



UNIVERSIDAD LA SALLE

100627
RECEBIDA EN LA SECRETARIA DE EDUCACION PUBLICA
2000

ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS
INCORPORADA A LA UNAM

3

Escherichia coli Y SUS SEROTIPOS
ENTEROPATOGENOS

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A :
MARIA SOLEDAD SANDOVAL CARACAS

ASESOR DE TESIS: O.B.P. GUADALUPE MORALES MEZA

MEXICO, D. F.

28/230

2000



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.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

1. Conocer las características principales de *Escherichia coli*, morfológicas, bioquímicas y antigénicas, para lograr un mejor entendimiento de las funciones de este microorganismo como bacteria comensal del organismo.
2. Establecer la función de *Escherichia coli* como microorganismo patógeno, sus serotipos y patologías causadas por la misma.
3. Describir los signos y síntomas que presentan estas patologías y establecer las semejanzas y diferencias entre ellas.
4. Describir los métodos de identificación comúnmente empleados para *Escherichia coli* como microorganismo comensal, y métodos específicos para su identificación como microorganismo patógeno.
5. Reconocer la importancia que representa *Escherichia coli* dentro de la industria, principalmente como indicador de calidad en la industria alimenticia, farmacológica y cosmetológica, higiene y salud pública.
6. Determinar la importancia de *Escherichia coli* como contaminante del agua, siendo ésta la fuente principal de su propagación.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE

Objetivos

INTRODUCCIÓN

0.1 Historia 11

0.1.1 Denominaciones de Tipos Patógenos Asociados a la Producción de Diarrea
Escherichia coli 13

0.2 Generalidades 13

CAPÍTULO I

1.1 Características Morfológicas 16

1.1.1 Pared Celular 16

1.1.1.1 Peptidoglucano 17

1.1.2 Membrana Externa 19

1.1.3 Espacio Periplásmico 22

1.1.4 Características de Cultivo 23

1.2 Características Bioquímicas 24

1.2.1 Vía Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) 25

1.2.1.1 Reacciones de la Glucólisis 26

1.2.1.1.1 Condiciones Anaeróbicas 32

1.2.1.1.2 Condiciones Aeróbicas 32

1.3 Características Antigénicas 34

1.3.1 Estructura Antigénica 34

1.3.2 Antígenos O (somáticos) 36

1.3.3 Antígenos K 39

1.3.4 Antígenos H 40

1.3.5 Antígenos de Fimbrias o Antígeno F (Pili) 42

1.3.6 Serotipos de *E.coli* 44

1.3.7 Variaciones Genotípicas 45

CAPÍTULO II

2.1 Patologías Causadas por *E.coli* 48

- 2.1.1 Acción Patógena 49
 - 2.1.1.1 Adherencia 49
 - 2.1.1.2 Toxinas 50
 - 2.1.1.2.1 Exotoxinas 51
 - 2.1.1.2.2 Enterotoxinas 51
 - 2.1.1.2.3 Endotoxinas 52
 - 2.1.1.3 Antígenos 54
- 2.1.2 Principales Síndromes Clínicos 55
 - 2.1.2.1 Septicemia 55
 - 2.1.2.1.1 Síntomas 55
 - 2.1.2.2 Infecciones de Vías Urinarias (IVU) 56
 - 2.1.2.2.1 Pielonefritis 56
 - 2.1.2.2.2 IVU en Varones 57
 - 2.1.2.2.3 IVU en Mujeres 58
 - 2.1.2.2.4 IVU Superiores 58
 - 2.1.2.2.5 Pielonefritis Aguda 58
 - 2.1.2.2.6 Pielonefritis Crónica 58
 - 2.1.2.2.7 IVU inferiores 59
 - 2.1.2.2.8 Cistitis Aguda 59
 - 2.1.2.2.9 Cistitis Crónica 59
 - 2.1.2.3 Otitis Media 60
 - 2.1.2.3.1 Síntomas 60
 - 2.1.2.4 Meningitis 61
 - 2.1.2.4.1 Síntomas 62
 - 2.1.2.5 Peritonitis y Abscesos Intra-Abdominales 63
 - 2.1.2.5.1 Peritonitis 63
 - 2.1.2.5.2 Peritonitis Secundaria 64
 - 2.1.2.5.3 Abscesos Intra-Abdominales 64
 - 2.1.2.5.4 Abscesos Intra-Peritoneales 65
 - 2.1.2.5.5 Abscesos Pancreáticos 66
- 2.1.3 Gastroenteritis 67
 - 2.1.3.1 *E.coli* Enterotoxigénica (ETEC) 68
 - 2.1.3.1.1 *E.coli* O169:H41 71
 - 2.1.3.2 *E.coli* Enteropatógena (EPEC) 71
 - 2.1.3.3 *E.coli* Enteroinvasora (EIEC) 72
 - 2.1.3.4 *E.coli* Enterohemorrágica (EHEC) 74
 - 2.1.3.4.1 *E.coli* O157:H7 74
 - 2.1.3.4.1.1 Signos y Síntomas 75
 - 2.1.3.4.1.2 Acción Toxígena 75
 - 2.1.3.4.1.3 Mecanismos de Resistencia de *E.coli* 79

2.1.3.4.1.4	Infección Asintomática y Diarrea Acuosa	80
2.1.3.4.1.5	Colitis Hemorrágica	81
2.1.3.4.1.6	Síndrome Urémico-Hemolítico	81
2.1.3.4.1.7	Púrpura Trombocitopénica Trombótica	82
2.1.3.4.1.8	Muerte	82
2.1.3.4.2	<i>E.coli</i> O111	83
2.1.3.4.3	<i>E.coli</i> O48:H21	83
2.1.3.4.4	<i>E.coli</i> O104:H21	84
2.1.3.5	<i>E.coli</i> Enteroagregativa (EAggEC)	85

CAPÍTULO III

3.1	Identificación Bioquímica	91
3.1.1	Reducción de Nitratos	92
3.1.1.1	Medios y Reactivos	93
3.1.1.2	Técnica e Interpretación	93
3.1.2	Agar de MacConkey	94
3.1.2.1	Fórmula	94
3.1.2.2	Interpretación	95
3.1.3	Agar Eosina Azul de Metileno (EMB)	95
3.1.3.1	Fórmula	95
3.1.3.2	Interpretación	95
3.1.4	Agar Desoxicolato-Citrato (ADC)	96
3.1.4.1	Fórmula	96
3.1.4.2	Interpretación	96
3.1.5	Agar ENDO	96
3.1.5.1	Fórmula	97
3.1.5.2	Interpretación	97
3.1.6	ONPG	97
3.1.6.1	Medios y Reactivos	98
3.1.6.2	Técnica e Interpretación	98
3.1.7	Indol	98
3.1.7.1	Medios y Reactivos	99
3.1.7.2	Técnica e Interpretación	99
3.1.8	Rojo de Metilo	100
3.1.8.1	Medios y Reactivos	100
3.1.8.2	Técnica e Interpretación	101
3.1.9	Prueba de Voges Proskauer	101
3.1.9.1	Medios y Reactivos	101
3.1.9.2	Técnica e Interpretación	102
3.1.10	KIA y TSI	102
3.1.10.1	Principios Bioquímicos	103

3.1.11 Preparación de Caldo <i>E.coli</i> (EC)	104
3.1.11.1 Materiales	104
3.1.11.2 Procedimiento	104
3.1.12 Preparación del Agar Membrana Termotolerante <i>E.coli</i> (mTEC)	105
3.1.12.1 Materiales	105
3.1.12.2 Procedimiento	105
3.1.13 Método de Filtro Membrana para <i>E.coli</i>	106
3.1.13.1 Filtrado de Muestras y Preparación de la Prueba	106
3.1.13.2 Comentarios	106
3.1.13.3 Procedimiento	107
3.1.13.4 Cuento	108
3.1.13.4.1 Procedimiento	108
3.1.13.5 Verificación	109
3.1.13.5.1 Procedimiento	109
3.2 Identificación Serológica	110
3.2.1 Inmunolectroforesis	112
3.2.1.1 Electroforesis por Inmunofijación	112
3.2.2 Electroinmunodifusión	112
3.2.2.1 Contraelectroforesis	113
3.2.2.2 Electroinmunodifusión Simple Unidimensional	114
3.2.3 Radioinmunoanálisis (RIA)	115
3.2.3.1 Calibración	115
3.2.4 Análisis Inmunsorbente Unido a Enzima (ELISA)	116
3.2.4.1 Método Indirecto	116
3.2.4.2 Método de Doble Sandwich de Anticuerpo	116
3.2.5 Inmunofluorescencia	117
3.2.5.1 Metodología	118
3.2.5.2 Técnicas de Tinción	119
3.2.5.3 Fluorescencia Cuantitativa	119
3.2.5.4 Cuantificación	120
3.2.6 Coaglutinación	120
3.2.6.1 Preparación de Reactivo Proteína A con la Modificación de Kronvall	120
3.2.6.2 Preparación de <i>Estafilococos</i> Sensibilizados	121
3.2.6.3 Procedimiento de Prueba	121
3.2.7 Aglutinación al Látex	121
3.2.7.1 Realización de la Prueba	122
3.2.8 Anticuerpos Monoclonales	122
3.2.9 TECRA	124
3.2.9.1 Procedimiento	125
3.3 Identificación Genética	126

- 3.3.1 Hibridación de DNA 126
 - 3.3.1.1 Prehibridación 126
 - 3.3.1.1.1 Protocolo 127
 - 3.3.1.2 Hibridación en Colonia o Directamente en Heces (Sistema ECL) 128
 - 3.3.1.3 Detección de Híbridos ECL Marcados 130
 - 3.3.1.3.1 Revelado de Película 131
 - 3.3.1.4 Protocolo para Hibridación de DNA en Gel Utilizando Gelbond Film 134
 - 3.3.1.5 Preparación en Gel y Electroforesis 135
 - 3.3.1.6 Preparación de Prueba 135
- 3.3.2 Electroforesis 136
 - 3.3.2.1 Buffers para Electroforesis 136
 - 3.3.2.1.1 Propiedades de los Sistemas Buffer TAE y TBE 136
 - 3.3.2.1.2 Preparación de Buffer 137
 - 3.3.2.1.3 Otros Sistemas Buffer 138
 - 3.3.2.1.4 Urea en Geles de Agarosa 138
 - 3.3.2.1.5 Voltaje Óptimo y Tiempos Electroforéticos 138
 - 3.3.2.1.6 Cargamento de DNA y Buffers 139
 - 3.3.2.2 Electroforesis en Gel de Agarosa 140
 - 3.3.2.2.1 Agarosas 140
 - 3.3.2.2.2 Concentraciones de Agarosa Sugeridas para Electroforesis de Proteínas 140
 - 3.3.2.2.3 Preparación, Carga y Electroforesis de Muestras de Proteínas 141
 - 3.3.2.2.4 Tinción con Azul Brillante Coomassie 141
 - 3.3.2.2.5 Secado y Preservación del Gel 142
 - 3.3.2.2.5.1 Secado por Presión 142
 - 3.3.2.2.5.2 Secado al Vacío 142
 - 3.3.2.2.6 Autoradiografía 142
 - 3.3.2.2.7 Fluorografía 143
 - 3.3.2.2.8 Electroblothing 143
- 3.3.3 Recuperación de Proteínas 143
 - 3.3.3.1 Recuperación de DNA β -Agarasa de Geles de Agarosa 145
 - 3.3.3.1.1 Agarosas Compatibles 145
 - 3.3.3.1.2 Tips 145
 - 3.3.3.1.3 Definición de Unidad β -Agarasa 146
 - 3.3.3.1.3.1 Materiales 146
 - 3.3.3.1.3.2 Reactivos 146
 - 3.3.3.1.3.3 Procedimiento para la Degradación β -Agarasa 147
 - 3.3.3.2 Electroseparación de DNA de Geles de Agarosa 148
 - 3.3.3.2.1 Agarosas Compatibles 148
 - 3.3.3.2.2 Tips 148
 - 3.3.3.2.3 Materiales 149
 - 3.3.3.2.4 Reactivos 149

- 3.3.3.2.5 Procedimiento: Tubos para Diálisis 149
- 3.3.3.2.6 Procedimiento para Electroseparación de DNA a partir de Geles de Agarosa 149
- 3.3.3.3 Extracción de DNA con Fenol/Cloroformo de Geles de Agarosa 151
 - 3.3.3.3.1 Agarosas Compatibles 151
 - 3.3.3.3.2 Tips 151
 - 3.3.3.3.3 Reactivos 151
 - 3.3.3.3.4 Protocolo 152
- 3.3.3.4 Extracción de DNA Congelar/Presionar Modificado de Gel de Agarosa 153
 - 3.3.3.4.1 Agarosas Compatibles 153
 - 3.3.3.4.2 Materiales 153
 - 3.3.3.4.3 Reactivos 153
 - 3.3.3.4.4 Procedimiento 154
- 3.3.3.5 Recuperación de DNA por Precipitación con Etanol 154
 - 3.3.3.5.1 Tips 154
 - 3.3.3.5.2 Materiales 155
 - 3.3.3.5.3 Reactivos 155
 - 3.3.3.5.4 Procedimiento 155
- 3.3.3.6 Otros Métodos de Recuperación a partir de Geles de Agarosa 156
 - 3.3.3.6.1 Electroforesis a membrana DEAE-Celulosa 156
 - 3.3.3.6.2 Paso a través de DEAE-Sefacel 157
 - 3.3.3.6.3 Recuperación de DNA Utilizando Burbujas de Vidrio 157
- 3.3.4 Southern Blotting 157
 - 3.3.4.1 Membranas 158
 - 3.3.4.2 Blotting 158
 - 3.3.4.3 Tiempos de blot 158
 - 3.3.4.4 Blots Alcalinos 159
 - 3.3.4.5 Otras técnicas de Blot 159
 - 3.3.4.6 Protocolo 160
 - 3.3.4.7 Preparación del Southern Blotting 160
 - 3.3.4.8 Procesar Southern Blotting 161
- 3.3.5 Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) 162

CAPÍTULO IV

- 4.1 Importancia de *E.coli* en la Industria 165
 - 4.1.1 Como Indicador de Higiene 170
 - 4.1.1.1 Medios de Transmisión 170
 - 4.1.2 Indicador de Calidad 173
 - 4.1.3 Industria Alimenticia 174
 - 4.1.3.1 Procedimientos Analíticos para la Identificación de *E.coli* 176
 - 4.1.4 Industria Ganadera 178

- 4.1.4.1 Factores Precipitantes de la Diarrea Indiferenciada Aguda (Diarrea Neonatal) en Becerras 178
- 4.1.4.2 Controles Durante el proceso de Manejo de Carne 180
- 4.1.5 Industria Farmacéutica y Cosmetológica 182
- 4.1.6 Salud Pública en México 182
 - 4.1.6.1 Objetivos 183
 - 4.1.6.2 Metas 183
 - 4.1.6.3 Estrategias 183
 - 4.1.6.4 Encuestas 184
 - 4.1.6.5 Autopsias Verbales 184
 - 4.1.6.6 Análisis Mensual de Defunciones 185

CAPÍTULO V

- 5.1 Importancia de *E.coli* como Contaminante del Agua 187
 - 5.1.1 Determinación de la Calidad del Agua Potable 187
 - 5.1.2 Detección de *E.coli* en Agua de Inyección Utilizando el Sistema de Detección MicroStar Rapid 188
 - 5.1.2.1 Protocolo 189
 - 5.1.2.1.1 Filtración 189
 - 5.1.2.1.2 Incubación 189
 - 5.1.2.1.3 Detección del sistema MicroStar 190
 - 5.1.3 Detección de sales Tóxicas Empleando *E.coli* 190

DISCUSIÓN 191

CONCLUSIONES 192

BIBLIOGRAFÍA 194

ÍNDICE DE CUADROS

- Cuadro 1.- Tipos patógenos de *E.coli* productores de diarrea. 13
- Cuadro 2.- Serotipos conocidos de *E.coli* 45
- Cuadro 3.- Características clínicas según agente etiológico. 68
- Cuadro 4.- Criterios que determinan los efectos nocivos de las toxinas. 70
- Cuadro 5.- Características más importantes de infección por *E.coli* 84
- Cuadro 6.- Condiciones de lavados a seguir durante el procedimiento. 130
- Cuadro 7.- Criterios a seguir según las pruebas empleadas 132
- Cuadro 8.- Métodos de preparación de las soluciones empleadas durante el proceso de hibridación. 133
- Cuadro 9.- Propiedades de los sistemas buffer TAE y TBE. 136
- Cuadro 10.- Preparación de soluciones buffer TAE y TBE. 137
- Cuadro 11.- Preparación del sistema buffer tris-fosfato. 138
- Cuadro 12.- Voltajes, tiempos y sistemas buffer óptimos para la mayor agudeza de la banda. 139
- Cuadro 13.- Concentraciones de agarosa sugeridas para electroforesis de proteínas. 140
- Cuadro 14.- Recuperación de proteínas utilizando diferentes agarosas. 144
- Cuadro 15.- Procedimiento para la degradación de β -agarasa. 147
- Cuadro 16.- Procedimiento empleado para tubos para diálisis. 149
- Cuadro 17.- Procedimiento empleado para la electroseparación de DNA 149
- Cuadro 18.- Procedimiento para extracción de DNA con fenol/cloroformo de geles de agarosa. 152
- Cuadro 19.- Procedimiento para extracción por el método congelar/presionar. 154
- Cuadro 20.- Procedimiento para la recuperación de proteínas por precipitación con etanol. 155
- Cuadro 21.- Características de las membranas de nylon y nitrocelulosa. 158
- Cuadro 22.- Tiempos de blotting y eficiencia de transferencia de DNA en geles de agarosa 3:1 (blots alcalinos). 159
- Cuadro 23.- Procedimiento empleado para la detección de *E.coli* en agua de inyección. 189

ÍNDICE DE FIGURAS

- Fig. 1.- Pared Celular. 17
- Fig. 2.- Reacción 1. Glucólisis. 26
- Fig. 3.- Reacción 2. Glucólisis. 27
- Fig. 4.- Reacción 3. Glucólisis. 27
- Fig. 5.- Reacción 4. Glucólisis. 28
- Fig. 6.- Reacción 5. Glucólisis. 28
- Fig. 7.- Reacción 6. Glucólisis. 29
- Fig. 8.- Reacción 7. Glucólisis. 29
- Fig. 9.- Reacción 8. Glucólisis. 30
- Fig. 10.- Reacción 9. Glucólisis. 30
- Fig. 11.- Reacción 10. Glucólisis. 30
- Fig. 12.- Proceso de Glucólisis. 33
- Fig. 13.- Estructura Antigénica. 34
- Fig. 14.- Estructura del Antígeno O. 36
- Fig. 15.- Estructura Lipopolisacárida de la Membrana. 38
- Fig. 16.- Flagelos. 41
- Fig. 17.- Estructura de un flagelo. 41
- Fig. 18.- Estructura de los Gangliósidos mejor conocidos. 69
- Fig. 19.- Unión de Toxinas Semejantes a *Shiga I y II* a las Células Humanas. 76
- Fig. 20.- Muestra del Equipo Montado para la Realización del Método de Filtro Membrana para *E.coli*. 106
- Fig. 21.- Diagrama que muestra el círculo vicioso de contaminación que presenta *E.coli*. 167

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

0.1 Historia

0.1.1 Denominaciones de Tipos Patógenos Asociados a la Producción de Diarrea *Escherichia coli*

0.2 Generalidades

INTRODUCCION

0.1 HISTORIA

Una vez que quedó claro el concepto de agentes específicos para una enfermedad microbiana y que se desarrollaron los procedimientos para los cultivos de los microorganismos, fue relativamente simple aislar una gran cantidad de patógenos microbianos. (152)

Aunque la transformación bacteriana es la consecuencia de un descubrimiento esencialmente accidental, la conjugación bacteriana fue demostrada inicialmente por Joshua Lederberg en 1946 mediante experimentos diseñados para determinar si podía efectuarse un proceso sexual en las bacterias. Este método implicaba el uso de mutantes nutricionales de *E. coli* de la cepa K-12, que es una de las pocas cepas que contienen el factor F (en su estado natural). El principio consiste en mezclar las dos cepas, una que requiere metionina y la otra que requiere treonina y leucina, y cultivar en un medio mínimo que carece de los cuatro factores de proliferación. Ninguno de los tipos parentales es capaz de crecer en este medio, pero cualquiera de las formas recombinantes sí, y cuando se siembran un cierto número de células se obtiene un pequeño pero significativo número de colonias. Las cepas con dos requerimientos nutricionales separados fueron empleadas en vista de que sería muy poco probable que pudieran ocurrir mutaciones retrógradas de ambos genes en una sola célula. La única explicación era que había tenido lugar algún tipo de recombinación genética. Se demostró que los filtrados de los cultivos o los extractos de cualquiera de estos tipos celulares quedaban separados por un disco de milipor, permeable a las macromoléculas pero no a las células, no tiene lugar la recombinación. Así se demuestra un proceso que requiere un contacto célula-célula. Los experimentos con interrupción del apareamiento y la demostración del mapa genético circular de *E. coli* fueron entonces realizados por Wollman y Jacob. (152)

Escherich T. le dió el nombre de *Bacterium coli commune* al causante de la diarrea infantil, la cual constituye un problema muy serio para los países que se encuentran en desarrollo por su elevada morbi-mortalidad. Estas pueden ser de más de 200 defunciones por mil nacidos vivos registrados. (122)

Este problema se remonta a fechas muy antiguas, en las que se presentaban problemas de salud en países que actualmente se consideran desarrollados. A estos brotes de diarrea epidémica se les llamó "*cólera infantum*"; en otros lugares se presentaron casos asociados con los cambios de estaciones del año y se les llamó "*diarrea de la estación*" o "*diarrea del verano*". Los niños afectados tenían alrededor de dos años de edad y pertenecían casi siempre a estratos económicos pobres; este síndrome puede ser provocado por varios agentes causales como: *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus* entre otras. (34)

A finales del siglo pasado, Lesage propone la presencia de *E.coli* en estos padecimientos, pero no fue sino hasta la década de los 40's en que un grupo del Hospital Infantil de México dilucida el posible papel de este microorganismo en la etiopatogenia del padecimiento. Este hecho se debe a la observación de que el suero de niños enfermos no aglutinaba con cepas de niños sanos y sí lo hacía con cepas aisladas de niños que murieron de gastroenteritis, por esto, surge la idea de que se trata del mismo agente etiológico. Estos hallazgos dieron la clave para el estudio del primer grupo de cepas y que recibe el nombre de *EPEC* (*E. coli enteropatogena*). Se perfeccionó el esquema serológico para la identificación de *E.coli*, basado en la presencia de un mosaico antigénico dado por los antígenos O, H y K; más de 164 serogrupos reconocidos para O, 60 para H y 103 para K. (125)

Después se determinaron otros antígenos que se relacionan con la adherencia y se asociaron con la presencia de fimbrias. Estos se denominaron K y CFA. Estos antígenos K son de envoltura y de naturaleza polisacárida que provocan el enmascaramiento de la aglutinación AgO. Se dividieron en L, A y B. El antígeno B es material de envoltura que forma la región termoestable de la superficie de *E.coli*. Actualmente se propone desechar los términos L, A y B. (34)

En la época de los 50's se descubre la producción de una toxina colérica nueva a la que se le denominó "Colienterotoxigénicos" o *ETEC*. En los años 70's se describe por primera vez la toxina ST que es termoestable, se enmascaró su presencia por la producción de la toxina LT. La toxina ST presenta dos variedades:

- 1.- Sta o ST I.- peso molecular de 2000, soluble en metanol, 14-18 aminoácidos con tres puentes disulfuro.
- 2.- STb o ST II.- peso molecular de 5000, insoluble en metanol, tiene 71 aminoácidos, restringida a cepas de origen porcino, es más estable al calor. (145)

En esta época se describió también la "diarrea del turista", la cual se presentaba en individuos de países desarrollados que viajan a países en desarrollo con índices elevados de insalubridad, mala disposición de excreta, falta de potabilidad en agua y mal control de los manipuladores de alimentos. También entonces Lederberg acuñó el término plásmido para describir elementos genéticos extracromosómicos, aunque este término no fue empleado ampliamente sino hasta la década de 1970, cuando la resistencia a los fármacos se convirtió en un problema médico importante. (74)

E.coli enteroagregativa EAaggEC estudiada por Crevioto desde 1979, empleando cultivos celulares Hep-2, algunos de sus tipos se asocian con *EPEC* o *ETEC*. (98)

E.coli enteroinvasiva EIEC se comenzó a describir al realizarse la prueba de Sereny. La capacidad invasiva de *EIEC* está codificada por un plásmido de 140 Mdaltons, también codifica la producción de proteínas de membrana externa involucradas en la invasividad. (34)

Cuadros de colitis hemorrágica se relacionan con otras cepas enteropatógenas como *EHEC*, asociado al serotipo O 157:H7. Esta patología se adquiere por consumo de alimentos, principalmente carne mal cocida y se caracteriza por cólicos, diarrea abundante acompañada de leucocitos, moco y sangre. El 70% de 78 serotipos identificados pertenecieron a *E.coli* O26:H11 y O157:H7; estas cepas fueron productoras de SL, que es una citotoxina semejante a *Shiga* (toxina *Shigella dysenteriae*). (91)

DENOMINACIONES DE TIPOS PATÓGENOS ASOCIADOS A LA PRODUCCIÓN DE DIARREA *Escherichia coli*

PATÓGENO	ACRÓNIMO
<i>Escherichia coli</i> ENTEROPATÓGENA (serotipos clásicos)	<i>EPEC</i>
<i>Escherichia coli</i> ENTEROTOXIGÉNICA	<i>ETEC</i>
<i>Escherichia coli</i> ENTEROINVASIVA	<i>EIEC</i>
<i>Escherichia coli</i> ENTEROHEMORRÁGICA	<i>EHEC</i>
<i>Escherichia coli</i> ENTEROAGREGATIVA	<i>EAggEC</i>
<i>EPEC</i> ADHERENTE A ENTEROTOCITOS	<i>EAEPEC</i>
<i>Escherichia coli</i> ENTEROPATÓGENA FACULTATIVA	<i>FEEC</i>
<i>Escherichia coli</i> CITOTÓXICA	<i>CEC</i>
<i>Escherichia coli</i> PRODUCTORA DE CITOTOXINA SEMEJANTE A SHIGA	<i>SLEC</i>

Cuadro 1.- Tipos patógenos de *E.coli* productores de diarrea. (69)

0.2 GENERALIDADES

A pesar de la complejidad de la flora bacteriana intestinal, se toman en cuenta sólo unos cuantos tipos de organismos en relación con las enfermedades comunes del tracto intestinal. Gran proporción de las bacterias del colon pertenece a la especie *E.coli* o a alguna de sus variedades, cuyos bacilos son bastoncillos gramnegativos sin esporas. Estas diferentes variedades no se pueden distinguir morfológicamente unas de otras. Todos éstos organismos, patógenos o no, pueden ser considerados como un solo grupo de especies relacionadas llamadas *bacterias entéricas*. (87)

Dentro de los géneros que habitan en el intestino se encuentran *Escherichia*, *Aerobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Proteus* y *Alcaligenes*, éstas comprenden las variedades no patógenas y ocasionalmente patógenas u oportunistas. La *Salmonella* y *Shigella* son los géneros que comprenden bacterias francamente patógenas que provocan fiebre tifoidea y paratifoidea, enteritis aguda asociada con infección alimenticia y disentería bacilar. (87)

Existe una estrecha relación entre la incapacidad bacteriana para producir rápida fermentación de la lactosa, con formación de ácido y gas, y la patogenicidad. Aquellas variedades que con regularidad fermentan la lactosa con formación de ácido y gas son *no patógenas* en el tracto intestinal; en cambio, la pérdida parcial o total del poder de desdoblar lactosa hace a la bacteria adquirir el desarrollo de poderes patógenos. Por lo tanto, las reacciones de fermentación de la lactosa son de valor práctico para identificar y clasificar los bacilos intestinales. (87)

La *E.coli* se emplea como índice de contaminación en el análisis bacteriológico del agua; pero también clínicamente es importante, como causante de varias formas comunes de infecciones. Es una de las bacterias que con mayor frecuencia producen inflamación de las vías urinarias (cistitis, pielitis) y de la vesícula biliar (colicistitis). Abunda en el tejido infectado en muchos casos de apendicitis y peritonitis, y, como ya se había mencionado, en casos de diarrea infantil. (87)

CAPÍTULO I

CARACTERÍSTICAS DE *E.coli*

CAPÍTULO I

1.1 Características Morfológicas

1.1.1 Pared Celular

1.1.1.1 Peptidoglucano

1.1.2 Membrana Externa

1.1.3 Espacio Periplásmico

1.1.4 Características de Cultivo

1.2 Características Bioquímicas

1.2.1 Vía Embden-Meyerhof-Parnas (EMP)

1.2.1.1 Reacciones de la Glucólisis

1.2.1.1.1 Condiciones Anaeróbicas

1.2.1.1.2 Condiciones Aeróbicas

1.3 Características Antigénicas

1.3.1 Estructura Antigénica

1.3.2 Antígenos O (somáticos)

1.3.3 Antígenos K

1.3.4 Antígenos H

1.3.5 Antígenos de Fimbrias o Antígeno F (Pili)

1.3.6 Serotipos de *E.coli*

1.3.7 Variaciones Genotípicas

1.1 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

La morfología que presenta *E.coli* es la siguiente: bacilos cortos gruesos de 1 a 3 μm X 0.5 μm que se presentan solos, en pares, en cadenas cortas y algunas veces en forma cocácea. En general móviles por flagelos peritricos, aunque existen variantes inmóviles no flageladas. (35)

Las cepas que pueden ser donadoras de DNA plásmido durante la conjugación producen también pelos sexuales. (124)

No forman esporas y pertenecen al grupo gramnegativo. En cultivos jóvenes la forma cocobacilar es bastante frecuente y en cultivos viejos se presentan formas de dimensión mayor. Dentro de sus características tintoriales, se tiñe bien con colorantes de anilina. (35)

Casi todos los géneros de *enterobacterias* son muy similares microscópicamente y por la morfología de sus colonias no pueden diferenciarse exactamente entre sí sin el uso de medios diferenciales o de pruebas bioquímicas. (124)

1.1.1 PARED CELULAR

La *E.coli* contiene la típica pared celular rica en lípidos de las bacterias gramnegativas. La capa externa contiene lipopolisacárido (LPS) que determina la especificidad del antígeno O. El peptidoglucano forma una capa definida de la pared celular entre el LPS y la membrana citoplasmática, pero no es tan grueso ni tan complejo como el de las bacterias grampositivas. Contiene de 5 a 10% de lipoproteína en la pared celular. Esta sustancia se mezcla con el LPS y tiene unión covalente con el peptidoglucano. No produce ácido teicoico. (124)

La pared celular bacteriana consiste en un exoesqueleto formado por una macromolécula única y rígida, o peptidoglucano, también conocido como mucopéptido o mureína. (87)

En bacterias gram-negativas, el peptidoglucano, que representa tan sólo del 1 al 10% del peso, está rodeada por una membrana externa, e inmersa en un espacio periplásmico. (94)

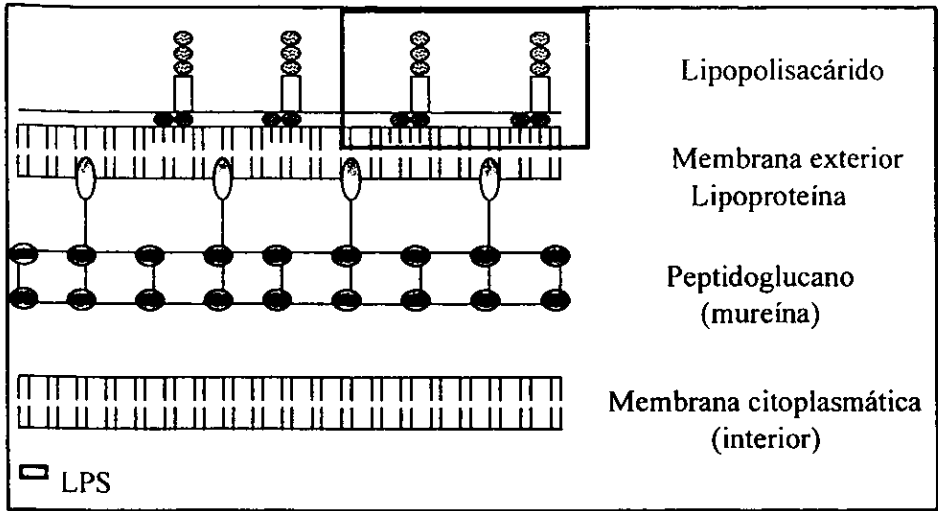


Fig. 1.- Pared Celular. (115)

1.1.1.1 PEPTIDOGLUCANO

El peptidoglucano está formado por repeticiones de una unidad disacáridica unida a su vez a un tetrapéptido. Distintas cadenas (formadas por el esqueleto de azúcares) se unen entre sí por determinados enlaces peptídicos entre tetrapéptidos de cadenas diferentes. (94, 82)

La unidad disacáridica repetitiva :

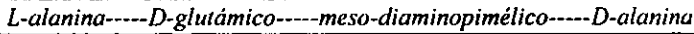
N-acetilglucosamina (NAG) unida por enlaces $\beta(1 \rightarrow 4)$ a *N*-acetilmurámico (NAM).

NAM es el 3-*O*-*D*-lactil-éter de la NAG (se deriva de unir el ácido *D*-láctico con el OH del C-3 de la NAG). (121)

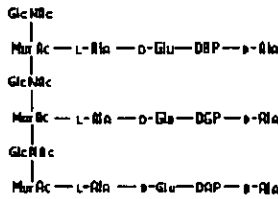
Las distintas unidades disacáridicas se van uniendo entre sí por enlaces $\beta(1 \rightarrow 4)$ entre el NAM de una unidad y la NAG de la siguiente. Este enlace es susceptible a la rotura catalizada por el enzima lisozima. El número de repeticiones (n) puede oscilar entre 10 y 100. (121)

La cadena tetrapeptídica:

Desde el grupo carboxilo de cada ácido NAM, y mediante un enlace amido, se encuentra unido el tetrapéptido típico de las bacterias: (121)



Debe observarse la alternancia de aminoácidos D y L en el tetrapéptido. (121)



(36)

Las distintas cadenas polisacáridas, con sus respectivos tetrapéptidos, se unen entre sí por medio de puentes o enlaces peptídicos, entre un aminoácido de una cadena (*meso-DAP*) y otro aminoácido de una cadena adyacente (*D-ala terminal*). En este enlace participan el 50% de los tetrapéptidos. Los demás péptidos no participan en enlaces. La estructura global es una sola macromolécula gigante que envuelve al protoplasto, formando un sáculo rígido, a modo continuo, que tiene el volumen y la forma de la bacteria respectiva. El sáculo está formado por una sola capa de cadenas de peptidoglucano, característica de las bacterias Gram-negativas. Esta capa simple de peptidoglucano mide 1 nm de espesor, y presenta grandes poros dejados por las zonas donde no hay enlace peptídico. Ello explica el comportamiento de la bacteria ante la tinción de Gram: al añadir el alcohol se produce una deshidratación que tiende a contraer la estructura del peptidoglucano, pero los poros son grandes y por ellos sale el primer colorante (violeta de genciana). El ulterior tratamiento de la preparación con el colorante de contraste tiñe a las bacterias de rojo. (115.121)

Los esqueletos de repeticiones de la unidad disacáridica se disponen paralelos a la superficie celular, con una tendencia a una forma espiral por encima de la membrana citoplásmica. Esta espiral cerrada se dispone siguiendo el perímetro circular (no siguiendo el eje longitudinal). Los grupos tetrapeptídicos salen perpendicularmente de los NAM, en sentido vertical hacia la membrana. Esta estructura confiere importantes propiedades: (94,115)

1.- Gran rigidez- que contrarresta las fuerzas osmóticas a que está sometido el protoplasto (presiones de 5 a 15 atm). Esta rigidez depende de:

a.- el grado de entrecruzamiento; (94,115,163)

b.- El hecho de que el enlace β (1 \rightarrow 4) es muy compacto. La alternancia entre anillos piranósicos de NAG y de NAM genera uno de los polisacáridos más estables desde el punto de vista termodinámico. (94,115,163)

c.- la alternancia en el tetrapéptido, de aminoácidos en configuraciones D y L confiere aún más fuerza estructural, y además permite que todas las cadenas laterales de estos aminoácidos se dispongan hacia el mismo lado, facilitando la formación de puentes de H. (94,115,163)

2.- Flexibilidad- esta propiedad, junto con la rigidez, colabora a soportar variaciones amplias de la tensión osmótica del protoplasto. (94,115,163)

3.- Condiciona la forma celular- la química del peptidoglucano no determina la forma, es su disposición espacial la responsable principal de esta forma. (94,115,163)

1.1.2 MEMBRANA EXTERNA

La membrana externa es una estructura de bicapa lipídica exclusiva de las bacterias Gram-negativas. Consta de una doble capa de lípidos, junto con proteínas de matriz. En la bicapa lipídica, los grupos polares quedan hacia afuera, mientras que los hidrófobos tienden al interior. (82)

Las características de los elementos de la membrana externa son:

- 1.- la bicapa es altamente simétrica;
- 2.- en la capa externa existe un 60% de proteínas y un 40% de una macromolécula exclusiva de esta membrana externa: el lipopolisacárido (LPS);
- 3.- en la capa interna no hay LPS, existiendo fosfolípidos (FL), lipoproteínas (LPP) y otras proteínas. (121)

El conjunto es un mosaico fluido que permite el desplazamiento lateral de los fosfolípidos, del LPS y de las proteínas, pero no de las lipoproteínas unidas covalentemente al peptidoglucano. (115,121,163)

La membrana externa se encuentra unida con el peptidoglucano a través de distintos componentes y tipos de enlaces:

- 1.- **enlaces iónicos**- mediados por cationes divalentes, entre distintas proteínas de la membrana externa y el peptidoglucano;
- 2.- **enlaces hidrófobos**- entre fosfolípidos y proteínas de la capa interior de la membrana externa con el peptidoglucano;
- 3.- **enlaces covalentes**- entre algunas moléculas de lipoproteína y el peptidoglucano. (94)

Componentes de la membrana externa:

1.- **Fosfolípidos (FL)**- se localizan en la lámina interna de la membrana externa. La composición en fosfolípidos es similar a la de la membrana citoplásmica, con un ligero enriquecimiento en fosfatidil-etanolamina. (82,94)

2.- **Lipopolisacáridos (LPS)**- macromolécula exclusiva de la lámina externa de la membrana externa de bacterias Gram-negativas, responsable de muchas de las propiedades biológicas de estas bacterias. Se le conoce también como **endotoxina** (toxina termoestable, no difusible). Se trata de un glucolípido complejo, que está compuesto de tres regiones:

- a.- Lípido A
- b.- Fracción central
- c.- Fracción externa (82,94)

3.- **Lipoproteína (LPP)**- Su porción es una pequeña proteína muy abundante en la membrana externa, y es la responsable de la unión covalente entre ésta y el peptidoglucano. La proteína tiene una configuración mayoritaria en α -hélice, que atraviesa el espacio periplásmico, y que se agrega formando trímeros. Una de las LPP del trímero se une covalentemente con el peptidoglucano. (94,115,163)

El aminoácido *N-terminal* es una *cisteína* cuyo grupo sulfhidrilo está unido por enlace tioéter a un diglicérido, y cuyo grupo amino se une por enlace amido con un ácido graso. Así, la porción N-terminal de la LPP está embebida en la lámina interna de la membrana externa. (94)

El aminoácido *C-terminal* es una *lisina*. Una de cada tres moléculas de LPP usa esta Lys para establecer un enlace peptídico entre su propio grupo $-NH_2$ libre y el $-COOH$ libre del meso-DAP del peptidoglucano. Por cada diez unidades disacáridicas del peptidoglucano, existe un enlace covalente con la LPP. (94,121)

La principal función de LPP es meramente estructural: estabilizar el complejo entre peptidoglucano y membrana externa. (121,163)

4.- **Proteínas de la membrana externa**- Están intercaladas en esta membrana, participando en la estabilización de la arquitectura tridimensional, interaccionando unas con otras y con los lípidos. Entre ellas, las más importantes son las porinas. (82,121)

A) Las porinas son proteínas de unos 35 kDa que se agregan formando trímeros con canales interiores, y que atraviesan la membrana de parte a parte. Su función es permitir el paso de sustancias a través de dichos canales interiores. (121)

Escherichia coli presenta tres porinas mayoritarias: **OmpC**, **OmpF** y **PhoE**. La OmpC deja pasar sustancias de menos de 500 dalton, mientras que OmpF permite el tránsito de moléculas de hasta 600 dalton. La proporción de ambas porinas está regulada por un mecanismo genético que responde a las condiciones de concentración de solutos en el medio. (94)

- en medios de baja osmolaridad aumenta la proporción de OmpF (la porina más permeable, de poro más grueso), lo que facilita la entrada de nutrientes en medios oligotróficos, como las aguas residuales (con pocos nutrientes disueltos).
- en medios de alta osmolaridad, aumenta la proporción de la OmpC, sólo entran moléculas más pequeñas, impidiendo la entrada de moléculas mayores, que son más abundantes en los nutritivos fluidos corporales. (94)

PhoE sólo se produce en condiciones de carencia de fosfatos, y permite el paso de moléculas cargadas negativamente. (94)

Las porinas colaboran en la protección contra las sales biliares que existen en el ecosistema intestinal. (121)

Existen otras proteínas minoritarias parecidas a las porinas, que actúan como canales específicos que permiten el paso de ciertas moléculas como la vitamina B₁₂, quelatos de Fe, nucleósidos, maltodextrinas, etc. Algunas de ellas sirven simultáneamente como receptores de fagos. (121)

B) Intimina.- proteína de la membrana externa de *E.coli*, provoca un ataque íntimo a las células epiteliales. Se presenta como un factor de adherencia. (121,129)

Funciones de la membrana externa:

1.- Actúa como tamiz molecular, que permite la difusión únicamente de moléculas relativamente pequeñas. Esto confiere protección frente a muchos agentes antibacterianos: colorantes, ácidos biliares, antibióticos, enzimas (lisozima que ataca al peptidoglucano). Las porinas sólo permiten el paso de sustancias hidrofílicas por debajo del tamaño especificado por el diámetro de los canales. (94,163)

2.- Condiciona propiedades de superficie

- grado de humedad
- adhesividad
- carga eléctrica (94)

a.- Es la estructura donde se fijan los componentes del complemento.

b.- Ciertas proteínas y cadenas laterales del LPS pueden ser lugares de adsorción (receptores específicos) de fagos y bacteriocinas.

c.- Punto de anclaje del anillo externo del corpúsculo basal de los flagelos. (94)

1.1.3 ESPACIO PERIPLÁSMICO

Entre la membrana externa y la membrana citoplásmica existe un comportamiento acuoso bañando al peptidoglucano, denominado periplasma o espacio periplásmico. El contenido incluye:

- RNAasa y fosfatasa, que digieren moléculas que por sí mismas no pueden pasar al citoplasma.
- Penicilinas: degrada penicilina, evitando la destrucción del peptidoglucano.
- Proteínas de transporte de nutrientes.
- Proteínas de unión a estímulos químicos. (121)

El periplasma cumple una función de osmorregulación: el periplasma es una solución densa, con alta concentración de macromoléculas, y que participa en la regulación de la osmolaridad celular frente a la tonicidad del medio exterior. Por esta razón, existe, dentro de este espacio, un oligosacárido derivado de la membrana citoplásmica (ODM) a base de 10 unidades de β -D-glucosa con sustituyentes ácidos. (82)

- En medios de alta osmolaridad (fluidos corporales) disminuye la concentración del oligosacárido.
- En ambientes de baja osmolaridad (aguas fecales), aumenta la concentración de dicha molécula. Así, la presión de turgor del protoplasto se transmite contra el peptidoglucano, que es la estructura que enfrenta las variaciones de presión osmótica. (121,163)

1.1.4 CARACTERÍSTICAS DE CULTIVO

Crece bien en los medios comunes de laboratorio. 1) Agar nutritivo: forma colonias circulares de 3 a 5 mm, convexas, de borde continuo o ligeramente ondulado, brillantes, de color blanco o ligeramente amarillentos. 2) Agar sangre: produce hemólisis. (124)

3) Estría en agar: presenta colonias grisáceas que se hacen visibles en 12 a 18 hr, las cuales gradualmente se hacen más y más opacas. 4) Agar -eosina-azul de metileno: colonias circulares húmedas de 2 a 3 mm de diámetro después de 24 hr de incubación a 37 °C. Cuando se examinan por transparencia, estas colonias tienen centros oscuros. 5) Medio de Endo: colonias rojas, lisas, circulares, con brillo metálico cuando se miran con luz refleja. El desarrollo tiene un olor fétido. 6) Medio triple azucarado de Krumwiede: en el fondo se forman ácido y gas, y ácido en la superficie inclinada. 7) Medio de Wilson y Blair: no hay desarrollo por la presencia de verde brillante. 8) Medio de selenita F y desoxicolato: no hay desarrollo. 9) Leche tornasolada: forma ácido y gas con coagulación del medio. 10) Patata: desarrollo profuso grisáceo o pardo amarillento. 11) Caldo simple, crece en abundancia formando una turbiedad uniforme, un anillo, pero no película, con fuerte olor fecaloideo. 12) Gelatina: buen desarrollo a lo largo de la línea de siembra por picadura, sin licuefacción del medio. (35) 12) Agar sangre: produce hemólisis. (124)

1.2 CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS

Temperatura óptima de crecimiento de 37 °C, pero posee propiedades de desarrollo en un límite bastante amplio de temperatura; el pH favorable es de 7.0. Con producción de ácido y gas (dióxido de carbono e hidrógeno en partes iguales), fermenta la lactosa, glucosa, levulosa, galactosa, maltosa, arabinosa, xilosa, y manitol. Es indol positivo, rojo de metilo positivo, VP negativo y no utiliza el citrato como única fuente de carbono. (35)

La capacidad de fermentar lactosa, depende de la posesión de β -galactosidasa; la utilización de lactosa también depende de una galactósido permeasa específica que facilita la entrada de lactosa en la célula. (124)

Produce H_2S en determinados medios. Prueba de Eijkman (fermentación de la glucosa a 46 °C) positiva. Acidifica y coagula leche. Oxidasa negativo, debido a la falta de citocromo C en su sistema de transporte de electrones. Pueden necesitarse pruebas adicionales en casos de *E. coli* aislada de colitis hemorrágicas, las cuales son típicamente negativas para sorbitol. La temperatura de 60 °C lo mata en 15 a 30 min. (35)

Es aerobio y anaerobio facultativo, puesto que posee un sistema respiratorio de transporte electrónico que le permite crecer aeróbicamente a expensas de una gran variedad de compuestos orgánicos oxidables, como son ácidos orgánicos, aminoácidos e hidratos de carbono; en condiciones anaerobias el crecimiento depende estrictamente de la fermentación de hidratos de carbono. (124)

Las enterobacteriáceas fermentan azúcares por la vía Embden-Meyerhof. El ácido pirúvico producido por esta fermentación puede ser catabolizado por vías diferentes. Todas las enterobacterias degradan piruvato a ácido fórmico. El ácido fórmico no se acumula porque muchas enterobacterias sintetizan hidrogenilasa fórmica, que convierte ácido fórmico en hidrógeno y anhídrido carbónico; la capacidad de sintetizar hidrogenilasa significa producción de gas, lo cual es el caso de *E. coli*. El resto del ácido pirúvico se divide por fermentación ácida mixta o por fermentación de butilenglicol (butanediol). Dos pruebas simples con cultivos en caldo de glucosa-peptona dividen a las enterobacteriáceas en dos grupos, según la vía de fermentación que usan. La prueba de rojo de metilo detecta aquellas que usan la fermentación ácida mixta porque producen suficiente ácido con glucosa para convertir este indicador a su forma ácida roja. La prueba de Voges-Proskauer detecta la fermentación de butilenglicol porque la acetoina se oxida a una forma diacetil a pH alcalino y forma complejos para dar como resultado un compuesto rosado. La forma ácida mixta es típica de la *Escherichia coli*. Este tipo de fermentación produce ácido succínico por una vía, ácido láctico por otra y ácido acético y etanol por la tercera. (124)

1.2.1 VÍA EMBDEN-MEYERHOF-PARNAS (EMP)

También conocida como Vía glucolítica, Vía Fermentativa, o Glucólisis. Fermentación y metabolismo anaerobio han sido considerados sinónimos, puesto que los ácidos y alcoholes son los principales subproductos de la degradación de los hidratos de carbono cuando el oxígeno está excluido del sistema. Se dice que en un sistema glucolítico existe metabolismo fermentativo cuando son compuestos orgánicos los que actúan como aceptores finales de hidrógeno (electrones). El ácido pirúvico actúa como aceptor intermedio de hidrógeno, luego es oxidado cediendo sus iones hidrógeno a lactato de sodio para formar ácido láctico, o a otras sales orgánicas, llamadas "ácidos mixtos". Dichos ácidos son los productos finales del metabolismo de la glucosa por esta vía, y dan cuenta de la caída de pH en las pruebas de fermentación empleadas para la identificación de bacterias. (95)

Por medio de este mecanismo se transforma la glucosa, a través del intermediario fructosa 1,6-bisfosfato, a piruvato, con la producción de 2 moles de ATP/mol de glucosa. La reacción global es:



(95)

La estrategia química de la glucólisis es:

- 1.- La adición de grupos fosforilo a la glucosa.
- 2.- La conversión química de los intermediarios fosforilados a compuestos con potenciales de transferencia de grupo fosfato elevados.
- 3.- El acoplamiento químico de la hidrólisis subsiguiente de las sustancias reactivas a la síntesis de ATP

y consta de 10 reacciones. (163)

Al principio de la vía se consume ATP para sintetizar compuestos fosforilo, pero se regenera posteriormente. Por tanto, la glucólisis transcurre en dos fases. (163)

Fase I Fase preparatoria en la que una hexosa, la glucosa, es fosforilada y fragmentada, dando lugar a dos moléculas de la triosa gliceraldehído-3-fosfato. Este proceso consume dos ATPs, en lo que constituye una especie de inversión de energía. (163)

Fase II Las dos moléculas de gliceraldehído-3-fosfato se convierten en piruvato, con la producción de cuatro moléculas de ATP. Por consiguiente, el rendimiento neto de la glucólisis es de dos ATPs por molécula de glucosa: en la Fase I, se consumen dos ATPs; la Fase II produce cuatro ATPs. (163)

El NAD^+ es el principal agente oxidante de la glucólisis. El NADH formado durante el proceso debe ser reoxidado continuamente para mantener el suministro de NAD^+ de la vía. (163)

1.2.1.1 REACCIONES DE LA GLUCÓLISIS

Reacción 1

Transferencia de un grupo fosforilo del ATP a la glucosa para formar **glucosa-6-fosfato (G6P)**, reacción catalizada por **hexoquinasa**. (163)

Una quinasa es una enzima que transfiere grupos fosforilo entre el ATP y un metabolito. El metabolito que actúa de aceptor del grupo fosforilo, para una quinasa determinada, viene identificada por el prefijo del nombre de la quinasa. La hexoquinasa es una enzima relativamente inespecífica que cataliza la fosforilación de hexosas. El segundo sustrato de la hexoquinasa es un complejo Mg^{2+} -ATP. El ATP libre es un potente inhibidor competitivo de la hexoquinasa. El Mg^{2+} es esencial para la actividad enzimática. (163)

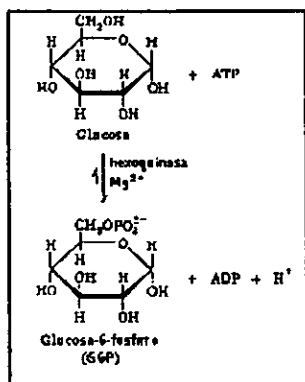


Fig. 2.- Reacción 1 (163)

Reacción 2

Conversión de la G6P a **fructosa-6-fosfato (F6P)**, catalizada por la **fosfoglucosa isomerasa (PGI)**. (163)

Tanto la G6P como la F6P existen en forma cíclica, por tanto, la reacción requiere la apertura del anillo, seguida de la isomerización y del cierre del anillo. La velocidad de catálisis se encuentra en función del pH, lo que indica la participación de una His y una Lys. (163)

Paso I Un ácido, grupo amino de una Lys, cataliza la apertura del anillo. (163)

Paso II Una base, grupo imidazol de una His, capta el protón ácido del C(2) de la G6P, formándose un intermediario cis-endoliato. (95,163)

Paso III El protón es sustituido en el C(1), en una transferencia global de protón. Los protones se intercambian rápidamente con los protones del disolvente. (163)

Paso IV Cierre del anillo para formar el producto.

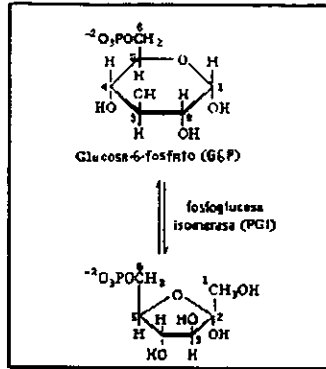


Fig. 3.- Reacción 2 (163)

Reacción 3

Fosfofructoquinasa (PFK) fosforila la F6P para formar **fructosa-1,6-bisfosfato (FBP ó F1,6P)**; denominada fructosa-1,6-difosfato.

