su volumen de isopropanol, se homogenizó invirtiendo varias veces hasta observar la formación de un precipitado (ADN). Una vez formado el precipitado, se centrifugó a 14,000 rpm durante 30 s, se lavó con 1.5 ml de etanol al 70%, se seco el precipitado y se resuspendió en 200 µl de agua destilada estéril. Por último, se trató con 3µl de RNAasa (10 mg/ml) durante 30 minutos a 37°C,

se precipitó nuevamente con isopropanol y se resuspendió en 200 μ l de agua destilada estéril (18).

Cuantificación del ADN por espectroscopía.

Una vez obtenido el ADN se cuantificó por espectroscopía a 260 nm. A esta longitud de onda una absorbancia de 1.0 indica la presencia de 50 μ g/ml de ADN de doble cadena. Se utilizó como blanco agua destilada estéril (18).

Extracción del ADN de heces.

Como paso inicial, se trató de obtener la mayor cantidad de paquete bacteriano extraído de heces por medio de centrifugaciones a alta y baja velocidad. Posteriormente, se realizó la extracción del ADN mediante el método de tiocianato de guanidina (7, 43).

Aproximadamente, 0.1 g de heces se resuspendieron en 1 ml de solución salina amortiguada con fosfatos (SSAF), se homogenizó en vortex durante 5 min y posteriormente se centrifugó a 1,000 rpm durante 3 min con la finalidad de eliminar las partículas de mayor tamaño. El paquete obtenido se lavó nuevamente con 1 ml de SSAF en dos ocasiones más, centrifugándose a 1,000 rpm por 3 min; los sobrenadantes se iban centrifugando a 14,000 rpm durante 5 min, se eliminaba el sobrenadante y se resuspendían con el sobrenadante siguiente con el objetivo de obtener un sólo paquete final, el cual, se resuspendió en 1 ml de PBS y se sometió a dos lavados más, uno a 1,000 y otro a 14,000 rpm durante 3 min, respectivamente.

Una vez obtenido el paquete bacteriano, se adicionaron 350 μ l de una solución de tiocianato de guanidina (tiocianato de guanidina 5 M, EDTA 0.1 M), se homogenizó con vortex durante algunos segundos y se agregaron 30 μ l de sarcosinato de sodio al 10%, nuevamente se homogenizó e incubó 10 min a temperatura ambiente. Posterior a la incubación se añadieron

250 μ l de acetato de amonio (7.5 M) frío y dejó reposar en hielo durante 10 min. A continuación se agregaron 550 μ l de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y se agitó suavemente durante 5 min, se centrifugó durante 20 min a 14,000 rpm y se extrajo la fase acuosa. Se adicionó 0.54 del volumen obtenido de isopropanol, se agitó suavemente e incubó toda la noche a -20°C . Se centrifugó a 14,000 rpm en frío y el precipitado obtenido se lavó con etanol (frío) al 70%. Se secó y se resuspendió en 50-100 μ l de agua destilada estéril.

Posterior a la extracción, se analizaron 3 μ l de la solución en un gel de agarosa al 7% para verificar la presencia de ADN, su integridad, y la cantidad de ARN presente. También se cuantificó espectrofotométricamente (18).

Reacción en cadena de la polimerasa para la detección de los genes que codifican para la SLT-I y SLT-II.

A) Cebadores.

Se utilizaron dos pares de cebadores que amplifican segmentos de los genes que codifican para la SLT-I y SLT-II en una sola reacción (tabla 3, figura 4 y figura 5.).

TABLA 3. CEBADORES UTILIZADOS EN LA PCR.

Cebador	Secuencia	Localización ^a
5' SLT-I ^b	5'-AAATCGCCATTCGTTGACTACTTCT-3'	691-715
3' SLT-I ^b	5'-TGCCATTCTGGCAACTCGCGATGCA-3'	1033-1057
5' SLT-II ^c	5'-CAGTCGTCACCTCACTGGTTTCATCA-3'	691-715
3' SLT-II ^c	5'-GGATATTCTCCCCTCTGACACC-3'	950-973

^a La localización corresponde a la posición de las bases con respecto a la secuencia de los genes de la *slt-I* y *slt-II* (figura 5) (37).

^b Secuencia derivada de los genes de la *slt-I* (figura 5) (7).

^c Secuencia derivada de los genes de la *slt-II* (figura 5) (7).

B) Condiciones utilizadas en la estandarización de la PCR.

Como ya se mencionó, la amplificación de los genes que codifican para cada una de las toxinas se realizó en una sola reacción (7). En cada ensayo se utilizaron 5 µl de ADN (aproximadamente 125 ng para muestras de heces sin diluir y 2.5 ng para muestras diluidas 1:50; en el caso de ADN de cepas puras se utilizó 1 ng) que se adicionaron a 45 µl de la mezcla de reacción, la cual contenía 20 pmol de cada cebador, deoxinucleótidos (dATP, dCTP, dTTP y dGTP) a una concentración de 200 µM cada uno, amortiguador de reacción (Tris-HCl, 10 mM pH 8.3; KCl, 50 mM; MgCl₂, 1.5 mM y gelatina al 0.001%) y 1.5 U de enzima Taq polimerasa (Perkin-Elmer Cetus). A cada reacción se le adicionó una gota de aceite mineral para evitar la evaporación. El proceso se inició con un paso de desnaturalización a 94°C durante 5 min, para posteriormente realizar 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 60°C y 45 s a 72°C. Un último paso consistió en una incubación a 72°C durante un lapso de 7 min (figura 3).

Se analizaron diez microlitros de la mezcla de reacción simultáneamente con un marcador

de peso molecular (Φ X-174 digerido con *Hae III*) por electroforesis en gel de agarosa (2% NuSieve [FMC, Rockland, Maine]; 1.0% agarosa [Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, Md.]) teñidos con bromuro de etidio (0.5 μ g/ml). Los geles se fotografiaron con filtro rojo bajo iluminación con luz ultravioleta. La presencia de una banda de 370 pb y otra de 283 pb indican la amplificación de los genes *slt-I* y *slt-II*, respectivamente.

Sensibilidad del PCR.

La sensibilidad del PCR se determinó en dos formas, en la primera se extrajo ADN de un cultivo puro de la cepa 933 de ECEH, se cuantificó el ADN y se realizaron diversas diluciones del mismo para determinar la mínima cantidad que podría detectar la reacción en cadena de la polimerasa. En la segunda se inocularon muestras normales de heces con cantidades conocidas de ECEH, se les extrajo el ADN y se sometieron a la PCR, calculando de esta manera la cantidad mínima de ECEH presente en muestras de heces que puede detectarse por PCR.

A) Con ADN puro.

Se obtuvo ADN de un cultivo puro de la cepa 933 por el método de tiocianato de guanidina, se cuantificó y se realizaron diluciones con el objeto de amplificar diversas concentraciones de ADN (1 ng, 500 pg, 10 pg, 5 pg, 1 pg y 500 fg) por PCR y determinar cuál es la mínima cantidad de ADN puro que puede amplificarse.

B) Con ADN extraído de heces previamente inoculadas con la cepa 933.

Para realizar las inoculaciones de las heces, se cultivó la cepa 933 en agar Luria durante 18 h para posteriormente resuspenderse en solución salina isotónica hasta alcanzar una absorbancia de 0.1 a 600 nm (aprox. 10^7 UFC/ml). Se realizaron diluciones seriadas de la misma

(de 10^{-1} a 10^{-4}) y por último se tomaron alícuotas de cada dilución para inocular las heces. También se tomaron alícuotas para realizar conteo en placa y calcular la concentración inicial de bacterias en la suspensión. A cada muestra de heces inoculada, así como a la muestra sin inocular, se les extrajo el ADN en la forma ya descrita y se utilizaron en PCR con el fin de determinar la mínima cantidad de ECEH que puede detectarse en heces.

