

10524  
25



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN

1974 A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLAN  
Departamento de  
Exámenes Profesionales

**"BUSQUEDA INTENCIONADA DE *Escherichia coli*  
ENTEROAGREGATIVA EN CASOS DE DIARREA  
EN MEXICO".**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
**QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA**  
P R E S E N T A

**XOCHITL QUETZAL MEY LING GONZALEZ OLMO**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

ASESORES: Q.F.B. ANA LAURA VAZQUEZ MARTINEZ  
M. EN C. GUADALUPE RODRIGUEZ ANGELES

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

2003

A



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.

**TESIS CON  
FALLA DE  
ORIGEN**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
 UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
 DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



SECRETARÍA NACIONAL  
 DE EDUCACIÓN PÚBLICA  
 MÉXICO

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO  
 DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN  
 P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares  
 Jefe del Departamento de Exámenes  
 Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicarle que usted que revisamos la TESIS:

Búsqueda intencionada de Escherichia coli enteroagresiva  
en casos de diarrea en México.

que presenta la pasante: Xochitl Susael Méy Ling González Olmos  
 con número de cuenta: 0754292-3 para obtener el título de:  
Química Farmacéutica Biológica.

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE	ATENTAMENTE
"POF. MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"	
Cuautitlán Izcalli, Méx. a <u>18</u> de <u>Octubre</u> de <u>2002</u>	
PRESIDENTE	<u>Q. F. I. Andrea Becerra Osneva</u> <i>Andrea A. Becerra</i>
VOCAL	<u>M. en F. C. Ma. Eugenia R. Posada Galarza</u> <i>Posada</i>
SECRETARIO	<u>Q. F. B. Ana Laura Vázquez Martínez</u> <i>Ana L. Vázquez</i>
PRIMER SUPLENTE	<u>Q. F. B. Ma. Esther Rosalinda Velázquez</u> <i>Esther</i>
SEGUNDO SUPLENTE	<u>Q. F. B. Rene Jordán Santos</u> <i>Rene</i>

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

B

## ***Agradecimientos.***

### **❖ *A mis padres:***

*A quienes me han heredado el tesoro mas valioso que puede darse a un hijo: Amor. A quienes sin escatimar esfuerzo alguno, han sacrificado gran parte de su vida para formarme y educarme. A quienes la ilusión de su vida ha sido convertirme en una persona de provecho. A quienes nunca podré pagar todos sus desvelos ni aún con las riquezas más grandes del mundo. Por esto y más .... Gracias.*

*Reynaldo González y Julieta Olmos.*

### **❖ *A mis hermanos:***

*Por haberme alentado a seguir adelante, su apoyo incondicional, sus consejos y palabras de aliento que me brindaron en todo momento.*

*Jaqueline, Nadya y Jorge.*

### **❖ *A mi familia:***

*En especial a mi tío Alberto, por su apoyo incondicional, a mi abuelita Concepción y a mi tía Carmen por sus consejos brindados y porque siempre estuvieron a mi lado.*

### **❖ *A Juan Carlos:***

*Por sus palabras y consejos siempre de aliento, por su confianza y por creer en mí.... Gracias.*

### **❖ *A mis amigos:***

*Por hacerme ver mis debilidades y errores a tiempo, por estar conmigo en los malos y buenos momentos.*

❖ **A mis asesoras:**

*Por su tiempo y dedicación brindadas ya que sin ellas habría sido imposible la realización de este trabajo.*

*Guadalupe Rodríguez y Ana Laura Vázquez.*

❖ **Al personal del InDRE:**

*Por su apoyo, por sus consejos, por toda su ayuda, su tiempo y por brindarme su amistad.*

**GRACIAS.**

*Carmen, Iliana, Jesús, Pilar, Alejandra y Don Tachito.*

❖ **A mis profesores y sinodales:**

*Gracias.*

TEMA CON  
FALLA DE ORIGEN

0

## INDICE.

Indice de tablas.	i
Indice de figuras.	ii
Abreviaturas.	iii
Resumen.	iv
<b>I. Introducción.</b>	<b>1</b>
1.-Generalidades.	1
2.-Clasificación de <i>E.coli</i> .	5
2.1.EPEC.	5
2.2.ETEC.	9
2.3.EIEC.	12
2.4.EHEC.	15
2.5.DAEC.	18
2.6.EAEC.	19
2.6.1.Generalidades.	19
2.6.2.Histopatología.	21
2.6.3.Adherencia.	23
2.6.4.Propiedades hemaglutinantes de EAEC.	24
2.6.5.Enterotoxina enteroagregativa termoestable (EAST-1).	25
2.6.6.Plásmido codificador de la toxina (Pet).	25
2.6.7.Proteína involucrada en la colonización intestinal (Pic).	26
2.6.8.Enterotoxina termolábil de alto peso molecular.	26
2.6.9.Inflamación intestinal.	27
2.6.10.Características clínicas.	27
2.6.11.Características epidemiológicas.	28
2.6.12. Diagnóstico de EAEC.	28

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

II. Justificación.	32
III. Objetivo General.	33
IV. Objetivos particulares.	33
V. Material.	34
VI. Metodología.	37
6.1. Colony blot.	37
6.1.1. Lisis.	37
6.1.2. Hibridación.	37
6.1.3. Revelado.	39
6.2. Pruebas de adherencia en cultivo celular HEP-2.	39
6.2.1. Preparación del cultivo celular en microplaca (Primer día)	41
6.2.2. Preparación del inóculo bacteriano (Primer día).	41
6.2.3. Preparación del cultivo celular en microplaca (Segundo día).	41
6.2.4. Preparación del inóculo bacteriano (Segundo día).	41
6.2.5. Inoculación de la monocapa celular.	41
6.3. PCR.	42
6.3.1. Preparación de la muestra.	42
6.3.2. Condiciones de amplificación.	42
6.3.3. Análisis del producto.	44
VII. Resultados.	45
VIII. Discusión.	69
IX. Conclusiones.	74
X. Apéndice.	75
XI. Referencias.	80

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

## INDICE DE TABLAS.

<b>Tabla 1.</b> Principales características bioquímicas de <i>Escherichia coli</i> .	2
<b>Tabla 2.</b> Determinantes de virulencia de <i>Escherichia coli</i> .	4
<b>Tabla 3.</b> Características principales de <i>Escherichia coli</i> enteropatógena.	6
<b>Tabla 4.</b> Características principales de <i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica.	10
<b>Tabla 5.</b> Características principales de <i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva.	13
<b>Tabla 6.</b> Características principales de <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica.	16
<b>Tabla 7.</b> Características principales de <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa.	20
<b>Tabla 8.</b> Condiciones en que se realizó la PCR.	43
<b>Tabla 9.</b> Número de cepas positivas y negativas en colony blot, PCR y células HEP-2.	46
<b>Tabla 10.</b> Comparación entre colony blot y PCR.	49
<b>Tabla 11.</b> Datos obtenidos por colony blot, a los cuales se les aplicó el teorema de Bayes.	50
<b>Tabla 12.</b> Datos obtenidos por PCR, a los cuales se les aplicó el teorema de Bayes.	51
<b>Tabla 13.</b> Distribución de <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa por edad.	53
<b>Tabla 14.</b> Distribución de <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa de los pacientes de 0-5 años de edad.	55
<b>Tabla 15.</b> Distribución de <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa según el sexo del paciente.	57
<b>Tabla 16.</b> Frecuencia de <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa por signos clínicos.	59
<b>Tabla 17.</b> Efectos de adherencia para <i>Escherichia coli</i> , según las técnicas moleculares empleadas.	60
<b>Tabla 18.</b> Distribución geográfica de las cepas de <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa	67

## INDICE DE FIGURAS.

<b>Figura 1.</b> Mecanismo de patogenicidad de los diferentes grupos de <i>Escherichia coli</i> .	22
<b>Figura 2.</b> Técnica de Colony blot.	38
<b>Figura 3.</b> Técnica de adherencia en cultivo de células HEP-2	40
<b>Figura 4.</b> Membrana de nylon con DNA de cepas de <i>Escherichia coli</i> sometidas a hibridación en fase sólida.	47
<b>Figura 5.</b> Productos amplificados de PCR, en cepas de <i>Escherichia coli</i> aisladas de pacientes con diarrea.	48
<b>Figura 6.</b> Distribución por edad de los pacientes con diarrea causada por EAEC.	54
<b>Figura 7.</b> Distribución de frecuencia de diarrea causada por EAEC en pacientes de 0-5 años.	56
<b>Figura 8.</b> Distribución de EAEC según el género del paciente.	58
<b>Figura 9.</b> Micrografía de células HEP-2 sin patrón de adherencia. Células inoculadas con la cepa testigo negativo (no adherente). Tinción de Giemsa, aumento 100 X.	61
<b>Figura 10.</b> Micrografía de la adherencia agregativa a células HEP-2. Tinción de Giemsa, aumento 100 X.	62
<b>Figura 11.</b> Micrografía de la adherencia difusa a células HEP-2. Tinción de Giemsa, aumento 100 X.	63
<b>Figura 12.</b> Micrografía de la adherencia localizada a células HEP-2. Tinción de Giemsa, aumento 100 X.	64
<b>Figura 13.</b> Distribución de EAEC por meses del año.	65
<b>Figura 14.</b> Distribución de <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa con patrón de adherencia agregativa en México.	68

## ABREVIATURAS.

**AA:** adherencia agregativa.  
**AAF:** fimbria de adherencia agregativa.  
**ADP:** difosfato de adenosina.  
**A/F:** adherencia y esfacelamiento.  
**AMPc:** adenosin monofosfato cíclico.  
**ATP:** adenosin trifosfato.  
**A, T, G, C:** adenina, timina, guanina, citosina.  
**BAB:** Agar base sangre.  
**BCIP:** 5-bromo-4-cloro-indoilfosfato.  
**BFP:** pili de forma rizada.  
**CDEC:** *Escherichia coli* desprendedora de células.  
**CFA:** factor de colonización antigénica.  
**CLDTEC:** *Escherichia coli* productora de toxina.  
**CO<sub>2</sub>:** dióxido de carbono.  
**CS:** antígenos de superficie.  
**Da:** dalton.  
**DA:** adherencia difusa.  
**DAEC:** *Escherichia coli* de adherencia difusa.  
**DA-EPEC:** *Escherichia coli* enteropatógena adherente difusa.  
**DNA:** Acido desoxirribonucleico.  
**dNTP's:** desoxirribonucleótidos trifosfatados, donde N= A, G, C, T.  
**EAEC:** *Escherichia coli* enteroagregativa.  
**EAF:** factor de adherencia de *E.coli*.  
**EAST:** Enterotoxina termoestable de cepas enteroagregativas.  
**EHEC:** *Escherichia coli* enterohemorrágica.  
**EIEC:** *Escherichia coli* enteroinvasiva.  
**EPEC:** *Escherichia coli* enteropatógena.

**Esp:** Proteínas secretadas.  
**EPEC:** *Escherichia coli* enterotoxigénica.  
**GMPE:** monofosfato de guanosin ciclico.  
**HA:** Hemaglutinación.  
**HEp-2:** células de carcinoma laríngeo.  
**ID:** intestino delgado.  
**IG:** intestino grueso.  
**kDa:** kilo dalton.  
**LA:** adherencia localizada.  
**LEE:** loci de esfacelamiento del enterocito.  
**LT:** toxina termolábil.  
**MDa:** megadaltones.  
**MEM:** medio mínimo esencial.  
**MgCl<sub>2</sub>:** cloruro de magnesio.  
**mL:** mililitro.  
**μL:** microlitro.  
**NaCl:** Cloruro de sodio.  
**NAD:** nicotinamida adenin dinucleótido.  
**NaOH:** hidróxido de sodio.  
**NBT:** nitroazul de tetrazolio.  
**NFM:** nefelómetro de Mac Farland.  
**OMP:** proteínas de membrana externa.  
**pAA:** plásmido de adherencia agregativa.  
**PAI:** isla de adherencia y esfacelamiento.  
**pb:** pares de bases.  
**PBS:** solución amortiguadora de fosfatos.  
**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa.  
**PES:** penicilina estreptomocina.  
**Pet:** plásmido codificador de la toxina.  
**Pic:** proteína involucrada en la colonización intestinal.

**PMN:** polimorfonucleares.

**RNA:** ácido ribonucleico de transferencia.

**SDS:** dodecil sulfato de sodio.

**ShET1:** enterotoxina semejante a *Shigella*.

**SLT:** toxina semejante a la Shiga.

**SSC:** solución salina citratada.

**SSF:** solución salina fisiológica.

**ST:** toxina termoestable.

**STX:** citotoxinas.

**SUH:** síndrome urémico hemolítico.

**TBE:** tris base-ácido bórico-EDTA disódico.

**Tir:** receptor translocado de intimina.

**Tris:** tris-hidroximetil aminometano.

**TSB:** caldo de soya tripticaseína.

**U.V:** luz ultravioleta.

**VT:** verotoxina.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## RESUMEN.

*Escherichia coli* es una bacteria de flora normal puede tener clonas patógenas capaces de causar daño, han sido agrupadas en seis grupos, de los cuales se sabe la presencia en México de sólo cinco: ETEC, EIEC, EPEC, EHEC y EAEC pero poco se conoce de la situación epidemiológica.

Por lo anterior el objetivo del estudio fue demostrar la presencia de *E.coli* enteroagregativa en la población mexicana de casos de diarrea por medio de técnicas de Biología Molecular para determinar su papel en la etiología de las diarreas.

Se estudiaron 748 cepas de *E.coli* aisladas de personas con cuadro clínico de diarrea, en el intervalo: enero a diciembre del 2001, las cuales fueron negativas en la hibridación para los grupos ETEC, EIEC, EPEC y EHEC.

Las cepas se sometieron como ensayo de escrutinio a la hibridación en fase sólida por el método de colony blot con la sonda marcada con digoxigenina específica para EAEC, posteriormente se buscó por PCR la presencia del gene que codifica para la fimbria de adherencia agregativa I, obteniéndose un fragmento de amplificación de 630 pb y finalmente a la prueba de adherencia en cultivo de células HEP-2 considerada la prueba de referencia o estándar de oro siendo la prueba de confirmación definitiva.

Del grupo de cepas estudiadas 166 fueron positivas a Colony blot y al ser sometidas a PCR sólo 47 cepas amplificaron el fragmento de 630 pb; y en el ensayo de adherencia 105 presentaron adherencia agregativa.

La estratificación de la edad en la población estudiada reveló que se encuentra principalmente en niños de 0 a 1 años, y afecta por igual a hombres y mujeres; además el síntoma reportado con mayor frecuencia fue la diarrea líquida.

La técnica de PCR mostró un 36% de sensibilidad y un 99% de especificidad, pero colony blot mostró una sensibilidad del 62% y una especificidad del 84% comparado con el ensayo de adherencia, sugiriendo que colony blot puede suplir a PCR.

# PAGINACIÓN DISCONTINUA

## I. INTRODUCCIÓN.

### 1.- Generalidades.

*Escherichia coli* es un bacilo Gram negativo pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, son bacilos de 1 a 3  $\mu\text{m}$  X 0.5  $\mu\text{m}$ ; se presentan solos, en pares, en cadenas cortas o agrupados; en general móviles por flagelos peritricos, aunque existen variantes inmóviles no flageladas, generalmente son no capsuladas.

Los microorganismos del género *Escherichia* son generalmente fimbriados y poseen pilis sexuales y fimbrias adhesivas; su metabolismo es respiratorio fermentativo por lo que se le considera como microorganismo aerobio o anaerobio facultativo. Genéticamente está constituido por una molécula circular de DNA con un peso molecular de  $2 \times 10^9$  y alrededor de  $5 \times 10^6$  pares de bases<sup>(13)</sup>.

*E. coli* coloniza el intestino del hombre poco después de su nacimiento, persistiendo en él durante toda su vida y tiene un papel importante en el mantenimiento de las condiciones fisiológicas normales, cuando sale de su nicho ecológico se le considera como un patógeno oportunista relacionado con diversos síndromes y enfermedades.

*E. coli* crece bien en los medios comunes de laboratorio, en caldo simple crece en abundancia formando una turbiedad uniforme, con fuerte olor fecaloideo; en agar, forma colonias circulares de 3 a 5 mm, lisas, convexas, de borde continuo o ligeramente ondulado, brillantes, de color blanco o ligeramente amarillentas. La temperatura de crecimiento es de 37° C y el pH favorable es de 7.0. En cuanto a su actividad bioquímica produce ácido y gas, fermenta la lactosa y un gran número de carbohidratos, es indol positivo, rojo de metilo positivo, VP negativo y no utiliza el citrato, tabla 1.

**Tabla 1.**

**Principales características bioquímicas de *Escherichia coli*.**

Bioquímica.	% de positividad.
Indol.	98
RM	99
VP	0
Citratos.	1
Producción de Ac.sulfhídrico.	1
Urea.	1
LIA	90
Arginina.	17
Ornitina.	65
Motilidad a 37°C.	95
Hidrólisis de gelatina.	0
Producción de gas.	95
Fermentación de:	
Glucosa.	100
Lactosa.	95
Sacarosa.	50
D-manitol.	98
m-inositol.	1
D-sorbitol.	94
L-arabinosa.	99
Rafinosa.	50
Maltosa.	95
D-manosa.	96
ONPG.	95
Oxidasa.	0

Tomado de: Farmer, J.J., y cols. ( 19 )

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

El bacilo de *E.coli* tiene estructura antigénica bastante heterogénea y al igual que otros géneros pertenecientes a esta familia, se divide en grupos con base a un antígeno somático (O) termoestable, de naturaleza lipopolisacárida, presente en la pared celular y en tipos por un antígeno proteínico flagelar (H) que se subdivide en B, L y A, y el antígeno capsular (K) que son principalmente polisacáridos ácidos, los cuales son termolábiles. Además *E.coli* puede formar antígenos de fimbrias que son de naturaleza proteica, designados como antígenos K (K88 y K99) que se encuentran en las cepas asociadas con enfermedades diarreicas<sup>(13,22)</sup>.