La PFK cataliza una de las reacciones que controlan la velocidad de la vía. Se ve estimulada por AMP, e inhibida por ATP y citrato. (95,163)

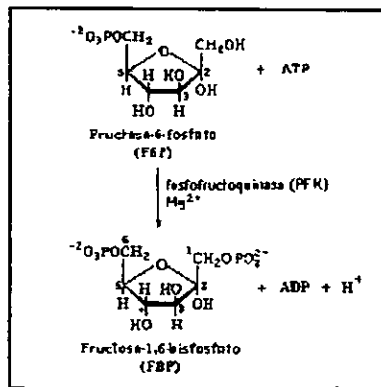


Fig. 4.- Reacción 3 (163)

Reacción 4

La aldolasa cataliza la cuarta reacción, la rotura de la FBP en dos triosas, el gliceraldehído-3-fosfato (GAP) y la dihidroxiacetona fosfato (DHAP). (163)

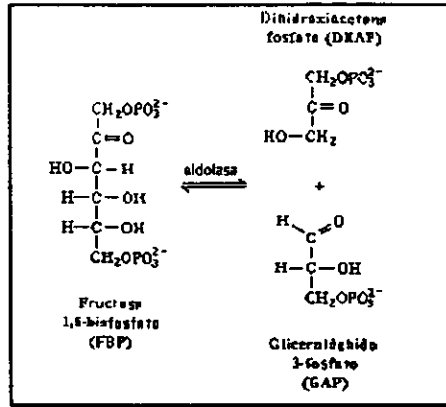


Fig. 5.- Reacción 4 (163)

Reacción 5

Sólo uno de los productos de la rotura aldólica, el GAP, continúa a lo largo de la vía glucolítica. La triosa fosfato isomerasa (TIM), cataliza este proceso en la última reacción de la Fase I. (163)

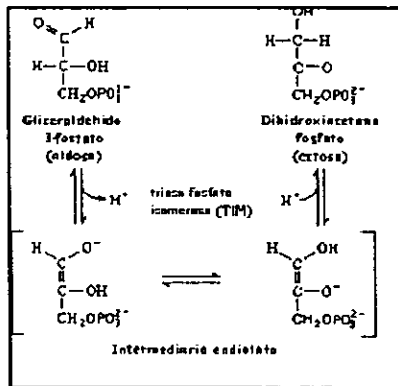


Fig. 6.- Reacción 5 (163)

Reacción 6

Oxidación y fosforilación del GAP por NAD^+ y P , que es catalizada por la **gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH)**. La oxidación del aldehído impulsa la síntesis del acil fosfato 1,3-difosfoglicerato (1,3-BPG). (95, 163)

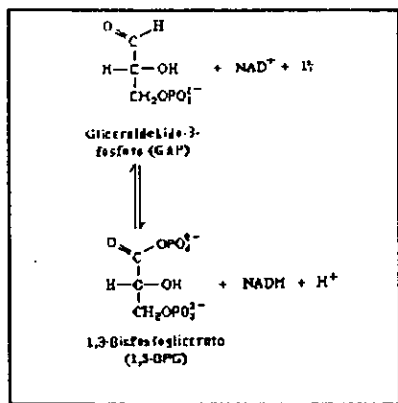


Fig. 7.- Reacción 6 (163)

Reacción 7

Se forma el primer ATP, junto con 3-fosfoglicerato (3PG), en una reacción catalizada por la **fosfoglicerato quinasa (PGK)**. (163)

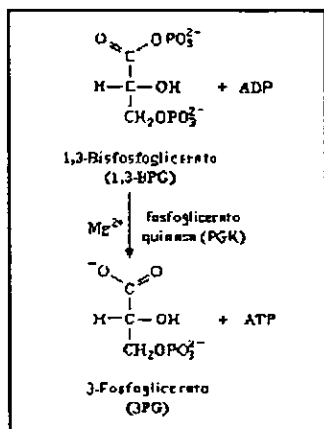


Fig. 8.- Reacción 7 (163)

Reacción 8

La **fosfoglicerato mutasa (PGM)** cataliza la conversión de 3PG a 2-fosfoglicerato (2PG). Una mutasa cataliza la transferencia de un grupo funcional de una posición a otra de una molécula. Esta reacción es la preparación necesaria para la siguiente reacción, que genera un compuesto fosforilo de "alta energía" para ser utilizado en la síntesis de ATP. (163)

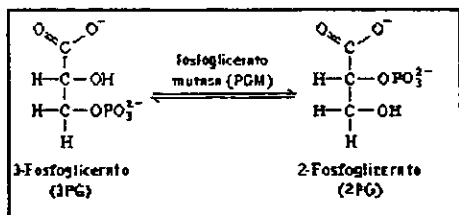


Fig. 9.- Reacción 8 (163)

Reacción 9

El 2PG se deshidrata a **fosfoenolpiruvato (PEP)**, en una reacción catalizada por **enolasa**. (163)

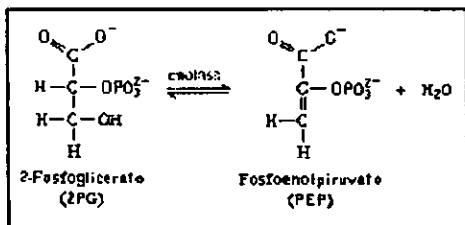


Fig. 10.- Reacción 9 (163)

Reacción 10

Ultima reacción. La **piruvato quinasa (PK)** acopla la energía libre de la hidrólisis del PEP a la síntesis de ATP para formar **piruvato**. (163)

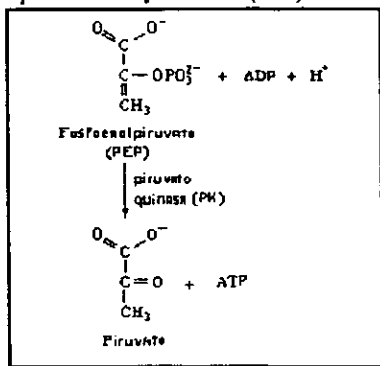
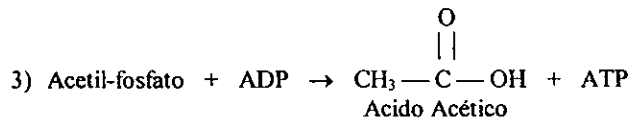
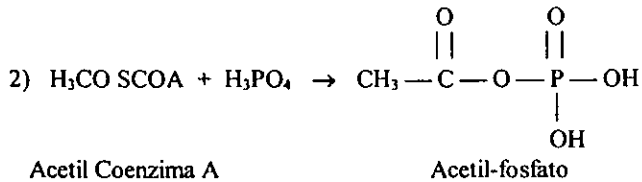
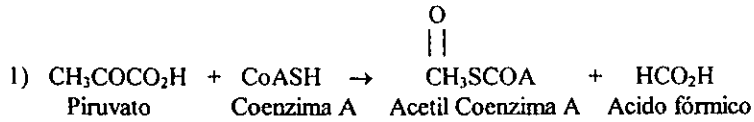


Fig. 11.- Reacción 10 (163)

Una de las reacciones más importantes del piruvato es la fermentación ácida mixta por enterobacteriáceas como *E.coli*. La reacción produce ácido fórmico, láctico y succínico, así como otros productos. La producción de formato y acetato incluye descarboxilación de piruvato por la siguiente serie de reacciones: (36)



(36)

1.2.1.1.1 CONDICIONES ANAERÓBICAS

En las levaduras anaeróbicas, el NAD^+ se regenera a través de la fermentación alcohólica:

Descarboxilación del piruvato para formar acetaldehído y CO_2 , catalizada por la **piruvato descarboxilasa** y que contiene una coenzima **pirofosfato de tiamina (TPP)**, que se encuentra fuertemente unido, aunque no de forma covalente, a la enzima. La coenzima se utiliza porque la descarboxilación del piruvato requiere la acumulación de carga negativa en el carbono carbonílico en el estado de transición, lo que constituye una situación inestable. Este estado de transición puede ser estabilizado por la deslocalización de la carga negativa, tarea que realiza fácilmente la TPP. (163)

El acetaldehído formado por descarboxilación del piruvato es reducido a etanol por el NADH , en una reacción catalizada por la **alcohol deshidrogenasa (ADH)**. La función de la fermentación alcohólica es la regeneración anaeróbica de NAD^+ para poder continuar con la glucólisis. (163)

1.2.1.1.2 CONDICIONES AERÓBICAS

El piruvato es convertido a **acetil-CoA** por el complejo enzimático de la **piruvato deshidrogenasa, dihidrolipoil transacetilasa y dihidrolipoil deshidrogenasa**. La subunidad de la piruvato deshidrogenasa cataliza la conversión de piruvato a CO_2 y a un intermediario hidroxietil-TPP. Este último pasa directamente a la dihidrolipoil transacetilasa, que oxida el grupo hidroxietilo a acetato y lo transfiere al CoA, formando acetil-CoA. (163)

El nexo entre la glucólisis y el ciclo del ácido tricarboxílico es la decarboxilación oxidativa de piruvato para formar acetil coenzima A. La unidad acetil de la acetil coenzima A se oxida completamente hasta CO_2 por medio de una reacción cíclica llamada Ciclo de Krebs. Durante el proceso oxidativo los electrones fluyen desde NAD reducido y FAD (flavina adenina dinucleótido) hasta oxígeno molecular por una cadena de portadores de electrones con síntesis acoplada de ATP en dos o tres sitios, según el sustrato oxidado. (36)

La oxidación de glucosa produce 38 moles de ATP. Estos derivan de la producción neta de 2 moles de ATP durante la conversión de un mol de glucosa a 2 moles de piruvato, y 36 moles de ATP durante la conversión de 2 moles de piruvato a 6 moles cada uno de CO_2 y H_2O . El cambio de energía libre de la oxidación de la glucosa es de 686.000 cal/mol. Como la energía libre de la síntesis de ATP puede acercarse a 12.000 cal/mol, según las concentraciones de ADP, ATP y fosfato en el sitio real de la enzima que cataliza las reacciones, la eficiencia puede ser hasta de 60%. (36)

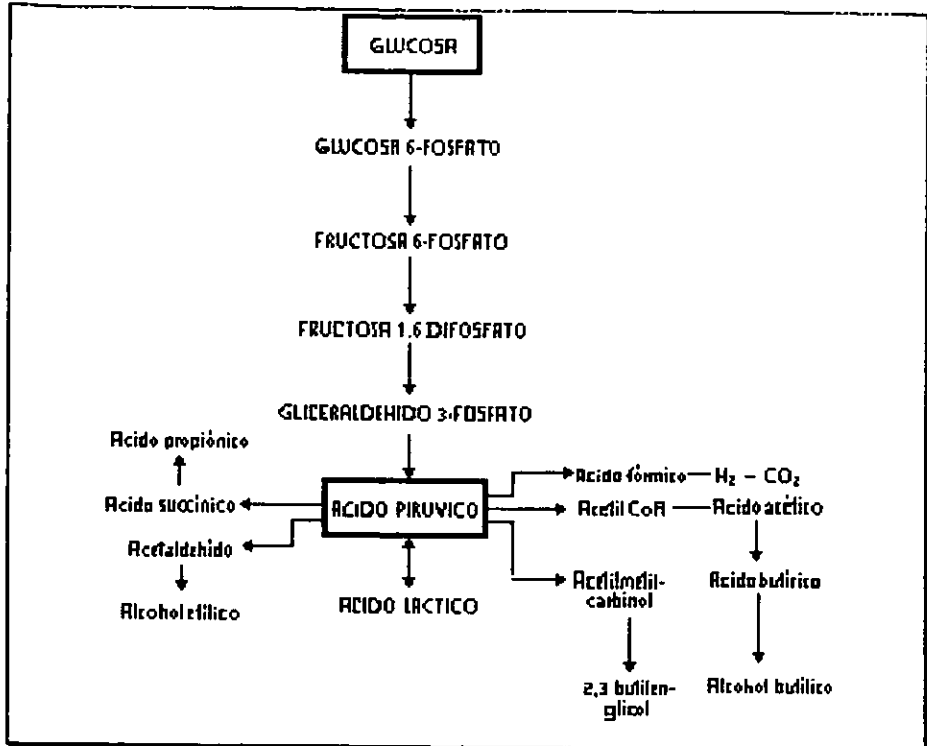


Fig. 12.- Glucólisis. (95)

1.3 CARACTERÍSTICAS ANTIGÉNICAS

1.3.1 ESTRUCTURA ANTIGÉNICA

Los antígenos *O*, *K*, *H* son los fundamentales para la serotipificación por la gran variedad de su composición química y estabilidad antigénica. Las propiedades de estos antígenos son relativamente estables porque están determinadas cromosómicamente. Esta serotipificación es útil para establecer con mayor precisión la identificación de cepas aisladas durante brotes y epidemias. (124)

Como muchos antígenos *O*, *K*, *H* pueden combinarse en formas diferentes, el número de serotipos posibles es muy elevado. Algunos son más comunes que otros tanto entre los serotipos especiales asociados a enfermedad como entre la flora del colon normal. Por esta razón casi todos los laboratorios comunes usan sólo un número limitado de antisueros que corresponden a ciertos serotipos patógenos. Un análisis más detallado debe hacerse en centros especializados. (124)

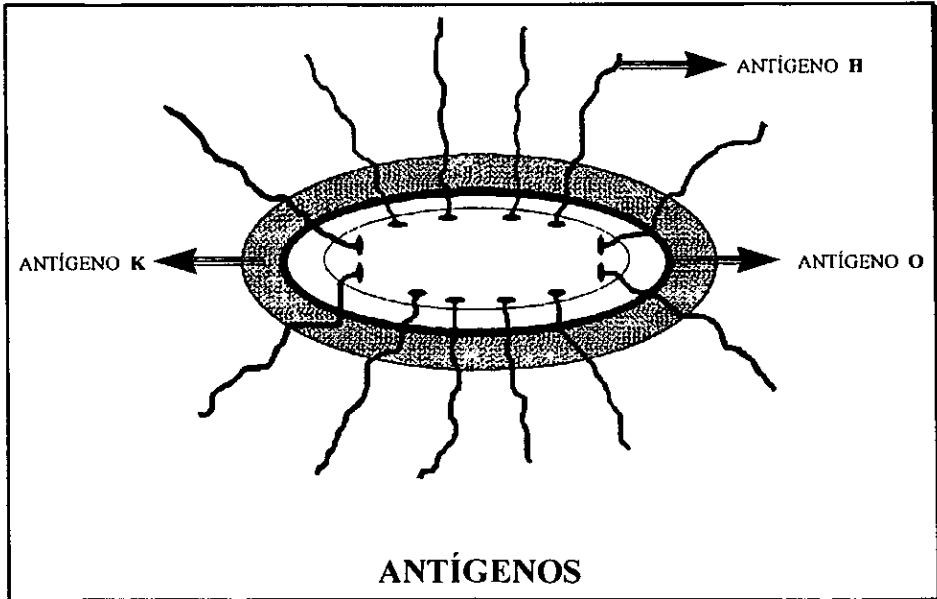


Fig. 13.- Estructura Antigénica (51)

Inicialmente las cepas de *E.coli* eran designadas por sus tres tipos de antígenos (O, K y H), pero actualmente el antígeno K se elimina del nombre. El término “Serotipo” se utiliza solamente cuando se presentan ambos antígenos, O y H. Si el antígeno H no es identificado, entonces el término correcto a emplear será “Serogrupo”. (61)

Se conocen aproximadamente 170 antígenos O y 55 antígenos H, pero se sabe que teóricamente existen más de 9000 posibles serotipos. Se ha observado, que ciertos serotipos se encuentran solamente bajo ciertas circunstancias. El serotipo O26:H11, se encuentra comúnmente como EPEC, mientras que el O157:H7, es el miembro mejor conocido de EHEC, el O4:H5 se asocia con infecciones en vías urinarias y el serotipo O148:H28 es bien conocido como ETEC. (61)

1.3.2 ANTIGENOS O (somáticos)

La pared celular está constituida por una fina capa de peptidoglicano, recubierta por la membrana externa compuesta de lipopolisacárido. (51)

Los antígenos son cadenas laterales de polisacáridos (LPS) formando la columna vertebral de los sistemas analíticos antígenicos y los cuales se caracterizan por ser moléculas muy complejas. (124)

Estos se dividen en tres partes:

- **Lípido A ó fracción interna.**- Región más proximal, y de carácter hidrofóbico. (121)

Corresponde a la endotoxina y el polisacárido corresponde a las otras dos fracciones que se identifican con el antígeno O. (51)

Esta región es prácticamente idéntica en todas las bacterias gram-negativas. Consiste en un disacárido formado por dos unidades de glucosamina unidas por enlace β (1 \rightarrow 6), pero donde todos los grupos -OH y -NH₂ están sustituidos (unidos a otras moléculas):

- existen 5 ácidos grasos, todos ellos saturados, con predominio de β -hidroximirístico (un ácido graso C₁₄)
- el -OH original en 4 está sustituido por *arabinosamina-fosfato*
- el -OH en 1 está sustituido por *fosforil-etanolamina* (94)

- **Fracción central u oligosacárido medular.**- También llamado corazón o núcleo, se une al lípido A a través del -OH en 3. Se encuentran dos fracciones:

a.- la fracción del núcleo interno, a base de dos tipos de azúcares exclusivos de Gram-negativas: *2-ceto-3-desoxioctónico (KDO)* y *L-glicero-Dmanoheptosa (Hep)*. Alguna de las Hep y alguno de los KDO pueden a su vez estar unidos a fosforil-etanolamina. Esta región es muy rica en grupos cargados, especialmente con carga negativa (de los fosfatos y KDO)

b.- La fracción del núcleo externo, constituido a base de *hexosas (glucosa, galactosa, NAG)*. (121)

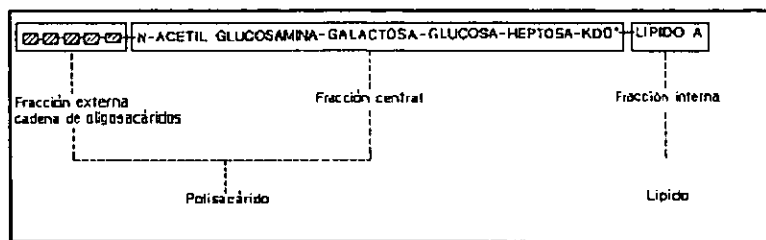


Fig. 14.- Estructura del antígeno "O". (51)

- **Fracción externa o cadena lateral específica.**- constituida por cadenas terminales de polisacáridos, que son responsables de la especificidad, de manera que las diversas especies de enterobacterias se pueden dividir en grupos O. (51)

Estos polisacáridos se proyectan hacia el exterior celular, constituye al Ag O y consiste en la repetición (hasta 40 veces) de unidades tri- tetra- o pentasacáridicas. (121)

De todas estas regiones la única indispensable para la viabilidad es el Lípido A. Los mutantes incapaces de sintetizar las cadenas laterales o el oligosacárido medular dan colonias rugosas y están afectados en distintas propiedades biológicas, pero pueden sobrevivir. (94)

Las funciones del LPS son:

1.- Papel estructural- el LPS es el componente esencial de la membrana externa. La porción hidrofóbica (cadenas de ácidos grasos del lípido A) se proyectan hacia el interior de esta membrana. Precisamente es la estructura del lípido A la principal responsable de la menor fluidez de dicha membrana, y por lo tanto de la mayor resistencia física. (121,115,163)

2.- A su vez, la propiedad anterior hace que sea menos soluble a detergentes y más resistente a disolventes orgánicos. (121,115,163)

3.- Es menos permeable a muchas moléculas hidrofóbicas, incluyendo antibióticos, debido a las largas cadenas laterales hidrofílicas. (121,115,163)

4.- Se une a cationes divalentes (Mg^{++} o Zn^{++}), lo que contribuye a la mayor estabilidad de la membrana externa. Esta presencia de cationes suministra un ambiente adecuado para muchas funciones de la pared celular. (121,115,163)

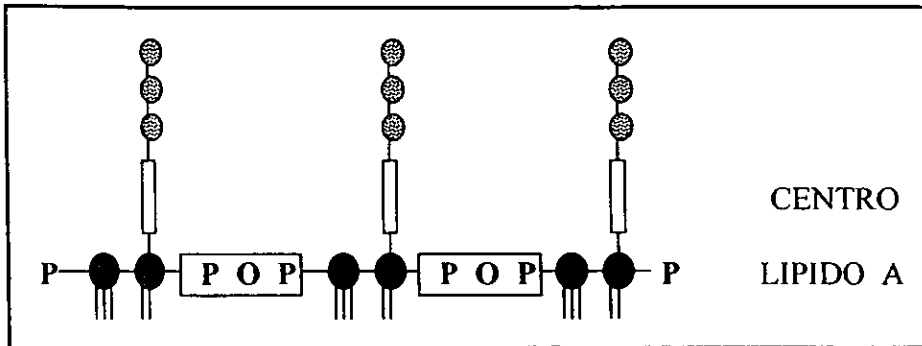
5.- El LPS constituye la endotoxina de las bacterias gram-negativas. La función como endotoxina se debe a la región del lípido A. Sus propiedades como endotoxina están en el origen de muchos síntomas patológicos propiciados por patógenos gram-negativos:

- Pirogenicidad (inducción de fiebre)
- Hipotensión
- Choque letal por fallo cardíaco (en casos graves)
- Actividad necrótica de tejidos. (121)

Igualmente presenta efectos beneficiosos: estimula una serie de mecanismos defensivos del hospedador, incluyendo la activación del complemento, que puede ocasionar la lisis de la bacteria y mejora las propiedades de los fagocitos. (94)

A pesar del nombre de endotoxina, el LPS no es intrínsecamente tóxico, sino que su efecto depende de la respuesta del hospedador. El macrófago, responsable de la mediación de los efectos del LPS, posee receptores de membrana para detectar el LPS bacteriano, y en respuesta a él, libera una serie de moléculas mediadoras (citoquinas) que actúan a su vez sobre diversas partes del sistema inmunitario. Los efectos negativos se deben a comportamientos no controlados desencadenados en el propio sistema inmunitario. (94)

6.- El LPS, y concretamente las cadenas laterales constituyen el antígeno somático O, cuya especificidad viene determinada por la secuencia repetitiva de azúcares. Esta porción condiciona la virulencia de las bacterias gram-negativas patógenas, por lo que debe ser esencial en la interacción hospedador-parásito. (121)



LPS

Fig. 15.- Estructura lipopolisacárida de la membrana. (115)

Es la inmunogenicidad de las unidades repetitivas de polisacáridos lo que le confiere al antígeno O su especificidad. Un gran número de antígenos O presentan reacciones serológicas cruzadas, o son idénticas, tanto química como serológicamente (ambas) a los antígenos somáticos de otros microorganismos, como sucede con cepas de *Shigella* y de *Salmonella*. *E.coli* O111 y *Salmonella* O35 se encuentran cercanamente relacionadas. Algunas *E.coli* carecen de estas cadenas laterales repetidas y se convierten en auto-aglutinables. (94)

1.3.3 ANTIGENOS K

Estos antígenos presentan moléculas polisacáridas con grupos ácidos, forman cápsulas bien definidas que pueden verse al microscopio. (115) Estas intervienen en la acción patógena por sus propiedades antifagocitarias, esto es, interfieren en la fagocitosis y en la actividad bactericida del suero. (66)

La cápsula bacteriana está constituida por polímeros orgánicos sintetizados por la propia bacteria, que se segregan y depositan por fuera de la pared bacteriana. Los principales componentes son polisacáridos complejos, formados por una mezcla de monosacáridos y ácidos urónicos., a los cuales se asocian en ocasiones azúcares aminados y acetilados. Contienen gran cantidad de agua (hasta el 90%). Los azúcares más habituales que constituyen los polisacáridos son la D-glucosa, D-galactosa y D-manosa. En los polisacáridos capsulares se encuentran aminoazúcares y ácidos urónicos como: ácido glucurónico, ácido galacturónico y ácido manourónico. La información genética necesaria para la biosíntesis de esta estructura radica en el DNA cromosómico. (51)

La cápsula protege la mayoría de las bacterias de la fagocitosis. La virulencia desaparece en el momento en que se pierde la cápsula. La cápsula impide o dificulta la fijación de bacteriófagos y que los antimicrobianos puedan llegar a la pared, a la membrana citoplásmica o al interior del citoplasma, para ejercer su acción antibacteriana. (51)

Anteriormente, las cápsulas K se dividían en tres, dependiendo de su sensibilidad al calor:

- 1.- Antígeno K, Tipo A
- 2.- Antígeno K, Tipo B
- 3.- Antígeno K, Tipo L (51)

La aglutinabilidad del Tipo A es inactivada por calor a 121 °C durante una hora, mientras esto hace al antígeno O aglutinable. Para los Tipos B y L, el calor a 100 °C es adecuado. El poder de unión del anticuerpo de B no se desactiva a 121 °C, mientras que el Tipo L se inactiva a 100 °C durante una hora. (61)

El antígeno K Tipo B enmascara la aglutinabilidad O de los cultivos vivos, por esta razón, es necesario hervir el cultivo antes que se puedan determinar los antígenos O. Los antiseros OB contienen aglutininas para los antígenos O y para los B; los antiseros O se emplean sólo cuando el antígeno B ha sido destruido por el calentamiento. (158)

Actualmente se ha realizado una revisión a la clasificación de los antígenos K, recomendando la supresión del antígeno B, que no se puede separar completamente del antígeno O, y la conversión del antígeno proteico L en antígeno F por haberse demostrado que corresponde a Fimbrias, de manera que el antígeno K queda limitado al antígeno polisacárido ácido. (158)

Los antígenos K pueden determinarse por medio de:

- Hinchazón Capsular.- la cápsula se hace visible por la adición de antisuero específico o por el desarrollo de líneas de precipitina empleando antisueros específicos por inmunoelectroforesis de contracorriente (CIE).
- Aglutinación Bacteriana.- debido a la presencia de otros antígenos en superficie, esta prueba puede dar resultados difíciles de interpretar.
- Microscopía Electrónica.- se determinan por medio de cápsulas o microcápsulas bien definidas. (124)

1.3.4 ANTIGENOS H

Las cepas móviles presentan antígenos flagelados proteicos y termolábiles, de importancia en la clasificación de serotipos, ya que les confieren la especificidad antigénica H. (36,51)

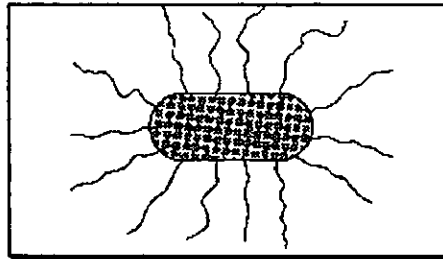


Fig. 16.- Flagelos. (51)

Los flagelos se encuentran distribuidos, en *E.coli*, sobre toda la superficie bacteriana (peritricas), y se componen de tres partes:

- 1.- Filamento
- 2.- Codo o manguito
- 3.- Corpúsculo basal (36,51)

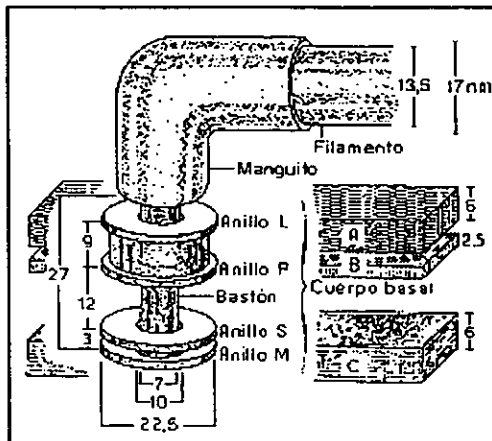


Fig. 17.- Estructura de un flagelo (51)

El filamento es la parte externa y conecta con el codo en la superficie bacteriana. Se forma por una proteína contráctil, la flagelina. Esta proteína especial se compone de monómeros o subunidades idénticos, dispuestos de forma helicoidal en 6 u 8 hileras alrededor de un eje cilíndrico hueco. (36,51)

El codo está compuesto de una unidad proteica simple. Es más estable que el filamento a pH bajo, altas concentraciones de urea, solventes orgánicos y agentes desnaturalizantes. En *E.coli* tiene 45 nm de longitud y está compuesto de 6 filamentos helicoidales concéntricos. (51)

El corpúsculo basal está formado por dos pares de discos. Uno de estos pares se sitúa en la membrana citoplásmica: el anillo M se inserta dentro o justamente por debajo de ella y el anillo S se sitúa inmediatamente por fuera de la membrana y queda posiblemente adherido a la superficie más interna de la capa de peptidoglucano. El otro par se adosa sobre la pared bacteriana: el anillo P en el peptidoglucano y el L en el lipopolisacárido. (36,51)

La diversidad antigénica está basada en los diferentes tipos de flagelina presente en la estructura flagelar. Muchas *E.coli*, en su primer aislamiento, son apenas móviles o no móviles. Sin embargo, al pasar a través de un agar semisólido obtienen completa movilidad. Sólo estas cepas pueden identificarse con el antígeno H. De lo contrario, se denominan NM (no móviles) o H-. (61)

La determinación serológica se hace mediante técnicas de aglutinación. (124)

1.3.5 ANTIGENOS DE FIMBRIAS O ANTIGENO F (PILI)

Las cepas que contienen fimbrias presentan antígenos proteicos relacionados con la capacidad de adherencia en las células epiteliales. Serológicamente son heterogéneos y permiten dividir las cepas en serotipos F. (51)

Las fimbrias son los factores de adherencia mayormente estudiados. Inicialmente algunos se designaban, erróneamente, como antígenos K. Los casos más notables fueron K88 y K99. En otros términos, basados en su función, se incluyen los Factores de colonización (CFA). Las Fimbrias Tipo I, son producidas por diferentes cepas de *E.coli*, tanto comensales como patogénicas, algunas adhesinas fimbriales o no fimbriales se encuentran frecuentemente asociadas con condiciones patológicas, tejidos u hospederos específicos. Generalmente, las fimbrias son estructuras de 5-7 nm de diámetro, pero las hay de menos de 4 nm. (129)

El potencial adhesivo de las fimbrias está determinado por la localización de dicha adhesina, ya sea en el extremo de la fimbria, o a lo largo de ésta. La fimbria P, que se une al antígeno P del grupo sanguíneo, tiene en sus extremos fibras complejas arregladas de tal manera que se adhieren receptor correspondiente por medio de la adhesina PapG. Algunas fimbrias como CFA/I, K88 y K99 están compuestas por una sola subunidad. En CFA/I, se encuentra expuesto el receptor en el extremo de la fimbria, mientras que K88 y K99 poseen receptores multivalentes a todo lo largo de su estructura. (129)

Como algunas cepas presentan sus fimbrias capsuladas, es ventajoso encontrar el receptor en el extremo de las mismas. Los receptores de las adhesinas tienden a estar compuestos por carbohidratos, los que las hace muy específicas. Se ha establecido que CFA es una fimbria exclusiva para humanos, mientras que K88 y K99 lo son para ganado porcino y vacuno respectivamente. (129)

Intimina.- Esta proteína de membrana presenta un papel muy importante en las infecciones causadas por EHEC y EPEC. Después de presentarse la adherencia a las células epiteliales por medio de adhesinas, señales de transducción provocan fosforilación de proteínas de las células del hospedero, así como incremento en los niveles de calcio intracelular trifosfatos de inositol. La intimina es el producto del gen cromosomal *eaeA*, cuya presencia es un importante factor de virulencia para EPEC y EHEC. Como resultado de la fosforilación de tirosina de las proteínas celulares del hospedero, la intimina reorganiza los elementos citoesqueléticos. En particular, actina filamentosa forma pedestales en forma de copas directamente debajo de la bacteria. (129)

Estos ejemplos demuestran el importante papel que juegan los mecanismos de adherencia en la patogenicidad de *E.coli*. (129)

1.3.6 SEROTIPOS DE *E.coli*

Tipo de <i>E.coli</i>	Serotipos O:H-	Serotipos O:H
Serotipos <i>EPEC</i>	O26, O55, O86, O91, O111, O119, O125, O126, O127, O128	O18:H7, O20:H26, O20:H34, O25:H1, O26:H11, O44:H34, O55:H6, O55:H7, O86:H27, O86:H34, O91:H7, O111:H2, O111:H12, O114:H10, O114:H32, O119:H6, O125:H21, O126:H2, O127:H9, O127:H21, O127:H40, O128:H2, O128:H7, O128:H8, O128:H12, O142:H6, O158:H23.
Serotipos <i>ETEC</i>	O20, O25, O16, O173	O6:H16, O8:H9, O11:H27, O15:H11, O25:H42, O27:H7, O78:H11, O78:H12, O128:H7, O148:H28, O149:H10, O159:H20, O148:H28
Serotipos <i>EHEC</i>	O4, O5, O98, O111, O125, O145, O157, O172	O16:H6, O26:H11, O26:H21, O26:H32, O46:H31, O48:H21, O55:H7, O91:H10, O91:H21, O111:H2, O111:H8, O113:H21, O117:H14, O118:H12, O119:H6, O126:H8, O128:H2, O157:H7
Serotipos <i>EIEC</i>	O28, O112, O124, O136, O143, O144, O152, O159	O124:H30, O124:H32, O167:H4, O167:H5
Serotipos <i>EAggEC</i>	O7, O86	O77:H18, O126:H27, O127:H2
Serotipos <i>UPEC</i>	O1, O7, O18, O75	O1:H4, O1:H6, O1:H7, O2:H1, O2:H4, O4:H5, O6:H1, O7:H4, O7:H6, O18:H7, O22:H1, O25:H1, O75:H5
Serotipos <i>EPEC</i> en conejos	O15	O2:H6, O103:H2
Serogrupos de septicemia	O8, O9, O15, O20, O26, O35, O78, O86, O101, O115, O117, O119	

Serogrupos de septicemia en ganado ovino	O15, O26, O35, O86, O115, O117, O119, O137	
Serotipos <i>ETEC</i> en ganado porcino	O9, O20, O45, O101, O138	O8:H19, O138:H14, O139:H1, O141:H4, O147:H19, O149:H10

Cuadro 2.- Serotipos conocidos de *E.coli* (61)

Actualmente, el número de antígenos O conocidos es de 173, el número de antígenos K es de 103 y el número de antígenos H es 56. (61)

1.3.7 VARIACIONES GENOTÍPICAS

Es frecuente la presencia de variaciones genotípicas debido a mutaciones o mecanismos de transferencia genética, que pueden llegar a afectar la constitución antigénica, así como los caracteres bioquímicos. (51)

La pérdida de la fracción terminal del polisacárido que confiere la especificidad del antígeno O, pérdida del antígeno H y aún la aparición de nuevos antígenos, como consecuencia de fenómenos de conversión lisogénica o de transferencia genética, cromosómica o plasmídica, son ejemplos de variaciones antigénicas por mutación. Estas variaciones pueden afectar a cualquiera de los antígenos presentes. (51)

También se pueden producir variaciones en las propiedades bioquímicas, como en la capacidad de fermentar un determinado azúcar, producción de exotoxinas y en la sensibilidad o resistencia a los antibióticos. (51)

Estos fenómenos de variación explican las dificultades que existen en la clasificación de las enterobacterias, ya que los géneros son difíciles de delimitar por la existencia de cepas que presentan caracteres atípicos e intermedios, además de las amplias posibilidades patógenas con la aparición de cepas resistentes a los antibióticos, que se producen en la mayoría de los casos por transferencia plasmídica (factor R); en el curso del tratamiento por antibióticos se seleccionan cepas resistentes de otras bacterias, que pueden colonizar la mucosa intestinal y transferir los factores de resistencia a enterobacterias oportunistas, creando el problema de las infecciones hospitalarias por gramnegativos. (51)

CAPÍTULO II

PATOLOGÍAS CAUSADAS
POR *E.coli*

CAPÍTULO II

2.1 Patologías Causadas por *E.coli*

2.1.1 Acción Patógena

- 2.1.1.1 Adherencia
- 2.1.1.2 Toxinas
 - 2.1.1.2.1 Exotoxinas
 - 2.1.1.2.2 Enterotoxinas
 - 2.1.1.2.3 Endotoxinas
- 2.1.1.3 Antígenos

2.1.2 Principales Síndromes Clínicos

- 2.1.2.1 Septicemia
 - 2.1.2.1.1 Síntomas
- 2.1.2.2 Infecciones de Vías Urinarias (IVU)
 - 2.1.2.2.1 Pielonefritis
 - 2.1.2.2.2 IVU en Varones
 - 2.1.2.2.3 IVU en Mujeres
 - 2.1.2.2.4 IVU Superiores
 - 2.1.2.2.5 Pielonefritis Aguda
 - 2.1.2.2.6 Pielonefritis Crónica
 - 2.1.2.2.7 IVU inferiores
 - 2.1.2.2.8 Cistitis Aguda
 - 2.1.2.2.9 Cistitis Crónica
- 2.1.2.3 Otitis Media
 - 2.1.2.3.1 Síntomas
- 2.1.2.4 Meningitis
 - 2.1.2.4.1 Síntomas
- 2.1.2.5 Peritonitis y Abscesos Intra-Abdominales
 - 2.1.2.5.1 Peritonitis
 - 2.1.2.5.2 Peritonitis Secundaria
 - 2.1.2.5.3 Abscesos Intra-Abdominales
 - 2.1.2.5.4 Abscesos Intra-Peritoneales
 - 2.1.2.5.5 Abscesos Pancreáticos

2.1.3 Gastroenteritis

- 2.1.3.1 *E.coli* Enterotoxigénica (ETEC)
 - 2.1.3.1.1 *E.coli* O169:H41
- 2.1.3.2 *E.coli* Enteropatógena (EPEC)
- 2.1.3.3 *E.coli* Enteroinvasora (EIEC)
- 2.1.3.4 *E.coli* Enterohemorrágica (EHEC)

- 2.1.3.4.1 E.coli O157:H7
 - 2.1.3.4.1.1 Signos y Síntomas
 - 2.1.3.4.1.2 Acción Toxígena
 - 2.1.3.4.1.3 Infección Asintomática y Diarrea Acuosa
 - 2.1.3.4.1.4 Colitis Hemorrágica
 - 2.1.3.4.1.5 Síndrome Urémico-Hemolítico
 - 2.1.3.4.1.6 Púrpura Trombocitopénica Trombótica
 - 2.1.3.4.1.7 Muerte
- 2.1.3.4.2 E.coli O111
- 2.1.3.4.3 E.coli O104:H21
- 2.1.3.5 E.coli Enteroagregativa (EA_gEC)

2.1 PATOLOGÍAS CAUSADAS POR *E. COLI*

Escherichia coli, que forma parte de la flora normal comensal del tubo digestivo, causa infecciones oportunistas y problemas gastrointestinales cuando se encuentra en cantidades excesivas o se vuelve enteropatógena. Entre algunos de los sistemas que puede afectar *E.coli* se encuentran : Sistema Nervioso Central, Vías Respiratorias, Vías Urinarias e incluso piel y tejido conectivo. (169)

El origen de estas afecciones se debe al paso del agente desde el canal intestinal hasta la circulación por: 1) lesiones en la mucosa entérica, 2) aumento apreciable de virulencia del microorganismo 3) baja resistencia del huésped atacado, así como un individuo en tratamiento inmunosupresivo, especialmente en personas de edad avanzada, niños o personas en etapa terminal de una enfermedad. (169)

E.coli es frecuentemente asociado con sepsis bacteriana, meningitis neonatal, infecciones de vías urinarias y gastroenteritis adquirida por alimentos no preparados higiénicamente. La mayor parte de las infecciones son endógenas, con excepción de la gastroenteritis, esto es, que la flora microbiana normal del individuo es capaz de establecer la infección cuando las defensas del huésped están comprometidas. (169)

También pueden encontrarse como saprófitos en el medio externo, que normalmente no se comportan como patógenos, pero, cuando se presentan factores predisponentes, pueden dar lugar a cuadros clínicos diversos, por lo general fuera del aparato digestivo. En su mayoría son cepas resistentes o multirresistentes a los antibióticos, que generalmente es necesario administrar para la curación del proceso. (170)

Las variantes bacteriológicas son del tipo enteropatógeno, enterotoxigénico, enteroinvasor y enterohemorrágico, cuya importancia clínica radica en la elevada morbimortalidad que tiene cuando no son diagnosticados oportunamente. (169)

Estas bacterias no forman parte de la flora normal intestinal, pero pueden dar lugar a procesos diversos en huéspedes normales, en su mayoría en el tubo digestivo (enteritis). Se caracterizan por su sensibilidad a gran número de antibióticos, que no siempre es necesario administrar. (170)

2.1.1 ACCIÓN PATÓGENA

2.1.1.1 ADHERENCIA

La adherencia es un fenómeno de superficie que supone la interacción de la bacteria con la célula. En la mayoría de los casos se considera un fenómeno específico como consecuencia de la combinación de sustancias presentes en la superficie de las bacterias o adhesinas con receptores de la superficie de las células. (170)

- **Adhesinas.-** Son compuestos de la superficie de las bacterias que actúan de mediadores del fenómeno de adherencia. Las adhesinas se encuentran asociadas con estructuras superficiales como las fimbrias o pili comunes, o con diversos componentes de la membrana externa (antígenos). (170)

En las bacterias gram-negativas, la adherencia es debida a la presencia de adhesinas en las fimbrias o en otras estructuras de la membrana externa. (170)

Fimbrias- son apéndices filamentosos de naturaleza proteica frecuentemente portadoras de adhesinas, que presentan la propiedad de combinarse con receptores de naturaleza polisacárida localizados en la superficie de las células epiteliales. Las fimbrias se pueden diferenciar por una serie de caracteres como el tamaño, peso molecular, composición en aminoácidos y poder inmunogénico y, además, en relación con la presencia de adhesinas, por la capacidad de fijación selectiva en los receptores de diversas células. (170)

1. Adhesinas Manosa Sensibles MS.- o fimbrias de tipo I, son las más frecuentes y difundidas en las bacterias gram-negativas. Presentan la propiedad de combinarse con receptores que contienen D-manosa que se encuentran en muchas glucoproteínas que existen en el moco, en gran número de células, incluidos fagocitos, produciendo el fenómeno de hemaglutinación, reacción que es inhibida por la adición de D-manosa al medio o de sustancias análogas. Estas fimbrias, por su capacidad de unirse a diversas células y tejidos, se consideran poco relacionadas con el poder patógeno, pero intervienen en el proceso de colonización. (170)

2. Adhesinas Manosa Resistentes MR.- son menos frecuentes y difundidas y se caracterizan por producir aglutinación aún en presencia de D-manosa. No forman un grupo homogéneo, sino que agrupan todas las fimbrias que se combinan con receptores específicos que no contienen manosa; es decir, un grupo heterogéneo en el que se incluyen diversos tipos de fimbrias. (170)

Hay que señalar que las fimbrias K88 y K987 P relacionadas con la diarrea de los lechones, K99 con la diarrea de bovinos y los factores de colonización CFA I, CFA II y E₈₇₇₅ relacionados con la diarrea humana. (170)

La síntesis de fimbrias está codificada por genes localizados en el cromosoma o en plásmidos y que su expresión fenotípica está modulada por factores ambientales (temperatura, pH, nutrientes, fase de crecimiento, presencia de antibióticos, etc.). Las fimbrias MS y las fimbrias P están codificadas por genes localizados en el cromosoma, mientras que las adhesinas MR asociadas con la acción patógena en el intestino del hombre son codificados por plásmidos. (170)

- **Receptores.** - Son compuestos que existen en la superficie de las células animales, que se combinan específicamente con las adhesinas bacterianas. Los receptores para las bacterias gram-negativas se encuentran en los carbohidratos de la membrana y del gel mucoso, y se identifican sus lugares combinantes con residuos de azúcares (enterobacterias), o polímeros más complejos (*E.coli*), con una configuración complementaria de las adhesinas. (170)

Los residuos de azúcares constituyen el sitio activo del receptor, que a su vez forma parte de moléculas de glucoproteínas o de glucolípidos (gangliósidos, globósidos). La adherencia requiere el contacto de la bacteria con la célula, pero, como ambas superficies son electronegativas, se crea una fuerza de repulsión, que sólo es neutralizada en parte por débiles fuerzas de atracción (Van der Waals, enlaces iónicos, enlaces de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas), lo que da como resultado la formación de una barrera electrostática que dificulta la aproximación. La presencia en la superficie de la bacteria de moléculas hidrofóbicas y en especial de adhesinas, que por su pequeño tamaño no están sujetas a las fuerzas de repulsión, permite neutralizar esta barrera y facilitar el contacto. (170)

Las adhesinas presentan configuraciones complementarias de los receptores celulares, lo que les permite aproximarse a distancias cortas, combinarse en forma esteroespecífica y formar numerosos enlaces independientes que aumentan la fortaleza de unión. (170)

Una vez producida la adherencia, la bacteria puede a su vez adherirse a otras bacterias de la misma o diferente especie por un mecanismo semejante, dando lugar a la formación de microcolonias o de cúmulos de bacterias en la superficie, lo que fortalece y estabiliza la colonización. (170)

2.1.1.2 TOXINAS

Al igual que todas las enterobacterias, presentan una endotoxina ligada al lipopolisacárido, en especial al lípido A, responsable de la acción pirógena y de las alteraciones vasculares que se producen en las infecciones generalizadas. Además, algunas cepas producen exotoxinas responsables de la producción de diarreas, cuya síntesis está codificada por la presencia de plásmidos (Ent⁺), que a su vez pueden contener genes asociados con la capacidad de adherencia y otras propiedades (producción de colicinas,

hemolisinas y resistencia a los antibióticos). Se conoce la existencia de una enterotoxina termolábil y una termoestable. Pueden producir enterotoxinas que actúan ya por acción tóxica directa sobre las células del epitelio intestinal o del endotelio funcional (enterotoxinas citotóxicas) o produciendo un estímulo funcional, generalmente a través del fermento adenilciclasa (enterotoxinas citotónicas). (136,142,170)

2.1.1.2.1 EXOTOXINAS

Son toxinas de naturaleza proteica que se sintetizan en el citoplasma durante la fase de desarrollo logarítmico de la bacteria, se transportan a través de la membrana citoplásmica y se liberan al exterior ya de forma directa o mediante la formación de vesículas. La síntesis de la toxina es codificada por el ADN plasmídico. (136,142)

Las exotoxinas son muy lábiles. Por acción del calor se inactivan con rapidez; el tratamiento por formol, en determinadas condiciones de temperatura, pH y tiempo, hace perder su toxicidad, conserva su poder inmunógeno y las transforma en toxoides de gran importancia en la preparación de vacunas antitóxicas. La pérdida de la toxicidad parece debida al bloqueo de los grupos amino libres por el aldehído fórmico. (136,142)

Presentan un poder antigénico elevado, pues la administración de toxoides por vía parenteral induce la formación de anticuerpos que neutralizan la acción de la toxina y se combinan según la ley de las proporciones múltiples. Son anticuerpos antitóxicos o antitoxinas, que constituyen la base para la preparación de sueros antitóxicos y aun de inmunoglobulinas específicas de gran interés para la prevención y tratamiento de estos cuadros. (136,142)

2.1.1.2.2 ENTEROTOXINAS

Exotoxinas de acción específica sobre las células intestinales, que dan lugar a la producción de diarrea. Se han clasificado en enterotoxinas citotónicas cuando sólo producen alteraciones funcionales en el metabolismo del enterocito y enterotoxinas citotóxicas cuando producen alteraciones anatómicas o necrosis. *E.coli* produce dos tipos fundamentales de enterotoxinas citotónicas. TL y TS. (136,142,170)

- **Enterotoxina termolábil TL (PM 86.000).** Es una toxina semejante a la cólerica en cuanto a composición, estructura, propiedades inmunológicas y mecanismo de acción, que se diferencia por estar codificada por plásmidos (plásmidos Ent). (170)

Está producida por las *E.coli* enterotoxigénicas y da lugar a diarrea. Estas cepas para producir enfermedad deben presentar los factores de colonización CFA ya antes mencionados. (170)

Esta toxina ejerce su efecto patógeno al estimular la enzima adenilciclase de las células epiteliales del intestino delgado, lo que causa aumento de la concentración intracelular de AMP cíclico (3,5-adenosinmonofosfato cíclico) y como efecto final, inhibición de la absorción de sodio e incremento en la secreción de cloruros, bicarbonato, potasio y agua hacia la luz intestinal. (67)

- **Enterotoxina termoestable TS.** Las cepas de *E.coli* enterotoxigénica también pueden sintetizar una toxina termoestable de menor peso molecular (1.900) y de escasa capacidad inmunógena, que se fija a un receptor diferente de las células del yeyuno e ileon y actúa por un mecanismo distinto, activando el fermento guanilciclase que produce un aumento de la producción de GMPc (guaninmonofosfato cíclico) y la aparición de diarrea. (67)
- **Verotoxina.** Enterotoxina citotóxica semejante a la toxina de *Shigella dysenteriae 1* producida por el serotipo O157 de *E.coli*, que tiene acción sobre las células endoteliales de los vasos sanguíneos intestinales dando lugar a diarreas hemorrágicas. (67)

2.1.1.2.3 ENDOTOXINAS.

Son toxinas localizadas en estructuras superficiales de la bacteria, que se pueden liberar durante la fase de crecimiento, pero sobre todo por lisis de la célula bacteriana. Las endotoxinas presentan las siguientes características: (170)

- **Toxicidad y acción inespecífica.-** Su toxicidad es menor que la de las exotoxinas. La administración de endotoxinas produce una gran variedad de manifestaciones biológicas, que son semejantes para todas las bacterias gramnegativas, pero difieren según la dosis y especie. Las manifestaciones más importantes son: (136,142,170)
 - a. **Fiebre.-** La administración de pequeñas cantidades de endotoxina por vía intravenosa o intramuscular produce fiebre que alcanza el máximo a las 3 horas (acción pirógena). La endotoxina es captada por los fagocitos (polinucleares y monocitos) que liberan un factor pirógeno, de acción sobre el centro termorregulador del hipotálamo. La producción de fiebre es una prueba muy sensible, que se emplea para la demostración de endotoxina en los líquidos y productos que se administran por vía parenteral. (136,142,170)
 - b. **Leucopenia, leucocitosis y trombopenia.-** La endotoxina aumenta la adherencia de los leucocitos al endotelio capilar y produce una leucopenia inicial, seguida de leucocitosis compensadora. También se absorbe en las plaquetas y da lugar a fenómenos de agregación y lisis plaquetaria, con liberación de sustancias vasoactivas, que junto con la desgranulación de los leucocitos son las responsables de las alteraciones vasculares. (170)

- c. **Alteraciones vasculares, shock y acción letal.**- La administración por vía intravenosa de dosis mayores produce, además de fiebre, leucopenia y trombopenia, alteraciones vasculares e hipotensión, y si la dosis es muy elevada, se puede presentar un cuadro grave con diarrea sanguinolenta, postración y colapso, que generalmente aboca a la muerte por shock séptico y coagulación intravascular diseminada. En estos casos se produce vasoconstricción periférica con formación de microembolias, que ocasionan un déficit de irrigación tisular, anoxia y necrosis. (136,142,170)

El hombre presenta la máxima sensibilidad a la endotoxina, que aumenta con la edad. Normalmente se producen pequeñas cantidades de endotoxina a partir de la flora gram-negativa del tubo digestivo, que por vía portal llegan al hígado donde son captadas por las células del SER que las metabolizan. Pero en las bacteremias y sepsis por bacterias gram-negativas se produce el paso directo de endotoxina a la circulación general, donde puede manifestar su acción tóxica coadyuvando al cuadro patológico con diversas manifestaciones, que pueden llegar al shock séptico y a la coagulación intravascular diseminada, según la cantidad de endotoxina liberada y su concentración en sangre periférica. (170)

La patogenia es el resultado de la activación e interacción de diversos sistemas de proteínas plasmáticas, en especial de los sistemas del complemento, coagulación, fibrinólisis y quininas. La endotoxina activa:

- a. El sistema del complemento por la vía alternativa, liberando fragmentos de C3a y C5a, que presentan una doble acción, quimiotáctica o de atracción de los leucocitos y anafilotóxica con desgranulación de los polinucleares y células cebadas y liberación de productos lisosómicos y sustancias vasoactivas. (170)
- b. La agregación y lisis plaquetaria, con liberación de sustancias vasoactivas (histamina, serotonina, quininas), que son responsables del aumento de la permeabilidad vascular, vasoconstricción periférica y producción del shock. (170)
- c. El factor de Hageman (factor XII de la coagulación), que a su vez activaría:

1.- El sistema intrínseco de coagulación (protrombina → trombina), que transforma el fibrinógeno y monómeros de fibrina en fibrina.

2.- El sistema de fibrinólisis, descomponiendo la fibrina y formando complejos entre los productos de degradación de la fibrina y los monómeros de la fibrina, que junto con la agregación plaquetaria da lugar a los fenómenos de coagulación intravascular diseminada. (170)

2.1.1.3 ANTÍGENOS

Las enterobacterias contienen antígenos estructurales de superficie, que son lipopolisacáridos y proteínas de algunos serogrupos (antígenos O), los antígenos capsulares (Antígenos K) y las fimbrias (antígenos F) actúan por sus propiedades antifagocitarias e inhibidoras e las sustancias bactericidas del suero y son responsables de la virulencia de las cepas invasivas, o por su capacidad de adherencia. (170)

Interferencia en la fagocitosis: Los microorganismos capaces de producir enfermedad poseen la habilidad de interferir en los mecanismos de fagocitosis:

- Destrucción de fagocitos.- El mecanismo más efectivo para evitar la fagocitosis es la destrucción de la célula fagocítica. Algunos microorganismos se multiplican en los tejidos y liberan sustancias solubles que son letales para dichas células; en otros casos la destrucción del fagocito se efectúa después del contacto con el microorganismo; algunas veces exhiben su acción lítica una vez que han sido fagocitados, liberando sustancias tóxicas que pasan al citoplasma de la célula hospedera; otros se replican dentro del macrófago y frecuentemente lo destruyen.

