

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO



FACULTAD DE QUIMICA

ECET Y ECEP: HALLAZGOS RECIENTES SOBRE SUS
FACTORES DE VIRULENCIA Y LOS METODOS QUE
SUSTENTAN SU DETECCION EN EL LABORATORIO

TRABAJO MONOGRAFICO DE
ACTUALIZACION
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
PRESENTA:
MARIA BEGOÑA GUZMAN SOLANO



MEXICO, D.F.

2000

282939



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

Presidente	Prof. Raúl Garza Velasco
Vocal	Prof. Abel Gutiérrez Ramos
Secretario	Prof. Eduardo Bonilla Espinosa
1er Suplente	Prof. Luciano Hernández Gómez
2° Suplente	Profra. Ma. de los Ángeles Granados Silvestre

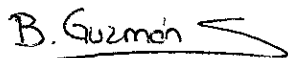
Sitio donde se desarrolló el tema:

Bibliotecas de la Facultad de Química, Medicina y del Sector Salud.

Asesor


Q.F.B. Raúl Garza Velasco

Sustentante


María Begoña Guzmán Solano



ESCUELAS PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA

*Dame, Señor, grandeza para entender,
capacidad para retener,
método y facultad para aprender,
sutileza para interpretar,
gracia y abundancia para hablar.*

*Dame acierto al empezar,
dirección al progresar
y perfección al acabar.*

Sto. Tomás de Aquino

DEDICATORIAS

A mis padres que han sido mi más grande apoyo y ejemplo en la vida, además de brindarme su amor incondicionalmente.

A mis hermanas Esti, Mary y Raquel por su cariño y estar siempre conmigo.

A mi tía Meche, mi abuelita Satur y a la memoria de mis abuelitos Roberto y Raquel.

A David por el apoyo y amor que me ha proporcionado en todo momento.

A Nahieli, Jiro, Santiago, Guimel, Poncho y Nohemí por su amistad y compañerismo. Han sido mi mejor equipo de trabajo.

A Fausto por esa gran amistad que hemos conservado a pesar de la distancia.

A mis amigas: Conchita, Alma, Magally, Wendy, Lushe, Mónica, Araceli y Betty por todas sus palabras de aliento.

A mi asesor Raúl Garza por toda su ayuda y comprensión.

A la Dra. Rachel Mata por ser un ejemplo de trabajo y dedicación.

A mis compañeros del trabajo, mis excompañeros del laboratorio 124 y de la Facultad por su ayuda en mi formación como persona y como profesionalista.

Finalmente doy gracias a la Universidad Nacional Autónoma de México, en especial a la Facultad de Química y a sus profesores, por todas sus enseñanzas.

CONTENIDO

Lista de tablas.....	I
Lista de figuras.....	II
Lista de abreviaturas.....	III
Agradecimientos.....	V

	Página
Introducción.....	1
Objetivos.....	5
I. <i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica (ECET)	
A. Definición.....	6
B. Patogénesis.....	6
1. Toxinas termolábiles (LT).....	7
2. Toxinas termoestables (ST).....	12
3. Adhesinas.....	16
C. Patología.....	21
D. Datos epidemiológicos.....	26

	Página
II. <i>Escherichia coli</i> enteropatógena (ECEP)	
A. Definición.....	30
B. Patogénesis.....	30
1. Patrón de “adherencia íntima-efusión” (A/E).....	30
2. Plásmidos EAF y <i>pili</i> BFP.....	42
3. Locus asociado a la efusión enterocítica (LEE) y exoproteínas asociadas a la virulencia.....	45
4. Regulación de los factores de virulencia.....	50
5. Otros probables factores de virulencia.....	52
C. Patología.....	53
D. Datos epidemiológicos.....	55
III. Detección de ECET y ECEP en el laboratorio.....	57
A. Pruebas bioquímicas.....	58
B. Pruebas biológicas.....	60
C. Pruebas fenotípicas.....	62
D. Pruebas inmunológicas.....	67
E. Métodos moleculares.....	78
Conclusiones.....	99
Bibliografía.....	102

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Correspondencia entre las principales adhesinas detectadas en ECET	19
Tabla 2. Propuestas de vacunas orales contra las cepas ECET de origen humano	24
Tabla 3. Resultados de estudios de diarrea efectuados en México por la Organización Mundial de la Salud (OMS)	27
Tabla 4. Frecuencia de aislamiento de enteropatógenos en la "diarrea del viajero"	28
Tabla 5. Relación entre virotipos de <i>E. coli</i> diarreagénica, serogrupos y serotipos	69
Tabla 6. Cuadro comparativo entre dos enzimas aplicables a la prueba de ELISA	76
Tabla 7a. Sondas de fragmentos de DNA para la detección de ECET	82
Tabla 7b. Sondas de oligonucleótidos para la detección de ECET	82
Tabla 8a. Sondas de fragmentos de DNA para la detección de ECEP	83
Tabla 8b. Sondas de oligonucleótidos para la detección de ECEP	83
Tabla 9. Componentes más relevantes de la PCR	89
Tabla 10. Iniciadores para la detección de ECET	91
Tabla 11. Iniciadores para la detección de ECEP	92

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estructuras de la exotoxina termolábil (LT) y del receptor intestinal de dicha toxina, el gangliósido G _{M1}	8
Figura 2. Mecanismo de acción propuesto para la acción de la LT	9
Figura 3. Mecanismo de acción propuesto para la acción de la ST	14
Figura 4. Fimbrias de ECET	18
Figura 5. Corte histológico, microscopía electrónica de barrido y microscopía de la colonización del intestino por ECET	21
Figura 6. Microscopía electrónica de la lesión A/E de ECEP	31
Figura 7. Microscopías electrónicas del BFP de ECEP	35
Figura 8. Mapa entero del plásmido pB171 de ECEP	44
Figura 9. Esquema del LEE de ECEP	46
Figura 10. Microscopía electrónica de la EspA de ECEP	49
Figura 11. Modelo de traslocación de proteínas tipo III en ECEP	50
Figura 12. Microscopías de luz y electrónicas que muestran los patrones de adherencia a células HEP-2 por distintos grupos de <i>Escherichia coli</i>	65
Figura 13. Microscopías de fluorescencia y de contraste de fases que muestran la adherencia localizada de ECEP	67
Figura 14. Reacciones de coaglutinación y aglutinación pasiva	71
Figura 15. Radioinmunoensayo para STa	75
Figura 16. Esquema general de las condiciones necesarias para la reacción en cadena de la polimerasa	89
Figura 17. Gel de electroforesis de una PCR múltiple	97

LISTA DE ABREVIATURAS

A/E	Adherencia íntima-efusión
Ac	Anticuerpo
Ag	Antígeno
BFP	<i>Pili</i> formadores de racimos
Ca⁺⁺_{ic}	Calcio intracelular
cAMP, cGMP	AMP o GMP cíclico
CFA	Factor antigénico colonizador
CFTR	Regulador transmembranal de la fibrosis cística
CS	Antígeno de superficie de <i>E. coli</i>
CT	Toxina del cólera o colerágeno
DNA	Ácido desoxirribonucleico
eae	Gen de adherencia íntima-efusión de <i>E. coli</i>
EAF	Factor adherente de ECEP (plásmido)
EAST1	ST de bajo peso molecular de ECEA
ECAD	<i>E. coli</i> adherente difusa
ECEA	<i>E. coli</i> enteroagregativa
ECEH	<i>E. coli</i> enterohemorrágica
ECEI	<i>E. coli</i> enteroinvasiva
ECEP	<i>E. coli</i> enteropatógena
ECET	<i>E. coli</i> enterotoxigénica
ELISA	Inmunoensayo enzimático
elt/etx	Genes que codifican para LT
Esp	Proteínas secretadas por ECEP

<i>estp/esth</i>	Genes que codifican para ST
FAS	Tinción fluorescente de la actina
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GC-C	Enzima guanilato ciclasa
Gs	Proteína que se une al GTP
IgAs	Inmunoglobulina clase A secretoria
Int	Intimina de ECEP
LA	Adherencia localizada
LEE	Locus asociado a la efusión enterocítica
Ler	Regulador de la expresión del LEE
LT	Toxina termolábil
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Per	Regulador codificado en plásmido
PKA / PKC	Proteín-cinasa A / C
RNA	Ácido ribonucleico
Sep	Proteínas de secreción de ECEP
SLT	Toxina como Shiga
SNE	Sistema nervioso entérico
ST	Toxina termoestable
Tir	Receptor translocado de intimina
TMP-SMZ	Trimetoprim-Sulfametoxazol
UFC	Unidades formadoras de colonias

AGRADECIMIENTOS

De manera muy especial, agradezco al Q.F.B Raúl Garza de la Facultad de Química de la UNAM, por la dirección del presente trabajo

Al Dr. Carlos Eslava de la Facultad de Medicina de la UNAM, por su ayuda en la comprensión de conceptos relativos al tema de este trabajo.

A las editoriales American Society for Microbiology y Blackwell Science Ltd., al igual que a los autores, por los permisos otorgados para la reproducción de algunas figuras.

A Fundación UNAM y al comité de becas de Roche-Syntex por las becas recibidas durante mis estudios en la Facultad de Química.

Al Sistema Nacional de Investigadores, que junto con CONACyT, me brindaron un apoyo económico durante mi estancia con la Investigadora Nacional Nivel III, Dra. Rachel Mata Essayag.

A Fundación Telmex por el apoyo, no sólo económico, que he recibido durante el estudio de la licenciatura de Química Farmacéutico-Biológica en la UNAM y durante la realización de este trabajo monográfico de actualización.

A Procter & Gamble por las facilidades otorgadas para los trámites y conclusión de esta prueba escrita.

INTRODUCCIÓN

En México, los padecimientos intestinales de origen infeccioso representan la segunda causa de enfermedad -superados únicamente por los de las vías respiratorias- y ocupan el catorceavo lugar entre los diversos motivos de defunción (40, 56). Es decir, su importancia es definitiva desde el punto de vista socio-económico, ya que se trata de patologías que provocan la pérdida de numerosas horas-hombre, debido a que uno de sus principales síntomas, la diarrea, resulta con frecuencia discapacitante durante varios días, e inclusive, genera al Estado la necesidad de prestarle servicios médicos relativamente costosos a los individuos afectados (54).

Por lo que se refiere a la población infantil, dichas patologías se consideran aún más trascendentales, ya que ascienden al segundo sitio en cuanto a incidencia y son la cuarta causa de mortalidad; independientemente de que también impactan en forma negativa al sector productivo, pues es muy común que los padres se vean obligados a interrumpir sus labores para cuidar de sus hijos durante la enfermedad (56, 114). En este sentido, regularmente se reportan entre 1 y 3 cuadros intestinales agudos anuales por persona en los países desarrollados y de 5 a 18 episodios anuales en cada menor de 5 años que habita en las zonas endémicas, las cuales generalmente abarcan a los países en vías de desarrollo (95)

Inclusive, en estos últimos años es muy frecuente que del 30 al 50% de los turistas provenientes del primer mundo adquieran la denominada "diarrea del viajero" y/o algunas otras afecciones entéricas, debido al consumo de agua o alimentos contaminados (95).

La microflora intestinal está compuesta por bacterias Gram positivas y Gram negativas que compiten por nutrientes y sitios de unión al tejido implicado. La mayoría de ellas son anaerobias obligadas y, dentro de las anaerobias facultativas, se encuentran las enterobacterias, entre las que destaca *Escherichia coli*. Esta especie sólo se desarrolla en el intestino y su detección en el agua y los alimentos representa un claro indicador de contaminación por materia fecal (50, 120).

Escherichia coli es la enterobacteria facultativa predominante del colon humano, al cual coloniza dentro de las primeras 40 h después del nacimiento (50). Esta bacteria Gram negativa desempeña una función simbiótica con su hospedero y permanece en la luz intestinal sin ocasionar lesiones; sin embargo, puede manifestarse como agente patógeno en individuos inmunodeprimidos o debilitados, independientemente de que existen cepas que han logrado desarrollar la capacidad de provocar un amplio espectro de padecimientos humanos (47, 72, 80).

Las principales patologías que se asocian a esta bacteria son (96):

- Infecciones del tracto urinario (*E. coli* es el agente etiológico del 80 al 90% de los casos)

- Septicemia.
- Meningitis séptica.
- Enfermedades entéricas. En tal contexto, las *E. coli* causantes de enfermedades entéricas presentan en común el hecho de que la persona afectada experimenta diarrea, la cual se puede definir como una mayor frecuencia en el movimiento intestinal y una menor consistencia de las evacuaciones (9).

Las diferentes cepas diarreagénicas de *Escherichia coli* se han agrupado en serotipos, de acuerdo con las características fenotípicas de la bacteria, determinadas mediante diversas técnicas serológicas que evidencian sus antígenos (Ags) somáticos (O), flagelares (H) y capsulares (K) (96). No obstante, al comprobarse que para cada cuadro clínico se podían asociar varios serotipos, se planteó otro tipo de clasificación, por virotipos o categorías (68, 80, 82, 96).

En este sentido, la base de la virotipificación corresponde a sus patrones de unión a la célula hospedera y al mecanismo de acción a partir del cual ejercen su acción patógena. De acuerdo con estas características, las *E. coli* productoras de afecciones entéricas se han clasificado tradicionalmente en seis virotipos o categorías: *E. coli* enterotoxigénica (ECET), *E. coli* enteropatógena (ECEP), *E. coli* enterohemorrágica (ECEH), *E. coli* enteroinvasiva (ECEI), *E. coli* enteroadherente o enteroagregativa (ECEA) y *E. coli* adherente difusa (ECAD) (80, 96).

Cabe señalar que, en los años más recientes, numerosos autores han propuesto la existencia de otros virotipos o categorías adicionales: *E. coli* separadora de células (CDEC, por sus siglas en inglés), *E. coli* productora de una toxina separadora y citoletal (CLDTEC, por sus siglas en inglés) y *E. coli* invasiva y productora de una enterotoxina similar a la toxina Shiga (ESIEC, por sus siglas en inglés) (68, 80, 82).

No obstante, los mencionados en primer término son los predominantes actuales, aunque esta afirmación sólo podría encontrarse sustentada en el desconocimiento de los segundos y, por lo tanto, en la carencia de metodologías destinadas a llevar a cabo la detección de estos últimos en el laboratorio.

El presente trabajo pretende difundir los conocimientos de mayor actualidad, acerca de los factores de virulencia y el diagnóstico de laboratorio de las dos categorías de *E. coli* diarreagénicas, consideradas como las de mayor frecuencia en nuestro medio: ECET y ECEP.

OBJETIVOS

- Describir los aspectos de mayor importancia asociados a los factores de virulencia de ECET y ECEP, microorganismos considerados entre los principales agentes etiológicos del síndrome diarreico entre la población infantil de los países en vías de desarrollo.
- Relacionar la forma en la que ECET y ECEP generan enfermedades intestinales al humano, con las medidas preventivas y terapéuticas que, para lograr su control y/o erradicación, se han establecido recientemente o aún se encuentran sujetas a investigación.
- Describir las principales metodologías bioquímicas, biológicas, fenotípicas, inmunológicas y moleculares, utilizadas en los laboratorios de referencia para detectar confiablemente a ECET y a ECEP, ya sea con fines diagnósticos y/o epidemiológicos.

I. *Escherichia coli* ENTEROTOXIGÉNICA (ECET)

A. Definición

Se trata de las cepas de *Escherichia coli* que producen dos distintas clases de enterotoxinas: toxinas termolábiles (LT) y/o toxinas termoestables (ST) (80).

B. Patogénesis

Las cepas clasificadas como ECET elaboran diversos factores de virulencia, entre los que destacan sus adhesinas y las enterotoxinas denominadas termolábiles (LT) y termoestables (ST); estudios originales realizados en ganado porcino han demostrado que dicha capacidad reside en la presencia de plásmidos¹ y que ambas toxinas pueden afectar a niños, e inclusive, a voluntarios humanos, provocándoles evacuaciones acuosas muy voluminosas, aunque en ausencia de inflamación y fiebre (17, 71, 113).

¹ Moléculas pequeñas de DNA extracromosómico, que se replican de forma autónoma y presentan estructura circular. Se localizan en diversas especies bacterianas y contienen información genética diversa, como la resistencia a antibióticos o la producción de toxinas (94).

1. Toxinas termolábiles (LT)

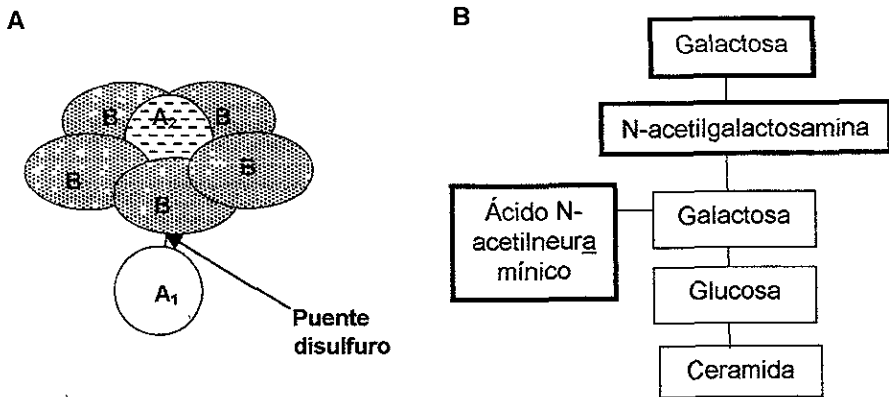
La toxina LT se encuentra íntimamente relacionada con el colerágeno (la toxina del cólera, CT), tanto en estructura como en función: ambas presentan una secuencia proteica idéntica en alrededor del 80%, comparten a su receptor primario en las células del hospedero y sus actividades enzimáticas son prácticamente iguales; de hecho, hasta ocasionan idénticos efectos sobre los cultivos experimentales *in vitro*, aunque se evidencia una mayor virulencia en la exotoxina del cólera. Es decir, sólo se han detectado claras diferencias en lo tocante a su síntesis y secreción, y en las respuestas que originan por parte de los linfocitos T cooperadores (71, 80, 96, 111).

Por otra parte, se acepta que existen al menos dos serogrupos de LT: LT-I y LT-II, los cuales no cruzan antigénicamente y, mientras el primero predomina en humanos y en ciertos animales, el segundo sólo se asocia a animales y muy rara vez al hombre (80, 96).

La LT-I es un oligómero de 86 kDa y está constituida por una subunidad A (de 28 kDa) y cinco subunidades idénticas B (cada una de 11.5 kDa), dispuestas en un anillo capaz de enlazarse firmemente al gangliósido G_{M1} (su receptor primario) y a otras glicoproteínas intestinales. Tal como ocurre en la gran mayoría de las exotoxinas A-B, su subunidad A es la responsable de la actividad enzimática y se escinde proteolíticamente redituando los péptidos

A₁ y A₂, entre los cuales suelen existir puentes disulfuro (Figura 1) (26, 80, 111).

Figura 1. Estructura de la exotoxina termolábil (LT) (**A**) y composición del receptor intestinal de dicha toxina, el gangliósido G_{M1} (**B**) (26, 111).



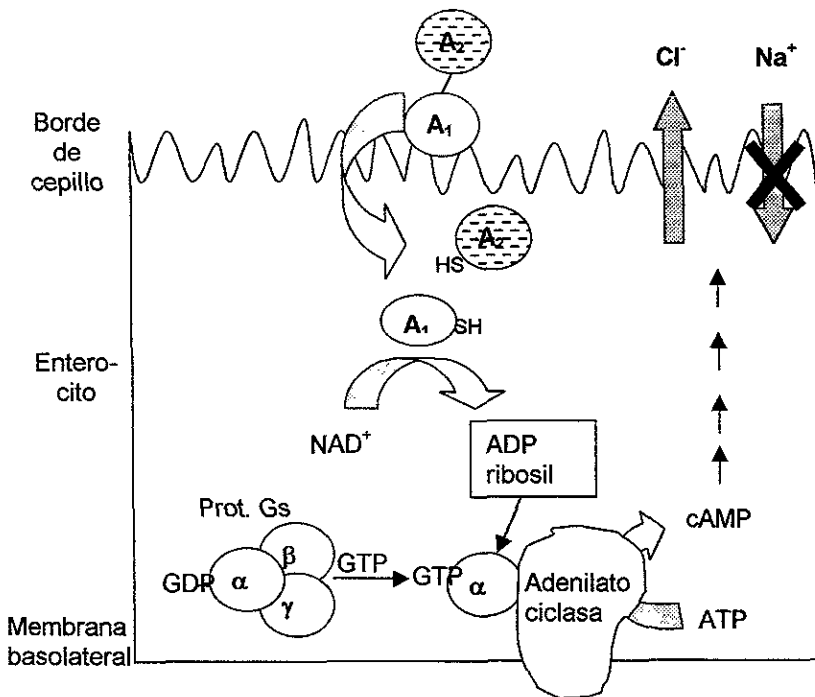
Adicionalmente, se han observado dos variantes de LT-I: LTp-I y LTh-I, que exhiben una parcial reactividad cruzada y que, al parecer, son específicas para hospederos porcinos y humanos, respectivamente (80).

Los genes que codifican para la síntesis de la LT se conocen como *elt* o *etx* y se localizan agrupados en operones², tal como sucede en el caso de la toxina del cólera (CT), si bien las regiones de los promotores son completamente diferentes. Dichos genes se encuentran en los mismos plásmidos que pueden contener la información genética de la que depende la producción de ST y de

² Un operón es un grupo de genes muy próximos entre sí, regulados de forma conjunta, existiendo genes reguladores, promotores, operadores y estructurales.

las adhesinas a las que se ha asignado el nombre de factores antigénicos de colonización (CFA por *colonization factor antigen*) (80, 96).

Figura 2. Mecanismo de acción propuesto para la LT; dicha toxina, al igual que la CT, posee una actividad ADP-ribosilante, cuya consecuencia final -la alteración en la absorción y la secreción de iones- genera el síndrome diarreico.



Una vez que la subunidad B de la LT se une a su receptor primario, la subunidad A penetra a través de la membrana, es escindida proteolíticamente y el péptido A₁ provoca la activación permanente de la adenilato-ciclasa localizada en la membrana basolateral de las células intestinales. En

concreto, el péptido A_1 cataliza la transferencia del ADP-ribosil del NAD^+ a la proteína reguladora Gs, la cual activa a la adenilato-ciclasa, lo que conduce al incremento de los niveles intracelulares de cAMP y, por ende, a la fosforilación supranormal de los canales de cloruro (Cl^-) ubicados en las membranas apicales de las células epiteliales. La consecuencia de dicha alteración es la hipersecreción del ion Cl^- y la inhibición en la absorción de sodio (Na^+), fenómenos que generan la pérdida de agua por parte de las células intestinales (consultar la figura 2) (9, 26, 80, 96).

Aunque como resultado del incremento en los niveles intracelulares de cAMP la secreción de Cl^- representa la explicación clásica del mecanismo mediante el cual la LT y el colerágeno ocasionan diarrea, existen ciertas evidencias de que la respuesta secretoria a la acción de ambas toxinas también podría ser generada mediante otros procesos; entre éstos se cuentan los siguientes (9, 80):

- La síntesis y liberación de prostaglandinas de la serie E (PGE1 y PGE2) -por parte de las células cebadas- y el factor de la activación plaquetaria -producto de las células del sistema inmune- promueven el transporte electrolítico y la movilidad intestinal.
- El sistema nervioso entérico (SNE) regula la movilidad intestinal y la secreción iónica, a través de la serotonina y un polipéptido epitelial vasoactivo cuya liberación sobre el intestino delgado humano sucede a la incorporación del colerágeno.