Los factores de virulencia de *E.coli* son excepcionalmente complejos y están asociados con su capacidad para unirse al lugar de la infección y colonizarlo.

*E.coli* produce unas sustancias bactericidas para otros microorganismos llamadas colicinas, que son proteínas con un peso molecular que oscila entre 20 y 90 kDa y cuya síntesis está controlada por plásmidos, las cuales se unen a receptores específicos de la membrana externa de las células susceptibles; tras esto, penetran en la membrana citoplásmica; algunas actúan formando canales impermeables a los iones de la membrana, que colapsan el transporte de protones; otras penetran en el citoplasma e interrumpen la síntesis proteica, en algunos casos por afinidad a ribonucleasa y en otros para actuar como endonucleasa de DNA<sup>(22,35)</sup>.

En la tabla 2 se exponen los determinantes que están, al parecer, directamente relacionados con la virulencia.

Entre las especies predominantes de anaerobios facultativos de la flora normal del intestino, *E.coli* juega un papel importante en el mantenimiento de la fisiología del intestino. Dentro de estas cepas sin embargo, hay cepas completamente patógenas que causan distintos síndromes de enfermedad diarreica<sup>(33)</sup>.

Las cepas de *E.coli* que causan diarrea al humano se dividen en seis categorías con base en sus diferentes propiedades de virulencia, diferentes interacciones con la mucosa intestinal, distintos síndromes clínicos, diferencias epidemiológicas y diferentes serotipos O:H, así como por la presencia de diferentes plásmidos o genes cromosomales que codifican para los factores de virulencia en *E.coli* patógena que están ausentes en las cepas comensales; además también con base en su patrón de interacción con las células epiteliales y cultivo celular<sup>(4,32,49)</sup>.

Tabla 2.

**Determinantes de virulencia en *Escherichia coli*.**

Adhesinas.	Toxinas.	Agresinas.
<p>Antígenos K de las fimbrias. Factores antigénicos de colonización (CFA/I y CFA/II). Fimbrias resistentes a manosa. Fimbrias sensibles a manosa. Adhesinas superficiales no fimbrias.</p>	<p>Enterotoxinas termoestables. Enterotoxinas termolábiles. Citotoxinas.</p>	<p>Antígenos capsulares K. Siderocromos y sistemas de transporte de hierro. Factores séricos de resistencia. Factores de resistencia al complejo anticuerpo-complemento.</p>
<p>Participan en la colonización La adherencia de <i>E.coli</i> a las células epiteliales está mediada por una o más de las adhesinas enumeradas anteriormente, en su mayoría de naturaleza fimbrial y actúan en receptores específicos de las células.</p>	<p>Actúan sobre las células del epitelio intestinal para causar diarrea, tienen especificidad de área.</p>	<p>Cuando <i>E.coli</i> invade los tejidos intervienen los factores de virulencia como resistencia a la fagocitosis, acción bactericida del suero, así como la capacidad de captar el hierro utilizado en los tejidos.</p>

Tomado de: Freeman (22) y Levinson (35).

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

Las seis categorías de *E.coli* diarreagénica son: *E.coli* enteropatógena (**EPEC**), *E.coli* enterotoxigénica (**ETEC**), *E.coli* enteroinvasiva (**EIEC**), *E.coli* enterohemorrágica (**EHEC**), *E.coli* enteroagregativa (**EAEC**), *E.coli* de adherencia difusa (**DAEC**)<sup>(4, 12, 50, 52)</sup>.

Actualmente se sugieren dos categorías adicionales, la *E.coli* desprendedora de células (**CDEC**) y *E.coli* productora de toxina (**CLDTEC**)<sup>(50)</sup>.

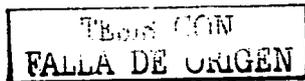
El estudio de la asociación entre ciertos serotipos de *E.coli* con procesos diarreicos ha conducido a la identificación de tres diferentes mecanismos por medio de los cuales este tipo de bacterias interactúa con las células epiteliales del intestino:

- 1.- **Adherencia** indispensable para que la bacteria pueda acercarse, pegarse y colonizar en el epitelio de ciertas áreas del intestino.
- 2.-Producción de proteínas bacteriana (**toxinas**) que se liberan una vez que la bacteria ha colonizado el intestino, dando lugar a la estimulación de la secreción de agua y electrolitos.
- 3.- **Invasión y reproducción bacteriana** dentro del citoplasma de las células epiteliales del intestino, lo cual permite a las bacterias evadir los mecanismos de protección del hospedero, una vez que se encuentran en el interior de la célula<sup>(K, 13, 64)</sup>.

## 2.-Clasificación de *E.coli*.

### 2.1.*Escherichia coli* enteropatógena (EPEC).

EPEC es responsable de un gran número de casos de diarrea infantil en diversos países subdesarrollados, tabla 3. Estas cepas corresponden a serotipos específicos y producen un patrón de adherencia característico en cultivo celular llamada adherencia localizada (LA). En el patrón de LA, la bacteria se une a áreas localizadas de la superficie celular, formando microcolonias compactas (bacterias agrupadas) y son visualizadas después de 3 horas de contacto de la bacteria con las células<sup>(62)</sup>.



**Tabla No. 3.**  
**Características principales de *Escherichia coli* enteropatógena.**

Características generales.	EPEC fue la primera clase de <i>E.coli</i> que fue reconocida como causante de diarrea en niños. Las evidencias indican que ésta clase de <i>E.coli</i> se adhiere al enterocito en dos fases una inicial mediada por adhesinas (BFP) y una segunda fase de adherencia íntima.
Grupos somáticos asociados.	26, 44, 55, 86, 111, 114, 119, 125, 126, 127, 128, 142 y 158.
Distribución geográfica.	Mundial.
Grupos de edad afectados.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Recién nacidos y lactantes.</li> <li>• Viajeros y turistas.</li> </ul>
Modo de transmisión.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alimentos contaminados.</li> <li>• Fómites y manos contaminadas.</li> </ul>
Periodo de incubación.	9-12 horas.
Mecanismo de patogenicidad.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Adherencia a células epiteliales y esfacelamiento de microvellosidades.</li> <li>• Producción de citotoxinas.</li> </ul>
Cuadro clínico.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Diarrea con sangre, moco, PMN.</li> <li>• Fiebre.</li> <li>• Dolor abdominal.</li> <li>• Vómito.</li> </ul>
Duración habitual.	1 semana.
Diagnóstico de laboratorio.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Serología.</li> <li>• Cultivos celulares.</li> <li>• Microscopia de fluorescencia.</li> <li>• Hibridación de DNA.</li> <li>• PCR.</li> </ul>
Tratamiento.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rehidratación oral.</li> <li>• Cotrimoxazol.</li> </ul>

Tomada de: Cravioto (8), (9), (10), Levine (33), Nataro (44).

La adherencia de tipo localizado de cepas EPEC al enterocito, tiene dos fases: una inicial mediada por adhesinas de tipo fimbriado permitiendo a las bacterias acercarse a sus receptores celulares y una segunda de adherencia íntima a la membrana del enterocito. Esta última se relaciona con el esfacelamiento del epitelio, la pérdida de microvellosidades y la formación de imágenes en pedestal en la célula epitelial<sup>(6, 9, 10, 62)</sup>.

La primera fase comprende el acercamiento de las bacterias a las células epiteliales y la acumulación en las mismas mediante la formación de haces de fimbrias. Este fenómeno es asociado con la presencia de un factor de adherencia de cepas EPEC (EAF), presente en un plásmido; además esta el grupo de genes que codifica para el pili de forma rizada (BFP) que parece que interconecta a la bacteria dentro de las microcolonias y de esta manera promueve su estabilización<sup>(62)</sup>.

Los BFP tiene una secuencia terminal de aminoácidos muy similar a la de fimbrias producidas por *Vibrio cholerae* O1 y *Neisseria gonorrhoeae*, lo cual indica que se trata de proteínas bacterianas que median adherencia fundamentalmente a células humanas. Estas fimbrias permiten a las bacterias unirse con otras para formar microcolonias por medio de las cuales interactúan con las células epiteliales<sup>(60)</sup>.

Una vez formadas estas microcolonias, comienza una segunda fase de adherencia, con la destrucción de las microvellosidades intestinales, proceso al que se ha denominado como esfacelamiento. La falta de microvellosidades permite a las bacterias adherirse de manera íntima a receptores de la membrana que se hallan en la célula epitelial. Esta segunda fase de adherencia está relacionada con la producción de una proteína de 94 Kilodaltones (kDa) denominada íntima, cuya producción está controlada genéticamente por varios *loci* en el cromosoma de la bacteria denominados *eaeA* y *eaeB*. Para la expresión de estos *loci* se requiere estén presentes ciertos genes en el plásmido EAF<sup>(9, 60)</sup>.

El proceso de adherencia íntima da lugar a que en las células epiteliales se acumule actina por debajo de las cepas de EPEC, la acumulación de estos componentes tiene relación quizá con un

aumento de calcio en las células epiteliales a partir de fuentes intracelulares. Además da lugar a la polimerización de la actina del citoesqueleto de la célula epitelial como respuesta a la fosforilación de proteínas que conducen a la elevación de calcio intracelular, a través del sistema de la enzima proteína C cinasa, lo cual da lugar a un incremento en la salida de agua, cloro y potasio<sup>(9,10,57,60)</sup>.

El proceso de adherencia íntima entre la bacteria y la membrana de las células del epitelio intestinal, seguida por la destrucción de las microvellosidades con alteración del citoesqueleto en el sitio de unión de la bacteria, se denomina adherencia y esfacelamiento (A/E)<sup>(9, 10, 15)</sup>.

El plásmido EAF no es esencial para la formación de lesiones A/E aunque su presencia aumentó la eficiencia con la que ocurre, probablemente por la influencia de un grupo de genes reguladores (*perA*, *perB* y *perC*). Los determinantes de la producción de las lesiones A/E están localizadas en el *locus* de esfacelamiento del enterocito (LEE), el cual contiene los genes que codifican para la íntima y otras moléculas de adhesión a la membrana; un sistema de secreción tipo III, un número de proteínas secretadas (Esp) y el receptor translocado de íntima (Tir)<sup>(62)</sup>.

Los cambios bioquímicos relacionados con este proceso son los que inducen probablemente a la célula intestinal a secretar agua y electrolitos (cloro y potasio) al espacio intraluminal. El efecto fisiológico secundario a estas alteraciones, así como la deficiente absorción de líquidos por la falta de microvellosidades en segmentos importantes del intestino, son los principales responsables del cuadro de diarrea severa<sup>(60)</sup>.

EPEC es una causa importante de diarrea en recién nacidos y en lactantes, así como de brotes en cuneros. El cuadro clínico de la infección se caracteriza por la presencia de dolor abdominal severo, fiebre y las evacuaciones son frecuentes con moco, PMN y sangre, la duración habitual de la enfermedad es de una semana<sup>(8)</sup>.

## 2.2. *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC).

La segunda clase más importante de *E. coli* asociada con diarrea es ETEC, la mayor causa de diarrea infantil en países en desarrollo y el agente más frecuentemente responsable de la diarrea del viajero. La infección por ETEC es adquirida por ingestión de agua o comida contaminada, la bacteria coloniza la parte proximal del intestino delgado, donde elabora una enterotoxina termolábil (LT) y una enterotoxina termoestable (ST)<sup>(33, 37)</sup>.

La toxina termolábil (LT) es una proteína dimérica de alto peso molecular (86 500 Da) similar en su estructura química, función y antigenicidad a la toxina producida por *V. cholerae* O1, se inactiva por calentamiento a 100°C durante 10 minutos, tabla 4.

Estructuralmente la toxina está compuesta por dos subunidades A y B. La primera consiste en una molécula de A<sub>1</sub> (24 kDa) que tiene como función principal inducir una ribosilación del ADP dando lugar al incremento de AMPc intracelular y otra de A<sub>2</sub> (5 kDa), la cual participa en la unión de la subunidad A<sub>1</sub> con la subunidad B, así como en el proceso de internalización de A a la célula intestinal; estas subunidades están unidas por un puente disulfuro y cada subunidad A está ligada en forma no covalente con la subunidad B, un pentámero con la propiedad de unir la toxina a un gangliósido (GM<sub>1</sub>) presente en la superficie de la célula epitelial intestinal, el cual actúa como su receptor para facilitar la internalización de la subunidad A<sup>(7, 60)</sup>.

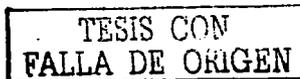
LT causa diarrea al estimular la actividad de una adenilato ciclasa ligada a la membrana, lo que da por resultado la conversión de ATP en AMPc, como sigue:



Cantidades mínimas de AMPc inducen la excreción activa de Cl<sup>-</sup> e inhiben la absorción de Na<sup>+</sup>, creando así un desequilibrio de electrolitos a uno y otro lado de la mucosa intestinal, con lo que se pierde abundante cantidad de líquido<sup>(64)</sup>.

El mecanismo por el cual la toxina LT estimula la actividad de la adenilato ciclasa es:

1.- La subunidad B de la toxina se liga a un receptor específico de la célula al gangliósido GM<sub>1</sub>.



**Tabla No. 4.**

**Características principales de *Escherichia coli* enterotoxigénica.**

Características generales.	Produce dos tipos de toxinas. LT y/o ST, la primera activa al sistema adenilato ciclasa provocando una hipersecreción prolongada, la segunda activa el sistema guanilato ciclasa.
Grupos somáticos asociados	6, 8, 15, 20, 25, 27, 63, 78, 114, 128, 148, 153, 159, 167, 169
Distribución geográfica.	Países en desarrollo y áreas tropicales.
Grupos de edad afectados.	Menores de 5 años de edad y turistas.
Modo de transmisión.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Agua y alimentos contaminados.</li> <li>• Persona-persona.</li> </ul>
Periodo de incubación.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 10-12 horas con cepas productoras de una sola toxina.</li> <li>• 24-72 horas con cepas LT, ST.</li> </ul>
Mecanismo de patogenicidad.	Enterotoxinas LT y/o ST.
Cuadro clínico.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• De 8-12 evacuaciones al día.</li> <li>• Dolor abdominal.</li> <li>• Vómito.</li> <li>• Fiebre.</li> </ul>
Duración habitual.	4-5 días.
Diagnóstico de laboratorio.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Asa ligada de conejo.</li> <li>• ELISA.</li> <li>• Aglutinación en partículas de latex.</li> <li>• Radioinmunoensayo.</li> <li>• Cultivo celular.</li> <li>• Hibridación de DNA.</li> <li>• PCR múltiple.</li> </ul>
Tratamiento.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rehidratación oral.</li> <li>• Ciproflavina</li> <li>• Doxiciclina</li> </ul>

Tomada de: Cravioto (8), (9), Levine (33), Nataro (44).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

2.- La subunidad A<sub>1</sub> es liberada de la toxina y penetra en la célula.

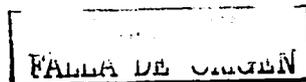
3.- La subunidad A<sub>1</sub> separa NAD en nicotinamida y ADP-ribosa y transfiere esta última a la proteína ligadora, con lo cual hay una mayor estabilidad del complejo catalítico encargado de la actividad de la adenilato ciclasa, ello ocasiona una mayor actividad (amplificada) de la ciclasa y un incremento correspondiente en la cantidad de AMPc producido<sup>(64)</sup>.

El incremento de los niveles de AMPc intracelular ocasiona un aumento en la secreción de agua y electrolitos en las células de las criptas intestinales, con una disminución concomitante en la absorción de agua en células de la punta de las vellosidades intestinales. Ambos eventos conducen a un incremento en la secreción de líquido hacia el lumen intestinal, el cual se manifiesta clínicamente como diarrea<sup>(15,21,39,60)</sup>.

La toxina termoestable (ST) comprende una familia de péptidos pequeños formados por 18 a 20 aminoácidos, de 1500 a 2000 Da, no se destruyen por calentamiento, no inmunogénicos, solubles o no en metano. Esta toxina se sintetiza en forma de pretoxina, la cual se activa intracelularmente antes de ser secretada por la bacteria<sup>(59,60,64)</sup>.

La ST estimula a la enzima guanilato ciclasa, incrementando los niveles de monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) inhibiendo el cotransporte de NaCl por la pared intestinal, por lo que la acción de la ST puede ser en forma primordial antiahsortiva; el control genético de la producción de LT y ST esta localizado en plásmidos transferibles<sup>(59,60,64)</sup>.