- Inhibición de la quimiotaxis o de la movilidad de las células fagocíticas.- Algunas sustancias inhiben la locomoción de los polimorfonucleares y de los macrófagos suprimiendo la quimiotaxis. En estos casos los microorganismos evitan el desplazamiento de los fagocitos en forma eficiente y como resultado el huésped es menos capaz de congrega polimorfonucleares y macrófagos al sitio de infección. (67)

2.1.2 PRINCIPALES SÍNDROMES CLÍNICOS

2.1.2.1 SEPTICEMIA

Es la presencia de bacterias en la sangre (bacteremia) y está asociada con enfermedades severas. La septicemia es una infección seria, de progreso rápido que amenaza la vida y surge de manera secundaria a infecciones localizadas del aparato respiratorio, genitourinario, gastrointestinal o de la piel mas los focos de infección primaria se dan a partir de vías urinarias o por diseminación del microorganismo desde infecciones del tubo digestivo inferior. *E.coli* al igual que *Klebsiella*, son hoy la causa más común de septicemia en pacientes hospitalizados. (169)

Puede preceder o coincidir con infecciones del hueso (osteomielitis), sistema nervioso central (meningitis) o de otros tejidos. Este padecimiento puede llevar al paciente a shock séptico y muerte. La septicemia, en asociación con microorganismos causantes de meningitis, produce shock, colapso adrenal y coagulopatía intravascular diseminada. (100)

El comienzo de una septicemia se anuncia con altas fiebres y escalofríos, aceleración de la respiración y del ritmo cardíaco, apariencia de estar seriamente enfermo (intoxicación) y sensación de muerte. Estos síntomas progresan rápidamente hasta shock con pérdida de la temperatura corporal (hipotermia), caída de la presión arterial, confusión, entre otros cambios del nivel de conciencia y lesiones hemorrágicas en la piel (equimosis). (100)

2.1.2.1.1 SÍNTOMAS

Los síntomas que presenta este padecimiento son los siguientes:

- 1) Fiebre.
- 2) Escalofríos.
- 3) Apariencia de enfermedad aguda.
- 4) Cambios en estado mental como: irritabilidad, ansiedad, agitación o falta de respuesta verbal.
- 5) Shock como: falta del habla, piel fría y pegajosa, palidez, cianosis.
- 6) Anormalidades en la piel como equimosis (generalmente lesiones largas, aplanadas, amoratadas que no se blanquean cuando se presionan), gangrena (cambios en las extremidades que sugieren el decremento o la falta de flujo sanguíneo).
- 7) Decremento o ausencia de orina. (100)

Un examen físico muestra hipotensión (baja presión arterial), hipotermia (baja temperatura corporal) y signos asociados con enfermedades como meningitis, neumonía, entre otras. Los exámenes que se realizan para confirmar la infección son: hemocultivo, urocultivo, cultivos de lesiones cutáneas, cuenta de plaquetas, niveles de fibrinógeno y gases en sangre. (100)

2.1.2.2 INFECCIONES DE VÍAS URINARIAS (IVU)

E.coli es el causante del 80% de infecciones urinarias adquiridas en la comunidad o en el medio intrahospitalario. La capacidad bacteriana de resistencia a la agresión de las células sanguíneas produciendo hemolisinas y la de unirse a células uroepiteliales, se asocia con incremento de virulencia y desarrollo de infección. Los antígenos K más comúnmente asociados a infecciones del tracto urinario K₁, K₂, K₃, K₅, K₁₂, K₁₃. Tipos O involucrados: O₁, O₂, O₄, O₆, O₈, O₉, O₁₁, O₁₈, O₂₂, O₂₅ y O₇₅. (115)

Una vez confirmada la infección de vías urinarias, es necesario, definir el sitio de infección y las repercusiones en la salud de quien la padece. Las vías de entrada son: a) hematogena; b) ascendente urinaria y c) linfática. (140)

Los factores predisponentes son reflujo vesicoureteral, obstrucción ureteral por cuerpos extraños (cálculos, catéteres o tumores) y malformaciones congénitas. (140)

En el medio hospitalario el 96% de estas infecciones son causadas por microorganismos gramnegativos o por enterococos. La presencia de fimbrias de *E.coli* es un factor de virulencia de este microorganismo que facilita su proliferación (140) ya que su mecanismo de adhesividad es el primer paso antes de invadir a la célula; esta adherencia requiere de dos factores que son un receptor y una adhesina. Los receptores se componen de residuos específicos de carbohidratos en la superficie celular, mientras que las adhesinas son proteínas que se encuentran en la superficie de las células y que interactúan con los receptores. Estas fimbrias reconocen carbohidratos como galactosa y ácido siálico en el caso de presentarse pielonefritis. También inhiben la fagocitosis por polimorfonucleares. (67)

2.1.2.2.1 PIELONEFRITIS

Infección piógena, aguda o crónica, es difusa y bilateral de pelvis renal y parénquima subyacente. Siendo su etiología a través de sangre, ganglios linfáticos o por infección ascendente desde la vejiga. (133)

Esta inflamación bacteriana del riñón presenta destrucción del tejido renal y compromiso de la vía urinaria. En enfermos inmunodeprimidos puede ser causada por otros agentes inflamatorios. La pielonefritis generalmente es focal, a veces circunscrita a una pequeña zona de un riñón, pero puede extenderse a todo el riñón o a ambos. La pielonefritis presenta como factores predisponentes: (97)

- 1) Reflujo.- Se produce cuando la orina vesical ingresa de nuevo al lumen ureteral, de manera que la vesícula vesico-ureteral es sobrepasada en sentido ascendente. Puede ser de diferente magnitud según el grado de la deformación de la vía urinaria. Causa del reflujo, es la estasia urinaria, que a su vez se debe a malformaciones o lesiones obstructivas adquiridas. Se denomina nefropatía por reflujo a la lesión córtico-medular renal resultante del mecanismo de reflujo, la que corresponde a una hidroureteronefrosis frecuentemente con pielonefritis crónica. (97)

- 2) Obstrucciones.- malformaciones o lesiones adquiridas.
- 3) Factores metabólicos.
- 4) Inmunodepresión.
- 5) Factores quirúrgicos. (97)

Las vías de propagación a los riñones por las que los agentes infecciosos pueden alcanzar los riñones son:

- 1) La ascendente, que es la más común y en que tiene gran importancia el reflujo vesíco-ureteral;
- 2) Hematógena,
- 3) Linfática, desde el intestino y vejiga y
- 4) Directa o por continuidad. Esta última es poco frecuente, se da en traumatismos con heridas penetrantes y en procedimientos quirúrgicos. (97)

Los microorganismos patógenos que participan en la primera infección de la vía urinaria generalmente pertenecen al grupo coliforme: *E.coli* en el 50 a 90% de los casos, no así en la pielonefritis crónica. (97)

La mejor manera de identificar pacientes con fiebre por infección de vías urinarias es examinando los resultados del uroanálisis, definida por identificación de ácido dimercaptosuccínico renal. Este puede ser un método de selección suficiente para exclusión de pielonefritis aguda en infantes atendidos por fiebre de origen desconocido. (133)

Con relación a la pielonefritis, se hace una revisión del tipo enfisematoso, en el cual el tejido se encuentra distendido por gases debida a las bacterias coliformes formadoras de gases. Ocurre con frecuencia en pacientes con diabetes mellitus y/o uropatía obstructiva. (133)

2.1.2.2.2 IVU EN VARONES

Durante el primer año de vida, la pielonefritis es más habitual en varones y se relacionan con malformaciones congénitas del aparato urinario. Las causas predisponentes son la falta de circuncisión y alimentación en la etapa de lactancia con leches industrializadas. Los lactantes circuncisos, que además se alimentan del seno materno, presentan IVU con menor frecuencia, ya que su alimentación contiene mayor cantidad de anticuerpos IgA, que confieren inmunidad pasiva y protegen contra diversas infecciones. (140)

Los jóvenes que presentan IVU con frecuencia son resultado de prostatitis aguda. Después de los 50 años de edad las IVU son más frecuentes en el varón, fundamentalmente por el crecimiento de la próstata. Esta situación favorece la retención de orina y con ello la proliferación de microorganismos en la vejiga. (140)

2.1.2.2.3 IVU EN MUJERES

A la edad de 5-7 años, las infecciones son más frecuentes en el sexo femenino, sobre todo al llegar a la etapa de vida sexual activa, debido a la corta longitud de la uretra femenina que facilita el ascenso de los microorganismos infectantes hacia la vejiga. La cistitis es más frecuente que la pielonefritis. (140)

2.1.2.2.4 IVU SUPERIORES

Comprenden: riñones, pelvis renal y cálices; pielonefritis tanto aguda como crónica. (140)

2.1.2.2.5 PIELONEFRITIS AGUDA

Se destacan microfocos purulentos o supurados que pueden extenderse y desarrollar abscesos perirrenales. En autopsias se observa asociada a una obstrucción de la vía urinaria. (97)

Se manifiesta por fiebre, malestar general, lumbalgia, disuria, poliaquiuria y tenesmo vesical. Se acompaña de reflujo vesicoureteral o de cálculos en la pelvis renal. (140)

Evolución:

- 1) Curación con cicatriz. Cuando las cicatrices son grandes pueden comprometer la función renal, favorecer nuevas infecciones y complicarse de hipertensión arterial.
- 2) Extensión en forma de perinefritis, abscesos perinefríticos y otras septicemias.
- 3) Transformación a pielonefritis crónica. (97)

2.1.2.2.6 PIELONEFRITIS CRÓNICA

Es una inflamación con destrucción del tejido renal y signos de organización, con fibrosis, retracción y depresiones corticales irregulares. En un comienzo existe infiltración celular linfoplasmocitaria, luego se producen glomeruloesclerosis, atrofia de tubos y esclerosis vascular. (130)

Existe una persistencia prolongada de microorganismos en el riñón. Una vez infectado un riñón, su esterilización total es casi imposible. Se deriva de orina residual y reflujo vesicoureteral y tiene como secuela la cicatrización parenquimatosa. (140)

Evolución:

- 1) Curación con cicatrices de extensión variable. Cuando son muy grandes, se produce el riñón retraído pielonefrítico. Las cicatrices pueden tener las mismas complicaciones que las de la pielonefritis aguda.
- 2) Extensión en la misma forma que la de la pielonefritis aguda.
- 3) Manutención por persistencia de factores predisponentes o de microorganismos resistentes al tratamiento.
- 4) La pielonefritis crónica puede llevar a la insuficiencia renal. (97)

2.1.2.2.7 IVU INFERIORES

Comprenden: ureteros, vejiga y uretra; las infecciones son cistitis aguda y crónica que puede presentarse en niños, adultos y personas de edad avanzada. (140)

2.1.2.2.8 CISTITIS AGUDA

Se manifiesta por: disuria, nicturia y poliaquiuria; el paciente puede presentar hematuria y dolor, sensación de pesantez suprapúbica; rara vez se presenta fiebre, la cual es indicativa de pielonefritis. Esta infección se presenta con mayor frecuencia en mujeres y la vía de entrada de los microorganismos es la ascendente. (140)

2.1.2.2.9 CISTITIS CRÓNICA

Se debe a reflujo vesicoureteral, pielonefritis crónica, estenosis ureteral, litiasis vesical, neoplasias vesicales. Se manifiesta por: disuria, nicturia, poliaquiuria, dolor suprapúbico y malestar general crónico. En la mujer puede deberse a la presencia de cistocele y en el varón a la hipertrofia prostática. (140)

Es preciso el control oportuno de estas infecciones que ponen en peligro la vida. En la microbiología de este padecimiento es frecuente encontrar como patógeno a *E.coli*, pero no se puede descartar la presencia de otros patógenos de vías urinarias, lo que obliga a la administración de antibióticos dirigidos a gramnegativos principalmente. (140)

2.1.2.3 OTITIS MEDIA

Se le llama así, como su nombre lo indica, a la infección bacteriana del oído medio. Ocurre frecuentemente en niños menores de 8 años de edad, aunque los adultos ocasionalmente la padecen. (149)

Es también la causa más común de la pérdida auditiva permanente en niños. La otitis media aguda comienza con una infección de las vías respiratorias altas (nariz, faringe, laringe y tráquea) como es el caso de un resfriado. (89)

No se trata de una infección contagiosa, pero sí lo es la infección respiratoria causante de la otitis y puede adquirirse al estar en contacto con personas infectadas y que presentan secreciones respiratorias. (126)

El oído medio tiene el tamaño de un guisante y es una cavidad llena de aire separada del exterior únicamente por la membrana del tímpano. Un oído sano contiene aire a la misma presión atmosférica que se encuentra en el exterior. (89)

La bacteria se introduce al canal auditivo a través del tubo de eustaquio, que conecta al oído con la garganta, y causa la inflamación del oído medio. Esta inflamación, junto con el fluido, bloquean el tubo de eustaquio. Además de encargarse de drenar el oído, este conducto tiene como función mantener la presión normal interna. Cuando el tubo se encuentra inflamado y obstaculizado por fluido, la presión interna se incrementa y puede provocar la ruptura de la membrana del tímpano. Entonces el fluido producido por la infección no puede drenarse correctamente a través del tubo de eustaquio y gotea por el oído. (149)

2.1.2.3.1 SÍNTOMAS

Los síntomas que se presentan son: dolor del oído, disminución o pérdida de la audición (sin el tratamiento adecuado la pérdida del oído puede ser crónica o permanente), sensación de oído tapado, descarga nasal, fiebre (especialmente en niños), estornudos, (149) llanto persistente, irritabilidad, náusea o dolor de estómago y vómito. (126) Los niños que no pueden describir el dolor de oído simplemente se tallan y rascan la zona afectada. (89)

Los niños que presentan dolor de oído no necesariamente deben aislarse de otros, pueden realizar sus actividades cotidianas sin representar peligro, pero es importante darles a

conocer algunas medidas preventivas como cubrir sus bocas al toser con un pañuelo desechable y desinfectar cualquier objeto que hayan introducido a la boca. (126)

Las secuelas a la pérdida de la audición son de gran importancia puesto que puede ocasionar una disminución en la capacidad de aprender, e incluso retrasar la evolución del habla. Además de que la infección puede extenderse a estructuras cercanas al oído. (89)

El médico debe encargarse de la revisión de los síntomas y de la función de la membrana del tímpano con un otoscopio. Remueve el exceso de cerilla por succión, irrigación o con instrumental especial. (149) En otros casos se realiza el timpanograma, que es el examen que consiste en la introducción de un pequeño instrumento al canal auditivo, se introduce aire y se mide el movimiento de la membrana del tímpano. Si hay fluido detrás de la membrana, ésta no se moverá correctamente. (149) Otra prueba que se realiza en estos casos es el Audiograma, cuyo objetivo es medir la magnitud de la pérdida de la audición por medio de diversos tonos en varios niveles. (89)

2.1.2.4 MENINGITIS

La meningitis bacteriana se define como una enfermedad infecciosa del sistema nervioso central que afecta el encéfalo y las meninges. Este padecimiento se presenta con mayor frecuencia en recién nacidos y lactantes. A pesar de los recursos para la revisión diagnóstica, empleo de terapias coadyuvantes y del uso de antimicrobianos, la letalidad asociada a la meningitis es muy elevada. Existen variaciones en cuanto a los agentes causales en diferentes áreas geográficas con un franco predominio de enterobacterias en la etapa neonatal. (89)

Los factores que predisponen para favorecer infecciones del sistema nervioso central son: prematuridad, peso bajo, desnutrición, hacinamiento, diabetes, insuficiencia renal e hipoparatiroidismo y en general en aquellos padecimientos que originan una alteración en el sistema inmune. Las bacterias patógenas pueden llegar al SNC a través de tres vías:

- 1) Diseminación hematológica
- 2) Diseminación bacteriana a través de estructuras vecinas infectadas
- 3) Invasión directa (89)

La meningitis bacteriana es el resultado de la diseminación hematológica de microorganismos a partir de focos de infección distantes, especialmente de vías respiratorias. en el 50 a 60% de los casos se puede encontrar como precedente una infección respiratoria superior. Las bacterias entran al líquido cefalorraquídeo a través de los ventrículos laterales y llevadas al espacio subaracnoideo, contaminando el recorrido y diseminando la infección. (89)

Los cambios fisiopatológicos que se presentan en el organismo son debidos primeramente al agente causal y posteriormente sostenidos por la respuesta inflamatoria o una combinación de ambas. (89)

2.1.2.4.1 SÍNTOMAS

El cuadro clínico es de presentación aguda y fulminante y se desarrolla con rapidez en pocas horas: fiebre, vómito, convulsiones e irritabilidad o letargo. Por esta razón, es necesario agotar recursos para lograr un diagnóstico correcto. La punción lumbar y el análisis tanto bioquímico como bacteriológico del líquido cefalorraquídeo, son el estándar principal para el diagnóstico. Se emplea la toma de hemocultivos seriados aun cuando su positividad no va más allá de un 20 a 30%. Como un método adicional útil, rápido, con elevada sensibilidad y especificidad, se utiliza la coagulación que permite tener el diagnóstico etiológico a pesar de no contar con bacterias viables, procedimiento que no requiere de equipo sofisticado y que está al alcance de todos los hospitales. Otras pruebas rápidas son las contraelectroforesis y ELISA. (89)

Es posible que se presenten complicaciones en el 50% de los casos como son: hidrocefalia, ventriculitis con fluido que bloquea el acueducto subdural (frecuentemente en niños), empiemas, abscesos (solamente en casos de encontrarse el organismo inmunocomprometido), vasoespasmio y vasculitis. (89)

La meningitis neonatal se reporta en 1 de cada 2500 nacimientos, el 80% de los casos se atribuyen a *E.coli* que, junto con *Streptococo B*, son la causa más común de meningitis neonatal. (56) Los antígenos K son los que promueven la patogenicidad, causan un alto porcentaje de meningitis sin aumento equivalente de colonización gastrointestinal ni septicemia. (155) La cápsula K1 (con ácido siálico) es química e inmunológicamente idéntico al grupo B polisacárido ácido de *Neisseria meningitidis*. Este antígeno K1 enmascara las estructuras que se encuentran debajo de la superficie celular de la bacteria, previniendo la respuesta específica del anticuerpo y la activación del sistema alternativo del complemento de ser activados. También reduce la sensibilidad del suero a *E.coli* y tiene reacción cruzada inmunológica con la cápsula de meningococos de serogrupo B. Por otro lado, también puede encontrarse en los desechos fecales de la madre, lo que nos indica que ella es la fuente de infección, y que ésta ocurre al nacer. Por esta razón se llega a la conclusión de que la susceptibilidad de los neonatos a *E.coli* se encuentra más relacionada a factores del hospedero que a factores microbianos. (56)

2.1.2.5 PERITONITIS Y ABSCESOS INTRA-ABDOMINALES

2.1.2.5.1 PERITONITIS

Se define como un proceso inflamatorio difuso o localizado que afecta a la membrana peritoneal. Presenta formas agudas o crónicas y variadas etiologías: bacterias como *E.coli*, hongos, parásitos, irradiación química, etc. (130)

La peritonitis primaria ocurre casi siempre en niños, predominantemente en niñas, menores de 10 años. Los organismos productores de este padecimiento en el mayor de los casos son *neumococos* o *estreptococos grupo A*, así como microorganismos gram-negativos, específicamente *E.coli* se aísla de la mitad de los casos de pacientes con este mal. La alta incidencia en niñas sugiere que la infección asciende a través del tracto genital, ya que el microorganismo se encuentra principalmente en las trompas de falopio. (130)

La ruta de infección más común es la bacteremia en fluido ascítico, con menor frecuencia es el resultado de la migración transmural de bacterias entéricas. Un factor predisponente es: antecedentes de cateterización intra-arterial o infusión de vasopresina como tratamiento de gastroenteritis hemorrágica. (130)

La fiebre es el síntoma más común, aunque se encuentra ausente en muchos de los casos. En la mayoría de los pacientes se presenta dolor abdominal y encefalopatía hepática. Sin embargo, en el 50% de los casos se sufre de relajamiento del abdomen y un tercio de los pacientes son asintomáticos, pero debe sospecharse de peritonitis si el paciente presenta deterioro clínico inexplicable o hipotensión. (130)

La clave para el diagnóstico es el examen de bacterias y células blancas en fluido ascítico. La cuenta bacteriana es por lo regular muy baja y por lo tanto la tinción de Gram en fluido ascítico es negativa; sin embargo, este examen es útil para visualizar la presencia de un solo tipo de bacteria que se encuentre de manera consistente en la peritonitis, así como para encontrar diferentes microorganismos que nos indiquen una posible peritonitis secundaria. Debido a la baja cuenta bacteriana, los cultivos deben inocularse con 10 a 20 ml de fluido ascítico en un hemocultivo. La cuenta de leucocitos polimorfonucleares es el mejor indicador de peritonitis primaria, esto es, una cuenta mayor de 250 cel/mm^3 . (130)

Es importante distinguir la peritonitis primaria de una secundaria que resulta de una enfermedad intra-abdominal, para este fin se emplea la cuenta de células blancas de la sangre en fluido ascítico. Una cuenta mayor de $10,000/\text{mm}^3$ sugiere peritonitis secundaria así como la presencia de especies múltiples de bacterias, anaerobios u hongos. Por esta razón es necesario que los pacientes sean evaluados clínica y radiológicamente para excluir cualquier evidencia de procesos no evidentes o escondidos que den lugar a estos padecimientos. (130)

2.1.2.5.2. PERITONITIS SECUNDARIA

Esta presenta dos formas: peritonitis en pacientes que experimentan diálisis peritoneal y peritonitis secundaria que resulta de una enfermedad intra-abdominal. Indicadores de peritonitis son: desarrollo de fiebre, dolor o relajamiento abdominal, leucocitosis y aislamiento de bacterias o agentes micóticos. Cuando se aíslan bacterias del equipo de diálisis, con ausencia de células inflamatorias acompañadas de signos clínicos, se puede hablar de una contaminación, más que una infección. Debido a la gran cantidad de diluciones involucradas, la ausencia de bacterias en la tinción de Gram del sedimento encontrado en el equipo de diálisis no debe dar lugar a una discriminación entre infección e inflamación estéril. La entrada a la cavidad peritoneal puede ocurrir de manera exógena (después de la colonización de la herida abdominal o por contaminación del equipo de diálisis), o endógena (bacteremia o por migración de la flora normal intestinal incrementada por trauma inducido por catéter). Los pacientes que no responden a la terapia de antibióticos en un lapso de 96 horas se encuentran frecuentemente infectados por bacilos gram-negativos. En estos casos, es necesario remover el catéter para diálisis de manera que se pueda controlar la infección. (130)

La peritonitis generalizada puede ser el resultado de apendicitis, heridas abdominales penetrantes, perforaciones en el tracto gastrointestinal (úlcera péptica o neoplasmo intestinal), o por ruptura de abscesos intra-abdominales o del hígado. La mayoría de estas infecciones son polimicrobianas que involucran especies anaeróbicas y aeróbicas. La cuenta de leucocitos en peritonitis secundaria a una enfermedad intestinal, es mayor que en la peritonitis primaria asociada con cirrosis. Debido al origen de la infección y a que es polimicrobiana el olor que se percibe en estos pacientes es muy desagradable. (130)

2.1.2.5.3 ABSCESOS INTRA-ABDOMINALES

Estos se presentan a causa de:

- 1) Cirugía abdominal
- 2) Enfermedad intra-abdominal primaria o
- 3) Trauma abdominal penetrante, en algunos casos son precedidos por esparcimiento infeccioso desde un punto distante, aunque es menos común. Se utiliza la diagnosis radiológica para determinar la presencia y tratamiento de bacterias anaeróbicas. (130)

Los abscesos intra-abdominales se presentan como una complicación de cirugía, fiebre de origen desconocido o disfunción de órganos vecinos. Se encuentran convenientemente clasificados según su localización anatómica: intraperitoneal, retroperitoneal o visceral. (130)

Abscesos intraperitoneales son áreas de peritonitis localizada en las que la infección ha progresado pero también ha sido obstaculizada por el peritoneo u otras vísceras. Infecciones retroperitoneales incluyen abscesos perinéfricos y paravertebrales. Abscesos viscerales se desarrollan dentro del abdomen y pueden llegar a afectar hígado, vejiga y riñones. (130)

A pesar de que la localización del absceso determina los signos que presenta, muchas de las infecciones comparten signos en común. Fiebre, se presenta invariablemente y de manera persistente. Puede presentarse hipotensión y shock séptico, además de dolor abdominal, que es la mejor clave que determinar abscesos intra-abdominales. En pacientes geriátricos no se observa dolor abdominal ni fiebre. (130)

Los abscesos intra-abdominales contienen múltiples especies bacterianas. Dentro de las bacterias comúnmente aisladas en estos padecimientos, se encuentra *E.coli* (entre otras bacterias anaeróbicas), debido a la proximidad con la que se encuentra el intestino al peritoneo. (130)

Para elegir los antibióticos adecuados es necesario tener los resultados de cultivo de sangre y material del absceso. A pesar de que el uso de antibióticos es esencial, especialmente por existir el riesgo de desarrollar bacteremia, la terapia por sí sola no erradicará los abscesos intra-abdominales, y por eso debe realizarse un drenado efectivo del absceso. Para lograr el drenado óptimo se emplean la ultrasonografía. Se ha demostrado que esta técnica es eficiente en un amplio rango de abscesos intra-abdominales. El fracaso del tratamiento se presenta en pacientes con abscesos multifocales, hematomas gruesos o infecciones organizadas. Complicaciones menores se presentan en un porcentaje insignificante, en cambio, complicaciones mayores, como hemorragias, sepsis y perforación intestinal, se encuentran en un porcentaje mayor. (130)

2.1.2.5.4 ABSCESOS INTRAPERITONEALES

Son el resultado de:

- 1) Peritonitis difusa
- 2) Expansión de una infección. Los tipos son:
 - 1) Abscesos subfrénicos
 - 2) Subhepáticos
 - 3) Paracólicos y
 - 4) Pélvicos. (130)

Cerca de una tercera parte de los abscesos intra-abdominales son intraperitoneales y la mitad de estos abscesos ocurren en la región baja del cuadrante derecho. (130)

Los abscesos subfrénicos son consecuencia de :

- 1) Cirugía intra-abdominal que involucre: duodeno, estómago, tracto biliar o apéndice
- 2) Ruptura de una víscera hueca (úlceras pépticas perforadas o apendicitis aguda) y
- 3) Trauma abdominal penetrante. (130)

Los signos clínicos van desde un desorden agudo severo, hasta proceso crónico caracterizado por: fiebre, anemia, pérdida de peso y síntomas no específicos. El síndrome crónico se presenta en pacientes que han recibido con anterioridad terapia antimicrobiana inadecuada. Se presenta también dolor o relajamiento abdominal en la región costal baja. (130)

El tratamiento primario consiste en drenar. Sin embargo, si el drenado quirúrgico se convierte en necesario, el acercamiento transperitoneal es favorable, puesto que permite una exploración adecuada de varios sitios donde se localicen abscesos y el drenado de purulencia presente. Se administran antibióticos dependiendo de los resultados obtenidos del cultivo. (130)

2.1.2.5.5 ABSCESOS PANCREÁTICOS

Estos son el resultado de complicaciones de pancreatitis derivada del alcoholismo, trauma o alguna infección. Este padecimiento es causado en la mayoría de los casos por E.coli. Se debe sospechar de una absceso pancreático cuando un paciente con pancreatitis presente fiebre persistente, náusea, vómito y dolor o relajamiento abdominal. Las complicaciones que presenta incluyen: perforación de la cavidad peritoneal, perforación del estómago, duodeno o colon transverso. (130)

2.1.3. GASTROENTERITIS

Las gastroenteritis constituyen la principal causa de muerte en los países en desarrollo. (139) En las diarreas infecciosas causadas por bacterias se han identificado cuatro mecanismos patogénicos diferentes, que corresponden cada uno de ellos a una lesión anatomopatológica distinta: enterotoxigenicidad, adherencia, invasión y citotoxicidad. (67)

Los datos clínicos observados en la gastroenteritis pueden agruparse en tres grupos: síndrome diarreico, síndrome disentérico y síndrome infeccioso. El síndrome diarreico se manifiesta como un aumento brusco en el número de evacuaciones y en el contenido líquido de las mismas; puede haber sangre y moco en ellas y están compuestas fundamentalmente de materia fecal líquida, también puede haber cólicos. El síndrome disentérico se caracteriza por la presencia de evacuaciones numerosas, compuestas fundamentalmente de moco y sangre, con escasa materia fecal; casi siempre se acompaña de cólicos y tenesmo. El síndrome infeccioso se caracteriza por fiebre, anorexia, vómitos y ataque al estado general. (67)

Estos síndromes pueden presentarse en forma simultánea o sucesiva en un mismo paciente o bien el cuadro clínico puede corresponder a uno sólo; sin embargo para hacer el diagnóstico es necesaria la presencia de diarrea o disentería. La frecuencia e intensidad de los síntomas y el tipo de síndrome, varía de acuerdo al agente patógeno. (67)

Las cepas de *E.coli* están agrupadas en cinco categorías:

- a. *Enterotoxigena (ETEC)*
- b. *Enteropatógena (EPEC)*
- c. *Enteroinvasiva (EIEC)*
- d. *Enterohemorrágica (EHEC)*
- e. *Enteroagregativa (EAggEC)* (86)

Cada categoría tiene niveles de virulencia distintos, formas patogénicas específicas, así como síndromes clínicos y patrones epidemiológicos diferentes. Los serotipos O:H se agrupan de manera separada. (137) El número asignado al nombre del organismo describe al serotipo al que pertenece. Esto tiene como objetivo distinguir entre los diferentes subgrupos de *E.coli*. (110)

Se puede adquirir la enfermedad por medio de:

- a. Ingestión de carne no cocida
- b. Ingestión de agua contaminada
- c. Ingestión de leche bronca
- d. Contacto directo con ganado (44)
- e. Persona a persona (32,44,110,156)

El control de la transmisión de *E.coli* debe realizarse en todas las etapas del proceso de la cadena alimenticia. Desde la producción agrícola, proceso, manufactura hasta preparación de los alimentos en ambientes comerciales y domésticos. (44)

Agente etiológico	Síndrome Fiebre	infeccioso Vómitos	Síndrome Con sangre	diarreico Sin sangre	Síndrome disentérico	Duración en días
<i>E.coli</i> toxigénica		++		++		5-10
<i>E.coli</i> invasora	++	+	+		++	5-10
<i>E.coli</i> patógena	+	+	+	+		5-10

Cuadro 3.- Características clínicas según agente etiológico. (67)

2.1.3.1. E.COLI ENTEROTOXIGÉNICA (ETEC)

Estas cepas presentan multiplicación entérica sin invasión de la mucosa intestinal por medio de fimbrias especiales, (67) determinados por plásmidos con un papel importante como estructuras adhesivas (MR). Los mejores ejemplos son *Vibrio cholerae* y *E.coli*, que condicionan la enfermedad al multiplicarse en el intestino delgado y liberar una exotoxina que causa gran pérdida de líquido y electrolitos vía AMPc sin presentar alteraciones histopatológicas de la mucosa. (139)

En la actualidad se sabe que *E.coli* es productora de uno de dos tipos de toxina: una termoestable (no inmunogénica) y otra termolábil (inmunogénica), como ya se había mencionado con anterioridad, la producción de toxinas es controlada por un plásmido enterotóxico (Ent⁺) de ADN, extracromosómico y transferible, adquirido por una cepa no toxigénica en el curso de la conjugación bacteriana, lo cual origina una *E.coli* nueva enterotoxigénica. (169)

La toxina termolábil presenta muchos puntos de semejanza con la toxina del cólera:

- 1) Estimula la adenilciclase, con las mismas consecuencias
- 2) Tiene reacción cruzada inmunológica con la toxina del cólera y el coleragenoide, es decir que antiseros de toxina del cólera y coleragenoide neutralizan ambas toxinas, antiseros de colitoxina neutralizan mal la toxina del cólera, y
- 3) Ambas toxinas se ligan al gangliósido GGnSLC. Hay sin embargo algunas diferencias. *E.coli* se une también al gangliósido GM1 y al monosialogangliósido GD1b, la toxina del cólera no se une a estos receptores. Las preparaciones de colitoxina varían considerablemente de peso molecular y todavía no se han purificado debidamente. (115)

Esto se debe a la asociación de la toxina a otros materiales del filtrado de cultivo. También es menos tóxica que la toxina del cólera, incluso teniendo en cuenta la impureza de las preparaciones. (115)

Esta toxina presenta la estructura general en dos subunidades. La subunidad "B" consta de 5 fracciones idénticas (PM 56.000) que se fijan al receptor, de la membrana del enterocito, facilitando la penetración de la subunidad "A" (PM 28.000), de naturaleza enzimática, que está constituida por dos fracciones A₁ y A₂ unidas por puentes disulfuro. Presenta actividad de ADP-ribosiltransferasa, catalizando la transferencia de ADP-ribosa a la proteína reguladora N₃, que produce la activación de un fermento del receptor, la adeniliclasa, que a su vez incrementa la transformación del ATP en AMPc. (115)

Se produce una diarrea secretora constituida por un líquido isotónico con pérdida de agua, cloruros y sodio, a través del epitelio intacto, a la luz intestinal, que ocasiona deshidratación y hemoconcentración que puede llegar a la acidosis, colapso y muerte en 18-48 horas. (115)

La diferencia entre la toxina de cólera y la producida por *E.coli* es que, la primera se encuentra codificada por genes cromosómicos, mientras que la segunda se codifica por plásmidos. (115)

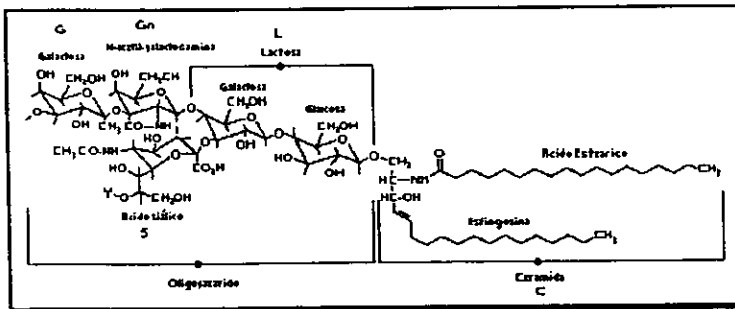


Fig. 18.- Estructura de los gangliósidos mejor conocidos; en este caso los residuos son los siguientes:

Y = H: Monosialosilgangliósido GGnSLC (GM1) (115)

Sólo las cepas de algunos serogrupos O producen estas toxinas con frecuencia (6, 8, 15, 20, 25, 63, 78, 80, 85, 115, 128, 148, 159, 167), lo que hace suponer que determinados serotipos están mejor adaptados para ser portadores de estos plásmidos. (170)

En cuanto al receptor celular para colitoxina, se ha comprobado que el gangliósido GGnSLC liga colitoxina además de toxina del cólera. Aunque ambas toxinas tengan el mismo componente activo y los componentes ligadores pueden unirse al mismo receptor, difieren en su capacidad de unión. Esto se debe a las variaciones que se encuentran en la estructura de la colitoxina, y a que ésta se asocia a otros componentes de filtrados de cultivo. Los otros componentes bloquean la capacidad de ligarse en grado variable, afectando así la toxicidad. (115)

La toxina termoestable TS está conformada de pequeños péptidos de 18 o 19 aminoácidos que se unen a receptores de superficie celular específicos (aún desconocidos) que se localizan en el borde intestinal (células del yeyuno e íleon) actuando por un mecanismo distinto. La unión entre la toxina y el receptor se realiza con una constante de afinidad de $10(9) \text{ l/mol}$, en ambos, células de yeyuno e íleon. Pero el número de receptores de toxina por célula en colon es mayor que en los ileocitos. TS activa la guanilciclase que produce un aumento de la producción de GMPc, cuya producción es estimulada por la interacción de óxido nítrico, péptidos natriuréticos y guanilín, y con su respectivo guanilato ciclase se activa la secreción a través de los canales iónicos de las células intestinales. Esto da como resultado un incremento en la secreción de sales (Cl) y agua y la aparición de una diarrea líquida inmediata y corta de duración. (38,72,154,162)

Si la toxina termoestable estimula la guanilciclase en una dosis idéntica en colon y membrana del íleon se observa sensibilidad similar y máxima respuesta. TS también inhibe el flujo neto de agua en un grado similar en ambos (-47.8 vs -48.4 $\mu\text{l.cm}$) a una dosis de 8 nmo/l. A esta dosis en el colon, en donde existe una alta absorción, ésta continúa pero a un nivel disminuido. En el caso del íleon, la toxina induce la secreción neta. De esta manera se concluye que la enterotoxina TS induce una enfermedad diarreica como resultado de una capacidad de absorción disminuida en el colon, contra una secreción de fluido aumentada en el intestino delgado. (114)

Criterios para juzgar si las toxinas son responsables de los efectos nocivos de una enfermedad infecciosa.

- 1.- El microorganismo produce una toxina.
- 2.- Las cepas virulentas producen la toxina; las avirulentas, no.
- 3.- El microorganismo produce enfermedad sin multiplicarse profusamente ni extenderse ampliamente.
- 4.- La sangre y linfa son estériles.
- 5.- Los órganos y los tejidos distantes del sitio de infección están afectados.
- 6.- La introducción de toxina estéril libre de células en animales produce síntomas que imitan la enfermedad.
- 7.- El clínico observa efectos tóxicos en el paciente: colapso vascular periférico; acción directa sobre el músculo cardíaco; compromiso del sistema nervioso central o periférico.
- 8.- La enfermedad puede prevenirse por inmunización contra la toxina (la antitoxina del cólera neutraliza la toxina de *E.coli*)

Cuadro 4.- Criterios que determinan los efectos nocivos de las toxinas. (115)

Se conoce además, otro factor de patogenicidad en algunas cepas de *E.coli* enterotoxigénica; como factor de adherencia presentan fimbrias con adhesinas MR. (170)

Esta cepa es la causa de gastroenteritis infantiles en los países en vías de desarrollo, especialmente en los menores de 2 años, con menor frecuencia en los adultos, y también de los cuadros que se presentan en los viajeros que visitan estos países (diarrea del turista). Algunos serotipos que causan la diarrea del turista son O148:H28 y O6:H16, que producen

una toxina muy semejante a la del cólera y se le conoce como “Diarrea no-Vibrio cholerae semejante a cólera”. (37,165)

Un tratamiento quimioproláctico puede dar algunos beneficios, pero presenta efectos secundarios como son ennegrecimiento de heces y lengua, comezón en la piel, candidiasis vaginal y reacciones anafilácticas. Algunos pacientes pueden presentar condiciones médicas desconocidas que pueden ser agravadas por una enfermedad diarreica como son intestino activo inflamado, diabetes mellitus y enfermedades cardíacas en ancianos. Los pacientes cuyas actividades no pueden interrumpirse, deben considerar la quimioprolaxis como la solución. (160)

2.1.3.1.1 SEROTIPO *E.coli* O169:H41

Este serotipo se ha encontrado con mayor frecuencia en Japón a partir de 1991 en alimentos contaminados, dentro de los cuales se encuentran pescados y mariscos. Además se realizan pruebas para detectar *Shigella*, *Salmonella*, *Vibrio* y *Staphylococcus* entre otras, pero *E.coli* O169:H41 se ha encontrado en la mayoría de los casos. (3)

ETEC puede ser identificada por detección de la enterotoxina en cultivo de fluido por ensayos inmunológicos o por detección de genes codificadores de enterotoxina con pruebas de DNA o amplificación de reacción en cadena de polimerasa (PCR). (3)

Es necesario realizar pruebas para la identificación de este serotipo en los restos fecales de personas que presenten síntomas como diarrea, dolor abdominal y fiebre de 38 °C, con un período de incubación de 33 horas. O169:H41 debe ser identificado con antisuero específico para esta cepa. Así mismo, para la detección de este serotipo puede realizarse una prueba de PCR para examinar la diarreogenicidad de *E.coli* aislada. La producción de ST se sometida a prueba mediante un ensayo inmunoabsorbente de enzima-ligada (EIA), ELISA para especies toxigénicas e invasivas de *E.coli*. (3)

2.1.3.2. *E.coli* ENTEROPATÓGENA (EPEC)

EPEC causa diarrea en lactantes, por lo que se le conoce como causante de “Diarrea Infantil”, pero también se aísla de niños mayores y adultos, sin que influya la presencia o ausencia de diarrea. También es la causante de diarrea acuosa o sanguinolenta, provocada por la adherencia del microorganismo y por el proceso agudo destructivo que realiza al tejido entérico. (67,169)

Los brotes por alimentos contaminados son esporádicos, pero son más frecuentes en lugares donde se realicen prácticas sanitarias pobres. Humanos, bovinos y porcinos pueden ser infectados, y los últimos se utilizan como modelos animales para experimentación. Se encuentra en alimentos contaminados como carne cruda o mal cocida y pollo, pero en general, se puede establecer en cualquier alimento que entre en contacto directo con restos fecales. (168,151)

La diarrea infantil puede ser en ocasiones, muy prolongada, lo que ocasiona deshidratación y pérdida de electrolitos, lo que puede llevar a la muerte. Este serotipo es altamente infeccioso, pero la dosis es muy baja. En adultos, la dosis es de 10^6 colonias. Su identificación se realiza por medio de estudios serológicos y ensayos de cultivo de células. (168)

Los tipos enteropatógenos se transfieren vía nosocomial en salas de maternidad y guarderías directa o indirectamente de un niño a otro, con una mortalidad elevada, producidos por determinados serotipos pertenecientes a 17 grupos O; los más frecuentes son los grupos O 26, 55, 86, 111, 119, 125, 126, 127, 128 y 142, asociados con determinados antígenos K y H. El papel etiológico es difícil de demostrar y se establece sobre la base de datos clínicos, epidemiológicos y pruebas de inoculación en voluntarios sin que se conozca su mecanismo de acción. Sin embargo, se observan lesiones histológicas características, constituidas por numerosas bacterias o microcolonias fuertemente adheridas a la mucosa con destrucción de las microvellosidades de los enterocitos sin que se produzca invasión, debido a la presencia de adhesinas MR. (170)

La infección de las células epiteliales con *EPEC* induce la fosforilación de la cadena ligera de miosina de 20 kilodalton (MLC20). La consecuencia fisiológica del largo incremento de la fosforilación de MLC20, es la perturbación de la función de barrera del epitelio intestinal, lo que contribuye a la aparición de diarrea. (168)

En estas cepas no se han detectado enterotoxinas TL o TS, pero se ha demostrado una toxina semejante a la producida por “*Shigella dysenteriae*” (verotoxina). (24)

2.1.3.3. *E.coli* ENTEROINVASORA (EIEC)

Algunas bacterias como *Shigella* y *E.coli* enteroinvasiva, son ejemplos de causantes de invasión y destrucción de la mucosa intestinal. Sin ser enterotoxigénica, esta cepa lesiona las células del intestino delgado causando diarrea por ulceración de las mismas. (169,139)

Esto puede considerarse como una infección descendente del sistema digestivo, ya que inicialmente las bacterias se localizan en el intestino delgado y posteriormente en el colon. El paciente sufre de dolor abdominal, cólico o fiebre; luego causa diarrea, seguida uno o dos días después, de datos de disentería. (139) Seguido de la ingestión de *EIEC* y la invasión a las células epiteliales se desarrolla un tipo de disentería leve que comúnmente se confunde con la producida por especies de *Shigella*, esto se debe a que en ambas se encuentran leucocitos en heces. La enfermedad se caracteriza por la presencia de sangre y moco en la materia fecal del individuo infectado. La dosis de *EIEC* que produce infección es de 10 organismos (igual que *shigella*). (151)

La diagnosis se realiza a partir del cultivo de materia fecal de un individuo infectado, y la demostración de la invasión a la mucosa se da a partir del cultivo de tejido dañado. Recientemente se han realizado pruebas genéticas para los genes invasores de *EIEC*. (151)

La disentería causada por *EIEC* ocurre entre las siguientes 12 a 72 horas de la ingestión de alimentos contaminados, este padecimiento es generalmente auto-limitante y no presenta complicaciones. (151)

Estas cepas pertenecen a los serogrupos 28, 29, 112, 124, 136, 143, 144, 152 y 164. Los más conocidos son los serogrupos 124 y 164 que se han aislado a partir de casos esporádicos y brotes epidémicos por alimentos contaminados. (170)

Con frecuencia presentan caracteres atípicos: son inmóviles, fermentan la lactosa lentamente o no la fermentan, no producen gas ni lisin-descarboxilasa (170).

2.1.3.4. *E.coli* ENTEROHEMORRÁGICA (EHEC)

Este serotipo produce "toxina semejante a *shiga*" (asociada con el síndrome urémico-hemolítico), citotoxina (verotoxina) que causa efecto citopático en células epiteliales del intestino, lo que trae como consecuencia colitis hemorrágica con dolor abdominal intenso, diarrea sanguinolenta, con o sin hipertermia. (156)

En estos casos debe tenerse especial cuidado a la hidratación y balance electrolítico, sobre todo en caso de diarrea profusa, así como establecer un régimen dietario adecuado. En todas las infecciones, la identificación del patógeno y su sensibilidad antimicrobiana son determinantes para el tratamiento, así como evitar la ingesta de alimentos de dudosa preparación higiénica. En el entorno intrahospitalario, la prevención se consigue evitando el uso de sondas, catéteres u otro tipo de material no esterilizado. (156)

2.1.3.4.1 SEROTIPO O157:H7

Estas cepas se identificaron en 1982 en Estados Unidos, donde ocasionaron brotes en diversos estados. Desde entonces se han descrito epidemias en diversos países del mundo. (86)

El serotipo O157:H7 se ha aislado con mayor frecuencia que *Shigella*. El rango de aislamiento de este serotipo entre pacientes que presentan diarrea sanguinolenta es muy alto. El número de brotes que se presentan han incrementado considerablemente, posiblemente debido a que en la actualidad se han reconocido casos reportándolos a las autoridades de salud de cada país. Las infecciones que causa este serotipo se presentan comúnmente durante los meses más cálidos (junio a septiembre). (156)

Los mecanismos por los que *E.coli* provoca el Síndrome urémico-hemolítico no se han comprendido por completo. El organismo se adhiere a las superficies mucosas y produce una o mas toxinas semejantes a *Shiga*, las cuales pueden actuar tanto local como sistemáticamente en la mucosa intestinal. La toxina semejante a *Shiga* juega un papel importante en el daño presentado en colon. Este daño permite que los lipopolisacáridos y otros mediadores inflamatorios ganen acceso a la circulación, de igual manera que los inicios del Síndrome urémico-hemolítico. Esta posibilidad se respalda al encontrar que entre pacientes con infección de *E.coli* O157:H7, el Síndrome urémico-hemolítico tiende a desarrollarse con mayor facilidad al presentarse diarrea sanguinolenta que en los que no se presenta este sintoma. (32)

2.1.3.4.1.1 SIGNOS Y SÍNTOMAS

El espectro de manifestaciones clínicas de infección por *E.coli* O157:H7 es amplio, haciendo difícil el diagnóstico. El microorganismo causa infección asintomática, diarrea acuosa, diarrea sanguinolenta, colitis hemorrágica, Síndrome urémico-hemolítico, púrpura trombocitopénica trombótica y muerte. (32)

El cuadro diarreico se presenta con deposiciones acuosas que van de leves a profusas y sanguinolentas, sin leucocitos en las heces, lo cual establece la diferencia con la shigelosis y la disentería por *EIEC*. (137)

El primer signo que se presenta es el dolor abdominal intenso. Posteriormente hay diarrea acuosa, lo que provoca la pérdida de fluidos y electrolitos en el cuerpo, éste signo tiene un tiempo de duración de un día. A partir de este momento, la diarrea se convierte en sanguinolenta, simulando una hemorragia gastrointestinal. A pesar de que la diarrea sanguinolenta es muy común en infecciones por *E.coli*, el diagnóstico debe considerarse en pacientes que no presenten sangre en heces. La infección produce llagas o heridas en el intestino, lo que da como resultado la presencia de sangre durante dos a cinco días con 10 o más movimientos entéricos diarios. (44)

Las ulceraciones pueden determinarse por estudios como la endoscopia, en donde la mucosa colónica aparece edematosa e hiperémica. Microscópicamente no se observan signos histológicos que diagnostiquen la presencia de la infección por este serotipo. Exámenes inmunocitoquímicos muestran que las células plasmáticas de la submucosa son principalmente IgG, IgA e IgM. (156)

La fiebre es, generalmente, leve, pero en la mayoría de los casos no se presenta. También puede haber náusea o vómito. (44)

2.1.3.4.1.2 ACCIÓN TOXIGENA

El agente genera citotoxinas potentes (similares a *Shiga I* y *II*) por fagos que transporta la bacteria. Estas toxinas poseen propiedades inmunológicas y fisicoquímicas diferentes. La toxina semejante a *Shiga I* tiene propiedades biológicas muy semejantes a las toxinas *Shiga* por lo que son casi indistinguibles, excepto a niveles nucleótido y proteínico. Posee también el mismo punto isoelectrico y estabildades al calor, puede neutralizarse con antisuero para purificar toxina *Shiga*. Las toxinas semejantes a *Shiga* se caracterizan por tener la misma estructura que consiste en una subunidad "A" y cinco subunidades de unión "B". Solo difieren en un aminoácido en la subunidad "A". (156) La subunidad "B" facilita

la adherencia y la subunidad A, de acción enzimática, actúa sobre los ribosomas, inhibiendo la síntesis proteica. (101)

En contraste, la toxina semejante a *Shiga II* está genéticamente relacionada pero antigénicamente distinta a la toxina I. Comparte menos del 60% de homología en su DNA y carece de neutralización cruzada por anticuerpos anti-toxina semejante a *Shiga* o toxina *Shiga*. La toxina II posee mas amplia variedad en su secuencia y antígenos. (156)

A pesar de ser diferentes, ambas toxinas comparten el mismo receptor celular y mecanismo de acción intracelular in vivo. Se unen al receptor ceramida globotriaosil, que es el mayor punto de unión de las toxinas semejantes a *Shiga* en las células Vero. La ceramida globotriaosil (Gb₃) se encuentra altamente expresado en la corteza del riñón humano y se encuentra en cultivos de células endoteliales. (156)

Es necesario hacer mención de que la toxina semejante a *Shiga II* requiere de un menor número de receptores en la célula que la toxina semejante a *Shiga I*. (40)

Existen 3 diferentes puntos de unión para la subunidad "B" (*Shiga I*) en el receptor Gb₃. El sitio de unión 2 es el primero y el principal; el sitio de unión 1 es importante pero secundario; el sitio 3 juega un papel menor en la unión, además de poseer, posiblemente, otras funciones biológicas. (102) La toxina *Shiga II* presenta dos puntos de unión por monómero con el receptor Gb₃ de la subunidad "B". (101)

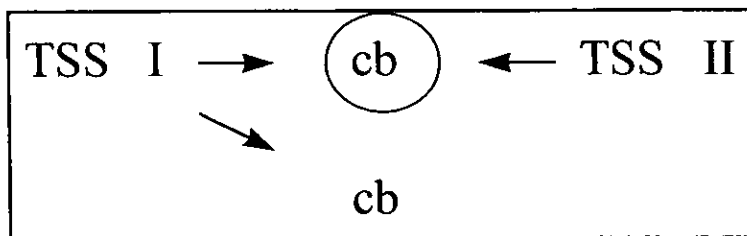


Fig. 19.- Unión de las toxinas semejantes a *shiga I* y *II* a las células humanas (40)

Se ha demostrado que al encontrarse ambas toxinas la *Shiga I*, durante la fase estacionaria, disminuye su producción mientras que *Shiga II* se mantiene en un nivel alto, esto explica la gran frecuencia con la que se asocian cepas de *E.coli* productoras de *Shiga II* con síndrome urémico-hemolítico. (159)

Estas toxinas inhiben la síntesis proteica para N-glicosidasa en un sitio específico de un residuo de adenina en la subunidad ribosomal 28s; además presentan actividades biológicas semejantes. Muestran actividad citotóxica en células Vero y HeLa en conejos. (156)

La toxina semejante a *Shiga I* presenta respuesta citotóxica directa sobre células del endotelio vascular y produce microangiopatía trombótica. Las toxinas semejantes a *Shiga* causan un decremento en la síntesis de prostaciclina y pueden dar lugar a la agregación plaquetaria. Es razonable pensar que el daño vascular del endotelio se acompaña de disminución de prostaciclina, aumento de plaquetas y exposición de subendotelio debajo del endotelio dañado. Se desencadena entonces, una cascada de eventos coagulativos dirigidos a la formación de trombos intravasculares. Cambios isquémicos precipitados por trombos plaquetas-fibrina resultan en colitis hemorrágica. De la misma manera, puede llegar a presentarse el Síndrome urémico-hemolítico y la púrpura trombocitopénica trombótica, que difieren principalmente en la distribución de las lesiones trombóticas. Los trombos plaquetas-fibrina se localizan en riñones en pacientes que presentan síndrome urémico-hemolítico, pero aparecen más diseminados en pacientes con púrpura trombocitopénica trombótica, incluyendo páncreas, corazón, cerebro y riñones. (156)

Aún no es claro cual de las dos toxinas es más virulenta, pero se ha demostrado que la toxina semejante a *Shiga II* es más letal y menos citotóxica que toxina I. (156,40) Ambas toxinas son codificadas por bacteriófagos. Algunos serotipos producen una o ambas toxinas, la ausencia de las mismas se debe a la inestabilidad de los genes codificadores para la toxina, lo que resulta en la pérdida de los mismos. (156)