Hibridación de los productos de PCR "slot-blot" para determinar la especificidad de la reacción.

Oligonucleótidos utilizados para confirmar el producto de PCR

El oligonucleótido utilizado para detectar el producto amplificado del gene que codifica para la SLT-I es el mismo que el utilizado para la hibridación de colonias, ya que esta región no se amplifica en el gene de la SLT-II por los cebadores utilizados (tabla 2, figura 2 y 5).

La secuencia del oligonucleótido utilizado para detectar el producto amplificado de la SLT-II se encuentra en una región de baja homología entre ambas toxinas, por lo que no hibrida con el producto amplificado de la SLT-I (tabla 4 y figura 2 y 5).

TABLA 4. OLIGONUCLEOTIDO UTILIZADO EN LA CONFIRMACION DEL PRODUCTO AMPLIFICADO DE LA SLT-II.

Oligonucleótido	Secuencia	Localización'
SLT-II ^a	5'-TCTGAAACTGCTCCTGTGTA-3'	849-868

La localización corresponde a la posición de las bases con respecto a la secuencia de los genes de la *slt-I* y *slt-II* (figura 5) (37).

^a Secuencia derivada de los genes de la *slt-II* (figura 5) (27).

Fijación del ADN a las membranas.

Los productos de PCR se desnaturalizaron con una incubación de 5 min a 94°C y un

enfriamiento brusco en hielo. Se tomaron 10 μ l de la mezcla de reacción desnaturalizada, se colocaron en la cámara de "slot-blot" para filtrarse a través de una membrana de nylon y se realizó vacío durante 1 hora. Por último el ADN se fijó a las membranas por exposición a luz ultravioleta durante 3 min.

Hibridación de los productos de amplificación de la SLT-I y SLT-II.

Para el producto amplificado de la SLT-I, se hibridó siguiendo las mismas condiciones de temperatura y lavados a las realizadas para la hibridación de colonias, mientras que para la hibridación del producto de la SLT-II, la prehibridación e hibridación se llevaron a cabo a una temperatura de 50°C; se realizaron tres lavados, dos con SSC 5X-SDS 0.2% a 30°C durante 10 min y uno último a 50°C durante 5 min. La concentración del oligonucleótido en la solución de hibridación fue de 5 pmol/ml. Los pasos de revelado fueron los mismos que los realizados en la hibridación de colonias (6, 9, 27, 52).

PCR PARA LA DETECCION DE ECEH EN CULTIVO PURO Y HECES.

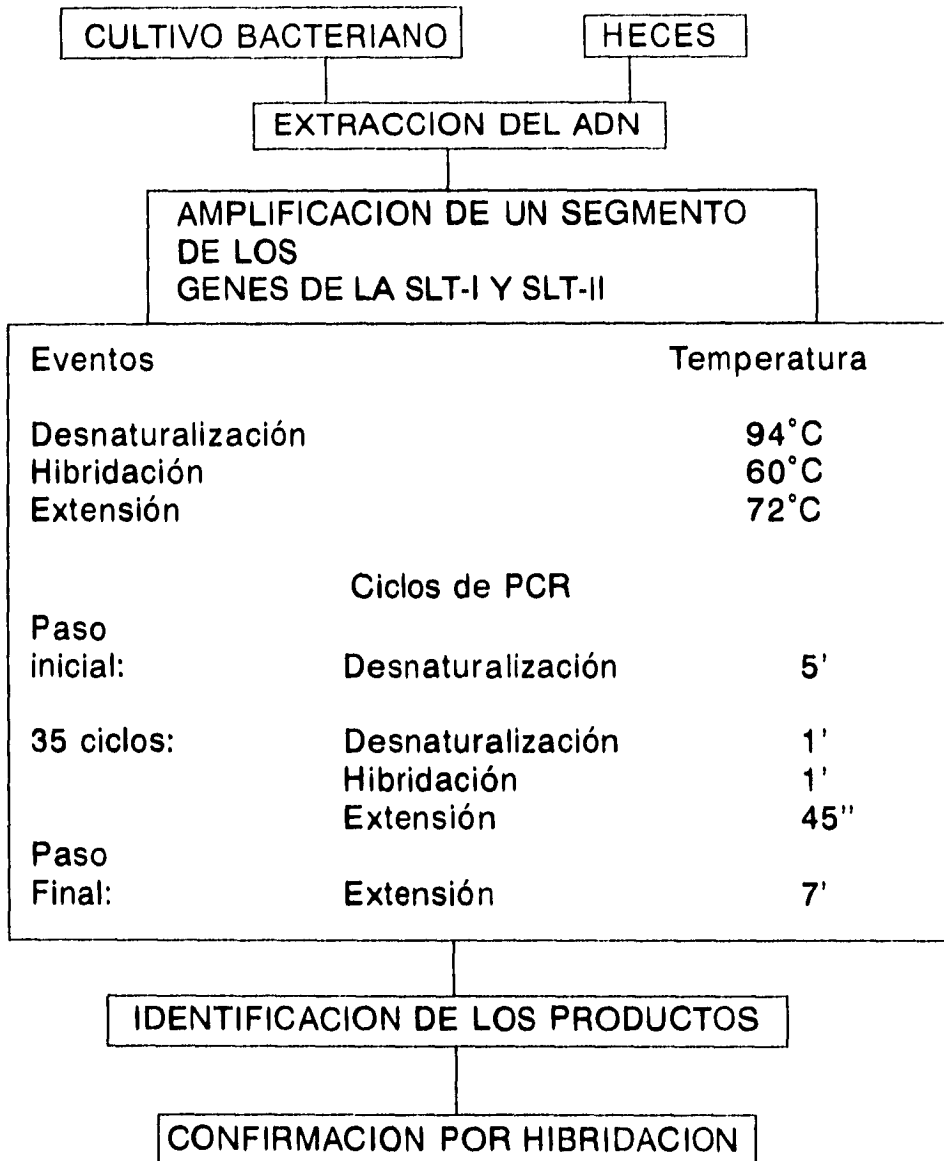


Figura 3

REGIONES AMPLIFICADAS DEL OPERON DE LAS SLTs.

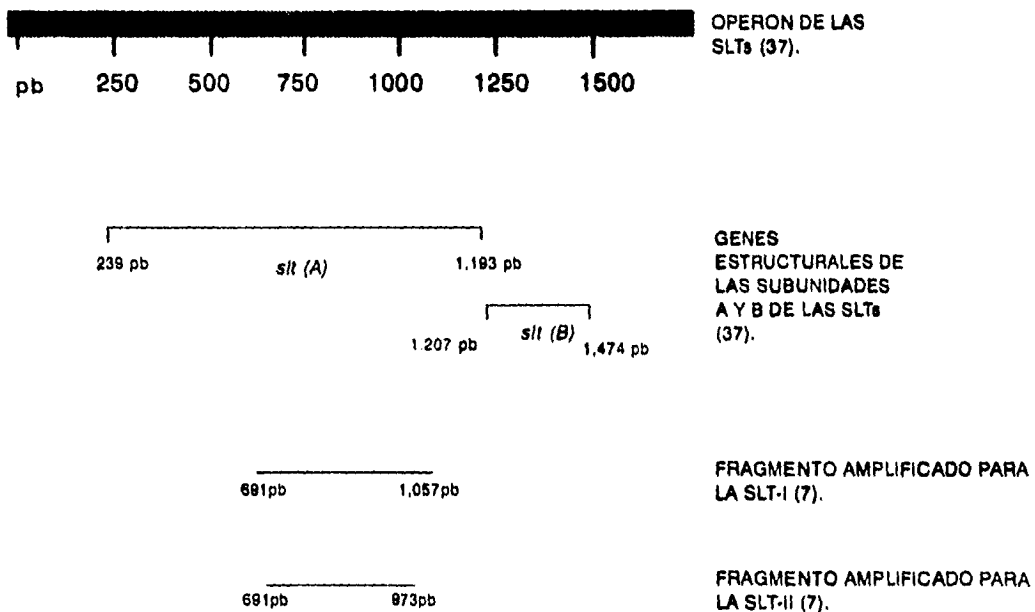


Figura 4

C G

ATCGCATAGCTCATCGGAACAAGCTCAAGCGGTCTCCGGTCGAGTCCTCATGCGTCCATTATCTGCATTATGCGTTGTTA 80

A CAGATAT TT AG TTGCA TC TT A TAT A T TCAT TC T A GT TTGITACGTT CCGG GCG 160
GCTCAGCCGGACAGAGCAATTCGCTTCGAGCAATCGGICACTGGTTGCAATCCAGTACAACGCCCATATTTATTATACC