Además las cepas ETEC tienen la propiedad de producir proteínas fimbriadas, por medio de las cuales se adhieren a receptores específicos presentes en las células del hospedero llamadas factores de colonización o CFA (CFA/I, CFA/II, CFA/III, y CFA/IV). Las cepas de ETEC aisladas de seres humanos producen dos tipos de antígenos, uno de tipo fimbriado y otros de tipo fibrilar. Dentro del primer grupo, se incluyen al CFA/I y los antígenos de superficie (CS) 1, 2, 4 y 5, quedando el CS3 y el CS6 dentro del grupo de antígenos fibrilares. Al igual que las enterotoxinas, la producción de estos factores de adhesividad está controlado por material genético presente en plásmidos<sup>(60)</sup>.



El cuadro clínico que inducen estas bacterias es similar al observado en el caso de cólera, presentándose de ocho a doce evacuaciones al día por un periodo de cuatro a cinco días. Las cepas ETEC son una causa importante de diarrea en niños menores de cinco años de edad y la causa más importante de diarrea del viajero<sup>(8)</sup>.

### **2.3. *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC).**

EIEC a diferencia de los demás grupos, puede producir daño por su capacidad de penetrar e invadir la mucosa del colon, además de que aparentemente no penetra la superficie del intestino delgado<sup>(9,17)</sup>.

EIEC produce un síndrome disentérico similar al causado por *Shigella*, caracterizado por dolor abdominal severo y diarrea con moco y sangre. Aunque los signos clínicos de ésta enfermedad varían en cada paciente se le atribuye fiebre, dolor de cabeza, mialgia y diarrea, hasta disenteria y en casos severos hipotensión<sup>(38)</sup>.

El mecanismo de invasividad producido por *Shigella* y *E.coli* enteroinvasiva a las células epiteliales de la mucosa colónica es multifactorial, por lo tanto es muy difícil establecer al mismo tiempo todos los fenómenos que participan durante el evento, pues existen múltiples interrelaciones entre los genes y las proteínas reguladas por el genóforo bacteriano y el plásmido, lo que da lugar al fenotipo expresado durante el proceso invasivo, tabla 5.

La invasividad es una cualidad de la patogenicidad relacionada con la entrada al hospedero. Al contacto con el epitelio celular de la mucosa del colon, la bacteria probablemente se adhiere a la mucosa a través de las tres proteínas de membrana externa (OMP) codificadas por el plásmido de 120-140 MDa e histológicamente, se observa la primera alteración: una degeneración localizada del borde de cepillo de la célula epitelial. Después que el microorganismo ha alcanzado la membrana celular epitelial, el gen *virF* que codifica para la síntesis de una proteína de 30 kDa se dice que regula positivamente la expresión de los genes *ipa* dando lugar a los polipéptidos

**Tabla No. 5.**

**Características principales de *Escherichia coli* enteroinvasiva.**

Características generales.	Estas cepas son capaces de invadir y penetrar células de la mucosa del colon e inducen una enfermedad diarreica hemorrágica.
Grupos somáticos.	28ac, 112ac, 124, 136, 143, 144, 152, 164 y 167.
Patogénesis.	Síndrome disentérico.
Distribución geográfica.	Mundial.
Grupos de edad afectados.	Todas las edades.
Modo de transmisión.	Alimentos contaminados.
Periodo de incubación.	18 horas en brotes.
Mecanismo de patogenicidad.	Invasión y multiplicación en células epiteliales.
Cuadro clínico.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dolor abdominal severo.</li> <li>• Evacuaciones frecuentes con moco y sangre.</li> <li>• Fiebre, dolor de cabeza, mialgia.</li> </ul>
Diagnóstico de laboratorio.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Prueba de Sereny.</li> <li>• Prueba de invasividad en cultivo celular</li> <li>• Hibridación de DNA.</li> <li>• PCR.</li> </ul>
Tratamiento.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rehidratación oral.</li> <li>• Ampicilina.</li> </ul>

Tomada de: Cravioto (8), (9), Levine (33), Nataro (44).

Ipa A, B, C y D que están involucrados en el proceso de entrada a la célula y son considerados como invasinas; penetrando así la membrana celular del enterocito<sup>(32,61)</sup>.

En el citoplasma celular, se observa que se empieza a polimerizar la actina junto con la acumulación de la miosina directamente en el sitio por donde va a penetrar la bacteria. La célula se encuentra metabólicamente activa y por ello va a fagocitar al microorganismo quedando éste atrapado dentro de una vacuola fagocítica. No se sabe con exactitud si la bacteria escapa rápidamente del fagosoma a través de exoenzimas hidrolíticas como fosfolipasas, lipasas y/o lecitinasas o por medio de un estallido respiratorio involucrando el incremento en la acidez de la vacuola por liberación de radicales de oxígeno. La bacteria induce la lisis de la membrana fagocítica poco tiempo después de la entrada a la célula; cuando el microorganismo se encuentra libre en el citoplasma, el gen *icsA* controlado positivamente por los genes *virF* y *kcpA*. Este gene codifica para una proteína de membrana externa de 120 kDa que permite a la bacteria moverse dentro de la célula y reinfectar a las células vecinas. Así, exhibe dos movimientos: el primero se ha designado fenotipo Ics (diseminación intra e intercelular), este es rápido y azarosamente orientado y conjuntamente con la multiplicación bacteriana en el interior de la célula, el microorganismo es capaz de atravesar el citoplasma en 4 a 5 horas. Este movimiento, da lugar a la formación de protusiones que se dan para infectar a las células adyacentes. Se observan así múltiples focos de nucleación en la célula y formación de pequeños filamentos de actina, cerca de la superficie bacteriana. Estos filamentos forman un saco polarizado en la superficie de la bacteria que promueve su locomoción<sup>(18,36,61)</sup>.

Las mutantes *icsA* (*virG*) pierden la capacidad de polimerizar la actina, pueden adherirse, entrar a la célula y lisar a la membrana fagosomal formando microcolonias cerca del núcleo de la célula infectada. La bacteria durante la colonización de la célula infectada se desliza a lo largo del haz de actina moviéndose suave y unidireccionalmente a través de éstos filamentos<sup>(61)</sup>.

La infección inicial se produce en las células periféricas y la colonización de las células centrales se da por el movimiento intracelular o por la diseminación entre célula a célula en la monocapa epitelial, el proceso de colonización es exclusivamente intra e intercelular<sup>(18)</sup>.

Las manifestaciones clínicas asociadas con esta infección son evacuaciones en poca cantidad acompañadas de moco y sangre, dolor abdominal tipo cólico y fiebre, la enfermedad habitualmente es autolimitada y las muertes ocasionadas por ella son poco comunes<sup>(8)</sup>.

#### **2.4. *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC).**

El término *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) fue propuesto por Levine en 1987 e incluye cepas de diferentes serotipos con características clínicas, epidemiológicas y patogénicas similares a los del serotipo O157:H7, considerado como prototipo del grupo<sup>(44)</sup>.

Las cepas EHEC generan un tipo de citotoxinas y además tienen la habilidad para adherirse en forma particular a la mucosa intestinal, mediante la producción de proteínas modificadas por un plásmido de 50 a 70 megadaltones (MDa) que induce una lesión caracterizada por adherencia íntima de las bacterias a las células epiteliales, después de destruir las microvellosidades, denominada adherencia y esfacelamiento<sup>(60)</sup>.

Las citotoxinas (STX) producidas por EHEC reciben dos nombres de acuerdo con sus características antigénicas y por su actividad sobre cultivos celulares, uno es citotoxina semejante a la de Shiga (SLT) y el segundo es de verotoxina (VT) por su efecto citotóxico (destrucción total de la monocapa celular) sobre monocapas de células Vero. Se conocen tres tipos antigénicos de las citotoxinas, la VT1 o SLT-1 y la VT2 o SLT-2, afectan específicamente a humanos y la Vte o SLT-Iv; una variedad antigénica de VT2, la cual afecta de modo exclusivo a animales, tabla 6.

Las tres citotoxinas pertenecen a una clase de proteínas bacterianas conocidas como A-B; la estructura de todas estas toxinas es doble, están formadas por una subunidad A única la cual posee la actividad enzimática, rodeada por cinco subunidades B, uniendo a la toxina con su receptor específico en la superficie celular<sup>(60)</sup>.

**Tabla No. 6**

**Características principales de *Escherichia coli* enterohemorrágica.**

Características generales.	Elabora citotoxinas que son denominadas Vero o toxinas Shiga-like, que provocan efectos citotóxicos en línea celular Vero y actúan a nivel de síntesis de proteínas inactivando células del huésped.
Grupos somáticos asociados.	2, 4, 7, 26, 45, 50, 11, 113, 121, 125, 145, 157 y 173.
Patogénesis.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Diarrea sanguinolenta.</li> <li>• Síndrome urémico hemolítico.</li> <li>• Colitis hemorrágica.</li> </ul>
Distribución geográfica.	Mundial.
Grupos de edad afectados.	Todas las edades.
Modo de transmisión.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alimentos contaminados.</li> <li>• Persona-persona.</li> </ul>
Mecanismo de patogenicidad.	Producción de citotoxinas (tipo Shiga).
Periodo de incubación.	12-60 horas.
Cuadro clínico.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Excremento sanguinolento.</li> <li>• SUH.</li> <li>• Trombocitopenia.</li> <li>• Anemia hemolítica microangiopática.</li> </ul>
Diagnóstico de laboratorio.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sorbitol.</li> <li>• Serología.</li> <li>• ELISA.</li> <li>• Hibridación de DNA.</li> <li>• PCR.</li> </ul>
Tratamiento.	• Rehidratación oral

Tomado de: Cravioto (8), (9), Levine (33), Nataro (44).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

La subunidad A de las toxinas VT tiene un peso molecular de 32 kDa, mientras que cada una de las cinco subunidades B poseen un peso molecular de 7.7 kDa.

El receptor específico del pentámero B de ambas citotoxinas es el glucolípido globotriosilcerámico (Gb3), el cual posee la secuencia específica Gal ( $\alpha$  1-4) Gal ( $\beta$  1-4) Glc-Cer.

Una vez unidas con su receptor por medio del pentámero B, la subunidad A de VT1 y VT2 se internaliza mediante un proceso de endocitosis, mediado principalmente por el receptor. En el interior de la célula la subunidad A se desdobra por acción proteolítica, dando lugar a un fragmento A1 que conserva la actividad enzimática de la citotoxina. Este fragmento interfiere con la unión de la aminoacil-RNAt de la subunidad ribosomal 60 S, impidiendo la síntesis de proteínas al actuar sobre el factor de elongación, además provocan hemorragias en la mucosa intestinal debido a la actividad citotóxica y como efecto secundario activan al sistema adenilato ciclasa, incrementando al AMPc<sup>(60)</sup>.

El aislamiento de cepas EHEC se ha relacionado con la presencia de diarrea esporádica, de colitis hemorrágica o febril, de síndrome urémico hemolítico y de púrpura trombocitopénica en niños, adultos y ancianos. La colitis hemorrágica asociada a infección por cepas EHEC es un padecimiento autolimitado, caracterizado por diarrea de inicio brusco con dolor abdominal. Las evacuaciones líquidas se acompañan de una descarga hemorrágica, la cual semeja un sangrado de tubo digestivo bajo<sup>(8,9,44,60)</sup>.

El síndrome urémico hemolítico (SUH) es una de las principales causas de daño renal en niños, se define por la presencia de anemia hemolítica microangiopática, insuficiencia renal aguda y trombocitopenia, cuadro de diarrea aguda con sangre. El daño renal se caracteriza por edema y desprendimiento de las células endoteliales del glomérulo, con coagulación intravascular y presencia de depósitos de fibrina<sup>(8,9)</sup>.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN.

### 2.5. *Escherichia coli* adherente difusa (DAEC).

Las cepas DAEC, son definidas por su patrón de adherencia difusa sobre cultivo de células HeLa o HEP-2; ha sido asociada con diarrea persistente en niños grandes, pero no en infantes. Además algunas cepas DAEC han estado involucradas en infecciones uropatogénicas<sup>(24,25)</sup>.

La familia DAEC aparece como un grupo heterógeno de cepas de *E. coli*, las cuales pueden ser una clase evolutiva de EAEC. Por otro lado un subgrupo de cepas DAEC ha sido nombrado *E. coli* enteropatogena adherente difusa (DA-EPEC) porque contiene un homólogo del locus de patogenicidad de la isla de patogenicidad de adherencia y esfacelamiento (PAI) y exhibe propiedades patógenas características de las cepas de *E. coli* enteropatogena<sup>(24,25)</sup>.

Poco se conoce acerca de las características de patogenicidad de las cepas DAEC que inducen diarrea. Los únicos factores de virulencia de las cepas DAEC que se conocen son sus adhesinas.

Las cepas DAEC expresan adhesinas AfaE-I y AfaE-II, las Dr adhesinas y la adhesina fimbrial F1845. El ensamble estructural de los genes que codifican para las adhesinas Afa/Dr son similares en organización, formados por operones. Son cinco genes, los genes A al D, codifican proteínas accesorias, y son altamente conservados entre los miembros de la familia, mientras que el gen E codifica para la molécula de adhesión<sup>(24,25,44,51)</sup>.

Las adhesinas Afa/Dr median la adhesión bacteriana en el patrón de adherencia difusa a los enterocitos y células epiteliales, por unión a un receptor común, el factor CD55, una proteína reguladora del complemento.

La asociación de las cepas DAEC y casos de diarrea se encuentra solamente en niños grandes, pero no en infantes. El riesgo de adquirir DAEC y sufrir diarrea incrementa con la edad desde 1 año hasta 5 años cuando se presenta el mayor número de casos<sup>(8,9)</sup>.

El modo de adquisición de la infección de DAEC, no ha sido determinado. La mayoría de los pacientes infectados con DAEC tienen diarrea acuosa sin sangre o leucocitos fecales.

## **2.6. *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC).**

### **2.6.1. Generalidades.**

EAEC es una causa importante de diarrea en niños en países subdesarrollados y ha sido particularmente asociado con diarrea persistente (más de 14 días) como una causa de enfermedad y muerte. Estudios recientes implican a EAEC como una causa de infección por alimentos contaminados en países industrializados.

EAEC es un patógeno enterico definido por su distintivo patrón de adherencia agregativo (AA) a un cultivo de células HEp-2, con notable agrupamiento de bacterias a las células y al vidrio, describiendo una configuración de ladrillos apilados<sup>(5)</sup>.

Los mecanismos de diarregenicidad de EAEC no están caracterizados, pero diversos factores han sido reportados; la adherencia es codificada en un plásmido de 60-65 MDa (designado pAA) el cual también codifica otros diversos factores de virulencia, tabla 7.

pAA codifica varios factores, incluyendo la fimbria de adherencia agregativa (AAF/I y AAF/II), la enterotoxina termoestable de cepas enteroagregativas (EAST-1) y una citotoxina de 104 kDa designada como Pet (plásmido codificador de la toxina)<sup>(14)</sup>. Además del plásmido pAA, algunas cepas de EAEC expresan otros factores de virulencia codificados sobre el cromosoma, incluye una mucinasa secretada de 116 kDa designada Pic (Proteína involucrada en la colonización intestinal), una hemolisina termolábil, una enterotoxina semejante a *Shigella* (ShET1), además de una proteína de 108 kDa que induce lesión destructiva<sup>(40,50)</sup>.

EAEC exhibe un patrón de transmisión, en el cual un plásmido de virulencia es adquirido y entonces se mantiene estable entre los descendientes de clonas, además la transmisión horizontal

**Tabla No. 7**

**Características principales de *Escherichia coli* enteroagregativa.**

Características generales.	Estas cepas se caracterizan por su adherencia agregativa en cultivo celular y al vidrio en forma de ladrillos apilados, por la formación de una biocapa de moco y toxicidad en la mucosa vía la elaboración de citotoxinas.
Grupos somáticos asociados.	44, 86, 11, 125 y 126.
Distribución geográfica.	Países subdesarrollados.
Grupos de edad afectados.	Niños menores.
Modo de transmisión.	Alimentos y agua contaminados.
Periodo de incubación.	20-48 horas.
Mecanismo de patogenicidad.	Estimula la producción de moco. Produce la toxina, EAST, y las proteínas Pic y Pet.
Cuadro clínico.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Diarrea intermitente y crónica.</li> <li>• Diarrea predominantemente secretora, acuosa y mucoide.</li> <li>• Bajo grado de fiebre, dolor abdominal, poco o nulo vómito.</li> <li>• Las heces contienen moco y a menudo sangre.</li> </ul>
Duración habitual.	≥14 días.
Diagnóstico de laboratorio.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cultivo celular Hep-2.</li> <li>• Colony blot.</li> <li>• PCR.</li> </ul>

Tomado de: Cravioto (8), (9), Levine (33), (34), Nataro (44), (45).

del plásmido entre distintos grupos cromosomales también ocurre. El mecanismo para la transmisión horizontal es presumiblemente la conjugación; se ha observado que el plásmido de AA es transmisible<sup>(12)</sup>.

Sin embargo aunque la patogenésis de la infección de EAEC no esta completamente entendida, se ha definido un gran número de características.

I) Adherencia inicial a la mucosa intestinal y/o la capa de moco, mediada por la fimbria de adherencia agregativa (AAFs) y quizá otros factores, pueden facilitar la colonización inicial.

II) Incremento en la producción de moco, formando una biocapa de bacteria-moco en la superficie intestinal.

III) Toxicidad en la mucosa, marcada por exfoliación de las células epiteliales, mediada presumiblemente por la elaboración de citotoxinas, figura 1<sup>(2,44,46,48)</sup>.

En los hospederos malnutridos puede producir un síndrome.