- Ante una eventual respuesta inflamatoria disparada por la LT o el colerágeno, ocurre una inducción de la liberación de interleucina 6 (IL-6).

Los tres mecanismos mencionados están sustentados en estudios *-in vivo* e *in vitro*- de la LT y de la toxina del cólera y, lógicamente, uno o más de ellos podrían ocurrir junto con el proceso clásico asociado al nivel de cAMP; de hecho, sólo la capacidad para inducir la liberación de serotonina no se ha logrado reproducir vía la adición de la LT a los modelos analizados. (80)

Por otro lado, se ha establecido claramente que la LT y el colerágeno disminuyen la absorción de fluidos y electrolitos a partir del lumen intestinal. A este respecto, Müller *et al* reportaron que ambas promueven la inhibición del péptido co-transportador de iones H⁺ (dependiente del cAMP) en la línea celular humana Caco-2 (de carcinoma de colon humano); cabe señalar que dicho péptido carece de los sitios para ser fosforilado por la proteín-cinasa A (PKA), por lo que se sugiere que el efecto en cuestión podría ser generado a través de la PKC (80).

Finalmente, es importante considerar que la LT es un potente inmunógeno , por lo que puede actuar como inductor de la respuesta inmune en la mucosa intestinal, e inclusive, a nivel generalizado, cuando se utiliza sólo la subunidad B de dicha toxina (32, 42, 80, 98).

Por lo que se refiere a la exotoxina **LT-II**, ésta contiene una subunidad A similar en un 57% a su análoga en la **LT-I** y en el colerágeno, pero su subunidad B es totalmente diferente a la de ambas. Además, se conocen dos variantes antigénicas: **LT-IIa** y **LT-IIb**, las cuales difieren entre sí en aproximadamente 68%. La **LT-II** incrementa los niveles de cAMP tal como lo hace la **LT-I**, pero emplea al gangliósido G_{D1} como su receptor en las células hospederas. Además, no existen evidencias contundentes de que la **LT-II** se relacione con enfermedades humanas o animales (80, 96).

2. Toxinas termoestables (ST)

Las toxinas termoestables son pequeñas, no inmunogénicas, monoméricas y contienen múltiples residuos de cisteína -cuyos enlaces disulfuro les confieren estabilidad al calor. A la fecha sólo se han detectado dos clases de ellas: **STa** o **ST-I** y **STb** o **ST-II**, que difieren en cuanto a estructura y mecanismo de acción. Los genes que codifican para la síntesis de las **ST's** residen principalmente en plásmidos, aunque también se han podido localizar en transposones (80, 96).

En cuanto a la **STa** activa (soluble en metanol), ésta corresponde a un péptido de 18 a 19 aminoácidos (2 kDa) y presenta dos variantes conocidas como **STp** (**ST** porcina o **STIa**) y **STh** (**ST** humana o **STIb**), denominaciones debidas a las especies hospederas en las cuales fueron detectadas. Sin embargo, ambas se ubicaron posteriormente en aislamientos humanos de

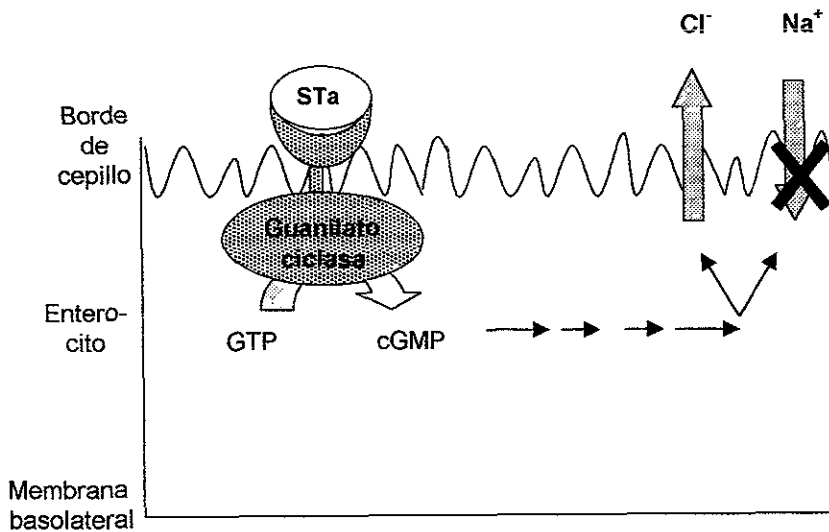
ECET, observándose que presentan trece aminoácidos idénticos, suficientes para manifestar su actividad tóxica. Seis de estos residuos corresponden a cisteínas que forman tres puentes disulfuro intramoleculares. Inicialmente, la STa es producida como un precursor constituido por 72 aminoácidos, que después es escindido por una peptidasa para reeditar la molécula que se transporta al periplasma, en donde la proteína DsbA provoca la formación de los enlaces disulfuro y otra proteasa la procesa dando lugar a su estado maduro activo, mismo que se libera por difusión a través de la membrana externa bacteriana (80, 96).

El receptor natural de la STa es la enzima guanilato-ciclasa C (GC-C) localizada en la membrana apical de las células epiteliales del intestino y cuya unión a "ligandos" del dominio extracelular estimula su actividad enzimática intracelular. Cabe tomar en cuenta que la hormona guanilina funge como el estimulador endógeno de la GC-C, que su efecto sobre esta enzima es menor que el exhibido por la STa y que su papel es el de recuperar la homeostasia del intestino; por tales motivos, la eventual influencia de la exotoxina sobre la GC-C provoca la aparición de diarreas severas (80, 96, 111).

Evidentemente, la unión de la STa a la GC-C promueve la actividad de la guanilato-ciclasa y, por ende, a elevados niveles intracelulares de cGMP, los cuales se acompañan por la secreción de Cl⁻ al activarse el canal de dicha ión conocido como CFTR- y/o por la inhibición de la absorción de Na⁺,

factores -ambos- que se traducen en la secreción de fluido intestinal. Los pasos intermedios implicados en el proceso aún no se han establecido con claridad (consultar la figura 3) (80, 111).

Figura 3. Mecanismo de acción propuesto para la acción de la ST; dicha toxina, al unirse a la enzima guanilato-ciclase, también provoca diarrea severa -vía la alteración en la absorción y secreción iónicas.



La STa actúa mucho más rápido que la LT, la cual requiere de 15 a 60 minutos para translocarse y activar a la adenilato-ciclase, merced a la ubicación apical de su ciclase-receptora. Como en el caso de la LT, también se han propuesto otros mecanismos adicionales de acción de la STa que parecen involucrar a las prostaglandinas, el calcio, el SNE, la liberación de fosfatidilinositol y diacilglicerol, la activación de la proteína-quinasa C (PKC) y

los rearreglos en los microfilamentos de actina, sin embargo, todo ello aún no puede afirmarse con plena certeza (9, 80).

La capacidad de síntesis de la STp y STh reside en un gen *-estp* o *esth*, respectivamente- cuya expresión es regulada y controlada por cAMP. Como se ha mencionado con anterioridad, ambos genes se encuentran en los mismos plásmidos que suelen contener la información genética de la que depende la producción de la LT-I y de las CFA's (96).

Por lo que respecta a la **STb**, ésta se asocia principalmente a cepas de ECET provenientes de porcinos, si bien se han reportado algunos aislamientos relacionados con humanos. Esta toxina es sintetizada inicialmente como una proteína precursora de 71 aminoácidos, la cual es procesada hasta contener 48 aminoácidos y mostrar un peso molecular de 5.1 kDa. A diferencia de la STa, la STb (80, 96, 111):

- Presenta 4 residuos de cisteína que forman enlaces disulfuro.
- Induce daños histológicos al epitelio intestinal, consistentes en la pérdida de células epiteliales vellosas.
- Su receptor en las células hospederas permanece sin determinarse, aunque algunos autores sugieren que su unión podría ser inespecífica a la membrana citoplásmica, previa endocitosis.
- No estimula la liberación de Cl^- , sino de HCO_3^- (en las células intestinales), sin que ello tenga relación alguna con el incremento de

niveles de cAMP o cGMP. Al parecer, si se asocia a un aumento en las concentraciones de calcio.

Además, la STb promueve la liberación de PGE2 y serotonina, lo cual sugiere que el SNE podría estar implicado en la respuesta secretoria que tiene lugar hacia su presencia (80).

3. Adhesinas

Antes de ocasionar diarrea, ECET debe adherirse a la mucosa del intestino delgado, concretamente a los enterocitos, a través de sus numerosas fimbrias (*pili*) distribuidas alrededor del bacilo. De esta manera, evita ser desplazada por el moco y los movimientos peristálticos (71)

Aunque se han caracterizado cerca de 21 adhesinas, lo cierto es que algunas otras permanecen sin determinarse con exactitud; de hecho, la clara heterogenicidad antigénica conferida por los múltiples tipos de *pili*, ha representado un obstáculo ineludible para desarrollar vacunas eficaces que protejan contra ECET (32, 60, 87).

Sin embargo, algunas fimbrias de este microorganismo definen cierta especificidad de su especie hospedera; por ejemplo, las cepas que expresan *pili* K99 suelen ser patógenas para vacunos, corderos y cerdos, mientras que las que poseen K88 sólo lo son en cerdos. En cuanto a las cepas de origen humano, éstas presentan sus propios arreglos fimbriales, conocidos

inicialmente como factores antigénicos de colonización o CFA's. Posteriormente, se determinó que estos últimos se encontraban formados por distintos componentes antigénicos, a los que se denominó Ags superficiales de *coli* o CS (por *coli surface antigens*). La tabla 1 relaciona ambas designaciones (32, 80).

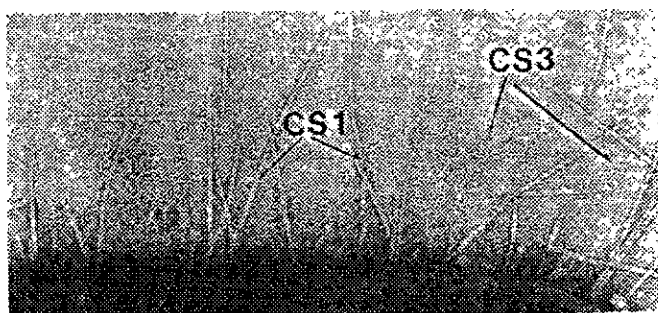
Los CFA's se subdividen de la siguiente manera, con base en sus características morfológicas, las cuales se pueden apreciar en la figura 4 (32):

- Fimbrias o filamentos rígidos, como el CFA/I, CS1, CS2, CS4, CS14, CS17 y CS19, que se conforman por una proteína única, ensamblada en forma helicoidal, la cual determina sus características inmunológicas.
- Fibrillas o paquetes de hilos flexibles.
- Filamentos individuales finos y flexibles.
- Proteínas superficiales no fimbriales.

Estos factores de colonización presentan homología en la secuencia de aminoácidos con otras estructuras; por ejemplo, el CFA/III corresponde a fimbrias que presentan homología con los *pili* tipo IV; por su parte, el CFA/II y el CFA/IV están constituidos por múltiples y distintas estructuras fimbriales; de hecho, las cepas productoras de CFA/II expresan la estructura flexible CS3, ya sea sola o mezclada con CS1 o CS2, y las que sintetizan CFA/IV combinan la CS6 con la CS4 o la CS5. El CS5 y el CS7 se encuentran en

forma de doble hélice y presentan homología con las fimbrias de las cepas ECET de origen animal, tales como la K88, F41 o 987P. Finalmente, el CS15 presenta similitud con las fimbrias SEF 14 de *Salmonella enteritidis* (32, 70, 80).

Figura 4. Tinción negativa que muestra a CS1 y CS3 de la ECET M424C1 (x 177 600) (Reproducción de referencia 70, copyright (1984) con el permiso de American Society for Microbiology).



Adicionalmente, se han observado muchas otras adhesinas en ECET; no obstante, los estudios epidemiológicos sugieren que, a nivel mundial, el 75% de las cepas expresan las CFA/I, CFA/II o CFA/IV y que una fimbria de reciente descubrimiento, denominada *Longus*, se encuentra en numerosos aislamientos provenientes de humanos (38). La detección de estos factores de virulencia se ha logrado concentrar por medio de técnicas inmunológicas que incluyen la aglutinación en placa, inmunodifusión, inmunoblotting y ELISA (por *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) y, desde luego, a través de

métodos moleculares tales como hibridación con sondas marcadas y PCR (por *Polymerase Chain Reaction* o reacción en cadena de la polimerasa) (32, 70, 71).

Tabla 1. Correspondencia entre las principales adhesinas detectadas en ECET.

Designación original	Designación CS	Designación original	Designación CS
Fimbrias rígidas			
CFA/I	CFA/I	PCF0166	CS14
CS1	CS1	CS17	CS17
CS2	CS2	PCFO20	CS18
CS4	CS4	CS19	CS19
PCFO159	CS12	CS20	CS20
Fimbrias en forma de paquete o racimo			
CFA/III	CS8	Longus	CS21
Fimbrias similares a fibrillas			
CS3	CS3	PCFO148	CS11
CS5	CS5	PCFO9	CS13
CS7	CS7		
Adhesinas no fimbriales			
CS6	CS6	8786	CS15
2230	CS10		

La genética asociada a los CFA's se ha estudiado extensamente, por lo que los trabajos implicados han logrado proponer los modelos de expresión, secreción, translocación y ensamble fimbriales. Los genes forman parte de operones localizados en plásmidos que, por lo general, también codifican para la síntesis de las toxinas LT y ST; dichos operones se han encontrado flanqueados por secuencias de inserción, lo cual hace pensar que su incorporación al plásmido ocurre mediante transposones. Los CFA's se

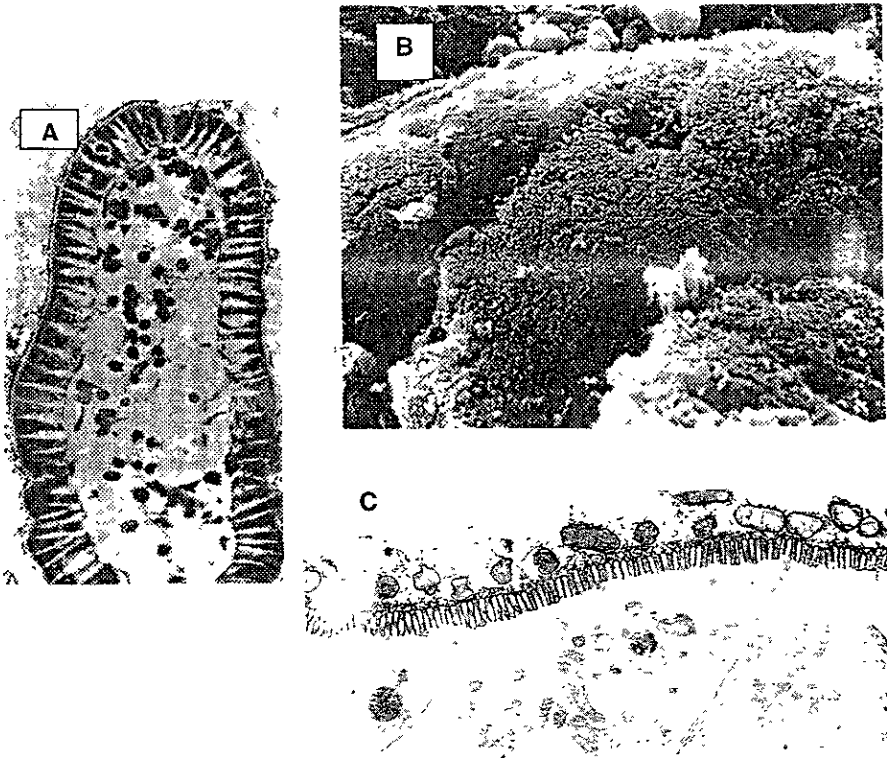
expresan en un 90% de cepas productoras de ST y LT, en el 60% de cepas que sólo elaboran ST y en el 10% de las que únicamente sintetizan LT; cabe mencionar que estas últimas son consideradas como las de menor importancia médica (32, 80).

Los racimos de genes fimbriales cuentan con la información necesaria para la producción de una subunidad proteica primaria y de las moléculas accesorias que se requieren para el procesamiento, la exportación y el propio ensamble de cada *pilus*; por lo regular, la subunidad estructural de este último, conocida como pilina, representa el inmunógeno predominante y está sujeta a las presiones inmunológicas correspondientes. Sin embargo, los *pili* exhiben una importante variación estructural, aunque el N-terminal de sus subunidades proteicas y la secuencia de las proteínas accesorias suelen conservarse, por lo menos parcialmente (32).

Cabe señalar que si bien la proteína situada en la punta de las fibrillas (Pap o fimbria tipo I) llega a fungir como la real adhesina de algunas cepas de *E. coli*, lo cierto es que, en las cepas diarreagénicas de esta misma especie, la propia pilina es la molécula que media la adherencia (80).

Gracias a estas adhesinas, ECET sólo permanece fija al enterocito sin invadir las células intestinales ni causar una lesión histológica característica como ECEP. En la figura 5 se puede observar la colonización por ECET (64)

Figura 5. Corte histológico de una mucosa intestinal infectada por ECET (x350) (A); microscopía electrónica de barrido de la misma mucosa (x1000) (B); y micrografía electrónica de mucosa intestinal infectada por ECET B7A (x12000) (C) (Reproducción de referencia 64, copyright (1987) con el permiso de American Society for Microbiology).



C. Patología

Las características clínicas del padecimiento ocasionado por ECET suelen ser similares, tanto en los pacientes que habitan en zonas endémicas, como en los voluntarios humanos inoculados experimentalmente. Los síntomas aparecen abruptamente, después de un corto período de incubación de 14 a

50 h y la diarrea es frecuente (por lo menos se presentan 3 ó 4 evacuaciones en 24 h) (66, 79, 113), muy acuosa y no presenta sangre, moco o material purulento; así mismo, la fiebre y el vómito son raros y las evacuaciones pueden ser moderadas y breves o tan severas como cuando se trata del cólera. Es oportuno agregar que la diarrea ocasionada por este microorganismo se puede diferenciar de las de origen viral porque la relación de frecuencia diarrea/vómito es ≥ 2.5 y la duración del cuadro patológico es significativamente mayor (17).

Por otra parte, aunque la administración de antibióticos eficaces reduce la duración de la diarrea y la excreción de ECET, los antimicrobianos más efectivos pueden no estar disponibles en las áreas endémicas; por tal motivo, la oportuna y debida hidratación adquiere visos de emergencia -sobre todo en los infantes afectados-. Conviene acompañarla con dosis orales de subsalicilato de bismuto o loperamida, aunque es preciso tomar en cuenta que esta última está contraindicada en los casos de que la patología curse con fiebre o disentería (53, 66, 102).

Evidentemente, las fluoroquinolonas (ciprofloxacina, norfloxacina u ofloxacina) suelen ser los agentes terapéuticos de mayor recomendación, principalmente a partir de la resistencia que el microorganismo ha desarrollado contra los antimicrobianos tradicionales tales como el trimetoprim-sulfametoxazol (TMP-SMZ), ciprofloxacina y azitromicina. Ericsson *et al* han propuesto un esquema combinado de ofloxacina y

loperamida que recomiendan como eficaz y seguro, alternativo al de TMP-SMZ con loperamida (43, 53, 95).

Uno de los puntos que más llama la atención sobre las enfermedades entéricas, reside en el hecho de que los viajeros provenientes de países desarrollados suelen llegar aleccionados a las zonas endémicas; en este sentido, algunos turistas se administran, como medida preventiva, una sola dosis diaria de doxiciclina, TMP-SMZ o alguna fluoroquinolona (norfloxacina) aplicada desde 24 h antes de la visita hasta el día de regreso a sus países de origen. En otros casos, las sugerencias incluyen:

- Evitar la ingestión de agua y alimentos sospechosos.
- Ingerir subsalicilato de bismuto diariamente, a razón de cuatro tomas cada día.
- Utilizar alguno de los antibióticos mencionados, sólo cuando lleguen a padecer de diarrea (43, 53, 95, 111).

La mala fama de ECET ha alcanzado un grado tal que varias vacunas orales se han venido desarrollando.

Como lo muestra la tabla 2, algunos expertos han empleado células completas del microorganismo que expresa los factores de colonización. Otros han trabajado con toxoides y, desde luego, también se han realizado diversos intentos por preparar vacunas con fimbrias purificadas, cepas atenuadas de ECET o de *Salmonella*, *Shigella* o *Vibrio cholerae*, en estos tres

últimos casos, elaborando cepas clonadas con Ags de ECET. Con los Ags de las adhesinas se pretende lograr inmunidad contra el 65% de las cepas productoras de ST o ST y LT y, por su parte, con el toxoide de LT (CTB) se busca un efecto protector contra las cepas que sólo producen LT (80, 111).

Tabla 2. Vacunas orales propuestas contra cepas ECET de origen humano.

Característica	Respuesta en la mucosa intestinal	Eficacia protectora	Ref.
Fimbrias purificadas			
Oral, en buffer	Pobre (0-20% contra CFA/I o CFA/II)	Ninguna	(32) (71)
Intra-intestinal, en cápsulas biodegradables	Moderada (50% contra CFA/II)	30% en voluntarios	(32)
ECET completas inactivadas			
Inactivadas con colicina E2	Buena (77% contra CFA/I)	Aprox. 75% en voluntarios	(32)
Inactivadas con formalina	Buena (70-90% contra CFA/I y CS1-CS5)	No probada	(32) (71)
Inactivadas con formalina y además con CTB	Buena (70-90% contra CFA/I y CS1-CS5 y >90% contra CTB)	≥ 70% en voluntarios	(3)(32) (71)(89) (98) (113)
Bacterias vivas			
ECET mutante tox ⁻ , CS1 ⁺ y CS3 ⁺	Buena (100% contra CS1 y CS3)	75% en voluntarios	(32) (71)

Característica	Respuesta en la mucosa intestinal	Eficacia protectora	Ref.
Cepas recombinantes vivas			
<i>Salmonella typhi</i> expresando CFA/I y CS3	No probada	No probada	(32) (71)
<i>Vibrio cholerae</i> expresando CFA/I y CS3	No probada	No probada	(32) (95)
<i>Shigella flexneri</i> 2ª ex presando CFA/I y CS3	No probada	No probada	(32)
<i>Salmonella typhimurium</i> expresando CFA/I	Buena	No probada en humanos	(86) (7)

En la actualidad, se prueba una vacuna oral integrada por células inactivadas de *V. cholerae*, mezcladas con la subunidad B del colerágeno, que intenta proteger a los individuos en contra de la "diarrea del viajero" causada por ECET; la base de su probable eficacia se ubicaría en la antigenicidad cruzada existente entre la LT y la toxina del cólera; lógicamente, este producto no abarca inmunidad alguna contra las cepas que sólo sintetizan ST y sólo cumpliría con una respuesta antitóxica dirigida contra una de las dos toxinas, sin impedir la colonización. Otra medida profiláctica bajo estudio consiste en la ingestión de leche bovina hiperinmune, es decir, con anticuerpos (Acs) contra CFA's que prevengan la colonización del intestino por parte de ECET (30, 32, 80).