Se observa un engrosamiento severo de la mucosa del colon transversal y ascendente, lo cual sugiere colitis isquémica con edema o hemorragia de la submucosa. La colonoscopia presenta colitis severa y la biopsia muestra ulceración focal. Los organismos liberan toxinas en el intestino y se absorben en la circulación, produciendo daño vascular del endotelio, subsecuentemente se observa coagulación local intravascular y depósitos de fibrina. (156)

Pacientes con colitis hemorrágica y síndrome urémico-hemolítico presentan un aumento de títulos de anticuerpos neutralizantes de toxina semejante a *Shiga*, lo que nos da a conocer el importante papel de esta toxina en la infección por *O157:H7*. El curso clínico severo que se presenta en personas mayores se debe a la ausencia de anticuerpos específicos neutralizadores. (156)

El serotipo *O157:H7* posee otros complejos factores de virulencia además de las toxinas. La producción de altos o moderados niveles de producción de toxinas presentan manifestaciones clínicas e hispatológicas similares, esto significa que las toxinas representan

un papel patógeno y sugiere que existe, por lo menos uno, factores de virulencia diferentes. *O157:H7* coloniza el intestino a través de la adherencia por fimbrias. Esta adherencia se presenta en células Henle. Grupos de *O157:H7* que no presentan fimbrias, pierden su habilidad para adherirse a las células intestinales. (156)

El agente etiológico principal es *O157:H7*, aunque intervienen otros como *O26:H11*, *O111:H8* y *O104:H21*. (86,137)

Las toxinas (verotoxina VT) se encuentran relacionadas o son idénticas a *Shigella dysenteriae*. Se les llama Verotoxinas por su efecto citotóxico en las células Vero en cultivo de tejido, pero la actividad de la toxina (receptor ceramida globotriaosil) se extiende a otras líneas celulares como HeLa, células intestinales, células endoteliales y células de linfoma Burkitt. Otros serotipos diferentes a *O157:H7* son productores de toxinas semejantes a *Shiga* y pueden ser aislados de pacientes con síndrome urémico-hemolítico o colitis hemorrágica. (156)

La mayoría de los brotes son el resultado de la transmisión del microorganismo a través del consumo de carne de res mal cocida, así como jamón, pavo, jugo de manzana (al caer éstas de los árboles sobre estiércol y luego procesarlas), leche bronca y queso. (156)

El ganado vacuno constituye el reservorio de *EHEC. O157:H7* se encuentra presente en los intestinos de ganado sano. La carne puede contaminarse durante el sacrificio de los animales, de igual manera, la transferencia de patógenos al interior de la carne, se presenta durante la molienda. (44)

Los humanos pueden también servir como reservorio para la transmisión persona a persona, sobre todo en establecimientos con alto grado de hacinamiento. (86,137)

Algunos brotes se relacionan con la ingestión de agua contaminada o no clorada, inmersión en la misma o por empleo de agua de servicio municipal sin desinfección. (32,137) De igual manera, se transmite por medio de la producción de toxinas semejantes a *Shiga* elaboradas por este microorganismo. Muchos de los casos reportados son esporádicos, pero también ocurren en institutos al cuidado de niños pequeños o en comunidades. (156)

La mejor manera de examinar la incidencia del microorganismo es realizar estudios de laboratorio en poblaciones definidas. Sin embargo el reporte de los casos se ve afectado por varios factores: la variedad y severidad de las manifestaciones clínicas; el número de personas infectadas que buscan ayuda médica; si se da la orden de realizar un cultivo de heces en el tiempo adecuado (13) (primeros 2 días de diarrea- detección del 100 %, de 3-6 primeros días- 91.7 %, 7 o más días- 3.3 %) (156) y posible empleo de antibióticos; si el

laboratorio realizó las pruebas adecuadas para la identificación del organismo; y si los resultados son reportados a las autoridades. La mayoría de los casos reportados ocurren en Estados Unidos, Canadá, Inglaterra, Australia, Japón, Argentina y Chile. (156)

El período de incubación es de 3 a 8 días, con una mediana de 3 a 4 días (137) , aunque la incubación puede ser tan corta como de un día o tan larga como de ocho días; periodos de incubación mayores a ocho días representan expansión secundaria. La eliminación del agente patógeno varía con la edad (32) , suele durar una semana o menos en adultos; sin embargo, en infantes se prolonga hasta tres semanas. No es frecuente la eliminación por períodos prolongados. (137)

La dosis infectante es desconocida pero se considera como muy baja, aproximadamente 10 organismos, al igual que *Shigella*. (39)

No es bien conocida la susceptibilidad e inmunidad a este agente. La edad avanzada aparece como un riesgo, sobre todo si está vinculada a hipoclorhidria, que puede ser un factor contribuyente a la susceptibilidad. Los infantes menores de 5 años tienen mayor riesgo de desarrollar síndromes urémico-hemolíticos. (86)

El alto rango de infección y complicaciones que se presenta en niños menores de cinco años o en ancianos sugiere que la inmunidad juega un papel importante, aunque no se sabe con exactitud si el anticuerpo para *O157* o para la toxina semejante a *Shiga* disminuye la infección. (156)

2.1.3.4.1.3 MECANISMOS DE RESISTENCIA DE *E.coli*

E.coli tiende a ser completamente sensible a todos los antibióticos y otros agentes antimicrobianos, pero su exposición a dichas sustancias causa el desarrollo de resistencia. Esta resistencia está mediada por plásmidos y cromosomas. Por medio de plásmidos, es resistente a penicilina, cefalosporina y aztreonam, en cambio, por medio de cromosomas, es resistente a la ampicilina. La mayoría de los serotipos de *E.coli* resistentes a la ampicilina producen β -lactamasas. *E.coli* tiene un número de mecanismos para desarrollar resistencia, como: (32)

- 1) El incremento en el número de genes que codifican para la producción de β -lactamasa, así como un aumento en la producción de enzimas. Si *E.coli* produce un bajo nivel de β -lactamasa, entonces el inhibidor inactiva la β -lactamasa. Si es un alto productor de β -lactamasa, entonces la cantidad de inhibidor en la célula será insuficiente para inactivar toda la β -lactamasa producida. (32)

- 2) Mutaciones que causan decrementos en la permeabilidad celular del microorganismo le confiere a *E.coli* resistencia, como el desarrollo de una girasa con estructura de subunidades alterada o por reducción del número de porinas. (32)
- 3) Algunos tipos enterotoxigénicos son capaces de transferir la resistencia a los medicamentos así como sus características toxigénicas. (32)

Una deficiencia en la estructura del lipopolisacárido hacen más susceptible a la bacteria a la actividad de quinolonas hidrofóbicas; las porinas no son el único mecanismo por medio del cual los medicamentos se internan en la célula. (32)

2.1.3.4.1.4 INFECCIÓN ASINTOMÁTICA Y DIARREA ACUOSA

- A) Casos de infección asintomática se han detectado en diferentes brotes, pero su incidencia es muy difícil de estimar puesto que no se toman muestra de heces en personas que no presentan diarrea. (156)
- B) Diarrea acuosa sin progresión a colitis hemorrágica.- los pacientes con diarrea acuosa presentan poca tendencia a desarrollar síndrome urémico-hemolítico. (156)
- C) Pacientes con diarrea acuosa que progresa a síndrome urémico-hemolítico.- los pacientes que presentan una larga duración de diarrea, dolores abdominales y vómito pueden desarrollar fácilmente el síndrome urémico-hemolítico. (156)

En algunos casos se presentan, como complicaciones:

- a. colitis hemorrágica
- b. síndromes urémico-hemolítico.- pacientes con este padecimiento tienen anemia hemolítica que es cuenta baja de células rojas.
- c. púrpura trombocitopénica trombótica.- cuenta baja de plaquetas. (104,156)
- d. fallas renales.- daño en riñones (oclusión de la microvasculatura glomerular renal por fibrina y plaquetas). (32,44,123)
- e. muerte (156)

2.1.3.4.5 COLITIS HEMORRÁGICA

Síndrome clínico que consiste en dolores abdominales, diarrea que se convierte en sanguinolenta; evidencia radiológica o endoscópica muestra edema mucoso en colon, erosión o hemorragia y ausencia de organismos entéricos convencionales en heces. (156)

La infección comienza con dolores abdominales severos, que son seguidos por diarrea acuosa, la cual progresa a diarrea sanguinolenta, escalofríos, náusea y vómito. La fiebre se presenta con más facilidad en personas con diarrea sanguinolenta, pero usualmente es leve o no se presenta. (156)

Algunos análisis como son sedimentación de eritrocitos, concentraciones electrolíticas en suero, resultados de pruebas hepáticas, protrombinas y uroanálisis presentan resultados normales. Colonoscopia sugiere enfermedad inflamatoria entérica o colitis esquémica, distensión del intestino delgado y colon ascendente. También se observa un incremento en la frecuencia y severidad de las anomalías en mucosas desde el recto. Edema, eritema, hemorragia y ulceración superficial son signos importantes. La recuperación se logra completamente después de una semana sin tratamiento específico o complicaciones. Sin embargo, se han reportado complicaciones localizadas en el epigastrio. (156)

Periodo de incubación de 1 a 9 días en brotes en comunidades, y de 1 a 14 días en una institución. La diarrea dura más en niños que en adultos, así como en personas que presentan sangre. Se realizan de 10 a 11 movimientos entéricos. En niños, se observa una cantidad de sangre de una cucharada, mientras que otros pacientes presentan hasta 4 tazas, o sangre esencialmente con poca materia fecal. (156)

No se recomienda el uso de antibióticos antes y durante la enfermedad por ser un factor de riesgo para la expansión de la enfermedad. (156)

2.1.3.4.6 SÍNDROME URÉMICO-HEMOLÍTICO

Este síndrome se caracteriza por anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia y falla renal. Muchos factores están implicados en el desarrollo de este síndrome, incluyendo genéticos, embarazo, medicamentos, toxinas, químicos, virus y bacterias. Se han identificado dos grandes subgrupos:

- a) típico (epidémico)
- b) no típico (esporádico) (156)

Los síntomas aparecen principalmente en niños pequeños y es la causa principal de falla renal en niños. El síntoma más común es diarrea acuosa o sanguinolenta, otros como dolores abdominales, vómito, fiebre, letargo y problemas respiratorios, se presentan también. Las manifestaciones iniciales gastrointestinales se confunden con colitis ulcerativa, isquémica y pseudomembranosa. Anormalidades radiográficas incluyen edema intestinal y estenosis, la sigmoidoscopia nos muestra ulceración rectal y colitis difusa. El colon ascendente muestra hemorragia y necrosis. (156)

Complicaciones gastrointestinales del síndrome urémico-hemolítico son: inflamación no específica, colitis isquémica crónica, necrosis y perforación del colon. A pesar de que las complicaciones nerviosas no forman parte de este padecimiento, pueden encontrarse rastros de estos como irritabilidad, letargo y coma. (132,156)

2.1.3.4.7 PÚRPURA TROMBOCITOPÉNICA TROMBÓTICA

Consiste en trombocitopenia, anemia hemolítica microangiopática, fiebre, falla renal y síntomas neurológicos. Se piensa que representa una forma extensiva del espectro clínico de enfermedades vasculares que produce síndrome urémico-hemolítico. El criterio de diagnóstico para este padecimiento es el mismo empleado para HUS, con adición de fiebre y déficit neurológico. En estudios postmortem se encuentran lesiones vasculares esparcidas con trombos plaquetas-fibrina. Algunos otros factores como medicamentos, toxinas, embarazo, enfermedades inmunológicas desconocidas y colitis hemorrágica son la causa de púrpura trombocitopénica trombótica. (156)

2.1.3.4.8 MUERTE

El riesgo de muerte se encuentra altamente relacionado con la edad, pacientes en edades extremas presentan un mayor riesgo de muerte así como personas con padecimientos como síndrome urémico-hemolítico, colitis isquémica y púrpura trombocitopénica trombótica. (156)

Estos padecimientos requieren atención en servicios especializados. Debido a que otras enfermedades también presentan diarrea sanguinolenta, es necesario determinar la causa de las mismas. Por esta razón se deben realizar cultivos de heces durante las primeras 48 horas después de presentarse la diarrea. (144,156)

2.1.3.4.2 *E.coli* O111

A pesar de que pertenece a *EHEC*, es un serotipo diferente a *O157*. Se ha aislado de heces fecales de terneros y ganado adulto. Debido a la dificultad de detección y la esporádica presencia en humanos provocando enfermedades, no se han realizado estudios extensos en animales. Este serotipo es semejante a otros *E.coli*, *enterobacterias* o *Salmonella*. Ninguno de estos organismos crece a una temperatura menor de 7 °C. Su crecimiento puede ser detenido al mismo pH y a la misma concentración de sal. Son sensibles al calor y su conducta contaminante es muy similar, aunque no idéntica. Sin embargo, existe evidencia de que este serotipo sobrevive más que otros en alimentos ácidos. (65)

No existen métodos específicos para la detección de este serotipo, aunque se están desarrollando. Debido a su gran similitud con otros *E.coli* es difícil diferenciarlo de *E.coli* normal. Otra complicación es el hecho de que algunos tipos de *E.coli* *O111* no pertenecen al grupo *EHEC* y por lo tanto, no producen síndrome urémico-hemolítico. No se realizan pruebas en alimentos que detecten la presencia de este microorganismo para asegurar la seguridad de los mismos. La calidad se garantiza realizando buenas prácticas de manufactura aplicadas a la industria alimenticia y previniendo el crecimiento de microorganismos patógenos. (65)

E.coli *O111* causa daño al humano por medio de organismos vivos que infectan el intestino, una vez ahí produce toxinas. Se han descrito casos de síndrome urémico-hemolítico causado por este serotipo en Australia a partir de 1995. Por esta razón es necesario que el sistema productivo empleado no solo prevenga el crecimiento de *E.coli* *O111*, sino que se logre la destrucción de los mismos al máximo, así como seguir los Puntos de Control Crítico (PCC) específicos para cada tipo de alimento. (65)

2.1.3.4.3 *E.coli* O48:H21

Serotipo perteneciente a *EHEC* que provoca síndrome urémico-hemolítico. Presenta algunos síntomas como diarrea de olor desagradable que se convierte en diarrea sanguinolenta, dolores abdominales intensos, movimientos entéricos muy frecuentes que dan lugar a la debilidad del paciente. Estas condiciones pueden progresar hasta daño renal. Puede observarse baja en el nivel de hemoglobina y plaquetas. Un estudio sanguíneo revela anemia hemolítica microangiopática con células rojas fragmentadas, por lo que el paciente requiere de hemodiálisis. (73)

El serotipo *O48:H21* demuestra toxigenicidad por pruebas como ELISA y reacción en cadena de polimerasa (PCR), con resultado positivo de toxina *Shiga I y II*. (73)

2.1.3.4.4 *E.coli* O104:H21

Las infecciones por este serotipo se confirman en base a análisis de cultivo de heces o por evidencia serológica. Se caracteriza por presentar síntomas como diarrea sanguinolenta, dolores abdominales severos, heces fecales con sangre, vómito y fiebre. En un caso presentado en Estados Unidos se encontró que el origen de la infección se dio por el consumo de leche contaminada. Al realizar pruebas microbiológicas se encuentra que la cuenta de coliformes excede los límites permitidos. La edad aproximada de los pacientes era de 36 años, por lo que no se presentaron casos más severos, como sucede en los infantes o en edad avanzada. (143)

Las manifestaciones clínicas de la infección de este brote son muy semejantes a las presentadas por *E.coli* O157:H7, a pesar de que O104:H21 no parece progresar hasta Síndrome urémico-hemolítico por tratarse de una enfermedad autolimitada, y por el factor de edad de los pacientes que la presentaron. (76)

Este serotipo es productor de toxina semejante a *Shiga II*. Después de realizarse pruebas y encontrar negativos a *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter* y *E.coli* O157:H7 de cultivos de heces, se puede confirmar la presencia de O104:H21 determinando la presencia de la toxina semejante a *Shiga II*, o encontrando colonias sorbitol-negativas en cultivo. Debido a que la mayoría de los laboratorios no cuentan con pruebas para identificar serotipos diferentes a O157:H7, generalmente estas patologías son irreconocibles, lo único plausible es encontrar la presencia de la toxina que identifique al microorganismo como *E.coli* enterohemorrágico diferente a O157:H7. (76,143)

	Enteropatógenos	Enterotoxígenos	Enterohemorrágicos	Enteroinvasivos
Cuadros	diarreas infantiles	diarreas infantiles, diarrea del turista	diarreas hemorrágicas	diarreas disenteriformes
Edad	lactantes y niños pequeños	niños y adultos	adultos y niños	adultos y niños
Países	desarrollados	en vías de desarrollo	desarrollados	diversos
Epidemiología	brotes epidémicos	casos esporádicos, brotes epidémicos	casos esporádicos y brotes epidémicos	casos esporádicos y brotes epidémicos
Grupos O más frecuentes	26, 55, 86, 111, 119, 125, 126, 127, 128	6, 8, 15, 20, 25, 63, 78, 80, 85, 115, 128, 148, 159, 167	O 157	28, 29, 42, 112, 124, 136, 143, 144, 152, 164

Adherencia	adhesinas MR	fimbrias MR (CFAI, CFAII, E ₈₇₇₅)	-----	-----
Mecanismo	enterotoxina citotóxica semejante a <i>Shigella</i>	enterotoxinas TL y/o TS, plásmidos Ent	enterotoxina citotóxica (verotoxina) S. <i>dysenteriae</i> 1	capacidad de penetración, plásmidos de 140 Mdaltos

Cuadro 5.- Características más importantes de infecciones por *E. coli*. (170)

2.1.3.5. *E. coli* ENTEROAGREGATIVA (*EAggEC*)

Se le conoce como “diarrea persistente en niños” principalmente en países en desarrollo. La diarrea con una duración tan larga como la que provoca este microorganismo es inusual en modelos causados por otros patógenos. Es semejante a *ETEC*. Se une a células Hep-2, es no invasiva y no presenta cambios histológicos. Difiere de *ETEC* en que no se adhiere uniformemente en la superficie de la mucosa, se adhiere en pequeños agregados por medio de pelos o fimbrias que reciben el nombre de AAF/I. La adherencia a células Hep-2 es una forma patogénica que presenta este serotipo y es una propiedad potencial distintiva de *EAggEC*. (119)

Presenta diarrea acuosa (aunque en algunos casos el organismo es incapaz de producir diarrea), lo que sugiere una enterotoxina implicada. (148)

No se observa fiebre, cefalea o algún otro síntoma sistémico. Para su identificación es necesario realizar pruebas de DNA para *EAggEC*, confirmando la presencia de la fimbria AAF/I y de las toxinas 108-kDa e *EAST*. (119)

No presenta producción de toxinas termolábiles, en cambio, produce una toxina termoestable llamada *EAST* (péptido de bajo peso molecular), que se encuentra asociada con la toxina termoestable de *E. coli* enterotoxigénica. *EAST* es diferente de otras toxinas termoestables de *E. coli*, a pesar de que exhibe funciones relacionadas con *ETEC*. (148)

El genotipo de *EAST* no se encuentra restringida para *EAggEC*, ya que se ha detectado su presencia en otros serotipos como *EHEC O157:H7*, *ETEC* y *EPEC*, así como en cepas de *E. coli* aisladas de niños asintomáticos. Esta toxina representa un determinante

virulento que, se encuentre o no expresado, es insuficiente para causar enfermedad si no existe un factor(es) adhesivo(s). (148)

Una segunda toxina *108-kDa* es semejante a hemolisina de *E.coli* pero no causa hemólisis, provoca poros en las células y se presenta un flujo de Ca significativo. (119)

Adherencia a células Hep-2, enterotoxina *EAST*, toxina *108-kDa*, todas o algunas de éstas son necesarias, mas no suficientes, para conferir la patogenicidad de *EAggEC*. Sin embargo, es significativo que la presencia de *AAF/I*, la habilidad de establecer colonias en el intestino humano, y la capacidad de elaborar una o más toxinas, son aparentemente insuficientes para conferir patogenicidad en adultos. (119)

El periodo de incubación es de 14.3 horas (con un rango de 7-22). En algunos casos se presenta moco en heces, pero no se observa sangre o pus; tampoco se encuentran leucocitos en residuos fecales. (119)

El mecanismo de *EAggEC* es desconocido, pero el corto periodo de incubación de la enfermedad, así como la carencia de fiebre, diarrea sanguinolenta o leucocitos en heces, sugiere una actividad más secretora que invasiva. (148)



CAPÍTULO III

IDENTIFICACIÓN DE
E.coli

CAPÍTULO III

3.1 Identificación Bioquímica

- 3.1.1 Reducción de Nitratos
 - 3.1.1.1 Medios y Reactivos
 - 3.1.1.2 Técnica e Interpretación
- 3.1.2 Agar de MacConkey
 - 3.1.2.1 Fórmula
 - 3.1.2.2 Interpretación
- 3.1.3 Agar Eosina Azul de Metileno (EMB)
 - 3.1.3.1 Fórmula
 - 3.1.3.2 Interpretación
- 3.1.4 Agar Desoxicolato-Citrato (ADC)
 - 3.1.4.1 Fórmula
 - 3.1.4.2 Interpretación
- 3.1.5 Agar ENDO
 - 3.1.5.1 Fórmula
 - 3.1.5.2 Interpretación
- 3.1.6 ONPG
 - 3.1.6.1 Medios y Reactivos
 - 3.1.6.2 Técnica e Interpretación
- 3.1.7 Indol
 - 3.1.7.1 Medios y Reactivos
 - 3.1.7.2 Técnica e Interpretación
- 3.1.8 Rojo de Metilo
 - 3.1.8.1 Medios y Reactivos
 - 3.1.8.2 Técnica e Interpretación
- 3.1.9 Prueba de Voges Proskauer
 - 3.1.9.1 Medios y Reactivos
 - 3.1.9.2 Técnica e Interpretación
- 3.1.10 KIA y TSI
 - 3.1.10.1 Principios Bioquímicos
- 3.1.11 Preparación de Caldo *E.coli* (EC)
 - 3.1.11.1 Materiales
 - 3.1.11.2 Procedimiento
- 3.1.12 Preparación del Agar Membrana Termotolerante *E.coli* (mTEC)
 - 3.1.12.1 Materiales
 - 3.1.12.2 Procedimiento
- 3.1.13 Método de Filtro Membrana para *E.coli*
 - 3.1.13.1 Filtrado de Muestras y Preparación de la Prueba
 - 3.1.13.2 Comentarios
 - 3.1.13.3 Procedimiento

- 3.1.13.4 Conteo
 - 3.1.13.4.1 Procedimiento
- 3.1.13.5 Verificación
 - 3.1.13.5.1 Procedimiento

3.2 Identificación Serológica

- 3.2.1 Inmunolectroforesis
 - 3.2.1.1 Electroforesis por Inmunoafijación
- 3.2.2 Electroinmuno-difusión
 - 3.2.2.1 Contra-inmunolectroforesis
 - 3.2.2.2 Electroinmuno-difusión Simple Unidimensional
- 3.2.3 Radioinmunoanálisis (RIA)
 - 3.2.3.1 Calibración
- 3.2.4 Análisis Inmuno-sorbente Unido a Enzima (ELISA)
 - 3.2.4.1 Método Indirecto
 - 3.2.4.2 Método de Doble Sandwich de Anticuerpo
- 3.2.5 Inmuno-fluorescencia
 - 3.2.5.1 Metodología
 - 3.2.5.2 Técnicas de Tinción
 - 3.2.5.3 Fluorescencia Cuantitativa
 - 3.2.5.4 Cuantificación
- 3.2.6 Coaglutinación
 - 3.2.6.1 Preparación de Reactivo Proteína A con la Modificación de Kronvall
 - 3.2.6.2 Preparación de Estafilococos Sensibilizados
 - 3.2.6.3 Procedimiento de Prueba
- 3.2.7 Aglutinación al Látex
 - 3.2.7.1 Realización de la Prueba
- 3.2.8 Anticuerpos Monoclonales
- 3.2.9 TECRA
 - 3.2.9.1 Procedimiento

3.3 Identificación Genética

- 3.3.1 Hibridación de DNA
 - 3.3.1.1 Prehibridación
 - 3.3.1.1.1 Protocolo
 - 3.3.1.2 Hibridación en Colonia o Directamente en Heces (Sistema ECL)
 - 3.3.1.3 Detección de Híbridos ECL Marcados
 - 3.3.1.3.1 Revelado de Película
 - 3.3.1.4 Protocolo para Hibridación de DNA en Gel Utilizando Gelbond Film
 - 3.3.1.5 Preparación en Gel y Electroforesis
 - 3.3.1.6 Preparación de Prueba

- 3.3.2 Electroforesis
 - 3.3.2.1 Buffers para Electroforesis
 - 3.3.2.1.1 Propiedades de los Sistemas Buffer TAE y TBE
 - 3.3.2.1.2 Preparación de Buffer
 - 3.3.2.1.3 Otros Sistemas Buffer
 - 3.3.2.1.4 Urea en Geles de Agarosa
 - 3.3.2.1.5 Voltaje Óptimo y Tiempos Electroforéticos
 - 3.3.2.1.6 Cargamento de DNA y Buffers
 - 3.3.2.2 Electroforesis en Gel de Agarosa
 - 3.3.2.2.1 Agarosas
 - 3.3.2.2.2 Concentraciones de Agarosa Sugeridas para Electroforesis de Proteínas
 - 3.3.2.2.3 Preparación, Carga y Electroforesis de Muestras de Proteínas
 - 3.3.2.2.4 Tinción con Azul Brillante Coomassie
 - 3.3.2.2.5 Secado y Preservación del Gel
 - 3.3.2.2.5.1 Secado por Presión
 - 3.3.2.2.5.2 Secado al Vacío
 - 3.3.2.2.6 Autoradiografía
 - 3.3.2.2.7 Fluorografía
 - 3.3.2.2.8 Electroblothing
- 3.3.3 Recuperación de Proteínas
 - 3.3.3.1 Recuperación de DNA β -Agarasa de Geles de Agarosa
 - 3.3.3.1.1 Agarosas Compatibles
 - 3.3.3.1.2 Tips
 - 3.3.3.1.3 Definición de Unidad β -Agarasa
 - 3.3.3.1.3.1 Materiales
 - 3.3.3.1.3.2 Reactivos
 - 3.3.3.1.3.3 Procedimiento para la Degradación β -Agarasa
 - 3.3.3.2 Electroseparación de DNA de Geles de Agarosa
 - 3.3.3.2.1 Agarosas Compatibles
 - 3.3.3.2.2 Tips
 - 3.3.3.2.3 Materiales
 - 3.3.3.2.4 Reactivos
 - 3.3.3.2.5 Procedimiento: Tubos para Diálisis
 - 3.3.3.2.6 Procedimiento para Electroseparación de DNA a partir de Geles de Agarosa
 - 3.3.3.3 Extracción de DNA con Feno/Cloroformo de Geles de Agarosa
 - 3.3.3.3.1 Agarosas Compatibles
 - 3.3.3.3.2 Tips
 - 3.3.3.3.3 Reactivos
 - 3.3.3.3.4 Protocolo
 - 3.3.3.4 Extracción de DNA Congelar/Presionar Modificado de Gel de Agarosa
 - 3.3.3.4.1 Agarosas Compatibles

- 3.3.3.4.2 Materiales
- 3.3.3.4.3 Reactivos
- 3.3.3.4.4 Procedimiento
- 3.3.3.5 Recuperación de DNA por Precipitación con Etanol
 - 3.3.3.5.1 Tips
 - 3.3.3.5.2 Materiales
 - 3.3.3.5.3 Reactivos
 - 3.3.3.5.4 Procedimiento
- 3.3.3.6 Otros Métodos de Recuperación a partir de Geles de Agarosa
 - 3.3.3.6.1 Electroforesis a membrana DEAE-Celulosa
 - 3.3.3.6.2 Recuperación de DNA Utilizando Burbujas de Vidrio
- 3.3.4 Southern Blotting
 - 3.3.4.1 Membranas
 - 3.3.4.2 Blotting
 - 3.3.4.3 Tiempos de blot
 - 3.3.4.4 Blots Alcalinos
 - 3.3.4.5 Otras técnicas de Blot
 - 3.3.4.6 Protocolo
 - 3.3.4.7 Preparación del Southern Blotting
 - 3.3.4.8 Procesar Southern Blotting
- 3.3.5 Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR)

3.1 IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA

Los bacilos gram-negativos pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae son los microorganismos más frecuentemente aislados en el laboratorio de microbiología clínica.(95)

La morfología observada mediante la técnica de Gram no es útil para separar a las enterobacterias de otros bacilos gram-negativos, ni para identificar especies. La morfología de las colonias desarrolladas en agar sangre es también de utilidad diagnóstica limitada pues la mayoría de las especies forman colonias color gris opaco, secas a mucoides. (95)

Todos los miembros de las Enterobacteriaceae pueden aislarse fácilmente de diversas fuentes clínicas: sangre, orina, esputo, heridas, líquidos corporales y material de abscesos. En cuanto a los microorganismos entéricos patógenos, las muestras clínicas pueden contener relativamente pocos patógenos. (95)

La clasificación de las enterobacterias está basada principalmente en la determinación de la presencia o ausencia de diferentes enzimas codificadas por el material genético del cromosoma bacteriano. Estas enzimas guían el metabolismo de las bacterias a lo largo de una de las diversas vías que pueden detectarse a través de medios especiales utilizados en las técnicas de cultivo in vitro. Los sustratos sobre los cuales estas enzimas pueden actuar se incorporan al medio de cultivo, junto con un sistema indicador que puede detectar ya sea la declinación del sustrato o la presencia de productos metabólicos específicos. Seleccionando una serie de medios que miden diferentes características metabólicas del microorganismo en estudio, es posible determinar una "huella digital" bioquímica para lograr la identificación de la especie. (95)

Con pocas excepciones, todos los miembros de la familia Enterobacteriaceae exhiben las siguientes características:

- Metabolizan la glucosa mediante fermentación
- Carecen de actividad citocromo oxidasa
- Reducen los nitratos a nitritos

El principio de fermentación de los hidratos de carbono indica que la acción de muchas especies de microorganismos sobre un sustrato hidrocarbonado produce la acidificación del medio. La fórmula de un típico medio de fermentación es:

Tripteína	10,000 g
Cloruro de sodio	5,000 g
Rojo de fenol	0,018 g
Agua destilada c.s.p.	1000 ml (95)

La tripteína es un hidrolizado de proteína (cascina) que sirve como fuente de carbono y nitrógeno, el cloruro de sodio se añade como estabilizador osmótico, y el rojo de fenol es un indicador de pH que vira al amarillo cuando el pH del medio cae por debajo de 6.8. (95)

Todas las enterobacterias desarrollan bien en este tipo de medio. La fermentación de la glucosa sigue la vía anaerobia de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), que conduce a la formación de ácido pirúvico, del cual se derivan una variedad de ácidos orgánicos. Todas las enterobacterias fermentan la glucosa por esta vía, produciendo una fermentación ácida mixta y color amarillo en el medio, si se emplea rojo de fenol como indicador de pH. (95)

En cuanto a la actividad citocromo oxidasa, todo organismo que exhibe actividad de citocromo oxidasa cuando se somete a esta prueba, se excluye de la familia Enterobacteriaceae. (95)

Muestras fecales

Porciones de la muestra se recogen cuidadosamente y se inoculan a buenos medios de placa y de enriquecimiento lo más pronto posible después de su recolección, algunos agentes etiológicos se hacen pronto menos numerosos y pueden ser ocultados por otros microorganismos.

Las pruebas de selección para cultivos fecales pueden limitarse generalmente al agar hierro triple azúcar, agar lisina-hierro y urea de Christensen, pero en áreas con frecuentes infecciones es necesario aumentar el número de pruebas. (95)

3.1.1 REDUCCIÓN DE NITRATOS

La capacidad de un organismo para reducir nitratos a nitritos es una característica importante utilizada para la identificación y diferenciación de especies de muchos grupos de microorganismos. (95,105)

Los organismos que reducen nitratos tienen la capacidad de obtener oxígeno de los nitratos para formar nitritos y otros productos de reducción. La ecuación química es:



La presencia de nitritos en el medio se detecta añadiendo α -naftilamina y ácido sulfanílico, con la formación de un colorante rojo de diazonio, p-sulfobenceno-azo- α -naftilamina. La α -naftilamina y el ácido sulfanílico son relativamente inestables, y su reactividad debe determinarse a intervalos frecuentes ensayando con organismos de control positivos y negativos. Dado que el compuesto de diazonio formado por organismos reductores de nitratos es inestable, las reacciones de color deben ser leídas dentro de un breve periodo, antes de que se produzca la decoloración. (95,105)

3.1.1.1 MEDIOS Y REACTIVOS

1.-	Caldo nitrato o agar nitrato (en pico)	
	Extracto de carne	3,0 g
	Peptona	5,0 g
	Nitrato de potasio (KNO ₃)	1,0 g
	Agar (libre de nitritos)	12,0 g
	Agua destilada c.s.p.	1000 ml
2.-	Reactivo A:	
	α -naftalinamina	5,0 g
	Acido acético (5N), 30%	1000 ml
3.-	Reactivo B:	
	Acido sulfanílico	8,0 g
	Acido acético (5N), 30%	1000 ml
		(95,105)

3.1.1.2 TÉCNICA E INTERPRETACIÓN

Inocular el medio de nitrato con un asa de cultivo puro del organismo aislado en agar e incubar a 35 °C durante 18 a 24 horas. Finalizada la incubación, añadir al medio 1 ml de reactivo A y luego 1 ml de reactivo B. Debido a que la prueba de reducción requiere tanto tiempo para ser llevada a cabo, no se utiliza comúnmente para el screening previo de esta característica en aislamientos bacterianos desconocidos. Una prueba más rápida es el empleo de tiras impregnadas en reactivo de nitrato. (95)

El desarrollo de un color rojo a los 30 segundos de añadir los reactivos indica la presencia de nitritos y representa una reacción positiva para la reducción de nitratos. La ausencia de color tras el agregado de los reactivos puede indicar que los nitratos no han sido reducidos o que han sido reducidos a productos distintos de los nitritos, como amoniaco, nitrógeno molecular (desnitrificación), óxido nítrico (NO) u óxido nítrico (N₂O), e hidroxilamina. Dado que los reactivos detectan sólo nitritos, este último proceso llevaría a una lectura falsa negativa. Por lo tanto, es necesario añadir una pequeña cantidad de polvo de zinc a todas las reacciones negativas. Los iones zinc reducen los nitratos a nitritos, y el

desarrollo de un color rojo tras agregar polvo de zinc indica la presencia de nitratos residuales y confirma la reacción negativa verdadera. (105)

Medios de aislamiento primario utilizados para la recuperación de enterobacterias:

Agar de MacConkey	
Agar Eosina Azul de Metileno (EMB)	
Agar Desoxicolato-citrato (ADC)	
Agar Endo	(95)

3.1.2 AGAR DE MACCONKEY

Este es un medio diferencial para la selección y recuperación de enterobacterias y bacilos gram-negativos entéricos relacionados. Las sales biliares y el cristal violeta inhiben el desarrollo de bacterias gram positivas y de algunas gram-negativas exigentes. La lactosa es el único hidrato de carbono. Las bacterias fermentadoras de lactosa forman colonias de diferentes tonos de rojo debido al viraje del indicador rojo neutro (rojo a pH menor de 6.8) por la producción de ácidos mixtos. Las colonias no fermentadoras de lactosa aparecen incoloras o transparentes. (95,108)

3.1.2.1 FÓRMULA

Peptona	17,000	g
Polipeptona	3,000	g
Lactosa	10,000	g
Sales biliares	1,500	g
Cloruro de sodio	5,000	g
Agar	13,500	g
Rojo neutro	0,030	g
Cristal violeta	0,001	g
Agua destilada c.s.p.	1000	l

pH final = 7,1 (95)

3.1.2.2 INTERPRETACIÓN

Los fermentadores fuertes de lactosa, como *E.coli*, forman colonias rojas rodeadas de una zona de bilis precipitada. Los fermentadores débiles, forman colonias incoloras o transparentes. (95,108)

3.1.3 AGAR EOSINA AZUL DE METILENO (EMB)

Medio diferencial utilizable en lugar del agar MacConkey para aislar y detectar enterobacterias o bacilos coliformes relacionados en muestras con bacterias mixtas. Los colorantes de anilina (eosina y azul de metileno) inhiben a las bacterias gram-positivas y a las gram-negativas exigentes. También se combinan precipitando a pH ácido, actuando como indicadores de producción de ácidos. El agar EMB de Levine, con lactosa solamente, da reacciones paralelas a las del agar de MacConkey; la fórmula modificada detecta también fermentadores de sacarosa. (95)

3.1.3.1 FÓRMULA

Peptona	10,000 g
Lactosa	5,000 g
Sacarosa	5,000 g
Fosfato dipotásico	2,000 g
Agar	13,500 g
Eosina	0,400 g
Azul de metileno	0,065 g
Agua destilada c.s.p.	1000 l

pH final = 7.2 (95)

3.1.3.2 INTERPRETACIÓN

Los fermentadores fuertes de lactosa, sobre todo *E.coli*, producen colonias color negro verdoso con brillo metálico. Los productores más débiles, forman colonias violetas, en cambio, los no fermentadores presentan colonias transparentes. En caso de encontrarse cepas no fermentadoras de lactosa pero fermentadoras de sacarosa, se observarán colonias transparentes en agar EMB Levine y violetas a negras en la fórmula modificada. (95)

3.1.4 AGAR DESOXICOLATO-CITRATO (ADC)

Medio diferencial utilizado para aislar enterobacterias a partir de cultivos mixtos. El medio tiene alrededor de 3 veces mayor concentración de sales biliares (desoxicolato de sodio) que el agar MacConkey. Los citratos sódico y férrico retardan el desarrollo de *E.coli*. La lactosa es el único hidrato de carbono y el indicador de pH rojo neutro detecta la producción de ácido. (95)

3.1.4.1 FÓRMULA

Carne, infusión	375,00 g
Peptona	10,00 g
Lactosa	10,00 g
Citrato de sodio	20,00 g
Citrato férrico	1,00 g
Desoxicolato de sodio	5,00 g
Agar	17,00 g
Rojo neutro	0,02 g
Agua destilada c.s.p.	1,00 l

pH final = 7.3 (95)

3.1.4.2 INTERPRETACIÓN

Todas las bacterias gram-positivas son inhibidas. Las colonias de *E.coli* son pequeñas y de color rojo intenso. Los productores más débiles de ácido forman colonias algo mucoides, incoloras con centro rosa claro. Los no fermentadores forman colonias incoloras. (95)

3.1.5 AGAR ENDO

Medio empleado para aislar coliformes y otros microorganismos entéricos en muestras clínicas o materiales de importancia sanitaria como agua, leche y otros alimentos. El sulfito de sodio y la fuscina básica inhiben el desarrollo de bacterias gram-positivas. La producción de ácido a partir de lactosa no se detecta por un cambio de pH, sino por la reacción del producto intermedio, el acetaldehído, que es fijado por el sulfito de sodio. (95)

3.1.5.1 FÓRMULA

Fosfato de potasio	3,5 g
Peptona	10,0 g
Agar	15,0 g
Lactosa	10,0 g
Sulfito de sodio	2,5 g
Fuscina básica	0,5 g
Agua destilada c.s.p.	1,0 l

pH final = 7,4 (95)

3.1.5.2 INTERPRETACIÓN

Las colonias fermentadoras de lactosa aparecen color rosa a rojo. Los fuertes productores de ácido, como *E.coli*, pueden teñir el medio que rodea a las colonias o producir un brillo metálico por reacción con la fuscina básica. Los no fermentadores de lactosa forman colonias incoloras o de color débilmente rosado, casi semejante al del medio. (95,105)

3.1.6 ONPG

El ortonitrofenil galactósido (ONPG) es estructuralmente similar a la lactosa, salvo que la glucosa ha sido sustituida por el ortonitrofenilo. (95,105)

Por acción de la β -galactosidasa, el ONPG se hidroliza desdoblándose en dos residuos, galactosa y ortonitrofenol. El ONPG es un compuesto incoloro; el ortonitrofenol es amarillo, lo cual provee una evidencia visual de la hidrólisis. (95,105)

Las bacterias fermentadoras de lactosa poseen permeasa y β -galactosidasa, dos enzimas requeridas para la producción de ácido en la prueba de fermentación de lactosa. La permeasa es necesaria para que la molécula de lactosa penetre en la célula bacteriana, donde la β -galactosidasa puede desdoblar la unión galactósido, produciendo glucosa y galactosa. Los no fermentadores de lactosa carecen de ambas enzimas y son incapaces de producir ácido a partir de lactosa. Algunas especies bacterianas aparecen como no fermentadoras de lactosa pues carecen de permeasa pero sí tienen β -galactosidasa y dan una prueba de ONPG positiva. Los llamados fermentadores tardíos de lactosa pueden demorar en producir ácido a partir de lactosa debido a una lenta actividad de permeasa. En estos casos una prueba de

ONPG positiva puede proveer una identificación rápida de los fermentadores tardíos. (95,105)

3.1.6.1 MEDIOS Y REACTIVOS

1. Buffer de fosfato de sodio, 1 M, pH 7
2. O-nitrofenil- β -galactósido (ONPG), 0,75 M,
3. Solución fisiológica
4. Tolueno (95,105)

3.1.6.2 TÉCNICA E INTERPRETACIÓN

Las bacterias desarrolladas en un medio con lactosa producen óptimos resultados en la prueba de ONPG. Emulsificar una asa cargada de desarrollo bacteriano en 0,5 ml de solución fisiológica hasta producir una suspensión abundante. Añadir a dicha suspensión una gota de tolueno y mezclar enérgicamente unos segundos para liberar la enzima de las células bacterianas. Añadir a la suspensión igual cantidad de solución buffer de ONPG y colocar la mezcla en baño de agua a 37 °C. (95,105)

La velocidad de la hidrólisis del ONPG a ortonitrofenol puede ser elevada en algunos organismos, produciéndose una reacción que se visualiza por la aparición de un color amarillo en 5 a 10 minutos. La mayoría de las pruebas son positivas en una hora; sin embargo, las reacciones no se deben interpretar como negativas antes de las 24 horas de incubación. El color amarillo suele ser bien definido e indica que el organismo ha producido ortonitrofenol a partir del sustrato ONPG por acción de la β -galactosidasa. (95,105)

3.1.7 INDOL

El indol es un bencilpirrol, uno de los productos de degradación metabólica del aminoácido triptófano. Las bacterias que poseen la enzima triptofanasa son capaces de hidrolizar y desaminar el triptófano con producción de indol, ácido pirúvico y amoníaco. La producción de indol es una característica importante para la identificación de muchas especies de microorganismos, siendo especialmente útil para diferenciar *Escherichia coli* de miembros del grupo *Klebsiella-Enterobacter*. (95,105)

La prueba de indol está basada en la formación de un complejo de color rojo cuando el indol reacciona con el grupo aldehído del p-dimetilaminobenzaldehído. Este es el principio activo de los reactivos de Kovac y Ehrlich. Se debe utilizar un medio rico en triptófano. En la práctica se emplean medios combinados tales como sulfuro-indol-movilidad (SIM), movilidad-indol-ornitina (MIO) o indol-nitrato. Las pruebas rápidas realizadas con tiras de papel filtro impregnadas con reactivo de Kovac son útiles para el screening de bacterias que son productoras veloces de indol. (95,105)

3.1.7.1 MEDIOS Y REACTIVOS

- 1.- Caldo triptófano (triptófano al 1%)
 - Peptona o digerido pancreático de caseína (tripteína) 2,0 g
 - Cloruro de sodio 0,5 g
 - Agua destilada 100 ml

 - 2.- Reactivo de Kovac
 - Alcohol amílico e isoamílico puro 150 ml
 - p-dimetilaminobenzaldehído 10,0 g
 - HCl concentrado 50 ml

 - 3.- Reactivo de Ehrlich
 - p-dimetilaminobenzaldehído 2,0 g
 - Alcohol etílico absoluto 190 ml
 - HCl concentrado 40 ml
- (95,105)

3.1.7.2 TÉCNICA E INTERPRETACIÓN

Inocular caldo triptófano (u otro medio con triptofano) con el microorganismo e incubar a 35 °C durante 18 a 24 horas. Al finalizar este período, añadir 5 gotas de reactivo por la pared interior del tubo. Si se emplea reactivo de Ehrlich, este paso debe ser precedido por la adición de 1 ml de cloroformo. Esto no es necesario con el reactivo de Kovac. (105)

El desarrollo de un vivo color rojo fucsia en la interfase del reactivo y el caldo (o en la capa de cloroformo) segundos después de añadir el reactivo, indica la presencia de indol y una prueba positiva. (95)

3.1.8 ROJO DE METILO

El rojo de metilo es un indicador de pH con un intervalo entre 6,0 (amarillo) y 4,4 (rojo). El pH al cual el rojo de metilo detecta ácido es considerablemente menor que el de otros indicadores utilizados en medios de cultivo bacteriológico. Por ende, a fin de provocar un cambio de color, el microorganismo en estudio debe producir grandes cantidades de ácido a partir del substrato hidrocarbonado que emplea. (105)

La prueba del rojo de metilo es cuantitativa para la producción de ácido y requiere organismos positivos que produzcan ácidos fuertes (láctico, acético, fórmico) a partir de glucosa, por la vía de la fermentación ácida mixta. Dado que son muchas las especies de enterobacterias que pueden producir cantidades suficientes de ácidos fuertes detectables con indicador rojo de metilo durante las fases iniciales de la incubación, sólo se consideran rojo de metilo positivos aquellos organismos que pueden mantener este pH bajo luego de una incubación prolongada (48-72 horas), contrarrestando el sistema estabilizador de pH del medio. (95)

3.1.8.1 MEDIOS Y REACTIVOS

El medio más comúnmente utilizado es el caldo rojo de metilo-Voges-Proskauer (RM/VP), según la fórmula de Clark y Lubs. Este medio sirve también para la ejecución de la prueba de Voges-Proskauer. (95)

Caldo RM/VP

Polipeptona	7,0 g
Glucosa	5,0 g
Fosfato dipotásico	5,0 g
Agua destilada c.s.p.	1,0 l
pH final = 6.9	

Indicador de pH rojo de metilo

Rojo de metilo, 0,1 g, en 300 ml de etanol al 95%.
Agua destilada, 200 ml. (95,105)

3.1.8.2 TÉCNICA E INTERPRETACIÓN

Inocular el caldo RM/PV con un cultivo puro del microorganismo. Incubar el caldo a 35 °C durante 48 a 72 horas (no menos de 48 horas). Finalizando este período, añadir directamente al caldo 5 gotas del reactivo rojo de metilo. (95,105)

El desarrollo de un color rojo estable en la superficie del medio indica que la producción de ácido es suficiente como para bajar el pH a 4,4 y es una prueba positiva. Dado que otros organismos pueden producir cantidades menores de ácido a partir del sustrato, es posible el desarrollo de un color naranja intermedio entre el amarillo y el rojo. Esto no indica una prueba positiva. (95,105)

3.1.9 PRUEBA DE VOGES PROSKAUER

La reacción de Voges-Proskauer recibe el nombre de dos microbiólogos que trabajaron a comienzos del siglo XX, siendo los primeros en observar la reacción de color rojo producida en medios de cultivo apropiados por tratamiento con hidróxido de potasio. Posteriormente se descubrió que el principio activo formado en el medio por metabolismo bacteriano es el acetilmetilcarbinol, un producto de la vía butilenglicol. (95,105)

El ácido pirúvico, componente fundamental en la degradación fermentativa de la glucosa, es metabolizado luego a través de varias vías, de acuerdo con los sistemas enzimáticos que poseen las diferentes bacterias. Una de dichas vías lleva a la producción de acetoína (acetilmetilcarbinol), un subproducto de reacción neutra. Los organismos tales como los miembros del grupo *Klebsiella-Enterobacter* producen acetoína como principal subproducto del metabolismo de la glucosa y forman cantidades menores de ácidos mixtos. En presencia de oxígeno atmosférico y de hidróxido de potasio al 40%. La acetoína se convierte en diacetilo y el α -naftol actúa como catalizador para revelar un complejo color rojo. (95,105)

3.1.9.1 MEDIOS Y REACTIVOS

Medios:

Caldo RM/VP

Reactivos:

1.- α -naftol (5%)	5,0 g	
Alcohol etílico absoluto	100 ml	
2.- Hidróxido de potasio (40%)	40,0 g	
Agua destilada c.s.p.	100 ml	(95)

3.1.9.2 TÉCNICA E INTERPRETACIÓN

Inocular un tubo de caldo RM/VP con un cultivo puro de microorganismo. Incubar durante 24 horas a 35 °C. Al finalizar este período, transferir 1 ml de caldo a un tubo de ensayo limpio. Añadir 0,6 ml de α -naftol al 5% y 0,2 ml de KOH al 40%. Es esencial adicionar los reactivos en ese orden. Agitar el tubo cuidadosamente para exponer el medio al oxígeno atmosférico y dejarlo reposar durante 10 a 15 minutos. (95,105)

Una prueba positiva está indicada por el desarrollo de un color rojo a los 15 minutos de añadir los reactivos, revelando la presencia de diacetilo, producto de oxidación de la acetoína. La prueba no debe leerse luego de más de 1 hora., ya que cultivos de Voges-Proskauer negativos pueden producir un color cobrizo, con la consecuente posibilidad de una interpretación falsa positiva. (95,105)

3.1.10 KIA Y TSI

El agar hierro de Kligler (KIA) y el agar triple azúcar hierro (TSI) son virtualmente indispensables para la identificación de bacilos gram-negativos recuperados en medios de aislamiento primario. Los patrones de reacción son parte integrante de muchos esquemas de identificación de enterobacterias y sirven también para su valioso control de calidad para la confirmación de las reacciones observadas en otros medios en estudio. (95,105)

La función original del agar doble azúcar era detectar la producción de ácido y gas a partir de dextrosa y lactosa en un único medio. Kligler añadió sulfato ferroso y tiosulfato de sodio a la fórmula a fin de detectar la producción de gas H₂S. Las fórmulas de KIA y TSI son idénticas, salvo en que el TSI contiene 10 g por litro de sacarosa además de glucosa y lactosa (triple azúcar). La fórmula de KIA es:

Agar hierro de Kligler

Extracto de carne	3,000 g
Extracto de levadura	3,000 g
Peptona	15,000 g
Proteosa peptona	5,000 g
Lactosa	10,000 g
Glucosa	1,000 g
Sulfato ferroso	0,200 g
Cloruro de sodio	5,000 g
Tiosulfato de sodio	0,300 g

Agar	12,000 g
Rojo fenol	0,024 g
Agua destilada c.s.p.	1,000 l

pH final = 7,4

(95)

La incorporación de cuatro compuestos proteicos, extracto de carne, extracto de levadura, peptona y proteosa peptona, hace que el KIA y el TSI sean muy ricos desde el punto de vista nutritivo, y la falta de inhibidores permite el desarrollo de todas las especies bacterianas salvo las más exigentes (excluyendo las anaerobias obligadas). El KIA y el TSI sólo pueden usarse para analizar una única especie bacteriana tomada de una sola colonia aislada en placas de agar primario o selectivo. La lactosa está presente en una concentración 10 veces mayor que la glucosa (la reacción sacarosa a glucosa) es también de 10:1 en el TSI). El sulfato ferroso como detector de H₂S, es algo menos sensible que otras sales férricas o ferrosas, por lo tanto puede haber discrepancias en las lecturas de H₂S entre el KIA y el TSI y otros medios analíticos. El indicador rojo fenol es amarillo a un pH menos de 6,8. Puesto que el pH final del medio está estabilizado a 7,4, la producción de cantidades relativamente pequeñas de ácidos provocan un cambio visible de color. (95)

El agar debe prepararse en “pico de flauta”. Esta configuración determina que haya esencialmente dos cámaras de reacción dentro del mismo tubo. La porción inclinada, expuesta en toda su superficie al oxígeno atmosférico, es aerobia; la porción inferior, llamada “fondo” o “profundidad”, está protegida del aire y es relativamente anaerobia. Al preparar los medios es importante que el pico y el fondo tengan la misma longitud de aproximadamente 3 cm cada uno, a fin de conservar este efecto de las dos cámaras. (95)

Los tubos de KIA y TSI se inoculan con un alambre recto. La colonia, aislada en placa de agar, se toca con el extremo del alambre, con el cual se atraviesa la parte profunda del tubo. Es importante que la línea de siembra no se extienda a más de 3 a 5 mm del fondo del tubo, a fin de evitar la entrada de aire en la parte profunda y una alteración en el medio anaerobio. Tras retirar el alambre del fondo, se estria el pico con un movimiento hacia y uno y otro lado. Los tubos inoculados se colocan en una incubadora a 35 °C durante 18 a 24 horas. (95)

3.1.10.1 PRINCIPIOS BIOQUÍMICOS

La porción inclinada del tubo que está expuesta al oxígeno atmosférico, tiende a tornarse alcalina por la descarboxilación oxidativa de proteínas, proteosas y aminoácidos del medio. Por acción aceleradora de las bacterias que desarrollan en el pico, se forman aminas a partir de estos derivados proteicos, y la porción inclinada tiende a permanecer alcalina y de color rojo. En el fondo del tubo, donde no hay oxígeno, la degradación proteica es mínima y

se pueden detectar incluso pequeñas cantidades de ácido por la aparición de un color amarillo. (105)

Las bacterias que utilizan lactosa (lactosa y/o sacarosa en el TSI) producen en el KIA cantidades relativamente grandes de ácido debido a la mayor concentración de lactosa (10:1 mayor que la de glucosa) en el medio. Esta cantidad de ácido es suficiente para superar la reacción alcalina desarrollada en el pico, y todo el tubo permanece de color amarillo. Las reacciones ácido/ácido, por ende, son indicativas de organismos fermentadores de lactosa. (95.105)

Otros medios empleados para la identificación de *E.coli* son:

3.1.11 PREPARACIÓN DE CALDO *E.coli* (EC)

3.1.11.1 MATERIALES

1. Matraz de 1 lt.
2. Agitador magnético.
3. Parrilla/Agitador.
4. Medio EC deshidratado.
5. Balanza Mettler PC 400.
6. Papel 4" x 4".
7. 108 tubos para prueba 16 mm x 125 mm con metal.
8. 108 viales de fermentación.
9. 2 tubos para prueba.
10. Pipetas Oxford Macro. (83)

3.1.11.2 PROCEDIMIENTO

1. Disolver 18.5 g de medio EC deshidratado en 500 ml de agua destilada.
2. Cubrir el matraz con papel aluminio.
3. Calentar suavemente en la parrilla con agitación para la completa disolución del medio.
4. Utilizando la pipeta, vertir 8 ml en cada tubo de prueba.
5. Colocar un vial de fermentación invertido en cada tubo.
6. Colocar las porciones de metal en los tubos.

7. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121 °C.
8. Etiquetar los tubos y guardar en el refrigerador. (83)

3.1.12 PREPARACIÓN DEL AGAR MEMBRANA TERMOTOLERANTE *E.coli* (*m TEC*)

3.1.12.1 MATERIALES

1. Matraz de 1 lt.
2. Agitador magnético.
3. Parrilla/Agitador.
4. Agar deshidratado *mTEC*.
5. Balanza Mettler PC 400.
6. Papel 4" x 4".
7. Pre-esterilizar cajas de petri de plástico de 50 x 9 mm.
8. Baño de agua a 45-46 °C. (83)

3.1.12.2 PROCEDIMIENTO

1. Disolver 11.32 g de agar *mTEC* deshidratado en 250 ml de agua destilada.
2. Cubrir el matraz con papel aluminio
3. Escribir los datos sobre el aluminio.
4. Calentar hasta que hierva mientras se agita para disolver completamente el agar.
5. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121 °C.
6. Enfriar en baño de agua.
7. Vaciar 5-6 ml de agar en cada caja de petri.
8. Cubrir las cajas con papel aluminio y etiquetar.
9. Enfriar a temperatura ambiente.
10. Almacenar en el refrigerador. (83)

3.1.13 MÉTODO DE FILTRO MEMBRANA PARA *E.coli*

3.1.13.1 FILTRADO DE MUESTRAS Y PREPARACIÓN DE LA PRUEBA.

1. Membrana termotolerante para *E.coli* (*mTEC*).
2. Plato de urea.
3. Filtros y ensamble de trampa de vacío.
4. Pipetas disponibles (1 o 10 ml).
5. Unidad de filtración de membrana (base del filtro y embudo).
6. Unidad esterilizadora de UV.
7. Pinzas para el manejo de los filtros.
8. Etanol en un vaso de precipitado de 10 ml.
9. Filtros membrana estériles con rejilla, 47 mm diámetro, con tamaño de poro de $0.45 \pm 0.02 \mu\text{m}$.
10. Baño de agua a $44.5 \pm 0.2 \text{ }^\circ\text{C}$. (83)

3.1.13.2 COMENTARIOS.

Generalmente, los matraces con filtro y los tubos de conexión se encuentran armados y sólo es necesario conectar el vacío y los embudos. Si no, montar el aparato de filtración de la siguiente manera:

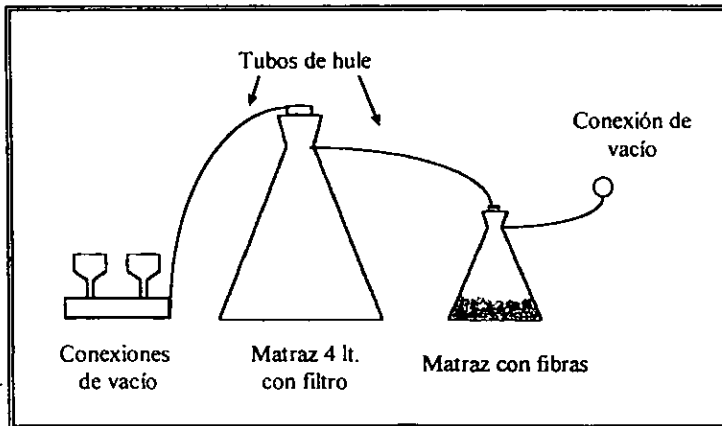


Fig. 20.- Muestra del equipo montado para la realización del método de filtro membrana para *E.coli*. (83)

El matraz más pequeño, que tiene como función mantener el agua fuera del sistema de vacío, debe contener fibras en su interior; éstas evitarán el borboteo en caso de ocurrir un sobreflujo. (83)

3.1.13.3 PROCEDIMIENTO

1. Colocar un filtro membrana estéril con la rejilla hacia arriba en la base del filtro y conectar un embudo a la base.
2. Agitar la muestra vigorosamente aproximadamente 25 veces.
3. Medir el volumen deseado de muestra o diluyente al embudo utilizando pipetas de 1 ml o de 10 ml. Seleccionar el volumen de la muestra basándose en el nivel de contaminación esperado, para producir 20-80 colonias de *E.coli*. Filtrar el mayor volumen posible para obtener resultados más precisos. (83)

Volúmenes de muestra sugeridos para la prueba de coliformes totales por filtro membrana:

Agua para beber	100 ml	
Piscinas	100 ml	
Pozos y manantiales	100, 50 ml	
Lagos y estanques	100, 50, 10 ml	
Surtir agua por tuberías	50, 10, 1 ml	
Agua para ducha	50, 10, 1 ml	
Agua de río	1, 0.1, 0.01 ml	
Agua de lluvia	1, 0.1, 0.01 ml	
Agua residual clorinada	1, 0.1, 0.01 ml	
Agua residual	0.1, 0.01, 0.001 ml	(83)

En caso de turbiedad, disminuir el tamaño de la muestra o diluir la misma para minimizar densidades bacterianas altas.

4. Filtrar la muestra y lavar los lados del embudo al menos dos veces con 20-30 ml de agua estéril.
5. Apagar el vacío y remover el embudo de la base del filtro utilizando pinzas estériles.

Para esterilizar las pinzas, colocarlas en un vaso de precipitado que contenga etanol. Sacudir los residuos de etanol de las pinzas antes de tomar el filtro membrana.

6. Colocar el filtro, rejilla hacia arriba, en una caja de petri con agar mTEC.

Girar la membrana en el medio, si aparecen burbujas entre la membrana y el agar, montar de nuevo la membrana.

7. Cerrar la caja, invertir e incubar a 35 ± 2 °C durante 2 horas. (83)

8. Para más de una muestra, descontaminar el embudo utilizando esterilizador UV. 2 minutos de exposición son suficientes antes de filtrar la siguiente muestra.

Abrir el esterilizador UV y encenderlo. Colocar el embudo de lado y cerrar la tapa. No apagar el switch hasta terminar todas las muestras. La unidad se encenderá o apagará según se abra o cierre la tapa.

9. Posterior a la incubación, transferir las cajas a bolsas, sellar y colocar las cajas invertidas a un baño de agua a 44.5 ± 2 °C durante 24 horas.
10. Después de la incubación, colocar almohadillas absorbentes en una caja de petri saturada con caldo de urea.
11. Incubar por 15-20 minutos a temperatura ambiente. (83)

3.1.13.4 CONTEO

1. Aparato de conteo manual.
2. Microscopio de disección con fuente de luz. (83)

3.1.13.4.1 PROCEDIMIENTO

1. Con la ayuda de un contador manual de colonias, contarlas con ayuda del microscopio de disección y la fuente de luz blanca fluorescente directamente de la parte superior; los rayos de luz deben caer de manera perpendicular sobre el filtro. La colonia típica es amarilla a café-amarillenta. (83)

Para membranas contables con 20-80 colonias y no más de 200:

$$\text{Cuenta/100ml} = \frac{\text{Colonias de } \underline{E.coli} \text{ contadas} \times 100}{\text{ml de muestra filtrada}} \quad (83)$$

Para membranas contables con 80-200 colonias de *E.coli* y no más de 200: utilizar la cuenta del volumen menor de filtración, calculada como se menciona, y reportada como > o = a la cuenta/100 ml. (83)

Para membranas con más de 200 colonias: reportar como "cuenta estimada. Para muestras verificadas: ajustar la cuenta inicial basándose en el porcentaje de verificación positivo y reportar como "cuenta verificada por cada 100 ml".

Colonias incontables (sobreposición o esparcimiento): muestras a analizar con métodos MPN. (83)

3.1.13.5 VERIFICACIÓN

1. Asa para inocular.
2. Mechero Bunsen.
3. Nutrientes inclinados (10 tubos por muestra a verificar).
4. Caldo de soya triptico (10 tubos por muestra a verificar).
5. Reactivo oxidasa.
6. Agar Citrato de Simmons (10 tubos por muestra a verificar).
7. Caldo triptona (10 tubos por muestra a verificar).
8. Reactivo de Kovacs.
9. Caldo de *E.coli* (10 tubos por muestra a verificar). (83)

3.1.13.5.1 PROCEDIMIENTO

1. Utilizando un asa estéril, de cada muestra verificada, transferir 10 colonias bien aisladas a un tubo TSB y a un agar nutriente inclinado. Incubar el caldo e inclinar durante 24 horas.
2. Después de la incubación, transferir una asada de material de cara tubo de caldo a:
 - SCA; incubar a 35 °C durante 24 horas.
 - Tubo TB; incubar a 35 °C durante 48 horas.
 - Tubo con caldo *EC*; incubar a 44.5 °C en baño de agua durante 24 horas. (83)
3. Posterior a la incubación, si hay crecimiento en el agar, realizar la prueba de oxidasa, que consiste en los siguientes pasos:
 - Sostener el gotero del reactivo con la punta lejos del cuerpo, presionar suavemente.
 - Administrar dos o tres gotas.
 - Una reacción positiva un color rosa que se convierte en marrón, para finalmente, presentar un color púrpúreo. (83)
4. Una vez incubado, si hay crecimiento, realizar la prueba de indol.
5. Las colonias de *E.coli* se confirman si:
 - *EC* es positiva (presencia de gas)
 - Oxidasa negativo
 - Indol positivo
 - No crecimiento en el citrato de Simmons. (83)

3.2 IDENTIFICACIÓN SEROLÓGICA

Para la clasificación de *E.coli* enteropatógena hay que determinar el antígeno O y la variedad B del antígeno K. Puesto que el antígeno B enmascara la aglutinabilidad O de los cultivos vivos, es necesario hervir el cultivo antes que se puedan determinar los antígenos O. Los antisueños OB contienen aglutininas para los antígenos O y para los B; los antisueños O se emplean sólo cuando el antígeno B ha sido destruido por el calentamiento. (158)

Una gota de antisuero polivalente se coloca en una placa, y un toma de asa pequeña del cultivo inclinado en agar emulsiona en el suero para obtenerse una suspensión homogénea. Luego se hace rotar la placa durante 1 a 2 minutos y se observa la aglutinación macroscópicamente. La aglutinación ha de ser rápida e intensa. Si es positiva, se emplearán antisueños OB individuales. Si se observa una aglutinación intensa en los antisueños polivalentes o en cualquiera de los serotipos individuales, puede hacerse un informe preliminar sobre la presencia de *E.coli*. (158)

Si hay una aglutinación positiva en el antisuero OB, hay que determinar el antígeno O. Esto puede lograrse calentando primero la suspensión salina del cultivo durante 30 minutos a 100 °C, añadiendo formalina al 0.5 %. Después se realizan diluciones séricas del antisuero específico en tubos de ensaye pequeños, de manera que se obtengan una serie de dilución de 1:20 a 1:2.560 en 0.5 ml de solución salina. Estas diluciones dependen del título original del antisuero. A cada una de estas diluciones se añaden 0.5 ml de la suspensión, después de lo cual se incuban los tubos a 48 o 50 °C durante 16-18 horas. Los cultivos que den aglutinación en diluciones, se considera que tienen el mismo antígeno O que el antisuero correspondiente. Si no se ve una aglutinación neta excepto en las diluciones bajas, considérese como negativo para el antígeno O en cuestión. (158)

También se pueden determinar los antígenos O por la prueba del portaobjetos, pero se comprueba siempre el resultado mediante el procedimiento de agar inclinado en tubo. (158)

Los antisueños para antígenos O se preparan por la inyección de cultivos lisos calentados a 100 °C durante 2.5 horas o a 121 °C durante 2 horas para inactivar sus antígenos K y H. En la preparación de antisueños K, se usan para inyectar a animales cultivos tratados con formalina o vivos de formas K seleccionados de placas de agar. En lo posible, deben usarse cepas no móviles para la producción de antisuero K los antisueños H se producen con cultivos de bacterias pasadas varias veces por agar semisólido para aumentar el desarrollo del antígeno H. (51)

Los antígenos K de los cultivos de *E.coli* son una clase compuesta por lo menos de tres variedades llamadas L, A y B. Todas las variedades son antígenos de vaina, envoltura o cápsula que inhiben la aglutinación de bacterias vivas en antisueros O. Una de las diferencias más importantes entre los antígenos L y B es que la fuerza de unión de anticuerpos del antígeno L se inactiva por calentamiento a 100 °C, mientras que la del antígeno B no se inactiva. Un antisuero L puro puede prepararse por absorción de un antisuero LO con una suspensión calentada de la cepa homóloga. El antisuero B puro no puede prepararse por este procedimiento porque la fuerza de unión de anticuerpos del antígeno B no se inactiva por el calor, y si el antisuero OB se absorbe en una suspensión calentada del cultivo homólogo, aglutininas O y B quedan fuera del antisuero. (51)

En los *E.coli* enterotoxigenos, para la demostración de enterotoxinas se pueden utilizar diversas pruebas; el modelo clásico ha sido la inoculación del asa ileal de conejo aislada y ligada, que produce una respuesta secretora, de manera que el asa se dilata y se llena de líquido por estímulo funcional. La toxina termolábil se puede demostrar también por los cambios morfológicos que produce en los cultivos de células Y1 de tumor adrenal del ratón o de células ováricas (CHO) de hámster chino y por métodos inmunológicos frente a un suero antitóxico de referencia (ELISA, RIA). La toxina termoestable puede detectarse por inoculación en el estómago o intestino del ratón lactante, donde produce una respuesta secretora. (124,156)

Los *E.coli* enteroinvasivos se reconocen por su capacidad de penetrar e invadir las células de la conjuntiva y córnea del cobayo, produciendo una queratoconjuntivitis; por instilación del saco conjuntival, de 1 a 7 días dan lugar a la aparición de un ojo hiperémico y edematoso. Por inoculación en cultivos de células HeLa o KB se observa a las pocas horas la presencia de bacterias intracelulares y más tarde la destrucción de la capa mononuclear. La desventaja que presentan los ensayos con las células HeLa es que se requieren gran cuidado y son muy lentas. Por otro lado, realizar estas pruebas, permite la detección del serotipo O157:H7 además de otros serotipos productores de toxinas semejantes a *Shiga*. Estas toxinas se mantienen medibles hasta 4-6 semanas. (124,167)

En el recién nacido, los títulos de anticuerpo anti-*E.coli* contra los serotipos más comunes son bajos o nulos por haber un paso transplacentario muy limitado. La carencia o escasez de anticuerpos en el neonato parecen condicionar un estado de susceptibilidad natural a numerosas infecciones por este microorganismo. (57)

3.2.1 INMUNOELECTROFORESIS

Este método combina la separación electroforética, difusión y precipitación inmunitaria de las proteínas. De esta manera, se obtiene la identificación y cuantificación de proteínas presentes en líquidos biológicos. (21,155)

El portaobjetos se cubre con agar o agarosa fundidos en una solución amortiguadora alcalina. Se corta un pozo para antígeno y un canal para el anticuerpo, con un aparato adecuado. El antígeno se coloca en el pozo y se separan en el campo eléctrico con una diferencia potencial de cerca de 3.3 V/cm durante 30-60 minutos. Entonces se coloca el antisuero en el canal y se permite que el suero y los anticuerpos se difundan durante 18 a 24 horas. Las líneas resultantes de precipitación pueden fotografiarse o lavar, secar y teñir la laminilla para un registro permanente. (21,155)

La inmunoelectroforesis distingue incrementos policlonales de los monoclonales en la γ -globulina. Es posible, también, analizar la disminución o ausencia de las inmunoglobulinas presentes en diversos trastornos de deficiencia inmunitaria. (21,155)

3.2.1.1 ELECTROFORESIS POR INMUNOFIJACIÓN

Esta técnica abarca la separación de proteínas por electroforesis en gel, seguida de inmunoprecipitación con antisuero monoespecífico. Las proteínas no precipitadas se eliminan al lavar las bandas de inmunoprecipitación reveladas con tinción para proteínas. Es especialmente importante para componentes de bajo nivel de IgM o IgA, que pueden estar recubiertos por un exceso de IgG normal. (21,155)

3.2.2 ELECTROINMUNODIFUSIÓN

Tiene como principio el contacto antígeno-anticuerpo precipitando en agar por difusión aumentando la velocidad y el desarrollo de la línea de precipitación, empleando la electricidad. Esta técnica es útil en el diagnóstico serológico de enfermedades infecciosas por la detección del antígeno en suero. (21,155)

3.2.2.1 CONTRAINMUNOELECTROFORESIS

También se le conoce como electroinmunodifusión doble unidimensional, electroforesis a contracorriente y electroprecipitación. El principio básico de este método es la electroforesis simultánea de antígeno y anticuerpo en direcciones opuestas, de pozos separados en el gel, con la precipitación resultante en un punto intermedio entre sus orígenes. (4)

Las desventajas principales de la doble difusión sin fuerza electromotriz son el tiempo que se requiere para la precipitación y la falta relativa de sensibilidad. Esta técnica puede producir líneas visibles de precipitación en 30 minutos y es cerca de 10 veces más sensible que las técnicas estándar de doble difusión. Sin embargo, esta técnica sólo es semicuantitativa. (4)

Preparación de placas de contrainmunolectroforesis (4)

- Preparar 30 ml de agarosa 1% en buffer barbital (0.3 g de agarosa y 30 ml de buffer barbital), pH 8.2; 0.05 M).
- Hervir cuidadosamente la solución en frasco cubierto con papel metálico hasta que la agarosa se disuelva por completo. No dejar que la solución de agarosa hierva fuera del frasco.
- Ajustar la mesa de nivelación y marcar una hoja de Mylar de 13 por 18 cm en el ángulo inferior derecho con un marcador negro. En lugar de Mylar puede usarse un portaobjetos de vidrio.
- Ajustar el volumen de agar aplicado al soporte según corresponda (aproximadamente 0.15 ml/cm² de superficie de soporte).
- Con una pipeta de 10 ml aplicar la agarosa fundida uniformemente a la hoja.
- Cuando la agarosa se gelifica, colocar la hoja en cámara húmeda a 4 °C hasta que esté lista para usar.
- Cortar los pocitos en pares con un cortador especial de 4 mm, según el número que se necesite. Las hojas de agarosa pueden guardarse como máximo 3 o 4 días a 4 °C.
- Llenar los pocitos con los antígenos y antisueros apropiados, usando una micropipeta o una pipeta capilar descartable.
- Si se cree que la muestra contiene grandes cantidades de antígeno, debe diluirse 1:10 con solución fisiológica estéril o agua estéril antes del análisis.
- Realizar electroforesis.
- Si el volumen es suficiente las muestras pueden concentrarse antes de analizarlas usando un ultrafiltro múltiple descartable. Este dispositivo concentra los constituyentes macromoleculares de las muestras diluidas.
- Si el volumen de la muestra es menor de 5 ml, puede usarse el método de precipitación en frío con etanol:
 - Centrifugar la muestra durante 5 minutos a 3.000 x g. Agregar 15 ml de etanol 95% a 5 ml del sobrenadante en un tubo de centrifuga cónico. (4)

- Refrigerar a 4 °C una hora.
- Centrifugar la muestra 20 minutos a 3.000 x g.
- Descartar el sobrenadante y secar el tubo en ángulo de 45 ° durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- Mezclar con 0.25 ml de solución salina normal y volver a suspender el sedimento.
- Centrifugar a 3.000 x g y probar el sobrenadante para encontrar polisacárido. (4)
- Colocar la hoja de agarosa en la solución de lavado desproteinizante durante la noche.
- Después de la desproteización, colocar la hoja en agua destilada y lavar durante una hora.
- Colocar la hoja de agarosa sobre una gradilla de tubos de ensaye y secarla en un horno durante 30-60 minutos o hasta que seque el gel de agarosa.
- Teñir la hoja durante 5 minutos con azul brillante de Coomassie, lavarla con agua destilada, colocarla en solución decolorante por lo menos durante 10 minutos, enjuagarla con agua destilada y secarla con papel absorbente. (4)

Deben tenerse en cuenta las limitaciones del método para la interpretación de resultados. De importancia fundamental es el antisuero específico reactivo de título alto. Un resultado CIE negativo sugiere solamente que, si el antígeno está presente, lo está en cantidades menores que la sensibilidad de detección del método, generalmente 0.01 a 0.05 µg/ml. Un resultado positivo también debe interpretarse con cautela, porque se sabe la existencia de reacciones cruzadas inmunológicas entre algunos antígenos detectados rutinariamente. (21,155)

3.2.2.2 ELECTROINMUNODIFUSIÓN SIMPLE UNIDIMENSIONAL

Este método se conoce como Técnica de Laurel. La aplicación principal de esta técnica ha sido el cuantificar los antígenos diferentes de inmunoglobulinas. En esta técnica, se incorpora antisuero con el antígeno o antígenos que se desea cuantificar en el medio de soporte de agarosa sobre una placa de vidrio en una posición fija, de manera que los anticuerpos migren. El espécimen que contiene una cantidad desconocida de los antígenos se coloca en un pequeño pozo. Entonces, se lleva a cabo la electroforesis del antígeno en la agarosa que contiene anticuerpo. La forma resultante de inmunoprecipitación semeja la punta de un cohete. (21,155)

Esta forma ocurre porque la precipitación se presenta a lo largo de los márgenes laterales de los bordes de antígeno en movimiento, al desplazarse el antígeno en el agar que contiene el anticuerpo. Gradualmente se pierde el antígeno por precipitación, su concentración en el borde anterior disminuye, y los márgenes laterales convergen para formar un punto agudo. La distancia total de la migración de antígeno para una concentración dada de antisuero, es linealmente proporcional a la concentración de antígeno. La sensibilidad de esta técnica es de cerca de 0.5 µg/ml para proteínas. Por desgracia, la

ligera carga negativa de las inmunoglobulinas impide su movilidad electroforética en este sistema, a menos que se utilicen electrolitos y agar especiales. (21,155)

3.2.3 RADIOINMUNOANÁLISIS (RIA)

Este método nos ayuda a determinar la concentración del analito (molécula de interés). La reacción del analito es común a todos los análisis ligando con una proteína captadora o captador que, con mayor frecuencia, es un anticuerpo. En su función como reactante con el captador, el analito se denomina ligando. Las moléculas pequeñas analito son haptenos funcionales, que necesitan estar conjugados a acarreadores para hacerse inmunogénicos con el propósito de formar anticuerpos para que se utilicen para su detección. El analito hapténico libre se puede detectar por estos anticuerpos en ausencia de acarreadores. En ciertos diseños de análisis, el captador puede reaccionar con múltiples ligandos diferentes, incluyendo al analito. (155)

3.2.3.1 CALIBRACIÓN

1. Reacción captador ligando.- Se establece un número de vasos de reacción en el cual cada uno contiene una concentración fija de analito, marcado con radioisótopos, conocido como marca o trazador. La calibración requiere de un grupo de diluciones de analito de concentración conocida: éstos se conocen como estándares o calibradores. Entonces se añaden diferentes cantidades de calibrador a una serie de mezclas de anticuerpo con marca. El evento central en el RIA es la competencia entre el analito marcado y el no marcado, para los sitios de captación del anticuerpo. De acuerdo al grado de acoplamiento de la reacción captador ligando, se dice que el análisis es análisis de equilibrio (reacción total), o análisis de desequilibrio (reacción incompleta). La marca se divide en dos categorías por la reacción: marca que está unida al anticuerpo (fracción unida) y marca que está libre en la solución (reacción libre). Al incrementar la cantidad fija de marca presente, estará libre una fracción creciente de la marca. (155)
2. Partición y separación.- Las fracciones unida y libre se sujetan al paso de partición, después del cual se separan físicamente. Los métodos de partición que secuestran el captador y los complejos de captador-ligando, incluyen extracción salina de proteína (mediante el uso de sulfato de amonio o de sodio), desnaturalización y precipitación de proteínas por solvente (como metanol, etanol o acetona), y precipitación por polietilenglicol o por un segundo anticuerpo dirigido contra el primero. La inmovilización del captador a una fase sólida tal como el tubo de ensayo de reacción, o una partícula macroscópica, permite una separación rápida de marca unida o separada, o de analito. Un método común para eliminar la fracción libre es la adsorción de ligando libre. Después de la partición, las fracciones unida y libre se sujetan a separación física por centrifugación y filtrado, durante el cual puede presentarse un grado pequeño de mezcla de fracciones unida o separada. (155)

3. Creación de una curva de calibración.- Se deberá establecer una relación entre la concentración del calibrador y la respuesta de la muestra. Las curvas de calibración que se encuentran con mayor frecuencia en los análisis son curvas simétricas más o menos sigmoides, cuando se grafican mediante el uso de un logarítmico de concentración. (155)

3.2.4 ANÁLISIS INMUNOSORBENTE UNIDO A ENZIMA (ELISA)

Método de identificación (marcas enzimáticas) de anticuerpos, de manera que están invertidas las funciones del captador y el ligando. El componente de fase sólida es un antígeno. El anticuerpo a detectar se une a este componente y, entonces, se adiciona un segundo anticuerpo unido a enzima, dirigido contra el anticuerpo a detectar. Se añade sustrato de la enzima, y se obtiene un producto colorido de la reacción, que puede medirse con facilidad por espectrofotometría. (60,155)

Aunque ELISA puede hacerse como prueba de unión competitiva como RIA, casi todas las aplicaciones emplean el método indirecto para detectar anticuerpo, y el método del doble sandwich de anticuerpo para detectar antígeno. (60)

3.2.4.1 MÉTODO INDIRECTO

- Se liga un antígeno específico del anticuerpo a medir a una fase sólida. Esta última puede ser partículas de poliestireno, placas con pozos múltiples o tubos.
- Después de la incubación, la fase sólida se lava para quitarle antígeno no ligado. Esta fase sólida revestida es estable a 4°C durante un tiempo variable que depende del sistema.
- Se agregan diluciones del suero de prueba, se incuba y se lava.
- Se agrega y se incuba un anticuerpo antiespecie marcado con enzima (peroxidasa o fosfatasa alcalina).
- Se quita por lavado el conjugado no ligado.
- Se añade el sustrato enzimático y la reacción termina después de producirse la reacción de color. Esta puede medirse espectrofotométricamente o leerse visualmente. (21)

3.2.4.2 MÉTODO DE DOBLE SANDWICH DE ANTICUERPO.

- El anticuerpo se liga a la fase sólida.
- Se elimina el exceso de anticuerpo y la fase sólida revestida se guarda a 4 °C.

- En el momento de la prueba, la fase sólida revestida se retira y se incuba con la muestra que contiene antígeno.
- Se retira el antígeno no ligado por lavado.
- Se añade e incuba conjugado específico de anticuerpo-enzima y se elimina el exceso.
- Se añade el sustrato enzimático y se lee visual o espectrofotométricamente la reacción de color. (21)

Aunque simple el concepto, ELISA puede plantear dificultades de desarrollo debidas a las muchas variables que deben examinarse para cada anticuerpo o antígeno a detectar que incluyen: 1) la fase sólida a usar, 2) incubación y concentración óptimas de anticuerpo, antígeno y complejo conjugado, 3) grado de lavado y naturaleza del buffer de lavado, 4) tratamiento previo de la muestra a analizar: dilución, inactivación, remoción de partículas, clarificación, desproteización; 5) método de conjugación de enzima con anticuerpo, 6) elección de enzima, 7) elección de sustrato, 8) método para detener la reacción enzimática, y 9) forma de leer la prueba. (21)

3.2.5 INMUNOFLUORESCENCIA

La inmunofluorescencia se puede aplicar como una técnica histoquímica o citoquímica, para detección y localización de antígenos en células o tejidos. El anticuerpo específico se conjuga con compuestos fluorescentes, sin alterar su reactividad inmunitaria, dando como resultado un trazador sensible para antígenos de tejido. El anticuerpo conjugado se añade a las células o tejidos y se fija a los antígenos, y forma así, un complejo inmunitario estable. El anticuerpo no fijado se elimina por lavado, y la preparación resultante se observa en un microscopio de fluorescencia. Esta adaptación a un microscopio regular, contiene una fuente de luz de alta intensidad, filtros de excitación para producir longitud de onda capaz de provocar activación de fluorescencia, y filtros de barrera para eliminar longitudes de onda de luz que puedan interferir. Cuando se observa en el microscopio de fluorescencia contra un fondo oscuro, los antígenos unidos específicamente a anticuerpo fluorescente se pueden detectar por su color brillante. (26,92)

La fluorescencia es la emisión de luz de un color, es decir una longitud de onda, mientras que la sustancia se irradia con luz de un color diferente. La longitud de onda emitida tiene un nivel inferior de energía del de la luz incidente o absorbida. Los fluorocromos tales como la rodamina o fluoresceína utilizados en los laboratorios clínicos, tienen espectros característicos de emisión y absorción. El isotiocianato de fluoresceína (FITC) es una forma química de fluoresceína que se une con rapidez covalentemente a las proteínas en un pH alto, en principio a través del aminoácido lisina, y grupos aminoterminales. Su absorción máxima es de 490 a 495 nm, y emite su color verde característico a 517 nm. El isotiocianato de tetrametil rodamina, que emite en rojo, tiene un máximo de absorción de 550 nm y una emisión máxima a 580 nm. Consecuentemente se

deberán emplear diferentes filtros de excitación y de barrera, para visualizar el color verde o rojo característico de estas tinciones fluorescentes. En general, se desea obtener una longitud de onda excitante casi igual a aquella de la excitación máxima de la tinción. De manera similar, el filtro barrera deberá eliminar todas menos el espectro de longitud de onda emitido. En la práctica, la brillantez real de la fluorescencia observada por el ojo depende de tres factores: 1) eficacia con la cual la tinción convierte la luz incidente en luz fluorescente; 2) concentración de la tinción en el espécimen del tejido; 3) intensidad de la radiación excitante (absorbida). (26,92)

Los microscopios utilizados para visualizar los especímenes inmunofluorescentes son modificaciones de los microscopios estándar de luz. (26,92)

3.2.5.1 METODOLOGÍA

Cualquier antígeno se puede detectar en secciones de tejido fijo o en suspensiones de células vivas por inmunofluorescencia. Es la combinación de gran sensibilidad y especificidad junto al uso de técnicas histológicas, lo que hace tan útil a la inmunofluorescencia. Los pasos a seguir en este método son preparación de antisuero inmune o anticuerpos purificados, conjugación con tinción fluorescente y el procedimiento de tinción. (26,92)

Se obtiene un antisuero para el antígeno que se desea detectar en especies heterólogas. Los anticuerpos monoclonales puros se pueden utilizar. Los antisueros deberán contener cantidades de miligramos de anticuerpos por ml. La especificidad deberá exceder un nivel detectable en las técnicas ordinarias de doble difusión o inmunolectroforesis. Los anticuerpos no deseados, presentes en conjugados o reactivos de antiglobulina para la prueba se pueden eliminar con inmunoabsorbentes insolubles, o evitar totalmente mediante el uso de anticuerpos monoclonales. (26,92)

Después de obtener el suero de alta potencia y especificidad apropiada, se puede preparar la fracción γ -globulina por precipitación con sulfato de amonio y cromatografía de intercambio iónico con DEAE celulosa. Es necesario purificar parcialmente la globulina sérica, ya que la conjugación subsecuente deberá limitarse al anticuerpo tanto como sea posible. Esto incrementará la eficacia de la tinción y evitará teñimiento no específico, indeseable, por proteínas séricas conjugadas con fluorocromo que no sean anticuerpo, y que se puedan adherir a los componentes tisulares. (26,92)

La conjugación de la γ -globulina depende del colorante particular a combinarse con la molécula de anticuerpo. Desde un punto de vista de laboratorio clínico, sólo se han usado con amplitud, fluorescencia, rodamina, y algunas ficobiliproteínas. La fluorescencia en forma de FITC o rodamina, lo mismo que el isotiocianato de tetrametil rodamina, se pone a reaccionar directo con γ -globulina, en solución alcalina durante toda la noche a 4°C o se dializa contra γ -globulina. Entonces, se elimina la tinción que no reaccionó del conjugado de proteína y fluorocromo, con filtrado en gel o diálisis exhaustiva. En caso de ser necesario, el

conjugado resultante se puede concentrar por liofilización, diálisis a presión o extracción por solvente con polímeros solubles en agua. De ahí en adelante, se deberá determinar la concentración de la γ -globulina y en la relación de tinción y proteína o fluoresceína y proteína de compuesto. Esto se hace espectrofotométricamente con correcciones para la alteración en absorbancia de γ -globulina mediante el fluorocromo introducido. (26,92)

3.2.5.2 TÉCNICAS DE TINCIÓN

1. Inmunofluorescencia directa: en esta técnica, el antisuero conjugado se añade directo a la sección de tejido o suspensión de células viables. (26,92)
2. Inmunofluorescencia indirecta: esta técnica permite la detección de anticuerpo en el suero. Elimina la necesidad de purificar y conjugar individualmente cada muestra de suero. El método es una adaptación de la reacción de antiglobulina (prueba de Coombs), o técnica del anticuerpo doble. Se han utilizado diversas variaciones adicionales en las técnicas de tinción. Estas comprenden un suero conjugado anticomplementario para la detección de complejos inmunitarios que contengan complemento o tinción doble con conjugados de rodamina y fluoresceína. (26,92)
3. Sistema de biotina y avidina: la avidina glucoproteína básica derivada de albúmina de huevo de PM 68,000, tiene una enorme afinidad para la vitamina biotina. La avidina se puede unir con facilidad en forma covalente a un anticuerpo, y después reaccionar con la avidina acoplada al fluorocromo. Después de la reacción de antígeno con anticuerpo no marcado, se añade el segundo anticuerpo marcado con biotina. Ya que muchas moléculas de biotina se pueden unir a un anticuerpo, la adición subsecuente de avidina marcada con fluorocromo da como resultado unión firme con fluorescencia muy brillante. Otras ventajas son la carencia de unión inespecífica de la avidina adicionada con fluorocromo, con varios sustratos, y el uso general de conjugados de avidina para unirse a anticuerpos marcados con biotina sin importar su especie de origen o su isotipo. (26,92)

3.2.5.3 FLUORESCENCIA CUANTITATIVA

Están disponibles los inmunoanálisis cuantitativos que utilizan antígenos marcados con fluorocromo. Mediante un microfluorómetro se puede medir con precisión la cantidad de luz de una determinada longitud de onda emitida por un espécimen fluorescente. Los sistemas de inmunoanálisis de fluorescencia se pueden utilizar para medir IgG, IgA e IgM; C3 y C4, y anticuerpos antinucleares y anti-DNA. Las inmunoglobulinas se miden por captación competitiva de antisuero marcado específicamente para antígeno libre y en fase sólida. El antígeno libre se presenta en el suero del paciente, mientras que la inmunoglobulina unida está fija a una superficie polimérica hidrofóbica. La cantidad de anticuerpo fluorescente unido al antígeno de fase sólida, se mide en un microfluorómetro diseñado especialmente, y convertido a mg por dl por una curva estándar de referencia. (26,92)

Los anticuerpos séricos a diversos antígenos celulares como DNA o núcleo, también se pueden medir mediante la técnica indirecta. El sustrato (DNA) se fija a la superficie del polímero en la fase sólida y se incuba con los sueros de prueba. Entonces se une un segundo reactivo antiinmunoglobulina fluoresceinada al primer complejo antígeno-anticuerpo, y se mide por fluorometría la cantidad de fluorescencia unida. (21,155)

3.2.5.4 CUANTIFICACIÓN

La cuantificación de fluorescencia en el trabajo rutinario de diagnóstico se basa en la observación visual de la brillantez o contraste relativo del antígeno específicamente teñido. Esto permite una estimación aproximada pero satisfactoria cuando se usa junto con controles positivos y negativos. Una buena solución práctica de la cuantificación de pruebas indirectas consiste en comparar la fluorescencia de una serie de diluciones del suero desconocido con la que dan diluciones semejantes de sueros conocidos, positivos y negativos. (26,92)

3.2.6 COAGLUTINACIÓN

Staphylococcus aureus es rico en proteína A y liga a la porción Fc de inmunoglobulina G, subclases 2 y 4, dejando a las porciones Fab en libertad para reaccionar con cualquiera de una serie de moléculas de anticuerpo. El *Staphylococcus* recubierto de anticuerpo se convierte en un reactivo que se aglutina en presencia de antígeno homólogo. La aglutinación de este complejo proteína A-*S.aureus* puede usarse para detectar la presencia de antígenos bacterianos en los líquidos corporales. (71)

3.2.6.1 PREPARACIÓN DE REACTIVO PROTEÍNA A CON LA MODIFICACIÓN DE KRONVALL.

- Cultivar *S.aureus* a 35 °C durante la noche en caldo soya triptico.
- Lavar las células tres veces con solución salina más buffer fosfato (PBS), pH 7.2.
- Después del último lavado, suspender las células en PBS conteniendo 0.5 % formalina 3 horas a temperatura ambiente.
- Lavar las células formalinizadas tres veces en PBS y ajustar a una suspensión final al 10% en PBS.
- Calentar la suspensión a 80 °C durante una hora. (71)

3.2.6.2 PREPARACIÓN DE ESTAFILOCOCOS SENSIBILIZADOS.

- Agregar 0.1 ml de antisuero no diluido a 1 ml de la suspensión de *Staphylococcus*.
- Diluir la suspensión sensibilizada a 10 ml con PBS y guardar a 4 °C antes de usar. (71)

3.2.6.3 PROCEDIMIENTO DE PRUEBA

- Colocar una gota ($\pm 50 \mu\text{l}$) de muestra clínica o suspensión bacteriana a probar en el pozo de un portaobjetos para aglutinación.
- Añadir igual cantidad de reactivo estafilocócico sensibilizado.
- Mezclar bien y leer a los 2 minutos contra fondo oscuro. La lectura puede facilitarse con una lupa.
- La aglutinación se gradúa de 0 a +4. Las pruebas se consideran positivas si el pozo de prueba aparece granular (+2) y los controles negativos y el reactivo estafilocócico sensibilizado con otros anticuerpos permanecen uniformemente lisos y no granulados. (71)

Puede observarse la aglutinación no específica, especialmente en las pruebas directas de líquidos corporales para antígenos bacterianos. Si hay diferencia definida de aglutinación entre un solo reactivo sensibilizado por anticuerpo, y los reactivos de control negativo u otros reactivos sensibilizados, la prueba puede considerarse positiva. Cuando la aglutinación es similar con todos los reactivos de control y de prueba, los resultados de la prueba deben considerarse equívocos. Se han recomendado varios métodos para la remoción de aglutinación no específica: adición de una gota de proteína A soluble a una gota de líquido corporal antes de agregar los reactivos o controles sensibilizados, y calentamiento del líquido corporal a 100 °C durante 1 o 2 minutos antes de probar. (71)

La coaglutinación se ha usado para la rápida detección de antígenos bacterianos en líquidos corporales y para la identificación inmunológica de bacterias. Las ventajas que presenta este método son: 1) menor autoaglutinación, 2) mayor especificidad, 3) facilidad de realización, y 4) economía debida al bajo consumo de antisueros. (155)

Los resultados deben interpretarse con cautela debido a las reacciones cruzadas inmunológicas conocidas. (71)

3.2.7 AGLUTINACIÓN AL LÁTEX

Los anticuerpos de antígenos bacterianos pueden unirse a partículas de látex, y el reactivo se usa entonces para detectar antígeno homólogo en líquidos corporales por aglutinación de las partículas de látex. (107)

Las partículas de látex poliestireno, 0.8 μm se sensibilizan con globulina anticuerpo específica. Diluir la solución de stock de látex hasta una densidad óptica de 0.3 a 650 nm. Mezclar volúmenes iguales de anticuerpo y látex, y guardar a 4 °C antes de usar. (56)

3.2.7.1 REALIZACIÓN DE LA PRUEBA

- Añadir 2 gotas de muestra o reactivo control al pozo del portaobjetos de aglutinación.
- Agregar una gota de reactivo de látex sensibilizado.
- Inclinar el portaobjetos suavemente adelante y atrás 2 minutos, y leer macroscópicamente contra un fondo negro.
- La aglutinación se gradúa de 0 a +4. (21,107)

Los resultados de las pruebas de coaglutinación deben interpretarse con cautela debido a las reacciones cruzadas inmunológicas conocidas. En los análisis de líquidos corporales debe tenerse en cuenta la tendencia a la autoaglutinación y los resultados deben compararse cuidadosamente con controles negativos (suspensión de látex no sensibilizada y otra sensibilizada con suero normal de conejo sin anticuerpos para los antígenos probados). (56)

3.2.8 ANTICUERPOS MONOCLONALES

Algunos elementos ajenos al organismo, como las bacterias causantes de enfermedades, se conocen como antígenos, y son reconocidos por el sistema inmune como invasores. Los anticuerpos se encargan de la defensa natural contra infecciones y son proteínas que se especializan en destruir antígenos. (164)

Los anticuerpos tienen dos características útiles. Primero, son extremadamente específicos, cada anticuerpo se une y ataca un antígeno en particular. Segundo, algunos anticuerpos, una vez activados por una enfermedad, continúan confiriendo resistencia contra la misma. (164)

La segunda característica de los anticuerpos hace posible el desarrollo de vacunas. Estas son preparadas de bacterias muertas o atenuadas, cuando se introducen al organismo, estimulan la producción de anticuerpos contra los antígenos que contiene. (164)

Es la primera característica, su especificidad, la que hace de la técnica de anticuerpos monoclonales tan valiosa. No solamente se emplean en terapéutica, sino también para la diagnosis de una gran variedad de enfermedades, y pueden detectar la presencia de drogas, productos bacterianos y virales, y otras sustancias inusuales o anormales en la sangre. (164)

La producción de anticuerpos monoclonales puros en grandes cantidades ha sido el foco de atención de investigaciones científicas. Anteriormente se inyectaban antígenos a animales, para que después se formaran los anticuerpos y se pudieran obtener del suero de la sangre (antisuero- suero sanguíneo con anticuerpos). Los problemas que se enfrentaban eran la poca pureza del antisuero, y la baja cantidad de anticuerpos útiles. (164)

La técnica de anticuerpos monoclonales nos permite producir grandes cantidades de anticuerpos puros de la siguiente manera: Se obtienen células productoras de anticuerpos de manera natural; también se encuentran disponibles clases de células que crecen continuamente en cultivo celular. Se forman híbridos que combinan las características de inmortalidad de unas y la habilidad de producir la sustancia requerida de otras. Estos anticuerpos se llaman monoclonales porque vienen de un sólo tipo de célula; los anticuerpos producidos por los métodos convencionales, se derivan de preparaciones que contienen muchos tipos de células, llamándose policlonales. (27)

Los hibridomas o células somáticas híbridas, pueden formarse con rapidez mediante la fusión de una sola suspensión celular de esplenocitos o linfocitos de ratones o ratas inmunizadas con células tumorales de replicación continua, por ejemplo, mielomas o linfomas. La línea celular replicante se selecciona por dos propiedades diferentes: 1) carencia de producción o secreción de inmunoglobulina, y 2) carencia de actividad de hipoxantina fosforribosil transferasa (HPRT). Estas células se funden por exposición rápida a polietilenglicol. De ahí en adelante permanecen tres poblaciones en el cultivo: esplenocitos, células de mieloma e híbridos. Los híbridos tienen la combinación del genoma de las líneas parentales y tarde o temprano se deshacen de los cromosomas y adquieren el estado diploide. La selección de los híbridos se obtiene al esperar la muerte natural de los esplenocitos. La línea de células de mieloma se muere porque en el medio HAT, que contiene hipoxantina aminopterina y timidina, las células HPRT no pueden utilizar hipoxantina exógena para producir purina. La aminopterina bloquea la síntesis endógena de purina y pirimidinas, y las células mueren. Los híbridos inician su duplicación cada 24 a 48 horas, y se forman colonias con rapidez. (27,164)

Entonces, se clonan las células del hibridoma mediante métodos de dilución limitante, y se analizan los sobrenadantes en búsqueda de producción de anticuerpo, por lo general, mediante ELISA o RJA. Para asegurarse de la monoclonalidad, se clonan de nuevo, y se cultivan grandes cantidades de células para la obtención del anticuerpo. Para asegurarse de la especificidad de anticuerpo se llevan a cabo estudios extensos inmunoquímicos y serológicos. Se pueden producir grandes cantidades de anticuerpo en cultivo libre de suero o líquido de ascitis, en ratones singénicos. Las células se almacenan en nitrógeno líquido para su utilización posterior. (27)

Se pueden producir interespecies e intraespecies, y propagarse en cultivos de larga duración. Para el uso de investigación terapéutica humana, se han empleado hibridomas de ratón, pero éstos producen respuesta de anticuerpo antimurino después de aplicarse a los humanos. Por esta razón, y para especificidad máxima, también se han utilizado hibridomas humano-humano. (27,155,164)

3.2.9 TECRA

El inmunoensayo visual para *E.coli* (VIA) TECRA provee una prueba rápida, conveniente, sensitiva y específica para la detección del serotipo *O157:H7* en alimentos. Los resultados se determinan ya sea visualmente, desarrollando una coloración verde de ser positiva, o por lecturas de microtítulos. (83)

Esta prueba es sumamente rápida. Un cultivo enriquecido selectivo se realiza durante la noche, y los resultados se obtienen al día siguiente después de 2 horas de procedimiento. (83)

El kit contiene:

- Concentrado de lavado.
- Control positivo: secador congelado.
- Control diluyente (control negativo).
- Conjugado: Secador congelado (x2).
- Conjugado : diluyente (x2).
- Substrato: Secador congelado.
- Substrato diluyente.
- Anticuerpos cubiertos.
- Aditivo de muestra.
- Tarjeta para comparar coloración. (83)

Materiales:

- Caldo de Soya triptica modificado con acriflavina.
- Medio *EC* modificado con novobiocina.
- Agitador (100 rpm).
- Pipetas serológicas 1 ml.
- Pipetas.
- Película plástica para envolver.
- Incubador.
- Botellas o tubos.
- Baño de agua.
- Piseta. (83)

3.2.9.1 PROCEDIMIENTO

1. Se provee microtítulos cubiertos con anticuerpos de alta afinidad. Estos anticuerpos son específicos para *E.coli* O157:H7. La muestra se adiciona y si *E.coli* está presente se captura por los anticuerpos. (83)
2. El conjugado (anticuerpos marcados con enzima) se agrega formando el sandwich anticuerpo/*E.coli*/conjugado. (83)
3. El sustrato químico se añade, la enzima dentro del conjugado da como resultado un color verde. (83)

3.3 IDENTIFICACIÓN GENÉTICA

3.3.1 HIBRIDACIÓN DE DNA

Los estudios de hibridación de DNA son útiles para determinar interrelaciones filogenéticas entre especies. Para realizar un ensayo de hibridación de DNA, la muestra se calienta hasta el punto de fusión, en que las hélices de las moléculas de DNA se separan. Estas hélices de DNA pueden mezclarse con las de otras especies, formando moléculas híbridas de DNA. Las uniones de hidrógeno se forman solamente con pares de bases complementarias. (21)

La estabilidad térmica del DNA se encuentra relacionada con el número de uniones de hidrógeno entre pares de bases complementarias. Entre mayor sea la similitud de las secuencias nucleótidas, mayor número habrá de uniones de hidrógeno presentes en un híbrido de DNA producido de dos muestras diferentes. (21,29)

3.3.1.1 PREHIBRIDACIÓN

1. Calentar el buffer de hibridación a 60 °C en baño maría (de 10 a 30 minutos dependiendo de la cantidad de buffer en el contenedor. Para calentar la solución en menos tiempo, puede radiarse la solución en microondas durante 1 minuto. Entonces colocar la solución en baño maría a 60 °C. Evitar sobrecalentar la solución.
2. Calentar 400 ml en microondas. Transferir el contenedor con agua hirviendo a la parrilla y mantener hirviendo las pruebas de DNA por 15 minutos.
3. Mientras hierve el DNA y la solución buffer se calienta, preparar las cajas para hibridación en orden secuencial. Asegurarse de tener una caja adicional.
4. Adicionar 50 ml de buffer a cada caja utilizando un tubo de 50 ml para medir la cantidad exacta de buffer que se agrega, este tubo debe estar esterilizado y graduado. Para más de un filtro por caja, adicionar un excedente de 15 ml de buffer, por cada uno de los dos filtros siguientes, y 10 ml de buffer por cada filtro adicional (cuatro filtros necesitarán $50+15+15+10 = 100$ ml de buffer). El límite de filtros de de 4 por caja.
5. Agregar 0.9 ml de DNA/50 ml de buffer en la caja de hibridación. Mezclar la solución suavemente.
6. Flamear la superficie de la solución para remover las burbujas. Para realizar esta actividad, debe utilizarse un mechero Bunsen. Tomar el mechero boca abajo hacia el interior de la caja de hibridación y pasar rápidamente la flama sobre la superficie de la solución. (167)

7. Colocar los filtros, uno por uno, dentro de las cajas, DNA hacia abajo (marcas hacia arriba). Si se colocan más filtros, el primero debe encontrarse húmedo. Si se emplean varias cajas, colocarlas una sobre otra (colocadas en pila). Número máximo de cajas por pila, cuatro, para un manejo óptimo.
8. Prehibridizar los filtros por lo menos 3 horas a 60 °C. (167)

3.3.1.1.1 PROTOCOLO

1.- Inoculación de membranas de nylon

1.1 Con Heces

Las muestras fecales, a excepción de las que presentan consistencia líquida, se resuspenden en un volumen igual de buffer salino de fosfatos. Esta suspensión fecal se inocula en un parche de 0.5 a 1 cm de diámetro a la membrana de nylon sostenida en placas de agar MacConkey. Ocho muestras fecales se prueban por membrana. Posterior a una incubación a 37 °C durante 16 horas, cepas control de E.coli se gotean en una rejilla que se encuentra al fondo de la membrana para proveer controles positivos y negativos a todas las pruebas en uso. Las placas se incuban por 4-6 horas. (161)

1.2 Con Caldo de Cultivo

Es necesario utilizar caldos cultivados durante la noche a 37 °C. Una gota de cultivo se coloca en los filtros de nylon, que se han sobrepuesto, a su vez, en placas de agar MacConkey. Se pueden utilizar hasta 50 gotas por filtro. En esta prueba también se emplean controles positivos y negativos ubicados al fondo de cada filtro. Posteriormente se incuban las placas con los filtros a 37 °C por 5-6 horas. (161)

Filtros Control

Estos filtros se cultivan durante la noche con cultivos nutrientes (paso 1).

E3787	<u>E.coli</u> O26:H11, VT1 + ve
E32511	<u>E.coli</u> O157:H-, VT2 + ve
E2347	<u>E.coli</u> O127:H6, Hep-2 + ve, eac + ve
E60725	<u>E.coli</u> O92:H33 AA + ve
E66438	<u>E.coli</u> O75:H- DA + ve
E7476	<u>E.coli</u> O166:H27 ST + ve
E5798	<u>E.coli</u> O7:H18 LT + ve
E35990	<u>E.coli</u> O143:H- EIEC + ve
14R519	<u>E.coli</u> K12, control negativo (29,61)

2.- Preparación de membranas para la hibridación de DNA

2.1 Para membranas con gotas de heces o cultivo

1. Preparar cuatro charolas con hojas de papel Whatman 3 mm (o similar). Saturar la primer hoja con 10% SDS y colocar los filtros con las colonias hacia arriba sobre la hoja saturada durante 5 minutos.

Para los pasos 2 a 5, tener precaución de no cubrir la parte superior de los filtros con ninguna de las soluciones. Entre cada paso, los filtros son marcados en toallas de papel.

2. Transferir los filtros a la segunda hoja saturada con solución denaturalizante (0.5M NaOH, 1.5M NaCl). Dejar reposar por 10 min.
3. Transferir los filtros a la tercer hoja saturada con solución neutralizante (1.5M NaCl, 0.5M Tris, pH 8). Dejar reposar durante 5 minutos.
4. Transferir los filtros a la cuarta hoja saturada con 2xSSPE, pH 7.4. Reposar 5 minutos.

Para preparar 2xSSPE, pesar 17.4 g de NaCl, 3.1 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.74 g de EDTA por litro, pH 7.4.

5. Permitir el secado de los filtros a temperatura ambiente. La unión del DNA liberado al filtro, se puede realizar por medio de dos métodos diferentes:
 - a) Envolver los filtros con parafilm y colocar en una lámpara de UV durante 4 minutos (colonias hacia abajo).
 - b) Colocar los filtros entre hojas de papel de 3 mm e introducir a la estufa por 2 horas a 80 °C.