### **2.6.2.Histopatología.**

Importantes indicios de la patogenésis de EAEC pueden ser encontrados por la examinación histopatológica de pacientes infectados y modelos animales. Las cepas de EAEC incrementan la secreción de moco característico de la mucosa, con implantación de la bacteria en una biocapa de bacteria-moco.

El papel de el exceso de producción de moco en la patogenésis de EAEC no es claro, sin embargo, la formación de una pesada biocapa puede ser relacionado con la diarregenicidad de EAEC y quizá, esta habilidad sea la causa de la colonización persistente y diarrea<sup>(41,42)</sup>.

Además de la formación de la biocapa de moco característico, muchas cepas de EAEC inducen efectos citotóxicos a la mucosa intestinal, provocando una lesión destructiva. La lesión se caracteriza por acortamiento de las vellosidades, necrosis hemorrágica de la punta de los vellos y

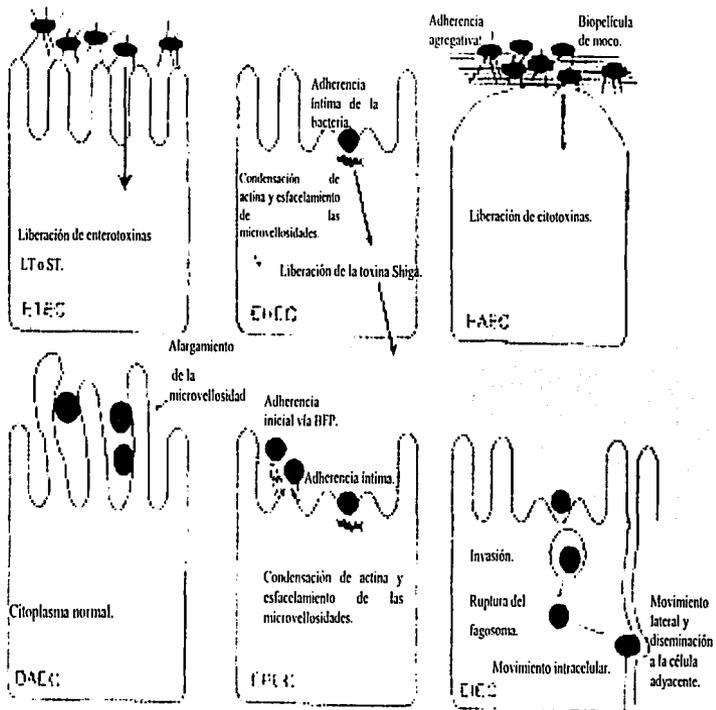


Figura 1. Mecanismo de patogenicidad de los diferentes grupos de *Escherichia coli*.

Tomado de: Nataro y col. (44).

TESIS CON  
 FALTA DE ORIGEN

una suave respuesta inflamatoria con edema e infiltración mononuclear de la submucosa, se observa una arquitectura microvellosa normal y no hay invasión a los enterocitos, además la adherencia de la bacteria no provoca la lesión de adherencia y esfacelamiento<sup>(23,44,45)</sup>.

La citotoxicidad inducida por EAEC es evidenciada por su único fenotipo, empieza con la ruptura de la monocapa de microvellosidades con la pérdida de estas por formación de vesículas, seguida de el aclaramiento de el citoplasma apical y subsecuentemente desarrollo de la vacuolización subnuclear y el núcleo asume una posición más apical dentro de las células; las células severamente afectadas muestran ruptura y exfoliación de la monocapa<sup>(43)</sup>.

Se ha reportado que la formación de vesículas de la membrana se debe a una severa polimerización de la actina en presencia de concentraciones elevadas de calcio intracelular<sup>(28)</sup>.

Las cepas de EAEC tienen la habilidad de adherirse al intestino delgado (ID) y grueso (IG); una enterotoxina actúa sobre el ID e induce un estado de diarrea acuosa seguido por la colonización de el IG, con la elaboración de una citotoxina la cual puede provocar daño a la mucosa, es la posible explicación de la diarrea con sangre observada en algunos niños infectados con EAEC<sup>(29)</sup>.

### **2.6.3. Adherencia.**

El fenotipo de AA de las cepas de EAEC está asociado con la presencia de un plásmido de 60MDa, el cual codifica para un pili que es de 2-3 nm de diámetro, designado fimbria de adherencia agregativa (AAF/I), también asociado con la hemaglutinación (HA) de eritrocitos humanos<sup>(40)</sup>.

Los genes para AAF/I están organizados en dos regiones del plásmido, separadas por 9kb . La región 1 contiene un grupo de genes requeridos para la síntesis fimbrial y ensamblamiento, incluyendo la subunidad estructural de la fimbria.

El análisis de la secuencia nucleotídica de los genes de la región 1 sugiere que AAF/I es miembro de la familia de las adhesinas Dr, así llamadas porque median la adherencia al antígeno del grupo de sangre Dr<sup>(11,41,44,45)</sup>.

La región 2 codifica para un activador transcripcional de la región de AAF/I llamado AggR, el cual muestra homología con los miembros de la familia Ara C de proteínas de unión a DNA.

Una segunda estructura fimbrial, designada AAF/II, la cual es diferente morfológica y genéticamente de AAF/I, ha sido identificada.

Las fimbrias AAF/II son de 5 nm de diámetro y están arregladas en filamentos agrupados semirígidos. Los genes que codifican AAF/II son también organizados en dos grupos separados por 12 kb. El análisis de los genes AAF/II indica que cada uno está relacionado con los genes que codifican para la familia de las adhesinas Dr<sup>(11,14,41,44,45)</sup>.

El análisis del DNA sugieren que AAF/I y AAF/II están presentes en solo una minoría de las cepas y que la colonización intestinal parece estar mediada por uno o más de los diferentes antígenos fimbriales.

En algunas cepas de EAEC, la AA puede ser dada por otros factores diferentes de las fimbrias de AAF. Una proteína de membrana externa afimbrial o una proteína de 38 kDa pueden ser responsables de la AA en algunas cepas<sup>(41,45)</sup>.

#### **2.6.4. Propiedades hemaglutinantes.**

Las cepas de EAEC poseen actividad hemaglutinante y existe, una relación entre la producción de la fimbria de adherencia agregativa y la hemaglutinación (HA).

La HA es una importante propiedad de EAEC y se demuestra para varias especies incluyendo humanos, ratas, ratón y ovejas, pero no conejos<sup>(41,53)</sup>.

La producción del pili AAF/I, demuestra una cercana correlación entre la posesión de esta fimbria, la AA y la HA de eritrocitos. Múltiples hemaglutininas y receptores están involucrados en la HA por FAEC, compuestos que contienen ácido siálico pueden ser los receptores sobre los eritrocitos y posiblemente en el intestino<sup>(41,52)</sup>.

#### **2.6.5. Enterotoxina termoestable de cepas enteroagregativas (EAST-1).**

Savarino et.al (44) estudiando el plásmido de la cepa, identificó un fragmento que codifica para una molécula de 41 kDa, homóloga de ST, designado EAST-1. El producto de este gen, EAST-1, es una proteína de 38 aminoácidos la cual se caracteriza por cuatro residuos cisteínicos, en lugar de 6 residuos característicos de la ST de *E.coli*. El papel de EAST-1 en la secreción no ha sido bien determinado<sup>(44,45)</sup>.

#### **2.6.6. Plásmido codificador de la toxina (Pet).**

Los sobrenadantes de cepas de EAEC contienen una proteína de alto peso molecular de 104 kDa, que induce acumulación de fluidos y efectos citotóxicos. El gen que codifica para esta toxina, se ha designado Pet (plásmido codificador de la toxina), y ha sido clonado y secuenciado. Pet mostró ser un miembro de la clase de proteínas de autotransporte, un grupo de determinantes de virulencia de las bacterias Gram negativas. La familia de autotransporte toma este nombre por su único mecanismo de secreción, en donde la secuencia señal es el aminoácido N-terminal el cual dirige la secreción a través del interior de la membrana y subsecuentemente la porción C-terminal del precursor forma una estructura  $\beta$ -barril en la membrana externa de la bacteria. La porción N-terminal de la molécula (también llamado dominio pasajero), se cree que es transportado a través del  $\beta$ -barril a la superficie celular, además Pet corresponde a la subfamilia característica que conserva una serin proteasa.

Pet causa alteraciones en las células HEP-2, altera el citoesqueleto, induciendo contracción del citoesqueleto, pérdida de la tensión de las fibras de actina y liberación de los contactos focales celulares del vidrio, seguido de un completo redondeamiento y separación de las células del vidrio<sup>(16,28,46,48)</sup>.

Las células redondas sugieren que Pet rompe el citoesqueleto o las proteínas del citoesqueleto y que es internalizado por las células HEP-2 y esta internalización parece ser requerida para la inducción de los efectos citopáticos.

Pet es una toxina que altera el citoesqueleto y su actividad de proteasa juega un papel en los efectos citopáticos y enterotóxicos<sup>(48)</sup>.

#### **2.6.7. Proteína involucrada en la colonización intestinal (Pic).**

El gen que codifica para una proteína secretada de 116 kDa, está localizado en el cromosoma de EAEC, el cual es llamado *pic* y cuyo producto es la proteína Pic (proteína involucrada en la colonización intestinal). Esta proteína es una serina proteasa extracelular la cual muestra actividad mucinolítica, resistencia al suero y de HA, la cual puede ser representativa para la unión a la mucosa. La proteasa es sintetizada como un precursor grande, el cual es procesado durante la secreción por el mecanismo de secreción de autotransporte. El gen que codifica la proteína Pic tiene un alto nivel de similitud con las proteínas de la familia de autotransporte<sup>(27,44,45)</sup>.

Pic media la resistencia al complemento, pero este efecto es dependiente de la actividad de proteasa de la proteína. Un papel más importante para Pic en la patogenésis puede ser su actividad en la degradación de la mucina. Pic está envuelta en las etapas tempranas de la patogenésis y más probablemente promueve la colonización intestinal<sup>(27)</sup>.

#### **2.6.8. Enterotoxina termolábil de alto peso molecular.**

Una proteína de 108 kDa secretada por las cepas de EAEC es una enterotoxina termolábil, la cual parece inducir no solamente efectos enterotóxicos, sino también daño al tejido, inflamación y secreción de moco. Esta proteína es codificada en el plásmido de virulencia pAA y tiene actividad enterotóxica y quizá actividad citotóxica. Esta enterotoxina puede jugar un papel importante en la diarrea producida por EAEC<sup>(47)</sup>.

### **2.6.9. In inflamación intestinal.**

Los niños con infección por EAEC tienen inflamación intestinal, la cual es determinada por la presencia de marcadores inflamatorios fecales, estos marcadores incluyen lactoferrina un producto estable de neutrófilos y un marcador muy sensible para neutrófilos fecales, interleucina 8 (IL-8), una citocina de neutrófilos, e interleucina  $1\beta$  (IL- $1\beta$ ), una citocina proinflamatoria polifuncional<sup>(11,45,58)</sup>.

El origen de estos factores inflamatorios sigue sin conocerse, aunque puede ser resultado de la estimulación directa de la liberación de citocinas del epitelio. La liberación es aparentemente mediada por una proteína codificada cromosomalmente, termoestable, de alto peso molecular<sup>(3,40)</sup>.

La relación entre la liberación de IL-8 y los síntomas de la infección de EAEC no se conoce. Sin embargo, se sugiere un papel hipotético en la liberación de IL-8 en la diarrea causada por EAEC. La liberación de IL-8 de las células epiteliales en respuesta a EAEC puede actuar como el primer paso en una cascada secretora para reclutar neutrófilos. Los neutrófilos en el epitelio intestinal liberan 5'-monofosfato adenosina, el cual es convertido por una 5-nucleotidasa en la superficie apical de los enterocitos, a adenosina, un agonista para la secreción de cloruro<sup>(41)</sup>.

### **2.6.10. Características clínicas.**

La diarrea de EAEC es caracterizada por la formación de un gel espeso de moco sobre la mucosa intestinal y por daño a la mucosa. La diarrea de EAEC es predominantemente de naturaleza secretora, acuosa y mucosa con un bajo grado de fiebre y con poco o nulo vómito, las cepas se relacionan con diarrea intermitente y crónica (mayor a 14 días).

Las heces contienen moco y a menudo sangre pero generalmente no tienen leucocitos polimorfonucleares (PMN). Los síntomas encontrados son dolor abdominal, vómito, flatulencia y fiebre<sup>(25,44,56)</sup>.

### **2.6.11. Características epidemiológicas.**

En la diarrea por EAEC la estratificación de la edad revela que esta asociación es marcadamente dependiente de la edad y se ha aislado principalmente de infantes y niños pequeños aunque se sugiere que niños en la edad escolar y adultos son también susceptibles<sup>(30,50,61)</sup>.

Las características epidemiológicas como reservorios de infección, rutas de transmisión, estación del año en la que predomina son aún desconocidos, aunque se supone que su fuente de transmisión sea por alimentos y agua contaminados<sup>(31,45,63)</sup>.

Sin embargo, se ha visto que la colonización asintomática por EAEC puede llevar a la malnutrición causada por un incremento metabólico demandado por la inflamación intestinal, daño persistente en la mucosa dado por citotoxinas o la presencia de una barrera de absorción de nutrientes impuesta por la biocapa moco-bacteria<sup>(6,9)</sup>.

### **2.6.12. Diagnóstico de EAEC.**

Las cepas de *E.coli* que causan diarrea en humanos constituyen un grupo heterogéneo de organismos que se distinguen en sus propiedades de virulencia, epidemiología y asociación con enfermedad.

Las técnicas que emplean biología molecular han mostrado ser altamente efectivas en la detección e identificación de *E.coli* enteroagregativa.

Su patrón característico de adherencia agregativa está asociado con la presencia de un plásmido grande. Estos plásmidos están estrechamente relacionados con sus mecanismos de virulencia ; los genes que codifican para la fimbria, relacionada con la adherencia y su enterotoxina termoestable han sido identificados en estos plásmidos<sup>(44,45)</sup>.

Además de su papel en la patógenesis de la enfermedad diarreagénica, fragmentos del gran plásmido han sido usados como sondas de DNA en el diagnóstico de infecciones causadas por EAEC.

La prueba de diagnóstico de EAEC comúnmente usada, consiste de un fragmento del plásmido de las cepas EAEC.

A principios de la década de los años 80 se comenzaron a usar técnicas de biología molecular empleando sondas de DNA que determinan secuencias específicas en el material genético que ponen de manifiesto fragmentos de DNA que codifican para una propiedad en especial. Los ensayos de hibridación se fundamentan principalmente en la característica de complementariedad que existe entre las cadenas de DNA de los ácidos nucleicos<sup>(20)</sup>.

La prueba de hibridación del DNA es un método alternativo para la identificación de EAEC y se ha encontrado que es específica y sensible.

Las reacciones de hibridación pueden efectuarse en:

- a) fase sólida como el colony blot.
- b) fase líquida como el PCR.

La hibridación en fase sólida se realiza sobre una membrana o filtro de nylon o de nitrocelulosa, pudiendo ser la muestra, DNA de una colonia que se coloca directamente en el filtro. El microorganismo se lisa y el DNA es desnaturalizado por la adición de NaOH y fijado al soporte sólido con luz U.V., la membrana es prehibridada con un DNA heterólogo, para evitar las uniones inespecíficas de la sonda a la membrana. Después de la hibridación con la sonda marcada (no radiactiva) con digoxigenina, los filtros se lavan a diferentes temperaturas determinadas por las condiciones de restricción de la reacción y las colonias que tienen el gene se identifican colorimétricamente<sup>(20)</sup>.

En el procedimiento de hibridación en fase líquida tanto el DNA molde como la sonda, se encuentran libres y en movimiento, aumentando la probabilidad de que las secuencias

complementarias se alinien y se unan. La hibridación en solución se efectuará de 5 a 10 veces más rápido que en fase sólida.

Un ejemplo de esta hibridación es la PCR, en donde se realiza *in vitro* el proceso de replicación del DNA. Está basado en la acción de la polimerasa que como se sabe es la enzima que dirige la síntesis del DNA, y desde una cadena simple de DNA sintetiza la complementaria. Para ello necesita al menos una pequeña fracción de cadena doble de DNA para iniciar la síntesis. Esto se hace posible, si se pone una pequeña fracción de oligonucleótidos que sean complementarios de una porción, se unirá después de la desnaturalización de la doble cadena y mediante el crecimiento hacia el extremo 3' del DNA por la unión de los nucleótidos correspondientes suministrados y a través de la acción de la polimerasa se hace la amplificación del fragmento deseado<sup>(20,54)</sup>.

En esencia un ciclo de amplificación está constituido por tres etapas que se hacen a temperaturas distintas. La primera etapa consiste en la desnaturalización del DNA, separándose las cadenas por ruptura de los enlaces de hidrógeno a temperatura de 95°C. La segunda reacción consiste en la hibridación de estas cadenas con los denominados oligonucleótidos, iniciadores o primers, que son fragmentos complementarios que se van a unir a cada una de las dos cadenas separadas del DNA. Para ello se baja la temperatura y las condiciones serán tales que se facilita la unión de los iniciadores a las cadenas, esta reacción suele hacerse alrededor de 50 y 60°C. La tercera etapa se efectúa a los 72°C, temperatura a la que, la polimerasa lleva a cabo su acción, concretamente la Taq DNA polimerasa que va a actuar uniendo los diferentes nucleótidos complementarios en el orden que le va indicando la cadena que actúa como molde<sup>(20,54)</sup>.