D. Datos epidemiológicos

Las cepas de ECET se relacionan generalmente con dos síndromes clínicos: las diarreas deshidratantes que afectan a la población infantil que habita en países subdesarrollados y la "diarrea del turista"; por obvio, los patrones epidemiológicos se encuentran determinados por diversos factores, entre los que destacan (80):

- La inmunidad desarrollada por los individuos que se han expuesto con anterioridad a ECET.
- Las personas asintomáticas pueden liberar grandes cantidades de ECET en las evacuaciones.
- Los cuadros entéricos debidos a ECET requieren de la ingestión de altas dosis del microorganismo.

Por lo que se refiere a las diarreas endémicas, las tres características anteriores implican una extensa contaminación del ambiente en las zonas afectadas y, por lo tanto, los infantes suelen adquirir al agente causal con suma facilidad. La tabla 3 muestra los resultados de un estudio realizado en México de 1982 a 1985, mismo que demuestra la importancia de este microorganismo en la diarrea endémica. En tal contexto, es oportuno comentar que los cuadros debidos a ECET incluyen mayoritariamente cepas productoras de ST (estos llegan a alcanzar el 30% del total de casos) y que otros estudios realizados en México, Nicaragua y Bangladesh indican que las

cepas que expresan CFA's son más virulentas que aquéllas que sólo producen toxinas (80, 89, 111, 113).

Por lo que respecta a la población que afecta, ECET incide principalmente en los niños de algunas semanas y hasta los 5 años, pero su prevalencia es mayor en el grupo de recién nacidos a 3 años. Es decir, el microorganismo se aísla con menos frecuencia a partir de adultos y de niños mayores de 5 años, debido probablemente a una posible inmunidad en las zonas endémicas (89, 111).

Tabla 3. Resultados asociados a un grupo de estudios de diarrea, efectuados en México por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (111).

Bacteria	Porcentaje (%)		Virus y protozoarios	Porcentajes (%)	
	Casos	Control		Casos	Control
ECET	17	7	Rotavirus	13	2
ECEP	10	9	Adenovirus	3	1
<i>Salmonella sp</i>	4	3	Virus de Norwalk	5	2
<i>Shigella sp</i>	11	1	<i>Giardia lamblia</i>	5	1
<i>Campylobacter jejuni</i>	2	2	<i>Entamoeba histolytica</i>	0.7	0
<i>Vibrio cholerae</i> 01	0	0			

CLAVE: Control = individuos sin cuadro diarreico.

En general, las investigaciones epidemiológicas han establecido que el agua y los alimentos contaminados representan el principal vehículo de ECET, e inclusive, que 10⁸ UFC del microorganismo -suspendidas en

amortiguador- son suficientes para reproducir la enfermedad diarreica en voluntarios humanos. Por ello, las principales medidas de prevención en los países en vías de desarrollo deberían incluir la apropiada sanitación del agua y los alimentos, sobre todo en los meses de mayor calor y/o humedad, cuando el microorganismo se reproduce más eficazmente (80).

La "diarrea del viajero" también recibe los nombres de "gypsy tummy", "Aden gut", "Delhi belly", "Hong Kong dog" y "Aztec two-step", ya que el 20 a 60% de los turistas norteamericanos la adquieren al visitar las zonas endémicas de Latinoamérica, Asia y África. El cuadro tiene una duración media de 3 a 4 días, suficientes para incomodar al turista durante su viaje y, según la tabla 4, 20 a 40% de los casos se deban a ECET (12, 49, 53, 95).

Tabla 4. Frecuencia de agentes enteropatógenos que provocan "diarrea del viajero" (12, 95).

Microorganismo	Porcentaje (%)				
	Reportado	Global	LA	Asia	África
ECET	25-75	40-60	42	16	36
Agente desconocido	NR	20-40	48 *	68 *	53 *
ECEP	NR	15	NR	NR	NR
<i>Shigella sp</i>	0-30	10	8	0	0
<i>Salmonella sp</i>	0-15	< 5	1	4	0
<i>Campylobacter jejuni</i>	0-15	< 5	NR	NR	NR

	Porcentaje (%)				
Rotavirus	0-36	< 5	12	0-6	0-6
Giardia lamblia	0-10	< 5	NR	NR	NR
<i>Entamoeba histolytica</i>	0-5	< 3	NR	NR	NR

CLAVES: NR = No reportado; * = Agente causal no identificado y/o aislado. Otros posibles agentes causales de "diarrea del viajero" son: bacterias tales como *Vibrio sp* y *Aeromonas hydrophila*; parásitos tales como *Cryptosporidium sp*; virus tales como el de Norwalk o el adenovirus.

II. *Escherichia coli* ENTEROPATÓGENA (ECEP)

A. Definición

En 1959, Neter definió a este microorganismo como “serotipos de *Escherichia coli* que se encontraban asociados epidemiológicamente a brotes de diarrea infantil.” Posteriormente, en 1983, Edelman *et al* denominaron ECEP a las cepas que causan diarrea, pero no son invasoras ni producen enterotoxinas (LT o ST). Recientemente, Donnenberg *et al* la clasificaron como aquella *E. coli* que origina una histopatología característica, conocida como lesión de “adherencia y efusión” (A/E, por *Adherence and Effacing*) y no sintetiza toxina de Shiga (20, 24, 61).

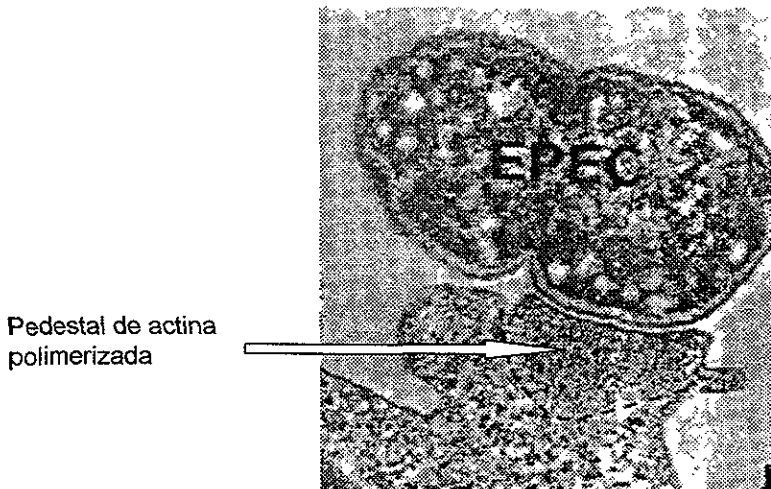
B. Patogénesis

1. Patrón de “adherencia íntima-efusión”

Una de las características más destacadas de las enfermedades debidas a ECEP consiste en un signo histopatológico que se aprecia en las biopsias intestinales de los humanos y los animales infectados, mismo que también se puede reproducir en ciertos cultivos celulares. El fenotipo obtenido se denomina A/E y se origina cuando la bacteria se posa sobre la membrana

celular del epitelio implicado, provocando que ésta experimente notables modificaciones, que incluyen la acumulación de actina polimerizada, α -actinina, miosina, talina y serrina, particularmente por debajo de los microorganismos adheridos; de esta manera, ECEP aparenta asentarse sobre estructuras semejantes a pedestales que, como si se tratara de pseudópodos, se extienden más de 10 μm hacia fuera de las células epiteliales (consultar la figura 6) (20, 62, 63, 92).

Figura 6. Microscopía electrónica de la lesión característica A/E de ECEP en el intestino (x 45000) (Reproducción de referencia 62, copyright (1989) con el permiso de American Society for Microbiology).



Dichos pedestales son el resultado de un proceso muy dinámico, durante el cual aquéllos se pueden tornar curvos u ondulados mientras se encuentran anclados a la superficie celular. Por su parte, el término "efusión" deriva del

hecho de que cada bacteria involucrada suele desplazarse a lo largo de la superficie epitelial (y sobre los cultivos celulares), a velocidades aproximadas de 0.1 $\mu\text{m}/\text{seg}$, merced a la polimerización de la actina ubicada en la base del pedestal. Cabe señalar que si bien aún no se ha podido establecer el papel de esta clase de movilidad en la patología involucrada, el fenómeno también se ha detectado en géneros muy invasivos, tales como *Listeria sp* y *Shigella sp* (en estos casos, a nivel intracelular) (18, 20, 62).

Knutton *et al* observaron que las lesiones A/E incluían la polimerización de la actina, lo que originó el diseño de la prueba de tinción fluorescente de la actina (FAS), la cual se describe en el siguiente capítulo (62).

Esta histopatología es muy diferente a la relacionada con ECET y *V. cholerae*, ya que ambas bacterias se adhieren de forma no íntima, sin causar la destrucción de las microvellosidades ni la acumulación de actina. Por otra parte, en el modelo "adherencia-efusión" observado en ECEP se evidencia la fijación microbiana a la membrana apical del enterocito y una deformación de este último, localizada en el borde de cepillo de las microvellosidades. Es importante comentar que la lesión A/E es compartida con numerosas cepas de ECEH (aunque el cuadro clínico asociado a éstas es diferente), *Hafnia alvei* (que ocasiona diarrea en niños), *Citrobacter freundii* biotipo 4280 (también conocido como *Citrobacter rodentium*, causante de hiperplasia colónica murina) y otras cepas de *E. coli* aisladas a partir de conejos,

becerros, cerdos y perros; no obstante, ECEP representa el prototipo de todo el conjunto de bacterias que manifiestan dicho proceso (20, 92)

En cuanto a los pasos implicados en el establecimiento de la lesión A/E, el modelo asociado a ECEP (mismo que explica mejor el fenómeno) incluye a los siguientes tres eventos (20, 29, 80):

- Establecimiento de la “adherencia localizada” sobre las células “blanco”
- Inducción de transducción de señales en la célula hospedera
- Concreción de una adherencia aún más íntima

a) El establecimiento de la “adherencia localizada” a las células “blanco”. Inicialmente, en 1979, Cravioto *et al* reportaron este tipo de adherencia de ECEP a células HEp-2 (línea celular de carcinoma de epitelio humano), en tanto que Baldini (1983) mostró que la mencionada capacidad de la cepa ECEP O127:H6 (también conocida como E2348/69) residía en un plásmido de 60 MDa, puesto que la pérdida o la inserción de este último correlacionaban con la desaparición o aparición de la característica correspondiente en las cepas analizadas. Paradójicamente, este plásmido fue detectado y denominado factor enteroadherente (EAF por *EPEC Adherence Factor*), varios años después de que se había venido utilizando una prueba de diagnóstico y epidemiología molecular cuyo segmento “blanco” de DNA pertenecía precisamente a él. Actualmente, se ha detectado que, en realidad,

los plásmidos EAF corresponden a una gran familia, dentro de la cual se incluyen -por ejemplo-, al plásmido pMAR2 de la cepa E2348/69, o bien, al pB171 de la cepa ECEP O111:NM (conocida como B171-8) (18, 28, 80, 109, 110, 111).

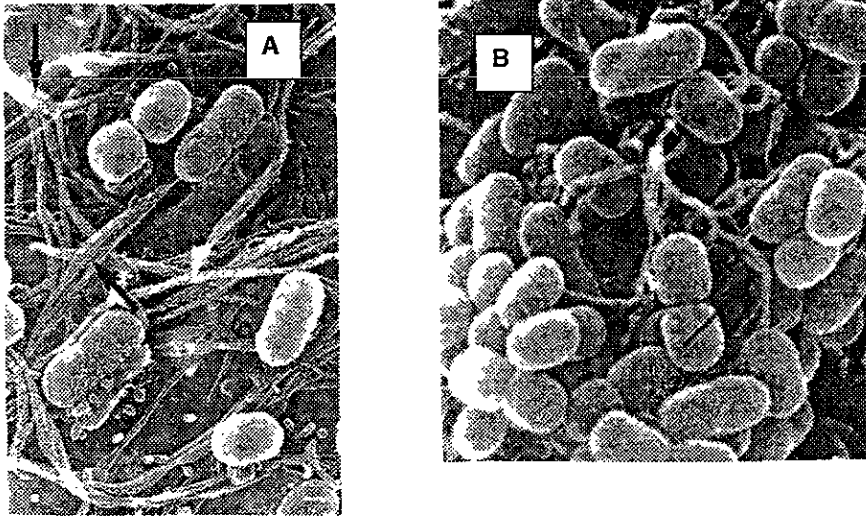
En la "adherencia localizada" se observan microcolonias tridimensionales de ECEP, ubicadas en una zona particular de la célula eucariote, en la cual se pone de manifiesto una muy estrecha interacción "bacteria-bacteria". El producto que media dicho patrón de adherencia en ECEP fue descubierto en 1991, por Girón *et al*, al modificar las condiciones de cultivo. Este grupo de investigadores reportó una fimbria de 7 nm de diámetro que tendía a agruparse en paquetes de 50-500 nm de ancho por 15-20 μ m de largo, los cuales se retorcián, curveaban y hasta formaban lazos; por tal motivo, sugirieron para ella el nombre de "*pilus* formadores de racimos" (BFP, de *Bundle-Forming Pilus*) (37, 65).

Diversos estudios genéticos revelaron que un operón de 14 genes del plásmido EAF es necesario para la expresión y el ensamble de los BFP. Es importante citar que, en el caso de ECEP B171, los sueros anti-BFP reducen significativamente la adherencia "localizada" a las células HEp-2, aunque no modifican la virulencia de la cepa (consultar la figura 7) (36).

Para lograr la expresión del BFP *in vitro*, es necesario cultivar al microorganismo a 37°C, en alguna línea celular, y aquélla ocurrirá durante la

fase de crecimiento, en presencia de iones calcio y amonio; ello demuestra que los BFP no representan un elemento constitutivo de la bacteria (65).

Figura 7. Microscopía electrónica de barrido que muestra al BFP uniendo bacterias a las 3 h de la infección **(A)** y a una microcolonia de ECEP después de 4 h de infección en células HEp-2 **(B)** (Reproducción de referencia 65, copyright (1999) con el permiso de Blackwell Science Ltd.).



b) La inducción de transducción de señales en la célula hospedera. La adherencia de ECEP a las células epiteliales provoca que éstas generen señales de transducción. En tal sentido, los genes bacterianos responsables de dichas señales se localizan en una "isla de patogenicidad"³ de 35 kb,

³ "Isla de patogenicidad" es una región cromosómica cuyos productos son esenciales para la virulencia y que aparenta no pertenecer a la especie que lo contiene. Generalmente, se encuentra flanqueada por secuencias de repetición o elementos de inserción, además de contar con una proporción G/C distinta al resto del cromosoma (76).

denominada “locus de efusión de enterocitos” o LEE (de *Locus of Enterocytes Effacement*), la cual codifica para la síntesis de las siguientes proteínas: **i)** los componentes del sistema de secreción proteica tipo III⁴; **ii)** una adhesina bacteriana conocida como “intimina”; y **iii)** el propio receptor de esta última (Tir, por *Translocated Intimin Receptor*), que posteriormente será translocado hacia la membrana de célula hospedera. La figura 8 presenta el esquema génico completo del LEE (2, 29, 59).

Las afirmaciones anteriores se desprenden del hecho de que una mutación en los genes bacterianos del LEE, tales como *espA*, *espB* o *espD* (*esp* por *EPEC secreted proteins*), suprime la transducción de señales, favoreciendo la internalización del patógeno. Además, la adición de sobrenadantes provenientes de cultivos líquidos de ECEP a las líneas celulares no reactiva el proceso patológico, lo cual confirma que los eventos señalados requieren de que la bacteria se encuentre adherida a las células “blanco” (39, 80)

Por otra parte, algunas consecuencias adicionales de la adherencia de ECEP a las células epiteliales son las siguientes:

- En los primeros experimentos, se observó un incremento en los niveles de calcio intracelular (Ca^{++}_{ic}), a partir de los almacenamientos

⁴ El sistema de secreción proteica tipo III se encuentra en bacterias Gram negativas; su función es la de exportar factores de virulencia -de manera activa, en un solo paso y sin transformaciones estructurales-, a través de la membrana interna y la membrana celular. Esta secreción se realiza a través de un canal que atraviesa ambas membranas y está compuesto por diversas proteínas (76, 103)

dentro de la célula; curiosamente, dicho aumento reduce la polimerización de la actina y el proceso de "adherencia-efusión", aunque provoca cambios en el citoesqueleto inducidos de manera activa por ECEP. Al final, el consecuente aumento de Ca^{++}_{ic} parece originar la inhibición de la absorción intestinal de Na^{+} , así como la secreción de Cl^{-} por parte de los enterocitos. Al margen de la diarrea resultante, las observaciones anteriores sugieren que los niveles de Ca^{++}_{ic} median la respuesta secretoria que ocurre hacia la presencia del microorganismo (8, 22, 80). Sin embargo, dichos experimentos no se han podido reproducir y también se ha observado a la lesión A/E sin que haya ocurrido un aumento en los niveles de Ca^{++}_{ic} . Una posible explicación a ello, radica en que, durante los últimos estudios, casi no hubo muerte del enterocito y, en los primeros, el aumento en los niveles de calcio podría haberse originado por algún efecto citotóxico de ECEP. De hecho, se ha demostrado que este microorganismo induce la apoptosis, lo cual indica que el aumento en los niveles de calcio podría provenir de este fenómeno y no de la formación de la lesión A/E (29, 68). No obstante, persiste la hipótesis de que ciertas proteínas codificadas por el LEE (EspA, EspB y Tir, entre otras) son las que verdaderamente inducen la lesión A/E, mediante la activación de canales de Cl^{-} independientes de calcio (29).

- La fosforilación de los residuos de serina y treonina en varias de las proteínas de las células epiteliales, entre las que destaca la cadena ligera de miosina. En ello participan al menos dos cinasas: la PKC y la miosina-cinasa; por ejemplo, la PKC- α es la única proteína estimulada por diacilglicerol en presencia de fosfolípidos y, al encontrarse activada, se transloca hacia la membrana celular, en donde estimula la generación de canales de Cl^- (tales como el CFRT -regulador de la fibrosis quística- o el canal de Cl^- del enterocito) y aumenta la permeabilidad al Na^+ y al manitol. De esta manera, modifica la secreción intestinal de agua y electrolitos, tanto *in vivo* como *in vitro*.

La fosforilación de la miosina desempeña un papel importante en el control de la polimerización-despolimerización de la actina durante la lesión A/E. Al mismo tiempo, altera las uniones célula-célula, fenómeno que podría potenciar los mecanismos diarreagénicos asociados a ECEP (16, 29, 80).

- La fosforilación de los residuos de tirosina en otras proteínas. Este efecto se ha detectado en las células de carcinoma de cérvix (línea celular HeLa): la principal proteína fosforilada es la Tir (cuyo peso molecular es de 90 kDa) la cual se localiza por debajo de las ECEP adheridas a la punta de los pedestales. Cabe subrayar que la Tir (translocada hacia la célula intestinal) sólo es fosforilada en el caso

de ECEP⁵, por lo que la citada fosforilación podría no ser indispensable para que la intimina se una a ella; en toda suerte, la unión intimina-Tir sí induce los rearrreglos en el citoesqueleto. Finalmente, otra proteína que es fosforilada (en este caso después de la unión intimina-Tir) es la fosfolipasa-C γ , y la reacción se presenta particularmente en uno de sus residuos de tirosina (29, 59, 91, 92, 100).

- Reducción de la resistencia transepitelial de las capas que recubren las células de la mucosa. Este hallazgo se realizó en células epiteliales polarizadas Caco-2 o T84 (células de carcinoma de epitelio intestinal), involucrando un mecanismo de transducción de señales -en las células hospederas- provocada por EspA, EspB y EspD. El fenómeno también afecta el transporte de electrolitos (15).
- Activación de la transcripción eucariótica del factor necrozante NF- κ B, el cual -a su vez- regula la expresión de la citocina IL-8, quimiotáctica para células polimorfonucleares (PMNs). Savkovich mostró que la adherencia del microorganismo a células intestinales T84 cocultivadas con PMNs, provoca que estos últimos crucen la monocapa epitelial⁶, consecuentemente, ocurren el aumento en la

⁵ Por ejemplo, cuando se trata de procesos relacionados con ECEH -en los que también se origina la lesión A/E-, dicha fosforilación no ocurre

⁶ Tal fenómeno se había demostrado ampliamente en *Salmonella sp*, pero no en bacterias no invasivas tales como ECEP.

permeabilidad paracelular y la estimulación de canales de Cl^- (29, 80).

c) La concreción de una adherencia aún más íntima. La adherencia íntima o más estrecha entre ECEP y las células epiteliales, es mediada principalmente por una proteína de membrana externa de 94 a 97 kDa, denominada intimina, cuya síntesis se encuentra codificada en el gen *eae* (por *E. coli attaching and effacing*), reportado por Jerse *et al* (92).

El gen *eae* está presente en todas las cepas de ECEP, ECEH, *C. rodentium* y *H. alvei*, capaces de originar el modelo "adherencia-efusión" y su ausencia es notoria en ECET, *E. coli* de la flora intestinal y muchas otras bacterias no relacionadas con la citada histopatología (92).

En general, la intimina detectada es 31% idéntica y 50% similar a la invasina clásica de *Yersinia*; por otra parte, la comparación de las intiminas de las cepas E2348/69 de ECEP y EDL933 de ECEH O157:H7 revela secuencias altamente conservadas y las escasas divergencias inciden en el segmento de la región C-terminal (280 aminoácidos), el cual representa la porción molecular que se une a sus respectivos receptores en las células epiteliales, confiriendo distintos patrones de colonización dentro del intestino (29, 80)

Se han logrado identificar cuatro subtipos de intiminas (α , β , γ , δ) asociadas a ECEP, si bien la Int280 α es la que predomina en la mayoría de las ECEP H6. Dicha intimina presenta tres dominios: dos del tipo "inmunoglobulina" y uno

más del tipo "lectina", en el cual existe un puente disulfuro indispensable para su unión a otros carbohidratos. De hecho, sólo con este puente intacto es que ECEP puede unirse a las integrinas $\beta 1$ y que su unión a Tir alcanza una mayor estabilidad, para generar su mayor movilidad y originar una mejor transducción de señales. En otras palabras, estas observaciones han abierto la posibilidad de que, en realidad, varias moléculas funjan como receptoras del microorganismo en los tejidos intestinales (29, 44, 80, 84, 90).

Antes del descubrimiento del *eae*, Levine *et al* habían encontrado que una proteína (94 kDa) de la membrana externa inducía una gran respuesta de Acs en los voluntarios humanos inoculados con ECEP; estudios posteriores demostraron que dicho inmunógeno era la intimina. Este hallazgo sugirió que la intimina podía jugar un papel importante en la inmunidad protectora contra ECEP y la teoría se reforzó al encontrarse altas concentraciones de Acs IgAs (inmunoglobulinas tipo A o de secreción) en la leche materna de numerosas mujeres que habitaban en pequeñas poblaciones mexicanas (80).