De esta manera, los filtros se encuentran listos para realizar las pruebas de hibridación. (161)

3.3.1.2 HIBRIDACIÓN EN COLONIA O DIRECTAMENTE EN HECES (SISTEMA ECL)

1. Precalentar el horno de hibridación a 68 °C, de acuerdo con las instrucciones de manufactura. (29,47,161)
2. Hacer una lista de los filtros a analizar y las pruebas a emplear. Humedecer los filtros en un pequeño volumen de 5x SSC en una caja plástica. Dependiendo del número de filtros

por prueba, se decidirá el tamaño a emplear de las botellas. Humedecer las mallas de tamaño apropiado, en una charola de 5x SSC.

3. Colocar las membranas en la malla de manera que no se traslapen. Poner una segunda capa de malla sobre la anterior, si es necesario. Enrollar suavemente la malla e introducir a la botella.
4. Agregar 5x SSC para llenar un cuarto de botella. Desenrollar las membranas suavemente y colocarlas en el horno. Centrifugarlas durante 1 hora.
5. Remover las mallas colocándolas en una charola que contenga una pequeña cantidad de 5x SSC. Limpiar las membranas con un pañuelo húmedo para remover los residuos celulares. Reensamblar las mallas y colocar en las botellas.
6. Agregar solución ECL para hibridación, 20 ml para botellas pequeñas y 30 ml para botellas medianas, aproximadamente. Es necesario agregar DNA de salmón a las botellas con la solución en un rango de 0.1 ml por cada 10 ml de solución.
7. Pre-hibridizar al menos durante 2 horas a 68 °C en el horno.
8. Descongelar la solución prueba, que debió ser, anteriormente diluida en 5-10 ml de solución para hibridación ECL.
9. Remover lo más posible la mezcla de pre-hibridación, de ser necesario, emplear una pipeta Pasteur
10. Calentar la solución prueba durante 5 minutos, enfriar rápidamente en hielo y agregarla toda a la botella apropiada. Revisar que toda la membrana se encuentre en contacto con la solución.
11. Hibridizar durante la noche a 68 °C
12. Remover la mayor cantidad posible de solución prueba, devolverla a su contenedor original y mantener en refrigeración.
13. Con las membranas aún dentro de la botella, realizar a temperatura ambiente, los lavados en el otro horno de hibridación por periodos de 10 minutos en 2x SSC/0.1% SDS. Las condiciones de los lavados subsecuentes, dependerán de la prueba utilizada y se encuentran enlistadas a continuación. Para cualquier lavado realizado a una temperatura diferente a 68 °C, las membranas deberán ser removidas de las botellas e incubadas en baño maria con agitación a la temperatura adecuada. (29,47,161)

VT1, VT2 o VT mixto eae, EAF	0.1x SSC/0.1 % SDS 2x 15 min a 68 °C
AA	5x SSC/0.1 % SDS 2x 15 min a 54 °C 2x SSC/0.1 % SDS 30 seg a RT
DA, EIEC	0.5x SSC/0.1 % SDS 2x 15 min a 68 °C

Cuadro 6.- Condiciones de lavado a seguir durante el procedimiento. (147)

Finalmente lavar brevemente en Buffer ECL y realizar la etapa de detección. Mantener los filtros húmedos todo el tiempo. (147)

3.3.1.3 DETECCIÓN DE HÍBRIDOS ECL MARCADOS

1. Transferir los filtros hibridados a bolsas de plástico, revisando que estas estén correctamente selladas en la parte posterior. Acomodarlas de manera que queden de espaldas unas con otras, con el DNA hacia afuera, evitando que se traslapen. Es posible acomodar ocho membranas en cada bolsa, pero pueden incluirse membranas extra si es necesario. Tratar de ocupar el menor número de bolsas posible. (29)
2. Preparar el reactivo bloqueador (0.5 % del bloqueador en buffer ECL 1). Cada bolsa llena requiere de 25 a 30 ml de la solución bloqueadora. Para lograr que la solución recoja el polvo, agregar solución buffer ECL 1 y someter a micro ondas ligeramente hasta que se disuelva al agitarse. No debe sobre calentarse o se formarán grumos. Enfriar a temperatura ambiente y agregar volúmenes apropiados a las bolsas. Sellar dejando espacio suficiente alrededor de los filtros, pero con la menor cantidad posible de aire dentro de ellas. Agitar durante 1 hora a temperatura ambiente. (29)
3. Cortar la parte superior de las bolsas y vaciar el bloqueador completamente. Agregar dentro un poco de ECL y agitar suavemente de manera manual. Vaciar nuevamente la solución y alisar las bolsas sobre una toalla para retirar la mayor cantidad posible de líquido. (29)
4. La conjugación se hace en ECL 1 que contenga 0.5 % de albúmina de suero de bovino. El conjugado almacenado se diluye 1/1000. Para una bolsa llena se necesitan 20 ml de conjugado diluido, pero para números menores de filtros se reduce la cantidad debido al elevado costo del conjugado. Resellar la bolsa y agitar a temperatura ambiente durante 1 hora. (29)
5. Remover los filtros a una caja de plástico y lavar a temperatura ambiente en buffer ECL 1 con Tween 20. Lavar 2x 10 min. Seguidos de 2x 5 min. Mantener los filtros húmedos. (29)

6. Hacer un volumen mínimo de sustrato mezclando volúmenes iguales de los dos reactivos. Evitar provocar una contaminación cruzada de los mismos. Para un filtro completo se necesitan 4 ml, tomando en cuenta que el total de filtros no se tratarán al mismo tiempo, por lo que el sustrato podrá reutilizarse entre filtros. No será necesario emplear una cantidad mayor de 40 o 50 ml, aún para cantidades grandes de filtros, y como los componentes del reactivo son caros, es recomendable economizar lo más posible en esta etapa. (29)
7. Llevar los filtros al cuarto oscuro y realizar los siguientes pasos en completa oscuridad o con la luz roja de seguridad. (29)

3.3.1.3.1 REVELADO DE PELÍCULA

1. En el cuarto oscuro reunir charolas plásticas blancas, parafilm con papel para hornear, cronómetros, sustratos, pipetas y carteras para documentos. Apagar las luces, mantener solamente las de seguridad encendidas. Cargar cassettes con cinta, 6 filtros ocuparán una cinta completa. (167)
2. Con las luces encendidas, arreglar los filtros con DNA hacia arriba en las charolas. Agregar el sustrato con pipeta a los filtros y dejar reposar por 1 minuto. Arreglar las membranas entre 2 capas de parafilm (en forma de sandwich) e introducir a la cartera plástica para documentos. Repetir este paso para los demás lotes de filtros. (167)
3. Con la luz de seguridad encendida, colocar la cinta dentro de las carteras y exponer los cassettes durante un tiempo apropiado. Esto es, 7 minutos para la mayoría de los filtros, pero hasta 20 minutos para filtros marcados (gotas). (167)
4. Con la luz de seguridad, desarrollar el proceso de la película o cinta, de acuerdo con las instrucciones de uso. Cubrir la película y las membranas y llevar la cuenta de los resultados. (167)
 - a. Colocar los filtros a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ al tiempo de exposición necesario.
 - b. Para realizar el revelado de la película, sacar los filtros de refrigeración y dejarlos descongelarse por 5-10 minutos.
 - c. Deben desarrollarse las siguientes actividades:
 - Cronómetro a 10 minutos.
 - Colocar la película cerca del área de trabajo.
 - Encender la luz roja de seguridad.
 - Remover las cubiertas del revelador y fijador y colocarlas boca abajo en la tarja. (167,124)

5. Inmediatamente antes de revelar la película, remover el tanque interno que cubre al fijador, dejar la solución salir de dentro del tanque por un momento, y entonces colocar la cubierta interna boca abajo en la parte superior del tanque externo del fijador. Repetir el mismo procedimiento para la cubierta interna del revelador antes de apagar las luces.(167)
6. Abrir el contenedor de la película, colocar los filtros lejos de la película, y sacar suavemente la película del contenedor.
7. Colocar la película en el soporte, cuidando que quede perfectamente bien colocada.
8. Acomodar la película en el tanque revelador por 3 minutos.
9. Removerla del tanque, dejando que la solución gotee dentro del mismo, sumergir la película en agua por 10 segundos y dejar escurrir.
10. Fijar durante 2 minutos y sacar la película dejando correr agua sobre ella por 2 minutos.
11. Si se revela más de una película, deben seguirse los pasos anteriores con un intervalo de 30 segundos entre cada filtro.
12. Después de encender las luces, colocar las cubiertas (interna y externa) del tanque revelador, de igual manera se procede con las cubiertas del fijador.
13. Colgar las películas para permitir que se sequen. Limpiar el cuarto oscuro. (124,167)

<u>Prueba</u>	<u>Número de filtro</u>	<u>Plásmido</u>	<u>Vector (marcador)</u>	<u>Insertar para prueba</u>
VT1	60R746	NTP705	pACYC177 Resistencia Kanamicina (20 µg/ml)	0.75kb <u>HincII</u>
VT2	62R310	Pdep28	pGEM1 Resistencia ampicilina (100 µg/ml)	0.85kb <u>SmaI- PstI</u>
eac	62R645	pCVD434	pUC19 Resistencia ampicilina (100 µg/ml)	1kb <u>KpnI-SalI</u>
AA	62R554	pCVD432	pUC19 Resistencia ampicilina	1kb <u>ECORI-PstI</u>

DA	62R612	pSLM852	(100 µg/ml) pUC8 Resistencia ampicilina (100 µg/ml)	370 bp <u>PSTI</u>
EIEC	62R706	H1	pACYC184 Resistencia cloramfenicol (20 µg/ml)	1kb <u>ECORI-SALI</u>

Cuadro 7.- Criterios a seguir según las pruebas empleadas. (161)

Cuando ha concluido el experimento, la prueba puede separarse de la membrana.

1. Esto se consigue colocando la membrana en un recipiente de vidrio, y lavando la membrana con una gran cantidad de buffer separador caliente (90 °C). El buffer se vacía al recipiente que se encuentra sobre una parrilla (calor máximo) y agitador. Se lleva a cabo la agitación con calor constante durante 30 minutos. Tener cuidado de no permitir la evaporación del buffer, suplementándolo con más buffer. (156)
2. Después del tratamiento con buffer, el blot es lavado con un buffer (2x SSC) permitiendo que el aire seque. Las membranas tratadas de esta manera se pueden utilizar varias veces. De no realizarse estos pasos, la muestra puede quedar unida permanentemente a la membrana, evitando que pueda utilizarse de nuevo. (156)

SOLUCIÓN	PREPARACIÓN
Buffer para hibridación	100 ml de buffer para hibridación en un vaso de precipitado con un agitador magnético. Colocar el vaso en una parrilla/agitador. Mantener agitación mientras se calienta la solución a 42 °C. Adicionar 4.38 g de NaCl y 5.0 g de polvo bloqueador. Continuar agitando a la misma temperatura durante 1 hora. Tomar una alícuota y colocarla en tubos plásticos estériles, almacenarlos a -20 °C. Antes de su uso, el buffer debe dejarse descongelar y recalentado a 42 °C por lo menos durante 30 minutos.
20x SSC	Agregar 175.3 g de NaCl y 88.2 g de citrato de sodio (sal trisódica) en agua destilada-deionizada a un volumen final de 1 litro. Ajustar pH a 7.0 utilizando HCl o NaOH. Esta solución puede almacenarse a temperatura ambiente sin esterilización.
20% SDS	Disolver 100 g de SDS en 400 ml de agua destilada-deionizada. La solución se verá turbia, ajustar a pH 7.2 utilizando HCl. Llevar a un volumen final de 500 ml con agua destilada. Esta solución se almacena a temperatura ambiente sin esterilización. (Si persiste la turbiedad, calentar a 50-65 °C para disolver el SDS)

Solución ECL 1	A 800 ml de agua destilada-deionizada, agregar 25 ml de 20x SSC, 20 ml de SDS al 20% y 360 g de urea. Llevar a un volumen final de 1 litro con agua destilada. Esta solución se almacena a temperatura ambiente sin esterilización.
Solución ECL 2	A 800 ml de agua destilada-deionizada, agregar 100 ml de 20x SSC. Llevar a un volumen final de 1 litro con agua destilada. Esta solución puede almacenarse a temperatura ambiente sin esterilización.
Buffer separador	A 800 ml de agua destilada-deionizada, agregar 5 ml de 20x SSC y 25 ml de SDS al 20%. Llevar a un volumen final de 1 litro con agua destilada. Esta solución puede almacenarse a temperatura ambiente sin esterilización.

Cuadro 8.- Métodos de preparación de soluciones empleadas durante el proceso de hibridación. (47)

3.3.1.4 PROTOCOLO PARA HIBRIDACIÓN DE DNA EN GEL UTILIZANDO GELBOND FILM

La hibridación de DNA ≤ 1 kb directamente en gel de agarosa ofrece una alternativa más rápida y de menor costo al Southern blotting sin comprometer sensibilidad. Este protocolo incluye el uso de Gelbond film como ayuda a facilitar el uso de gel durante la hibridación. Reduce costos debido a que es más económico que el uso de membranas de nylon. (20)

Este procedimiento es compatible con pruebas ≤ 100 nt. Pruebas mayores (≥ 100 nt), deben realizarse en degradación ácida para incrementar la sensibilidad. Oligopruedas (≤ 100 nt), comúnmente se radiomarcán por quinasa y se utilizan sin tratamiento de ácido y pueden ofrecer una mayor sensibilidad. (20)

Se ha demostrado que la detección por hibridación en gel utilizando Gelbond film es equivalente o superior a membranas, particularmente para fragmentos de peso molecular grande ≥ 5 kb. (20)

La hibridación en gel es útil para el estudio de insertos plásmidos o fragmentos de Reacción en Cadena de Polimerasa PCR de gran tamaño. Esto incrementa la velocidad, sensibilidad y efectividad empleando Gelbond film como una alternativa al Southern blotting. (20,29)

3.3.1.5 PREPARACIÓN DE GEL Y ELECTROFORESIS

1. Colocar un gel de agarosa 0.5 % a 1.2 %, de 2 mm de grueso directamente en una superficie Gelbond film hidrofílica. Como una alternativa, se adhiere el gel de agarosa a un Gelbond film después de la electroforesis. (118)

Nota: Después de la electroforesis, colocar el gel de agarosa en la superficie hidrofílica del Gelbond film, que es un poco más grande que el gel. En un plato se coloca el Gelbond film con deteniéndolo con abrazaderas. Secar en un horno a 55 °C o a temperatura ambiente. El gel se ha de adherir al Gelbond film durante el proceso de secado. (118)

El tiempo de secado depende del grueso del gel.

1mm	1-1.5 horas
3-4 mm	4 horas

2. Realizar la electroforesis utilizando un protocolo estándar (descrito posteriormente).
3. Filtrar con bromuro etílico.
4. Fotografiar colocando el gel hacia abajo en una lámpara de UV.
5. Colocar el gel en un plato, la película debe ver hacia abajo para secarse.
6. Desnaturalizar DNA en el gel con 0.5 M NaOH, 0.15 M NaCl por 40 minutos.
7. Enjuagar brevemente con agua destilada.
8. Neutralizar en 0.5 M Tris-HCl, 0.15 M NaCl (pH 7.5), por 40 minutos. (118,124)

3.3.1.6 PREPARACIÓN DE PRUEBA

Utilizando el protocolo estándar, generar pruebas marcadas 32P y remover los nucleótidos que no se incorporaron. Neutralizar la solución prueba adicionando 0.5 volúmenes de 1 M Tris-HCl, pH 7.5. Posteriormente, se realiza la hibridación mediante el método antes descrito. (118)

3.3.2 ELECTROFORESIS

3.3.2.1 BUFFERS PARA ELECTROFORESIS

Durante la electroforesis, el agua se electroliza, lo que genera la presencia de protones en el ánodo y iones hidroxilo en el cátodo. La terminal catódica, dentro de la cámara de electroforesis, se torna básica y el ánodo, ácido. El empleo de un sistema de buffers se necesita cuando las moléculas cargadas sufren la electroforesis a través de un medio de separación. Los dos buffers comúnmente utilizados son Tris-acetato con EDTA (TAE; 40 mM Tris-acetato, 1mM EDTA) y Tris-borato con EDTA (TBE; 89 mM Tris borato, 2 mM EDTA). Debido a que el pH de estos buffers es básico, la columna de fosfato del DNA tiene una carga negativa neta y migra hacia el ánodo. (19,146)

3.3.2.1.1 PROPIEDADES DE LOS SISTEMAS BUFFER TAE Y TBE

A pesar de la similitud entre TAE y TBE, cada uno posee diferentes propiedades que los hacen útiles para diferentes aplicaciones. (19)

BUFFER	USOS Y COMENTARIOS
TAE	Se emplea cuando se desea recuperar DNA. Para uso en electroforesis de DNA de gran tamaño (> 12 kb). Propiedades: Capacidad Buffer baja- puede ser necesaria la recirculación para mayores tiempos electroforéticos.
TBE	Se emplea para electroforesis de DNA de menor tamaño (< 1 kb). Mejor resolución de DNA pequeño (< 1 kb) Propiedades: Disminuye la movilidad del DNA. Alta capacidad de buffer- no requiere la recirculación para mayores tiempos de electroforesis.

Cuadro 9.- Propiedades principales de los sistemas buffer TAE y TBE. (19)

Cuando no es necesaria la recuperación de DNA, se pueden emplear los dos sistemas (1x ó 0.5x) cuando el DNA es menor a 12-15 kb. Para DNA de mayor tamaño, el mejor sistema a utilizar es TAE en combinación con una baja fuerza de campo. Durante estas extensas corridas electroforéticas, la gran porosidad del gel y la baja fuerza de campo, disminuye la tendencia del DNA a ennegrecerse. (19,146)

El sistema TBE se prefiere para la separación de DNA pequeño (< 1 kb) cuando no se requiere la recuperación del DNA. La interacción del buffer TBE con agarosa resulta un tamaño pequeño aparente de poro. (19)

Cualquiera que sea el buffer a emplear, la profundidad sobre el gel en un sistema electroforético horizontal debe ser de 3-5 mm. Una cantidad menor de buffer haría que el gel se seque durante la electroforesis. Exceso de profundidad de buffer, disminuye la movilidad del DNA, promueve una distorsión de la banda y produce una mayor cantidad de calor dentro del sistema. (19)

El agotamiento del buffer se ve influido por el buffer empleado y su capacidad como tampón. Un TBE 0.5x tiene una mayor capacidad que un TAE 1x, debido a que el pKa del borato se acerca más al pH del buffer inicial que el acetato. Cámaras de electroforesis de tamaño standard (15 x 30 cm) con 1.5 a 2 kb de capacidad, toleran 40 a 50 horas-watt antes del agotamiento del buffer, éste no ocurre en cámaras mini-electroforéticas por 10 a 13 horas-watt. (19)

Evidencias del agotamiento del buffer son:

1. Gel derretido
2. DNA quemado
3. Sobre calentamiento (19)

Estos efectos, así como el desarrollo del gradiente de pH se pueden reducir recirculando el buffer. Esto es solamente necesario cuando se realizan electroforesis por tiempos prolongados o si la capacidad del buffer es muy baja. (19)

3.3.2.1.2 PREPARACIÓN DE BUFFER

50x TAE (Tris-acetato)	5x TBE (Tris-borato)
*1x = 40 mM base tris 40 mM ácido acético 1mM EDTA	*1x = 89 mM base tris 89 mM ácido bórico 2 mM EDTA
242.0 g base tris	*0.5x = 45 mM tris-borato 1mM EDTA
57.1 ml ácido acético glacial	54.0 g base tris
18.61 g Na ₂ EDTA·2H ₂ O	27.5 g ácido bórico
a 1 litro de agua destilada	3.72 g Na ₂ EDTA·2H ₂ O
	a 1 litro de agua destilada

Cuadro 10.- Preparación de las soluciones buffer TAE y TBE. (19,146)

3.3.2.1.3 OTROS SISTEMAS BUFFER

Buffer tris-fosfato (TPE) puede ser también utilizado para electroforesis de DNA. Como el TBE, el TPE posee una gran capacidad buffer, pero no interfiere en los procedimientos de recuperación. Sin embargo, no puede emplearse cuando DNA recuperado se usará en una reacción fosfato-sensitiva. (146)

10x Tris-fosfato (TPE)
1x = 90 mM base tris
90 mM ácido fosfórico
2mM EDTA
108.0 g base tris
15.5 ml ácido fosfórico al 85%
7.44 g Na ₂ EDTA 2H ₂ O
a 1 litro de agua destilada

Cuadro 11.- Preparación del sistema buffer tris-fosfato. (146)

3.3.2.1.4 UREA EN GELES DE AGAROSA

La presencia de urea inhibe la gelatinización de la agarosa interfiriendo con hidrógeno que se vincula con las cadenas polisacáridas de agarosa. Para evitar este problema, debe prepararse cuidadosamente el gel y someterlo a refrigeración, generalmente durante la noche. El gel resultante será más fragmentado que un gel de agarosa regular. Por esta razón, no es recomendable marcar el gel (gotas). (19)

Los geles de agarosa-urea pueden prepararse disolviendo agarosa en un volumen pequeño de agua o buffer, enfriando a 50 °C y adicionando urea durante la agitación. La disolución de urea cristalina, ultrapura o concentrada, es un proceso endotérmico. A pesar de que la solución se enfría notablemente aumentando la viscosidad, la solución no forma gel. Una vez que la urea se ha disuelto, ajustar el peso/volumen deseado con agua destilada o buffer y refrigerar toda la noche. (19,146)

3.3.2.1.5 VOLTAJE ÓPTIMO Y TIEMPOS ELECTROFORÉTICOS

La distancia utilizada para determinar el voltaje a emplear, es la que hay entre los electrodos, no el largo del gel. Si el voltaje es muy alto, para DNA >12-15 kb, resultará en un rayado de la banda. Cuando el voltaje es muy bajo, la movilidad de pequeños DNA (< 1 kb) se reduce y la banda presenta ensanchamiento debido a la dispersión y difusión. (19)

El buffer también juega un importante papel en la agudeza de la banda. Esta tiende a ser mejor para DNA pequeños en geles TBE, así como para DNA mayores, es preferente utilizar TAE. (19)

TAMAÑO	VOLTAJE	BUFFER	
		RECUPERACIÓN	ANALÍTICO
≤ 1 kb	5 V/cm	TAE	TBE
1 A 12 kb	4-10 V/cm	TAE	TAE/TBE
> 12 kb	1-2 V/cm	TAE	TAE

Cuadro 12.- Voltajes, tiempos y sistemas buffer óptimos para la mayor agudeza de la banda. (146)

Debe correrse el gel hasta que la banda de interés haya migrado en un 40 o 60 %. Ensanchamiento de la banda, resultado de la dispersión y difusión, trae como consecuencia una menor resolución en la tercera parte inferior del gel. La resolución puede disminuir en geles pequeños, pues corridas electroforéticas más largas resultan en una mejor separación entre dos fragmentos. (19)

3.3.2.1.6 CARGAMENTO DE DNA Y BUFFERS

La cantidad de DNA en un gel depende de varios factores:

1. Volumen del pozo.
2. Tamaño del fragmento: La capacidad del gel cae notablemente si el tamaño del fragmento incrementa, especialmente sobre unos pocos kb.
3. Distribución de los fragmentos.
4. Gradiente de voltaje: Gradientes de voltaje altos son apropiados para fragmentos de DNA < 1 kb, mientras que en el caso contrario se utilizan menores voltajes (> 1 kb).

La menor cantidad de DNA que puede detectarse en una sola banda es de aproximadamente 10 ng, 60 pg. o 100 ng.

El cargamento de buffers en un gel tiene tres objetivos en la electroforé시스:

1. Incrementa la densidad de la muestra.
2. Agrega color a la muestra: Simplifica el cargamento
3. Agrega movimiento del colorante: El colorante migra en un campo eléctrico hacia el ánodo en rangos predecibles, lo que nos permite monitorear el proceso electroforético. (19,146)

Para incrementar la agudeza de las bandas de DNA, se emplea el polímero ficoll (tipo 400) en lugar de glicerol. El uso de glicerol, con peso molecular menor, permite al DNA fluir en el pozo antes de comenzar la electroforesis, lo que da como resultado una banda en forma de "U". En geles TBE, el glicerol interactúa con el borato, alterando el pH del medio. (158)

3.3.2.2 ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

En ciertas circunstancias, la electroforesis de proteínas en geles de agarosa tienen ventajas comparadas con los geles de poliacrilamida. Por ejemplo, los geles de agarosa son no tóxicos, así que pueden utilizarse inclusive en laboratorios donde se imparta enseñanza. La recuperación de proteínas es muy eficiente en agarosa; las bandas de proteínas en agarosa pueden utilizarse para inmunizar animales directamente en la producción de anticuerpos, o las proteínas pueden recuperarse en un gran campo de geles de agarosa con procedimientos simples. Finalmente, los geles de agarosa pueden separar fácil y efectivamente proteínas de altos pesos moleculares. (88)

3.3.2.2.1 AGAROSAS

Analizando el gel: Un gel de agarosa MetaPhor 4% descompone proteínas de 20 kDa a 200 kDa. Para proteínas hasta 600 kDa, utilizar concentraciones menores de agarosa MetaPhor (menor a 2%). Para proteínas mayores a 600 kDa, se recomienda el uso de agarosa SeaKem Gold, o SeaPlaque en caso de requerir un punto de fusión menor al de la agarosa. Cualquiera de estas agarosas dará como resultado una muy buena resolución y fuerza al utilizar concentración de 2% o menos. (19)

3.3.2.2.2 CONCENTRACIONES DE AGAROSA SUGERIDAS PARA ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS

TAMAÑO DE LA PROTEÍNA RANGO (kda)	AGAROSA SUGERIDA	CONCENTRACIÓN
20 a 200	MetaPhor	4.0 %
100 a 300	MetaPhor	3.0 %
300 a 600	MetaPhor	2.0 %
600 a 1000	SeaKem Gold o SeaPlaque	1.5 %
1000 a 5000	SeaKem Gold o SeaPlaque	1.0 %

Cuadro 13.- Concentración de Agarosa para electroforesis de proteínas. (146)

3.3.2.2.3 PREPARACIÓN, CARGA Y ELECTROFORESIS DE MUESTRAS DE PROTEÍNAS

Suspender las muestras de proteínas en buffer, y si es necesario, desnaturalizar las proteínas incubando a 95 °C - 100 °C. (19)

Cargar las muestras en pozos. La cantidad de proteína que se puede cargar en los geles de agarosa es esencialmente la misma que para geles de poliacrilamida de las mismas dimensiones, grueso y ancho. Dependiendo de la proteína, la cantidad mínima detectable por colorante azul brillante Coomassie es de 1 µg. Cantidades mayores de proteína se pueden cargar, pero el grueso de la banda incrementa considerablemente. (19)

Condiciones típicas de electroforesis:

Horizontal (0.2 a 0.3 cm de grueso, 5.3 x 8.5 cm): 100 volts de voltaje constante durante 3 a 4 horas. (146)

Vertical (14.5 x 16.5 x 0.1 cm): 25 m a corriente constante de aproximadamente 80 volts al inicio y 200 volts al final por 3 a 3.5 horas. (146)

Mini vertical (8 x 10 x 0.1 cm): 20m a corriente constante de aproximadamente 50 volts al inicio y 120 volts al final por 1.5 a 2 horas. (146)

Nota: Evitar corrientes mayores pues el calor generado puede derretir la agarosa. Geles verticales más anchos requieren voltajes mayores proporcionadamente con su tamaño. Someter a electroforesis el gel hasta que el colorante viaje hasta el fondo del gel. Alternativamente, marcadores de peso molecular precoloreados se pueden utilizar para determinar los tiempos electroforéticos. (19)

3.3.2.2.4 TINCIÓN CON AZUL BRILLANTE COOMASSIE

MetaPhor y otros geles de agarosa pueden arreglarse y tñirse con solución azul brillante Coomassie, que consiste en un 40 % de metanol, 10 % de ácido acético glacial y 0.2 % de colorante azul brillante R-250. Los geles son posteriormente desteñidos en una solución de 20 % de metanol, 5 % ácido acético glacial. Generalmente, los geles de agarosa requieren de mayor tiempo de tinción que los geles de poliacrilamida de dimensiones similares. Un gel de agarosa MetaPhor de 14 x 16.5 cm, 1 mm de grueso, se tiñe en 1 a 3 horas, dependiendo de la concentración proteínica. Cuatro horas adicionales se requieren para desteñir el gel. Frecuentemente se presentan cambios del buffer que aceleran el proceso. Geles más gruesos o de mayor concentración necesitan más tiempo de tñido y desteñido. No debe mantenerse el gel en la solución 2 pues el gel se fracturará. Geles hidratados pueden almacenarse en solución de glicerol al 5%, o por secado como se describe a continuación. (124)

3.3.2.2.5 SECADO Y PRESERVACIÓN DEL GEL

Los geles pueden secarse en papel de cromatografía en una secadora por vacío, previendo que el gel no se caliente a más de 50 °C. Colocar el gel entre una hoja de papel cromatografía Whatman 3MM por un lado, y una envoltura plástica por el otro formando un sandwich. Desalojar cualquier burbuja o restos de aire dentro del sandwich. Poner varias hojas de papel cromatografía en la secadora del gel y colocar el gel de manera que el papel 3MM mire hacia la fuente de vacío. Geles de 1 mm de grueso requieren al menos de 4 horas de secado completo. (19,124,146)

3.3.2.2.5.1 SECADO POR PRESIÓN

El gel desteñado se coloca en un baño de glicerol 5% por una hora. Enjuagar brevemente con agua destilada y acomodar el gel viendo hacia una toalla de papel. Colocar una hoja Whatman 3MM de papel cromatografía humedecido con agua destilada en la superficie del gel. Sobreponer el papel cromatografía con 6 capas de toallas de papel absorbente. Colocar un plato de vidrio ,con un peso de 1 a 2 kg, sobre las toallas y dejar secar durante una hora. (124)

Remover el peso, plato de vidrio y toallas. Rehumedecer el papel en su totalidad, con agua destilada y retirar de la superficie del gel. (19)

Sujetar en GelBond film, hacia arriba, sobre el plato de vidrio para prevenir que se frunza durante el secado. Secar el gel en un horno a 50 a 55 °C durante 15 minutos, o a temperatura ambiente durante la noche. Si se expone el gel a sobreseca puede agrietarse. (146)

3.3.2.2.5.2 SECADO AL VACÍO

Cubrir el gel con una pieza húmeda de papel cromatografía Whatman 3MM.

Colocar varias hojas de papel cromatografía en el secador y poner el gel sobre éstos para que el GelBond film se encuentre alejado de la fuente de vacío.

Secar el gel bajo vacío a temperatura de 55 °C durante 4 horas.

Remover el papel cromatografía mojando con un poco de agua destilada para retirar de la superficie del gel. (88)

3.3.2.2.6 AUTORADIOGRAFÍA

Después del secado, los geles de agarosa pueden exponerse directamente a película de rayos X. (19,146)

3.3.2.2.7 FLOUROGRAFÍA

No se debe sumergir un gel MetaPhor u otro gel de agarosa en solución de fluorografía si los geles se encuentran unidos a GelBond film. Soluciones que contienen altas concentraciones (> 50 %) de DMSO no deben emplearse pues pueden disolver la agarosa. Soluciones preparadas comerciales precipitan el fluor en la matriz del gel de agarosa y trabajan mejor. El gel impregnado con fluor pueden entonces secarse en un filtro de papel al vacío a < 0 55 °C y luego exponerse a rayos X. (19)

3.3.2.2.8 ELECTROBLOTTING

Las proteínas pueden someterse a electroblotting fuera de los geles de agarosa a membranas (nitrocelulosa, PVDF, etc.) empleando los mismos métodos que para geles de poliacrilamida, si el gel de agarosa no se encuentra adherido a GelBond film, no se puede realizar electroblotting a través de GelBond film. El tiempo requerido para la transferencia óptima de proteínas específicas no necesita ser determinado experimentalmente. Proteínas pequeñas transfieren más rápido que las proteínas grandes. En general, las proteínas transfieren más rápido en geles de agarosa que en los de poliacrilamida al 15 %. Una vez transferidas a la membrana, se detectan por cualquier número de métodos. (93)

3.3.3 RECUPERACIÓN DE PROTEÍNAS

Incremento en la Eficiencia de Recuperación de DNA de Geles de Agarosa

1. Selección de la agarosa apropiada
 2. Selección del buffer para electroforesis apropiado
 3. Pruebas para gel y cargamento de DNA
 4. Teñido y recuperación (19,146)
-
1. Cuando se desea recuperar DNA, la elección de agarosa es uno de los factores más importantes. (83)

	Agarosa SeaKem GTG	Agarosa SeaPlaque GTG	Agarosa NuSieve GTG	Agarosa MetaPhor	Agarosa SeaPlaque
Reacciones en- gel		*	*		
β -Agarasa		*	*		*
Fenol/Cloroform o		*	*		*
Columnas de recuperación	*	*	*	*	*
Electroelución	*	*	*	*	*
Congelar/Presio nar	*	*	*	*	*
Membrana DEAE	*	*	*	*	*

Cuadro 14.- Recuperación de proteínas utilizando diferentes agarosas. (106)

2. Tipos de Buffer.- Cuando se recupera DNA de geles de agarosa, se recomienda el empleo de 1x Tris-acetato (TAE) para la electroforesis. (83)

3. Pruebas y cargamento

- Preparar el gel en buffer 1x TAE.
- No probar el gel con bromuro etílico.
- Probar un gel de 3-4 mm de grueso.
- Usar un peine de 1 mm de grueso.
- No cargar más de 100 ng de DNA por banda. (83,106)

4. Teñido y recuperación.- Cuando se recupera DNA se recomienda lo siguiente:

- Teñir el gel de 15 a 20 minutos. Desteñir el gel en agua destilada, 20 minutos de lavados.
- No exponer el DNA a la luz ultravioleta por más de un minuto. Exposición más larga del DNA puede hacer muescas en el mismo.
- La adición de guanosina 1 mM o citadina al gel y buffer para electroforesis es efectiva para la protección del DNA contra los daños inducidos por UV.
- Cortar la menor cantidad de gel posible. (83,106)

Es posible evitar muestras teñidas utilizadas en la recuperación corriendo un camino adicional que contenga una pequeña cantidad de la muestra inmediatamente después del marcador de peso molecular; aún así, el DNA se daña con UV en ausencia del bromuro etílico, mantener la exposición a UV de manera breve. (83)

3.3.3.1 RECUPERACIÓN DE DNA β -AGARASA DE GELES DE AGAROSA

La β -agarasa es una enzima que degrada polisacáridos de agarosa a oligosacáridos solubles en alcohol. El DNA en gel de agarosa de baja temperatura de fusión puede recuperarse después de fundirse el gel y de la degradación por acción de la enzima. Los restos oligosacáridos no interferirán con las manipulaciones subsecuentes del DNA como el marcado de clones, restricción de degradación o secuenciación. La β -agarasa se encuentra libre de cualquier Dnasa, Rnasa y actividades de fosfatasa, detectables. La recuperación por β -agarasa es particularmente útil para la obtención de DNA grandes (> 10 kb) que pueden compartirse con otros métodos de recuperación. (43,96)

3.3.3.1.1 AGAROSAS COMPATIBLES

- Agarosa SeaPlaque GTG (certificada y probada para la recuperación de DNA).
- Agarosa NuSieve GTG (certificada y probada para la recuperación de DNA)
- Agarosa SeaPlaque
- Agarosa MetaPhor (43)

3.3.3.1.2 TIPS

- Transferir no más de 200 mg de gel de agarosa a un tubo de microcentrifugación para el equilibrio con el buffer degradante.
- Permitir que el gel se funda por completo antes de la adición de la enzima.
- Las precipitaciones de etanol deben incubarse a temperatura ambiente con acetato de amonio más que con acetato sódico, para disminuir la posibilidad de precipitación de los oligosacáridos de la agarosa con la quinasa polinucleótida del DNA, inhibida por ion amonio ≥ 7 mM. Utilizar acetato sódico para la precipitación si se desea fosforilar el DNA después de recuperarse.
- La preparación de la enzima retiene actividad completa por varias horas a 45 °C; sin embargo, la actividad disminuirá gradualmente en incubaciones largas. Por esta razón, debe incubarse durante la noche para la degradación a 40 °C.

- Para una recuperación eficiente de ácidos nucleicos pequeños (< 500 bp) y/o muestras muy diluidas (< 0.05 µg/ml), se recomienda la adición, tanto de tRNA, como de nucleasa libre de glicógeno. Además, la precipitación durante la noche a temperatura ambiente puede ser útil.
- La preparación de la enzima tiene una actividad máxima entre pH 6 y 7 y es relativamente poco afectado por la concentración de sales entre 0.1 y 0.25 M. El equilibrio del gel con buffer β-agarasa es necesario para proveer a la enzima con condiciones buffer óptimas. Este equilibrio es más importante para geles preparados en TBE que en TAE, debido a la gran capacidad buffer de TBE.
- El etanol precipita al DNA a temperatura ambiente o en hielo. La precipitación de DNA más efectiva se le atribuye a 0 a 22 °C, más que a -20 a -70 °C. A temperaturas más altas, los campos son más consistentes y se evitará la precipitación de los oligosacáridos. (43,96)

3.3.3.1.3 DEFINICIÓN DE UNIDAD β-AGARASA

Una unidad de β-agarasa degrada por completo 2 mg de gel de agarosa SeaPlaque GTG 1%, fundido, que ha sido dializado en buffer 1x β-agarasa en una hora a 40 °C. (96)

Concentración: 1 unidad por µL. (96)

3.3.3.1.3.1 MATERIALES

- Tubos de microcentrifugación (≥ 1 ml).
- Dos baños de agua o parrillas.
- Escalpelo o navaja.
- Microcentrifuga. (96)

3.3.3.1.3.2 REACTIVOS

- Agarosa SeaPlaque, SeaPlaque GTG, o NuSieve GTG.
- Tinción de ácido nucleico GelStar, tinción con SYBR verde I, o bromuro etílico.
- Buffer β-agarasa.
- Enzima β-agarasa.
- Acetato de amonio 10 M.
- Etanol 100%. (96)

3.3.3.1.3.3 PROCEDIMIENTO PARA LA DEGRADACIÓN β -AGARASA

PASO	ACCIÓN
Antes de comenzar	Ocupar un baño maría o parrilla a 70 °C, y otro a 45 °C.
1	Someter el DNA a electroforesis en gel de agarosa de baja temperatura de fusión (como agarosa SeaPlaque, SeaPlaque GTG o NuSieve GTG, que han sido preparados en buffer TAE o TBE).
2	Teñir el gel brevemente con colorante GelStar, SYBR verde I o con bromuro etílico.
3	Fotografiar el gel.
4	Cortar una tira de gel que contenga muestra del DNA de interés.
5	Colocar la tira de gel en un tubo para microcentrifugación.
6	Equilibrar la tira de gel con 10 volúmenes de buffer 1x β -agarasa durante 60 minutos a temperatura ambiente; de otra manera, seguir los pasos mencionados a continuación: 6.1.- Fundir la tira de gel a 70 °C durante 15 minutos. Asegurarse que la tira de gel se encuentra completamente fundida puesto que la enzima no degradará la agarosa en estado de gel. 6.2.- Adicionar 2 μ l de buffer 50x β -agarasa a aproximadamente 100 μ l de solución de gel fundido. 6.3.- Mezclar la solución. 6.4.- Proceder al paso 10
7	Descartar el buffer
8	Derretir la tira de gel a 70 °C (aproximadamente 15 minutos)
9	Enfiar la agarosa fundida a 45 °C.
10	Agregar una unidad de β -agarasa por 200 ml de gel de agarosa al 1% (agregar proporcionalmente la preparación de la enzima para diferentes tamaños de tiras de gel, o con más altas o bajas concentraciones de agarosa, respectivamente). Por otro lado, si se siguieron los pasos 6.1 a 6.4, la cantidad de enzima a emplear debe ajustarse. Si el gel se preparó con buffer TAE: se necesitará doble cantidad de enzima. Con buffer TBE: se necesitarán siete veces la cantidad de enzima.
11	Mezclar
12	Incubar a 45 °C por 60 minutos.
13	Cuando el DNA es: \leq 30 kb: Centrifugar la solución en la microcentrifuga durante 5 minutos, a temperatura ambiente. Continúe con el paso 14. 30 kb: La solución β -agarasa puede usarse directamente sin

	precipitación para manipulaciones enzimáticas subsecuentes. O: la muestra puede concentrarse sin precipitación con etanol por centrifugación.
14	Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo de microcentrifugación.
15	Adicionar acetato de amonio al sobrenadante a una concentración final de 2.5 M.
16	Agregar 2 a 3 volúmenes de etanol al 100 %.
17	Si el DNA es $\leq 0.05 \mu\text{g/ml}$: precipitar a temperatura ambiente por 24 horas y agregar 10 μg de tRNA. Si el DNA es $> 0.05 \mu\text{g/ml}$: precipitar a temperatura ambiente por 30 minutos.
18	Recolectar el precipitado por centrifugación.

Cuadro 15.- Degradación de β -Agarasa. (43,96)

3.3.3.2 ELECTROSEPARACIÓN DE DNA DE GELES DE AGAROSA

La electroseparación es un método seguro y consistente de recuperación. El DNA recuperado es adecuado para un amplio rango de aplicaciones. Para fragmentos pequeños, un campo típico puede ser 50-85 %, pero a medida que la longitud incrementa, el campo cae hasta 20 %. El procedimiento descrito a continuación describe la electroseparación de DNA a bolsas de diálisis. (30,85)

3.3.3.2.1 AGAROSAS COMPATIBLES

- Agarosa SeaKem GTG (certificada y probada para recuperación de DNA).
- Agarosa SeaPlaque GTG (certificada y probada para recuperación de DNA).
- Agarosa NuSieve GTG (certificada y probada para recuperación de DNA).
- Agarosa SeaPlaque.
- Agarosa NuSieve 3:1, Agarosa MetaPhor. (30,85)

3.3.3.2.2 TIPS

- Someter DNA a electroforesis en buffer 1x TAE.
- Tener 1 μg de DNA en la banda de interfase.
- Minimizar la exposición de DNA a la luz UV no más de un minuto.
- Cortar la tira de gel del menor tamaño posible. (58)

3.3.3.2.3 MATERIALES

- Escalpelo o navaja.
- Espátula. Tubo de diálisis.
- Clips para tubos de diálisis.
- Cámara electroforética.
- Lámpara de luz UV de mano.
- Tubo de plástico disponible.
- Pipeta Pasteur. (30,85)

3.3.3.2.4 REACTIVOS

- Buffer 1x TAE
- Bicarbonato de sodio 2 % EDTA 1mM pH 8.0 preparado en agua destilada.
- Agua destilada.
- GelStar, SYBR verde I o Bromuro etílico. (30,85)

3.3.3.2.5 PROCEDIMIENTO: TUBOS PARA DIÁLISIS

PASO	ACCIÓN
1	Cortar los tubos en piezas de 10 a 20 cm de largo.
2	Hervir durante 10 minutos en un gran volumen de bicarbonato sódico 2%/ EDTA 1 mM, pH 8
3	Lavar los tubos con agua destilada.
4	Hervir durante 10 minutos en EDTA 1 mM, pH 8.0
5	Enfriar tubos
6	Almacenar a 4 °C inmerso en EDTA 1 mM, pH 8.0

Cuadro 16.- Procedimiento empleado para tubos para diálisis. (58)

3.3.3.2.6 PROCEDIMIENTO PARA ELECTROSEPARACIÓN DE DNA A PARTIR DE GELES DE AGAROSA

PASO	ACCIÓN
1	Someter DNA a electroforesis en gel de agarosa.
2	Teñir el gel con colorante GelStar, SYBR verde I, o bromuro etílico.
3	Localizar la banda de interés utilizando UV. Minimizar la exposición del DNA en UV a menos de 1 minuto.

4	Cortar la banda de interés con ayuda de un escalpelo o navaja.
5	Humedecer una espátula con buffer 1x TAE.
6	Colocar la tira de agarosa que contiene al DNA sobre la espátula húmeda.
7	Fotografiar el gel.
8	Sellar un extremo del tubo de diálisis con un clip especial.
9	Llenar la bolsa hasta el tope con buffer 1x TAE.
10	Transferir la tira de agarosa a la bolsa con un espátula.
11	Permitir que la tira de agarosa se sumerja al fondo de la bolsa.
12	Remover el buffer de la bolsa de diálisis dejando lo justo para mantener la tira de gel en constante contacto con el buffer.
13	Sujetar la bolsa de diálisis por sobre la tira de gel evitando la formación de burbujas.
14	Colocar una capa superficial de buffer 1x TAE en una cámara de electroforesis.
15	Colocar la bolsa en la cámara de electroforesis inmersa en el buffer.
16	Pasar corriente eléctrica a través de la bolsa por 2 o 3 horas. Durante este tiempo el DNA se separa fuera del gel a la pared interna del tubo de diálisis. Este proceso puede monitorearse con lámpara de mano de luz UV. Exponer a la luz UV brevemente.
17	Revertir la polaridad de la corriente. Esto removerá al DNA de la pared de la bolsa.
18	Sacar la bolsa de la cámara electroforética.
19	Dar un masaje suave a la bolsa, empleando guantes, del lado en el que el DNA se ha acumulado. Esto removerá el DNA de la pared de la bolsa. Este proceso puede monitorearse con la ayuda de una lámpara de mano de luz UV; la exposición debe ser breve.
20	Abrir la bolsa de diálisis.
21	Transferir todo el buffer que rodea la tira de gel a un tubo plástico.
22	Lavar la bolsa con una pequeña cantidad de buffer 1x TAE.
23	Transferir la solución a un tubo plástico.
24	Remover la tira de gel de la bolsa.
25	Opcional: teñir la tira con SYBR verde I o con bromuro etílico para asegurar que todo el DNA se separó de la tira.
26	Purificar el DNA de la solución 1x TAE utilizando extracciones fenol/cloroformo

Cuadro 17.- Procedimiento para la electroseparación de DNA. (30,85)

Después de la electroseparación, se recomienda que el DNA se purifique posteriormente con extracciones de fenol/cloroformo seguidas de precipitación por etanol. Los oligosacáridos y otros contaminantes, pueden co-purificarse con el DNA. La extracción con fenol remueve cualquier oligosacárido, evitando la co-precipitación con etanol. (58)

3.3.3.3 EXTRACCIÓN DE DNA CON FENOL/CLOROFORMO DE GELES DE AGAROSA

3.3.3.3.1 AGAROSAS COMPATIBLES

- Agarosa SeaPlaque GTG (certificada y probada para recuperación de DNA).
- Agarosa NuSieve GTG (certificada y probada para recuperación de DNA).
- Agarosa SeaPlaque. (23,147)

3.3.3.3.2 TIPS

Las fallas en la recuperación cuando se extrae DNA de geles de agarosa utilizando fenol/cloroformo comúnmente resultan por una extracción de una porción de agarosa muy grande , o por precipitación de agarosa junto con DNA durante este paso. Como tratamiento de estas dificultades se recomienda lo siguiente: (23,147)

- No más de 200 mg (200 ml) de agarosa deben extraerse en un sólo tubo. Si la tira de gel es mayor a esta cantidad, separarla en porciones pequeñas, entonces combinar las soluciones extraídas antes de la precipitación con etanol.
- La precipitación con etanol puede evitarse enfriando la solución extraída en hielo durante 15 minutos. A máxima velocidad de centrifugado anterior a la adición de sales y etanol. El sobrenadante se decanta cuidadosamente, y el DNA se precipita siguiendo los protocolos estándar.
- No se recomienda su uso para DNA grandes (>10 kb). Agitación muy fuerte puede provocar la ruptura del DNA. (23,147)

3.3.3.3.3 REACTIVOS

- SeaPlaque GTG, NuSieve GTG. o Agarosa SeaPlaque.
- Buffer TE calentado a 67 °C.
- Equilibrio buffer-fenol.
- Cloroformo.
- Fenol/Cloroformo 1:1. (23)

Precaución: El fenol causa severas quemaduras. Deben utilizarse guantes, lentes protectores y bata cuando se trabaja con esta sustancia. (147)

3.3.3.3.4 PROTOCOLO

PASO	ACCIÓN
1	Someter DNA a lectroforesis en gel de agarosa de baja temperatura de fusión preparado en 1x TAE.
2	Preparar un baño maría a 67 °C.
3	Precalentar el TE a 67 °C.
4	Cortar un fragmento de gel conteniendo DNA.
5	Colocar la tira de DNA En un tubo de microcentrifugado.
6	Calcular el volumen de la tira. Si la tira es significativamente mayor a 200 mg, romper la tira de agarosa en tamaños más pequeños y colocar cada uno en tubos para microcentrifugado por separado.
7	Derretir la tira de gel a 67 °C por 10 minutos.
8	Adicionar el volumen apropiado de buffer TE (precalentado a 67 °C hasta el momento en que se realicen las extracciones.
9	Adicionar un volumen equivalente de buffer-fenol.
10	Los siguientes pasos pueden realizarse a temperatura ambiente.
11	Agitar por 15 minutos.
12	Centrifugar a la máxima velocidad en microcentrifugado durante 3 minutos.
13	Cuidadosamente, remover la fase acuosa (parte superior). La interfase de restos blancos es la agarosa, que contiene DNA atrapado. Esto puede ser extraído con TE para maximizar el campo.
14	Colocar la fase acuosa en un tubo para centrifugación limpio.
15	Repetir la extracción con fenol.
16	Adicionar un volumen equivalente de fenol/cloroformo a la fase acuosa.
17	Agitar 15 segundos.
18	Centrifugar a la máxima velocidad en centrífuga durante tres minutos.
19	Remover la fase acuosa y colocar en tubo para centrifugación limpio.
20	Repetir la extracción con un volumen equivalente de cloroformo.
21	Enfriar la fase acuosa en hielo durante 15 minutos.
22	Centrifugar a alta velocidad durante 15 minutos en un cuarto frío (4 °C).
23	Cuidadosamente, decantar el sobrenadante a un tubo de centrifugado limpio.
24	Precipitación por etanol del DNA en el sobrenadante siguiendo el protocolo estándar.

Cuadro 18.- Procedimiento de extracción de DNA con fenol/cloroformo de geles de agarosa. (23,147)

3.3.3.4 EXTRACCIÓN DE DNA CONGELAR/PRESIONAR MODIFICADO DE GEL DE AGAROSA

Este protocolo es relativamente rápido y funciona para agarosas de baja y estándar temperaturas de fusión. Igual que en otras técnicas, el campo de DNA disminuye al incrementar el tamaño del DNA. (157)

3.3.3.4.1 AGAROSAS COMPATIBLES

- Agarosa SeaKem GTG (certificada y probada para recuperación de DNA).
- Agarosa SeaPlaque GTG (certificada y probada para recuperación de DNA).
- Agarosa NuSieve GTG (certificada y probada para recuperación de DNA).
- Agarosa SeaPlaque.
- Agarosa MetaPhor. (134)

3.3.3.4.2 MATERIALES

- Tubos para microcentrifugación (≥ 1 ml).
- Cubeta con hielo. Agitador-mezclador.
- Microcentrifuga.
- Escalpelo o navaja.
- Barra agitadora plástica o de vidrio. (134)

3.3.3.4.3 REACTIVOS

- Buffer TE calentado a 67 °C
- Buffer-fenol.
- Cloroformo. Fenol/Cloroformo 1:1 (134)

3.3.3.4 PROCEDIMIENTO

PASO	ACCIÓN
1	Someter el DNA a electroforesis en gel de agarosa preparado en 1x TAE.
2	Cortar una tira del gel que contiene DNA.
3	Colocar en un tubo de microcentrifugado.
4	Calcular el volumen basado en peso.
5	Amasar el gel con una varilla de agitación
6	Adicionar un volumen equivalente de buffer-fenol.
7	Agitar durante 10 segundos.
8	Congelar a -70 °C por 5 a 15 minutos.
9	Centrifugar durante 15 minutos a temperatura ambiente.
10	Remover el sobrenadante que contiene DNA.
11	Colocar el sobrenadante en un tubo de microcentrifugación limpio.
12	Realizar la extracción con fenol/cloroformo al sobrenadante.
13	Seguir con extracción con cloroformo.
14	Precipitación con etanol siguiendo los procedimientos estándar.

Cuadro 19.- Procedimiento para extracción por el método congelar/presionar. (134,157)

3.3.3.5 RECUPERACIÓN DE DNA POR PRECIPITACIÓN CON ETANOL

Este método es compatible con otras técnicas de recuperación ya mencionadas.

3.3.3.5.1 TIPS

- Anterior a la adición de sales y etanol, la precipitación de agarosa puede evitarse enfriando el sobrenadante, centrifugando la(s) muestra(s) en un cuarto frío durante 15 minutos con máxima velocidad de centrifugado. El sobrenadante se decanta cuidadosamente, y el DNA en el sobrenadante se precipita con etanol siguiendo los protocolos estándar.
- Las precipitaciones con etanol deben incubarse a temperatura ambiente con acetato de amonio más que con acetato sódico para disminuir la tendencia de la co-precipitación de los oligosacáridos de agarosa con el DNA o RNA. (147)

3.3.3.5.2 MATERIALES

- Cubeta con hielo.
- Agitador-mezclador.
- Microcentrifuga.
- Secador de gel al vacío.
- Tubos para microcentrifuga (≥ 1 ml). (147)

3.3.3.5.3 REACTIVOS

- Etanol 100% enfriado en hielo.
- Etanol 70 % a temperatura ambiente.
- Buffer TE, pH 8.0.
- Acetato de amonio 10 M. (147)

3.3.3.5.4 PROCEDIMIENTO

PASO	ACCIÓN
1	Enfriar el sobrenadante en hielo por 15 minutos.
2	Centrifugar la muestra en cuarto frío durante 15 minutos a máxima velocidad en microcentrifugadora.
3	Decantar cuidadosamente el sobrenadante.
4	Colocar en un tubo para centrifugado limpio.
5	Medir el volumen de la muestra.
6	Adicionar 0.2 volúmenes de acetato de amonio 10 M a la muestra.
7	Adicionar 2 volúmenes de etanol 100% enfriado en hielo
8	Agitar brevemente.
9	Almacenar la mezcla durante 30 minutos durante la noche a temperatura ambiente.
10	Centrifugar por 30 minutos.
11	Decantar el sobrenadante.
12	Lavar la pílora tres veces con etanol al 70%.
13	Permitir que seque a temperatura ambiente.
14	Secar al vacío por 5-10 minutos.
15	Disolver el DNA en buffer TE.