Para llevar a cabo la reacción se debe de aportar: el DNA a copiar o amplificar, denominado DNA molde, los iniciadores, que se hibridaran a las cadenas simples de DNA, grandes cantidades de los cuatro desoxinucleótidos trifosfatos necesarios para que el DNA se amplifique (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) y la Taq DNA polimerasa.

Una vez que se ha sintetizado *in vitro* una secuencia de DNA, esta se debe reconocer. Para detectar el producto se ponen los fragmentos en un gel de agarosa en el que haremos que se

desplacen mediante electroforesis. Para visualizar el DNA en el gel se le añade bromuro de etidio que fluoresce con luz ultravioleta. Se utilizan controles de peso molecular conocidos que permiten reconocer los fragmentos sintetizados. En todos los casos se deben de incluir controles negativos y positivos<sup>(53)</sup>.

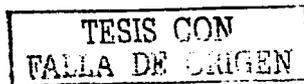
La técnica de PCR permite un diagnóstico más rápido de EAEC, además de ser altamente sensible.

Otra técnica, la "prueba de oro" para distinguir EAEC, es el ensayo en células HEp-2 en donde las bacterias son incubadas por varias horas sobre una monocapa de células HEp-2, posteriormente las células son teñidas y se examina la adherencia bacteriana. Las cepas de EAEC son caracterizadas por su único patrón de adherencia a células HEp-2, la bacteria aparece como agrupaciones de ladrillos apilados los cuales se adhieren a las células HEp-2 y a la cubierta del vidrio<sup>(44,45)</sup>.

Un esquema de tres pasos para la identificación de EAEC que puede ser práctico para el laboratorio clínico, en el primer paso, cultivos de toda la noche de las muestras son probadas por el método de PCR, en el segundo paso, solo las muestras las cuales fueron PCR positivas pueden ser analizadas para la identificación de la cepa, esto puede ser por pruebas como cultivo celular o la prueba de colony blot. El tercer paso debe incluir la identificación de las especies por pruebas bioquímicas a las colonias positivas, esto puede ser seguido por la determinación del antígeno O y H<sup>(13)</sup>.

## II. JUSTIFICACIÓN.

*E. coli* es una bacteria de flora normal que puede tener clonas patógenas capaces de causar daño, que han sido agrupadas en seis grupos de los cuales se sabe de la presencia de ETEC, EIEC, EPEC, EHEC en México pero hay poca información con respecto a la situación epidemiológica de EAEC, por otra parte se desconoce el cuadro clínico, la edad, sexo y áreas geográficas en donde se encuentra el mayor número de casos.

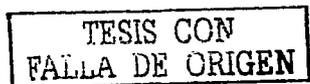


### **III. OBJETIVO GENERAL.**

Demostrar la presencia de *E.coli* enteroagregativa en la población mexicana que presenta diarrea, empleando para esto técnicas de Biología Molecular para conocer su papel en la etiología de las diarreas.

### **IV. OBJETIVOS PARTICULARES.**

1. Comparar las técnicas moleculares colony blot y PCR con la prueba de referencia, cultivo celular para valorar su utilidad clínica.
2. Determinar cual es la edad más afectada.
3. Determinar cual es el género más afectado.
4. Establecer los signos clínicos mas frecuentes en la diarrea por *Escherichia coli* enteroagregativa.
5. Saber su frecuencia estacional.
6. Conocer su distribución geográfica



## V .MATERIAL.

### ❖ Material biológico.

\**E.coli* H10407

\**F.coli* 25 611 .

\**Shigella flexnery.*

\**E.coli* pMs207

\**E.coli* 0157:H7

\**E.coli* 22 254.

\*Una botella confluyente de células HEp-2

### ❖ Medios de cultivo.

\*Agar base sangre (BAB).

\*Medio MFM sin suero fetal de bovino y sin penicilina estreptomycinina (PFS).

\*Caldo de soya tripticaseína (TSB).

### ❖ Material.

\*Membrana de nitrocelulosa.

\*Una placa de cultivo celular de 24 pozos estéril con un fragmento de cubreobjetos.

\*Tubos de 16X150 con 3 mL de TSB con 0.5 mL de D-manosa.

\*Tubo No.1 del nefelómetro de Mac Farland (NFM).

\*Cubreboca.

\*Microtubos de 1.5, 0.5 y 0.2 mL.

\*Micropipetas de 200, 20 y 2 µL.

\*Guantes.

\*Material de vidrio, el usual en un laboratorio de Bacteriología Médica.

### ❖ Reactivos y soluciones.

\*NaOH.

\*Tris base y Tris hidrocloreto.

- \*Cloruro de sodio.
- \*Acido clorhídrico.
- \*Cloruro de magnesio.
- \*Dodecil sulfato de sodio (SDS)
- \*N-laurilsarcosina.
- \*Leche descremada.
- \*Sonda marcada con digoxigenina.
- \*Anticuerpo antidigoxigenina.
- \*Nitroazul de tetrazolio 75 mg/mL (NBT)
- \*5-bromo, 3-cloro indoilfosfato 50 mg/mL (BCIP)
- \*Solución Salina fisiológica estéril.
- \*PBS estéril.
- \*Metanol absoluto.
- \*Colorante de Giemsa.
- \*Enzima Taq polimerasa.
- \*MgCl<sub>2</sub>.
- \*Regulador de la enzima.
- \*dNTP's (adenina, timina, guanina, citocina).
- \*Iniciadores.
- \*Agarosa tipo II.
- \*Solución Tris Boratos EDTA (TBE) 1X.
- \*Bromuro de etidio.

❖ Equipo.

- \*Incubadora Thelco a 37°C.
- \*Baño Maria Blue M.
- \*Agitador orbital Lab-Line.
- \*Balanza analítica CHYO.
- \*Horno de luz U.V. Gene Linker.
- \*Microscopio binocular invertido Carl Zeiss.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

- \*Campana de flujo laminar Labconco.
- \*Incubadora de CO<sub>2</sub> VWR Scientific..
- \*Pipeteador automático Pipet -aid.
- \*Termociclador Perkin Elmer.
- \*Microcentrifuga Hermle.
- \*Agitador magnético Corning..
- \*Horno de microondas Goldstar.
- \*Potenciometro Corning.
- \*Fuente de poder Bio Rad.
- \*Camara de electroforesis Bio Rad.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## **VI. METODOLOGIA.**

En este estudio se seleccionaron 748 cepas aisladas de personas de cuadro clínico de diarrea, de Enero a Diciembre del 2001, los cuales previamente fueron negativos en la hibridación para los grupos ETEC, EIEC, EPEC y EHEC. Se incluyeron muestras que tenían encuestas con información completa como: edad, sexo, lugar de procedencia y cuadro clínico.

### **6.1. Colony blot.**

Las cepas de trabajo se sembraron en agar BAB utilizando una cuadrícula para organizar las colonias, sembrando en los 6 últimos lugares los controles positivos y negativos<sup>(34)</sup>.

Después se colocaron sobre las placas membranas de nylon y se incubaron a 37°C durante toda la noche, figura 2.

#### **6.1.1.Lisis.**

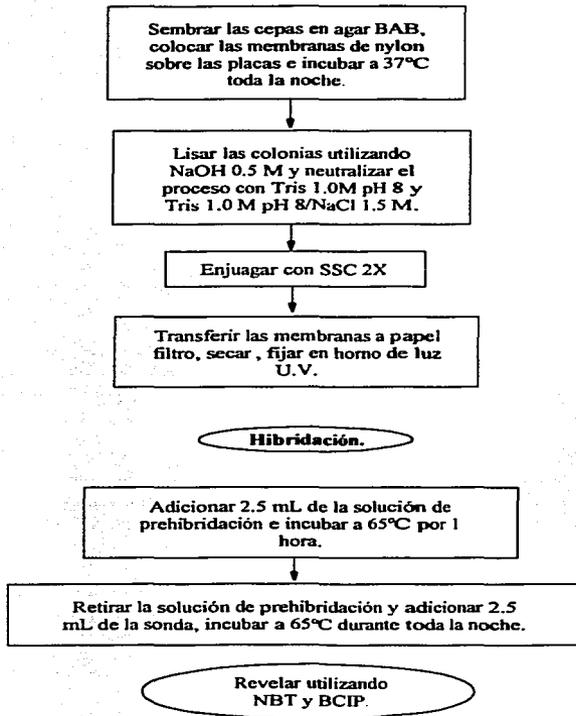
Las colonias adheridas a las membranas de nylon se lisaron con NaOH 0.5 N durante 15 minutos con las colonias hacia arriba. Posteriormente las membranas se saturaron con Tris 1 M pH 8.0 y posteriormente con Tris 1 M pH 8.0/NaCl 1.5 M durante 10 minutos cada proceso con la finalidad de neutralizar.

Después las membranas se enjuagaron en una solución de SSC 2X, se transfirieron a un papel filtro y se secaron a temperatura ambiente. Por último se colocaron en un horno de luz U.V para fijar el DNA y se guardaron en bolsas de plástico hasta la hibridación.

#### **6.1.2.Hibridación.**

Para realizar el proceso de hibridación se agregaron 2.5 mL de solución de prehibridación para bloquear la membrana donde no hay DNA bacteriano y evitar uniones inespecíficas; y se incubaron a 65°C por 1 hora en baño de agua con agitación, con el DNA hacia arriba.

Aproximadamente 20 minutos antes del término del tiempo de prehibridación, se preparó la sonda.



**Figura 2. Técnica de Colony blot.**

Se puso la sonda en un tubo cónico con 6 mL de la solución de prehibridación. Los tubos se colocaron 15 minutos en baño de agua a ebullición y luego se pasaron a hielo durante 10 a 15 minutos.

Las membranas se retiraron del baño de agua, se removió la solución de prehibridación y se agregaron 2.5 mL de la sonda. El proceso de hibridación se llevó a cabo a 65°C en baño de agua con agitación por 24 horas.

Al día siguiente las membranas se sacaron de la bolsa de plástico, guardando la sonda para ser reutilizada.

Las membranas se colocaron en cajas de plástico y se les adicionó solución de lavado hasta cubrir las, se incubaron a 65°C, durante 15 minutos, se eliminó la solución anterior y se repitió el paso anterior.

#### **6.1.3.Revelado de la membrana.**

Después las membranas se enjuagaron en solución A y se agitaban un minuto, posteriormente se transfirieron a cajas Petri con solución B durante 60 minutos con la finalidad de bloquear los sitios donde no se unió la sonda. Posteriormente se colocó la membrana en solución B con 1.5 µL de anticuerpo antidigoxigenina conjugada a fosfatasa alcalina, incubando 30 minutos en agitación, llevándose a cabo la unión del anticuerpo a la sonda marcada con digoxigenina

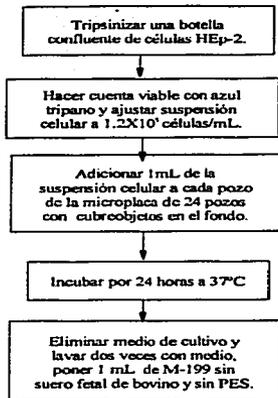
Se lavó el filtro con solución A agitando 15 minutos, se eliminó la solución anterior y se repitió el paso anterior. Después se enjuagó el filtro en solución C por 1 minuto, proporcionando pH alcalino, que es el pH óptimo de la enzima, además se adicionó el cofactor (MgCl<sub>2</sub>).

Finalmente se colocó la membrana en solución C adicionando 45 µL de NBT y 35 µL de BCIP y se dejó incubando a temperatura ambiente protegido de la luz hasta aparición de color<sup>(54)</sup>.

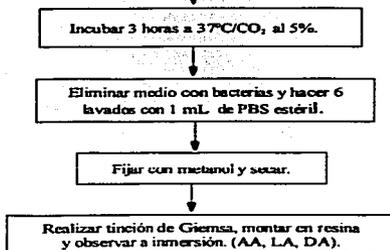
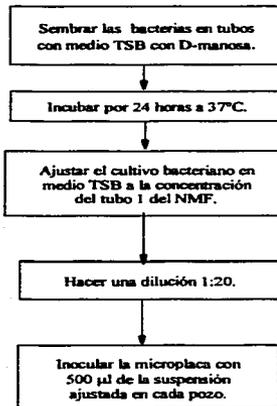
#### **6.2.Pruebas de adherencia a cultivo celular HEP-2.**

El ensayo de adherencia se realizó utilizando la línea celular HEP-2 de acuerdo a la técnica de Cravioto modificada, referida por Levine y cols (34), considerando la preparación del inóculo bacteriano y del cultivo celular en microplaca, la inoculación de la monocapa celular y el tipo de adherencia, figura 3.

### Cultivo celular.



### Cultivo bacteriano.



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Figura 3. Técnica de adherencia en cultivo de células HEP-2.

Primer día.

#### **6.2.1. Preparación del cultivo celular en microplaca.**

A partir de un cultivo de células HEP-2 con 100% de confluencia se realizaron los microcultivos celulares en una microplaca de 24 pozos con una cuenta celular de  $1.2 \times 10^5$  ó  $10^6$  células/mL. Se adicionaron 2 mL de la suspensión celular a cada pozo de la microplaca y se incubó por 24 horas a 37°C.

#### **6.2.2. Preparación del inóculo bacteriano.**

Se sembraron las cepas de *E.coli*, 22254 (testigo positivo) y los testigos negativos en 3 mL de TSB con D-manosa (17%) y se incubaron por 24 horas a 37°C para obtener un cultivo en fase logarítmica indispensable para la realización del ensayo de adherencia.

Segundo día.

#### **6.2.3. Preparación del cultivo celular en microplaca.**

Después de 24 horas de incubación, la microplaca se lavó dos veces con Solución Salina Fisiológica estéril (SSF) y se le adicionó 1 mL de medio MEM sin suero fetal de bovino (SFB) y sin penicilina estreptomycin (PES) y se realizó un análisis de confluencia antes de proceder con la inoculación de la monocapa celular.

#### **6.2.4. Preparación del inóculo bacteriano.**

Cada cultivo bacteriano se ajustó a la concentración del tubo 1 del Nefelómetro de Mac Farland (NFM) con medio TSB y se hizo una dilución 1:20 (50 µL de la solución y 950 µL de TSB).

#### **6.2.5. Inoculación de la monocapa celular.**

Se inocularon por duplicado 500 µL de la suspensión bacteriana ajustada a cada pozo de la microplaca con el cultivo celular con 70-90% de confluencia.

Se incubó a 37°C por 3 horas en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%.

Pasado este tiempo se hicieron 6 lavados con 1 mL de PBS estéril y se adicionó una gota de metanol absoluto y se realizó la tinción de Giemsa. Se examinaron microscópicamente con aceite de inmersión y se clasificaron de acuerdo a los tres tipos de adherencia: localizada (LA), difusa (DA) y agregativa (AA).

### 6.3.PCR.

Las cepas de *E.coli* fueron estudiadas por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detectar el plásmido para EAEC, para el gen específico de la fimbria de adherencia agregativa I (AAF/I).

La técnica de PCR fue usada para amplificar el fragmento de el gen *aagA-1* y *aagA-2* el cual codifica para AAF/I localizado entre los nucleótidos 55-72 y 506-523 respectivamente, usando dos iniciadores con las siguientes secuencias de oligonucleótidos, 5'-TTAGTCTTCTATCTAGG-3 y 5'-AAATTAATTCGGCATGG-3

#### 6.3.1.Preparación de la muestra.

Cada cepa se sembró en placas de medio BAB por estría cruzada y se incubaron a 37°C por 24 horas.

Cinco colonias aisladas se resuspendieron en 200  $\mu$ L de agua destilada, filtrada y estéril.

Los tubos se sometieron a ebullición en baño maría por un período de 15 minutos y después se colocaron en baño de hielo hasta su procesamiento.

#### 6.3.2.Condiciones de amplificación

Por separado en un microtubo de 0.2mL para cada muestra se preparó la mezcla de reacción que contenía 10  $\mu$ L de agua, 2.5  $\mu$ L de regulador de la enzima (Tris pH 8.3), KCl 500mM, gelatina 0.1% p/v), 2.5  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> (25mM), 4  $\mu$ L de dNTP's (1  $\mu$ M), 1  $\mu$ L del iniciador 1 y 2 dilución 1:320 (15.6 pmol/ $\mu$ L) y 1:40 (125 pmol/ $\mu$ L) respectivamente, con 1  $\mu$ L de Taq polimerasa (5U/ $\mu$ L) y se le adicionaron 3  $\mu$ L de DNA (1.5X10<sup>5</sup> bacterias/mL). Se homogenizó y centrifugó cada uno de los tubos, tabla 8.

**Tabla 8. Condiciones en que se realizó la PCR.**

Reactivos.	Concentración.	Volumen ( $\mu\text{L}$ ).
Agua.	-	10
Regulador.	10 X	2.5
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2.5
dNTP's	1 $\mu\text{M}$ .	4
Iniciador 1.	15.6 pmol/ $\mu\text{L}$	1
Iniciador 2.	125 pmol/ $\mu\text{L}$	1
Taq polimerasa.	5 U/ $\mu\text{L}$	1
DNA.	1 X 10 <sup>5</sup> UFC/mL	3

La mezcla fué amplificada con el siguiente programa de PCR: 1 ciclo de 94°C por 1 min, 30 ciclos de 94°C por 25 seg, 54°C por 30seg, 72°C por 1 min con una extensión final de 72°C por 3.5 min.