En 1996, Rosenshine *et al* observaron la unión de la intima de ECEP a los enterocitos, atribuyéndola a la presencia de una proteína de la membrana eucariote (conocida como Hp90), cuya fosforilación era inducida por el microorganismo para unirse a la intimina. En 1997, Kenny *et al* demostraron que, realmente, la Hp90 correspondía a la Tir -codificada por el gen *tir* de ECEP-, la cual era transferida a su hospedero; este último fosforilaba a la Tir

y, al quedar ésta anclada a la membrana externa del enterocito, funcionaba como receptor de la intimina (59, 92).

Al parecer, la proteína Tir queda fija a la membrana del enterocito, en forma de "gancho de cabello", con sus extremos amino y carboxilo dentro de la célula, y un segmento extracelular de 107 aminoácidos al cual se une la intimina. Es en esta secuencia de Tir en donde se percibe una mayor variabilidad entre las distintas especies causantes de la lesión A/E; sin embargo, prácticamente no existen dudas de que su función es la de un receptor muy afín a la bacteria que, además, provoca señales que permiten la polimerización de la actina en las células del hospedero (44, 59, 100).

2. Plásmidos EAF y *pili* formadores de racimos (BFP)

La trascendencia del plásmido EAF en el origen de los padecimientos humanos fue demostrada por Levine *et al*, quienes administraron oralmente a voluntarios humanos la cepa E2348/69, que contiene naturalmente al pMAR2, o bien, una mutante de la misma, carente de dicho plásmido; la diarrea ocurrió en nueve de los diez individuos que ingirieron la cepa original y en sólo dos de los nueve a quienes se les inoculó la mutante.

Al margen de lo anterior, cabe destacar que el 67% de las cepas que inicialmente contenían el plásmido EAF, perdieron dicho elemento extracromosómico después de haber sido aisladas a partir de las

evacuaciones de los voluntarios afectados; ello significa que la prueba molecular en la que se utiliza la sonda EAF reditúa un elevado grado de falsos negativos y que, por lo tanto, aquélla debe complementarse con la prueba de FAS (por *Fluorescent Actin Stain*) (21, 62, 69).

En cuanto al factor de virulencia BFP, éste se asocia al operón *Bfp*, compuesto por 14 genes que codifican para su expresión y ensamble; a este respecto, el gen *bfpA* codifica para la subunidad principal -la bundilina- y se utiliza como sonda para la detección de ECEP. Otros genes implicados en dicho operón, son: el *bfpB* que codifica para una proteína externa de membrana; el *bfpE*, relacionado con la proteína interna de la membrana; el *bfpP*, cuya expresión da lugar a una peptidasa que procesa a la probundilina -para su polimerización-; y el *bfpF*, que codifica para una proteína que permite la retracción del BFP -después de formadas las colonias de ECEP- con el fin de dispersar a las bacterias y favorecer la colonización del intestino (5, 13, 18, 20, 36, 61, 65, 109).

En general, dichos genes codifican para proteínas similares a las requeridas en la producción de *pili* tipo IV, característicos de otros patógenos Gram negativos, tales como *Vibrio cholerae* y *Pseudomonas aeruginosa* (5, 20, 61, 65).

La expresión y el ensamble de los BFPs también dependen de otros elementos reguladores de la patogénesis asociada a ECEP, tales como el operón *perABC* (por *Plasmid-Encoded global Regulator*, conocido también

como operón *bfpTWV*) y el gen cromosómico *dsbA* (que codifica para una enzima periplásmica que media la formación de enlaces disulfuro de las dos cisteínas de cada BfpA). Estos mecanismos de regulación se detallan en otro apartado (18, 20, 29, 65, 109).

Figura 8. Mapa entero del plásmido pB171. El círculo exterior muestra los marcos abiertos de lectura (ORF por *Open Reading Frames*) en las partes externa -si son leídos en sentido de las manecillas del reloj- e interna -si su lectura ocurre en sentido inverso- (Reproducción de referencia 109, copyright (1999) con el permiso de American Society for Microbiology).



La figura 8 muestra el mapa entero del plásmido pB171, en el cual se localiza al operón *Bfp* y, corriente abajo, al operón regulador *bfpTWV*. Dicho mapa incluye secuencias de inserción lo que, sumado a la proporción G/C del

operón *Bpf* (38.4%) y del *bfpTVW* (29.9%) –versus el 46% del resto del plásmido-, sugiere una clara transferencia horizontal del *Bfp* (109).

3. Locus asociado a la efusión enterocítica (LEE) y exoproteínas asociadas a la virulencia

Durante muchos años se ha buscado infructuosamente alguna enterotoxina a la que se le pueda atribuir la diarrea relacionada con ECEP. No obstante, los estudios correspondientes han permitido descubrir ciertas exoproteínas microbianas, al agregarse sobrenadantes de los cultivos líquidos sobre líneas celulares eucariotes, en condiciones semejantes a las del tracto gastrointestinal humano (29, 80).

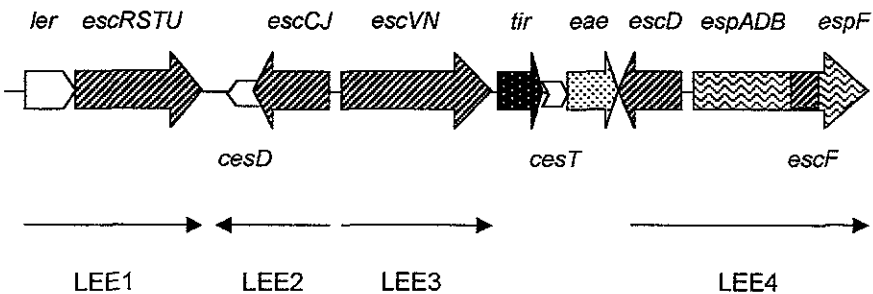
Dichas exoproteínas, conocidas como Esps, también son producidas durante el curso de la enfermedad, tal como lo demuestra la presencia de Acs dirigidos contra ellas en el suero de voluntarios humanos inoculados con el microorganismo (29, 80).

En contraste con lo observado cuando se adicionan enterotoxinas, las Esps no desencadenan efectos citopáticos, a menos de que se incorporen junto a células de ECEP previamente adheridas a sus células “blanco”; en este sentido, el papel de aquéllas parece ser el de disparar la transducción de señales tales como las descritas anteriormente (80).

Analizando las posibles funciones de las Esps se localizó una “isla de

patogenicidad" de 35.6 kb [en el minuto 82 del cromosoma de EPEC, junto al gen de la selenocisteína (*se/C*)], cuyo contenido G/C es menor (38.2%) al del resto del cromosoma de *E. coli* (50.8%). McDaniel *et al* mostraron que los genes *eae*, *esp* y *sep* (por *secretion of EPEC proteins*, también conocidos como *esc*) se localizan en esta "isla", denominada LEE, presente en otras bacterias tales como ECEH, *H. alvei* y *C. rodentium*, y de la cual carecen ECET y las cepas de *E. coli* de la flora intestinal (consultar la figura 9) (2, 29, 31, 93).

Figura 9. Esquema de la "isla de patogenicidad" denominada *locus* de efusión enterocítica (LEE) de *E. coli* E2348/69 (29, 31).



Genes que codifican para:

- Regulador *ler*
- Proteínas chaperonas
- Complejo de translocación de proteínas tipo III
- Sistema de secreción proteica tipo III

- Operón LEE1. El primer gen codifica para un regulador positivo (llamado *Ler* por *LEE expression regulator*) de numerosos genes de la "isla de patogenicidad". En este operón también se localizan los genes

escR, *escS*, *escT* y *escU*, que contienen información para la síntesis de proteínas formadoras del complejo de translocación proteica tipo III (29, 31).

- Operón LEE2. En éste reside la expresión del gen *cesD*, que genera la proteína chaperona de EspD; adicionalmente, se encuentran *escC* y *escJ*, cuyo producto EscC es el componente mayoritario del canal formado en la membrana exterior de la bacteria por el sistema de secreción proteica tipo III. De hecho, las cepas que carecen de los genes *escC* no presentan señales de transducción ni provocan la aparición del modelo "adherencia-efusión" (29, 103, 115).
- Operón LEE3. Contiene a los genes *escV* y *escN*, que codifican para proteínas estructurales del complejo de translocación proteica tipo III. EscN es una ATPasa que "inyecta" las proteínas bacterianas hacia la célula "blanco" y se encuentra localizada en la membrana interna del microorganismo (29, 31, 80).
- Genes no agrupados en operones. Entre éstos genes se cuentan el *tir*, *eae* y *cesT*; la expresión de este último reditúa una chaperona de Tir, necesaria para evitar la degradación del receptor en su terminal amino. Como ya se mencionó, *tir* y *eae* codifican para la Tir y la intimina, respectivamente (1, 31).
- Operón LEE4. Las proteínas EspA, EspB, EspD y EspF son traducidas

a partir de los genes correspondientes (*espA*, *espB*, *espD* y *espF*), sin el péptido señal N-terminal. Las tres primeras son esenciales para la generación del modelo "adherencia-efusión", lo cual es comprobable al observarse que las cepas mutantes carentes de los genes correspondientes no generan la histopatología característica (29, 80).

Los productos de LEE4 son de gran trascendencia, ya que se trata de los componentes del sistema de secreción proteica tipo III, en donde las subunidades de EspA forman una estructura hueca en la superficie bacteriana (figura 10), a través de la cual se proyecta EspB hacia la membrana y al citosol del enterocito. Una vez establecido el puente de unión, Tir se transporta -a través del canal EspA- hasta la célula hospedera, a cuya membrana se ancla después de sufrir algunas transformaciones. En cuanto a EspD, existen ciertas evidencias de que se encuentra unida a EspA y que forma parte del sistema de translocación proteica tipo III⁷. Por su parte, EspF no se ha asociado a la secreción proteica ni se ha podido establecer su participación en la patogenicidad de ECEP (consultar la figura 11) (27, 29, 67, 75, 107, 108, 116, 117).

La exoproteína EspC, no codificada en el LEE, es digna de mencionarse, ya que presenta homología con ciertas proteínas autotransportadoras tales como

⁷ En ECEH se ha encontrado que EspD funge como proteína formadora del poro de la membrana del enterocito, como lo demuestran ciertos experimentos de lisis de glóbulos rojos.

la IgA hidrolasa de *Neisseria gonorrhoeae* y *Haemophilus influenzae*, la Tsh de *E. coli* patógena aviar y la SepA de *Shigella flexneri* (103).

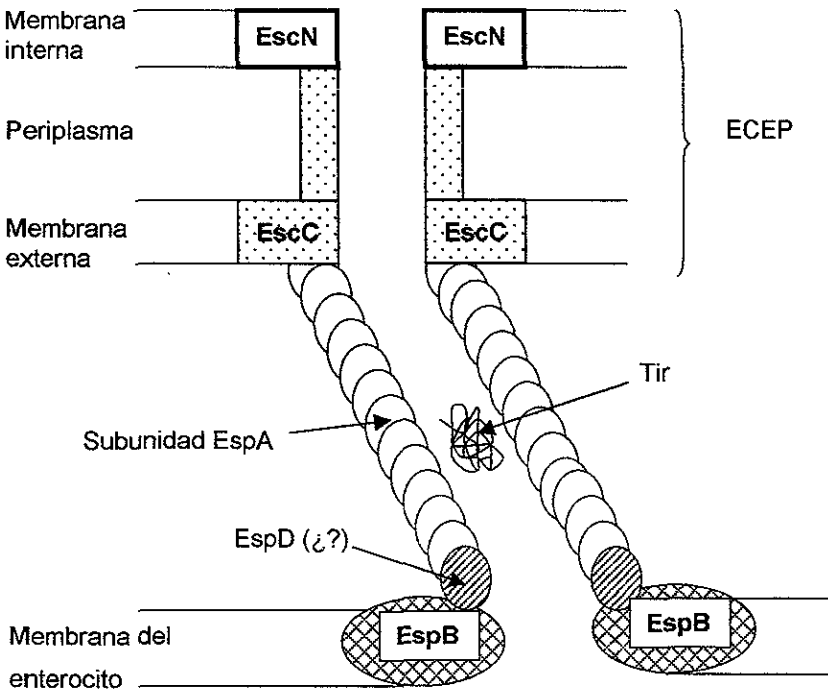
Figura 10. Microscopía electrónica de barrido, la cual -mediante una técnica inmunoquímica- demuestra la presencia de los conductos EspA (flechas) entre la bacteria y la célula hospedera (Reproducción de referencia 45, copyright (2000) con permiso de Blackwell Science Ltd.).



También resulta conveniente señalar que LEE no es una única "isla de patogenicidad" presente en el cromosoma de ECEP, ya que existe una copia del mismo *locus* (en el minuto 94) y, por lo menos, otra "isla" diferente; Esta última es denominada LIM (por *Locus for Improving Microcolony formation*): en presencia de *perA* codifica para una chaperona (TrcA, por *Bfp T-regulated chaperone-like protein*), la cual actúa postranscripcionalmente, respecto a la expresión de la subunidad BfpA antes de ser modificada por una peptidasa; su proporción G/C es de 42% y también se ha localizado en *S. flexneri*, lo que

reafirma la ocurrencia de la transferencia horizontal de genes. Finalmente, en el plásmido EAF se detecta un marco abierto de lectura, cuyo gen *trcP* presenta una gran homología con *trcA* (109, 110).

Figura 11. Modelo de translocación de proteínas tipo III en ECEP.



(¿?) = Localización todavía no confirmada para ECEP

4. Regulación de los factores de virulencia

Como sucede en numerosas bacterias patógenas, la expresión de los factores de virulencia de ECEP se encuentra regulada, al menos por el

operón *perABC*, que activa la transcripción de varios genes del cromosoma y del plásmido EAF (20).

Con respecto a la regulación de los factores de patogenicidad codificados por el plásmido, la proteína PerA, producto de la lectura del primer marco del operón *perABC*, es homóloga a la familia de reguladores bacterianos AraC, que incluyen a la VirF de *Shigella* y a la Rns y CfaD/CfaR de ECET. Esta proteína desestabiliza al DNA para activar al promotor y permitir la lectura del operón *bfp* por parte de la RNA polimerasa. Otro mecanismo de regulación, aunque éste a nivel postranscripcional, es el controlado por el gen cromosómico *dsbA*: éste codifica para una enzima periplásmica que, al formar enlaces disulfuro en la subunidad BfpA, permite la polimerización de esta última y el secuencial ensamble del *pili* (20, 80, 109).

También se ha demostrado la regulación de la expresión de los genes del LEE, por parte de las proteínas Per e IHF (por *Integration Host Factor*). Ambas activan al primer gen del LEE1 *-ler-*, cuya expresión da origen a la proteína Ler, un regulador positivo de la expresión de los genes *escJ*, *escV*, *tir*, *eae* y *espB*. Por lo que se refiere al *tir*, el mecanismo depende de la desrepresión del promotor (29, 31).

Los mecanismos mencionados anteriormente comprueban la existencia de un sistema global que regula la virulencia de ECEP y demuestran que los factores de patogenicidad no son constitutivos ya que, además, su expresión sólo ocurre bajo ciertas condiciones fisicoquímicas. En este último caso, se

pueden citar: a) la síntesis de EspB, en respuesta a condiciones similares a las del intestino; y b) la represión de la producción de intimina durante la fase estacionaria del crecimiento y su estimulación durante la fase exponencial (80).

5. Probables factores de patogenicidad

Otras fimbrias. Aunque han aparecido numerosos reportes acerca de fimbrias adicionales producidas por ECEP, algunas de ellas han resultado ser comunes del tipo 1. Girón *et al* informaron sobre una extensa caracterización de fimbrias sintetizadas por la cepa B171 la cual, además de las BFP, produce fimbrias fibrilares (todas ellas denominadas FB171) homólogas a la F9 y F72 (ambas del tipo P) de cepas uropatógenas de *E. coli* y a la F1845 de ECAD. Una mezcla de sueros anti-FB171 y anti-BFP inhibe en su totalidad la adherencia localizada, lo que sugiere que este tipo de adhesión comprende la participación de adhesinas multifactoriales (80).

Toxina EAST1. A pesar de que la patogenicidad de ECEP no ha sido atribuida a la producción de toxinas, algunas cepas de ECEP producen una molécula termoestable de bajo peso molecular, denominada EAST1, cuya síntesis se observa en ECEA y en todos estos casos se observa la hibridación con el gen *astA* -que codifica para dicha toxina-. La cepa prototipo de ECEP (E2348/69) contiene dos genes *astA* (uno en el cromosoma y otro en el plásmido EAF); sin embargo, su expresión sólo se ha logrado en

algunas cepas bacterianas carentes del plásmido (EAF negativas). Por lo tanto, el significado de la toxina EAST1 en la enfermedad ocasionada por ECEP aún se considera desconocido (80).

Invasión. Varios investigadores han reportado que diversas cepas de ECEP son capaces de internalizarse en varias líneas de células epiteliales, e inclusive, algunos han presentado las micrografías correspondientes. Sin embargo, a diferencia de los clásicos patógenos intracelulares (como *Shigella sp*), no existen pruebas contundentes de que ECEP se reproduzca intracelularmente, o de que escape de las vacuolas o fagosomas, e inclusive, ni de que ocasione un síndrome disentérico. Durante un estudio genético, se detectó fagocitosis de aquellas cepas cuyos genes involucrados en la producción de la lesión A/E (*eae* del LEE) se encontraban alterados por la inserción de genes de invasividad (39, 80, 99).

C. Patología

La infección por ECEP ocasiona síntomas tales como fiebre moderada, malestar, vómito y diarrea; esta última se considera persistente -dura más de 14 días-, se atribuye al tipo de lesión implicada y se caracteriza por presentar evacuaciones líquidas con moco, pero sin sangre (71, 111).

El cuadro clínico ocasionado por ECEP se puede presentar después de un período de incubación de 4 a 12 h en voluntarios adultos sugiriendo, durante

la infección, la participación de una gran variedad de mediadores intracelulares del transporte electrolítico. El mecanismo molecular involucrado se ha descrito con anterioridad, en la sección referente a la inducción de transducción de señales en la célula hospedera (20, 80)

Por lo general, se trata de una infección autolimitada, que requiere de rehidratación constante sin la obligada administración de antibióticos. Sin embargo, en el caso de prescribirse algún medicamento, el trimetoprim-sulfametoxazol (TMP-SMZ) es el agente terapéutico de primera elección. Otros antibióticos utilizados son la colistina y la gentamicina oral, cuya administración debe ocurrir bajo estricta vigilancia médica debido a sus efectos secundarios (43, 111).

Al igual que en el caso de ECET, se han propuesto distintas vacunas para prevenir la diarrea persistente causada por ECEP. En 1970, se utilizaron bacterias inactivadas con formalina sin alcanzarse una inmunidad protectora efectiva. Posteriormente, en 1989, Cravioto *et al* diseñaron una vacuna elaborada con mutantes de ECEP incapaces de utilizar galactosa, pretendiendo inducir inmunidad sin generar lesiones A/E. Recientemente, se han identificado potentes inmunógenos, tales como la intimina y las Esps, con los que se buscará clonar cepas atenuadas de *E. coli* o *S. typhi*, para que estos microorganismos, utilizados meramente como vehículos, los expresen dentro del hospedero e induzcan protección contra ECEP (29, 111).

D. Datos epidemiológicos

La edad representa la característica predisponente más notable en la gran incidencia de este microorganismo, los padecimientos debidos a ECEP afectan de manera primaria a los infantes menores de 2 años, aunque su frecuencia es mayor en menores de 6 meses. A partir de los 2 años, son comunes los aislamientos a partir de individuos sanos y enfermos (10, 21, 111).

Lógicamente, ECEP es un agente etiológico endémico entre la población infantil de los países en vías de desarrollo. Diversos estudios efectuados en Brasil, México, Sudáfrica y Australia, han demostrado que del 30 al 40% de casos de diarrea infantil se deben a ECEP. Por su parte, en los países desarrollados, este microorganismo no es considerado un agente causal frecuente, incluyendo a la población infantil, exceptuando los esporádicos brotes que llegan a aparecer, principalmente en las guarderías y los orfanatorios (10, 24, 71, 80).

A pesar de que ECEP es asociada a diarrea infantil persistente, puede llegar a ocasionar diarrea en voluntarios humanos adultos, a condición de que los inóculos sean relativamente grandes y de que la acidez gástrica sea previamente neutralizada vía la ingesta de bicarbonato. Cabe mencionar que, en los hospitales se puede presentar la enfermedad, debido a pequeños inóculos transmitidos vía persona-persona. También se han documentado

casos de diarrea en personas inmunocomprometidas, diabéticas, ancianos y pacientes con acloridia (21, 80).

El hecho de que ECEP no haya sido implicada como una causa consistente de diarrea del turista, radica en bases fisiológicas de resistencia, más que en inmunidad o exposición previas (80).

III. DETECCIÓN DE ECET y ECEP EN EL LABORATORIO

Tal como ocurre en la mayoría de las enfermedades infecciosas, la detección presuntiva del agente etiológico se basa en la historia clínica del paciente (la cual incluye al cuadro clínico y al examen físico), así como en los antecedentes y datos epidemiológicos asociados a la región geográfica involucrada. Evidentemente, dependiendo de la gravedad del cuadro, ese diagnóstico presuntivo se puede traducir en un tratamiento temporal de emergencia, en tanto se determina con certeza la causa de la diarrea. En general, cuando existen fiebre elevada, tenesmo, heces sanguinolentas con más de dos semanas de evolución y/o deshidratación, se procede a realizar el diagnóstico definitivo y se instituye una terapia sintomática que incluye la hidratación oral (111).

El diagnóstico microbiológico por el laboratorio tiene como propósito fundamental el de contribuir al establecimiento del tratamiento óptimo de los padecimientos infecciosos, a fin de que el enfermo recupere la salud a la brevedad posible y, consecuentemente, deje de fungir como fuente de contagio para otros individuos.

Entre las pruebas rápidas de laboratorio se contemplan el examen en fresco, el recuento diferencial de leucocitos, la observación de preparaciones teñidas

(al Gram modificada para detectar *Campylobacter* y por Ziehl-Neelsen modificada para *Cryptosporidium*), la prueba de látex para rotavirus, la medición del pH, de azúcares reductores y de sangre oculta en la materia fecal (111).

Adicionalmente, con el coprocultivo se intenta detectar al agente etiológico del cuadro diarreico (considerando la información provista por el médico), aunque con frecuencia sólo se busca a *E. coli*, *Salmonella sp* y/o *Shigella sp*. En el caso específico de la identificación de *Escherichia coli* se utilizan medios tales como el agar Eosina Azul de Metileno (EMB) o el Mac Conkey, incubándose a 37°C bajo condiciones aerobias (78, 111, 113).

Las pruebas de detección de ECET y ECEP, según sus respectivos fundamentos, se pueden dividir en: bioquímicas, biológicas, fenotípicas, inmunológicas y moleculares. A continuación se describen las más destacadas en la actualidad.

A. Pruebas bioquímicas

Las pruebas bioquímicas son estudios *in vitro* que pretenden poner de manifiesto la capacidad de elaborar ciertas enzimas por parte del microorganismo en estudio, ya que cada especie o cepa suele presentar un patrón característico que permite diferenciarla.

En cuanto a *Escherichia coli*, la identificación bioquímica se aplica a las colonias lactosa positiva obtenidas en los medios selectivos citados anteriormente. No obstante, es necesario tomar en cuenta que *Escherichia coli* enteroinvasiva (ECEI) produce generalmente colonias lactosa negativa, por lo que se recomienda probar a todos los aislamientos sospechosos, considerando el diagnóstico presuntivo y el perfil bioquímico global de los posibles agentes causales, antes de demostrar o descartar su presencia. Una prueba bioquímica 99% positiva para *E. coli* es la referente a la producción de indol, a la cual suelen sumarse otras, como la de lisina descarboxilasa, producción de gas a partir de D-glucosa, fermentación de D-manitol, D-sorbitol, D-xilosa y utilización de acetato; la de citrato y ureasa suelen ser negativas (74, 96, 120).

Actualmente, resultan de empleo común los sistemas de identificación rápida, tales como el API 20E, que se ha convertido en un método de referencia, o bien, el sistema automatizado VITEK (bioMérieux Vitek, Inc); ambos métodos sólo requieren de que la suspensión bacteriana se ajuste a una turbidez de la escala de McFarland, indicada en los manuales correspondientes (51, 66, 74, 80, 120).

La previa identificación bioquímica de *Escherichia coli* es fundamental para evitar gastos innecesarios en la serotipificación (54).

B. Pruebas biológicas

El fundamento de esta clase de pruebas consiste en demostrar la presencia de factores de virulencia, con base en el efecto que éstos producen en modelos animales adecuados; los ensayos más destacados son los siguientes:

- Prueba de asa ligada de conejo. Ésta se utilizó ampliamente hace algunas décadas para detectar toxinas causantes de diarrea; consiste en anestesiar a un conejo albino en ayuno de 48 h; después de lavar el intestino delgado, se ligan segmentos intestinales de 4 a 5 cm de largo; uno se inocula con 1 mL de amortiguador de fosfatos (PBS) (control negativo), otro con 2 mg de toxina del cólera (CT) (control positivo), en el tercero se inocula 1 mL de PBS con enterotoxina(s) producida(s) por la cepa de *E. coli* en estudio (ST y/o LT) y, en el cuarto segmento, 1 mL de PBS con enterotoxina, previo tratamiento térmico, esto con el fin de sólo detectar ST (realizando duplicados en cada conejo). Una vez efectuada la inoculación, el animal se cierra y, transcurridas 6 h, se sacrifica, se extrae su intestino delgado, se mide el volumen de fluido acumulado en cada segmento y se registran sus respectivas longitudes. La relación mL/cm del cuarto segmento se asociaba a la actividad de la ST; y, en cuanto a la LT, su valor surge de restarle a la actividad del tercer segmento el obtenido en el cuarto segmento (25, 96).

Este método asume la desventaja de que muchas toxinas son

hospedero-específicas y manifiestan diferentes mecanismos de acción; además, es muy costoso y, al no lograrse su plena estandarización, finalmente resultó reemplazado por otro tipo de pruebas (25, 80, 96).

- Bioensayo en ratón recién nacido Por muchos años se consideró como prueba estándar para detectar a la STa. La técnica incluye la inoculación de 0.1 mL de filtrado del cultivo bacteriano de 24 h, junto con 2 gotas de azul de Evans, de manera percutánea-intragástrica en ratones albinos recién nacidos. Después de 3 h de "incubación", se sacrifica a los animales, se pesa el intestino de aquéllos en los que el colorante se encuentra dentro de la luz intestinal y se registra también el peso del animal sin el intestino. Si la relación peso del intestino con líquido/peso del animal sin intestino es mayor a 0.083 (unidad de actividad ST), la prueba se considera positiva para ST. La sensibilidad de este método es de 2-6 ng/tubo de ensayo, aunque sus desventajas son importantes: es laborioso, caro, inespecífico para toxinas involucradas en enfermedades humanas y sólo es semicuantitativo (33, 34, 80).

Sin lugar a dudas, las desventajas mencionadas para ambas pruebas biológicas y sus limitaciones, en cuanto a que sólo son capaces de detectar toxinas, estos ensayos en animales han caído en desuso, ya que se prefieren otros métodos más rápidos, baratos, específicos y sensibles (33, 80).

C. Pruebas fenotípicas

Las pruebas fenotípicas tienen como base el correlacionar la presencia de factores de patogenicidad, con las características patológicas que éstos generan en cultivos de células, los cuales representan sistemas relativamente más fáciles de estandarizar que los animales de experimentación (80).

Cabe subrayar que, si bien con los modelos animales se pensó que se detectaba a la toxina termoestable de ECET, se utilizaba como control positivo una toxina con mecanismo de acción similar al de la toxina termolábil. En este sentido, en 1975 se inició el diseño de métodos por medio de cultivos celulares para poner en evidencia a la LT. De hecho, hoy en día la prueba tipo consiste en inocular los sobrenadantes de cultivos de posibles ECET a células Y1 adrenales, o bien, a células de ovario de hámster chino (CHO), en el primer caso, cuando la toxina está presente, las células se "redondean" mientras que, en el segundo, las células se elongan (78, 79, 80).

Por su parte, el reconocimiento de otros grupos enteropatógenos de *E. coli*, tales como ECEP, ECEA y ECAD, se realiza a través de otras técnicas fenotípicas, entre las que figura el ensayo de adherencia a células HEp-2 (células cancerosas de epidermis humana) descrito originalmente por Cravioto *et al.* Esta prueba se realiza de la siguiente manera (19).

1. Las células HEp-2 cultivadas en medio mínimo esencial de Eagle (MEM) hasta un 50% de confluencia, son tripsinizadas y distribuidas de

100 a 200 células por pozo (cada pozo cuenta con un cubreobjetos) para su posterior incubación 48 h. Aparte, las bacterias se incuban en caldo Luria-Bertani, a 37°C, de 12 a 18 h.

2. El cultivo celular se lava tres veces y se agregan a cada pozo 1 mL de medio fresco MEM con 1% (p/v) de manosa o α -metilmanósido y 20 μ L del cultivo bacteriano. Se dejan incubar 3 h a 37°C bajo una atmósfera de 95% aire y 5% CO₂.
3. Terminada la incubación, el medio es aspirado y cada cubreobjetos con células (eucariotes y bacterianas) es lavado 4 veces con amortiguador de fosfatos.
4. Las células se fijan al cubreobjetos con 1 mL de metanol al 70% (v/v) por 5 minutos a temperatura ambiente.
5. El metanol se aspira y las células se tiñen adicionando 1 mL de Giemsa al 10% , el cual se deja actuar por 15 minutos.
6. Las células se lavan con agua destilada hasta que ésta no evidencie coloración
7. Los cubreobjetos se extraen de los pozos, se permite que sequen y se montan permanentemente con resina para examinarse a inmersión

La observación de las preparaciones puede mostrar alguno de los siguientes tipos de adherencia (19, 80, 88)

- Adherencia localizada. Consiste en la ubicación de microcolonias en

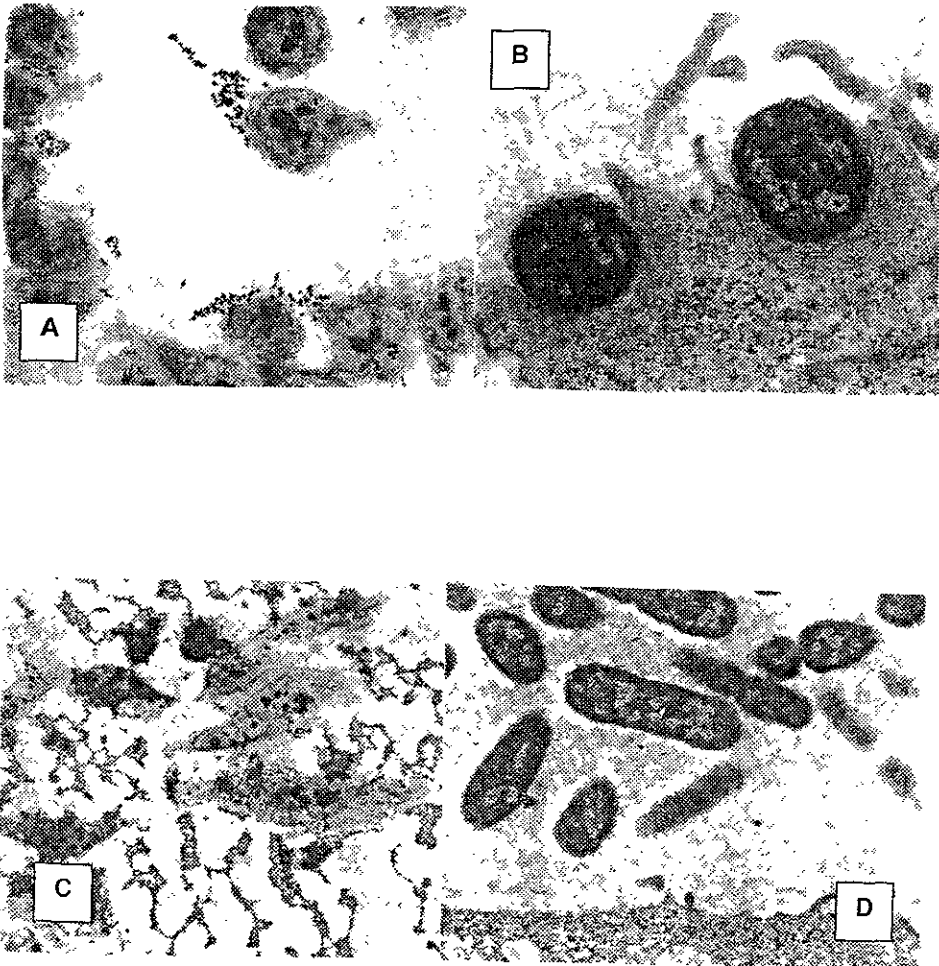
zonas específicas de la superficie de las células HEp-2 (frecuentemente en los extremos). Esta forma de adherencia es característica de ECEP y algunas ECEH

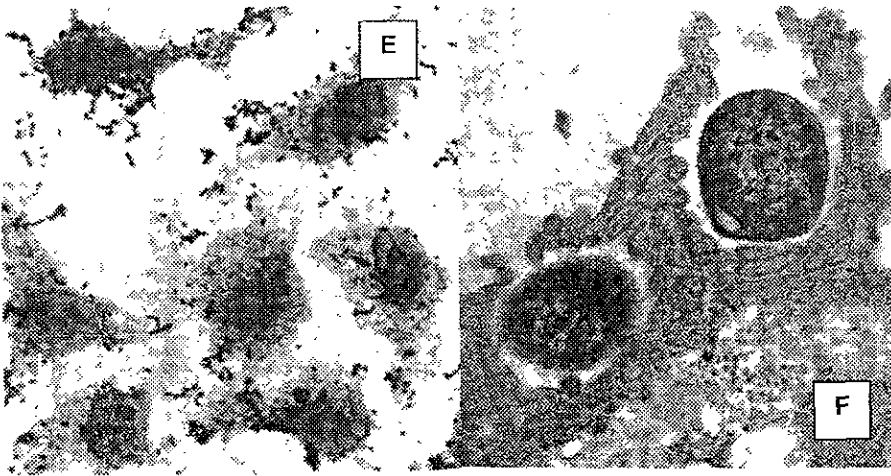
- Adherencia agregativa. Este patrón es el más difícil de identificar, sobre todo a las 3 h de incubación. Se le reporta como un patrón que semeja una "pared de ladrillos", peculiar de ECEA, microorganismo para el cual el ensayo de adherencia en HEp-2 es considerado como la prueba de oro.
- Adherencia difusa. Es cuando las bacterias se encuentran dispersas sobre toda la superficie de las células HEp-2, patrón que caracteriza a ECAD.

También es posible el uso de microscopía electrónica, para observar la lesión de adherencia íntima-efusión en biopsias intestinales, o bien, en cultivos de células epiteliales incubados con ECEP. En la figura 12 se pueden observar microscopías representativas de cada patrón de adherencia.

Lógicamente se han venido experimentando diversas variaciones a este método, en cuanto a las líneas celulares utilizadas y a los tiempos de incubación; en el primer caso, se ha intentado mejorar o reproducir el fenómeno en células HeLa, T84 y Caco-2, sin obtenerse los resultados buscados (81).

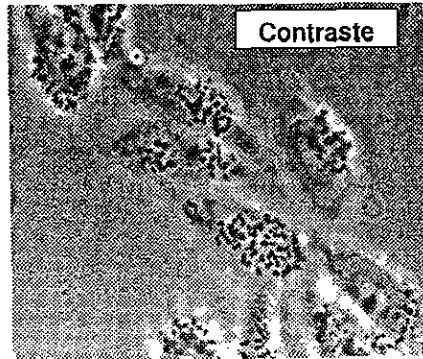
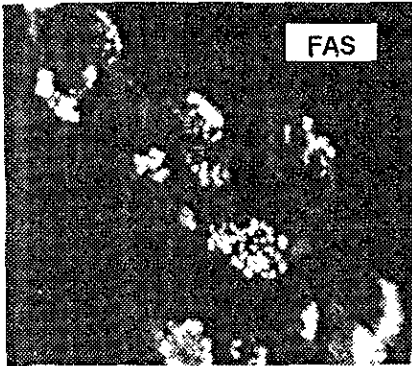
Figura 12. Microscopías de luz (A, C, E) con tinción de Giemsa y microscopías electrónicas (B, D, F) que muestran los patrones de adherencia a células HEp-2 por distintos grupos de *Escherichia coli*. Adherencia localizada (A x740, B x30000); adherencia agregativa (C x740, D x12500) y adherencia difusa (E x740, F x28000) (Reproducción de referencia 88, copyright (1997) con permiso de American Society for Microbiology)





Las observaciones realizadas por Knutton *et al*, en el sentido de que las lesiones con “adherencia-efusión” incluían la polimerización de la actina, dieron lugar al desarrollo de la prueba de tinción fluorescente de la actina (FAS). En esta prueba la faloidina se une específicamente a los filamentos de actina (F-actina) que se ubican por debajo de las bacterias adheridas a los cultivos de células epiteliales (por lo tanto se requiere realizar previamente la prueba de adherencia a HEP-2). Dicha micotoxina se encuentra conjugada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) o con rodamina por lo que se pueden observar las zonas de polimerización de actina por medio de microscopía de fluorescencia y se examinan los mismos campos en microscopía de contraste de fases (Ver figura 13) (62).

Figura 13. Microscopía de fluorescencia (**FAS**) y de contraste de fases (**Contraste**) que muestran la adherencia localizada de la cepa E2348 al infectar células HEp-2 (ambas x 600) (Reproducción de referencia 62, copyright (1989) con el permiso de American Society for Microbiology).



D. Pruebas inmunológicas

La base de las pruebas inmunológicas, consiste en llevar a cabo la detección de Ags o anticuerpos específicos, a través del empleo de anticuerpos o Ags conocidos. A continuación se describen brevemente las de mayor uso:

- Serotipificación. Representa la prueba inmunológica de más frecuente aplicación desde la identificación de muchos de los factores de virulencia de *E. coli*. De hecho, en 1944 Kauffman propuso un esquema de serotipificación

que actualmente se encuentra vigente con algunas modificaciones (83); éste corresponde a la realización de pruebas de aglutinación directa con las que se busca diferenciar a los antígenos O (somático), H (flagelar) y K (capsular), redefiniéndose al último de ellos como polisacáridos ácidos, excluyendo de esta manera los Ags fimbriales que se contemplaban inicialmente. Así, en 1991 se reportaron 173 antígenos O, 80 K y 56 H, pero en la actualidad la serotipificación de una colonia pura de *E. coli* ya se efectúa con 181 antígenos O y 52 antígenos H (54, 83).

El Ag O determina el serogrupo de las cepas cuyos respectivos serotipos dependen de la combinación específica de sus antígenos O y H, sin que se tome en cuenta al K, ya que no se han reportado *E. coli* encapsuladas causantes de diarrea (54). Lógicamente, también se ha buscado asociar los determinados serotipos con alguna categoría específica de *E. coli* diarreagénica; no obstante, la coincidencia no es 100% plena, ya que los genes de los antígenos O, H y K son cromosómicos⁸ y los que codifican para los principales factores de virulencia suelen residir en plásmidos (ver tabla 5) (80, 83).

Cabe subrayar que la serotipificación se realiza actualmente en microplacas, de manera semiautomatizada y sólo en un selecto grupo de laboratorios situados en distintas regiones geográficas mundiales.

⁸ Aunque existe evidencia de la regulación de transferencia del antígeno O por medio de dichos plásmidos.

Tabla 5. Relación entre los diferentes virotipos, serogrupos y serotipos de *E. coli* diarreagénica (80).

Virotipo	Serogrupo	Antígeno H asociado (Ref)
ECET	O6	H16
	O8	H9
	O11	H27
	O15	H11
	O20	NM
	O25	H42, NM
	O27	H7
	O43	H2 (87)
	O78	H11, H12
	O114	H? (60)
	O128	H7
	O148	H28, H18, H30 (87)
	O149	H40
	O159	H20, H4 (87)
	O169	H41
O173	NM	
ECEP	O55	H6, NM
	O86	H34, NM
	O111	H2, H12, NM
	O119	H6, NM, H2 (13)
	O125	H21
	O126	H27, NM, H12 (10)
	O127	H6, NM
	O128	H2, H12
	O142	H6
ECEH	O26	H11, H32, NM
	O55	H7
	O111	H8, NM
	O113	H21
	O117	H14
	O157	H7

CLAVES: NM = No móvil después de 10 días de incubación; ? = Ag no identificado por los métodos convencionales.

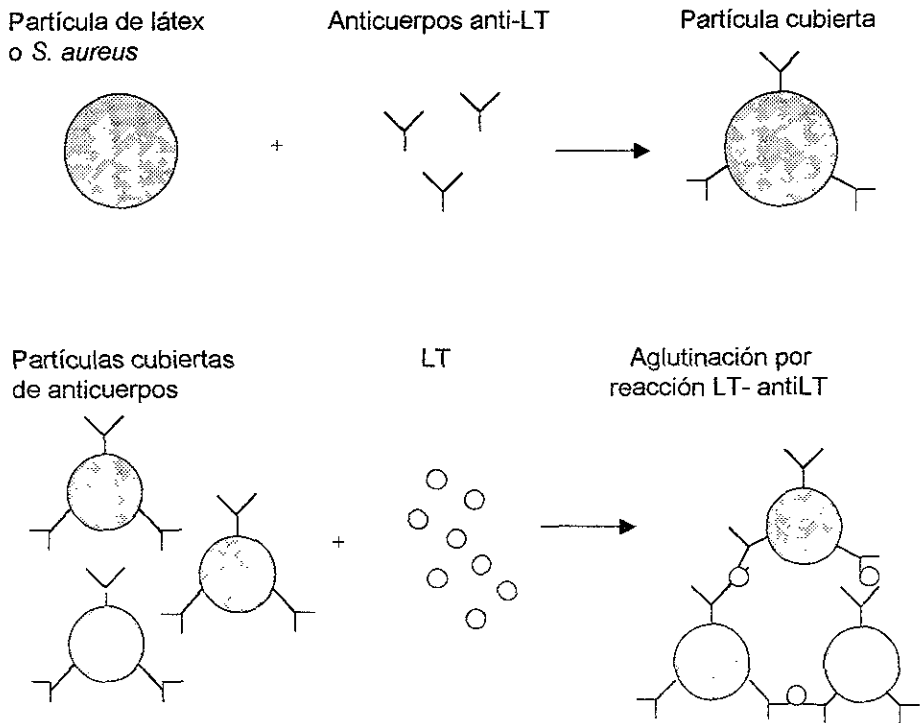
Virotipo	Serogrupo	Antígeno H asociado (Ref)
ECEI	O28	NM
	O29	NM
	O112	NM
	O124	H30, NM
	O136	NM
	O143	NM
	O144	NM
	O152	NM
	O159	H2, NM
	O164	NM
	O167	H4, H5, NM
ECEA	O3	H2
	O15	H18
	O44	H28, H18
	O86	NM
	O77	H18
	O111	H21, H2
	O126	H27 H2
	O127	H2
	O?	H10
ECAD	O26	H60

CLAVES: NM = No móvil después de 10 días de incubación; ? = Ag no identificado por los métodos convencionales.

- Métodos de coagulación para toxinas de ECET. Los primeros métodos diagnósticos para ECET se basaban en la detección de toxinas (LT y/o ST), por medio de pruebas de coagulación o aglutinación pasiva. Por ejemplo, la prueba de aglutinación pasiva reversa en látex emplea anticuerpos monoclonales contra LT, adsorbidos a partículas de látex: una vez que éstas se ponen en contacto con el sobrenadante del cultivo productor de LT, se observa una aglutinación típica. En la prueba de coagulación estafilocócica se utilizan células de *Staphylococcus aureus*

como soporte de los anticuerpos correspondientes, aprovechando que éstos se adsorben naturalmente por su fracción Fc a su proteína A superficial. En 1983, esta prueba fue la primera en desplazar a las fenotípicas y a la prueba de Biken, ya que es poco costosa, de escasa manipulación y el diagnóstico sólo requiere de 6 a 7 h después de que se ha sembrado la cepa. Estas reacciones de coagulación y aglutinación pasiva se encuentran esquematizadas en la figura 14 (46, 104).

Figura 14. Reacciones de coagulación y aglutinación pasiva.



- Otros métodos de aglutinación. Evidentemente, los Ags de superficie de ECET también se pueden detectar mediante aglutinación directa en placa. Puesto que el Ag CS expuesto en la superficie de la bacteria se encuentra particulado, la aglutinación ocurre en presencia de anticuerpos específicos. Esta técnica se utiliza principalmente en estudios epidemiológicos y no tanto en el diagnóstico clínico (113). También se cuenta con kits comerciales destinados a la aglutinación en látex, en la que el soporte sólido se encuentra cubierto de anticuerpos monoclonales, dirigidos contra una determinada adhesina (54).
- Métodos de precipitación para toxinas de ECET. En 1981, se desarrolló la prueba de Biken para detectar LT a través de reacciones de precipitación. Dicho ensayo consiste en sembrar la cepa sospechosa en agar Biken y, después de 48 h de incubación se provoca la liberación de la LT agregando polimixina (de esta manera el Ag queda en forma soluble); posteriormente se corta un pequeño fragmento en el agar cercano a la colonia analizada y se adiciona el suero anti-LT en el pozo resultante. Después de otras 48 h de incubación, en caso positivo, se observarán líneas de precipitación entre la colonia y el pozo practicado (46).
- Otros métodos de precipitación. En esta categoría destacan las pruebas de Ouchterlony y de inmunodifusión radial. En el primer caso, el Ag soluble se encuentra formando parte de extractos salinos derivados del previo tratamiento térmico de ECET; en el centro de la placa se sitúa el pozo en el

que se agregan los anticuerpos anti-CS, por lo que la presencia de CS es detectada en forma sencilla y barata, aunque no rápida (104).

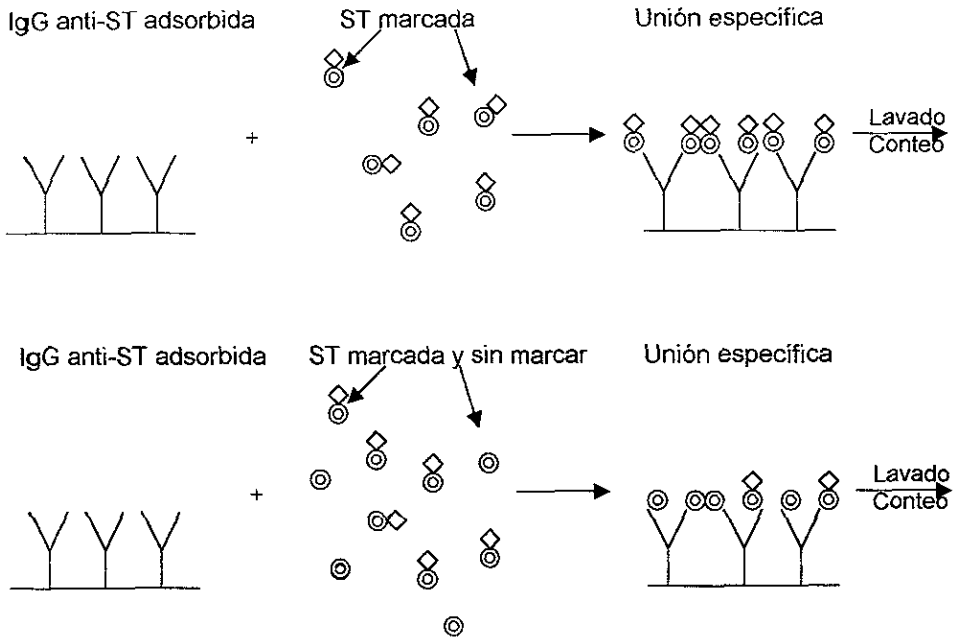
Por lo que se refiere a la inmunodifusión radial, ésta se utiliza para detectar la concentración de IgA secretoria, presente en los sobrenadantes de fluidos intestinales. Sin embargo, al igual que las demás técnicas de inmunoprecipitación, actualmente se ha reemplazado por técnicas más rápidas, como la de ELISA (70).

- Marcaje inmunoquímico. Estos métodos emplean el marcaje de los anticuerpos específicos que reaccionan con el Ag que se desea poner en evidencia. Dicho marcaje se puede llevar a cabo con partículas de oro, a fin de realizar las observaciones correspondientes mediante microscopía electrónica (70) o bien, aplicando la técnica propuesta por Ismaili *et al*, quienes sugieren el uso de anticuerpos monoclonales marcados con isotiocianato de fluoresceína (FITC) dirigidos contra α -actinina, en lugar del marcaje con faloidina, según el método de tinción de FAS (80).
- Radioinmunoensayo (RIA): El bioensayo en ratón recién nacido, considerado inicialmente como prueba estándar para la detección de la STA, ha sido sustituido desde 1981, gracias al desarrollo de un radioinmunoensayo específico con el mismo fin.

El radioinmunoensayo tiene como base la unión competitiva. en uno de los pozos de la microplaca, a una concentración conocida de anticuerpos contra

STa fijos, se agrega una concentración estándar de referencia de STa marcada (^{125}I -STa) para que se una y después de un lavado, se pueda detectar la radiación producida, debido a la STa unida a su anticuerpo específico. En otro pozo se agrega una determinada cantidad de cultivo bacteriano productor de toxina termoestable además de lo anterior, y se detecta una menor radiación debido a que la STa no marcada se une a los anticuerpos en lugar de la toxina radiactiva. En otros pozos se añaden cantidades mayores del cultivo bacteriano y se observa un desplazamiento de la toxina marcada, generándose una curva característica de inhibición. La concentración de STa presente se calcula por medio de una curva de calibración, realizada con una concentración conocida de anticuerpos, toxina marcada y estándares de concentración conocida de STa (fundamento esquematizado en la figura 15) (57, 104).

La sensibilidad de este método es de 50 pg/tubo de ensayo y existe una excelente correlación con la prueba biológica de ratón recién nacido. Esta técnica es más sensible y específica (no se observan reacciones cruzadas con otros péptidos intestinales, por lo que se puede ocupar directamente para muestras fecales). Tiene como desventajas que requiere de equipo especializado y que cada lote de STa marcada posee una vigencia corta de sólo un mes (33, 57).

Figura 15. Radioinmunoensayo (prueba de inhibición competitiva) para STa.

- Inmunoensayos enzimáticos (ELISA, por las siglas de *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Esta técnica es actualmente la más utilizada para llevar a cabo la detección de LT y su fundamento es el siguiente: el receptor de esta toxina, el gangliósido G_{M1} , se adsorbe a una microplaca; según el protocolo original, después de bloquear con albúmina los espacios libres de la placa, se agrega el sobrenadante de un cultivo de ECET productora de LT, se incuba, se lava y después se agregan anticuerpos anti-LT producidos por conejo. Después de volver a incubar y lavar, se agregan anticuerpos anti-IgG de conejo conjugados con una enzima. En una modificación a este protocolo,

se utilizan anticuerpos monoclonales contra LT producidos en ratón en tanto que los anticuerpos marcados son anti-IgG de ratón producidos en conejo. En ambos casos, después de agregar el segundo anticuerpo, se incuba, se lava y se agrega el sustrato, obteniéndose una reacción colorida en aquellos casos en que la LT se encuentra presente. Dependiendo de la enzima utilizada, se han obtenido los resultados expuestos en la tabla 6. (105)

Tabla 6. Cuadro comparativo entre dos enzimas aplicables a la prueba de ELISA.

Parámetro evaluado	Fosfatasa alcalina	Peroxidasa de rábano
Límite de detección de LT	4 ng/mL	10 ng/mL
Límite de detección de CT	8 ng/mL	15 ng/mL
Tiempo del ensayo	26-30 h	6-10 h
Sustrato utilizado	<i>o</i> -nitrofenilfosfato	<i>p</i> -fenilendiamina + H ₂ O ₂
Absorbancia mínima para un resultado positivo	0.3	0.1

Con base en los resultados anteriores, se prefiere utilizar a la peroxidasa de rábano, ya que el diagnóstico puede realizarse en una jornada de trabajo (8 h) con una elevada confiabilidad. Además, la técnica es simple y rápida de realizar; los reactivos son estables, fáciles de conseguir y a un precio más accesible que en el caso del RIA (87, 89, 105, 113).

Cabe señalar que esta prueba también puede detectar STa por medio de anticuerpos monoclonales, en placas en las que se ha adsorbido el gangliósido G_{M1} . El principio de la detección radica en la inhibición de la unión de IgG anti-ST (anticuerpos marcados) a una fase fija con ST por la competencia entre dicha fase y STa libre en el cultivo bacteriano. Para realizar en forma paralela la detección de LT y ST, inicialmente se incuba una noche el cultivo bacteriano en una placa con G_{M1} adsorbido, al terminar este tiempo, todo el medio de cultivo es transferido a otra placa con G_{M1} adsorbido para realizar la detección de ST. La detección de LT se realiza en la placa a la cual se le eliminó el medio de cultivo. El procedimiento para ST es el siguiente: a la nueva microplaca con G_{M1} se le añade ST purificada conjugada con CT-B; ésta se une al gangliósido y de esta manera queda ST fija a la placa. Posteriormente, se añaden a los pozos, diluciones del cultivo bacteriano y se agrega IgG de ratón anti-ST. Si se encuentra presente ST en el cultivo bacteriano dichos anticuerpos no se unirán a la ST fijada a la placa y, por lo tanto, no se podrán detectar después de lavar la placa y agregar anticuerpos anti-IgG de ratón marcados con peroxidasa. Para esta prueba, al igual que para el radioinmunoensayo, es importante realizar una curva patrón y contar con controles positivos y negativos (87, 89, 106).

El uso del ELISA no se encuentra restringido a la detección de toxinas (solubles en medios de cultivo); Albert *et al*, desarrollaron una variante para detectar cepas de ECEP con patrón clásico de adherencia localizada. En esta prueba, se adsorbe la suspensión bacteriana de ECEP a la microplaca y se

utilizan anticuerpos de conejo contra ECEP y, posteriormente, anticuerpos anti-IgG de conejo marcados con peroxidasa. A pesar de mostrar una correlación del 100% con el ensayo de adherencia e hibridación con sondas de DNA, este último ELISA no es utilizado actualmente en el diagnóstico de ECEP (4).

a) Ensayos de inmunotransferencia: Estas pruebas se han utilizado para detectar colonias productoras de un determinado Ag de superficie y, por lo general, sólo se realizan a aquellas cepas que previamente han demostrado capacidad para producir LT y ST mediante ensayos de ELISA. El microorganismo es suspendido en amortiguador y adsorbido a una tira de papel filtro de nitrocelulosa, la cual, después de lavarse y secarse, se pone en contacto con anticuerpos monoclonales (preparados en conejo) específicos contra un determinado CS. Finalmente, se le agregan anticuerpos anti-IgG de conejo conjugados con peroxidasa y la reacción se revela con los mismos sustratos utilizados en el ELISA: las colonias que generan un punto de color en la tira de papel filtro son reportadas como positivas (89).

E. Métodos moleculares

Las técnicas de biología molecular representan la herramienta diagnóstica más confiable, ya que establecen con exactitud la presencia de los agentes

etiología en los diversos especímenes clínicos, con base en la detección de segmentos de DNA específicos de cada microorganismo.

En ciertos laboratorios resulta relativamente común el empleo de sondas⁹ comerciales, tanto para confirmar resultados obtenidos mediante metodologías convencionales, como para aplicarlas directamente a las muestras patológicas (54).

• Hibridación con sondas. Una variante de esta clase de pruebas consiste en utilizar sondas, entre las cuales destacan las siguientes:

a) Sondas de fragmentos de DNA o polinucleótidos. Éstas se obtienen a partir de la digestión de un plásmido bacteriano, con una o más enzimas de restricción; posteriormente, se separan mediante electroforesis y se extraen del gel de poliacrilamida. Este tipo de sondas puede hibridar con genes que codifican para un determinado fenotipo, o bien, ser de una utilidad empírica. Sin embargo, presentan como desventaja su considerable cantidad de falsos positivos, ya sea cuando no se realiza una adecuada separación de fragmentos del vector, o simplemente, cuando el producto no es suficientemente específico (23, 78, 79, 80)

b) Sondas sintéticas de oligonucleótidos. Éstas se elaboran a partir de

⁹ Fragmentos de DNA obtenidos a partir de agentes patógenos plenamente identificados. Las sondas sólo hibridan (por complementariedad de bases) con cadenas simples de DNA homólogo, lo cual determina la posibilidad de detectar al agente causal en la muestra analizada.

secuencias de DNA previamente determinadas que codifican para factores de virulencia y presentan hasta 27 pares de bases (pb) de largo. Tienen como ventajas el ser más específicas que los polinucleótidos y la de no dar lugar a falsos positivos, aunque su alta especificidad puede ser causa de falsos negativos al ocurrir alguna mutación nucleotídica que no implique la pérdida de patogenicidad (23, 79, 80).

Con respecto a la detección de ECET y ECEP, la hibridación con sondas para puede realizarse de dos maneras diferentes:

- 1 Hibridación-blot de colonias. Este método requiere de colonias puras, las cuales han sido inoculadas en placas, respetando un orden conocido (40 colonias por placa, además de un control positivo y uno negativo). Las colonias son transferidas a papel filtro Whatman no. 541, o bien, a filtros de nitrocelulosa, a fin de llevar a cabo la hibridación. A continuación, las bacterias se lisan y desnaturalizan e hibridizan con las sondas *in situ*. La detección depende del marcador de la sonda, el cual puede ser enzimático (en cuyo caso se adiciona el sustrato adecuado) o, en su defecto, dicho marcador puede ser radioactivo (lo que requerirá de la exposición del papel a una placa de rayos X). Esta técnica es confiable y eficiente, pero implica el previo aislamiento de la bacteria a partir de la materia fecal (23, 35, 79, 80)

2. Hibridación-blot de evacuaciones Esta técnica no hace indispensable el aislamiento de colonias para realizar la hibridación; de hecho, sólo se siembran las muestras de materia fecal (como puntos) directamente sobre los filtros de nitrocelulosa que se encuentran sobre una placa de agar Mac Conkey y, después de incubar durante una noche, el papel se separa del plato, se seca y se trata de la misma forma descrita para la hibridación de colonias aisladas. La ventaja de no requerirse el previo aislamiento de colonias puras, contrasta con la baja sensibilidad del método: éste presenta como limitante su necesidad de que el patógeno se encuentre en una concentración de 10^5 a 10^7 UFC/g de materia fecal (23, 35, 79, 80).

Tal como se había mencionado con anterioridad, el método estándar para efectuar la detección de ECET es la hibridación-blot de 5 colonias lactosa positiva (por muestra) con sondas de oligonucleótidos complementarias del segmento de DNA que codifica para la síntesis de las toxinas LT y ST. En este sentido, las sondas que han sido más utilizadas son las resumidas en las tablas 7a y 7b.

Las pruebas en las que se aplican sondas de polinucleótidos de LT, muestran una alta sensibilidad y especificidad; el marcaje se realiza con radioisótopos, o bien, con enzimas tales como la fosfatasa alcalina. Las sondas son utilizadas para llevar a cabo la hibridación-blot de colonias aisladas.

Para identificar a las cepas productoras de ST, se han desarrollado sondas de oligonucleótidos (ya que el gen es muy pequeño) que resultan sensibles y específicas, y se pueden aplicar a la hibridación-blot de evacuaciones provenientes de personas infectadas. En resumen, este tipo de sondas son útiles para detectar tanto LT como ST, mediante pruebas estándar (80) (79), pero no para los factores de colonización, ya que éstos presentan una gran heterogenicidad (80).

Tabla 7a. Sondas de fragmentos de DNA para la detección de ECET (78)

Toxina detectada	Gen blanco	Sonda (enzima de restricción)	Tamaño
LT	<i>elt</i>	EWD299 (<i>HincII</i>)	0.8 MDa
	<i>elt</i>	pCDV403 (<i>BamHI</i>)	1000 pb ⁽³⁵⁾
STp	<i>estp</i>	pRIT10036 (<i>Hinfl</i>)	157 pb
	<i>estp</i>	pCVD426 (<i>PstI</i>)	NR (82)
STh	<i>esth</i>	pSLM004 (<i>Hinfl</i>)	216 pb
	<i>esth</i>	pCVD427 (<i>EcoRI</i>)	NR (82)

CLAVE: NR= No reportado

Tabla 7b. Sondas de oligonucleótidos para la detección de ECET (79)

Toxina detectada	Gen blanco	Secuencia (5'→ 3')	Tamaño
LT	<i>eltA₁₁</i>	GCG AGA GGA ACA CAA ACC GG	20 pb
STp	<i>estp</i>	GCT GTG AAC TTT GTT GTA ATC C	22 pb
STh	<i>esth</i>	GCT GTG AAT TGT GTT GTA ATC C	22 pb

En cuanto a la detección de ECEP, también se puede realizar la hibridación-blot, a través de la aplicación de las sondas ejemplificadas en las tablas 8a y 8b.

Tabla 8a. Sondas de fragmentos de DNA para la detección de ECEP (82).

Gen blanco	Sonda [enzima(s) de restricción]
LEE A	pCDV453 [<i>Bgl</i> II/ <i>Mlu</i> I]
LEE B	pCDV461 [<i>Eco</i> RI/ <i>Sal</i> I]
LEE C (<i>eae</i>)	pCDV443 [<i>Hind</i> III]
LEE D	pCDV460 [<i>Bgl</i> III]
<i>BfpA</i>	pMSD207 [<i>Eco</i> RI]

Tabla 8b. Sondas de oligonucleótidos para la detección de ECEP (80).

Factor	Secuencia (5'→3')
EAF	TAT GGG GAC CAT GTA TTA TCA
BFP	GCT ACG GTG TTA ATA TCT CTG GCG

Cabe señalar que en el caso de las sondas de DNA empleadas para identificar a ECEP, es necesario considerar que la mayoría de los genes "blanco" son cromosómicos (LEE) y que la hibridación-blot es coincidente con la observación de "adherencia localizada" por la técnica de FAS; de hecho, la sonda de *eae* es 100% sensible y 98% específica. Por su parte, la secuencia de la sonda EAF de oligonucleótidos (21 pb) se obtuvo a partir del plásmido

EAF cuya presencia no correlaciona con ninguna otra característica de patogenicidad de ECEP; empero, la hibridación positiva con dicha sonda de DNA (1 kb) concuerda en un 96% con el patrón de "adherencia localizada." Adicionalmente, otra sonda de oligonucleótidos (BFP) muestra un 95.7% de sensibilidad y 100% de especificidad, con respecto al ensayo de adherencia a células HEp-2. Es importante subrayar que ambas sondas dirigidas hacia regiones del plásmido EAF exhiben una excelente correlación con las características fenotípicas de "adherencia localizada" de ECEP. Su principal desventaja radica en el hecho de que no pueden detectar cepas atípicas de ECEP que han perdido al plásmido EAF, pero que conservan el patrón de "adherencia localizada" (18, 80).

- La reacción en cadena de la polimerasa (PCR): La PCR ha venido a enriquecer la práctica diagnóstica molecular de las enfermedades infecciosas en los laboratorios de todo el mundo. Una vez recolectada y preparada la muestra, ocurre en su seno la rápida multiplicación (amplificación) del DNA perteneciente al agente causal, y los millones de copias obtenidas incrementan notablemente la sensibilidad de cualquier técnica que se elija -entre las que se cuentan los análisis moleculares mediante *Southern-blot* del DNA y *Northern-blot* del RNA- para lograr la detección correspondiente (94, 118).

El reciente desarrollo de la PCR ha modificado en todo el mundo los criterios implicados en la práctica diagnóstica de las enfermedades infecciosas.

Debido a que el método es rápido, se ha logrado automatizar y, consecuentemente, representa la técnica más utilizada en los laboratorios de referencia (54). Este método sólo requiere de la adición de una "mezcla estandarizada" al tubo de reacción correspondiente; además, su eficacia es reproducible prácticamente en cualquier tipo de muestras clínicas: biopsias, sangre y diversos productos sanguíneos, semen, secreciones uretrales y vaginales, expectoraciones, aspirados transtraqueales, materia fecal, orina, y los líquidos cefalorraquídeo (LCR), sinovial, pleural, peritoneal y amniótico, entre algunos otros (94, 119).

Cabe señalar que la PCR no constituye por sí misma un método diagnóstico. En una muestra clínica, el proceso global asociado a la detección del agente causal, con base en el reconocimiento de su DNA, consta de tres pasos (94):

1. Procesamiento de la muestra
2. Amplificación del DNA por PCR
3. Identificación del DNA amplificado

1. *Procesamiento de la muestra.* La detección de bacterias patógenas por PCR a partir de muestras fecales es relativamente laboriosa, ya que además de la gran cantidad de inhibidores presentes, existe una gran cantidad de DNA proveniente de otras fuentes (por ejemplo: flora habitual, células intestinales y alimentos). De hecho, es posible adicionar directamente la materia fecal al termociclador, sólo cuando se ha diluido, lo que provoca bajos límites de detección. Con el objetivo de obtener una

mayor concentración de DNA del patógeno es recomendable utilizar colonias aisladas en placas de agar; de esta manera, se incrementa la sensibilidad del método, aunque se retarda el diagnóstico. Otra opción consiste en concentrar el DNA total y eliminar los inhibidores de la PCR (94).

Entre los métodos convencionales más utilizados para extraer el material genético del patógeno a partir de muestras de materia fecal se cuentan los siguientes (48, 52, 55, 73, 94, 101):

- Lisis bacteriana por el repetido congelamiento/ descongelamiento (de 5° a 20°C) de la muestra.
- Lisis bacteriana mediante un único congelamiento, ebullición (de 5° a 94°C) y el consecuente almacenamiento a -20°C.
- Ebullición con Chelex^{MR} 100 (BioRad) a 60°C durante 10 minutos, centrifugación y uso del sobrenadante. Una variante a este método también es el calentamiento de la muestra a 56°C por 10 minutos, ebullición a 100°C otros 10 minutos, enfriamiento a temperatura ambiente y uso del sobrenadante.
- Extracción a través de la mezcla fenol:cloroformo y precipitación en etanol; este método convencional elimina contaminantes biológicos y permite la obtención de un extracto con un alto grado de pureza. Una variante de esta técnica consiste en el tratamiento inicial con una alta concentración de NaOH.

- Extracción salina y precipitación en etanol, cuya principal ventaja consiste en que no se utilizan solventes orgánicos en la extracción de material genético
- Lisis del patógeno con lisozima y SDS, digestión con proteinasa K y precipitación del DNA con etanol; éste es el método más utilizado en el procesamiento de muestras de heces humanas.

Sin lugar a dudas, las tres metodologías señaladas en último término constan de varios pasos, con el fin de purificar el DNA obtenido; por ello, las extracciones orgánicas involucradas son las recomendadas para los kits comerciales (73, 101).

Adicionalmente, se sugieren dos métodos que también promueven la purificación del DNA, los cuales presentan como paso común el de suspender las muestras fecales en determinadas soluciones y asentar el debris fecal por medio de centrifugación a baja velocidad (14, 73, 101):

- Lisis con solución caotrópica y la purificación del DNA mediante su fijación a una matriz de vidrio o a polvo de fibras de celulosa.
 - Lisis por calentamiento y la purificación del DNA, a través de una cromatografía de columna "spin" de Sepharosa CL-6B.
2. *Amplificación de la muestra por PCR.* Dicho proceso corresponde a una reacción enzimática ejecutada por alguna DNA polimerasa. Esta clase de

enzimas cataliza la formación de un enlace fosfodiéster entre el 3'-OH en el extremo creciente de la cadena de DNA a elongar (el iniciador) y el grupo 5'-PO₄ del desoxirribonucleótido trifosfatado (dNTP) entrante. La elección de cada nucleótido a incorporar, está determinada por el DNA molde, al que el iniciador se ha unido previamente por complementariedad de bases. La amplificación del DNA (de manera exponencial) se logra mediante ciclos repetidos de PCR, cada uno de los cuales presenta 3 etapas distintivas de temperatura¹⁰ (Ver figura 16) (94, 118).

Cabe señalar que la reacción concluye cuando la cantidad de enzima se reduce hasta niveles insuficientes (por la inactivación térmica ocurrida después de cada paso de desnaturalización), pero también gravita el hecho de que la efectividad del alineamiento de los iniciadores va decreciendo paulativamente (al irse disminuyendo su concentración e incrementando en forma exponencial el número de secuencias "blanco"), generalmente a los 30 ó 40 ciclos de amplificación. Los principales componentes de la PCR se enumeran en la tabla 9 (94, 118).

Además, cuando el DNA molde se encuentra mezclado con numerosas estructuras secundarias, es oportuno incorporar urea, formamida o dimetilsulfóxido al 1 a 10%; análogamente, la adición de albúmina o glicerol

¹⁰ Cada etapa dura apenas entre uno y algunos minutos, por lo cual casi resulta indispensable que el laboratorio cuente con un termociclador, éste permite programar las temperaturas y la duración de los diversos períodos, para todo el proceso.

incrementa el rendimiento de la reacción de amplificación cuando se trata de fragmentos de DNA molde mayores de 2.5 kpb (94)

Figura 16. Esquema general de las condiciones utilizadas en la reacción en cadena de la polimerasa.

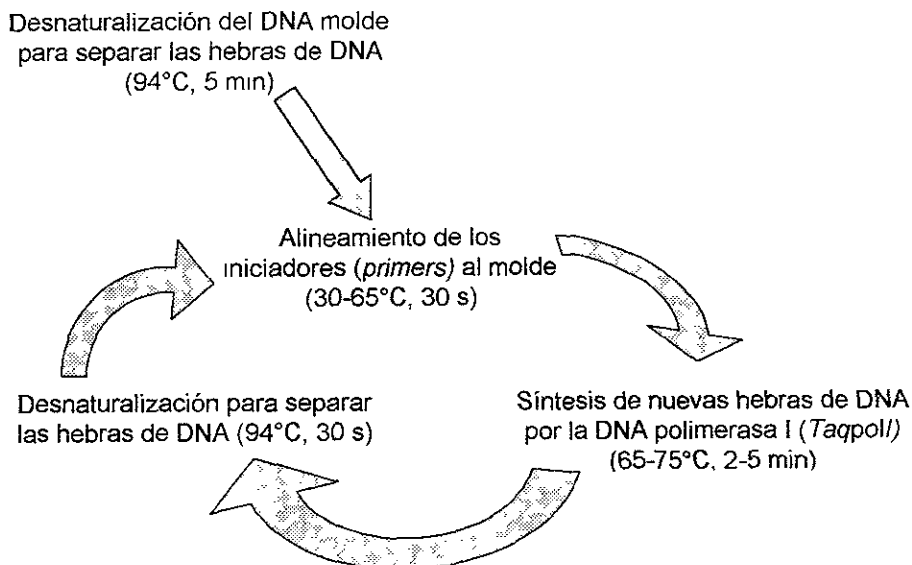


Tabla 9. Componentes más relevantes de la PCR (94).

Componentes de la PCR	Características	Concentración
Secuencia blanco	<ul style="list-style-type: none"> • 150 a 500 pares de bases (pb) 	1 a 20 ng/μL
Iniciadores (<i>primers</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • 15 a 25 pb de composición semejante • No son complementarios entre sí • Con similares temperaturas de fusión (T_m) 	Cada uno de 0.1 a 1 μM

Componentes de la PCR	Características	Concentración
DNA polimerasa I termoestable (<i>Taq</i> pol I)	<ul style="list-style-type: none"> • Temperatura óptima: 70 a 80°C • V_{max} próxima a los 180 nucleótidos/segundo/ molécula de enzima (nt/s) 	2.5 U totales
Desoxirribonucleótidos trifosfatados libres (dNTPs)	<ul style="list-style-type: none"> • Se ocupan dATP, dGTP, dCTP y dTTP 	Cada uno a 200µM.
Mg ²⁺	<ul style="list-style-type: none"> • Influye en el alineamiento de los iniciadores, T_m y actividad enzimática de la <i>Taq</i> DNA pol I 	0.5 a 4 mM
Solución amortiguadora de Tris-Cl	<ul style="list-style-type: none"> • pH 8.3 a 8.9 	20 a 50 mM

Evidentemente, para efectuar la detección de ECET y ECEP, debe buscarse la amplificación de los genes que codifican para los factores de virulencia, a través de iniciadores específicos. Las secuencias de estos últimos pueden desarrollarse de manera empírica o fundamentándose en programas de computación que identifican las características críticas de diseño y muestran propiedades conocidas y predictivas de los iniciadores. (Ver tablas 10 y 11) (80, 94).

Tabla 10. Iniciadores para la detección de ECET.

Iniciador	Secuencia de los oligonucleótidos (5'→3')	DNA "blanco"	pb del producto	Pruebas de detección	Ref.
NR	TTA ATA GCA CCC GGT ACA AGC AGG CTT GAC TCT TCA AAA GAG AAA ATT AC	Gen de STI	NR	NR	(80)
STIa-1	TCT GTA TTA TCT TTC CCC TC	Gen de STI	186	SB	(94)
STIa-2	ATA ACA TCC AGC ACA GGC				
STII-FP	GCA ATA AGG TTG AGG TGA T	Gen de STII	368	EF/EthBr	(111)
STII-RP	GCC TGC AGT GAA ATG GAC				
JW14	ATT TTT MTT TCT GTA TTR TCT T	Gen de STI	190	SB y EF/EthBr	(101)
JW7	CAC CCG GTA CAR GCA GGA TT				
LT-A1	GGC GAC AGA TTA TAC CGT GC	Gen de LT-A	696	SB	(80)
LT-A2	CCG AAT TCT GTT ATA TAT GTC				(94)
TW20	GGC GAC AGA TTA TAC CGT GC	Gen de LT-A	450	EF/EthBr	(101)
JW11	CGG TCT CTA TAT TCC CTG TT				
LTL	AGA GAT ACA CGT ATG CCT CG	Gen de LT-A	322	EF/EthBr	(94)
LTR	AAC GCC GTT AGT CAT ACC				
LT 51	CCG TAT TAC AGA AAT CTG A	Gen de LTI	110	EF/EthBr	(111)
LT 31	GTG CAT GAT GAA TCC AGG GT				

CLAVES: M = A o C; R = A o G ; NR = no reportado; SB = Southern blot con sondas marcadas; EF/EthBr = Electroforesis en gel de agarosa al 3% con bromuro de etidio.

Tabla 11. Iniciadores para la detección de ECEP.

Iniciador	Secuencia de los oligonucleótidos (5' → 3')	DNA "blanco"	pb del producto	Pruebas de detección	Ref.
Int-Fc	CCG GAA TTC GGG ATC GAT TAC CGT CAT	eee	840	EF/EthBr	(11)
Int-Rc	CCC AAG CTT TTA TTT ATC AGC CTT AAT CTC				
eee P1	CTG AAC GGC GAT TAC GCG AA	eee	917	EF/EthBr	(90)
eee P2	CCA GAC GAT ACG ATC CAG				
EAF1	CAG GGT AAA AGA AAG ATG ATA A	Gen de EAF	397	EF/EthBr	(28)
EAF25	TAT GGG GAC CAT GTA TTA TCA				
NR	AAT GGT GCT TGC GCT TGC TGC GCC GCT TTA TCC AAC CTG GTA	Gen de BFP	NR	NR	(41)

CLAVES: NR = no reportado; EF/EthBr = Electroforesis en gel de agarosa al 3% con bromuro de etidio.

3. *Identificación del DNA amplificado* Una de las principales decisiones de quienes emplean la PCR consiste en seleccionar un método adecuado para detectar el producto amplificado, dado que, entre los que se encuentran disponibles, existen diferencias muy significativas en términos de sensibilidad, especificidad, confiabilidad, dificultad y costo.

Como el producto primario de la PCR es una molécula dúplex de DNA lineal, con longitud y secuencia definidas, el método de detección ideal debe permitir una determinación precisa del tamaño y de la pureza del producto amplificado.

En este sentido, existen técnicas que se basan en el uso de geles de agarosa hasta las que contemplan la secuenciación del DNA. Entre las técnicas empleadas con mayor frecuencia se cuentan las siguientes:

- a) Electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida. El corrimiento electroforético de los productos de la PCR puede relacionarse con marcadores de peso molecular y representa el método empleado más frecuentemente en los laboratorios, ya que aporta resultados relativamente confiables, con una sensibilidad de 1.0 a 5.0 ng de DNA. El procesamiento simultáneo de marcadores de peso molecular y de controles positivos provenientes de microorganismos caracterizados con anterioridad, permite realizar las comparaciones correspondientes y, consecuentemente, establecer la procedencia del DNA amplificado por PCR (11, 90, 101, 112).

- b) Southern blot. Esta metodología representa una herramienta muy efectiva para establecer el origen del DNA presente en una muestra clínica. Una vez que se ha llevado a cabo la separación de los productos de la PCR -mediante electroforesis en gel-, se puede identificar un fragmento específico del DNA, previa transferencia de los diversos segmentos a una membrana de *nylon* o nitrocelulosa. Posteriormente, la secuencia "blanco" se identifica vía su hibridación con una sonda marcada con algún elemento radioactivo, digoxigenina o bien con biotina-avidina conjugada con peroxidasa. Después de un lavado de la membrana, la doble cadena de DNA (constituida por la sonda marcada y el DNA "problema"), permanecerá unida a dicho soporte, en tanto que las moléculas monocatenarias se habrán eliminado. El revelado correspondiente se logra mediante la exposición de la membrana a una película de rayos-X, o bien, agregando el sustrato apropiado para la enzima utilizada como marcador (80, 94, 101, 118).
- c) Captura por hibridación en sándwich. En esta técnica se inmoviliza una sonda complementaria de la secuencia amplificada a identificar. De esta forma, la muestra híbrida con dicha sonda y, previo lavado, se agrega una segunda sonda marcada con estreptoavidina-peroxidasa. Finalmente, la reacción se revela con reactivo de color (tetrametilbencidina) por 30 minutos y el producto amplificado se detecta a 450 nm. La estreptavidina también puede conjugarse con

isoluminol, lo cual permite la detección del DNA por quimioluminiscencia. Esta técnica tiene la ventaja de usar el equipo estándar de ELISA y de no requerir una electroforesis previa ni radioisótopos (94).

Por otra parte, también existen otras técnicas de identificación utilizadas en estudios epidemiológicos, o bien, en laboratorios de investigación, entre las cuales destacan las siguientes.

- Análisis con enzimas de restricción. El empleo de esta clase de enzimas requiere del conocimiento previo de la secuencia del fragmento amplificado, ya que al encontrar su secuencia blanco en el DNA, dará lugar a fragmentos que podrán ser plenamente identificados a través de una electroforesis en gel de agarosa. Por ejemplo, el fragmento EAF obtenido con los iniciadores EAF1 y EAF25 (397 pb), al ser cortado por la *AfuI*, dará origen a dos fragmentos de 308 y 89 pb; a diferencia de ello, si se utiliza la *NciI*, los fragmentos producidos son de 191 y 206 pb (28).

Con la finalidad de evitar falsos positivos, se recomienda que el análisis se efectúe con dos distintas enzimas de restricción, cuyas regiones "blanco" se localicen en una porción conservada del fragmento amplificado.

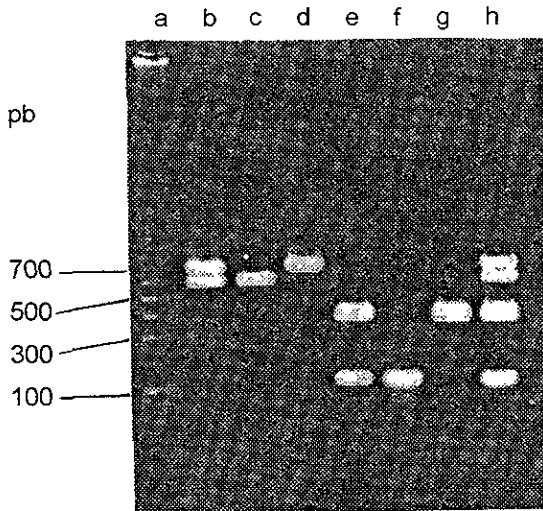
- Secuenciación de los fragmentos obtenidos por PCR. Esta metodología puede emplearse para determinar la identidad del

fragmento amplificado, o bien, para conocer la secuencia del DNA “blanco.” La secuenciación requiere la previa purificación del DNA y posteriormente su análisis por medio del ciclo *Taq* que tiene como principio el método de secuenciación de Sanger. Ambos procesos se pueden realizar por medio de kits comerciales. Esta técnica es cara, laboriosa y no es adecuada para el diagnóstico rutinario de ECET o ECEP (28, 118).

Recientemente se han desarrollado PCRs múltiples, que consisten en utilizar distintos pares de iniciadores de manera simultánea, para detectar genes que codifiquen, por ejemplo, para las distintas toxinas de ECET en el caso de la detección de todos los tipos de ECET sólo con una reacción de amplificación de DNA. También se han desarrollado PCRs múltiples para detectar distintos alelos de intiminas en ECEP, e incluso, para evidenciar diferentes especies de *Escherchia coli* causantes de diarrea. Para la identificación de los productos amplificados se utiliza la electroforesis en gel de agarosa, diferenciándolos por tamaño y por comparación con un control positivo. Por lo general, se realiza una posterior hibridación para identificar definitivamente cada producto de la PCR (Ver figura 17) (80, 90, 97, 101, 111).

Finalmente, en estudios epidemiológicos, en los que se desea conocer si una cepa determinada es la causante de un brote diarreico, o bien, cuando se buscan establecer relaciones filogenéticas, se utilizan las técnicas mencionadas a continuación (6, 58, 77, 85, 97, 118).

Figura 17. Gel de electroforesis de un PCR múltiple para la detección de: b) SLTII y SLTI (de *Shiga-Like Toxin*), c) SLTI, d) SLTII, d) LTI, STII, f) LTI, g) STII y h) STII, SLTI, SLTII y LTI (a es el marcador de pesos moleculares) (Reproducción de referencia 111, copyright (1998) con el permiso de Blackwell Science Ltd.).



- Ribotipificación. En ella se busca identificar el polimorfismo a nivel de genes de rRNA 16S.
- Electroforesis en gel bajo un campo eléctrico por pulsos (PFGE por *Pulsed-field gel electrophoresis*).
- Variaciones de la PCR tales como "arbitrary primed PCR", o bien, "análisis de la amplificación aleatoria de fragmentos polimórficos" (RAPD), al generar grupos discretos ("huellas digitales") de fragmentos

amplificados de DNA total de bacterias, utilizando iniciadores escogidos de manera arbitraria y utilizando condiciones de alineación de baja "estringsencia" Estos métodos se utilizan para comparar resultados intralaboratorios de manera preliminar. También se han empleado en condiciones de alineación de baja estringsencia, ciertos iniciadores específicos para determinados genes, técnica conocida como "detección combinada de genes y tipificación epidemiológica" (COGEDET por sus siglas en inglés).

- PCR por fragmentos polimórficos de restricción con longitudes variables (RFLP). Ésta resulta útil para el estudio de variaciones en pequeñas regiones del DNA, tales como las de genes individuales. Esta variabilidad puede ser demostrada cuando el DNA cromosómico es purificado y se fragmenta en varios segmentos, vía la acción de endonucleasas de restricción. Después de dicha digestión, los fragmentos se separan mediante electroforesis en gel de agarosa¹¹, a fin de apreciar diferencias entre conjuntos de bandas de distintas cepas. Sin embargo, si dichas diferencias son muy pequeñas, se puede recurrir al análisis por *Southern-blot*.

¹¹ Los diferentes tamaños de los fragmentos obtenidos (origen de la denominación de "polimorfismo") dependen plenamente de la ubicación y cantidad de las secuencias que funcionan como sitios de reconocimiento/corte para la(s) enzima(s) utilizada(s)

CONCLUSIONES

- a) El reconocimiento de los distintos factores bacterianos de virulencia recibe actualmente una inusitada atención, ya que tiene aplicación directa en el desarrollo razonado de vacunas que protejan eficazmente contra los agentes etiológicos más peligrosos, en el diseño de mejores regímenes terapéuticos, e inclusive, en el establecimiento de pruebas diagnósticas más confiables.
- b) ECET produce dos clases de toxinas, cada una de las cuales cuenta con un diferente "sitio blanco" de acción en el enterocito; ambas promueven distintas señales en la célula hospedera, desencadenando el síndrome diarreico, sin llegar a un contacto íntimo bacteria-célula intestinal.
- c) La toxina termoestable (ST) de ECET es la de mayor importancia médica, si bien esta característica y su mecanismo de acción no se citan con la frecuencia y profundidad que la literatura convencional dedica a la LT. Además, cuando la cepa implicada expresa adhesinas CS, la virulencia de ECET se incrementa significativamente.
- d) ECEP requiere concretar una adherencia íntima con el enterocito para promover las señales que generan diarrea. Dicha clase de unión es mediada por factores de virulencia codificados por genes

cromosómicos y plasmídicos entre los cuales, adicionalmente, se reparte la función regulatoria global.

- e) ECEP cuenta con la extraordinaria capacidad de sintetizar su propio receptor y translocarlo a la membrana del enterocito, a través de un complejo sistema de transporte proteico
- f) Tanto ECET como ECEP comparten factores de virulencia con otros microorganismos que también ocasionan enfermedades intestinales al humano; ello demuestra que ocurre una eficaz transferencia horizontal de numerosos genes asociados a la patogenicidad bacteriana.
- g) ECET y ECEP afectan a distintos sectores de la población: mientras esta última ocasiona cuadros diarreicos a los infantes menores de 2 años, ECET lo hace en niños de 0 a 5 años y funge como el principal agente causal de la llamada "diarrea del viajero". Evidentemente, el síndrome diarreico es de mayor gravedad en los infantes, entre quienes la muerte representa una posibilidad real, sobre todo cuando la enfermedad no es tratada adecuada y oportunamente.
- h) Como ocurre en la mayoría de las enfermedades intestinales, el tratamiento de elección de las afecciones debidas a ECET y ECEP reside en la inmediata restitución de agua y electrolitos. Por lo general, el uso de antibióticos sólo se justifica en los casos de gravedad y/o ante la previa realización de las pruebas de

susceptibilidad del agente infeccioso a los antimicrobianos

- i) Llama la atención el hecho de que, actualmente, los turistas del primer mundo que viajan a países en vías de desarrollo suelen ser ampliamente informados acerca del uso preventivo y correctivo de los electrolitos y de diversos antimicrobianos. De hecho, esta información también se proporciona a través de los distintos medios electrónicos.
- j) En cuanto a los métodos que permiten efectuar la detección de ECET y ECEP en el laboratorio; recientemente se han desarrollado métodos relativamente económicos, rápidos y de fácil ejecución; entre ellos, destacan los de orden inmunológico y las técnicas moleculares que, conjuntamente, aportan una gran confiabilidad, tanto al diagnóstico como a los estudios epidemiológicos. Sin embargo, no todos los ensayos biológicos han podido ser sustituidos por aquéllos: el de adherencia a cultivos celulares continúa vigente ya que permanece como el método de referencia para identificar a ECEP y representa la prueba de oro para detectar a ECEA.
- k) Recientemente se han diseñado protocolos de PCR múltiple por medio de los cuales, en una sola reacción, se puede identificar confiablemente a éstos y otros patógenos. Es probable y deseable que esta clase de métodos se implemente en diversos laboratorios clínicos, a fin de agilizar la detección del agente etiológico y, por ende, la administración de la terapéutica correspondiente.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abe A, de Grado M, Pfuetzner RA, Sanchez-Sanmartin C, Devinney R, Puente JL, Strynadka NC, and Finlay BB.: Enteropathogenic *Escherichia coli* translocated intimin receptor, Tir, requires a specific chaperone for stable secretion, *Mol Microbiol*, 1999; 33 (6): 1162-1175.
2. Agin TA and Wolf MK. Identification of a family of intimins common to *Escherichia coli* causing attaching-effacing lesions in rabbits, humans, and swine, *Infect Immun*, 1997; 65 (1): 320-326.
3. Ahrén C, Jertborn M, and Svennerholm A.: Intestinal immune responses to an inactivated oral enterotoxigenic *Escherichia coli* vaccine and associated immunoglobulin A responses in blood, *Infect Immun*, 1998; 66 (7): 3311-3316.
4. Albert MJ, Ansaruzzaman MS, Faruque MS, Neogi PKB, Haider K, and Tzipori S.: An ELISA for the detection of localized adherent classic enteropathogenic *Escherichia coli* serogroups, *J Infect Dis*, 1991; 164 (Nov): 986-989.
5. Anantha RP, Stone KD, and Donnenberg MS.: Role of BfpF, a member of the pilT family of putative nucleotide-binding proteins, in type IV pilus biogenesis and in interactions between enteropathogenic *Escherichia coli* and host cells, *Infect Immun*, 1998; 66 (1): 122-131.
6. Arnold C, Metherell L, Willshaw G, Maggs A, and Stanley J.: Predictive fluorescent amplified-fragment length polymorphism analysis of *Escherichia coli*: high-resolution typing method with phylogenetic significance, *J Clin Microbiol*, 1999; 37 (5): 1274-1279.
7. Ascón MA, Hone DM, Walter N, and Pascual DW : Oral immunization with a *Salmonella typhimurium* vaccine vector expressing recombinant enterotoxigenic *Escherichia coli* K99 fimbriae elicits elevated antibody titers for protective immunity, *Infect Immun*, 1998; 66 (11): 5470-5476.
8. Baldwin TJ, Ward W, Aitken A, Knutton S, and Williams PH : Elevation of intracellular free calcium levels in HEP-2 cells infected with enteropathogenic *Escherichia coli*, *Infect Immun*, 1991; 59 (5): 1599-1604.
9. Banwell JG : Pathophysiology of diarrheal disorders, *Rev Infect Dis*, 1990. 12 (1). S30-S35.

10. Barlow RS, Hirst RG, Norton RE, Ashhurst-Smith C, and Bettelheim KA: A novel serotype of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) as a major pathogen in an outbreak of infantile diarrhoea, *J Med Microbiol*, 1999; 48 (12): 1123-1125
11. Batchelor M, Knutton S, Capiroli A, Huter V, Zanial M, Dougan G, and Frankel G: Development of a universal intimin antiserum and PCR primers, *J Clin Microbiol*, 1999; 37 (12): 3822-3827
12. Black RE.: Epidemiology of travelers' diarrhea and relative importance of various pathogens, *Rev Infect Dis*, 1990; 12 (1): S73-S79.
13. Bortolini MR, Trabulsi LR, S  ller R, Frankel G, and Sperandio V.: Lack of expression of bundle-forming pili in some clinical isolates of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) is due to a conserved large deletion in the *bfp* operon, *FEMS Microbiol Letters*, 1999; 179: 169-174.
14. Caeiro JP, Estrada-García MT, Jian ZD, Mathewson JJ, Adachi JA, Steffen R, and Dupont HL.: Improved detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* among patients with travelers' diarrhea, by use of the polymerase chain reaction technique, *J Infect Dis*, 1999; 180 (6): 2053-2055.
15. Collington GK, Booth IW, Donnenberg MS, Kaper JB, and Knutton S.: Enteropathogenic *Escherichia coli* virulence genes encoding secreted signaling proteins are essential for modulation of Caco-2 cell electrolyte transport, *Infect Immun*, 1998; 66 (12): 6049-6053.
16. Crane JK and Oh JS.: Activation of host cell protein kinase C by enteropathogenic *Escherichia coli*, *Infect Immun*, 1997; 65 (8): 3277-3285.
17. Dalton CB, Mintz ED, Wells JG, Bopp CA, and Tauxe RV.: Outbreaks of enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in American adults: a clinical and epidemiologic profile, *Epidemiol Infect*, 1999; 123 (1): 9-16.
18. Donnenberg MS and Kaper JP.: Enteropathogenic *Escherichia coli*, *Infect Immun*, 1992; 60 (10): 3953-3961.
19. Donnenberg MS and Nataro JP.: Methods for studying adhesion of diarrhaeagenic *Escherichia coli*, *Methods Enzymol*, 1995; 253: 324-336.
20. Donnenberg MS, Kaper JB, and Finlay BB.: Interactions between enteropathogenic *Escherichia coli* and host epithelial cells, *Trends Microbiol*, 1997; 5 (3), 109-114.
21. Donnenberg MS, Tacket CO, Losonsky G, Frankel G, Nataro JP,

- Dougan G, and Levine MM: Effect of prior experimental human enteropathogenic *Escherichia coli* infection on illness following homologous and heterologous rechallenge, *Infect Immun*, 1998; 66 (1): 52-58.
22. Dytoc M, Fedorko L, and Sherman PM.: Signal transduction in human epithelial cells with attaching and effacing *Escherichia coli* in vitro, *Gastroenterology*, 1994; 106 (5): 1150-1161
 23. Echeverria P, Taylor DN, Serwatana J, and Moe C.: Comparative study of synthetic oligonucleotide and cloned polynucleotide enterotoxin gene probes to identify enterotoxigenic *Escherichia coli*, *J Clin Microbiol*, 1987; 25 (1): 106-109.
 24. Edelman R and Levine MM: Summary of a workshop on enteropathogenic *Escherichia coli*, *J Infect Dis*, 1983; 147(6): 1108-1122.
 25. Evans DG, Evans DJ Jr, and Pierce NF.: Differences in the response of rabbit small intestine to heat-labile and heat-stable enterotoxins of *Escherichia coli*, *Infect Immun*, 1973; 7(6): 873-880.
 26. Fishman PH.: "Mechanism of action of cholera toxin", en *ADP-ribosylating toxins and G proteins*, (Moss J and Vaughan M), USA, ASM Press, 1990; p. 127-137.
 27. Fivaz M and Van der Goot FG.: The tip of a molecule syringe, *Trends Microbiol*, 1999; 7 (9): 341-343.
 28. Franke J, Franke S, Schmidt S, Schwarzkopf A, Wieler LH, Baljer G, Beutin L, and Karch H.: Nucleotide sequence analysis of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adherence factor probe and development of PCR for rapid detection of EPEC harboring virulence plasmids, *J Clin Microbiol*, 1994; 32(10): 2460-2463.
 29. Frankel G, Philips AD, Rosenshine I, Dougan G, Kaper JB, and Knutton S.: Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements, *Mol Microbiol*, 1998; 30 (5): 911-921.
 30. Freedman DJ, Tacket CO, Delehanty A, Maneval DR, Nataro J, and Crabb JH.: Milk immunoglobulin with specific activity against purified colonization factor antigens can protect against oral challenge with enterotoxigenic *Escherichia coli*, *J Infect Dis*, 1998; 177 (3): 662-667
 31. Friedberg D, Umanski T, Fang Y, and Rosenshine I.: Hierarchy in the expression of the locus of enterocyte effacement genes of enteropathogenic *Escherichia coli*, *Mol Microbiol*, 1999; 34 (5): 941-952.

32. Gaastra W, and Svennerholm A.: Colonization factors of human enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC), Trends in Microbiology, 1996; 4 (11): 444-452.
33. Giannella RA, Drake KW, and Luttrell M. Development of a radioimmunoassay for *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin: Comparison with the suckling mouse bioassay, Infect Immun, 1981; 33 (1) 186-192.
34. Giannella RA.: Suckling mouse model for detection of heat-stable *Escherichia coli* enterotoxin: Characteristics of the model, Infect Immun, 1976; 14 (1): 95-99
35. Gicquelais KG, Baldini MM, Martinez J, Maggi L, Martin WC, Prado V, Kaper JV, and Levine MM.: Practical and economical method for using biotinylated DNA probes with bacterial colony blots to identify diarrhea-causing *Escherichia coli*, J Clin Microbiol, 1990; 28 (11): 2485-2490.
36. Girón JA, Donnenberg MS, Martín WC, Jarvis KG, and Kaper JB.: Distribution of the bundle-forming pilus structural gene (*bfpA*) among enteropathogenic *Escherichia coli*, J Infect Dis, 1992; 168 (Oct): 1037-1041.
37. Girón JA, Ho ASY, and Schoolnik GK.: An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*, Science, 1991; 254: 710-713
38. Gómez-Duarte OG, Ruiz-Tagle A, Gómez DC, Viboud GJ, Jarvis KG, Kaper JB, and Girón JA.: Identification of IngA the structural gene of longus Type IV pilus of Enterotoxigenic *Escherichia coli*, Microbiol, 1999; 145 (7): 1809-1816.
39. Goosney DL, Celli J, Kenny B, and Finlay BB.: Enteropathogenic *Escherichia coli* inhibits phagocytosis, Infect Immun, 1999; 67 (2): 490-495.
40. Guerrant RL, Hugues JM, Lima NL, and Crane J.: Diarrhea in developed and developing countries. Magnitude, special settings, and etiologies, Rev Infect Dis, 1990; 12 (1): S41-S50.
41. Gunzberg IT, Tornieporth NG, and Riely LW.: Identification of enteropathogenic *Escherichia coli* by PCR-based detection of bundle-forming pilus gene, J Clin Microbiol, 1995, 33: 1375-1377.
42. Haan L de, Verweij WR, Fiel IK, Lijnema TH, Hol WGJ, Agsteribbe E, and Wilschut J : Mutants of the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin with reduced ADP-ribosylation activity or no activity retain the immunogenic properties of the native holotoxin, Infect Immun, 1996; 64

(1): 5413-5416

43. Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW, and Gilman AG.: "Fármacos que afectan la función gastrointestinal y fármacos antimicrobianos" en *Goodman & Gilman, Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*, (Blengio JR, Rivera B y Sapiña S) 9ª ed., México, McGraw-Hill Interamericana, 1996; pp. 965-1002 y 1123-1140.
44. Hartland EL, Batchelor M, Delahay RM, Hale C, Matthews S, Dougan G, Knutton S, Connerton I, and Frankel G.: Binding of intimin from enteropathogenic *Escherichia coli* to Tir and to host cells, *Mol Microbiol*, 1999; 32 (1): 151-158.
45. Hartland EL, Daniell SJ, Delahay RM, Neves BC, Wallis T, Shaw RK, Hale C, Knutton S, and Frankel G.: The type III protein translocation system of enteropathogenic *Escherichia coli* involves EspA-EspB protein interactions, *Mol Microbiol*, 2000; 35 (6): 1483-1492.
46. Honda T, Samakoses R, Sornchai C, Taked C, and Miwatani T.: Detection by a staphylococcal coagglutination test of heat-labile enterotoxin-producing enterotoxigenic *Escherichia coli*, *J Clin Microbiol*, 1983; 17 (4): 593-595.
47. <http://falcon.cc.ukans.edu/~jbrown/ecoli.html>
48. <http://ftp.bio.indiana.edu/1m/Molecular-Biology/Materials%2BMethods>
49. <http://sun1.bham.ac.uk/bcm4ght6/path/path.html?>
50. <http://www.bact.wisc.edu/Bact330/lectureecoli>
51. <http://www.biomerieux-vitek.com/>
52. <http://www.bio-rad.com/>
53. <http://www.cdc.gov/travel/diarrhea.htm>
54. <http://www.ecoli.cas.psu.edu/>
55. <http://www.nwfsc.noaa.gov/protocols/>
56. <http://www.ssa.gob.mx/dgei/vitales/cuadro4.html>
57. Janeway Ch A Jr, Travers P, Walport M, and Capra JD.: *Immunobiology, the immune system in health and disease*, 4a. Ed., USA, Garland Publishing, 1999; pp. 33-76.
58. Jones C and Kortenkamp A.: RAPD library fingerprinting of bacterial and

- human DNA: Applications in mutation detection, Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis, 2000; 20 (2) 49-63
59. Kenny B, DeVinney R, Stein M, Reinscheid DJ, Frey EA, and Finlay BB.: Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptors for intimate adherence into mammalian cells, *Cell*, 1997; 91: 511-520
 60. Khalil SB, Cassels FJ, Shaheen HI, Pannell LK, El-Ghorab N, Kamal K, Mansour M, Savarino SJ, and Peruski LF Jr.: Characterization of an enterotoxigenic *Escherichia coli* strain from Africa expressing a putative colonization factor, *Infect Immun*, 1999; 67 (8): 4019-4026.
 61. Knutton S, Baldini MM, Kaper JB, and McNeish AS.: Role of plasmid-encoded adherence factors in adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to Hep-cells, *Infect Immun*, 1987; 55 (1): 78-85.
 62. Knutton S, Baldwin TJ, Williams PH, and McNeish AS.: Actin accumulation of sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*, *Infect Immun*, 1989; 57 (4): 1290-1298.
 63. Knutton S, Lloyd DR, and McNeish AS.: Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to human intestinal enterocytes and cultured human intestinal mucosa, *Infect Immun* 1987; 55 (1): 69-77.
 64. Knutton S, Lloyd DR, and McNeish AS.: Identification of a new fimbrial structure in enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) serotype O148:H128 which adheres to human intestinal mucosa: a potentially new human ETEC colonization factor, *Infect Immun*, 1987; 55 (1): 86-92.
 65. Knutton S, Shaw RK, Anantha RP, Donnenberg MS, and Zorgani AA.: The type IV bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli* undergoes dramatic alterations in structure associated with bacterial adherence, aggregation and dispersal, *Mol Microbiol*, 1999; 33 (3): 499-509.
 66. Koneman EW, Allen SD, Dowell VR, Janda WM, Sommers HM, y Winn WC.: *Diagnóstico Microbiológico*, 3a. Ed., Argentina, Ed. Médica Panamericana, 1992; pp. 250-255.
 67. Kresse AU, Rohde M, and Guzmán CA.: The EspD protein of enterohemorrhagic *Escherichia coli* is required for the formation of bacterial surface appendages and is incorporated in the cytoplasmic membranes of target cells, *Infect Immun*, 1999; 67 (9): 4834-4842.
 68. Lai X, Xu J, Melgar S, and Uhlin BE.: An apoptotic response by J774 macrophage cells in common upon infection with diarrheagenic

- Escherichia coli*, FEMS Microbiol Letters, 1999, 172: 29-34.
69. Levine MM, Nataro JP, Karch H, Baldini MM, Kaper JB, Black RE, Clements ML, and O'Brien AD.. The diarrheal response of humans to some classic serotypes of enteropathogenic *Escherichia coli* is dependent on a plasmid encoding an enteroadhesiveness factor, J Infect Dis, 1985; 152 (3): 550-559
 70. Levine MM, Ristaino P, Marley G, Smyth C, Knutton S, Boedeker E, Black R, Young C, Clements ML, Cheney C, and Patnaik R. Coli surface antigens 1 and 3 of colonization factor antigen II-positive enterotoxigenic *Escherichia coli*: morphology, purification, and immune responses in humans, Infect Immun, 1984; 44 (2): 409-420.
 71. Levine MM.: *Escherichia coli* that cause diarrhea. enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent, J Infect Dis, 1987; 155 (3): 377-387.
 72. Levinson W y Jowitz E.: *Microbiología e Inmunología Médicas*, (Casolio MR) México, Ed. El Manual Moderno, 1992; pp. 32-37.
 73. Lou Q, Chong SKF, Fitzgerald JF, Siders JA, Allen SD, and Lee C.: Rapid and effective method for preparation of fecal specimens for PCR assays, J Clin Microbiol, 1997; 35 (1): 281-283.
 74. MacFaddin J.: "Enterobacteriaceae y otras bacterias intestinales" en *Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Médica*, México, Ed. Médica Panamericana, 1991, pp. 258-274.
 75. McNamara BP and Donnenberg MS.: A novel proline-rich protein, EspF, is secreted from enteropathogenic *Escherichia coli* via the type III export pathway, FEMS Microbiol Letters, 1998; 166: 71-78.
 76. Meccas J and Strauss EJ.: Molecular mechanisms of bacterial virulence: Type III secretion and pathogenicity islands, Emerg Infect Dis, 1996, 2 (4): 271-288.
 77. Mitsuda T, Muto T, Yamada M, Kobayashi N, Toba M, Aihara Y, Ito A, and Yokota S.: Epidemiological study of a food-borne outbreak of enterotoxigenic *Escherichia coli* O25:NM by pulsed-field gel electrophoresis and randomly amplified polymorphic DNA analysis. J Clin Microbiol, 1998; 36 (3): 652-656.
 78. Moseley SL, Echeverria P, Seriwatana J, Tirapat C, Chaicumpa W, Sakuldaipeara T, and Falkow S.: Identification of enterotoxigenic *Escherichia coli* by colony hybridization using three enterotoxin gene probes, J Infect Dis, 1982; 145 (6): 863-869.

79. Murray BE, Mathewson JJ, Dupont HL, and Hill WE.: Utility of oligodeoxyribonucleotide probes for detecting enterotoxigenic *Escherichia coli*, J Infect Dis , 1987; 155 (4): 809-811
80. Nataro JP and Kaper JB.: Diarrheagenic *Escherichia coli*, Clin Microbiol Rev, 1998; 11: 142-201
81. Nataro JP, Hicks S, Phillips AD, Vial PA, and Sears CL.: T84 cells in culture as a model for enteroaggregative *Escherichia coli* pathogenesis, Infect Immun, 1996; 64 (1): 4761-4768.
82. Okeke IN, Lamikanra A, Steinruck H, and Kaper JB.: Characterization of *Escherichia coli* strains from cases of childhood diarrhea in provincial southwestern Nigeria. J Clin Microbiol, 2000; 38 (1): 7-12.
83. Orskov F and Orskov I.: *Escherichia coli* serotyping and disease in man and animals, Can J Microbiol, 1992; 38: 699-704.
84. Oswald E, Schmidt H, Morabito S, Karch H, Marches O, and Caprioli A.: Typing of intimin genes in human and animal enterohaemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* characterization of a new intimin variant, Infect Immun, 2000; 68 (1): 64-71.
85. Pacheco ABF, Guth BEC, Soares KCC, de Almeida DF, and Ferreira LCS.: Clonal relationships among *Escherichia coli* serogroup O6 isolates based on RAPD, FEMS Microbiol Letters, 1997; 148: 255-260.
86. Pascual DW, Hone DM, Hall S, Van Ginkel FW, Yamamoto M, Walters N, Fujihashi K, Powell RJ, Wu S, Vancott JL, Kiyono H, and McGhee JR.: Expression of recombinant enterotoxigenic *Escherichia coli* colonization factor antigen I by *Salmonella Typhimurium* elicits a biphasic T helper cell response, Infect Immun, 1999; 67 (12): 6249-6256
87. Peruski LF Jr, Kay BA, El-Yazeed RA, El-Etr SH, Cravioto A, Wierzba TF, Rao M, El-Ghorab N, Shaheen H, Khalil SB, Kamal K, Wasfy MO, Svennerholm A, Clemens JD, and Savarino SJ.: Phenotypic diversity of enterotoxigenic *Escherichia coli* strains from a community-based study of pediatric diarrhea in Periuban Egypt, J Clin Microbiol, 1999; 37 (9): 2974-2978.
88. Polotsky Y, Nataro JP, Kotler D, Barrett TJ, and Orenstein JM.: Hep-2 cell adherence patterns, serotyping, and DNA analysis of *Escherichia coli* isolates from eight patients with AIDS and chronic diarrhea, J Clin Microbiol, 1997; 35 (8): 1952-1958.
89. Qadri F, Das SK, Fauque ASG, Fuchs GJ, Albert MJ, Sack RB, and Svennerholm A.: Prevalence of toxin types and colonization factors in

enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated during a 2-year period from diarrheal patients in Bangladesh, *J Clin Microbiol*, 2000; 38 (1): 27-31

90. Reid SD, Betting DJ, and Whittam TS.: Molecular detection and identification of intimin alleles in pathogenic *Escherichia coli* by multiplex PCR, *J Clin Microbiol*, 1999, 37 (8): 2179-2722.
91. Rosenshine I, Donnenberg MS, Kaper JB, and Finlay BB.: Signal transduction between enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and epithelial cells: EPEC induces tyrosine phosphorylation of host cell proteins to initiate cytoskeletal rearrangement and bacterial uptake, *EMBO J*, 1992; 11 (10): 3551-3560.
92. Rosenshine I, Ruschkowski S, Stein M, Reinscheid DJ, Mills SD, and Finlay BB.: A pathogenic bacterium triggers epithelial signals to form a functional bacterial receptor that mediates actin pseudopod formation, *EMBO J*, 1996; 15 (11): 2613-2624.
93. Rycke J de, Comtec E, Chalareng C, Boury M, Tasca C, and Milon A.: Enteropathogenic *Escherichia coli* O103 from rabbit elicits actin stress fibers and focal adhesions in HeLa epithelial cells, cytopathic effects that are linked to an analog of the locus of enterocyte effacement, *Infect Immun*, 1997; 65 (7): 2555-2563.
94. Saavedra MR.. Aplicaciones de la reacción en cadena de la polimerasa en el diagnóstico por el laboratorio de enfermedades bacterianas, México, UNAM, 1996; 19-30, 46, 57-80, 106, 129-138.
95. Sack RB.: Travelers' diarrhea: Microbiologic bases for prevention and treatment, *Rev Infect Dis*, 1990; 12 (1) : S59-S63.
96. Salyers AA and Dixie DW.: "Host defenses against bacterial pathogens: Defenses of body surfaces" y "*Escherichia coli* gastrointestinal infections", en *Bacterial pathogenesis, a molecular approach, USA*, ASM Press, 1994; pp. 3-14, 190-204.
97. Saulhier P, Chachaty E, Hilali F, and Andremont A.: Single-step polymerase chain reaction for combined gene detection and epidemiological typing in three bacterial models, *FEMS Microbiol Letters*, 1997; 150: 311-316.
98. Savarino SJ, Hall ER, Bassily S, Brown FM, Youssef F, Wierzba TF, Peruski L, El-Masry NA, Safwat M, Rao M, Mohamady HE, Abu-Elyazeed R, Naficy A, Svennerhol AM, Jertborn M, Lee YJ, and Clemens JD.: Oral, inactivated, whole cell enterotoxigenic *Escherichia coli* plus cholera toxin B subunit vaccine: results of the initial evaluation in children, *J Infect Dis*, 1999; 179 (1). 107-114.

99. Scaletsky ICA, Pedrosa MZ, and Fagundes-Neto U: Attaching and effacing enteropathogenic *Escherichia coli* O18ab invades epithelial cells and causes persistent diarrhea, *Infect Immun*, 1996; 64 (11): 4876-4881.
100. Sperandio V: Taking the host-cell hostage, *Trends Microbiol*, 2000; 8 (4): 160.
101. Stacy-Phipps S, Mecca JJ, and Weiss JB.: Multiplex PCR assay and simple preparation method for stool specimens detect enterotoxigenic *Escherichia coli* DNA during course of infection, *J Clin Microbiol*, 1995; 33 (5): 1054-1059.
102. Steffen R.: Worldwide efficacy of bismuth subsalicylate in the treatment of travelers' diarrhea, *Rev Infect Dis*, 1990; 12 (1): S80-S85
103. Stein M, Kenny B, Stein MA, and Finlay BB.: Characterization of EspC, a 110-kilodalton protein secreted by enteropathogenic *Escherichia coli* which is homologous to members of the immunoglobulin A protease-like family of secreted proteins, *J Bacter*, 1996; 178 (22): 6546-6554.
104. Stevens CD.: "Precipitation reactions, agglutination, and labeled immunoassays" en *Clinical Immunology and Serology, A Laboratory Perspective*, USA, F. A. Davis Company, 1996; pp. 11-121, 126-136, 146-155
105. Svennerholm A and Wiklund G.: Rapid GM1-enzyme-linked immunosorbent assay with visual reading for identification of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin, *J Clin Microbiol*, 1983; 17 (4): 596-600
106. Svennerholm A, Wikström M, Lindblad M, and Holmgren J.: Monoclonal antibodies against *Escherichia coli* heat-stable toxin (Sta) and their use in a diagnostic ST ganglioside GM1-enzyme-linked immunosorbent assay, *J Clin Microbiol*, 1986; 24 (4): 585-590.
107. Taylor KA, Luther PW, and Donnenberg MS.: Expression of the EspB protein of enteropathogenic *Escherichia coli* within HeLa cells affects stress fibers and cellular morphology, *Infect Immun*, 1999; 67 (1): 120-125.
108. Taylor KA, O'Connell C, Luther PW, and Donnenberg MS.: The EspB protein of enteropathogenic *Escherichia coli* is targeted to the cytoplasm of infected HeLa cells, *Infect Immun*, 1998; 66 (11): 5501-5507.
109. Tobe T, Hayashi T, Han Ch, Schoolnik GK, Ohtsubo E, and Sasakawa Ch.: Complete DNA sequence and structural analysis of the enteropathogenic *Escherichia coli* adherence factor plasmid, *Infect Immun*, 1999; 67 (10): 5455-5462.

110. Tobe T, Tatsuno I, Katayama E, Wu C, Schoolnik GK, and Sasakawa C. A novel chromosomal locus of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), which encodes a *bfp7*-regulated chaperone-like protein, TrcA, involved in microcolony formation by EPEC, *Mol Microbiol*, 1999, 33 (4) 741-752.
111. Torregrosa L, Santos JI, Rodríguez RS, Velásquez L, García JA y Alpuche CM.: *Enfermedades diarreicas en el niño*, 10ª ed., México, Interamericana Mc-Graw-Hill, 1996; 1-18, 24-31, 39-49, 83-95, 163-179, 276-283, 331-344, 410-417, 430-435.
112. Tsen HY, and Jian LZ.: Development and use of multiplex PCR system for the rapid screening of heat labile toxin I, heat stable toxin II and shiga-like toxin I and II gen of *Escherichia coli* in water, *J Appl Microbiol*, 1998; 84 (4):585-92.
113. Viboud GI, Jouve MJ, Binsztein N, Vergara M, Rivas M, Quiroga M, and Svennerholm A.: Prospective cohort study of enterotoxigenic *Escherichia coli* infections in argentinean children, *J Clin Microbiol*, 1999; 37 (9): 2829-2833.
114. Vigilancia Epidemiológica Semana 1: del 1-8 de enero del 2000. Sistema único de información para la vigilancia epidemiológica. Información preliminar. Procesada por DGE (Cuadros 6, 8 y 8.2)
115. Wainwright LA, Kaper JB.: EspB and EspD require a specific chaperone for proper secretion from enteropathogenic *Escherichia coli*, *Mol Microbiol*, 1998; 27 (6): 1247-1260.
116. Warawa J, Finlay BB, and Kenny B.: Type III secretion-dependent hemolytic activity of enteropathogenic *Escherichia coli*, *Infect Immun*, 1999; 67 (10): 5538-5540.
117. Watcher C, Beinke C, Mattes M, and Schmidt MA.: The tip of a molecular syringe: Response, *Trends Microbiol*, 1999; 7 (9): 343.
118. Watson JD, Gilman M, Witkowski J, and Zoller M.: *Recombinant DNA*, 2a ed., USA, Scientific American Books, 1998; 79-98, 127-130.
119. Yauson M, Parath N, Ochoa O, Dagon R, Orni-Wasserlouw R, and Cohen D.: Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* in stool specimen by PCR, *Diagn Microbiol Infect Dis*, 1998; 31 (4): 503-509.
120. "Group 5: Facultatively anaerobic gram-negative rods" en *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9a ed., USA, Williams & Wilkins, 1993; pp. 179, 180, 233 y 234.