Cuadro 20.- Procedimiento para la recuperación de proteínas por precipitación con etanol. (68,147)

Las proteínas pueden recuperarse de geles MetaPhor y SeaPlaque. Se recomienda la siguiente técnica: (147)

A. Identificar la región del gel que contiene las proteínas a recuperar. Esto puede realizarse de diferentes maneras. Si el gel se arregla y tiñe con azul brillante Coomassie, destiñéndose después, entonces debe agregarse 1 % SDS a la dilución buffer. La recuperación de proteínas en estado nativo requiere que no se mezclen antes de la recuperación. Métodos para la detección de proteínas que no necesitan mezclado son: (68,147)

1. El uso de marcadores preteñidos de peso molecular como guía para la posición relativa de la proteína deseada en el gel. (147)
2. Realizar blot corto por presión/capilaridad del gel (10 minutos o menos), así, porciones pequeñas de proteínas son transferidas a la membrana para luego teñirse. Si se utilizan marcadores preteñidos, es posible colocar la membrana bajo el gel e identificar la región de interés. (147)
3. El sistema de visualización proteica Promega ChromaPhor permite la identificación de proteínas en geles MetaPhor sin mezclar o teñir. (147)

B. Se recomienda el empleo de Tris/HCl 50 mM, EDTA 1 mM a un pH de 8 y buffer de extracción/dilución. El buffer puede requerir modificaciones dependiendo de la proteína en particular a recuperar y al trabajo a realizar después de la recuperación. El buffer debe ser uno en que la proteína de interés se muestre estable. (68,147)

C. La cantidad de buffer para extracción/dilución agregada se encuentra directamente relacionada con la cantidad de proteína a recuperar: a mayor cantidad de agarosa diluida, mayor cantidad de proteína recuperada. Cantidades mayores al 90% de la proteína puede recuperarse con una dilución de agarosa al 0.5%. Puede realizarse un segundo ciclo de recuperación para proteínas adicionales. (51,68,147)

3.3.3.6 OTROS MÉTODOS DE RECUPERACIÓN A PARTIR DE GELES DE AGAROSA

3.3.3.6.1 ELECTROFORESIS A MEMBRANA DEAE-CELULOSA

Este método es muy eficiente para fragmentos de DNA menores a 5 kb; no se recomienda para la recuperación de una sola cadena de DNA o fragmentos mayores a 15 kb. El DNA se separa en, ya sea, gel de agarosa de bajo punto de fusión, o estándar. Se hace una pequeña incisión en la banda de interés. Se coloca una membrana en la incisión y se

continúa la electroforesis hasta que el DNA se encuentre sobre la membrana. La membrana se remueve del gel y se separa de la misma con ayuda de un buffer de alta fuerza iónica. (166)

3.3.3.6.2 PASO A TRAVÉS DE DEAE-SEFACEL.

El DNA se separa del gel de agarosa de bajo punto de fusión. La banda se corta y se corre a través de una columna que contiene una matriz aniónica. El DNA se une a la matriz y los contaminantes se eliminan. El DNA es entonces separado de la matriz incrementando la fuerza iónica del buffer. (147)

3.3.3.6.3 RECUPERACIÓN DE DNA UTILIZANDO BURBUJAS DE VIDRIO

Se trata de un método extremadamente rápido que tiene como ventaja la acumulación del DNA sin necesidad de precipitar con etanol. Este procedimiento es aplicable para fragmentos > 500 bp. A pesar de que el procedimiento es rápido, puede resultar en campos menores que los esperados empleando extracciones fenol/cloroformo. El DNA se separa en un gel de agarosa de baja o estándar temperatura de fusión. La banda se corta y se funde o disuelve en yoduro de sodio y se trata con suspensión de vidrio/silica en presencia de sal. El DNA es absorbido en las burbujas de vidrio y los contaminantes se eliminan. El DNA se separa con una solución buffer baja en sales. (20,41)

3.3.4 SOUTHERN BLOTTING

De ser posible evitar el uso de geles gruesos (> 4 mm). Geles gruesos requieren de tiempos mayores de electroforesis, de igual manera existe una gran interferencia con la transferencia de ácidos nucleicos a la membrana de hibridación. (93)

Es necesario cubrir el gel de agarosa con buffer para electroforesis tan pronto como la solución de agarosa haya solidificado completamente. La submersión inmediata después de la solidificación previene la formación de una membrana impermeable en la superficie del gel debida a la evaporación de agua del gel. (167)

3.3.4.1 MEMBRANAS

Realizar una elección apropiada de membranas para la aplicación, teniendo en cuenta las siguientes características:

NYLON	NITROCELULOSA
Fuerza alta	Fuerza baja
Muchas pruebas	Pocas pruebas
Buena unión \leq 300 bp	Unión pobre \leq 300 bp
Mejor fondo	Fondo malo

Cuadro 21.- Características más importantes de las membranas de nylon y nitrocelulosa. (42)

3.3.4.2 BLOTTING

1. Con cuidado, humedecer las hojas de papel con 2x SSC a colocar sobre la membrana.
2. Invertir el gel de manera que el lado inferior quede en contacto con la membrana.
3. No utilizar más de 500 g en peso sobre la pila cuando se realiza el blot en un gel de agarosa de 20 x 15 cm. Emplear pesos menores en geles más pequeños.
4. Utilizar un buffer adecuado según las recomendaciones de uso para las membranas. El buffer más recomendable es 10x SSC o SSPE. Ambos transfieren eficientemente DNA de cualquier tamaño a la membrana de nylon, y también permiten una inmovilización en UV aceptable. Para membranas de nitrocelulosa de 20x, se recomiendan los mismos buffers. (42,167)

3.3.4.3 TIEMPOS DE BLOT

El tiempo requerido para una transferencia eficiente depende del grueso del gel, porcentaje de agarosa y el tamaño de los fragmentos a transferir. A pesar de que algunas horas son suficientes para completar la transferencia, algunas condiciones adicionales deben tomarse en cuenta: (42,167)

Permitir 15 a 20 horas de blotting si:

- Se utilizan geles gruesos (> 4 mm).
- Si se emplean geles de alta concentración.
- Detección de una sola copia de genes.
- Transferencia de fragmentos de DNA muy largos (> 15 kb) (42,167)

Para mejorar la eficacia en la transferencia durante blottings prolongados, sustituir las toallas antes de que se saturen. (42,167)

Los tiempos para el blotting pueden reducirse cambiando las toallas por cojincillos comerciales de alta absorción. (42,167)

CONCENTRACIÓN DE AGAROSA	TIEMPO	TAMAÑO DE DNA	EFICACIA
2 %	1.5 horas	<150 bp > 150 bp	>90 % ≈ 75 %
3 %	1.5 horas 3 horas	≤ 700 bp ≤ 700 bp	< 5 % ≈ 90 %
4 %	3 horas 15 horas	≤ 700 bp ≤ 700 bp	< 5 % > 90 %

Cuadro 22.- Tiempos de blotting y eficiencia de transferencia de DNA en geles de agarosa 3:1 (blots alcalinos). (167)

3.3.4.4 BLOTS ALCALINOS

Transferencias alcalinas prolongadas pueden resultar en fondos de hibridación altos. Esto puede minimizarse incubando la membrana en 1x SSC, SDS 1% por 30 minutos a 65 °C después de la inmovilización de DNA, y utilizando una más alta concentración de buffer para prehibridación. (167)

Neutralizar el gel siguiendo un tratamiento ácido y entonces comenzar la transferencia alcalina. De no neutralizarse correctamente antes de la transferencia, puede obtenerse como resultado una baja intensidad en las señales debido a la continuación de la depuración con el gel tratado con ácido. (167)

3.3.4.5 OTRAS TÉCNICAS DE BLOT

Existen otras alternativas para la transferencia de DNA del gel a la membrana de blotting. Como la poliacrilamida, el DNA puede someterse a electroblotting de geles de agarosa, ya sea con un aparato blotting o con equipo electroblotting semi-seco. (42)

El blotting descendente es una alternativa al blotting capilar estándar. No requiere equipo especial, y conlleva a transferencias rápidas y de alta eficacia que los protocolos estándar. Esta técnica utiliza la gravedad para ayudar a la solución buffer a correr a través del gel en lugar de hacerlo hacia arriba por acción capilar. (42)

3.3.4.6 PROTOCOLO

Durante esta técnica deben emplearse guantes.

1. Teñir el gel con bromuro etílico. Para fragmentos de DNA es necesario fotografiar el gel. Puede realizarse la corrida por duplicado (utilizando dos geles y fotografiar). Cada gel tiene dos porciones, una superior y otra inferior. Cuidadosamente debe cortarse el gel en porción superior e inferior; a cada porción se le corta 1 cm, marcar las esquinas que servirán de referencia y realizar el proceso en ambas porciones en paralelo. (167)
2. Transferir el gel a una caja plástica para realizarle el tratamiento siguiente:
3. Si se transfireren fragmentos grandes de DNA (más de 6×10^6) o plásmidos completos entonces bañar el gel en 600 a 800 ml de HCl 0.25 N. Para tratamiento suave (fragmentos) realizar este procedimiento durante 20 minutos, de otra manera requerirá 30 minutos con un cambio de solución. Agitar; el color azul debe convertirse en amarillo durante este paso por la depuración del DNA. (167)
4. Vaciar el HCl y agregar 800 a 1000 ml de NaOH 0.5 N/ NaCl 0.5 M, aunque 500 ml pueden ser suficientes para un gel de tamaño regular. Colocar en el agitador por 30-45 minutos. El color debe cambiar de nuevo a azul en este paso, debido a la desnaturalización de las cadenas de DNA. (167)

Mientras el gel se encuentra en NaOH/NaCl, preparar las membranas para el blotting:

Por cada gel a someter a blotting, (asumiendo las posiciones superior e inferior), preparar:

- 6 piezas de papel Whatman 3MM, 21 x 12cm de tamaño, y dos piezas de Hybond N+, 20 x 10 cm de tamaño.
- Marcar con tinta indeleble la membrana Hybond con el número del blot en la parte inferior del mismo.
- Sumergir Hybond en agua destilada durante 5 minutos.
- Vaciar el agua y adicionar NaOH 0.5 N/NaCl 0.5 M y sumergir en esta solución durante 5 a 10 minutos. (167)

3.3.4.7 PREPARACIÓN DEL SOUTHERN BLOTTING

1. Preparar el aparato para el blotting y adicionar NaOH 0.5 N/ NaCl 0.5 M retirando todas las burbujas posibles de las esponjas. (167)

2. Brevemente sumergir dos filtros Whatman 3MM en NaOH 0.5 N/NaCl 0.5 M y colocarlas en la parte superior de una de las esponjas. Repetir este proceso colocando ahora dos filtros Whatman remojados en la superficie de la otra esponja. Utilizar una pipeta para sacar las burbujas. (167)
3. Cuidadosamente, colocar la porción superior del gel en la primer esponja. Colocar la porción inferior del gel en la esponja más baja.
4. Envolver el gel completamente con tiras de hojas de plástico. Tener cuidado de que no se vean las superficies de las esponjas.
5. Con precaución, colocar las membranas Hybond numeradas sobre las porciones superior e inferior con los números hacia arriba.
6. Brevemente sumergir una pieza de Whatman en NaOH 0.5 N/NaCl 0.5 M y colocar sobre la porción superior del gel. Repetir con la porción inferior del gel, cuidando siempre sacar las burbujas presentes.
7. Colocar 6 u 8 toallas de papel sobre cada filtro Whatman.
8. Colocar hojas plexiglass y una charola (con suficiente agua para cubrir el fondo) sobre las toallas de papel, para mantener todo comprimido.
9. Permitir que el blotting continúe durante 6 horas o toda la noche. (167)

3.3.4.8 PROCESAR SOUTHERN BLOTTING

1. Remover las toallas de papel, etc, y colocar las membranas Hybond en NaOH 0.4 N por un minuto (también puede teñirse el gel, si se desea, para corroborar que el DNA fue transferido). (161,167)
2. Vaciar el NaOH y neutralizar la membrana adicionando Tris 0.2 M/2X SSC por 10 minutos.
3. Colocar la membrana (DNA hacia arriba) en filtros Whatman y dejar secar varios minutos.
4. Transferir las membranas a filtros Whatman nuevos y someter al vacío en un horno a 70 °C durante 2 a 3 horas.
5. Almacenar los blots a temperatura ambiente. (6, lupita)

Para membranas de nylon se realiza el mismo procedimiento antes mencionado, pero el gel y las membranas pueden sumergirse en una solución 6x SSC. Para filtros de nitrocelulosa, hacer el blot en 20x SSC. El filtro de pre-humedecerse antes de colocar el gel. El DNA puede unirse solo por calentamiento en horno. (161)

Para un gel en el que diferentes huellas se hibridarán con diferentes pruebas, hacer blot en el gel completo y remarcar la división del gel. Después del blotting, transferir estas marcas a la membrana y cortar. (161)

Soluciones:

- a. HCl 0.25 N \Rightarrow 11 ml HCl concentrado + 489 ml de agua.
- b. NaOH 0.5 M, NaCl 0.5 M \Rightarrow Solución desnaturalizante.
- c. Tris 0.5 M, NaCl 1.5 M pH 7.4 \Rightarrow Solución neutralizante
- d. 6x SSC, 20x SSC \Rightarrow Solución blotting (93,161)

3.3.5 REACCIÓN EN CADENA DE POLIMERASA (PCR)

Ésta, es una poderosa técnica, que resulta en la rápida producción de copias múltiples de una parte de la secuencia de DNA. PCR ha hecho posible el análisis de fragmentos de DNA en muestras que contienen cantidades de DNA que son demasiado pequeñas o degradadas para permitir otro tipo de análisis de ácidos nucleicos. Como resultado, se ha hecho posible analizar y caracterizar fragmentos de DNA encontrados en cantidades diminutas en lugares como una gota de sangre en la escena de un crimen o la célula de un ser extinto. Este método se emplea ampliamente para investigación en laboratorios a partir de la capacidad de enzimas como la polimerasa de mantenerse estables a altas temperaturas. (25,163)

El método PCR es una reacción cíclica en que el DNA se desnaturaliza por calor para separar las cadenas de la molécula, se incuba en presencia de DNA polimerasa y dos oligonucleótidos cebadores que dirigen a la DNA polimerasa en la síntesis de nuevas hebras complementarias, y sin los cuales sería imposible realizar el proceso. Así, la célula posee otra enzima llamada primasa, que de hecho hace las primeras copias de nucleótidos. Esta extensión de DNA se llama "primer". Una vez elaborado el primer, la polimerasa puede continuar haciendo el resto de la cadena nueva, terminando de esta manera, cada ciclo. Debido a que los productos de un ciclo PCR pueden actuar como modelos para el siguiente, el número de moléculas idénticas nuevas se duplican en número con cada repetición del ciclo. En la naturaleza, la mayoría de los organismos copian su DNA de esta manera. (25,163)

Antiguamente, las DNA polimerasas disponibles se desactivaban cada vez que la temperatura se elevaba para desnaturalizar las cadenas del modelo. Esto significa debía

estable al calor de la bacteria termofílica *Thermus aquaticus* (*Taq*) elimina la necesidad de añadir nueva enzima después de cada etapa de desnaturalización térmica. Cada ciclo de amplificación se controla sencillamente variando la temperatura. (25)

Un tubo de PCR contiene los aditamentos necesarios para realizar la duplicación del DNA: porción de DNA, grandes cantidades de las bases nucleicas, grandes cantidades de la secuencia primer y DNA polimerasa. (25)

Las tres partes de la reacción en cadena de polimerasa se realizan dentro del mismo tubo, pero a diferentes temperaturas. La primera parte del proceso (separación de doble hélice), se realiza calentando el tubo a 90-95 °C durante 30 segundos. (25)

Pero los primers no pueden unirse a las cadenas de DNA a tan alta temperatura, así que el tubo debe enfriarse a 55 °C. A esta temperatura, los primers se unen a los extremos de las cadenas de DNA. Tiempo aproximado de reacción: 20 segundos. (25)

El paso final de la reacción es hacer la copia completa de los modelos. Ya que *Taq* polimerasa trabaja mejor alrededor de los 75 °C, la temperatura del tubo debe subir. La *Taq* polimerasa comienza a adherir nucleótidos al primer y eventualmente hace la copia complementaria del modelo. Si el modelo contiene adenina, la enzima une ésta con timina; de la misma manera une citocina y guanina. (25)

El proceso completo de la reacción en cadena de polimerasa toma menos de dos minutos. Los ciclos pueden repetirse alrededor de 30 o más veces. Cada ciclo duplica un modelo, así que al término de 30 ciclos se habrán formado un millón de copias de una simple porción de DNA. Tomando en cuenta el tiempo que toman los cambios de temperatura en el tubo, un millón de copias se obtienen en 3 horas. (25,163)

CAPÍTULO IV

IMPORTANCIA DE *E.coli* EN LA INDUSTRIA

CAPÍTULO IV

4.1 Importancia de *E.coli* en la Industria

4.1.1 Como Indicador de Higiene

4.1.1.1 Medios de Transmisión

4.1.2 Indicador de Calidad

4.1.3 Industria Alimenticia

4.1.3.1 Procedimientos Analíticos

4.1.4 Industria Ganadera

4.1.4.1 Factores Precipitantes de la Diarrea Indiferenciada Aguda (Diarrea Neonatal) en Becerras

4.1.4.2 Controles Durante el proceso de Manejo de Carne

4.1.5 Industria Farmacéutica y Cosmetológica

4.1.6 Salud Pública en México

4.1.6.1 Objetivo General

4.1.6.2 Metas

4.1.6.3 Estrategias

4.1.6.4 Encuestas

4.1.6.5 Autopsias Verbales

4.1.6.6 Análisis Mensual de Defunciones

4.1 IMPORTANCIA DE *E.coli* EN LA INDUSTRIA

El intestino alberga un número enorme de bacterias y de especies microbianas, en su gran mayoría en el intestino grueso. Las bacterias residentes se encuentran adheridas a las células epiteliales de la mucosa, en nichos ecológicos a lo largo del tubo intestinal, donde se multiplican permanentemente. Además, existe una abundante flora transeúnte que procede del medio ambiente, de la alimentación o de tramos superiores del tubo digestivo, que se encuentra libre en la luz intestinal o asociada con partículas y restos alimentarios. Transita pasivamente y en condiciones normales es incapaz de fijarse y establecerse, y es eliminada al exterior. (51)

En el intestino grueso, el número de bacterias aumenta considerablemente, en comparación con el intestino delgado, debido a la presencia de residuos no absorbibles procedentes de los alimentos (celulosa, aditivos) y del propio organismo (moco, restos celulares, secreción biliar), y puede considerarse como un tanque de fermentación o un quimiostato. *E.coli* es considerada uno de los principales componentes de la flora intestinal; pueden encontrarse también anaerobios no esporulados- cocos grampositivos, anaerobios facultativos- *enterobacterias*, *Pseudomonas*, *S.aureus*, *Lactobacillus*, hongos, protozoarios y virus. (51)

La flora de las heces es enorme, pues representa el 40 % de su peso. Contiene en general todas las bacterias del tubo digestivo, pero no en la misma proporción, y su composición es muy parecida a la del colon; además está relacionada con la dieta. (51)

En los países desarrollados se presenta una mayor cantidad de anaerobios estrictos, mientras que en los países subdesarrollados se observa gran cantidad de especies aerobias y anaerobias. En las heces de la mayoría de la población se encuentra *E.coli*, bacteria indicadora de la contaminación fecal de las aguas. (51)

Teniendo en cuenta la importancia de la flora intestinal, especialmente de la anaerobia, y la gran cantidad de enzimas y productos que vierten al tracto digestivo, es evidente que su existencia influye en:

- la anatomía y fisiología del tubo digestivo (peristaltismo),
 - en la nutrición (síntesis de vitaminas K, tiamina, riboflavina y vitamina B₁₂),
 - en el desarrollo del sistema inmunitario local y en la acción de barrera evitando el establecimiento de los patógenos, especialmente cuando llegan en pequeño número.
- (51)

En este sentido constituye uno de los factores más eficaces de la resistencia general inespecífica, como consecuencia de las interacciones de las diversas especies de la microflora entre sí con el huésped, que dificultan el establecimiento de patógenos. Es una acción

sinérgica que puede ser debida a varios factores: 1) Competición por un sustrato nutritivo o por un receptor celular, 2) Modificación de las condiciones fisico-químicas (disminución de pH, del potencial óxido-reducción), 3) Producción de sustancias inhibidoras. (51)

La administración por vía oral de antibióticos de amplio espectro, al destruir la mayoría de la flora, especialmente la anaerobia, que es la más sensible, anula la acción de barrera y selecciona las especies más resistentes, que ante el vacío ecológico creado encuentran facilidades de multiplicación. (51)

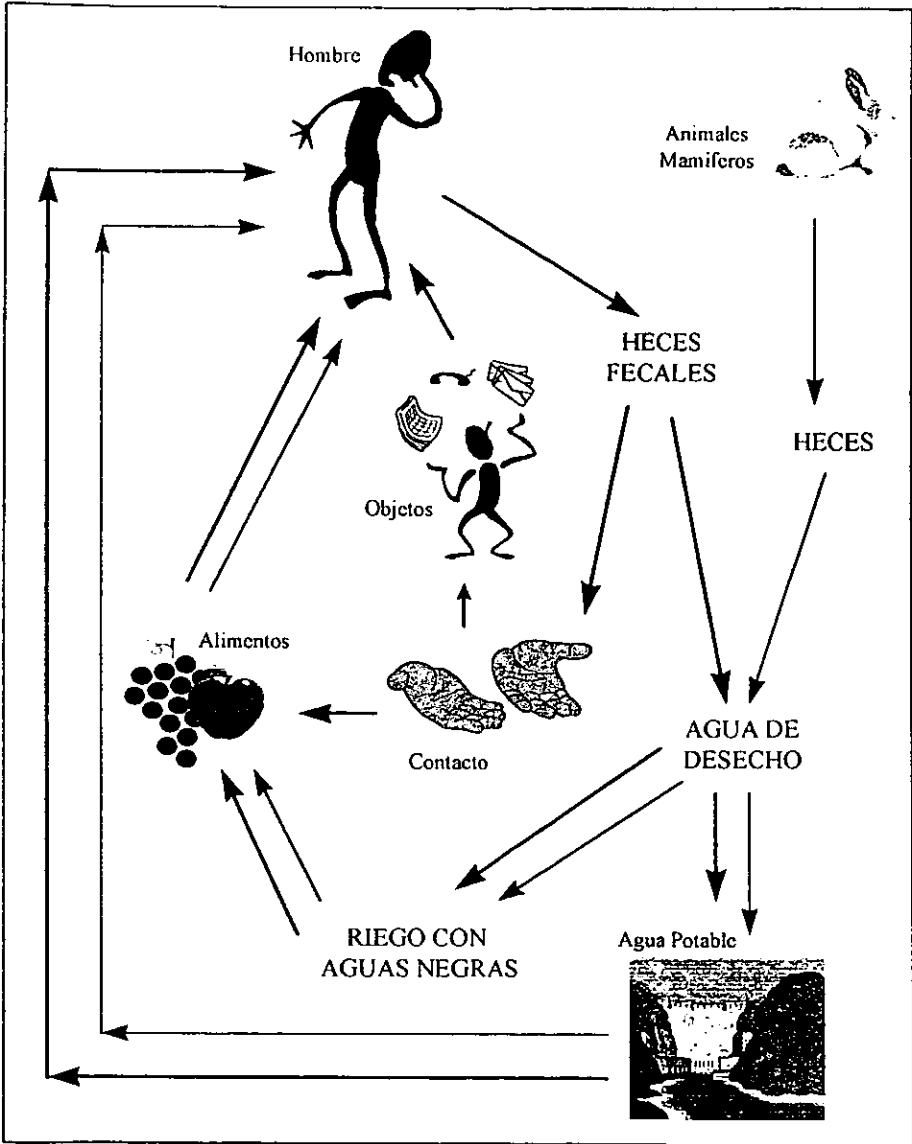


Fig. 21.- Diagrama que muestra el círculo vicioso de contaminación que presenta *E. coli*. (150)

El círculo vicioso de contaminación por *E. coli* comienza por el hombre o animales mamíferos. El hombre o animal portador del microorganismo dispersa al mismo por medio de la defecación. Esta contaminación sigue caminos diferentes:

- Hombre.- Si no se realizan buenas prácticas de higiene, el contacto de las manos contaminadas con alimentos u objetos provocan que personas sanas reciban a la bacteria en su organismo. (150)
- Estas mismas heces fecales viajan a través del agua de desecho, que contamina al agua potable, volviendo al hombre; el agua de riego (aguas negras) entra en contacto con los alimentos, que una vez consumidos causan enfermedades si no se lavan o cocinan correctamente. (150)
- Animales.- Las heces fecales de los animales ensucian, mediante el agua de desecho, al agua potable; de otra manera, al regarse los alimentos se contaminan, provocando trastornos en los seres humanos. (150)

Métodos de control:

- Realizar estudios epidemiológicos de las fuentes de infección y aplicar las medidas de prevención y control más eficaces.
- La población debe ser informada de las medidas preventivas, haciéndose énfasis en el consumo de agua y alimentos seguros, y extremar las medidas higiénicas personales. Desarrollo de una barrera sanitaria con la participación de toda la población.
- Énfasis en el consumo de leche y derivados pasteurizados. Combatir el consumo de leche cruda.
- Vigilancia en los mataderos de ganado bovino para minimizar la contaminación de la carne por contenido intestinal de las reses.
- Las carnes deben ser bien cocinadas, sobre todo la carne molida. Se recomienda un nivel de cocción hasta que desaparezca el color rosado. Todo alimento recalentado debe ser llevado a un punto de cocción.
- Se recomienda que los hornos microondas tengan una potencia superior a 500 W.
- Vigilancia de niveles adecuados de desinfección en los sistemas de abastecimiento de agua y de piscinas. La ebullición del agua es recomendable en lugares donde no es posible contar con sistemas confiables o donde el agua es almacenada a nivel domiciliar. (150)

Control del paciente, de los contactos y del ambiente:

- Notificación a las autoridades sanitarias de los brotes.
- Desinfección concurrente de secreciones fecales y artículos contaminados. En lugares con alcantarillado o buenos sistemas de eliminación de excreta, las heces pueden eliminarse directamente.
- Los contactos con diarrea deberían ser excluidos del manejo de alimentos y el cuidado de infantes o pacientes, hasta que la diarrea termine y se obtengan 2 informes negativos de cultivos de heces para detectar el agente. Estas personas deben ser instruidas acerca del rol que juegan en la diseminación de la enfermedad y en las medidas de prevención fundamentales. (150)

- Excluir a los niños enfermos que presenten diarrea hasta que esta haya parado o se haya detectado la causa de enfermedad.
- Desinfectar los juguetes, baños y utensilios de cocina con un poco de agua clorada.
- Mantener los alimentos refrigerados.
- Usar termómetros para checar la temperatura del refrigerador (38 °C) y congelador (0 °C) o menos.
- Lavar frutas y verduras con agua limpia que se mantenga en movimiento, incluyendo frutas a las que se les quite la cáscara, ya que de atravesarlas con algún utensilio, las bacterias pueden dispersarse al interior.
- Tratamiento específico: el manejo adecuado de la diarrea con soluciones rehidratantes es la medida más importante, en la mayoría de los casos. En pacientes que presentan síndrome urémico-hemolítico o púrpura trombocitopénica trombótica deben aplicarse las medidas específicas en servicios de salud. El tratamiento antibacteriano es incierto.
- Ante situaciones epidémicas es necesario determinar las fuentes de infección (agua y/o alimentos), los mecanismos de transmisión, los grupos más vulnerables, y desarrollar de inmediato medidas de prevención y control, con participación plena de la comunidad y de los medios de comunicación.
- No es recomendable el uso de antibióticos como medicamentos profilácticos.(150)

4.1.1 COMO INDICADOR DE HIGIENE

Es de interés para la población que el mayor número de familias se hagan conscientes y responsables de las medidas higiénicas a adoptar. (54)

En estas enfermedades que fundamentalmente son causantes de procesos diarreicos, son cuatro los medios de transmisión: Manos sucias, Agua, Moscas y Excretas (heces fecales). (54)

Conviene por ello saber cómo se contaminan las manos, agua de bebida, o en la que nos bañamos, cómo esta agua o las moscas contaminan los alimentos, el porqué del peligro que suponen las heces y lo que podemos hacer para evitar estas contaminaciones. (54)

El peligro está fundamentalmente en el hombre enfermo, que alberga los gérmenes en su intestino, eliminándolos al exterior por las heces. Pero aún hay personas más peligrosas, los portadores, que no se dan cuenta de que están enfermos pues no presentan ningún síntoma. (54)

Tanto en un caso como en el otro, los gérmenes eliminados por las heces acaban contaminando todo, agua, suelo, alimentos, manos, ropa etc. (54)

4.1.1.1 MEDIOS DE TRANSMISIÓN

1. Manos Sucias

- La acción de defecar provoca que las manos se ensucien, las cuales, a su vez, pueden contaminar todo lo que tocan. Si alguna persona más toca estos objetos, alimentos, etc. previamente contaminados, ensucia sus manos sin saberlo y, si no tiene la precaución de lavarse, puede introducir en su boca microorganismos. Lo mismo sucede al tener contacto con el suelo, agua, basura, ropa, etc. (54)
- Para evitar esta contaminación deben seguirse las siguientes medidas:
 - a. Lavarse las manos después de ir al baño, con jabón, tratando de limpiar bien hasta las uñas.
 - b. Lavarse las manos antes de comer y no llevarlas sucias a la boca.
 - c. Mantener las uñas cortas, para evitar que se deposite suciedad debajo de ellas.
 - d. Cuando por cualquier motivo tengamos que manejar basura o ropa de enfermos diarreicos, el lavado de manos debe hacerse profundamente y con el mayor cuidado. (54)

2. Agua

2.1 Agua de bebida (54)

- Fuentes de contaminación:
 - a. Pozos. Si están mal protegidos o próximos a las viviendas, granjas, establos. Por permeabilidad del terreno, las aguas superficiales de lluvia, o de riego, arrastran suciedad y ésta se filtra por las paredes del pozo contaminándolo. (54)
 - b. Manantiales. Igual que ocurre con los pozos, hay un gran número de manantiales contaminados a pesar de la creencia común de que este tipo de agua es más pura. (54)
 - c. Pantanos y ríos. Se contaminan igual que los anteriores, pero existe otra causa más importante; la recepción de aguas negras o residuales procedentes de las localidades situadas en sus proximidades, o por el lavado de ropas que suelen efectuarse en ellos. En algunos casos la distancia entre los pueblos hace que el agua se autodepure en su recorrido, pero ello depende de la cantidad de materia fecal recibida y de la distancia que recorre el agua hasta llegar al usuario. (54)
 - d. Red de distribución de agua potable. En ocasiones el agua se contamina en el punto donde se capta, pero puede hacerlo ya dentro de las tuberías (tuberías en mal estado, con grietas, fisuras). Mientras el tubo está lleno de agua con presión, nada puede pasar dentro, pero cuando la tubería no contenga agua, sea escasa, o con poca presión, el agua contaminada pasará al interior de las tuberías. Este puede ser el caso de las aguas del alcantarillado, si están a la misma altura de la conducción de agua potable o cuando hay un cruce y ambas presentan fisuras o roturas. (54)

- Medidas de prevención:
 - a. Protegiendo los pozos de bebida y uso doméstico.
 - b. Recogida de muestras y análisis por los servicios de sanidad.
 - c. Depurar las aguas negras antes de verterlas a ríos, pantanos, mar, etc.
 - d. Instalar en lugares alejados los pozos negros, eliminación de basuras, etc.
 - e. Agregar cloro a los depósitos o en el agua que utilizamos en casa.
 - f. Es importante señalar que los alimentos pueden también contaminarse en el mismo lugar donde se producen, como ocurre con las verduras, hortalizas y , en general, con todos los productos de la huerta que se riegan con agua contaminada. (54)

Los mariscos, almejas, mejillones, ostras, que se consumen crudos, pueden estar contaminados por las aguas donde viven. Es conveniente el consumo de estas especies que proceden de vivero y hayan sido previamente depurados. (54)

Método de cloración doméstica de productos destinados al consumo crudo: las hortalizas y frutos cultivados a ras de la tierra deben lavarse con agua clorada de la siguiente manera: disolver 20 g de cloro en un litro de agua y llevar a 2 litros. Después de agregar la solución clorada al agua, debe removerse bien. Sumergir en esta mezcla, durante media hora como máximo, los alimentos. (54)

Después enjuagar con agua hervida o clorada según las proporciones señaladas para la cloración del agua de bebida. (54)

2.2 Agua para baño

- Fuentes de contaminación:

- a. El agua de baño puede resultar peligrosa por lo fácil que es tragar algo de ella involuntariamente y porque impregna nuestras manos, que luego nos llevamos a la boca.
- b. El agua del mar se contamina igual que la de los ríos. Por ello hay que señalar los peligros que resultan de bañarse en lugares de la playa próximos a la salida de alcantarillado. (54)

- Medidas preventivas:

- a. Nos bañamos en ríos, si las aguas están por debajo de la salida de aguas residuales de algún pueblo.
- b. No orinar dentro del agua.
- c. Exigir que el agua de las piscinas donde nos bañemos esté tratado con cloro. El olor a cloro es garantía de nuestra salud.
- d. Ducharnos antes de entrar a la piscina.
- e. Alejarnos de las playas donde haya algún desagüe de aguas residuales.(54)

3. Moscas

Las moscas que se posan en heces o lugares contaminados transportan en sus patas la suciedad y, posteriormente, al posarse en los alimentos, los contaminan. (54)

4. Excretas

En las enfermedades infecciosas que se acompañan con diarreas, los gérmenes salen por millones del intestino. Ello no solamente en los enfermos, sino también en los convalecientes, los vómitos y heces, hay que tratarlas con solución de hipoclorito puro, dejándolos en contacto un mínimo de dos horas, antes de verterlas en los retretes. Igualmente las ropas manchadas por las excretas, vómitos, deben ser cuidadosamente desinfectados. (54)

4.1.2 INDICADOR DE CALIDAD

Esta bacteria se considera como indicador de calidad sanitaria dentro del campo de salud y del alimenticio; dentro del laboratorio sirve como parámetro para medir la presencia de otros microorganismos o del mismo, así como para reconocer resultados de cultivos, pruebas bioquímicas, etc. Por su funcionamiento y estructura tan conocidos se pueden realizar estudios de todo tipo en *E.coli*. (64)

E.coli es el ratón de laboratorio de la biotecnología, debido a que es posible insertar genes de otras bacterias en ella, ahora se usa como microorganismo de laboratorio estándar. Hasta hace pocos años casi toda la información en la regulación de la síntesis proteica procariótica se basaba en trabajos sobre *E.coli*, especialmente de la estructura de las moléculas de RNA, particularmente tRNA y ribosomas. (64)

También *E.coli* puede emplearse como cepa control dentro de los métodos bioquímicos, así como en los genéticos en estudios de hibridación, plásmidos o marcado de pruebas de DNA. (64)

En 1997 se realizó un descubrimiento importante a partir de estudios en bacterias comunes de *E.coli*. Existen proteínas “heroicas” que saltan contra genes dañados, como una segunda línea de defensa contra mutaciones genéticas. (63)

El DNA se daña a diario, por químicos en el cigarro, radiación UV y otros carcinógenos, en una manera, esto puede crear mutaciones genéticas que desembocan en desórdenes, incluyendo al cáncer. El organismo utiliza sistemas de enzimas reparadoras que corrigen estos daños, pero en algunas ocasiones el sistema falla. Entonces se activa la segunda línea de defensa que pelea contra el desarrollo de mutaciones. (63)

Las proteínas conocidas como Fpg y UvrA, cuyo papel reparador de DNA de “cortar y pegar” era conocido, actúan también uniéndose ellas mismas físicamente al DNA dañado, previniendo la multiplicación del mismo. Estas proteínas pertenecen a una larga familia de reparadores de DNA, proteínas que trabajen según este principio. Si se logran entender por completo estos mecanismos reparadores, se podrá prevenir el cáncer. (63)

4.1.3 INDUSTRIA ALIMENTICIA

Dentro de la industria alimenticia, *E.coli* es de vital importancia, puesto que actúa como un indicador de contaminación de los alimentos. Dependiendo de cada tipo de alimento los parámetros a seguir al presentarse una contaminación, así como las medidas preventivas que deben seguirse para evitar la misma. Al encontrarse bacterias fuera del rango permitido, es necesario realizar una investigación minuciosa sobre la procedencia de los microorganismos; de esta manera, se podrá deducir que parte del proceso, desde su inicio hasta el fin, es el que presenta el problema y las causas de éste. (54)

La industria alimenticia presenta un problema especial debido a su gran extensión. En la seguridad alimentaria adquiere máxima importancia la manipulación del alimento durante su procesamiento como factor de riesgo que podría influir negativamente en la salud humana, ocasionando graves alteraciones en el consumidor a consecuencia de una manipulación al margen de las correctas prácticas de higiene. Debe existir una gran responsabilidad en cada fase de la producción alimenticia, procesamiento y distribución. (54)

La FDA estima que se presentan 7,000 muertes anualmente debidas a enfermedades infecciosas causadas por alimentos; aproximadamente 4 millones de casos de salmonelosis; de igual manera, se culpa a *E.coli* O157:H7 de 20,000 enfermedades al año. Pero el temor no es la respuesta, sino el conocimiento. *E.coli* O157:H7 no existía hace diez años, pero ahora es parte de la vida misma, lo que no significa que no podamos coexistir. Algunos cambios están por venir. De manera creciente, la irradiación, a la que se han sometido alimentos crudos (bajos niveles de radiación), se está adoptando como una solución. (63)

La radiación es mucho menos destructiva que la pasteurización y el enlatado. Permite a la carne encontrarse tan libre de microorganismos que puede permanecer a temperatura ambiente por meses sin descomponerse. Pero las personas temen a la exposición y sobre todo, si la irradiación cambia los contenidos nutricionales de los alimentos. A pesar de las creencias populares, la irradiación de los alimentos no es dañina si se realiza dentro de los patrones establecidos; en cambio puede ser la solución a un problema grave de enfermedades por contaminación alimenticia. (63)

La FDA ha aprobado el uso de radiación en bajas dosis para algunos alimentos como son: trigo, harina de trigo, frutas, vegetales, especias, semillas, té y algunos productos ganaderos frescos o congelados; actualmente al gobierno de los Estados Unidos ha aprobado el uso de radiación en alimentos en algunos estados de su país. (63)

En la actualidad, muchos procesadores de carne y grandes grupos respaldan el uso de irradiación para ayudar a salvaguardar sus productos, bombardeando los mismos con pequeñas dosis de energía ionizante, en muchos casos rayos gamma de fuentes de cobalto-60 o destellos de electrones de aceleración lineal. (63)

Algunos opinan que los trabajadores pueden verse afectados por la radiación a través de la maquinaria operada por control remoto. Estudios científicos no muestran evidencia de que los alimentos irradiados sean tóxicos, cancerígenos o dañinos. Por otro lado, las cepas patógenas de *E.coli* no pueden detectarse por inspección rutinaria y deben detenerse dentro de las plantas en lugar de esperar que los consumidores logren su seguridad a través del cocinado y manejo adecuados. Se ha demostrado que en el caso de la carne de res la irradiación a niveles de 10 o más son seguros para este propósito. La irradiación no debe sustituir los estándares de sanidad e inspección. (63)

En la reunión anual de tecnólogos de alimentos, Food Expo con la presencia de investigadores de la Universidad de Kansas (1997), se demostró que es posible controlar la presencia de *E.coli* en los alimentos empleando especias con un fin antimicrobiano. (48)

- El uso de distintas especias probadas reduce presencia de *E.coli* en carne cruda de hamburguesas y salami. Este estudio puede también aplicarse a otros patógenos.
- En el estudio de hamburguesas, “el clavo” tiene el mayor efecto inhibitorio, seguido en potencia por la canela, el ajo, el orégano y la salvia.
- En cuanto al salami, al añadir 1 % de especias (ajo, clavo o canela) reduce en pequeñas cantidades la presencia del patógeno; sin embargo, si se añade un 7.5 % de ajo y clavo, se logra matar al 99 %. En ambos casos, la fermentación del salami no sufre alteraciones, completándose adecuadamente.
- Las investigaciones deberán continuar, pues debe determinarse si las cantidades de especias requeridas para eliminar significativamente al patógeno son prácticas para el consumidor y para los productores de alimentos.
- Aún cuando las especias reducen la presencia de *E.coli* en carne, no la eliminan por completo. Por lo tanto, la cocción sigue siendo el único medio viable de erradicar completamente la presencia del microorganismo. (48)

4.1.3.1 PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE E.coli

Manual de Bacteriología Analítica (FDA)

- Método convencional para la determinación de coliformes y E.coli.
- Método EC-MUG para la determinación de MNPs de E.coli en mariscos de concha.
- Inmunoblot para verotoxinas.
- Aislamiento e identificación de E.coli enterovirulenta.
- Métodos de aislamiento para E.coli enterohemorrágica.
- Método LST-MUG para detectar E.coli en alimentos fríos o congelados exclusivamente de moluscos de conchas bivalvulares.
- Método rápido usando medio A-1 para recuperación de coliformes fecales de mariscos de concha.
- Caracterización serológica.
- Pruebas para E.coli enteroinvasiva.
- Pruebas para E.coli enterotoxigénica.
- Pruebas para toxinas de E.coli enterohemorrágica. (84)

Métodos Oficiales de Análisis AOAC

- Conteo de bacterias y coliformes en productos diarios: Métodos de película rehidratable seca. (5)
- Conteo de bacterias y coliformes en leche: Métodos de película rehidratable seca. (6)
- Coliformes en productos diarios: Método de gel de pectina. (7)
- Conteo de coliformes y E.coli en alimentos: Métodos de película rehidratable seca. (8)
- Coliformes totales y E.coli en todos los alimentos: Método de disco de soporte de sustrato. (9)
- Detección de E.coli productora de enterotoxina termolábil: Método de hibridación de DNA. (10)
- E.coli Enterotoxigénica: Método de hibridación de DNA empleando oligoribonucleótidos sintéticos y papel filtro. (11)
- Enterotoxinas de E.coli: Ensayos de células adrenales de ratón. (13)
- E.coli en alimentos fríos y congelados: Ensayo fluorogénico para glucuronidasa. (12)
- Coliformes fecales en mariscos de concha: Método de medio A-1. (14)
- Invasividad en células mamarias por E.coli: Método microbiológico. (15)
- Conteo de coliformes totales y E.coli en alimentos: Método de filtro membrana hidrofóbica. (17)
- Coliformes totales y E.coli en agua: Método tecnológico de sustrato definido. (16)
- Coliformes totales, coliformes fecales y E.coli en alimentos: Método de filtro membrana hidrofóbica. (18)

En México, las intoxicaciones alimentarias afectan a un número cada vez mayor de personas cada año, Sin embargo, gracias a las medidas sanitarias, los envenenamientos por culpa de la industria alimentaria y los restaurantes se han reducido drásticamente. El enemigo está ahora en casa y en las calles muchas de las intoxicaciones se producen en nuestros hogares, debido principalmente a la falta de higiene o a una incorrecta manipulación y conservación de los alimentos. (54) La comida que se expende en las calles está contaminada con *E.coli* y no cumplen con las normas oficiales para ser consideradas aptas para consumo. Según muestras tomadas de alimentos que se encuentran en algunos de estos sitios, después de realizar análisis de laboratorio, se encontraron 4 millones de mesofilicos aerobios que sirven como indicadores para conocer el grado de contaminación de un alimento. (52)

El problema que impide el control de esta situación consiste en la gran falta de reporte y subregistro de este tipo de enfermedades, debido a varios factores: no todos los que padecen diarrea acuden al médico; de los que van a consulta, muchos lo hacen con médicos particulares, quienes no hacen reportes a salubridad de los casos que se atienden en el sector salud. muchos son diagnosticados inadecuadamente, como gastroenteritis sin especificar qué bacteria está involucrada. Cuando lo hacen, casi nunca cuentan con confirmación por laboratorio. (52)

El peso de la enfermedad se calcula con parámetros establecidos, como el que mide días laborales perdidos; se calcula que en la Ciudad de México las enfermedades diarreicas aumentaron en un 34 % de 1994 a 1995. De acuerdo con los datos obtenidos de un estudio seroepidemiológico, 4.3 de cada 100 habitantes son positivos. (52)

Los días laborales perdidos en la Ciudad de México son muy difíciles de cuantificar, ya que existe una enorme población en la llamada economía informal. Otro aspecto importante es el dinero que genera este tipo de negocios, del que viven miles de familias en el Distrito Federal, además de los ingresos extra que algunos inspectores de las delegaciones reciben por dejarlos trabajar. (52)

Uno de los problemas es que la autoridad sanitaria local tendría que prohibir la venta de comida en la calle. Es una decisión política difícil de tomar. Cuidar todos los puestos con análisis es, por su costo, casi imposible. Otro asunto sería educar a la población para que dejara de consumir alimentos en la calle; se necesitaría una revolución cultural urbana. (52)

4.1.4 INDUSTRIA GANADERA

4.1.4.1 FACTORES PRECIPITANTES DE LA DIARREA INDIFERENCIADA AGUDA (DIARREA NEONATAL) EN BECERRAS.

Enfermedad infecciosa más común en becerros y puede afectar a una alta proporción de éstos (hasta el 50 % o más) causando elevados porcentajes de mortalidad (40 %). Es necesario fijar metas de productividad o parámetros productivos que promuevan la rentabilidad de la empresa dedicada a la producción de leche. (49,113,138)

Las pérdidas al parto y hasta las 24 primeras horas son dependientes de eventos preparto como la preparación de la vaca al parto, el desarrollo esquelético de la vaquilla, el semen utilizado y la calidad de atención al parto. De igual manera, el lugar y condiciones donde se desarrollan el período seco y el parto, transferencia de inmunoglobulinas a través del calostro, alojamientos para las becerras, alimentación y subnutrición. (1,113)

Es evidente que la diarrea neonatal demanda los mayores esfuerzos en prevención, tratamiento y control. Los factores que precipitan o desencadenan la diarrea se dividen en tres:

- Factores de Riesgo Ambientales.
- Factores de Riesgo en la Becerra.
- Factores de Riesgo Infeccioso. (1,28)

1. Factores de Riesgo Ambientales.

Se refieren a factores físicos como:

- Densidad de Población. El grado y duración del confinamiento en las instalaciones favorecen el esparcimiento de los agentes infecciosos. Varios animales o el hacinamiento por largos periodos incrementan los niveles de contaminación ambiental. (112,113)
- Grado de Confinamiento. El uso de agua a presión es un medio para la remoción de la contaminación, aún sin el uso de desinfectantes. Este método no puede ser usado en lugares donde hay escasez de agua. Pero donde es posible usarlo se producen nebulizaciones conteniendo altas cargas de patógenos que aunado a deficiencias en la ventilación, resulta en una elevada incidencia de trastornos respiratorios. (112,113)
- Alojamiento. Las vaquillas deben ser alimentadas durante el período seco en forma separada de las vacas adultas. Los animales adultos aparentemente normales pueden actuar como multiplicadores de organismos infecciosos como lo es *E.coli*. (120)

- **Clima.** Los brotes de diarrea son precedidos de bajas temperaturas, vientos dominantes o lluvia. Si hay lluvia, los agentes infecciosos se diseminan cuando hay hacinamiento de animales para protegerse de ésta. (120)

2. Factores de Riesgo en la Becerra:

- **Nutrición.** Las vacas deben ser nutridas durante todo el ciclo productivo pero especialmente en el periodo del parto. Si son subalimentadas, llegan con menor peso al parto y con baja calificación de la condición corporal. Esto se traduce en mayores dificultades al parto, menor volumen de calostro producido, baja producción lechera y el nacimiento de un mayor porcentaje de becerros débiles. La deficiencia de vitamina E y selenio produce menor respuesta inmune. Debe administrarse calcio y fósforo junto con vitamina A. (1,28)
- **Inmunidad.** 1.- Inmunidad General No Específica, 2.- Inmunidad Específica Contra Agentes Infecciosos. La mejor forma de alcanzar una inmunidad no específica es alimentando a las vacas preñadas correctamente de tal manera que produzcan becerros saludables y vigorosos que puedan ingerir un fuerte volumen de calostro inmediatamente después del parto. La inmunidad específica contra agentes infecciosos, se logra a través de la aplicación a la vaca de antígenos específicos que son: E.coli antígeno K99, rotavirus, etc. El calostro es el mecanismo principal a través del cual los becerros pueden obtener inmunidad específica contra agentes infecciosos. La prueba de calostrometría que tiene como objetivo, seleccionar los calostros de mayor gravedad específica y por lo tanto de mayor concentración de anticuerpos al parto. (112,113,138)

3. Factores de Riesgo Infecciosos.

Los agentes infecciosos son transportados por las vacas y diseminados a través de las heces, secreciones nasales, y quizás otros fluidos corporales, siendo altamente contagiosos y diseminándose rápidamente por lo que la alta densidad de población y/o confinamiento favorece su diseminación dentro del hato. Lo anterior es especialmente crítico alrededor de la época del parto que es cuando el becerro tiene mayor susceptibilidad a las infecciones. (1,31)

A pesar de que las vacas se encuentran infectadas frecuentemente no presentan signos de infección lo que dificulta la identificación de los animales que diseminan la enfermedad. Cuando una alta proporción del hato se encuentra diseminando una infección, hay una contaminación ambiental intensa y por lo tanto los becerros recién nacidos se contaminan al parto o bien inmediatamente después de éste. Ante tales circunstancias, el control y la prevención deben estar enfocados en forma prioritaria a la mejoría substancial de las condiciones medio ambientales. (81,138)

E.coli produce diarrea en becerros debido a septicemia o infección entérica. La infección entérica por E.coli se divide en enteroagregativa, enterohemorrágica, enteropatogénica, enteroinvasiva y enterotoxigénica. (116)

La infección enterotoxigénica por *E.coli* causa una diarrea acuosa y profusa en becerros hasta de 4 días de edad y ocasionalmente en becerros mayores. *E.coli* enterotoxigénica secreta toxinas termoestables que estimulan la secreción de agua, sodio y cloro. Generalmente es positiva al antígeno K99, por lo que la vacunación ayuda a su control. Produce también un síndrome clínico discreto, caracterizado por debilidad y deshidratación antes de que se manifieste la diarrea en becerros de 1 a 4 días de edad con postración y muerte en 6 a 12 horas. (116)

Estas bacterias pueden ser negativas al antígeno K99. Los signos en este tipo de infección incluyen diarrea, disentería y deshidratación en becerros de 2 días a 4 semanas de edad, con dolores abdominales ocasionales manifestados como bruxismo y dolor a la palpación abdominal. (120)

4.1.4.2 CONTROLES DURANTE EL PROCESO DE MANEJO DE CARNE

Materia prima:

Deben emplearse materiales de buena condición microbiológica. Aún cuando se realiza correctamente, no debe confiarse solamente en que la fermentación y secado destruya grandes números de *E.coli*. Si la carne como materia prima no se ha producido bajo buenas condiciones de manufactura, existirán grandes cantidades de patógenos que sobrevivan al proceso. (111)

Descongelado o templado:

La carne abastecida debe ser microbiológicamente satisfactoria, pero es necesario poner cuidado en la preparación del batido utilizado en el embutido. La carne congelada debe deshielarse o templarse bajo condiciones que prevengan el crecimiento de *E.coli*. Las temperaturas de descongelado recomendadas se encuentran debajo de los 5 °C. Si la superficie de la carne descongelada se encuentra sobre los 7 °C, el crecimiento de este organismo puede suceder. De manera similar, demoras en la preparación del batido permite el crecimiento. Los tiempos aproximados para *E.coli* para doblar su número en carne cruda son : a 10 °C, 7 a 10 horas; a 15 °C, 2.6 horas; a 20 °C, 1.4-1.6 horas. El tiempo que la carne permanece sin refrigerar antes de la fermentación debe ser limitado. Deben existir tiempos y temperaturas especificadas para el descongelado de la carne anterior al batido. (111)

Fermentación:

El objetivo microbiológico de la fermentación es ocasionar la caída de pH que previene el crecimiento de patógenos y proveer algunas de las condiciones que provocan la muerte de patógenos. La adición de sales al batido desacelera el crecimiento de *E.coli*. Sin embargo, a menos que se presente una caída de pH pronto después del comienzo de la

fermentación, los patógenos crecerán. El rango en el cual el pH debe caer depende de la temperatura de fermentación. A más altas temperaturas, se necesita una más rápida caída de pH. Debido al rango variable de la caída de pH por fermentación natural, el control de número de patógenos también varía. La variabilidad puede ser tan grande como para permitir el crecimiento de *E.coli*. Pequeñas cantidades de ácidos (acético, propiónico, butírico) producidos durante la fermentación son más efectivos que el ácido láctico en la subsecuente número decreciente de patógenos. Deben emplearse los correctos cultivos para la temperatura de fermentación. Algunos cultivos están diseñados para temperaturas de 25 °C, otros para 35 °C. La temperatura de fermentación debe ser conocida y controlada. El éxito de la fermentación debe ser asesorado realizando mediciones de pH a intervalos establecidos. (111)

Secado:

Posterior a la fermentación, los embutidos se secan y maduran a 10-15 °C. La combinación del secado con un pH final de 5.2 evita el crecimiento de bacterias a temperatura ambiente. (111)

Durante este proceso es necesario controlar la temperatura de secado, la humedad relativa del aire y la distribución del flujo del aire. El secado no puede ser muy rápido de lo contrario el centro del embutido no se secará debidamente. La evaluación del secado se determina midiendo la pérdida de peso. Durante el secado y maduración se reduce la presencia de microorganismos. Una destrucción mayor se le atribuye al alcance de un pH bajo. En productos semi-secos la destrucción será menor. (111)

Salida:

No debe liberarse el producto final a menos que se cuente con las medidas de pH y humedad que certifiquen que el producto se procesó dentro de las especificaciones de caída de pH durante la fermentación y secado durante la maduración. (111)

Destrucción de Coliformes:

Ya que existe una gran variedad de productos fermentados, inclusive al mismo producto se procesa de diferente manera en diferentes establecimientos, no es posible asegurar la destrucción de coliformes. Los fabricantes deben saber la dimensión de la reducción de coliformes que asegura su proceso cuando se realiza según las especificaciones. (111)

4.1.5 INDUSTRIA FARMACÉUTICA Y COSMETOLÓGICA

Dentro de estas industrias, *E.coli* funciona siempre como un indicador de contaminación. Al encontrarse el microorganismo dentro de los productos nos da como señal el mal manejo del proceso, o de alguna fase del mismo. Así también puede indicar la mala higiene del personal que realiza la manufacturua, o la baja calidad sanitaria del agua que se emplea en el proceso. También puede detectarse personal portador de la bacteria. (95,105)

Los productos, principalmente de la industria farmacéutica, que presentan esta problemática deben rechazarse hasta encontrar la causa de la cuenta alta de *E.coli*, buscar la solución y erradicar el problema. (95,105)

4.1.6 SALUD PÚBLICA EN MÉXICO

La prevención y el control de las enfermedades diarreicas están relacionados con muy diversas circunstancias: la cultura y el nivel de escolaridad, el estado de nutrición, el saneamiento básico, el acceso a servicios de salud y la calidad de éstos. Sin embargo, es a partir del conocimiento de su naturaleza infecciosa y de sus mecanismos fisiopatológicos que las acciones se han sistematizado e inclusive se han organizado programas con base en actividades específicas. La terapia de hidratación oral (THO) es considerada el avance médico del siglo, por el número de muertes que puede evitar a corto plazo. (22)

En la selección y diseño de las estrategias influyen antecedentes y circunstancias de las cuales cabe destacar que:

- Impulsar y extender los programas ya existentes.
- Avanzar en la integración del Sistema Nacional de Salud mediante programas con objetivos, metas y estrategias comunes, así como tareas compartidas por las instituciones del sector. (22)
- Para modificar la conducta terapéutica del personal de salud; es conveniente utilizar las estrategias educativas planteadas por los investigadores participantes en el proyecto. (33,52,77,80,128)
- Para la evaluación de las acciones y avance del programa es necesario realizar encuestas periódicas. (46)
- Para la evaluación del impacto del programa se debe disponer de datos de mortalidad. (79)

4.1.6.1 OBJETIVOS

- Acelerar la tendencia descendente de la mortalidad por Enfermedad Diarreica Aguda en la población menor de cinco años.
- Promover cambios de comportamiento en la población, con énfasis en las madres de familia, en relación con la prevención y la atención de las Enfermedad Diarreica Aguda.
- Modificar la conducta terapéutica del personal de salud, en relación con la terapia de hidratación oral, el uso de antimicrobianos, la prescripción de dietas y la referencia de pacientes con Enfermedad Diarreica Aguda.
- Impulsar las obras de saneamiento básico. (135)

4.1.6.2 METAS

- Reducir al 50 % las defunciones por Enfermedades Diarreicas Agudas.
- Incrementar el uso de Sobres Vida Suero Oral (fórmula de la Organización Mundial de la Salud).
- Capacitar al 100 % a las madres a través de una técnica activo-participativa para capacitación individual o en grupos, en talleres de dos horas de duración. Los capacitadores deben ser trabajadores de los servicios de salud y maestros especialmente entrenados. Simultáneamente incrementar el número de mensajes informativos en los medios de comunicación social, radio y televisión principalmente.
- En casos de Enfermedades Diarreicas Agudas tratados por personal de salud, incrementar al 90 % el uso de Vida Suero Oral, reducir al 10 % la prescripción de dietas restrictivas y a menos del 50 % la prescripción de antimicrobianos.
- Instalar en el 100 % de las jurisdicciones sanitarias, actividades de fomento y supervisión del saneamiento básico: abastecimientos de agua, eliminación de excretas e higiene de los alimentos. (135)

4.1.6.3 ESTRATEGIAS

- Elaboración de un programa estatal con la participación de todas las instituciones del sector salud: SSA, IMSS, ISSSTE, Sistema Nacional para el Desarrollo Integral de la Familia (DIF) y Subcomité de Salud del Comité de Planeación y Desarrollo del Estado de Tlaxcala (COPLADET).
- Extensión y apoyo de las actividades de los programas de prevención y control, principalmente las de atención materno-infantil y medicina preventiva.
- Evaluación de las principales actividades mediante encuestas periódicas. (78)
- Evaluación permanente del proceso de atención médica en el 100 % de las defunciones por Enfermedades Diarreicas Agudas en menores de cinco años, mediante autopsias verbales.