### **6.3.3. Análisis del producto.**

Los productos de DNA amplificados fueron revelados por electroforesis en geles de agarosa (2% p/v) conteniendo 20 µg de bromuro de etidio.

## VII. RESULTADOS.

Un total de 748 cepas de *E.coli* aisladas de pacientes con diarrea, durante el año 2001; las cuales fueron previamente negativas en la hibridación para los grupos ETEC, EPEC, EIEC y EHEC fueron sometidas independientemente a las pruebas de hibridación en fase sólida, el ensayo de PCR y la prueba de adherencia en cultivo de células HEp-2.

De las 748 cepas probadas sólo 166 fueron positivas por Colony blot (22.2%) y 47 cepas fueron positivas para el ensayo de PCR (6.3%) y 105 (14%) para la prueba de adherencia en cultivo de células HEp-2, estos resultados se muestran en la tabla 9.

En la figura 4, se puede observar una de las membranas de nylon que se hibridó con la sonda derivada del plásmido pAA, elaborada para el gen *aggA* que codifica para AAF/I; aquí se ejemplifican muestras y testigos positivos y negativos respectivamente.

En la figura 5, se pueden observar los productos de PCR derivados de las cepas de *E.coli*, en donde se observa la banda de amplificación de 630 pb que corresponde a las cepas de *E.coli* que fueron positivas.

En la tabla 10 se presenta la comparación de los resultados obtenidos en la hibridación en fase sólida y en el ensayo de PCR: 24 (3.3%) cepas colony blot positivo-PCR positivo, 22 (3.1%) cepas colony blot negativo-PCR positivo, 141 (18.9%) cepas colony blot positivo-PCR negativo y 560 (74.9%) cepas colony blot negativo-PCR negativo.

Se aplicó el teorema de Bayes, a los datos obtenidos en colony blot y PCR comparando cada método con la adherencia en células HEp-2 que es el estándar de oro, el cual nos permite calcular el valor de predicción de una prueba positiva y de una prueba negativa sobre la sensibilidad y especificidad diagnósticas, para valorar la utilidad clínica de una prueba de laboratorio, mostrándose los resultados en las tablas 11 y 12.

**Tabla 9. Número de cepas positivas y negativas en Colony blot, PCR y células HEp-2.**

<b>Prueba molecular/No.cepas.</b>	<b>POSITIVAS.</b>	<b>NEGATIVAS.</b>	<b>TOTAL.</b>
Adherencia en células HEp-2.	105 (14%).	643 (86%)	748 (100%)
Colony blot.	166 (22.2 %)	582 (77.8)	748 (100%)
PCR.	47 (6.3%)	701 (93.7%)	748 (100%)

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

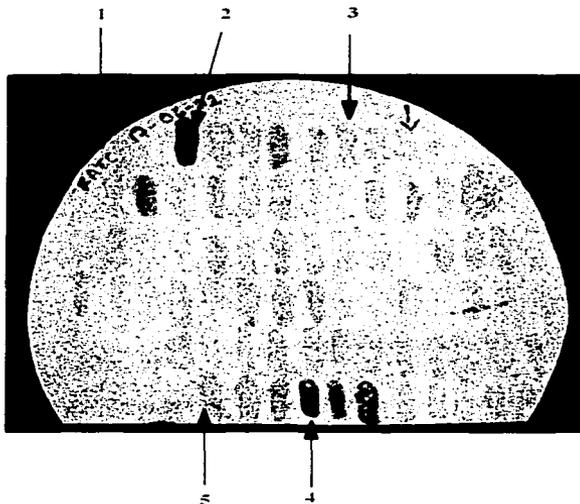
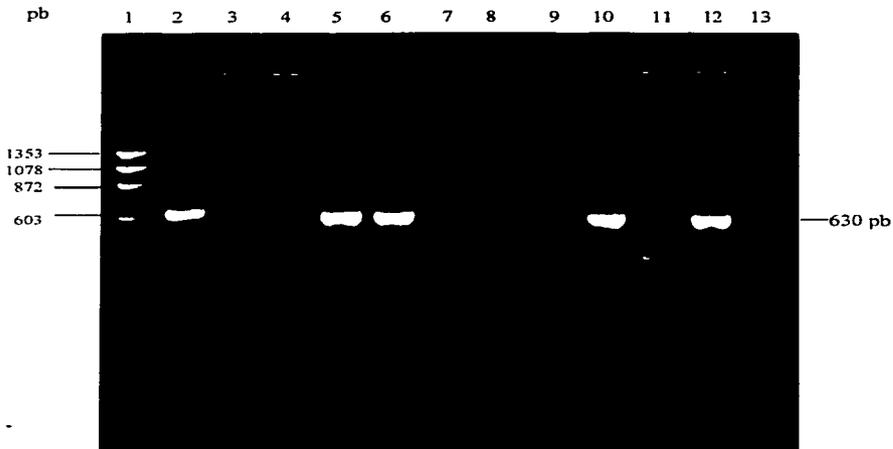


Figura 4. Membrana de nylon con DNA de cepas de *Escherichia coli* sometidas a hibridación en fase sólida.

1.-Clave que indica el grupo que esta siendo hibridado y fecha. 2.-*E.coli* positiva al grupo EAEC. 3.-*E.coli* negativa al grupo EAEC. 4.-Testigo positivo para la cepa EAEC. 5.-Testigo negativo para la cepa EAEC.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Figura 5. Productos amplificados de PCR, en cepas de *Escherichia coli* aisladas de pacientes con diarrea.**

Carril 1.- Marcador de peso molecular Fago Fi 174, carril 2.- Cepa 22 254, testigo positivo, carril 3.- Testigo negativo, carril 4-13.- Cepas aisladas de casos de diarrea.

ISSN 0014-1801  
**FALLA DE ORIGEN**

**Tabla 10. Comparación entre Colony blot y PCR.**

	<b>Colony blot positivo.</b>	<b>Colony blot negativo.</b>	<b>Total.</b>
<b>PCR positivo.</b>	25 (3.3%)	22 (2.9%)	47 (6.2%)
<b>PCR negativo.</b>	141 (18.9%)	560 (74.9%)	701 (93.8%)
<b>Total.</b>	166 (22.2%)	582 (77.8%)	748 (100%)

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

**Tabla 11. Datos obtenidos por Colony blot, a los cuales se les aplicó el teorema de Bayes.**

	<b>Cultivo celular positivo.</b>	<b>Cultivo celular negativo.</b>	<b>Total.</b>
<b>Colony blot positivo.</b>	65	101	166
<b>Colony blot negativo.</b>	40	542	582
<b>Total.</b>	105	643	748

Sensibilidad      62%  
Especificidad    84 %

**Tabla 12. Datos obtenidos por PCR, a los cuales se les aplicó el teorema de Bayes.**

	Cultivo celular positivo.	Cultivo celular negativo.	Total.
PCR positivo.	38	9	47
PCR negativo.	67	634	701
Total.	105	643	748

Sensibilidad 36 %  
Especificidad 99 %

La estratificación de la edad en la población estudiada reveló una distribución dependiente de la edad (tabla 13 y figura 6): EAEC fue significativamente mas frecuentemente aislada de niños menores de 5 años, y mas notorio en niños menores de 2 años (tabla 14 y figura 7).

Con respecto a la presencia de *E.coli* enteroagregativa en hombres y mujeres, es ligeramente mayor en los hombres (0.7%); estos resultados se muestran en la tabla 15 y figura 8.

Los síntomas encontrados entre los pacientes de EAEC fueron: la diarrea líquida, seguida de la diarrea pastosa; en algunos casos hubo vómito y deshidratación, estos resultados se muestran en la tabla 16.

La prueba de adherencia tiene alto nivel de especificidad y es considerada la prueba de referencia o estándar de oro por lo que es recomendada para ser usada como una prueba de confirmación definitiva, es la prueba de referencia para las pruebas moleculares; en la tabla 17, se presentan los diferentes efectos de adherencia observados, con base a los patrones de adherencia y a los datos de las pruebas empleadas.

La figura 9, muestra el testigo negativo en el cual no se observó patrón de adherencia, la figura 10, ejemplifica el efecto de adherencia agregativa, en donde se apreció a las bacterias formando agregados en forma de ladrillos apilados que se adhieren a las células HEp-2 y al vidrio, característicos de este grupo patógeno.

La figura 11 corresponde a el efecto de adherencia difusa que se caracterizó por la presencia de bacterias adheridas a todo el citoplasma celular y la figura 12, a el efecto de adherencia localizada en donde las bacterias se adhieren en forma de microcolonias a las células epiteliales.

Por otra parte en la figura 13 se observa que en los meses de Marzo y Octubre son más frecuentes los casos de diarrea por EAEC.

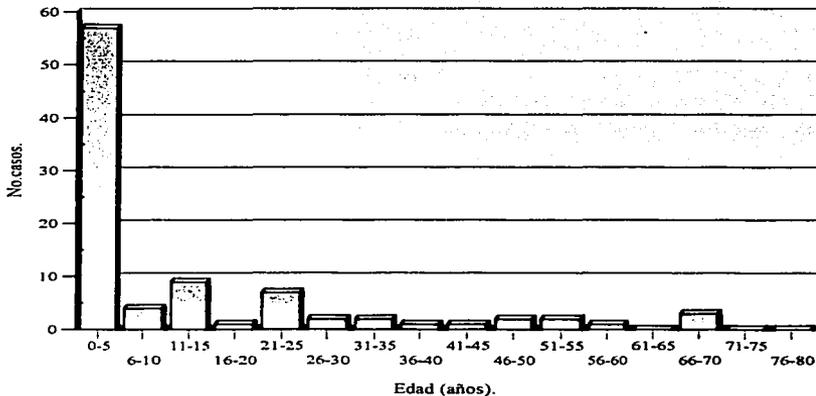
**Tabal 13. Distribución de *Escherichia coli* enteroagregativa por edad.**

Edad (años)	CB+PCR+ CC+	CB+PCR+ CC-	CB-PCR+ CC+	CB-PCR+ CC-	CB+PCR- CC+	CB+PCR- CC-	CB-PCR- CC+	CB-PCR- CC-	Total.
0-5	12	1	10	5	21	58	14	272	393
6-10	0	0	1	0	1	8	2	53	65
11-15	2	0	0	0	6	6	1	43	58
16-20	1	0	0	0	0	5	0	17	23
21-25	2	0	0	0	4	1	1	15	23
26-30	0	0	0	0	1	3	1	14	19
31-35	2	0	0	0	0	4	0	9	15
36-40	1	0	0	1	0	3	0	12	17
41-45	0	0	0	0	1	1	0	7	9
46-50	0	0	0	0	2	1	0	5	8
51-55	1	0	0	0	0	2	1	7	11
56-60	0	0	0	0	0	0	1	5	6
61-65	0	0	0	0	0	0	0	3	3
66-70	0	0	0	0	1	0	2	3	6
71-75	0	0	0	0	0	0	0	2	2
76-80	0	0	0	0	0	1	0	3	4
s/d	2	1	4	1	5	6	2	65	86
<b>Total.</b>	<b>23</b>	<b>2</b>	<b>15</b>	<b>7</b>	<b>42</b>	<b>99</b>	<b>25</b>	<b>535</b>	<b>748</b>

CB: colony blot.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

CC: cultivo celular con adherencia agregativa.



**Figura 6. Distribución por edad de los pacientes con diarrea causada por EAEC.**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**Tabla 14. Distribución de *Escherichia coli* enteroagregativa de los pacientes de 0-5 años de edad.**

Edad (años)	CB+PCR+ CC+	CB+PCR+ CC-	CB-PCR+ CC+	CB-PCR+ CC-	CB+PCR- CC+	CB+PCR- CC-	CB-PCR- CC+	CB-PCR- CC-	Total
1	7	1	5	2	12	20	9	136	192
2	1	0	3	3	6	16	2	63	94
3	2	0	1	0	0	14	2	32	51
4	2	0	1	0	1	4	1	24	33
5	0	0	0	0	2	4	0	17	23
Total.	12	1	10	5	21	58	14	272	393

CB: colony blot.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

CC: cultivo celular con adherencia agregativa.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

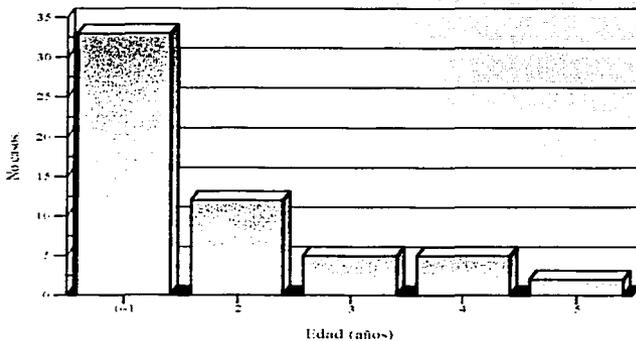


Figura 7. Distribución de frecuencia de diarrea causada por EAEC en pacientes de 0-5 años.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Tabla 15. Distribución de *Escherichia coli* enteroagregativa según el sexo del paciente.**

Mes.	CB +		PCR +		CB -		PCR -		Total.
	Masculino.	Femenino	Masculino	Femenino.	Masculino.	Femenino	Masculino.	Femenino.	
enero.	1	1	2	3	2	0	2	2	13
febrero.	0	0	0	0	0	0	0	0	0
marzo.	0	1	4	1	6	4	2	1	19
abril.	2	1	0	1	0	2	3	3	12
mayo.	0	0	0	0	0	0	0	0	0
junio.	2	2	1	1	1	2	1	0	10
julio.	1	2	0	1	4	4	1	0	13
agosto.	2	0	0	0	0	0	0	0	2
septiembre.	0	1	1	0	5	6	0	0	13
octubre.	2	3	0	1	1	2	7	1	17
noviembre.	0	2	1	1	0	0	1	1	6
diciembre.	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total.	10	13	9	9	19	20	17	8	105

Nota: los resultados que se presentan en esta tabla son cultivo celular con adherencia agregativa..

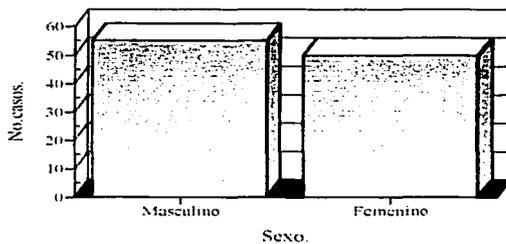
CB: colóny blot.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

Masculino 55/748 (7.35%)

Femenino 50/748 (6.68%)

50/55 (0.7%)



**Figura 8. Distribución de EAEC según el género del paciente.**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**Tabla 16. Frecuencia de *Escherichia coli* enteroagregativa por signos clínicos.**

Pruebas/signos clínicos. n: número de pacientes con EAEC	Diarrea líquida.	Diarrea pastosa.	Vómito.	Deshidratación.
Colony blot positivo, PCR positivo y cultivo celular positivo.	20	2	4	1
Colony blot negativo, PCR positivo y cultivo celular positivo.	13	2	2	3
Colony blot positivo, PCR negativo y cultivo celular positivo.	33	9	9	5
Colony blot negativo, PCR negativo y cultivo celular positivo.	21	4	2	0
Total.	87	17	17	9

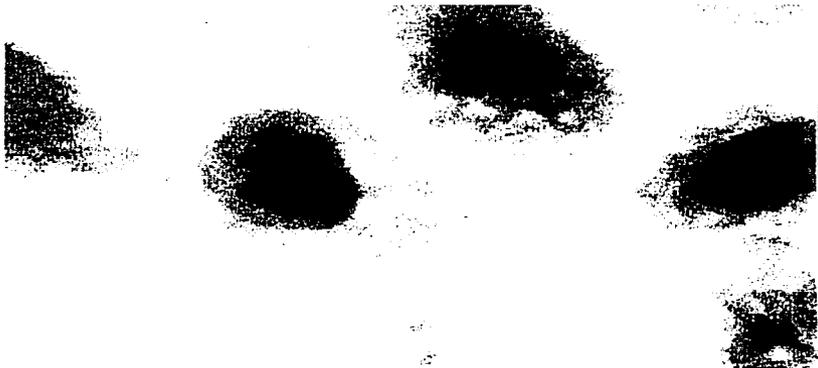
PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

**Tabla 17. Efectos de adherencia para *Escherichia coli*, según las técnicas moleculares empleadas.**

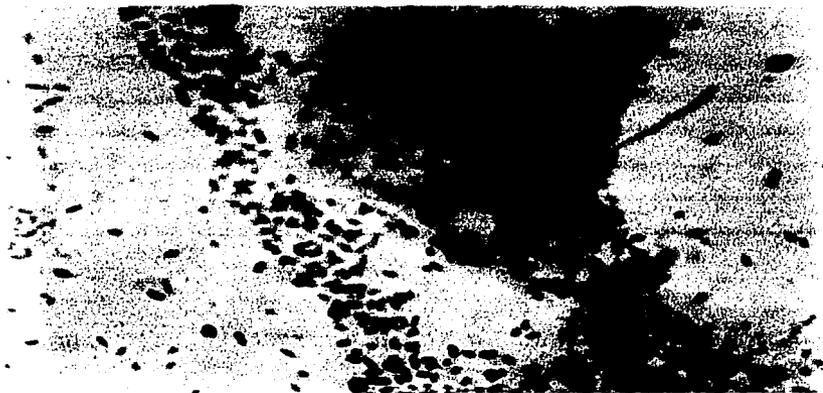
<b>Prueba/Adherencia.</b>	<b>Agregativa</b>	<b>Difusa.</b>	<b>Localizada.</b>	<b>Negativa.</b>	<b>Total.</b>
Colony blot positivo y PCR positivo.	23	2	0	0	25
Colony blot negativo y PCR positivo.	15	1	3	3	22
Colony blot positivo y PCR negativo.	42	30	10	59	141
Colony blot negativo y PCR negativo.	25	54	21	460	560
<b>Total.</b>	<b>105</b>	<b>87</b>	<b>34</b>	<b>522</b>	<b>748</b>

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



**Figura 9. Micrografía de células HEp-2 sin patrón de adherencia. Células inoculadas con testigo negativo (no adherente). Tinción de Giemsa, aumento 100 X.**



**Figura 10. Micrografía de la adherencia agregativa a células HEP-2. Tinción de Giemsa, aumento 100 X.**

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



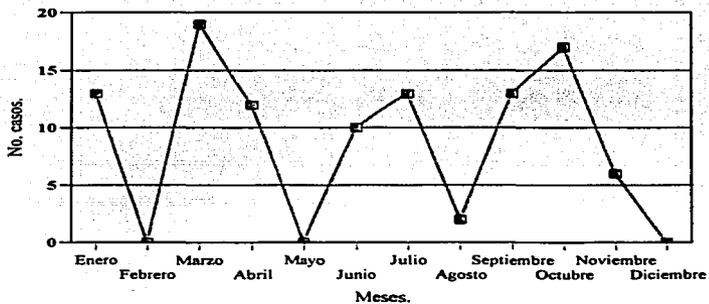
**Figura 11. Micrografía de la adherencia difusa a células HEP-2. Tinción de Giemsa, aumento 100 X.**

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Figura 12. Micrografía de la adherencia localizada a células HEP-2. Tinción de Giemsa, aumento 100 X.**

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Figura 9. Distribución de EAEC por meses del año.**

La distribución geográfica de las cepas de EAEC en la República mexicana, se muestran en la tabla 18.