C TAAAA GCCGTTCCTT AGGGCGT GGA TT AA AATATAGTTATCG TGGTGCT GGA TTGTGTA 240
AGGCTCGCTTTTGGCGGCCCTTTTATATCTGCGCCGGTCTGGTGCTGATTACTTCAGCCAAAAGGAACACCTGTATAT

AATA TATT G GT C ACT TTT C TG TATC AGTTAATGTGGTGG GAA A CT 320
GAAGTGATATATTATTTAAATGGGTACTGTGCTGTTACTGGGTTTTCTTCGGTATCCCTATTCGCCGGAGTTTACGATAG

C TGC AAGACG AGA C G GTC T CT T CA GGT T AT AC GAC T A 400
ACTTTTCGACCCAAACAAAGTTATGTCTCTTCGTTAAATAGTATACGGACAGAGATATCGACCCCTCTTGAACATATATCT

TCA AGGT G TT ACTGA G GATAGTGG TCA GGATA TTG A T G CA A A GC 477
CAGGGGACCACATCGGTGCTGTTTAAACACACCACGGCAGTTATXXXTTTGGCTGIGGATATACGAGGGCTTGATGT

AG GG A G G A TA A G T G A G A A A T C G A A 557
CTATCAGCGCGTTTTGACCATCTTCGCTGATTTAGGCAAAATAATTTATATGTGGCAGGGTTCGTTAATACGGCAA

AT GT T T C G T T G TA CT T A ACA G A AT T TGGT T 637
CAAATACTTTCTACCGTTTTTTCAGATTTTACACATATATCAGTGGCCGGTGTGACAAACGGTTCCATGACAAACGGACAGC

C GT A G T G A CAGT A G G G A A C T GT A C A T T 717 C₁I
AGTTATACCCTCTGCAACGCTGCGCAGCGTGGAAACGTTCCGGAAATGCAAAATCAGTCGCTACTCAGTGGTTTCATATA C₁II

AT TC CAT A CCT C CGAGTC TGG A GA GT A G T G 797
TCTGGCGTTAATGGAGTTCAGTGGTAATACAAATGACAGAGATGATCCAGAGCAGTTCGCGTTTTGTCCTGTCCACAG

T T T TC A G G ACAA GA TCTC G GG G TCT GTA 874 O-II
CAGAAGCCTTACGCTTACGGCAGATACAGAGAGAATTCGTCAGGCACCTGCTGAA+++ACTGCTCCTGTGTATACGATG

TG T A T T T T AT AA GT G T GC C G T C AT C A CTC 954 C₁II
ACGCCGGAGACGTGGACCTCACTCTGAACTGGGGGGCAATCAGCAATGTGCTTCGGGAGTATCGGGGAGAGGATGGTGT

TC T A A T T GGA GC TAAT A T A GC AT A T 1034 O-S
CAGAGTGGGGAGAAATATCCCTTAAATAATATATACAGCGATACTGGGGACGTGGCCGTTATACTGAAATTCATCATCAGG

CAT AGT CCA AATG CATC T TT CTT TATG C GC GA AAGATC G GG T CGCAC 1114 C₁I
GGCGCGTTCGTTCGCGCCGTAATGAAGAGATCAACCAGAAATGTCAGATAACTGGCGACAGCCCTGTTATAAAAATA

T A T G TTCATCC TCTG GG AA TGC C GAACATTAGCAGT GA GG 1194
AACAAACATATATGGGAAGTAATACAGCTGCAGCGTTTTCTGAACAGAAAGTCAAGTTTTTATATACACCGGGTAAATA

A A CATTA A A T CA CGC T TTT A CA G GC A CCT 1268
AAGGAGTTAAGCATGAAGAAGATG+++TTTTATGGCGTTTTATTGTCATTAGCTTCTGTTAATGCAATGCCGCG+++GA

TA CT A GG G A A A A T C T C T A G GT AT TA 1348
TTGTGCTAAAAGGTAATATGAGTTTTCCAAAGTATAATGAGGATGACACATTTACAGTGAAGTTCCACGGGAAGAAATACT

TT ACA A T GT TC T T TC G AA T G G A C T A T A G 1428
GGACCAGTCGCTGGAATCTGCAACCGTTACTGCAAGTGTCTCAGTTGACAGGAATGACTGTCACAATCAATCCAGTACC

C TAAT AGGG CAGC TATT CG TGACT A ATAGCTCAG AAATA CAGGCAGA ATT 1508
TCTGAATCAGCCTCCGGATTTGCTGAAGTGCAGTTTAAATAATGACTGAGGCATAACCTGATTCGTGTTATGTGGGTAACA

TAAA GT AAA ACAT TCAATTCAGTCAG TGTT CC GT C G T A AGATG G TAG

AGTGTAATCTGTGTCACAATTCAGTCAGTTTGACAGTTGCTGTCAGACTGAGCATTGTGTTAAAAATTTCCGATGGTGA 1588

ATCCCCCTGTGTGGGGGACTGGTGA AAAATCCTTGCTTGTGATTCATTATCGACACGGGTTCCGGTGGTACC 1651

Figura 5. Secuencia de ADN del gene de la SLT-II. La secuencia se compara con la secuencia de la SLT-I. La secuencia de la SLT-I se encuentra sobre la secuencia de la SLT-II sólo en donde difieren sus bases (37).

- C₁I Cebador inicial para la amplificación de la SLT-I.
- C₂I Cebador final para la amplificación de la SLT-I.
- C₁II Cebador inicial para la amplificación de la SLT-II.
- C₂II Cebador final para la amplificación de la SLT-II.
- O-S Oligonucleótido utilizado en la hibridación de colonias y en la confirmación del producto amplificado de la SLT-I.
- O-II Oligonucleótido utilizado para confirmar el producto amplificado de la SLT-II.

Especificidad de la PCR.

La especificidad de la PCR se confirmó amplificando el ADN de las siguientes cepas e hibridando los productos obtenidos con los oligonucleótidos específicos para cada producto por separado en dos membranas diferentes. 1.- *E. coli* productora de SLT-I, 2.- Cepa 933, 3.- ADN de muestra de heces positiva por hibridación de colonias, 4.- *E. coli* aislada de heces y positiva por hibridación de colonias y 5.- *Shigella dysenteriae*. En el caso de la cepa 933 se realizaron 3 diferentes amplificaciones, una con los dos pares de iniciadores y las otras dos con solo un par de los mismos (un par diferente para cada reacción), con el objetivo de amplificar solamente un gene por reacción y verificar de esta forma si no hay una amplificación inespecífica entre un par de cebadores y el gene que no es amplificado por los mismos.

B.2. Detección de ECEH por PCR en muestras de heces diarreicas.

A 9 muestras de heces diarreicas negativas por hibridación de colonias y a una positiva por el mismo método se les extrajo el ADN con el fin de analizarse por PCR y determinar si alguno de estos episodios pudo deberse a una infección por ECEH y, al mismo tiempo, tratar de establecer si el PCR era más sensible que la hibridación de colonias, lo cual no necesariamente se logrará, ya que estas muestras tienen una alta probabilidad de ser negativas por ambos métodos debido a que no tienen las características de una infección por ECEH.

III. RESULTADOS

4.1 Hibridación del ADN de colonias de *E. coli*.

a) Cuantificación del marcaje del oligonucleótido.

TABLA 5. SEMICUANTIFICACION DEL OLIGONUCLEOTIDO MARCADO.

Concentración del oligonucleótido control.	Dilución del oligonucleótido marcado.	Presencia de señal después de 30 min de revelado.
0.25 pmol/ μ l	1:10	POSITIVA
0.025 pmol/ μ l	1:100	POSITIVA
2.5 fmol/ μ l	1:1,000	POSITIVA
0.25 fmol/ μ l	1:10,000	POSITIVA

Al realizar la semicuantificación del oligonucleótido marcado, se observó que las cuatro diluciones realizadas dieron una señal muy similar a las diluciones del oligonucleótido control, por lo que se estimó una concentración aproximada de 2.5 pmol/ μ l del oligonucleótido marcado, determinando que se marcaron casi en su totalidad los 100 pmol del mismo.

b) Especificidad del oligonucleótido utilizado en la hibridación de colonias.

Al hibridar el ADN de colonias de 3 diferentes cepas de *E. coli* enterohemorrágica y otras 4 categorías de *E. coli* enteropatógenas y 1 no enteropatógena con el oligonucleótido SLTs, solamente resultaron positivas las cepas de *E. coli* pertenecientes a la categoría de ECEH, no importando la ubicación de las mismas dentro de la membrana (figura 6).

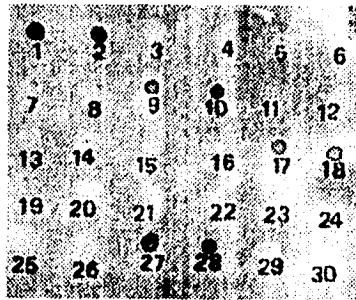


FIGURA 6. ESPECIFICIDAD DE LA HIBRIDACION DE COLONIAS.

En las posiciones: 1 y 2 ECEH cepa 933; 9 y 10 ECEH O157:H7; 17 y 18 ECEH O157:H7; 27 y 28 ECEH productora solamente de SLT-I; 5, 6, 21 y 22 ECEP; 7, 8, 23 y 24 ECEAgg; 3, 4, 15 y 16 ECEI; 13, 14, 19, 20, 29 y 30 ECET y 11, 12, 25 y 26 *E. coli* no enteropatógena (HS).

c) Reutilización de las membranas.

El método más adecuado para desacoplar el oligonucleótido del ADN de las colonias con el fin de utilizar nuevamente las membranas, fue el de NaOH/SDS, ya que se logró obtener la misma intensidad de señal en los controles positivos en posteriores hibridaciones. Una misma membrana se probó hasta cuatro veces obteniendo una señal adecuada y sin presentar reacción de fondo o inespecífica.

d) Detección de ECEH en cepas aisladas de muestras clínicas.

De las 128 cepas aisladas de episodios diarreicos, sólo una fue positiva por hibridación

de colonias, lo que representa que sólo 1 muestra de 64 (1.56%) se le identificó una ECEH como posible causa de la diarrea, al no ser identificado ningún otro enteropatógeno de importancia.

4.2 Extracción de ADN y PCR.

a) Extracción de ADN de cultivos bacterianos puros.

El método utilizado (tiocianato de guanidina) permitió obtener ADN en cantidades adecuadas (de 20 a 30 μ g) y con buena pureza; lo anterior se determinó tanto espectrofotométrica como electroforéticamente en gel de agarosa al 0.8% (figura 7).

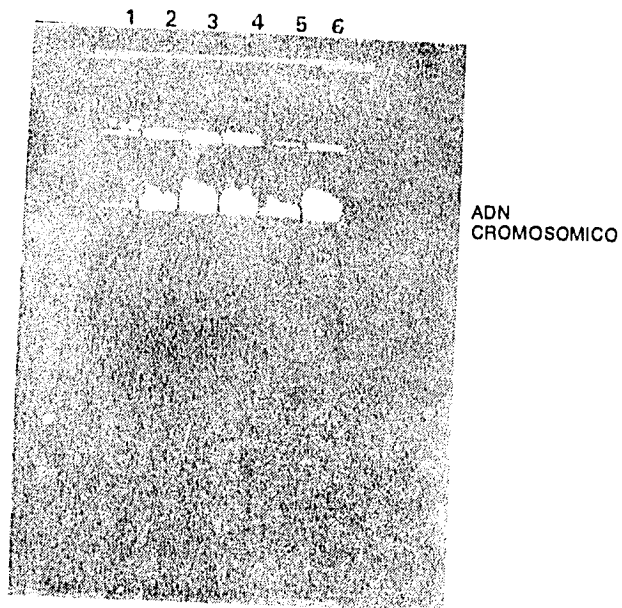


FIGURA 7. ADN EXTRAIDO DE CEPAS PURAS DE *E. coli*.

Gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio. En los carriles: 1) *E. coli* no enteropatógena, 2) ECEH 933, 3) ECEH O157:H7 silvestre, 4) ECEP, 5)ECEI y 6) ECEAgg.

c) Especificidad del PCR

Se amplificó 1 ng de ADN de diferentes cepas de *E. coli* enteropatógenas y una no enteropatógena, obteniéndose amplificación de un producto de 370 pb y otro de 283 pb (que indican la presencia del gene de la SLT-I y de la SLT-II respectivamente) en la cepa de ECEH 933 (figura 8).

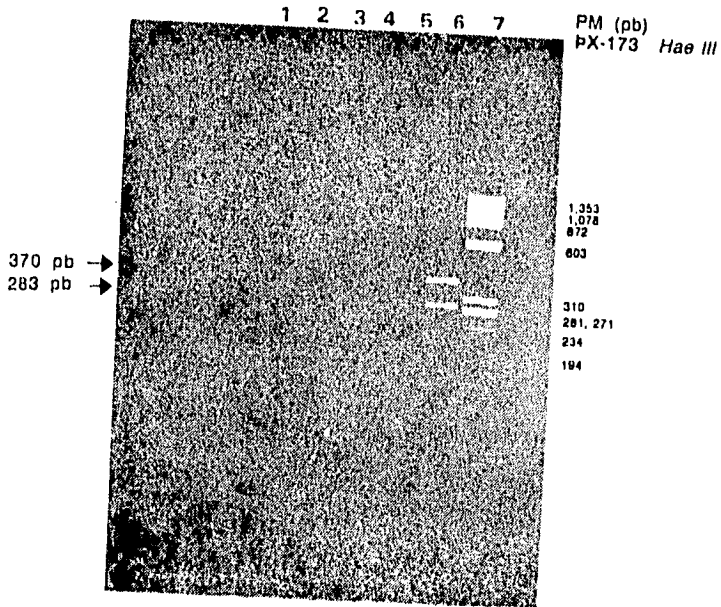


FIGURA 8. ESPECIFICIDAD DEL PCR.

En los carriles: 1) Control negativo, 2) ECEAgg, 3) ECEI, 4)ECEP 5)HS, 6)ECEH 933 y 7)Marcador de peso molecular (ϕ X-174 digerido con *Hae III*).

d) Sensibilidad del PCR.

La amplificación de los segmentos de 370 pb (SLT-I) y 283 pb (SLT-II) se detectó hasta una concentración de 500 fg de ADN de la cepa 933 de ECEH en un gel al 2% teñido con bromuro de etidio (figura 9).

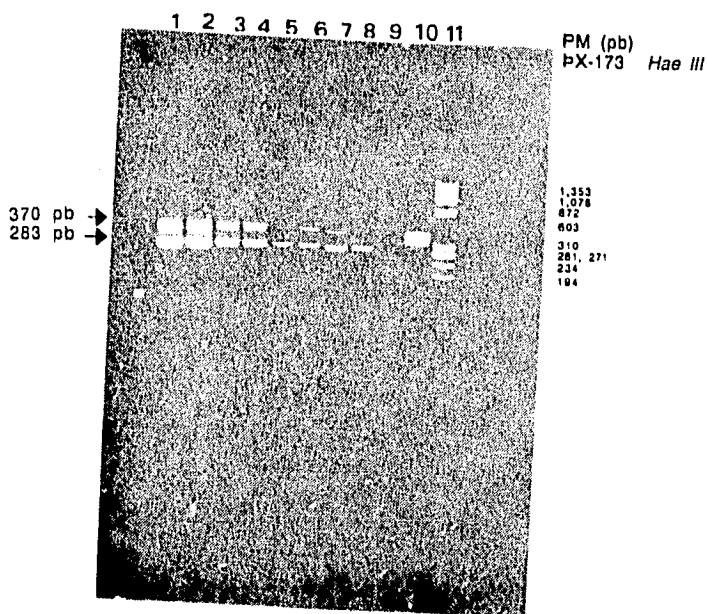
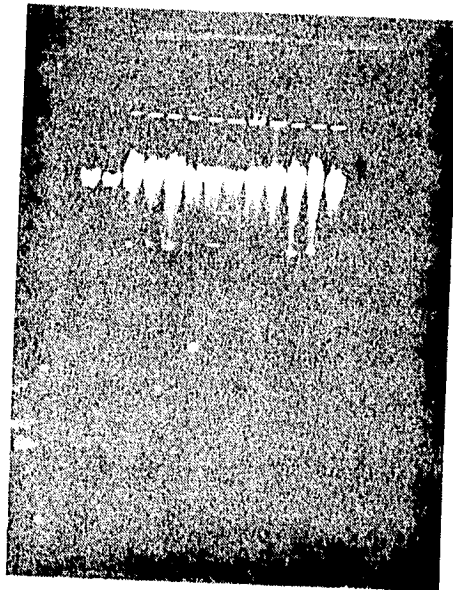


FIGURA 9. SENSIBILIDAD DEL PCR PARA DETECTAR LOS FRAGMENTOS DE 370 Y 283 pb EN ADN DE ECEH.

En los carriles: Muestras de PCR de diferentes concentraciones de ADN de la cepa 933; 1) 1 ng, 2) 500 pg, 3) 10pg, 4) 5 pg, 6) 500 fg, 7) y 8) Control positivo, 9) Control negativo, 10) ECEH productora de SLT-I, y 11) Marcador de peso molecular (ϕ X-174 digerido con *Hae III*).

e) Extracción de ADN de heces.

Con el método utilizado se logró obtener una cantidad aceptable de ADN tanto cuantitativa (3 - 8 μ g) como cualitativamente, determinado en forma espectrofotométrica y en geles de agarosa al 0.8% (figura 10).



ADN BACTERIANO
PROVENIENTE DE HECES

FIGURA 10. EXTRACCION DE ADN DE MUESTRAS DE HECES

En todas los carriles se muestra ADN extraído de heces.

f) Sensibilidad del PCR en muestras de heces inoculadas con ECEH.

La amplificación de ADN bacteriano extraído de heces inoculadas con ECEH (933) se detecta en geles de agarosa al 2% hasta una cantidad aproximada de 3,000 UFC/mg de heces (figura 11).

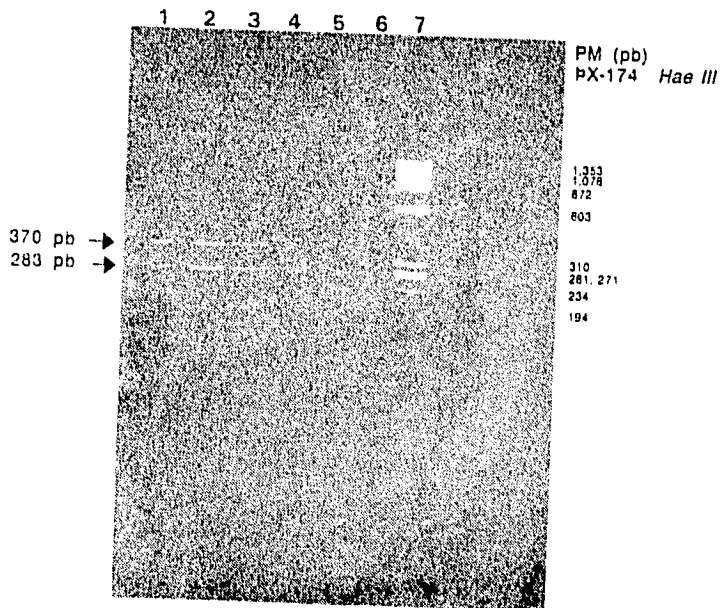


FIGURA 11. AMPLIFICACION DE ADN BACTERIANO PROVENIENTE DE HECES INOCULADAS CON ECEH.

En los carriles: Muestras de PCR de ADN de heces inoculadas con cantidades conocidas de ECEH. 1) 5×10^4 UFC/mg, 2) 10^4 UFC/mg, 3) 8×10^3 UFC/mg, 4) 3,000 UFC/mg, 5) 10^3 UFC/mg, 6) Control negativo y 7) Control de peso molecular.

g) Especificidad de la PCR.

Los productos de PCR hibridaron en forma positiva con ambos oligonucleótidos cuando la reacción dió positiva para ambos genes. Cuando la reacción se llevó a cabo con un solo par de cebadores, la hibridación fue positiva solo con el oligonucleótido homólogo al gene amplificado. En el caso de cepas que sólo producen SLT-I la hibridación únicamente fue positiva para el oligonucleótido correspondiente (figura 12).

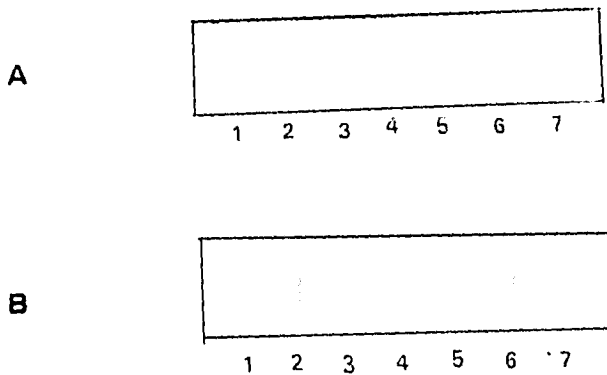


FIGURA 12. A) DOT BLOT DE LOS PRODUCTOS DE PCR HIBRIDADOS CON EL OLIGONUCLEOTIDO HOMOLOGO A LA SLT-I. B) DOT BLOT DE LOS PRODUCTOS DE PCR HIBRIDADOS CON EL OLIGONUCLEOTIDO HOMOLOGO A LA SLT-II.

En las líneas: 1) Amplificación de la cepa 933 con los primers de la SLT-I. 2) Amplificación de la cepa 933 con los cebadores de la SLT-II. 3) *E. coli* productora de SLT-I. 4) *E. coli* positiva por hibridación de colonias. 5) PCR de ADN de *S. dysenteriae*. 6) Cepa 933 amplificada con ambos cebadores. 7) Control negativo (ADN de fago λ).

h) PCR de muestras diarreicas.

Las 9 muestras de heces negativas por hibridación de colonias y analizadas por PCR, dieron un resultado negativo tanto en el corrimiento electroforético como en la hibridación del producto amplificado. El ADN de la muestra de heces positiva por hibridación de colonias dió tanto la amplificación como la hibridación de los productos amplificados positivos para los genes de la SLT-I y SLT-II, mientras que la cepa aislada de esta muestra (y positiva por hibridación de colonias) dió un PCR positivo sólo para el gene de la SLT-I.

IV. DISCUSION

La falta de métodos accesibles y prácticos para la identificación de ECEH ha sido una de las probables causas por las que no se ha estudiado su prevalencia en México en forma constante y adecuada. Los estudios realizados hasta ahora han utilizado métodos de hibridación con sondas radioactivas (4, 12), ensayos de citotoxicidad (54, 13) o se han limitado a la búsqueda de un serotipo específico (O157:H7) (54), lo que ha restringido el número de trabajos y sus resultados. De lo anterior, surgió la inquietud por modificar la técnica de hibridación de ácidos nucleicos de colonias bacterianas y hacerla más accesible al utilizar un marcaje no radioactivo, pero sin sacrificar la sensibilidad del método, así como, utilizar el método de amplificación en cadena de la polimerasa en cepas puras y heces para la detección de ECEH.

En la estrategia utilizada, se escogió a la digoxigenina como marcaje no isotópico debido a que se ha reportado una sensibilidad semejante a la obtenida con métodos radioactivos en "dot blots" (6, 30, 52) y una menor reacción de fondo e inespecífica con respecto a otros métodos no radioactivos que necesitan utilizar un paso extra con proteinasa K (lo que aumenta su costo) en la hibridación del ADN de colonias (Ej. Biotina) (19).

El oligonucleótido utilizado en la hibridación de colonias sólo difiere en un nucleótido entre las secuencias de los genes que codifican para la SLT-I y SLT-II, y se encuentra en una región de alta homología entre todos los genes de la familia de toxinas SLT, por lo que, a una temperatura de hibridación de 45°C fue factible identificar cepas de ECEH independientemente del tipo de SLT que puedan producir, y sin la necesidad de utilizar un oligonucleótido para cada tipo de toxina. El oligonucleótido hibridó con las cepas de ECEH sin dar reacción inespecífica con otras categorías de *E. coli*.

En términos prácticos y comparando el uso de métodos isotópicos con el de la

digoxigenina, se obtienen diversas ventajas. El tiempo utilizado es menor ya que se elimina la autorradiografía, los oligonucleótidos ya marcados pueden almacenarse durante varios meses sin perder su actividad y la solución de hibridación puede utilizarse varias veces (se calculó un mínimo de cinco veces en el presente trabajo).

Al utilizar este método, también fue factible utilizar varias veces las membranas de nylon con el ADN fijo para hibridaciones posteriores, lo cual es de suma utilidad si se desean realizar otras pruebas sobre el mismo ADN bacteriano.

Con el método de PCR utilizado, se logró obtener una amplificación de los genes que codifican para la SLT-I y SLT-II en una sola reacción, lo que ayudará a determinar el tipo de toxina que producen las bacterias que den hibridación del ADN de colonias positivas. La sensibilidad obtenida con ADN de cepas puras fue de 500 fg al ser analizados los productos amplificados en geles de agarosa al 1.5%.

Dentro de la técnica utilizada en la extracción del ADN de heces, se observó que los lavados con centrifugaciones a alta y baja velocidad realizados antes de iniciar la extracción son de suma importancia, ya que al ser omitidos o disminuidos no se logra la amplificación deseada. Lo anterior, probablemente se deba a que los lavados permiten eliminar una gran cantidad de impurezas presentes en las muestras (y que son capaces de inhibir la reacción en cadena de la polimerasa) y, al mismo tiempo, concentrar el número de bacterias presentes en la muestra.

Al realizarles PCR a heces previamente inoculadas con cantidades conocidas de la cepa 933, se logró obtener una sensibilidad de 3.000 UFC/mg de heces con una dilución 1:50 del ADN extraído. Cuando se utilizó el ADN directamente sin diluir, no siempre se logró obtener una amplificación positiva en estas muestras, por lo que, es recomendable realizar diluciones 1:50 del ADN extraído de heces que va a ser sometido a PCR para eliminar posibles falsos negativos debidos a la inhibición de la reacción.

Dentro del objetivo principal del trabajo, se encontraba el de utilizar los métodos anteriores en la búsqueda de ECEH en 128 cepas de *E. coli* provenientes de 64 muestras diarreicas, los resultados obtenidos dieron como resultado que sólomente una cepa haya dado hibridación positiva, lo que representó el 1.56% de las muestras analizadas. La baja prevalencia encontrada, probablemente se deba que las muestras estudiadas no son las más características de una infección por ECEH. Aunque en esta ocasión los métodos se utilizaron en muestras diarreicas, su principal aplicación se realizaría sobre muestras diarreicas con presencia de sangre, ya que es en este tipo de muestras en donde se ha observado una alta incidencia de ECEH, reportándose que llega a ser su prevalencia del 11% (5). Estudios en México indican que hasta un 82% de los aislamientos de ECEH se asocian a diarrea severa con sangre o colitis hemorrágica (5).

La cepa que por la técnica de hibridación de colonias dio positiva, tuvo un PCR positivo sólo para la SLT-I, mientras que la muestra de heces de la que se aisló, fue positiva por PCR tanto para la SLT-I como para la SLT-II. Lo anterior, probablemente se deba a que la cepa aislada haya perdido el ADN del bacteriófago que codifica para la SLT-II, o que se trate de una cepa de *E. coli* que haya sido infectada solamente por el bacteriófago que codifica para la SLT-I y que en realidad no sea la cepa inicial que causó el episodio diarreico, sino una cepa que adquirió el bacteriófago de una ECEH que contenía ambos bacteriófagos durante su estancia en el intestino.

Una importante observación al trabajo radica en que solamente se utilizaron dos colonias de *E. coli* por muestra, lo que podría provocar que las muestras de heces con bajas concentraciones de *E. coli* no pudieran ser identificadas, o que en el caso de la muestra positiva, no se hayan podido detectar cepas que codifican para ambas toxinas, por lo que, se sugiere que en estudios posteriores se realice hibridación a por lo menos cinco colonias por muestra de

heces (47). Con el objetivo de demostrar una mayor sensibilidad del método de PCR en la identificación de ECEH, se procesaron por este método 9 muestras (aparte de la positiva por hibridación de colonias), siendo negativas todas ellas tanto en la visualización del producto en gel de agarosa como por hibridación del producto amplificado. La limitante de sólo haber analizado 9 muestras por PCR no sustentó de forma determinante la mayor sensibilidad que tiene el método de PCR, como ya se ha comprobado ampliamente en diversos estudios (1, 3, 18, 21), aunque el hecho de que se haya podido detectar por PCR que una muestra contenía cepas que codificaban tanto para la SLT-I como para la SLT-II, mientras que por hibridación de colonias sólo se comprobó la existencia de cepas que codifican para la SLT-I, da una idea de la diferencia de sensibilidad entre ambos métodos. La posible aplicación de los métodos a un número mayor de muestras podría verificar lo anterior, ya que aumentaría la probabilidad de tener un mayor número de muestras positivas y se observaría que con el PCR se obtendría un mayor número de muestras identificadas (debido a su sensibilidad), que con el método de hibridación de colonias.

En general, ambos métodos pueden ser empleados en forma independiente o complementaria en la identificación de ECEH, la aplicación de uno u otro método dependerá de diversos factores como el tiempo, costo, disponibilidad de equipo y tipo de estudio, ya que no es lo mismo utilizar un método en estudios epidemiológicos, que como herramienta de diagnóstico.

Una de las principales ventajas de ambos métodos es que no importa el serotipo de la bacteria para poder identificarse como ECEH, hecho de suma importancia en estudios que pudiesen realizarse en México, ya que hay reportes (12, 13) que indican la presencia de diversos serotipos en México así como en otros países (11, 33, 53). Además, debido a que la información genética que codifica para la síntesis de las toxinas se encuentra mediada por la infección de

bacteriófagos, es de esperarse que aumente el número de serotipos capaces de adquirir esta característica.

CONCLUSIONES

- 1.- El oligonucleótido utilizado en la hibridación de colonias, aunado al marcaje no radioactivo, proporciona un método eficaz y sencillo para la detección de *E. coli* productora de SLT-I y/o SLT-II en un solo ensayo, así como, la opción de utilizar las membranas con el ADN de las bacterias en diversos ensayos de hibridación.
- 2.- Los dos pares de cebadores utilizados en la reacción de la polimerasa en cadena (PCR), permiten amplificar segmentos de los genes de las dos toxinas (SLT-I y SLT-II) en una sola reacción tanto en heces, como en cultivo puro.
- 3.- La utilización de un método u otro para la búsqueda y/o confirmación de ECEH, dependerá de los fines clínicos, epidemiológicos, etc. y de la disponibilidad de equipo y material.
- 4.- Por medio de la hibridación de colonias, se detectó que sólo 1 de 64 muestras de heces diarreicas (1.56%), presentaba aislamiento de ECEH como su posible causa.
- 5.- La cepa de *E. coli* positiva por hibridación de colonias, fue solamente productora de SLT-I, determinada por PCR.
- 6.- El ADN de la muestra de heces positiva por hibridación de colonias y amplificado por PCR, resultó positivo para ambas SLT(s).

ANEXO

Soluciones.

Amortiguador 1 (pH 7.5)

Ac. maleico	0.1 M
NaCl.	0.15 M

Ajustar con perlas de NaOH o con una solución concentrada y esterilizar por autoclave.

Solución de bloqueo (Stock).

Disolver el reactivo de bloqueo en el amortiguador 1 al 10%.

Amortiguador 2.

Solución de bloqueo en amortiguador 1 diluido 1/10.

Amortiguador 3.

Tris-HCl (pH 9.5)	100 mM
NaCl	100 mM
MgCl ₂	50 mM

Ajustar con NaOH antes de añadir solución de MgCl₂, evitando precipitación de sales.

Solución de prehibridación.

SSC	5 X
Lauril sarcosinato de sodio	0.1 %
Dodecil sulfato de sodio (SDS)	0.02 %
Reactivo de bloqueo	1.0 %

Solución de hibridación.

Oligonucleótido marcado diluido a la concentración deseada en la solución de prehibridación.

Substrato de color

45 µl de NBT (75 mg/ml en dimetil formamida).

35 µl de X Fosfato (5-Bromo, 4-Cloro, 3-Indoil fosfato, 50 mg/ml en dimetil formamida).

10 ml de amortiguador 3

Amortiguador SSC 20X.

NaCl	3 M
Citrato de sodio	300 mM

Ajustar a pH 7.5

Solución de lisis.

NaOH	0.5 N
NaCl	1.5 N

Solución neutralizante.

Tris-HCl (pH 8.0)	1.0 M
NaCl	1.5 M

Solución desacoplante 1
Formamida 30 %
SDS 1 %
Tris 10 mM

Solución desacoplante 2
NaOH 0.2 N
SDS 0.1 %

Solución desacoplante 3
SDS 0.5 %
SSC 0.1 %

V. BIBLIOGRAFIA

1. Arnheim, N., Erlich, H. 1992. Polymerase chain reaction strategy. *Annu. Rev. Biochem.* 61:131-156.
2. Basta, M., Karmali, M., Lingwood, C. 1989. Sensitive receptor-specified enzyme-linked immunosorbent assay for *Escherichia coli* verocytotoxin. *J. Clin. Microbiol.* 27:1617-1622.
3. Begum, D., Strockbine, N.A., Sowers, E., Jackson, M.P. 1993. Evaluation of a technique for identification of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* by using polymerase chain reaction and digoxigenin-labeled probes. *J. Clin. Microbiol.* 31:3153-3156.
4. Benítez, O., Uribe, F., Navarro, A., Hernández, D., Ruiz, J., Cravioto, A. 1991. Etiología de diarrea con sangre en niños de una comunidad rural. *Bol. Med. Hosp. Inf. Mex.* 48:65-70.
5. Book, G. 1991. Verocytotoxin producing *Escherichia coli*. *BMJ.* 303:800-801.
6. Boehringer Mannheim.
DNA LABELING AND DETECTION NONRADIOACTIVE
Alemania (1989)
7. Brian, M.J., Frosolono, M., Clearly, T.G. 1992. Polymerase chain reaction for diagnosis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection and hemolytic-uremic syndrome. *J. Clin. Microbiol.* 30: 1801-1806.
8. Brown, J.E., Echeverria, P., Taylor, D., Seriwatana, J., Neill, R. and Newland J.W. 1989. Determination by DNA hybridization of Shiga-like-toxin-producing *Escherichia coli* in children with diarrhea in Thailand. *J. Clin. Microbiol.* 27:291-294.
9. Brown, J.E., Sethabutr, O., Jackson, P.M, Lolekha, S., Echeverria, P. 1989. Hybridization of *Escherichia coli* producing Shiga-like toxin I, Shiga like toxin II, and a variant of Shiga-like toxin II with synthetic oligonucleotide probes. *Infect. Immun.* 57: 2811-2814.
10. Cervantes, R., Valdivia A., Zepeda, L. 1992. Citotoxinas de *Escherichia coli*. *Enfer. Infec. Microbiol.* 57: 17-31.
11. Cordovéz, A., Prado, V., Maggi, L., Cordero, J., Martínez, J., Misraji, A., Soza, G., Ojeda, A., Levine, M. 1992. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* associated with hemolytic-uremic syndrome in Chilean children. *J. Clin. Microbiol.* 30:2153-2157.
12. Cravioto, A., Reyes, R., Trujillo, F., Uribe, F., Navarro, A., De la Roca, J.M., Hernández, J., Pérez, G., Vázquez, V. 1990. Risk of diarrhea during the first year of life associated with initial and subsequent colonization by specific

- enteropathogens. *Am. J. Epidemiol.* 131:886-904.
13. Cravioto, A., Vázquez, V., Soria, A., Navarro, A., Ortiz, M. 1988. Producción de citotoxina tipo Shiga (SLT) 1 en cepas de *Escherichia coli* aisladas de niños con diarrea en una comunidad rural. *Bol. Med. Hosp. Inf. Mex.* 45:206-210.
 14. Donnenberg, M., Kaper, J. 1992. Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 60:3953-3961.
 15. Donnenberg, M., Tacket, Carol., James, S., Losonsky, G., Nataro, J., Wasserman, S., Kaper, J., Levine, M. 1993. Role of the *eaeA* gene in enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *J. Clin. Invest.* 92:1412-1417.
 16. Fang, G. 1993. Intestinal *Escherichia coli* infections. *Curr. Opin. Inf. Dis.* 6:48-53.
 17. Farmer III, J., Davis, B. 1985. H7 Antiserum-Sorbitol fermentation medium: a single tube screening medium for detecting *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis. *J. Clin. Microbiol.* 22:620-625.
 18. Fritsch, E., Maniatis, T., Sambrook, J. (eds.)
MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL
 2a. edición
 Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor
 N.Y. (1989)
 19. Gicquelais, K., Baldini, M., Martinez, J., Maggi, L., Martin, W., Prado, V., Kaper, J., Levine, M. 1990. Practical and economical method for using biotinylated DNA probes with bacterial colony blots to identify diarrhea-causing *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 28:2485-2490.
 20. Gyles, C.L. 1992. *Escherichia coli* cytotoxins and enterotoxins. *Can. J. Microbiol.* 38: 734-746.
 21. Jackson, Matthew P. 1992. Identification of Shiga-like toxin type II producing *Escherichia coli* using the polymerase chain reaction and a digoxigenin labelled DNA probe. *Mol. Cell. Probes.* 6:209-214.
 22. Jallat, C., Livrelli, V., Rich, Ch., Joly, B. 1993. *Escherichia coli* strains involved in diarrhea in France: high prevalence and heterogeneity of diffusely adhering strains. *J. Clin. Microbiol.* 31:2031-2037.
 23. Jerse, A., Gicquelais, Karen., Kaper, James. 1991. Plasmid and chromosomal elements involved in the pathogenesis of attaching and effacing *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 59:3869-3875.
 24. Kaplan, B., Clearly, T., Obring, T. 1990. Recent advances in understanding the pathogenesis of the hemolytic uremic syndromes. *Pediatr. Nephrol.* 4:276-283.

25. Kaplan, B., McGowan, K. 1994. Hemolytic uremic syndrome. *Curr. Op. Infect. Dis.* 7:351- 357.
26. Karch, H., Bitzan, M., Sandkamp, O., Meyer, T. 1989. Synthetic oligodeoxyribonucleotide probes to detect verocytotoxin-producing *Escherichia coli* in diseased pigs. *FEMS Microbiology Letters.* 57:247-252.
27. Karch, H. and Meyer, T. 1989. Evaluation of oligonucleotide probes for identification of Shiga-like-toxin-producing *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 27:1180-1186.
28. Karch, H. and Meyer, T. 1989. Single primer pair for amplifying segments of distinct Shiga-like-toxin genes by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 27:2751-2757.
29. Karmali, M., Petric, M., Winkler, M., Bielaszewska, M., Brunton, J., Kar, N., Morooka, T., Nair, M., Richardson, S., Arbus, G. 1994. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of immunoglobulin G antibodies to *Escherichia coli* vero cytotoxin 1. *J. Clin. Microbiol.* 32:1457-1473.
30. Kessler, Christoph. 1991. The digoxigenin:anti-digoxigenin (DIG) technology- a survey on the concept and realization of a novel bioanalytical indicator system. *Mol. Cell. Prob.* 5:161-205.
31. Levine, Myron M. 1986. *Escherichia coli* infections. *N. Engl. J. Med.* 313:445-447.
32. Levine, Myron M. 1987. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J. Infect. Dis.* 155:377-388.
33. Lopez, E., Diaz, M., Grinstein, S., Devoto, S., Mendilaharsu, F., Murray, B.E., Ashkenazi, S., Ruboglio, E., Woloj, M., Vasquez, M., Turco, M., Pickering, L., Cleary, T. 1989. Hemolytic uremic syndrome and diarrhea in argentine children: The role of Shiga-like toxins. *J. Infect. Dis.* 160:469-475.
34. Mathewson, J. 1992. Laboratory diagnosis of gastrointestinal infections. *Curr. Op. Infect. Dis.* 5:106-110.
35. Mass, Renata. 1983. An improved colony hybridization method with significantly increased sensitivity for detection of single genes. *Plasmid* 10:296-298.
36. Neill, M. 1994. Pathogenesis of *Escherichia coli* O157:H7 infection. *Curr. Op. Infect. Dis.* 7:295-303.
37. Newland, J.W., O'Brien, A.D., Neill, R.J., Holmes, R.K., Jackson, M.P. 1987. Nucleotide sequence analysis and compararison of the structural genes for Shiga-like toxin II encoded by bacteriophages from *Escherichia coli* 933. *FEMS Microbiol. Letters.* 44: 109-114

38. Newland, W.J., and Neill, R.J. 1988. DNA Probes for Shiga-like toxins I and II and for toxin converting bacteriophages. *J. Clin. Microbiol.* 26:1292-1297.
39. O'Brien, A.D., and Holmes, R.H. 1987. Shiga and Shiga-like toxins. *Microbiol. Rev.* 51: 206-220.
40. O'Brien, A.D., and Tesh, V.L. 1991. The pathogenic mechanism of Shiga toxin and the Shiga-like toxins. *Mol. Microbiol.* 5(8):1817-1822.
41. Olsvik, O., Rimstad, E., Hornes, E., Strockbine, N., Wasteson, Y, Lund, A., Wachsmuth, K. 1991. A nested PCR followed by magnetic separation of amplified fragments for detection of *Escherichia coli* Shiga-like toxin genes. *Mol. Cell. Probes.* 5:429-435.
42. Paton, A., Paton, J., Goldwater, P., Manning, P. 1993. Direct detection of *Escherichia coli* Shiga-like toxin genes in primary fecal cultures by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 31:3063-3067.
43. Pitcher, D., Saunders, N., Owen, R. 1989. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Lett. Appl. Microbiol.* 8:151-156.
44. Pollard, D.R., Johnson, W.M., Lior, H., Tyler, D.S. and Rozee, K.R. 1990. Rapid and specific detection of Verotoxins genes in *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 28:540-545.
45. Ritchie, M., Partington, S., Jessop, J., Kelly, M. 1992. Comparison of a direct fecal Shiga-like toxin assay and sorbitol-MacConkey agar culture for laboratory diagnosis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection. 1992. *J. Clin. Microbiol.* 30:461-464.
46. Salyers, A., Dixie, D.
BACTERIAL PATHOGENESIS
ASM Press
Whashington, D.C. (1994)
47. Sansonetti, P. (ed.)
PATHOGENESIS OF SHIGELLOSIS
Springer-Verlag
N. Y. (1992)
48. Schaechter, M. Medoff, G. Eisenstein, B. (eds.)
MICROBIOLOGIA. MECANISMOS DE LAS ENFERMEDADES INFECCIOSAS
Segunda edición
Medica Panamericana
México (1994)
49. Suárez-Hoíl, G. Flores, J., Heredia, R., Puc, M., Franco, J. 1993. Prevalencia de bacterias enteropatógenas en niños con diarrea aguda con sangre. *Bol. Med.*

- Hosp. Infant. Mex. 50:151-155.
50. Sussman, M. (ed.)
THE VIRULANCE OF *Escherichia coli*
Academic Press
Londres (1985)
 51. Tesh, V., O'Brien, A. 1992. Adherence and colonization mechanisms of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Microb. Pathogen. 12:245-254.
 52. Thomas, A., Smith, H., Rowe, B. 1993. Use of digoxigenin-labelled oligonucleotide DNA probes for VT2 and VT2 human variant genes to differentiate Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* strains of serogroup O157. J. Clin. Microbiol. 31:1700-1703.
 53. Thomas, A., Chart, H., Cheastry, T., Smith, H., Frost, J., Rowe, B. 1993. Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli*, particularly in the United Kingdom: 1989-91. Epidemiol. Infect. 110:591-600.
 54. Vázquez, V., Arredondo, M., Trujillo, F., Cravioto A. 1987. Relación entre aislamiento de cepas de *Escherichia coli* O157 y presencia de colitis hemorrágica en niños. Bol. Med. Hosp. Infant. Méx. 44: 442-447.
 55. Willshaw, G., Scotland, H., Smith, H., Rowe, B. 1994. Hybridization of strains of *Escherichia coli* O157 with probes derived from the *eaeA* gene of enteropathogenic *E. coli* and the *eaeA* homolog from a Vero cytotoxin-producing strain of *E. coli* O157. J. Clin. Microbiol. 32:897-902.
 56. Willshaw, G., Smith, H., Scotland, S., Field, A., Rowe, B. 1987. Heterogeneity of *E. coli* phages encoding Vero cytotoxins: comparison of clones sequences determining VT1 and VT2 and development of specific gene probes. J. Gen. Microbiol. 133:1309-1317.
 57. Yu, J., Kaper, J. B. 1992. Cloning and characterization of the *eae* gene of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Mol. Microbiol. 6:411-417.