- Evaluación oportuna del impacto del programa mediante el análisis mensual del 100 % de los certificados de defunción en menores de cinco años.
- Adecuación constante del programa, en función de los resultados de las evaluaciones y su análisis y discusión mensual, con la participación de las máximas autoridades de salud. (78)

4.1.6.4 ENCUESTAS

El objetivo de las encuestas es obtener información relativa a los conceptos y a la conducta de la madre en relación con la prevención, hidratación, alimentación y utilización de los servicios médicos; así como sobre la conducta terapéutica de los médicos de primer nivel. (99)

De esta manera es posible evaluar el impacto del taller en la conducta prescriptiva de los médicos. Realizar encuestas antes y después de la intervención educativa. (99)

Los resultados obtenidos fueron estadísticamente significativos: se disminuyó el uso de antibióticos, antiparasitarios y antidiarreicos y se incrementó la indicación de Vida Suero Oral. El cambio más importante fue la disminución de prescripción de ayuno o suspensión de alimentos. (131)

4.1.6.5 AUTOPSIAS VERBALES

Se basan en una entrevista con los familiares del fallecido para el estudio de las causas de muerte. Esto tiene como objetivo analizar el proceso de enfermedad-atención-muerte, proceso en el que participan tanto la familia como el personal de salud. (75,127)

Las autopsias verbales, las realizan enfermeras capacitadas, cada una de las cuales se responsabiliza de un área geográfica; y se lleva a cabo entre 15 a 60 días después del fallecimiento, utilizando un cuestionario con preguntas abiertas en su inicio, para permitir la descripción espontánea de los hechos, y posteriormente con preguntas dirigidas para completar la información. (127)

Se ha encontrado por este medio que el 65 % de las defunciones se deben al tratamiento médico incorrecto por el uso injustificado de antimicrobianos y por no utilizar la hidratación oral. (141)

Estas entrevistas son de gran utilidad para conocer aspectos como el alto porcentaje de niños que mueren en el hogar, a pesar de ser llevados a un médico; la mala calidad de atención médica que se otorga y la importancia que tiene la medicina privada aún en comunidades con nivel socioeconómico bajo. (141)

Es necesario iniciar una capacitación de los médicos privados y la vigilancia estrecha de la calidad de la atención médica, así como a las madres, principalmente a aquéllas que tengan niños menores de un año. (109)

4.1.6.6 ANÁLISIS MENSUAL DE DEFUNCIONES

El análisis de mortalidad se realiza con varios años de retraso debido a las dificultades para disponer de datos recientes. Debido a esta problemática es necesario plantear la necesidad de contar, con un máximo de un mes de retraso, con los certificados de defunción de todos los niños menores de cinco años con Enfermedad Diarreica Aguda como causa de muerte. Capacitar a los responsables de las oficinas del registro civil con el fin de que no retengan estos documentos y de que los hagan llegar a la Dirección de Planeación de la Secretaría de Salud del Estado lo más pronto posible. (53,55)

El análisis de certificados de defunciones de cada mes debe contener: número de muertes por Enfermedad Diarreica Aguda según edad, derecho-habencia de los niños fallecidos, porcentaje de muertes en el hogar, porcentaje que recibió atención médica y municipios donde fallecieron. (53,55)

Al término del estudio realizado en el Estado de Tlaxcala, los resultados obtenidos indicaron que se puede disminuir la mortalidad por Enfermedad Diarreica Aguda y de reducirla a corto plazo. La meta propuesta era disminuir el 50 % de defunciones en un lapso de dos años; esta meta se alcanzó y se superó. Al presentarse el primer caso de cólera en México, se tomaron medidas de control que básicamente son las mismas para la diarrea. También se implantó en todo el país el Programa de Vacunación Universal en el año de 1992, lo que demuestra que debemos esforzarnos para lograr la mejoría de la situación de salud en nuestro país. (53,55)

CAPÍTULO V

IMPORTANCIA DE *E.coli* COMO CONTAMINANTE DEL AGUA

CAPÍTULO V

5.1 Importancia de *E.coli* como Contaminante del Agua

5.1.1 Determinación de la Calidad del Agua Potable

5.1.2 Detección de *E.coli* en Agua de Inyección Utilizando el Sistema de Detección MicroStar Rapid

5.1.2.1 Protocolo

5.1.2.1.1 Filtración

5.1.2.1.2 Incubación

5.1.2.1.3 Detección del sistema MicroStar

5.1.3 Detección de sales Tóxicas Empleando *E.coli*

5.1 IMPORTANCIA DE E.coli COMO CONTAMINANTE DEL AGUA

E.coli es un organismo indicador utilizado para mostrar que el suministro de agua es susceptible a contaminación. La bacteria E.coli proviene de los intestinos de los animales de sangre caliente. Esto significa que puede originarse de heces fecales de humanos (sistema séptico disfuncional). Una prueba positiva para E.coli es una indicación mucho más fuerte de que algo anda mal que la detección de coliformes totales. (45)

5.1.1 DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD DEL AGUA POTABLE

Para determinar si una masa de agua puede o no servir con seguridad como agua potable, es necesario hacer un reconocimiento sanitario de la cuenca hidrológica para descubrir las posibles fuentes de contaminación y proceder al análisis del agua en el laboratorio. (36)

Las pruebas de agua en el laboratorio comprenden:

- Examen microscópico. Revela el número y tipo de vida microscópica que hay en el agua.
 - Análisis físico y químico. Determinación de cualidades como color, turbiedad, olor, temperatura y dureza; determinación de amoníaco libre, nitratos, nitritos y cloro, y pruebas para descubrir minerales tóxicos como el plomo.
 - Análisis bacteriológico. Este análisis comprende: (36)
1. Análisis Cuantitativo. Cantidad total.- Determinar el número de bacterias en el agua. Preparar placas de agar con 1-11 ml de muestra de agua, incubar durante 24 horas a 35 °C, hacer recuento de colonias desarrolladas y calcular el número aproximado de bacterias por ml (promedio del recuento de colonias en todas las placas). La cantidad total es de poca importancia para juzgar la potabilidad, es más importante reconocer la bacteria que se encuentra en el análisis. (36)
 2. Análisis Cualitativo. La E.coli como índice de contaminación.- Este análisis consta de pruebas para descubrir E.coli y otros coliformes, si abundan en una muestra de agua es una prueba evidente de que el agua está contaminada por desechos intestinales. (36)

Las pruebas para bacilos coliformes se realizan en tres etapas:

1. Prueba de presunción.- Inocular caldo de lauril triptosa con 0.5 % de lactosa en tubos de fermentación, con diferentes cantidades de muestra (generalmente 0.1, 1, 10 ml). Si el brazo cerrado del tubo contiene gas, después de 24-48 horas, constituye una prueba de presunción positiva. (36)
2. Prueba de confirmación.- Transferir de los tubos de lactosa original a medios líquidos especificados, como el caldo de lactosa que contenga verde brillante y bilis, o agar ENDO, o Azul de Metileno Eosina. Estos medios inhiben todas las especies con excepción de bacilos coliformes. Con formación de gas se confirma la presencia de bacilos del colon. (36)
3. Prueba completa.- Demostrar con cultivos puros, aislados de colonias de tipo coliforme en las placas; éstos contendrán bacilos gramnegativos que forman gas en caldo de lactosa. (36)

5.1.2 DETECCIÓN DE *E.coli* EN AGUA DE INYECCIÓN UTILIZANDO EL SISTEMA DE DETECCIÓN MICROSTAR RAPID

Este sistema combina tres tecnologías para proveer un resultado rápido, sensitivo y seguro. La optimización de estas tecnologías establecidas: filtración de membrana, química bioluminiscente, y análisis de imagen avanzada, habilita al usuario a enumerar rápidamente bajos niveles de microorganismos (0 a 200 unidades formadoras de colonias UFC por muestra) en volúmenes variables de muestra en cuestión de minutos u horas, más que de días. (59)

Los microorganismos se capturan en una membrana durante la filtración de la muestra mientras que los residuos se lavan. La membrana contiene más de 600 compartimentos separados por particiones hidrofóbicas. (59)

Las células microbianas capturadas se tratan para liberar ATP intracelular. La aplicación de un ensayo de luciferasa altamente específico para ATP, produce bioluminiscencia discreta o puntos iluminados en la membrana que corresponde a las UFC. (59)

Se capturan los puntos luminosos por medio de una detección de fotones avanzada y sistema de imagen que se muestra en el monitor de la computadora. El software enumera los puntos luminosos y provee una cuenta clara que puede posteriormente imprimirse desde la pantalla. (59)

5.1.2.1 PROTOCOLO

1.	Volumen de Filtración	100 ml ó más.
2	Lavado de Filtración	2x volumen de muestra de agua esterilizada.
3	Incubación Post-Filtrado	
	Medio	Agar Soya Trypticasa.
	Temperatura	30 °C
	Tiempo	5 horas
4	Sistema de Detección MicroStar	
	Agente Liberador de ATP	20 segundos
	Secado	5 minutos
	Reactivo Bioluminiscente	5 segundos
5	Imágen del Sistema MicroStar	2 minutos
6	Enumeración del Sistema MicroStar	10 segundos

Cuadro 23.- Procedimiento empleado para la detección de *E.coli* en agua de inyección. (59)

5.1.2.1.1 FILTRACIÓN

1. Ensamblar las conexiones de filtración sanitizada.
2. Colocar un filtro membrana MicroStar sobre el soporte de manera aséptica.
3. Asegurar el embudo apropiado de filtración con el soporte.
4. Humedecer el filtro con 10 ml de agua estéril.
5. Agregar la muestra requerida de muestra (normalmente 100 ml).
6. Agitar suavemente para mezclar la muestra.
7. Aplicar vacío.
8. Lavar el embudo dos veces con 100 ml de agua esterilizada. (59)

5.1.2.1.2 INCUBACIÓN

9. Remover cuidadosamente el filtro membrana MicroStar y colocarlo (microorganismos hacia arriba) en el Agar soya trypticasa marcado para la designación de la muestra.
10. Incubar TSA a 35 °C durante 5 horas.
11. Remover el filtro membrana del agua y colocarlo sobre una toallita absorbente.

12. Marcar la toallita con el número de muestra y colocarlo en una campana de secado (5 minutos). (59)

5.1.2.1.3 DETECCIÓN DEL SISTEMA MICROSTAR

13. Rociar el agente liberador de ATP sobre la superficie de la membrana durante 20 segundos.
14. Permitir el secado de la membrana.
15. Rociar el reactivo bioluminiscente durante 5 segundos.
16. Inmediatamente colocar la membrana (microorganismos hacia abajo) en la torre de detección.
17. Iniciar la detección de 2 minutos y el autocontado utilizando el botón apropiado.
18. Imprimir los resultados y guardar la imagen. (59)

5.1.3 DETECCIÓN DE SALES TÓXICAS EMPLEANDO *E.coli*

Muchas áreas del mundo bombean su agua directamente a la superficie de pozos profundos. Si las rocas que se encuentran en el fondo contienen sales de arsénico y antimonio, existe un riesgo de que esos iones se mezclen con el agua a suministrar. (50)

Estudios llevados a cabo en la Universidad de Kentucky han permitido realizar ingeniería genética sobre la bacteria *E.coli* para que ésta actúe como sensor de iones tóxicos aún en presencia de contaminantes menos dañinos como sulfatos, fosfatos y carbonatos. (50)

Se extrae una pequeña sección del DNA de *E.coli* o plásmido circular. El plásmido codifica varias proteínas que protegen a la bacteria de iones antimonio y arsénico. Después de remover los genes del plásmido, se insertan genes de la enzima beta-galactosidasa. Esta enzima galactosa del suministro alimenticio de la bacteria. Posteriormente se pega el plásmido modificado a la bacteria. (50)

La enzima y la proteína se encuentran unidas fuertemente. De no encontrarse arsénico y antimonio presente, la bacteria no produce la proteína protectora, lo que significa que no se libera tampoco la beta-galactosidasa. Tan pronto como la bacteria entra en contacto con unas cuantas partes por millón de uno de estos aniones, libera la proteína y se dispara la producción de beta-galactosidasa. Al comenzar la enzima a trabajar, se libera galactosa y la reacción produce una señal electroquímica. (50)

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Escherichia coli es el comensal mejor conocido, por esta razón, representa, dentro de la microbiología, un microorganismo de gran importancia. Por otro lado, sabemos que presenta serotipos enteropatógenos que han provocado grandes problemas entre la población mundial, incluyendo a los países del primer mundo. Es por esto que, desde hace 15 años a la fecha, el estudio sobre esta bacteria ha crecido considerablemente.

El hablar de enfermedades causadas por estas cepas es enfrentar la realidad de que son causadas únicamente por falta de higiene, lo cual nos indica, que puede evitarse fácilmente. El problema principal radica en la amplitud del proceso en el que *E.coli* interviene, y debido a que estos patógenos se dispersan fácilmente en alimentos, agua, heces fecales humanas y animales, una pequeña contaminación de estas fuentes conduce a enfermedades graves a las personas que entran en contacto con los mismos.

Es necesario hacer conciencia que la educación del sector salud para el tratamiento óptimo, así como hacia la población para seguir las medidas de higiene y alimentación requeridas, es de suma importancia para evitar infecciones causadas por microorganismos patógenos, *E.coli* u otros. De esta manera será posible disminuir la incidencia de enfermedades por este medio, por esta razón se requiere que todo personal, médicos y procesos se unan en la lucha contra la contaminación innecesaria que puede prevenirse.

Existen otros factores que impiden se logren estos objetivos. Uno de ellos es la dificultad que se enfrenta al necesitar identificar los microorganismos patógenos de manera más específica, debido al alto costo de las pruebas empleadas. Por otro lado, no todos los laboratorios cuentan con los recursos necesarios para la realización de éste tipo de análisis.

La falta de aviso al presentarse casos de infección severos a las autoridades, trae como consecuencia el aumento en la incidencia de los mismos; el tratamiento inadecuado y la rápida propagación de las infecciones, son a su vez causas del aumento de casos.

En nuestro país es difícil tomar medidas pues las áreas geográficas que cubre el sector salud en cada estado, son demasiado grandes, no existe el presupuesto necesario para el saneamiento y la capacitación de las familias y de los médicos. El gobierno no aporta el dinero suficiente para este fin, por lo que razones políticas y financieras impiden el desarrollo de planes y estrategias eficientes para erradicar el problema.

Es preocupante la cantidad y gravedad de los casos que se presentan con tanta frecuencia. Por esta razón, es necesario combatir los factores causantes de estas enfermedades a fin de lograr una mejor salud mundial.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Resulta necesario recalcar que *Escherichia coli* es el microorganismo mejor conocido y el más estudiado; a partir de ella ha sido posible obtener avances de importancia, principalmente dentro del ámbito de la genética bacteriana y, debido a la amplitud de la información existente sobre el mismo, es necesario hacer una recopilación de estos datos que nos permita tener una visión más general de la importancia de *E. coli*.

El estudio profundo de un microorganismo nos permite conocer sus principales funciones, así como la manera en que interactúa con sus hospederos. En el presente trabajo se dieron a conocer las principales características de *Escherichia coli*, ya sean morfológicas, bioquímicas, microscópicas y antigénicas, así como las respuestas inmunológicas correlativas a su antigenicidad, lo que da como resultado un amplio panorama de esta bacteria. Esto tiene como finalidad determinar la manera en que *Escherichia coli*, como bacteria comensal, actúa en el organismo, así como la forma en que interviene en diversas patologías de importancia.

Escherichia coli representa un papel esencial dentro del tubo digestivo como parte de la flora normal entérica, no así cuando este mismo comensal causa infecciones que se propagan rápidamente a otros órganos diferentes al intestino. De igual manera, los serotipos enterovirulentos de *E. coli* se traducen en patologías que, en la mayoría de los casos, representan un gran peligro para la salud, e incluso la vida del paciente. Es por esta razón que resulta de gran importancia contar con un conocimiento adecuado acerca de estas enfermedades, sus principales causas, síntomas, mecanismos de acción y factores de patogenicidad que permitan prevenir el avance del padecimiento. Es también indispensable recordar siempre que el tratamiento antimicrobiano debe administrarse únicamente de ser necesario, ya que resulta contraproducente administrar antibióticos en este tipo de enfermedades. Por ser patológicamente autolimitante, la principal acción en este tipo de enfermedades es la administración de líquidos, así como el mantenimiento hidro-eléctrico del paciente a través de la administración de sueros orales conteniendo agua y sales minerales para evitar la deshidratación por diarreas excesivas.

Cabe mencionar que la mejor manera de combatir un padecimiento causado por este microorganismo comienza siempre con el diagnóstico adecuado en el tiempo pertinente, es decir, que debe llevarse el análisis patológico tan profundamente como sea necesario hasta encontrar el agente causal específico presente en el organismo al momento de presentarse los primeros indicios de infección o toxicosis. En el caso de *Escherichia coli* como comensal resulta menos difícil una identificación correcta, lo que no sucede con sus serotipos enterovirulentos; los padecimientos que traen consigo estos microorganismos son fácilmente confundidos con otros causados por agentes diferentes que presentan signos y síntomas muy

Conclusiones

similares, como es el caso del cólera. Debido a ésto se han mencionado aquí los métodos que poseen gran sensibilidad y que nos aseguran la identificación última de esta bacteria.

Es igualmente importante hacer hincapié en que la higiene y el manejo adecuado de los alimentos es la principal medida profiláctica contra estas infecciones. Debido a que los alimentos son fácilmente contaminados durante cualquier fase de su preparación, incluyendo todas las fases de su procesamiento hasta su manipulación en el hogar, por lo que resulta eminente que la educación en cuanto a higiene es esencial para disminuir la prevalencia de infecciones por este medio, especialmente en las personas que tienen un contacto directo con los alimentos. En el caso del agua, ésta representa un medio de infección muy importante que se contamina fácilmente con heces fecales humanas y animales, esta agua que es utilizada posteriormente difundiendo los microorganismos rápidamente. Por tal motivo, las industrias involucradas en este problema deben contemplar la necesidad de implementar métodos de análisis que aseguren el uso de agua bacteriológicamente adecuada (normas). Es así como *Escherichia coli* nos ayuda a determinar el grado de pureza o contaminación tanto de alimentos como del agua, actuando como un indicador de higiene y calidad dentro de los diferentes ámbitos de la industria en donde pueda intervenir esta bacteria como un patógeno amenazante del hombre.

De esta manera se concluye que se han cubierto satisfactoriamente los objetivos planteados en un inicio.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Acres, S.D., Radostits, O.M., "Calf Scours VIDO FACT Sheet 1. Memorias del Curso Internacional Sobre Crianza de Becerras", Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, 72-81, 1993.
2. Ahmad, I., *Biotechniques*, 8:162-165, 1990.
3. Ando, K., Itaya, T., Aoki, A., "An Outbreak of Food Poisoning Caused by Enterotoxigenic *Escherichia coli* O169:H41", *J. Food Microbiol.*, 10:77-81, 1993.
4. Anhalt, J.P., Kenny, G.E., "Detection of Microbial Antigens by Counterimmunoelectrophoresis", Coordinating ed. T.L. Gavan, *American Society for Microbiol.*, 1980.
5. AOAC, "Bacteria and Coliform Counts in Dairy Products: Dry Rehydratable Film Methods", Sec. 17.3.03, Method 989.10. In Official Methods of Analysis of AOAC International, 16th Edition, P.A. Cunniff, 12 AOAC International, 1997.
6. AOAC, "Bacteria and Coliform Counts in Milk: Dry Rehydratable Film Methods", Sec. 17.3.02, Method 986.33, Official Methods of Analysis of AOAC International, 16th Edition, P.A. Cunniff, 12 AOAC International, 1997.
7. AOAC, "Coliforms in Dairy Products: Pectin Gel Method", Sec. 17.3.01, Method 989.11, Official Methods of Analysis of AOAC International, 16th Edition, P.A. Cunniff, 11-12 AOAC International, 1997.
8. AOAC, "Coliform and *Escherichia coli* Counts in Foods: Dry Rehydratable Film Methods", Sec. 17.3.04, Method 991.14, Official Methods of Analysis of AOAC International, 16th Edition, P.A. Cunniff, 13-15 AOAC International, 1997.
9. AOAC, "Confirmed Total Coliform and *E.coli* in all Foods: Substrate Supporting Disc Method", Sec. 17.3.07, Method 992.30, Official Methods of Analysis of AOAC International, P.A. Cunniff, 17-18 AOAC International, 1997.
10. AOAC, "Detection of *Escherichia coli* Producing Heat-Labile Enterotoxin: DNA Colony Hybridization Method", Sec. 17.4.03, Method 984.34, Official Methods of Analysis of AOAC International, P.A. Cunniff, 24-27 AOAC International, 1997.
11. AOAC, "Enterotoxigenic *Escherichia coli*: DNA Colony Hybridization Method Using Synthetic Oligodeoxyribonucleotides and Paper Filters", Sec. 17.4.04, Method 986.34, Official Methods of Analysis of AOAC International, P.A. Cunniff, 27-31 AOAC International, 1997.
12. AOAC, "*Escherichia coli* in Chilled or Frozen Foods: Fluorogenic Assay for Glucuronidase", Sec. 17.4.01, Method 988.19, Official Methods of Analysis of AOAC International, P.A. Cunniff, 21-22 AOAC International, 1997.
13. AOAC, "*Escherichia coli* Enterotoxins: Mouse Adrenal Cell and Suckling Mouse Assays", Sec. 17.4.05, Method 984.35, Official Methods of Analysis of AOAC International, P.A. Cunniff, 31-32 AOAC International, 1997.
14. AOAC, "Fecal Coliforms in Shellfish Growing Waters: Medium A-1 Method", Sec. 17.3.05, Method 978.23, Official Methods of Analysis of AOAC International, 16th Edition, P.A. Cunniff, 15 AOAC International, 1997.

15. AOAC, "Invasiveness of Mammalian Cells by *Escherichia coli*: Microbiological Method", Sec. 17.4.02, Method 982.36, Official Methods of Analysis of AOAC International, P.A. Cunniff, 22-24 AOAC International, 1997.
16. AOAC, "Total Coliforms and *Escherichia coli* in Water: Define Substrate Technology", Sec. 17.3.06, Method 991.15, Official Methods of Analysis of AOAC International, P.A. Cunniff, 15-17 AOAC International, 1997.
17. AOAC, "Total Coliform and *Escherichia coli* Counts in Foods: Hydrophobic Grid Membrane Filter/MUG Method", Sec. 17.3.09, Method 990.11, Official Methods of Analysis of AOAC International, P.A. Cunniff, 20-21 AOAC International, 1997.
18. AOAC, "Total Coliforms, Fecal Coliforms, and *Escherichia coli* in Foods: Hydrophobic Grid Membrane Filter Method", Sec. 17.3.08, Method 983.25, Official Methods of Analysis of AOAC International, P.A. Cunniff, 18-20 AOAC International, 1997.
19. Atkins, T., *Am. Biol. Teacher*, 53:490-495, 1991.
20. Ausubel, F.M., *Current Protocols in Molecular Biology*, Book Bulletin Supplement 29 Winter 1995, Wiley and Sons, New York, 1995.
21. Bailey, W.R., "Bailey Scott Diagnóstico Microbiológico", Editorial Panamericana, 1990.
22. Barss, P., "Water with Sugar and Salt", *Lancet*, 1:300-301, 1980
23. Benson, S.A., *Biotechniques*, 2: 66-67, 1984
24. Bentin, L., Montenegro, M. A., Orskov, I., "Close Association of Verocytotoxin Production with Enterohemolysis Production in Strain of *Escherichia coli*", *J. Clin. Microbiol.*, 27:2559-2564, 1989.
25. Bethesda, M.D., "Polymerase Chain Reaction", *New Tools for Tomorrow's Health Research*, National Center for Human Genome Research, National Institutes of Health, 853-855, 1992.
26. Beutner, E.H., Barnett, E.V., "Quantitative Studies of Immunofluorescent Staining", *Bull W.H.O.*, 39: 587-606, 1980
27. Biotechnology Industry Organization, "Monoclonal Antibodies Technology", *New Tools for Tomorrow's Health Research*, 1989.
28. Blood, D.C., Radostits, O.M., "Veterinary Medicine, a Text Book of the Diseases of Cattle, Sheep, Pigs, Goats and Horses", Bailliere Tindall, 1989.
29. Boehringer Mannheim, "Standard Experimental Procedures", pp 111, 112, 113, 115, 1994.
30. Bostian, K.A.; *Anal. Biochem.*, 95:174-182, 1980.
31. Bouda, J., Doubeck, K.J., "Fisiopatología de las Diarreas y Rehidratación", Memorias del Curso: Diagnóstico de Campo y de Laboratorio para el Tratamiento de Enfermedades en Bovinos, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, 135-138, 1996.
32. Boyce, Th., Swerdlow, D., "*Escherichia coli* O157:H7 and the Hemolytic-Uremic Syndrome", *New Eng. J. Med.*, vol. 333, num. 6, pp 364-367, 1995.
33. Bronfman, M., Martínez, M.C., "Estrategias para Mejorar los Patrones Terapéuticos Utilizados en Diarrea Aguda en Unidades de Atención Médica Primaria. Metodología y Características de las Unidades Médicas y de la Población Estudiada". *Archivo de Investigación Médica*, 19:335-350, 1988.

34. Browne, R.M., "Traditional *Enteropathogenic Escherichia coli* of Infantile Diarrhea", *Rev. Infect. Dis.*, 9(1):28-53, 1987.
35. Bryan, A.H., Bryan, Ch., "Bacteriología", Editorial CECSA, 6ª Edición, 1986.
36. Burdon Kenneth, Williams R., "Microbiología", Editorial Cultural, México, 1989.
37. Catani, C.F., Yamada, A., "Adhesion of Bovine *Enterotoxigenic Escherichia coli* (ETEC)", *FEMS Microbiol. Lett.*, 137:241-245, 1996
38. Carrithers, S.L., Parkinson, S.I., Goldstein, S., "*Escherichia coli* Heat-Stable Toxin Receptors in Human Colonic Tumors", *Gastroenterology*, vol. 107, 1653-1661, 1997.
39. CDC, "*Enterohemorrhagic Escherichia coli*", *J. Emerging Infect. Dis.*, Vol. 1, no. 2, 1995.
40. Chandra, L., Obrig, T., "Specific Interactions of *E.coli* O157:H7 Derived Shiga-like Toxin II with Human Renal Endothelial Cells", *J. Infect. Dis.*, pp 1397-1400, 1995.
41. Chen, C.W., Thomas, C.A., *Anal. Biochem.*, 101:339-341, 1980.
42. Chomczynski, P., *Anal. Biochem.*, 201: 134-139, 1991.
43. Chong, S., *Biotechniques*, 18:719-725, 1994.
44. Cleary, TH. G., "*Escherichia coli* O157:H7 that Causes Hemolytic-Uremic Syndrome", *Pediatr. Infect.*, 6:163-176, 1992.
45. Comisión Nacional del Agua, "Programa de Agua Limpia", Comisión Nacional del Agua México, 1997.
46. Consejo Nacional de Vacunación, Secretaría de Salubridad y Asistencia, "Programa de Vacunación Universal", SSA México, 1991.
47. Cooper, Ch., "Standard Hybridization and Chemiluminiscent Detection Procedures", *Direct Nucleic Acid Labelling and Detection Systems*, 1993.
48. Cruz, J., "Especies con Acción Antimicrobiana", Congreso Anual de Tecnólogos de Alimentos, Food Expo, Universidad de Kansas, 1997.
49. Dahl, J.C., "Quality Milk Production Enhancement", *Bou-Matic*, USA, 1992.
50. Daunert, S., "Bacteria Engineered to Detect Toxic Salts, Water Contamination", *Anal. Biochem.*, 89:16, 1997.
51. Davis, B.D., "Tratado de Microbiología", Barcelona Salvat, 1988.
52. Dirección General de Estadística Informática y Evaluación, Secretaría de Salud, "Enfermedades Infecciosas Intestinales", Perfiles Estadísticos, no. 1, Series Monográficas, SSA México, 1992.
53. Dirección General de Estadística, Informática y Evaluación, Secretaría de Salud, "Políticas de Modernización Informática", SSA México, 1991.
54. Dirección General de Medicina Preventiva SSA, "Programa Nacional de Prevención y Control de Enfermedades Diarreicas", SSA México, 1984.
55. Dirección de Planeación, Secretaría de Salud del Estado de Tlaxcala, "Mortalidad 1991-1992", Tlaxcala:SESA, 1992.
56. Dirks, G., Zanen, H.C., "Latex Agglutination in the Diagnosis of Bacterial Meningitis", *J. Clin. Pathol.*, 31:1167-1171, 1980.
57. Divo, A., "Microbiología Médica", 4ª Edición, Editorial Interamericana, pp 155-157, 1988.
58. Dretzen, G., *Anal. Biochem.*, 112:295-298, 1981.

59. Edwin, F., "Detection of Escherichia coli in Water for Injection Using the MicroStar Rapid Micro Detection System", *Microbial Quality of Water Supply in Distribution Systems*, 1996.
60. Engvall, E., Perlmann, P., "Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)", *Immunochemistry*, 8:871-874, 1981.
61. Ferguson, S.J., "The Periplasm, Prokaryotic Structure and Function: a New Perspective", Society of General Microbiology and Cambridge University Press, pp 311-339, 1992.
62. FMC BioProducts, *Resolutions*, 8(1): 67, 1992.
63. Friedman, M., "Beef Irradiation", FDA, Clinton Administration Proposals, 1997.
64. Foxman, B., Shang, L., "Virulence Characteristics of Escherichia coli Causing First Urinary Tract Infection Predict Risk of Second Infection", *J. Infect. Dis.*, pp 1536-1541, 1995.
65. F.S & H., "Mettwurst and Escherichia coli O111", *Australian Food Industry Bulletin*, 1995.
66. Fung, D., Berg, H., "Powering the Flagellar Motor of Escherichia coli with an External Voltage Source", *Letters to Nature*, Vol. 375: 809-812, 1995.
67. Gardner, P., "Manual of Acute Bacterial Infections", Ed. Little Brown, pp 10-12, 16, 58-59, 62-64, 82, 177, 186, 256, 469, 633, 1996.
68. GIBCO-BRL, Life Technologies Inc., 7(4):1-2, 1985.
69. Giono, S., "Diarreas Infecciosas", *Boletín Cólera*, vol. 1, no. 4, pp 10, 1991.
70. Girvitz, *Anal. Biochem.*, 106:492, 1989.
71. Goding, J.W., "Use of Staphylococcal Protein A as an Immunological Reagent", *J. Immunol. Meth.*, 20:241-253, 1982.
72. Goldstein, J.L., Sahi, J., Bhuvra, M., "Escherichia coli Heat-Stable Enterotoxin-Mediated Colonic Cl Secretion is Absent in Cystic Fibrosis", *Gastroenterology*, vol.107, 950-956, 1994.
73. Goldwater, P., Bettelheim, K., "The Role of Enterohemorrhagic Escherichia coli Serotypes others than O157:H7 as Causes of Disease", *Communicable Disease Intelligence* 19:2-4, 1995.
74. Gorbach, S.L., Evans, D.G., "Travelers Diarrhea and Toxigenic Escherichia coli", *New Eng. J. Med.*, 292(18):933-936, 1975.
75. Gray, R., Smith, G., "The Use of Verbal Autopsy Methods to Determine Selected Causes of Death in Children", Institute for International Programs, Baltimore, John Hopkins University, No. 10, 1990.
76. Griffin, P.M., "Escherichia coli O157:H7 and other Infections of the Gastrointestinal Tract", *New York Raven Press*, 7:39-61, 1995.
77. Guicafré, H., Gutierrez, G., Muñoz, O., Pérez-Cuevas, R., Reyes, H., "Evaluación de una Intervención Educativa para el Tratamiento de la Diarrea Infecciosa y las Infecciones Respiratorias Agudas", *Bol. Méd. Hosp. Inf. (Méx.)*, 48:754, 1991.
78. Gutiérrez, G., "Reducción de la Mortalidad por Enfermedades Diarreicas Agudas. Experiencias de Investigación-Acción", *Salud Pública en México*, vol. 36, no. 2, 1994.
79. Gutiérrez, G., "El Sistema Nacional de Información en Salud", *Información en Salud: La Salud en Cifras*. Fondo de Cultura Económica, vol. 19, 1981.

80. Gutiérrez, G. Guiscafré, H., Muñoz, O., "Estrategias para Mejorar los Patrones Terapéuticos Utilizados en Diarrea Aguda en Unidades de Atención Médica Primaria", Memorias del V Curso Internacional, SSA México, Organización Panamericana de la Salud, UNICEF, 1991.
81. Hall, G.A., Jones, P.W., "Calf Diarrhea in Bovine Medicine, Diseases and Husbandry of Cattle", *Blackwell Scientific Publications*, 154-180, 1994.
82. Hancock, R.E.W., "Bacterial Outer Membranes", *ASM News*, 57: 175:182, 1991.
83. Hengen, P.N., "DNA Recovery", *Methods and Reagents Recovering DNA from Agarose Gels*, TIBS, 1994.
84. Hitchens, A.D., Feng, P., Watkins, W.D., "Escherichia coli and the Coliform Bacteria", Ch. 4 In Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual, 8th Edition, 4.01-4.29, 1998.
85. Ho, N.W.Y., *Electrophoresis*, 4:168-170, 1983.
86. Holmgren, J., Lindblad, M., Fredman, P., "Comparison of Receptors for Cholera and Escherichia coli Enterotoxins in Human Intestine", *Gastroenterology*, vol. 89, pp 27-35, 1990.
87. Jawetz, E., Melnick, J., "Microbiología Médica", Editorial El Manual Moderno, 7^a Edición.
88. Jeppson, J.O., Laurell, C. B., Franzen, B., "Agarose Gel Electrophoresis". *Clin. Chem.*, 25:629, 1980.
89. Joanne, E., "Meningitis: Medical Development and Educational Perspectives", Wick Roberts Editions, 1997.
90. Johnson, D.R., Breitenberger, C.A., *Biotechniques*, 8:162-165, 1990.
91. Johnson, W.M., Lior, H., "Citotoxic Escherichia coli O157:H7 Associated with Hemorrhagic Colitis in Canada", *Lancet* 76, 1983.
92. Kawamura, A., "Fluorescent Antibody Techniques and their Applications". University Park Press, Baltimore, 1980.
93. Khyse-Andersen, J., "Electroblotting of Multiple Gels", *J. Biochem. Biophys. Methods*, 15:836-837, 1993
94. Koch, A.L., "Biophysics of Bacterial Walls Viewed as Stress-Bearing Fabric", *Microbiol. Rev.* 52: 337-353, 1988.
95. Koneman, E., "Diagnóstico Microbiológico", Editorial Panamericana, 1991.
96. Lamb, B.T., *Nature Genetics*, 5:22-29, 1993.
97. Landau, D., "The Value of Urianalysis in Differentiating Acute Pyelonephritis form Lower Urinary Tract Infection", *J. Pediatr. Infect. Dis.*, 1994.
98. Levine, M., "Escherichia coli that Cause Diarrhea ETEC, EPEC, EHEC, EIEC, EAaggEC", *J. Infect. Dis.*, 155(3): 377-388, 1987.
99. Libreros, V., Guiscafré, H., Tomé, P., Reyes, H., "Patrones de Prescripción Terapéutica en Infección Respiratoria Aguda y Diarrea Aguda en Dos Instituciones de Salud, IMSS-SSA. Metodología de Estudio, Características de las Unidades Médicas, de los Médicos y de la Población Estudiada", *Gaceta Médica Mex.* 128: 505-513, 1992.
100. Lim, D.J., "Recent Advances in Septicemia; Proceedings of the Sixth International Symposium", 1996.

101. Ling, H., Boodhoo, A., Armstrong, G.D., "A Mutant Shiga-like Toxin II Bound to its Receptor", *Med. Microbiol. Immunol.*, Department of Biochemistry, University of Alberta, Canada, 1996.
102. Ling, H., Boodhoo, A., Armstrong, G.D., "Specific Binding of Shiga-like Toxin to its Cell Surface Receptor Gb3", *Med. Microbiol. Immunol.*, Department of Biochemistry, University of Alberta, Canada, 1996.
103. Litz, J.S., *Resolutions*, 6(3):6, 1990.
104. López, E., Devoto, S., Fayad, A., "Association Between Severity of Gastroenteritis Prodrome and Long Term Prognosis in Classic Hemolytic-Uremic Syndrome", *J. Pediatr.*, vol. 120, no. 2, part 1, pp 210-215, 1992.
105. Mac Faddin, "Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica", Editorial Médica Panamericana, 1990.
106. Maniatis, T., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, Spring Harbor Laboratories, 1982.
107. March, S.B., Rutnam, S., "Latex Agglutination Test for Detection of *Escherichia coli* Serotype O157:H7", *J. Clin. Microbiol.*, 27:1675-1677, 1989.
108. March, S.B., Rutnam, S., "Sorbitol- MacConkey Medium for Detection of *Escherichia coli*", *J. Clin. Microbiol.*, 23: 869-872, 1986.
109. Martínez, H., Reyes, H., "La autopsia Verbal: Una Herramienta para el Estudio de la Mortalidad en Niños", *Bol. Méd. Hosp. Inf. (Méx.)*, 50: 57-63, 1992.
110. McDonald, K., Oster, H., Michaels, T., "The Emergence of *Escherichia coli* O157:H7 Infection in the USA, the Changing Epidemiology of Foodborne Disease", *JAMA*, 269:2264, 1993.
111. Medina, C., Bouda, J., Padilla, S., "Factores Precipitantes de la Diarrea Indiferenciada Aguda (Diarrea neonatal) en Becerras", *Producción Animal y Diagnóstico Clínico*, Conferencia 2 UNAM, vol. 2, 1997.
112. Medina, C.M., "Etiología y Diagnóstico Diferencial de las Diarreas en el Becerro", *Memorias del Curso Internacional Teórico-Práctico de Actualización en el Diagnóstico de las Enfermedades más Frecuentes en Bovinos*, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, 56-60, 1997.
113. Medina, C.M., "Medicina Productiva en la Crianza de Becerras Lecheras", Editorial Limusa, 1996.
114. Mezzoff, A.G., Giannella, R.A., "*Escherichia coli* Enterotoxin (Stx) Binds to Receptors, Stimulates Guanyl Cyclase, and Impairs Absorption in Rat Colon", *Gastroenterology*, vol. 102, 816-822, 1994.
115. Mizrahi, M., Muñoz, H., "Infecciones Entéricas, Fisiopatología y Tratamiento de sus Complicaciones", Editorial El Manual Moderno, 1984.
116. Morgado, D.E., "Respuesta al Tratamiento Oral con una Solución Hiperosmótica en Becerras Holstein-Friesian con Diarrea Indiferenciada Aguda", *Vet Mex* 21(3): 246-253, 1992.
117. Morgan, J.H., *Biotechniques*, 11:256-261, 1991.
118. Naczynski, Z.M., Kropinski, A. M., *Biotechniques*, 14:195-197, 1993.
119. Nataro, J., Yikang, D., "Heterogeneity of Enterotoxigenic *Escherichia coli* Virulence Demonstrated in Volunteers". *J. Infect. Dis.*, pp 465-468, 1995.

120. Naylor, J.M., "Neonatal Ruminant Diarrhea", *Animal Int. Med.*, Smith B.P., 396-417, 1997.
121. Nikaido, H., Vaara, M., "Outer Membrane, *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* Cellular and Molecular Biology", *Am. Soc. Microbiol.*, F.C. Neidhart ed., pp 7-22, 1987.
122. OPS, "Diarrheal Diseases Control", Edit. World Health Organization, 1986.
123. Orrbine, E., Zoubek, Th., Clarke, W., "Sequelae of Hemolytic-Uremic Syndrome", *Current Problems in Pediatrics*, pp 16-33, 1993.
124. Orskov, F., Orskov, I., "Microbiología Médica", Editorial Panamericana, Buenos Aires, 1984.
125. Orskov, I., "Serology Chemistry and Genetics of O and K Antigens of *Escherichia coli*", *Bacteriol. Rev.*, 41: 667-710, 1980.
126. Oster, H., Michaels, T., Soler, J., "Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 Infection in Minnesota Child Day Care Facilities", *JAMA*, 269: 883, 1993.
127. Pacqué-Margolis, S., Zwannah, D., "Application of the Verbal Autopsy During a Clinical Trial", *Soc. Sci. Med.*, 3: 585-591, 1990.
128. Padilla, G., Reyes, R.M., "Estrategias para Mejorar los Patrones Terapéuticos Utilizados en Diarrea Aguda en Unidades de Atención Médica Primaria. Evaluación de una Estrategia Dirigida a Médicos Familiares para Incrementar el Uso de la Hidratación Oral y Disminuir el de Antimicrobianos y Dietas Restrictivas", *Archivo de Investigación Médica*, 19: 395-407, 1988.
129. Park, J.T., "The Murein Saccules", *Am. Soc. Microbiol.*, F.C. Neidhart ed., pp 23-30, 1987.
130. "Peritonitis and Intra-Abdominal Abscesses", *Sci. Am. Med.*, vol. 7, No. XXI, pp 1-6, 1995.
131. Pérez-Cuevas, R., Muñoz, O., "Patrones de Prescripción Terapéutica en Infección Respiratoria Aguda y Diarrea Aguda en Dos Instituciones de Salud, IMSS-SSA. Características de la Prescripción Médica", *Gaceta Médica Mex*, 128: 531-541, 1992.
132. Pickering, L., Obrig, T., Stapleton, B., "Hemolytic-Uremic Syndrome and *Enterohemorrhagic Escherichia coli*", *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 13: 459-476, 1994.
133. "Pielonefritis y Pielonefritis Enfisematosa", *Nefrología, Manual de Infectología*, año 15, num. 6, pp 257-259, 1995.
134. Polman, J.K., Larkin, J.M., *Biotechnology Techniques*, 3:329-332, 1989.
135. Programa Nacional de Control de Enfermedades Diarreicas, Secretaría de Salud. "Guía para el Manejo Efectivo del Niño con Enfermedad Diarreica", *Manual de Procedimientos*, SSA México, vol. 10, 1991.
136. Raetz, C.R.H., "Biochemistry of Endotoxins", *Annu. Rev. Biochem.*, 59:129-170, 1990.
137. Rademaker, C.M.A., Fluit, A.C., Jansze, M., "Frequency of *Enterovirulent Escherichia coli* in Diarrheal Disease in the Netherlands", *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 12, no. 2, pp 93-97, 1993.
138. Radosiits, O.M., Leslie, K.E., "Herd Health, Food Animal Production Medicine", *W.B. Saunders Co.*, 1996.
139. Rebolledo, L., Muñoz, O., "Etiopatogenia de la Gastroenteritis Aguda", *Gastroenterología*, Ed. Méndez Otero Fco., pp 1-3, 1996.

140. "Revisión Actualizada sobre Infecciones de Vías Urinarias", Urología, *Manual de Infectología*, año 15, num. 8, pp 326-330, 1995.
141. Reyes, H., Tomé, P., Martínez, H., Romero, G., "Autopsia Verbal en Niños con Infección Respiratoria y Diarrea Aguda. Análisis del Proceso Enfermedad-Atención-Muerte", *Bol. Méd. Hosp. Inf. (Méx.)*, 50: 7-16, 1993.
142. Rietschel, E.T., Brade, H., "Endotoxinas Bacterianas", *Investigación y Ciencia* 193:16-24, 1992.
143. Riley, L.W., Rewis, R.S., Helgerson, S.D., "Hemorrhagic Colitis Associated with a Rare *Escherichia coli* Serotype", *New Eng. J. Med.*, 308:681-685, 1993.
144. Robson, W., Leung, A., Kaplan, B., "Hemolytic-Uremic Syndrome", *Current Problems in Pediatrics*, pp 16-33, 1993.
145. Ryder, R.W., Wachsmuth, "Infantile Diarrhea Produced by Heat-Stable Enterotoxigenic *Escherichia coli*", *New Eng. J. Med.*, 295: 849-853, 1980.
146. Sakakibara, R., *Anal. Biochem.*, 162: 150-155, 1987.
147. Sambrook, J., *Molecular Cloning: A laboratory Manual*, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
148. Savarino, S., Mc Veigh, A., "Enteroadgregative *Escherichia coli* Heat-Stable Enterotoxin is not Restricted to Enteroadgregative *Escherichia coli*", *J. Infect. Dis.*, pp 1019-1022, 1996.
149. Schmidt, M., Rapp, D., "Healing Childhood Ear Infections: Prevention, Home Care, and Alternative Treatment", 1996.
150. Secretaría de Salud, "Programa Nacional de Control de Enfermedades Diarreicas (PRONACED)", SSA México, 1990.
151. Shanahan, F., Sullivan, G., "Enteropathogenic *E.coli* Intimacy Redefined", *Gastroenterology* 115:233, 1998.
152. Solomon, E.P., Vilee, C.A., Davis, P.W., "Biología", Interamericana, pp 409-410, 552, 1990.
153. Son, M., *Nucl. Acids Res.*, 18:10, 1990
154. St. Pierre, M.V., Schlenker, Th., Dufour, J.F., "Stimulation of Cyclic Guanosine Monophosphate Production by Natriuretic Peptide in Human Biliary Cells", *Gastroenterology* 114:782-790, 1998.
155. Stites, D.P., Terr, A.I., "Inmunología Básica y Clínica", Manual Moderno, 7^{ma} Edición, 1993.
156. Su, Ch., Brandt, L., "*Escherichia coli* O157:H7 Infection in Humans", *Ann. Int. Med.*, 123(9): 698-711, 1995.
157. Tautz, D., Renz, M., *Anal. Biochem.*, 132:14-19, 1983.
158. Todd-Sanford, "Diagnóstico Clínico y Tratamiento Clínico por el Laboratorio", Salvat Mexicana de Ediciones, Tomo II, 8^{va} Edición, pp 1004, 1005, 1006, 1075-1076, 1635, 1645-1647, 1664, 1668. 1991.
159. Tous, M., Miliwebsky, E., "Differential Kinetic Patterns for Shiga Toxin Production by *Escherichia coli*", *Revista Argentina de Microbiología*, vol. 29, 1997.
160. "Travelers Diarrhea", *Health Advice for International Travelers*, vol. 8, num. XIV, pp 9-10, 1995.

161. UNAM. "Métodos Actuales para la Determinación de Microorganismos en Alimentos; Métodos Moleculares, Hibridación de DNA", Programa Universitario de Alimentos. 1994.
162. Vaandrager, A.B., Bot, A.G., De Vente, J., "Atriopeptins and Escherichia coli Enterotoxin Sta Have a Different Sites of Action in Mammalian Intestine". *Gastroenterology*, vol. 102, 1161-1169, 1994.
163. Voet, D., Voet, J., "Bioquímica", Editorial Omega., 1992.
164. Vunakis. H., "Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods", Academic Press, 1990.
165. Willshaw. G.A., "Isolation of ETEC", *Epidemiol. Infect.* 115:445-463, 1995.
166. Yang. R.C.A., *Meth. Enzymol.*, 68:176-182, 1980.
167. Young. N.D., "Southern Blotting and DNA Hibridization", Nevin Dale Young and The Reagents of the University of Minnesota, University of Minnesota, 1997.
168. Yuhan. R., Koutsouris, A., Savkovik, S.D., "Enteropathogenic Escherichia coli-Induced Myosin Light Chain Phosphorilation Alters Intestinal Epithelial Permeability", *Gastroenterology* 114:243, 1998.
169. Zedillo. M., Alvarez, T.M., "Gastroenteritis y Otras Enfermedades por Escherichia coli", Bacteriología, *Manual de Infectología*, año 15, num. 7, pp 171-173, 1995.
170. Zilberg. B., S. AFR. *Med. J.*, 1997.