En la figura 14 se observa que la distribución del grupo EAEC, está indicado solamente para algunos estados de la República que enviaron un número considerable de cepas al IndRE ya que existen estados que no envían cepas, razón por la cual no se puede saber si está presente EAEC, por lo que se sugiere realizar un estudio epidemiológico, que incluya todos los estados de la República Mexicana.

**Tabla 18. Distribución geográfica de las cepas de *Escherichia coli* enterogregativa.**

<b>Estado.</b>	<b>Número de cepas.</b>
Campeche.	5
Chiapas.	6
Chihuahua.	1
Hidalgo.	53
Jalisco.	17
Michoacán.	1
Tamaulipas.	8
Tlaxcala.	14

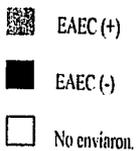


Figura 14. Distribución de *Escherichia coli* enteroagregativa con patrón de adherencia agregativa en México.

## VIII. DISCUSIÓN.

Las bacterias implicadas en brotes o casos aislados, han sido identificados por métodos tradicionales para obtener su género, especie, serotipo y resistencia a los antibióticos. Estas determinaciones fenotípicas se basan en el análisis de enzimas, toxinas y otros productos de los genes que pueden requerir largo tiempo, pero en ocasiones es preciso una identificación rápida del agente etiológico y su subtipificación con fines epidemiológicos por métodos moleculares, los cuales permiten identificar los genes que codifican para alguna característica en particular por medio de la biología molecular, ya que cada microorganismo tiene una secuencia única de nucleótidos en su genoma que los distingue de otras especies<sup>(44)</sup>.

Las cepas de *E.coli* diarreogénica se encuentran entre los primeros patógenos para los cuales los métodos de diagnóstico molecular fueron desarrollados. Los métodos de diagnóstico molecular se encuentran entre las técnicas más confiables para diferenciar las cepas diarreogénicas de los miembros no patógenos de la flora normal y además distinguir una categoría de otra<sup>(45)</sup>.

Así la detección de *E.coli* diarreogénica ha estado enfocada a la identificación de características que determinan la virulencia de estos organismos; esto puede incluir ensayos fenotípicos *in vitro* los cuales correlacionan con la presencia de características de virulencia específicos o detección de los genes que codifican estas características<sup>(44)</sup>.

Las diferentes categorías de *E.coli*, se han reconocido cada vez más como agentes importantes que producen diarrea aguda en niños en países en vías de desarrollo y actualmente se ha propuesto una nueva categoría la *E.coli* enteroagregativa, que produce un síndrome de diarrea persistente<sup>(45)</sup>.

Progresos importantes han sido realizados en el desarrollo de sondas de DNA específico, para ETEC, EIEC, EPEC y EHEC, además el desarrollo de una sonda de DNA para identificar EAEC ha sido considerada con alta prioridad.

El uso de sondas de DNA para la detección de estos organismos permite al laboratorio clínico la identificación rápida directamente en una muestra obtenida del paciente.

Por otra parte la PCR, el mayor avance en el diagnóstico molecular de microorganismos patógenos, incluyendo *E.coli*, ha desarrollado iniciadores de PCR para diferentes categorías de *E.coli* diarreagénica, incluyendo EAEC.

En todo el mundo el significado epidemiológico y la importancia de EAEC como patógeno diarreico y problema de salud pública esta empezando a ser evaluado. por ello, en el presente estudio, al existir poca información con respecto a la situación epidemiológica de EAEC, cuadro clínico, edad, sexo y áreas geográficas en donde se presenta el mayor número de casos; se procedió a evaluar la sonda y PCR para demostrar la presencia de EAEC en la población mexicana, empleando el ensayo de adherencia en células HEP-2 como el estándar de oro para el diagnóstico de EAEC.

Se realizó la hibridación en fase sólida usando la sonda derivada del plásmido pAA elaborada para el gen *aggA* que codifica para AAF/I, descrita por Baudry et al <sup>(1)</sup>.

Se encontró un 14% de EAEC, resultado semejante al que obtuvo Schmidt et al <sup>(55)</sup> quienes estudiaron una población de 468 cepas de las cuales 50 correspondieron a EAEC (11%).

Al comparar los resultados obtenidos con la sonda, PCR y la adherencia en cultivo celular, se encontraron algunas discrepancias.

Primero, 42 cepas de *E.coli* que hibridaron con la sonda de DNA dieron un resultado negativo en el examen de PCR; una posible explicación es que estas cepas exhiban una variación en la secuencia de los sitios de unión de los iniciadores<sup>(55)</sup>.

Segundo, 2 de las 25 cepas que fueron colony blot y PCR positivos no se adhirieron a las células HEp-2, posiblemente debido a que alguna mutación en los genes evitó dicho efecto, aunque cabe señalar que estas cepas exhibieron adherencia difusa, lo cual contrasta con los resultados obtenidos por Baudry et al <sup>(1)</sup> en el cual 43 cepas con adherencia difusa fueron colony blot negativo.

Tercero, 25 cepas de *E.coli* que se adhirieron a células HEp-2 con el característico patrón agregativo fueron colony blot y PCR negativo, esto puede deberse a que la adherencia no solo esta dada por AAF/I y que no todas las cepas de EAEC presentan esta fimbria, Okeke et al <sup>(49)</sup> detectaron los genes de AAF/I solo en el 63% de las cepas estudiadas.

Además estudios previos han mostrado que no todas las *E. coli* enteroagregativas hibridan con la sonda de EAEC, lo cual coincide con los resultados obtenidos en este estudio. La razón por la que no todas las cepas de EAEC hibridan con la sonda no se conoce, sin embargo cabe la posibilidad de que existan diferentes categorías de las cepas de EAEC, considerando los diversos factores de virulencia y el desconocido mecanismo de patogenicidad<sup>(1)</sup>.

Cuarto, 15 muestras fueron positivas para el examen de PCR y negativas en el colony blot, una posible explicación puede ser que exista una mutación en la secuencia del sitio de unión de la sonda de DNA o que la temperatura y el tiempo de hibridación no haya sido el óptimo<sup>(55)</sup>.

El ensayo de adherencia nos permitió diferenciar las tres categorías de *E. coli* adherente, observándose los diferentes tipos de adherencia: agregativa (figura 10), difusa (figura 11) y localizada (figura 12).

Como se puede observar las cepas de EAEC se caracterizan por su modelo de adhesión a las células HEp-2, mostrando como las bacterias forman agregados en forma de ladrillos apilados que se adhieren a las células y a la superficie del vidrio<sup>(44)</sup>.

En otras cepas se observó el efecto de adhesión difusa donde las bacterias se adhieren a todo el citoplasma celular.

Y por último, las cepas de adherencia localizada, que se caracteriza por la formación de microcolonias bacterianas que se adhieren a las células HEP-2.

Esta prueba nos ayudo a valorar la utilidad clínica de las dos técnicas moleculares colony blot y PCR.

La técnica de PCR usada mostró un 36% de sensibilidad y un 99% de especificidad, además permite un diagnóstico más rápido de EAEC que otras técnicas, pero debido a su baja sensibilidad se sugiere probar otra secuencia de iniciadores.

Sin embargo, la prueba de hibridación en fase sólida presentó un 62 % de sensibilidad y un 84 % de especificidad, comparado con el ensayo de adhesión sugiriendo que colony blot puede suplir a PCR.

Al comparar los resultados de la figura 7 con los estudios realizados por Nataro et al <sup>(40)</sup> al estudiar EAEC, se puede observar una gran similitud con respecto al grupo afectado, ya que son los niños los que presentaron la mayor frecuencia, sin embargo cualquier persona adulta puede estar expuesta a este patógeno. En contraste con lo que él reporta, son los niños de 0-1 años los más afectados y no los de 5 años<sup>(40)</sup>.

Con respecto a la presencia de *E.coli* enteroagregativa en hombres y mujeres. es ligeramente mayor en los hombres (0.7%), que coincide con los estudios realizados por Gilligan et al <sup>(26)</sup> en donde EAEC puede afectar por igual a hombres y mujeres.

Además, las cepas de EAEC son causa de una diarrea secretora, el vómito se presenta en algunos casos al igual que la deshidratación, por lo que se debe considerar que las enfermedades diarreicas siguen siendo un problema de salud pública<sup>(21)</sup>.

En cuanto a la frecuencia estacional se pudo observar que en los meses de Marzo y Octubre hubo un mayor número de casos de diarrea provocada por EAEC, esto puede ser debido a que altas temperaturas y la lluvia son factores benéficos para la reproducción de estos microorganismos.

Es claro que se necesitan estudios adicionales para elucidar la epidemiología de la infección por EAEC en diferentes grupos de edad, identificar factores de riesgo, modos de transmisión, signos clínicos, duración de la diarrea ya que en este estudio en las encuestas no se especificaba el tiempo de duración de la diarrea así como localización geográfica, en la figura 14 . solo se muestran algunos estados que enviaron cepas al INDR, siendo Hidalgo el estado con el mayor número de casos de diarrea por EAEC debido a que este estado participa activamente en el envío de cepas, pero no se puede determinar con certeza cual es la distribución de EAEC, porque no se incluyen todos los estados de la República Mexicana y además el número de cepas estudiadas por cada estado es diferente.

En la actualidad la única prueba confiable para identificar EAEC es la prueba de adherencia en células HEp-2, pero es reducido el número de muestras que se pueden procesar, además de estar sujeto a la variación del observador<sup>(1)</sup>.

Se encontró que la prueba del colony blot puede ser usada para probar numerosas muestras; es una técnica práctica y económica que puede ser usada en laboratorios no muy sofisticados y provee una herramienta de diagnóstico práctico.

## **IX. CONCLUSIONES.**

- ❖ Se encontró la presencia del grupo *Escherichia coli* enteroagregativa en la población mexicana estudiada.
- ❖ El ensayo de PCR presentó un 36 % de sensibilidad y un 99 % de especificidad
- ❖ La prueba de hibridación en fase sólida presentó un 62 % de sensibilidad y un 84 % de especificidad.
- ❖ El grupo de edad más afectado por *Escherichia coli* enteroagregativa fue el de los niños de 0-1 años.
- ❖ *Escherichia coli* enteroagregativa afecta por igual a hombres que mujeres.
- ❖ Las cepas de *Escherichia coli* enteroagregativa son causa de diarrea de tipo secretora, con poco o nulo vómito y en algunos casos deshidratación.
- ❖ Los meses de Marzo y Octubre presentaron un mayor número de casos de diarrea provocada por *Escherichia coli* enteroagregativa.
- ❖ De los estados de la República Mexicana incluidos en este estudio, Hidalgo participa activamente en el programa de diarrea y fue el estado que presentó un mayor número de casos.

## **X. APENDICE.**

### **A.1. Soluciones y medios de cultivo<sup>(64)</sup>.**

#### **A.1.1. Soluciones para Colony blot.**

##### **Solución de prehibridación (300mL).**

SSC 20 X	75 mL.
Reactivo bloqueador 1%	3g.
N-laurilsarcosina 0.1%	0.1%.
SDS 0.02%	0.6mL.

Notas: \*Se adicionan primero los sólidos y después los líquidos.

\*Para disolver calentar la solución hasta ebullición.

\*La solución debe almacenarse a -20° C.

##### **Solución de lavado.**

10 mL SDS 10%  
50 mL SSC 20 X.  
En 960 mL de agua.

##### **Solución A.**

100 mL de Tris pH7.5.  
50 mL de NaCl 3M.  
En 850 mL de agua.

##### **Solución B.**

Solución A + leche descremada al 5%.  
Se usan 20 mL por membrana.

##### **Solución C.**

100 mL de Tris 1M pH9.5  
33.3 mL de NaCl 3M.  
100 mL de MgCl<sub>2</sub>.  
Aforar a 1000 mL

### **A.1.2. Soluciones para PCR<sup>(56)</sup>.**

#### **Regulador 10X.**

Tris pH 8.3 100mM.  
KCl 500mM.  
Gelatina 0.1%.

#### **MgCl<sub>2</sub> 25mM.**

0,0119 g de MgCl<sub>2</sub>  
Aforar a 50 mL con agua destilada, filtrada y estéril.

#### **TBE 10X.**

108 g de Tris base.  
27.5 g de Acido bórico.  
6.8 de EDTA.  
Aforar a 1000 mL.

### **A.1.3.Soluciones para Cultivo Celular.**

#### **Solución amortiguadora de fosfatos (PBS) completo pH 7.2.**

##### **Reactivo A (10X)**

NaCl 80.0 g.  
KCl 2.0 g.  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 11.5g.  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.0g.  
Agua destilada c.b.p 800 mL.

##### **Reactivo B.**

CaCl<sub>2</sub> 1.0g.  
Agua destilada c.b.p 1000mL.

##### **Reactivo C.**

MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 1.0g  
Agua destilada c.b.p 1000 mL.

**Nota:** Esterilizar por separado cada solución en autoclave y mezclar en frío las soluciones en la siguiente proporción.

80 mL del reactivo A.  
100 mL del reactivo B.  
100 mL del reactivo C.  
720 mL de agua destilada.

**Solución madre de colorante Giemsa.**

Giemsa en polvo 0.5 g.  
Glicerol 27 mL.  
Metanol 41 mL.

Nota: Antes de usar se diluye 1:50 con PBS o agua destilada.

**A.2. Medios de cultivo.**

**Base de agar sangre.**

*Gramos por litro de agua destilada.*

Infusión músculo cardíaco sólido	10.0
Peptona de carne	10.0
Cloruro de sodio	5.0
Agar	15.0
pH final	7.3

- 1.- Suspender 40 g del medio comercial en un litro de agua destilada.
- 2.- Calentar agitando frecuentemente y hervir durante un minuto.
- 3.- Esterilizar a 121°C (15 lb de presión) durante 15 minutos.
- 4.- Enfriar y vaciar el medio en cajas petri. Dejar solidificar y posteriormente meter las cajas a prueba de esterilidad en la incubadora, 24 horas a 37°C.

**Caldo de Soya Trypticaseína.**

*Gramos por litro de agua destilada.*

Cloruro de sodio	5.0
Dextrosa	2.5
Fosfato dipotásico	2.5
Peptona de caseína	17.0
Peptona de soya	3.0
pH final	7.3

- 1.- Rehidratar 30g del medio de cultivo comercial en un litro de agua destilada.
- 2.- Mezclar bien, calentar a punto de ebullición, hasta la completa disolución del medio.

- 3.- Esterilizar a 121°C (15 lb de presión) durante 15 minutos.
- 4.- Dejar enfriar y adicionar 3 mL del medio (TSB) a tubos de 16X150.
- 5.- Meter a prueba de esterilidad en la incubadora, 24 horas a 37°C.

#### **Medio 199.**

- 1.- Mezclar el medio en aproximadamente el 90% del volumen de agua final requerido.
- 2.- Adicionar a la solución 2.2 g de bicarbonato de sodio y mezclar hasta disolver.
- 3.- Ajustar el pH del medio a 7.0, usando HCl 1 N o NaOH 1 N para ajustar el pH.
- 4.- Adicionar agua a la solución hasta alcanzar el volumen final.
- 5.- Esterilizar inmediatamente por filtración usando una membrana de poro de 0.22 micras.
- 6.- Almacenar en un recipiente limpio, poner a prueba de esterilidad y guardar en refrigeración.

#### **B.Métodos.**

##### **Mantenimiento de la línea celular HEP-2.**

- 1.- A un cultivo de células HEP-2 100% confluyente en una botella de cultivo celular de 25 mL eliminar el medio de cultivo.
- 2.- Lavar dos veces con 5 mL de una solución de verseno.
- 3.- Agregar 2 mL de la solución de tripsina al 0.0125%.
- 4.- Observar en el microscopio hasta que las células se comiencen a hacer redondas y eliminar la tripsina.
- 5.- Cuando la tripsina ya disgrega la monocapa celular, neutralizar con 3 mL de SFB.
- 6.- Resuspender con una pipeta de 5 mL.
- 7.- Tomar 1.5 mL de la suspensión anterior y colocarla en una nueva botella de cultivo celular.
- 8.- Adicionar 8.5 mL de medio de cultivo suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 14%.
- 9.- Adicionar 3 gotas de HEPES e incubar las botellas a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%.

### Cuenta celular.

- 1.- Preparar una dilución 1:10 de la suspensión celular utilizando azul de tripano.
- 2.- Para la cuenta celular se utiliza una cámara de Newbawer y se coloca una gota de la suspensión 1:10 en cada extremo.
- 3.- Contar 8 cuadrantes y sacar el promedio.
- 4.- Ajustar la dilución de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Promedio de células contadas} \times \text{Factor de dilución} \times 10000 = 1: X$$

Número de células deseadas/ mL

Donde X = dilución.

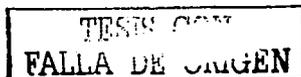
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

UNA FALTA DE ORIGEN  
SUA BIBLIOTECA

## **XI. Referencias.**

- 1.- Baudry B, Savarino SJ, Vial P, Kaper JB and Levine MM.1990 **A sensitive and specific DNA probe to identify Enteroaggregative *Escherichia coli*, a recently discovered diarrheal pathogen.** J. Infect.Dis.161:1249-1251.
- 2.- Benjamin P, Federman M and Wake AC. 1995. **Characterization of an invasive phenotype associated with Enteroaggregative *Escherichia coli*.** Infect.Immun. 63(9):3417-3421.
- 3.- Bishop PW and Ulshen MH. 1988. **Clinicas pediátricas de Norteamérica.** Gastroenterología. 1:73-90.
- 4.- Biswas R, Nelson EAS, Lewindon PJ, Lyon DJ, Sullivan PB, and Echeverria P. 1996. **Molecular epidemiology of *Escherichia coli* diarrhea in children in Hong Kong.** J.Clin.Microbiol. 34(12):3233-3234.
- 5.-Boukenooghe RA, Dupont LH, Zhi DJ, Adachi J, Mathewson JJ, Verenkon PM, Rodriguez S and Steffen R. 2000. **Marker of enteric inflammation in Enteroaggregative *Escherichia coli* diarrhea in travelers.** Am.J.Trop.Med.Hyg. 62(6):711-713.
- 6.- Brett F, Rosenshine I, Donnenberg SM and Kaper BJ. 1992. **Cytoskeletal composition of attaching and effacing lesions associated with Enteropathogenic *Escherichia coli* adherence to HeLa cells.** Infect.Immun.60(6):2541-2543.
- 7.- Brooks FG y Butet SJ. 16ª edición **Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg.** El Manual Moderno. México. 1999. pp 272-273.
- 8.- Cravioto A, García JJ y Eslava C. 1996. **Diarrrea por *Escherichia coli*. Primera de tres partes.** Rev.Fac. Med.UNAM.39(1):14-18.
- 9.- Cravioto A, García JJ y Eslava C. 1996. **Diarrrea por *Escherichia coli*. Segunda de tres partes.** Rev.Fac. Med.UNAM.39(2):45-50.
- 10.- Cravioto A, Trujillo F, León LA., Hernández JM y Eslava C. 1996. **Infecciones por *Escherichia coli* enteropatógena.** Gac. Méd. Méx.132(6):611-615.
- 11.- Czczulin JR., Balepur S, Hicks S, Phillips A, Hall R, Kathary MH, Navarro F and Nataro JP. 1997. **Aggregative Adherence Fimbria II, a second fimbrial antigen mediating aggregative adherence in Enteroaggregative *Escherichia coli*.** Infect.Immun.65(10):4135-4145.
- 12.- Czczulin JR, Whittam T, Henderson I, Navarro GF and Nataro JP. 1999. **Phylogenetic analysis of Enteroaggregative and diffusely adherent *Escherichia coli*.** Infect.Immun.67(6):2692-2699.

- 13.- Divo A. **Microbiología Médica**. Interamericana Mac Graw Hill. México. 1990. pp 155-157.
- 14.- Elias V, Czezulín JR, Henderson IR, Trobulsi LR and Nataro JP. 1999. **Organization of biogenesis genes for Aggregative Adherence Fimbriae II defines a virulence gene cluster in Enteroaggregative *Escherichia coli***. J.Bacteriol. 181(6):1779-1785.
- 15.- Eslava C, Mateo VJ y Cravioto A. **Cepas de *Escherichia coli* relacionadas con la diarrea**. En: Diagnóstico de laboratorio de infecciones gastrointestinales. Giono CS, Escobar GA y Valdespino GJL (eds). Secretaría de Salud. México. 1994. pp.251-265.
- 16.- Eslava C, Navarro GF, Czezulín JR, Henderson IR, Cravioto A and Nataro JP. 1998. **Pet, an autotransporter enterotoxin from Enteroaggregative *Escherichia coli***. Infect.Immun. 66(7):3155-3163.
- 17.- Ewing G and Edwards H. 4ª edición. **Identification of enterobacteriaceae**. Elsevier. Nueva York. 1986 pp 93-136.
- 18.- Falkow SP, Small R, Isberg SF, Hayer G and Carwin D. 1987. **A molecular strategy for the study of bacterial invasion**. Rev. Inf.Dis. 9(Suppl. 5):5450-5455.
- 19.- Farmer JJ. 1987. **Biochemical identification of new species and biogroups of Enterobacteriaceae isolated from clinical specimens**. J.Clin.Microbiol. 21(18):46-76.
- 20.- Figueroa AP. **Técnicas de biología molecular en el diagnóstico de enfermedades gastrointestinales**. En: Diagnóstico de laboratorio de infecciones gastrointestinales. Giono CS, Escobar GA y Valdespino GJL (eds). Secretaría de Salud. México. 1994. pp. 395-409.
- 21.- Forestier C, Meyer M, Favre BS, Rich C, Malpuech G, Le Bouguenec C, Sirot , Joly B and Champs C. 1996. **Enteroadherent *Escherichia coli* and diarrhea in children: a prospective case-control study**. J.Clin.Microbiol. 34(12):2897-2903.
- 22.- Freeman BA. 22ª edición. **Microbiología de Burrows**. Interamericana Mac Graw Hill. México. 1989. pp. 505-514.
- 23.- Gascón J, Vargas M., Corachán QM., Jiménez AMT and Vila J. 1998. **Enteroaggregative *Escherichia coli* strains as a cause of travelers diarrhea: A case -control study**. J.Infect.Dis. 177:1409-1412.
- 24.- Guignot J, Breard J, Marie FBC, Peiffer I, Nowicki BJ, Servin AL, and Ann BP. 2000. **Pyelonephritogenic Diffusely Adhering *Escherichia coli* EC7372 harboring Dr-II adhesins carries classical uropathogenic virulence genes and promotes cell lysis and apoptosis in polarized epithelial Caco-2/TC7 cells**. Infect.Immun. 68(12):7018-7027.
- 25.- Guignot J, Bernet C, Marie F, Pous C, Plancon L, Le Bouguenec C and Servin AL. 2001. **Polarized entry of uropathogenic Afa/Dr Diffusely Adhering *Escherichia coli* strain**



**IH11128 into human epithelial cells: evidence for integrin recognition and subsequent internalization through a pathway involving caveolae and dynamic unstable microtubules.** Infect.Immun. 69(3):1856-1868.

26.- Gilligan PH. 1999. ***Escherichia coli* EAEC, EHEC, EIEC, ETEC.** Clin Lab Med. 19:505-521.

27.- Henderson IR, Czczulin J, Eslava C, Fernando N and Nataro J. 1999. **Characterization of Pic, a secreted proteasa of *Shigella flexneri* and Enteroaggregative *Escherichia coli*.** Infect.immun.67(11):5587-5596.

28.- Henderson IR, Hicks P, Navarro GF, Elias WP, Phillips AD, and Nataro JP. 1999. **Involvement of the Enteroaggregative *Escherichia coli* plasmid-encoded toxin in causing human intestinal damage.** Infect.Immun.67(10):5338-5344.

29.- Hicks S, Candy DCA and Phillips D. 1996. **Adhesion of Enteroaggregative *Escherichia coli* to pediatric intestinal mucosa *in vitro*.** Infect.Immun.64(11):4751-4760.

30.- Huppertz HI, Rutkowski S, Aleksic H and Korch H. 1997. **Acute and chronic diarrhoea and abdominal colic associated with Enteroaggregative *Escherichia coli* in young children living in western Europ.** Lancet.349: 1660-1662.

31.- Keskimaki M, Mattila L and Peltola H. 2000. **Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in finns with or without diarrhea during a round the world trip.** J.Clin.Microbiol.38(12):4425-4429

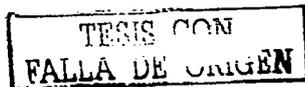
32.- Labrec EH, Scheider T, Magnani and Formol. 1964. **Epithelial cell penetration as an essential step in the pathogenia of bacillary dysenter.** J.Bacteriol.88(5):1503-1518.

33.- Levine M. 1987. ***Escherichia coli* that cause diarrhea: Enterotoxigenic, Enteropathogenic, Enteroinvasive, Enterohemorrhagic, and Enteroadherent.** J.Infect.Dis. 155(3):377-385.

34.- Levine M, Prado V, Nataro J, Lior H, Kaper J, Moseley S and Tall B. 1988. **Use of DNA probes and Hep-2 cell adherence assay to detect diarrheagenic *Escherichia coli*.** J.Infect. Dis.158(1):224-228.

35.- Levinson W y Ernest J. 2ª edición. **Microbiología e inmunología. Autoevaluación y repaso.** Manual Moderno, México, D.F. 1998. pp 148-151.

36. López J. 1988. **Diarreas bacterianas: Estudio de los mecanismos de patogenicidad de cepas de *E.coli* en poblaciones controladas. Invasividad y patrón de producción de lipasa, lecitinasas, proteasas y hemolisinas.** FES-Cuautitlán-UNAM.



- 37.- López VY. 1997. **Epítotos continuos y comunes presentes en las fimbrias de *Escherichia coli* enterotóxicas (ETEC).** Gac.Med.Méx. 133(6):511-525.
- 38.- Maurelli TA. 1992. ***Shigella* inside and out lifestyles of the invasive and dysenteric.** ASM News. 58(11):603-608.
- 39.- Murray P. 2ª edición. **Microbiología Médica.** Harcourt Brace. Madrid, España. 1997. pp 231-233.
- 40.- Nataro J, Yikang D, Cookson S, Cravioto A, Savarino S, Guers L, Levine M and Tacket C. 1995. **Heterogeneity of Enteroaggregative *Escherichia coli* virulence demonstrated in volunteers.** J.Infect.Dis. 171:465-468.
- 41.- Nataro J, Yikang D, Giron J, Savarino S, Kothary M and Hall R. 1993. **Aggregative Adherence Fimbriae I expression in enteroaggregative *Escherichia coli* requires two unlinked plasmid regions.** Infect. Immun. 61(3):1126-1131.
- 42.- Nataro J, Deng Y, Maneval D, German A, Martin W and Levine M. 1992. **Aggregative Adherence Fimbriae I of *Escherichia coli* mediate adherence to Hep-2 cells and hemagglutination of human erythrocytes.** Infect.Immun. 60(6):2297-2304.
- 43.- Nataro J, Hicks S, Phillips A, Vial P and Sears C. 1996. **T84 Cells in culture as a model for Enteroaggregative *Escherichia coli* pathogenesis.** Infect. and Immun. 64(11): 4761-4768.
- 44.- Nataro J and Kaper J. 1998. **Diarrheagenic *Escherichia coli*.** Clin. Microbiol. Rev. 11(1):142-201.
- 45.- Nataro J, Steiner T and Guerrant R. 1998. **Enteroaggregative *Escherichia coli*.** Emerg. Infect. Dis. 4(2)251-261.
- 46.- Navarro GF, Canizalez RA, Luna J, Sears C and Nataro J. 2001. **Plasmid-encoded toxin of Enteroaggregative *Escherichia coli* is internalized by epithelial cells.** Infect. Immun. 69(2):1053-1060.
- 47.- Navarro GF, Eslava C, Villaseca J, López RR, Czeuczulin J, Srinivas S, Nataro J and Cravioto A. 1998. **In vitro effects of a high-molecular-weight heat-labile enterotoxin from Enteroaggregative *Escherichia coli*.** Infect. Immun. 66(7):3149-3154.
- 48.- Navarro GF, Sears C, Eslava C, Cravioto A and Nataro J. 1999. **Cytoskeletal effects induced by Pet, the serine protease enterotoxin of Enteroaggregative *Escherichia coli*.** Infect.Immun. 67(5):2184-2192.
- 49.- Okeke I, Lamikanra, C, Dubovsky F, Kaper J and Nataro J. 2000. **Heterogeneous virulence of Enteroaggregative *Escherichia coli* strains isolated from childrens in southwest Nigeria.** J.Infect.Dis. 181:252-260.

- 50.- Okeke I, Adebayo L, Steinruck H and Kaper J. 2000. **Characterization of *Escherichia coli* strains from cases of childhood diarrhea in provincial southwestern Nigeria.** J.Clin.Microb. 38(1):7-12.
- 51.- Peiffer I, Blan PAB, Bernet CMF, Guignot J, Barbat A and Servin A. 2000. **Afa/Dr Diffusely Adhering *Escherichia coli* C1845 infection promotes selective injuries in the junctional domain of polarized human intestinal Caco-2/TC7 cells.** Infect.Immun. 68(6):3431-3442.
- 52.- Polotsky Y, Nataro J, Kotler D, Barret T. and Orenstein J. 1997. **Hep-2 cell adherence patterns, serotyping, and DNA analysis of *Escherichia coli* isolates from eight patients with AIDS and chronic diarrhea.** J.Clin.Microb.35(8):1952-1958.
- 53.- Qadri F, Haque A, Faruque S, Bettelheim K, Robins BR and Jhon A. 1994. **Hemagglutinating properties of Enteroaggregative *Escherichia coli*.** J.Clin.Microb. 32(2):510-514.
- 54.- Rodríguez AG, Cortes OI, Torres MP, Moreno EA y Tenorio JM. **Curso de estudio y diagnóstico molecular de *E.coli* y otros enteropatógenos.** Laboratorio de Bacteriología Molecular.Secretaría de Salud, México. 2001.
- 55.- Schmidt H, Knop C, Aleksic S, Heeseman J and Karch H. 1995. **Development of PCR for screening of Enteroaggregative *Escherichia coli*.** J.Clin.Microb. 33(3):701-705.
- 56.- Shults C, Cobelens F, Vervoort T, Wetsteyn J and Dankert J. 2000. **Diarrheogenic *Escherichia coli* and acute and persistent diarrhea in returned travelers.** J.Clin.Microb.38(10): 3550-3554.
- 57.- Simonovic I, Arpin M, Koutsouris R and Hecht G. 2001. **Enteropathogenic *Escherichia coli* activates *ezrin*, wich participates in disruption of tight junction barrier function.** Infect.Immun. 69(9):5679-5688.
- 58.- Stenier T, Lima A, Nataro J and Guerrant R. 1998. **Enteroaggregative *Escherichia coli* produce inflammation and growth impairment and cause Interleukin-8 release from intestinal epithelial cells.** J.In.Dis.177:88-96.
- 59.- Taniguchi T, Akeda Y, Haba A, Yasuda Y, Yamamoto K, Honda T and Tochikubo K. 2001. **Gene cluster for assembly of pilus colonization factor antigen III of Enterotoxigenic *Escherichia coli*.** Infect.Immun.69(9):5864-5873.
- 60.- Torregrasa L. 10ª edición. **Enfermedades diarreicas en el niño.** Interamericana Mc. Graw Hill. México. 1996.pp 90-91, 163-168, 170-177, 181-185.
- 61.- Vasselon T.J, Mounier, R Hellio and P.U.Sansonetti. 1992. **Movement along actin filaments of the perijunctional area and de novo polymerization of cellular actin are required for**

*Shigella flexneri* colonization of epithelial CaCo-2 cell monolayers. Inf.Immun.60(3):1031-1040.

62.- Vieira M, Andrade J, Trabulsi L, Rosa A, Dias A, Ramos S, Frankel G and Gomes T. 2001. Phenotypic and genotypic characteristics of *Escherichia coli* strains of non-Enteropathogenic *E.coli* (EPEC) serogroups that carry *eae* and lack the PEC adherence factor and Shiga toxin DNA probe sequences. J.Inf.Dis. 183:762-772.

63.- Vila J, Vargas M, Henderson I, Gascón J and Nataro J. 2000. Enteromaggregative *Escherichia coli* virulence factors in travelers diarrhea strains. J.Inf.Dis.182:1780-1783.

64.- Volk W. 3ª edición. **Microbiología Médica**. Interamericana Mac Graw Hill. México. 1988. pp 408-411.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN