

45



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"

ESTANDARIZACIÓN DE PCR Y SONDA PARA DIAGNÓSTICO DE *Escherichia coli* ENTEROAGREGATIVA (EAggEC)

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUIMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A:
PATRICIA PALACIO FRAUSTO

U N A M
F E S
Z A R A G O Z A



ASESORES: M.en C. MARÍA GUADALUPE RODRÍGUEZ ANGELES
Q.F.B. ROBERTO CRUZ GONZÁLEZ MELÉNDEZ

MÉXICO D.F.

2002.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

PAGINACION DISCONTINUA



SECRETARÍA NACIONAL
DE EDUCACIÓN
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"

JEFATURA DE LA CARRERA DE QUÍMICO
FARMACÉUTICO BIÓLOGO

ASUNTO: ASIGNACION DE SINODALES

ESTIMADOS MAESTROS:

La Dirección de la Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza", ha nombrado a ustedes como Sinodales del Examen Profesional del (la) señor (ita):

PALACIO FRAUSTO PATRICIA

para obtener el Título de Químico Farmacéutico Biólogo.

Les agradeceré se sirvan revisar el trabajo escrito intitulado: Estandarización de PCR y sonda para diagnóstico de *Escherichia coli* enteroagregativa (EAggEC).

Y asistir en la fecha que después se les hará saber al Examen de Recepción Profesional.

PRESIDENTE Dra. Teresa Corona Ortega.
VOCAL M. en C. Ma. Guadalupe Rodríguez Angeles
SECRETARIO Q.F.B. Roberto Cruz González Meléndez.
SUPLENTE Q.F.B. Georgina Rios Olivera.
SUPLENTE Q.F.B. Raquel Retana Ugalde.

M. Guadalupe Rodríguez Angeles

R. Cruz González Meléndez

G. Rios Olivera

R. Retana Ugalde

ATENTAMENTE.
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
México, D.F. a, 15 de Noviembre del 2001.

R. Cruz González Meléndez

Q.F.B. ROBERTO CRUZ GONZÁLEZ MELÉNDEZ
JEFE DE LA CARRERA

c.c.p Departamento de Control de Egresados
c.c.p Interesado

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Bacteriología Molecular del Instituto de Diagnóstico y Referencias Epidemiológicas (InDRE), bajo la dirección de la M. en C. María Guadalupe Rodríguez Angeles y la asesoría del Q. F. B. Roberto Cruz González Meléndez de la Facultad de Estudios Superiores " Zaragoza " .

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

AGRADECIMIENTOS

A Dios

por estar siempre presente en mi vida

A mis Padres

Aleonso Palacio Jáquez y
Ana Ma. Frausto Loperena

por haberme brindado todo su apoyo, cariño y confianza en todo momento y a quienes dedico en especial este proyecto

A mis Hermanas

Iliana y Berenice por su generosidad

A Lupita Rodríguez

por ser una gran persona,
a quien le doy las gracias por su apoyo y dedicación en la asesoría de este proyecto

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**A Chucho, Ale, Ili, Pili y todas las demás personas
del laboratorio de Biología molecular (InDRE)**

por su ayuda y amistad

Al Q.F.B. Roberto C. González

por su asesoría

A mi primo Miguel, a mi tía y a la familia Zavala R.

por su apoyo

Y a todos mis amigos

Edgar Rodríguez, Lupita Rincón, Coral Lozano, Carolina Hernández, Ma. Elena Guizar,
Edith Robles, Deneb Dávalos, Ricardo Colunga, Silvia Ugalde, Rosa Balderas, etc.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

INDICE	Páginas
Índice de tablas	i
Índice de figuras	ii
Abreviaturas	iii
Resumen	vi
I. Introducción	1
II. Marco Teórico	
2.1 Generalidades de la <i>Escherichia coli</i>	3
2.2 Mecanismos de patogenicidad	3
2.3 Clasificación de cepas de <i>Escherichia coli</i>	4
2.4 Características de los diferentes grupos patógenos de <i>E. coli</i>	7
2.4.1 <i>E. coli</i> enteropatógena (EPEC)	7
2.4.2 <i>E. coli</i> enterotoxigénica (ETEC)	9
2.4.3 <i>E. coli</i> enteroinvasiva (EIEC)	12
2.4.4 <i>E. coli</i> enterohemorrágica (EHEC)	13
2.4.5 <i>E. coli</i> enterodifusa (ADEC)	15
2.4.6 <i>E. coli</i> enteroagregativa (EAaggEC)	15
2.5 Técnicas de biología molecular	21
III. Planteamiento del problema	26
IV. Objetivos	27
V. Hipótesis de trabajo	28
VI. Material y métodos	29
VII. Resultados	45
VIII. Discusión	64

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

IX.	Conclusiones	70
X.	Anexo	71
XI.	Glosario	74
XII.	Bibliografía	75

**TESIS COM
FALLA DE ORIGEN**

Índice de tablas**Págs.**

Tabla 1.	Características de los grupos de <i>Escherichia coli</i> causantes de diarrea	5
Tabla 2.	Procedimientos empleados para la identificación de los grupos patógenos de <i>Escherichia coli</i>	20
Tabla 3.	Condiciones para PCR, variando la concentración de los iniciadores	37
Tabla 4.	Condiciones para PCR, variando el volumen de: MgCl ₂ , dNTP's y Taq polimerasa	38
Tabla 5.	Nomenclatura habitualmente utilizada cuando se aplica el Teorema de Bayes	44
Tabla 6.	Condiciones empleadas para la PCR de <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa	46
Tabla 7.	Cepas de <i>Escherichia coli</i> que se estudiaron por colony blot y PCR	47
Tabla 8.	Relación entre pruebas moleculares y cuadros clínicos para EAEC	50
Tabla 9.	Datos obtenidos por colony blot a los cuales se les aplico el Teorema de Bayes	52
Tabla 10.	Datos obtenidos por PCR a los cuales se les aplico el Teorema de Bayes	53
Tabla 11.	Distribución de EAEC que presentaron colony blot o / y PCR positivos por grupo etéreo	54
Tabla 12.	Distribución de EAEC según el sexo del paciente	55
Tabla 13.	Efectos de adherencia para <i>Escherichia coli</i> según las técnicas moleculares empleadas	56
Tabla 14.	Cepas de EAEC confirmadas por el patrón de adherencia agregativa en células HEP-2 que se presentaron en algunos estados de la República Mexicana	62

Índice de figuras**Págs.**

Figura 1.	Representación de los mecanismos de patogenicidad de los diferentes grupos de <i>Escherichia coli</i> : enterotoxigénica (ETEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroagregativa (EAEC), enterodifusa (ADEC), enteropatógena (EPEC) y enteroinvasiva (EIEC)	6
Figura 2.	Micrografía de la adherencia a células HEP-2 infectada con la cepa testigo 22254. Tinción de Giemsa, aumento 40X	16
Figura 3.	Diagrama de flujo de la técnica de Colony blot	35
Figura 4.	Diagrama de flujo de la técnica de PCR	36
Figura 5.	Diagrama de flujo de la técnica de adherencia en células HEP-2	41
Figura 6.	Membrana de nylon con cepas de <i>Escherichia coli</i> sometidas a hibridación por la técnica de "colony blot"	48
Figura 7.	Productos amplificados de PCR en cepas de <i>Escherichia coli</i> agregativa aisladas de pacientes con diarrea	49
Figura 8.	Micrografía de la adherencia a células HEP-2 infectadas con la cepa testigo negativo. Tinción de Giemsa, aumento 40X	57
Figura 9.	Micrografía de la adherencia a células HEP-2 infectadas con una cepa de EAEC sonda positiva y PCR positiva, mostrando adherencia agregativa. Tinción de Giemsa, aumento 40X	58
Figura 10.	Micrografía de la adherencia a células HEP-2, infectadas con una cepa de EAEC, pero con adherencia difusa. Tinción de Giemsa, aumento 40X	59
Figura 11.	Micrografía de la adherencia a células HEP-2, infectadas con EAEC con adherencia localizada. Tinción de Giemsa, aumento 40X	60
Figura 12.	Distribución de <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa con patrón de adherencia agregativa en México	63

ABREVIATURAS:

- AA: adherencia agregativa
- AAF: "adherent-aggregative-fimbrial"; fimbria de la adherencia agregativa
- ADEC: *E. coli* enterodifusa
- ADN: ácido desoxirribonucleico
- A/E: adherencia y esfacelación
- A, T, G, C: adenina, timina, guanina, citosina
- BAB: agar base sangre
- BCIP: 5-bromo-4-cloro-indoilfosfato
- BFP: bundle-forming-pilus; pili en forma de rizo
- cAMP: adenosin monofosfato cíclico
- CFA: factor de colonización antigénico
- cGMP: guanosin monofosfato cíclico
- CHO: células de ovario de hámster chino
- CO₂: dióxido de carbono
- dNTP's: adenina, guanina, citosina, timina
- EAEC ó EAggEC: *E. coli* enteroagregativa
- EAF: factor de adherencia de *E. coli*
- EHEC: *E. coli* enterohemorrágica
- EIEC: *E. coli* enteroinvasiva
- EPEC: *E. coli* enteropatógena
- ETEC: *E. coli* enterotoxigénica
- g : gramos

- HeLa : células de carcinoma de cervix
- HEp-2: células de carcinoma laríngeo
- *hlyA*: gene de la hemolisina
- IMVIC: indol, movilidad, Voges-Proskauer, citrato
- kDa: kilodaltones
- LT: toxina termolábil
- mDa: megadaltones
- MEM: medio mínimo esencial
- $MgCl_2$: cloruro de magnesio
- mL: mililitros
- μL : microlitros
- NaOH: hidróxido de sodio
- NBT: nitro azul de tetrazolio
- NMF: nefelómetro de Mc Farland
- pb: pares de base
- PCR: reacción en cadena de la polimerasa
- PES: penicilina-estreptomicina
- PMN: polimorfonucleares
- PTT: púrpura trombocitopénica
- RNA: ácido ribonucleico
- SLT: "Shiga like toxin"
- SLTX: "Shiga like toxin", semejante a la producida por *Shigella dysenteriae* tipo 1
- SSC: solución salina citratos
- SSF: solución salina fisiológica

- ST: toxina termoestable
- STX: "Shiga like toxins" producidas por *E. coli*
- SUH: síndrome urémico hemolítico
- TBE: tris base-ácido bórico-EDTA disódico
- Tris: tris-hidroximetil amino metano
- TSB: caldo de soya tripticaseína
- U.V.: ultravioleta
- VTEC: *E. coli* productora de verotoxina
- Y1: células de tumor adrenal

RESUMEN

Escherichia coli es una bacteria de flora normal, existen clonas capaces de causar cuadros de diarrea. En la actualidad se reconocen seis grupos patógenos: enterotoxigénico (ETEC), enteropatógeno (EPEC), enteroinvasivo (EIEC), enterohemorrágico (EHEC), enteroagregativo (EAEC) y enterodifuso (ADEC). Específicamente para el grupo de EAEC, se han descrito varias técnicas moleculares para su identificación.

Por lo anterior, el objetivo del presente estudio fue estandarizar y comparar las técnicas moleculares de PCR y "colony blot" para el diagnóstico de *Escherichia coli* enteroagregativa, utilizando el ensayo de adherencia en células HEP-2 como referencia para determinar el patrón de adherencia agregativo.

Se estudiaron 500 cepas de *E. coli* aisladas de casos de diarrea en México, durante 8 meses, previamente negativas a los grupos ETEC, EPEC, EIEC y EHEC por colony blot. Las cepas se sometieron como ensayo de escrutinio a hibridación en fase sólida por el método de colony blot con la sonda elaborada marcada con digoxigenina específica para EAEC, posteriormente se buscó por PCR la presencia del gene que codifica para la fimbria involucrada en la adherencia agregativa, obteniéndose un fragmento de amplificación de 630 pares de bases (pb).

Del grupo de cepas que se estudiaron, 193 fueron positivas a colony blot. Al ser sometidas a PCR sólo 69 cepas amplificaron el fragmento de 630 pb. En el ensayo de adherencia sólo 48 presentaron adherencia agregativa.

El síntoma que se encontró con mayor frecuencia fue la diarrea, principalmente en niños menores de un año.

En conclusión, la técnica de PCR fue más rápida y específica pero colony blot, fue más sensible por lo que es necesario contar con una técnica de diagnóstico que permita conocer la distribución e importancia de EAEC como agente etiológico de los casos de diarrea en México. También, en el futuro las pruebas de diagnóstico molecular más útiles serán aquellas que puedan probar simultáneamente más de un organismo, como lo es la PCR múltiplex, siendo el único inconveniente, para laboratorios pequeños, el costo de reactivos, patentes, equipo y espacios para realizar la pre y postamplificación.

I. INTRODUCCIÓN

Una amplia gama de patógenos microbianos pueden infectar el tracto gastrointestinal. Se adquieren por vía fecal-oral a partir de alimentos, líquidos o manos contaminados con heces. Para que se produzca la infección, los patógenos deben ser ingeridos en número adecuado y poseer atributos particulares para eludir las defensas del tracto gastrointestinal y llegar al intestino. Allí permanecen localizados y causan enfermedad a consecuencia de su multiplicación mediante la producción de toxinas, invasión de la mucosa intestinal, para alcanzar los ganglios linfáticos o el torrente sanguíneo¹

Los efectos de las infecciones del tracto gastrointestinal van desde el episodio diarreico leve y autolimitado hasta la diarrea grave, a veces mortal. Pueden existir vómitos, fiebre y malestar general. La diarrea es el resultado de un aumento en la pérdida de líquidos y electrolitos hacia la luz intestinal, que da lugar a heces líquidas o no formadas. Ésa es la manifestación más común de la infección del tracto gastrointestinal, y puede considerarse como un mecanismo mediante el cual el huésped provoca o induce la expulsión del patógeno.

El síndrome diarreico es una causa importante de morbilidad y mortalidad en el mundo subdesarrollado, sobre todo entre los niños pequeños. En los países desarrollados sigue siendo un trastorno muy común, pero de modo habitual leve y autolimitado, excepto en los sujetos muy jóvenes, ancianos o inmunocomprometidos.

Los patógenos intestinales como bacterias y virus se encuentran en todo el mundo, pero algunos, tienen una distribución geográfica más limitada. Sin embargo, tales infecciones pueden ser adquiridas por las personas que viajan a las áreas endémicas e importadas por ellas a sus países de origen. Por tal motivo dentro de las bacterias que han sido más estudiadas a este respecto se encuentra la *Escherichia coli*; siendo uno de los patógenos bacterianos más versátiles¹

Esta bacteria es el principal habitante del intestino grueso y es única entre los microorganismos que integran la flora normal por cuanto también es el patógeno humano aislado con mayor frecuencia como agente causal de infecciones de las vías urinarias y de heridas. Los últimos estudios han demostrado que ciertas cepas de *E. coli* también son patógenos intestinales importantes que causan una amplia variedad de enfermedades gastrointestinales². Para *E. coli* se han descrito seis grupos patógenos enterotoxigénico (ETEC), enteropatógeno (EPEC), enterohemorrágico (EHEC), enteroinvasivo (EIEC), enterodifuso (ADEC) y enteroagregativo (EAEC), de estos dos últimos grupos se sabe poco ya que son los que se han descrito más recientemente.

E. coli patógena se ha diagnosticado por métodos tradicionales como modelos animales o "in vitro" empleando células HEP-2, Vero, CHO o HeLa, por serología o pruebas inmunológicas como ELISA y actualmente por técnicas de biología molecular como hibridación en fase sólida "Colony blot" o en fase líquida como PCR³

Al estandarizar un nuevo método que se empleará en el diagnóstico se debe comparar con el método de referencia que en el caso de EAEC es el patrón de adherencia agregativo.

II. MARCO TEORICO

2.1 GENERALIDADES DE LA *Escherichia coli*

El género *Escherichia* incluye a la especie, *Escherichia coli*, son bacilos gramnegativos, de 2 – 4µm de longitud por 0.4 – 0.6µm de ancho, móviles, fermentan la lactosa (bacilos coliformes) y la glucosa, con producción de gas y ácidos diversos y que presentan una respuesta característica al grupo de pruebas IMVIC (+ + - -)⁴

Son poco exigentes en sus necesidades nutritivas y relativamente resistentes a los agentes externos, se cultivan en medios comunes e incluso a temperaturas de 45° C lo que permite diferenciarlos de los demás coliformes⁵

Forman la mayor parte de la flora comensal aerobia y anaerobia facultativa del tubo digestivo y se eliminan por las heces al exterior.

Pueden intervenir en procesos patológicos como patógenos verdaderos en la producción de cuadros intestinales con diarrea o como oportunistas en infecciones extraintestinales diversas, que también pueden ser producidas por otras enterobacterias⁴

2.2 Mecanismos de Patogenicidad

Las cepas causantes de enfermedad diarreica lo hacen por mecanismos de patogenicidad distintos:

- 1) Adherencia, indispensable para que la bacteria pueda acercarse, pegarse y colonizar el epitelio de ciertas áreas del intestino.

- 2) Producción de proteínas bacterianas (toxinas), liberadas una vez que la bacteria ha colonizado el intestino y con un efecto final en la estimulación de la secreción de agua y electrolitos.
- 3) Invasión y reproducción bacteriana dentro del citoplasma de las células epiteliales del intestino, lo cual permite a las bacterias evadir los mecanismos de protección del hospedero una vez que se encuentran en el interior de la célula.

2.3 Clasificación de cepas de *Escherichia coli*

Las cepas *E. coli* asociadas con procesos diarreicos inicialmente fueron clasificadas en cuatro grupos: enteropatógena, enterotoxigénico, enteroinvasiva y enterohemorrágica. En la tabla 1 se hace un resumen de las características para clasificar a las cepas de *E. coli* en los grupos mencionados. Actualmente están en estudio dos grupos más: enteroagregativa y enterodifusa³

En la figura 1, se representa esquemáticamente un resumen de los principales mecanismos de patogenicidad de cada grupo patógeno, los cuales se describirán más ampliamente a continuación.

Tabla 1. Características de los grupos de *Escherichia coli* causantes de diarrea

Grupo	Síndromes clínicos	Síndromes epidemiológicos	Serogrupos "O" más comunes	Mecanismos de patogenicidad	DNA asociado
Enterotoxigénico (ETEC)	Diarrea acuosa	Diarrea en niños en países en desarrollo. Diarrea del viajero (adultos)	8,15,20,25, 27,63,78,80, 85,115,128, 148,159	Se adhiere por medio de fimbrias CFAI, CFAII y toxinas LT, ST	30-75 mDa (plásmido)
Enteroinvasiva (EIEC)	Diarrea con moco y sangre (disentería)	Afecta adultos principalmente, a veces brotes por alimentos contaminados	28,112,124, 136,143,144 147,152,164	Invade y se multiplica en enterocitos; inflamación por PMN, producción de citotoxinas	140 mDa plásmido
Enterohemorrágica (EHEC)	Diarrea aguda y crónica en niños	Brotos de alimentos contaminados	157	Se adhiere al enterocito por fimbrias, síntesis de hemolisina, toxina SLT	Fagos lisogénicos, plásmido de hemolisina
Enteropatógena (EPEC)	Diarrea aguda y crónica en niños	Brotos de diarrea en cuneros, diarrea epidémica y esporádica en comunidades, es rara en adultos.	26,55,86,111, 114,119,125, 126,127,128, 142	Se adhiere íntimamente a enterocitos y destruye microvellosidades, efecto de adherencia y esfacelación	55-60 mDa plásmido de EAF
Enterodifusa (ADEC)	Diarrea	Diarrea en niños entre 1 a 5 años	86,111,127	Se adhiere por medio de la fimbria F1845	
Enteroagregativa (EAEC)	Diarrea acuosa persistente	Diarrea esporádica	3,15,44,77,86,111,127	Estimulación de moco, efecto citotóxico, EAST1	Plásmido 60Mda

Modificado de: Eslava C et al³

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

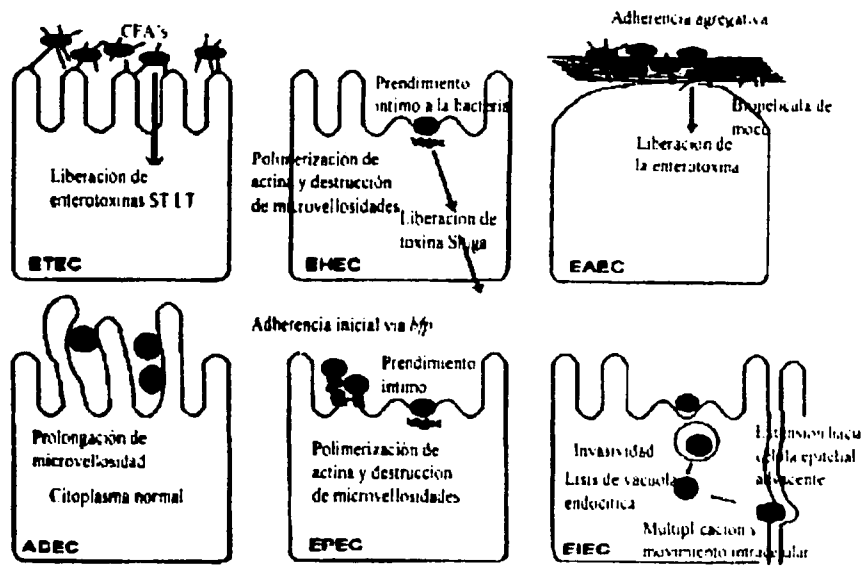


Figura 1. Representación de los mecanismos de patogenicidad de los diferentes grupos de *Escherichia coli*: enterotoxigénica (ETEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroagregativa (EAEC), enterodifusa (ADEC), enteropatógena (EPEC) y enteroinvasiva (EIEC).

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

2.4 Características de los diferentes grupos patógenos de *E. coli*.

2.4.1 *E. coli* enteropatógena (EPEC).

Fue el primer grupo de *E. coli* patógeno causante de diarrea que se describió. Se adhieren a la membrana del enterocito de manera íntima con destrucción de las vellosidades intestinales⁶. Cravioto et al⁷ publicaron en 1979 un estudio sobre la capacidad de EPEC para adherirse en forma íntima a células eucarióticas en cultivo y encontraron que el 80% de una colección importante de cepas EPEC formaban microcolonias sobre el citoplasma de células HEP-2. Otros estudios demostraron que existían cuando menos tres tipos de adherencia de *E. coli* a células HEP-2: 1) localizada, caracterizada por la formación de microcolonias en el citoplasma de las células; 2) difusa, cuando las bacterias se adherían a todo el citoplasma celular y 3) agregativa, cuando las bacterias formaban acúmulos tanto en la superficie celular como sobre el vidrio de la preparación. Las bacterias que presentan los dos últimos patrones constituyen los dos grupos recientemente descritos^{8,9}

La adhesión a células HEP-2 fue descrita primero por Cravioto et al⁷ para EPEC. Baldini et al¹⁰ mostró que la cepa de EPEC E23448/69 (O127:H6) tiene la habilidad de presentar una adherencia localizada la cual es dependiente de la presencia de un plásmido de 60-MDa. Este plásmido se designó como el factor de adhesión para EPEC (EAF) y un fragmento de 1-kb de esta región se utilizó para desarrollar una sonda de ADN para el diagnóstico¹¹

La característica de las infecciones por EPEC es la histopatología de la adherencia y esfacelación (A/E), la cual se puede observar en biopsias intestinales de pacientes y animales infectados que pueden ser reproducidas en cultivo celular¹²

Este fenotipo parece estar caracterizado por la adherencia íntima entre la bacteria y la membrana de la célula epitelial de la microvellosidad¹³

El citoesqueleto adquiere cambios marcados, incluyendo la acumulación de actina polimerizada, que se ve directamente por debajo de la bacteria. La bacteria algunas veces se deposita o coloca sobre un ligero pedestal o estructura de cáliz¹⁴. Esta estructura en forma de pedestal o cáliz puede extenderse desde 10µm sobre la estructura epitelial en forma de pseudópodos. Esta lesión es completamente diferente a la histopatología causada por la ETEC y *V. cholerae*, en las cuales los organismos no se adhieren íntimamente y no se adhieren a las microvellosidades ni polimerizan la actina¹⁵

Moon et al¹⁶ fue quien asoció fuertemente este fenotipo con EPEC y le dio el nombre de adherencia y esfacelación.

Así es como las cepas de EPEC son el prototipo perfecto de las bacterias entéricas patógenas que producen lesión A/E en las células epiteliales¹⁷, existen múltiples pasos que involucran la producción de la lesión histopatológica A/E característica. En 1992 Donnerberg y Kaper¹⁸, propusieron tres pasos en la patogénesis de EPEC: 1) adherencia localizada, 2) señal de transducción y 3) adherencia íntima. La secuencia de estos eventos es incierta y seguramente, algunos eventos pueden ocurrir conjuntamente. Sin embargo, estos modelos pueden aportar avances a la investigación de la patogénesis de EPEC.

El factor involucrado en la adhesión localizada se describió en 1991 por Giron et al¹⁹ quién observó una fimbria de 7nm de diámetro producida por cepas de EPEC que

tienden a agregar y formar haces ondulados, recibiendo el nombre de "bundle-forming-pilus" (BFP), esta fimbria sólo se produce bajo ciertas condiciones de cultivo.

BFP está relacionada con la adhesión de bacteria a bacteria en el modelo de adherencia localizada, más no hay ninguna prueba definitiva que BFP este involucrada con la adhesión real a las células del epitelio.

Los brotes gastrointestinales se presentan fundamentalmente en los lactantes y niños pequeños durante los meses de verano en forma de brotes epidémicos en las salas de los hospitales y maternidades, con una mortalidad elevada⁵

2.4.2 *E. coli* enterotoxigénica (ETEC)

Posee fimbria o factores de colonización antigénicos (CFA) por los que la bacteria se une a receptores específicos de la membrana de la célula intestinal, donde la bacteria produce dos enterotoxinas potentes: la termolábil (LT) y la termosestable (ST).

La enterotoxina termolábil LT es una proteína de elevado peso molecular (85 000 a 87 000 kDa), similar en estructura química, función y antigenicidad a la toxina producida por *Vibrio cholerae* O1. Estructuralmente la toxina esta compuesta por la subunidades A y B.

El incremento de los niveles de cAMP intracelular provoca que las células de las criptas intestinales aumenten la secreción de agua y electrolitos con una consecuente disminución en la absorción en las vellosidades. Ambos eventos conducen a un incremento en la secreción de líquidos a nivel del lumen intestinal que clínicamente se manifiesta como diarrea³

La enterotoxina ST, estructuralmente es un péptido de bajo peso molecular (1,000 a 6,000 kDa), no es inmunogénica, soluble en metanol y como su nombre lo sugiere es resistente al calentamiento^{20,21}. Aún no ha sido posible evidenciar como se pega la toxina a la membrana y penetrar al citoplasma del enterocito, sin embargo lo que si se conoce es que incrementa los niveles de GMP cíclico al estimular la guanilato ciclasa²⁰

Los mecanismos por los que las cepas de ETEC se adhieren y colonizan la mucosa intestinal han sido un asunto de investigación intensiva. Para causar diarrea, las cepas de ETEC deben adherirse primero al enterocito del intestino delgado, mediado por una fimbria en la superficie (también llamado pili). Existe un gran número de antígenos de fimbria de ETEC, aunque algunas cepas tienen que ser identificadas todavía. Claramente la heterogeneidad del antígeno conferida por la existencia múltiple de antígenos de la fimbria es un obstáculo para el desarrollo de una vacuna eficaz.

La terminología del CFA es confusa. Sin embargo, se ha propuesto un esquema uniforme que numera cada CFA consecutivamente según el año de su descripción inicial²²; el número sería precedido por las iniciales CS.

Los CFAs pueden subdividirse según sus características morfológicas en tres variedades morfológicas principales: estructuras rectas y rígidas, estructuras formadoras de rizos, y las estructuras flexibles delgadas. CFA/I, es el prototipo de la fimbria recta y rígida, está compuesto de una sola proteína firme²³. CFA/III es un pilus con forma rizada homólogo al tipo IV de la familia de fimbrias²⁴. CFA/II y CFA/IV están compuestos de estructuras de fimbrias distintas múltiples: productores de CFA/II expresan la CS3 que es una estructura flexible solo o en asociación con los CS1 o CS2²⁵; las cepas productoras de CFA/IV expresan CS6 junto con CS4 o CS5²⁶. Los estudios epidemiológicos sugieren que

CFA/I, CFA/II ó CFA/IV son expresados por aproximadamente el 75% de ETEC humanas a nivel mundial²⁷. Una fimbria de ETEC recientemente descrita, designada Longus, se ha encontrado en una gran proporción de ETEC humana^{28,29}

El pili estructural normalmente es el inmunogeno predominante y está sujeto a la presión del antígeno.

El grupo ETEC es la causa de gastroenteritis infantiles, en los países en vías de desarrollo, especialmente en los menores de 2 años y con menos frecuencia en los adultos, específicamente en los viajeros que visitan estos países⁵

Las pruebas más frecuentes para poner de manifiesto las toxinas de ETEC son:

Asa ligada, que consiste en hacer una cirugía en el intestino delgado de conejo de Nueva Zelanda, en donde se forman pequeñas porciones que se ligan con hilo quirúrgico y en las cuales se deposita sobrenadante de cultivo de cepas ETEC libres de microorganismos, en donde esta presente la toxina. La prueba se considera positiva cuando hay acumulación de líquido en el asa.

ELISA, la cual consiste en pegar a una fase sólida el receptor celular para posteriormente unir el sobrenadante a continuación se adiciona una antitoxina y la reacción antígeno-anticuerpo se hace con un anti-anticuerpo conjugado a una enzima, después se coloca el sustrato de la enzima y un cromógeno para desarrollo de color en las muestras positivas.

Para la prueba de toxigenicidad en cultivo celular, se prepara una microplaca de 96 pozos con monocapas confluentes de células Vero y CHO a las cuales se les deposita sobrenadante de cultivos de ETEC. El efecto se presenta como alargamiento y se considera efecto citotónico³

2.4.3 *E. coli* enteroinvasiva (EIEC).

Las cepas EIEC tienen características de patogenicidad, bioquímicas y genéticas relacionadas con *Shigella spp*, ya que generalmente en las pruebas bioquímicas resultan ser lisina descarboxilasa negativas, no móviles y lactosa negativas³⁰

En lo que respecta a su mecanismo de patogenicidad, la forma precisa para describir a las cepas EIEC, no está bien elucidado, sin embargo, la patogénesis estudiada para EIEC sugiere factores de patogenicidad que son virtualmente idénticos a los de *Shigella spp*³¹

Ambos microorganismos al invadir y colonizar el epitelio han mostrado un fenotipo regulado por un plásmido y un loci cromosomal denominado *ial*. También elaboran una enterotoxina secretora y esta puede jugar un papel importante en la patogénesis de la diarrea³²

El modelo que se sugiere comprende la penetración a la célula epitelial, lisis de la vacuola endocítica, multiplicación intracelular con un movimiento direccional a través del citoplasma, y extensión hacia la célula epitelial adyacente³³. Cuando la infección es severa, esta sucesión de eventos origina una reacción inflamatoria fuerte que se manifiesta como ulceración severa en el sitio de infección para *Shigella* y EIEC que es la mucosa del colon³⁴ *in vitro* el ensayo se realiza en monocapas de células Hela, se deposita cultivo de cepas EIEC y se deja incubando durante 4 h para demostrar la capacidad invasiva de las cepas, posteriormente las monocapas de tejido se lavan y tiñen para poder observar al microscopio, células con bacterias adentro.

Las infecciones por *Shigella* y EIEC son caracterizadas por un periodo de diarrea acuosa precedida por evacuaciones con moco y sangre. De hecho, en la mayoría de los pacientes con infección de EIEC y muchos con infección por *Shigella spp*, se presenta sólo

la diarrea acuosa. Nataro et al³² clonaron y secuenciaron un plásmido que codifica para una proteína de 63 kDa.

El papel de las enterotoxinas no está bien demostrado pero su presencia puede ser explicada por la característica de diarrea acuosa acompañada por moco y a veces por sangre atribuida a EIEC.

2.4.4 *E. coli* enterohemorrágica (EHEC).

Incluye cepas de diferentes serotipos que presentan las mismas características clínicas, epidemiológicas y patogénicas del serotipo O157:H7, considerado como el prototipo del grupo. Tzipori et al³⁵ utilizan un criterio más amplio para definir a este grupo, señalando la asociación de EHEC con la etiopatogenia de colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico. Las cepas causantes de estos cuadros clínicos tienen la capacidad para elaborar una o más citotoxinas, cuya información genética se encuentra en un fago, además está presente un plásmido EAF y uno de hemolisina (50 – 70 MDa) que en modelos animales inducen distintas lesiones en la mucosa intestinal caracterizadas por el daño de tipo A/E^{12,16,36}

Las *E. coli* productoras de verotoxinas han recibido diferentes denominaciones según la bibliografía, *E. coli* verotoxigénicas (VTEC) denominadas así por su capacidad de producir efecto citotóxico *in vitro* en células de riñón de mono verde africano (células Vero) cuyo ensayo se realiza de manera semejante al descrito previamente para ETEC, *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC), *E. coli* productoras de toxinas semejantes a shiga (SLTEC) y más recientemente se le da la denominación Shiga like toxin (SLT ó STX)^{37,38}

Existen dos tipos de verotoxinas VT1 ó SLTXI y diversas variantes de VT2 ó SLTII, SLTX2, tales como la VT2vha y la VT2vhb. Si bien la VT2 y sus variantes también son consideradas "shiga like toxins" sus actividades biológicas no son neutralizadas con un antisuero para la toxina shiga³⁸

Las verotoxinas son liberadas en el intestino y después de absorberse, pasan a la sangre causando lesiones en el endotelio vascular. Inducen una coagulación intravascular local y una acumulación de fibrina en el sistema nervioso central, en el tubo digestivo y en los riñones³⁹. Todo esto puede conducir a un daño intestinal, renal, cerebral o multisistémico.

Las EHEC pueden provocar en los seres humanos: colitis hemorrágica, el síndrome urémico hemolítico (SUH), púrpura trombocitopénica (PTT), diarrea no sanguinolenta e incluso infecciones asintomáticas. La manifestación clínica más común es la colitis hemorrágica, caracterizada por un cuadro severo de dolor abdominal y diarrea sanguinolenta³⁹

En México, Cravioto et al⁴⁰ encontraron que este tipo de microorganismos sólo se relaciona con diarrea de tipo secretor leve o moderada.

El plásmido de 60 MDa comúnmente encontrado en las cepas O157:H7 contiene genes que codifican para una hemolisina⁴¹. Esta enterohemolisina está estrechamente relacionada con todas las cepas O157:H7 y distribuida en menor cantidad entre las cepas no O157:H7 productoras de STX. El gen que codifica para la hemolisina *hlyA*, se expresa generalmente en cepas de *E. coli* patógena que ocasionan síndrome urémico hemolítico⁴²

2.4.5 *E. coli* enterodifusa (ADEC).

El término “ *E. coli* enterodifusa ” fue inicialmente usado para referirse a algunas cepas de *E. coli* que se adhieren a las células HEP-2, las cuales no formaban microcolonias semejantes a EPEC. Se da entonces el descubrimiento de ADEC como un grupo independiente y potencialmente patógeno como causante de diarrea.

Los mecanismos de patogenicidad de ADEC aún no están bien determinados aunque se sugiere que la adherencia está mediada por una proteína de membrana externa de 100 kDa y una fimbria denominada F 1845; pero aún faltan más estudios al respecto⁴³

2.4.6 *E. coli* enteroagregativa (EAggEC).

Este grupo también se encontraba dentro del grupo de las EPEC, pero las observaciones realizadas por Cravioto⁷, Scaletsky⁸ y Nataro⁴⁴ permitieron diferenciar estos dos últimos grupos (ADEC y EAEC) de las EPEC. Designando el término *E. coli* enteroadherente-agregativa, después se acortó a *E. coli* enteroagregativa y abreviado EAggEC o simplemente EAEC. Actualmente se definen las cepas de EAEC como cepas que no secretan enterotoxinas LT ó ST y se adhiere a células HEP-2 en el modelo de adhesión agregativa en el cual se observa una autoaglutinación prominente de las células, sobre todo en la superficie de las células y en el vidrio⁴⁵ (Figura 2).

La patogénesis de EAEC no está bien definida, sin embargo, se ha descrito una lesión histopatológica característica y varios factores de virulencia.

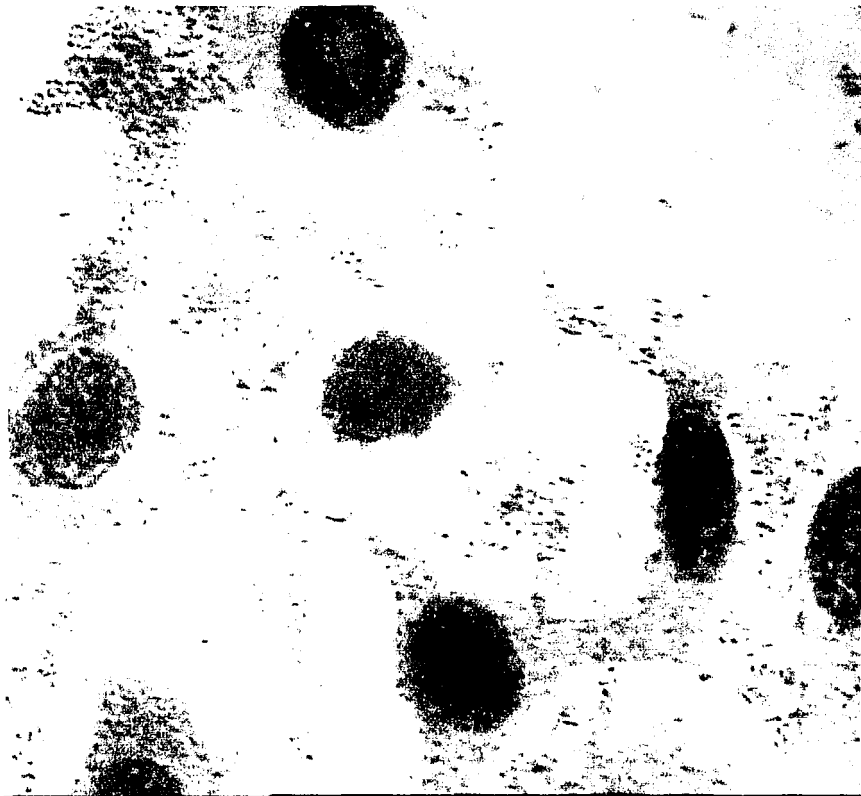


Figura 2. Micrografía de la adherencia a células HEp-2 infectadas con la cepa testigo 22254. Tinción de Giemsa, aumento 40X

Tzipori et al⁴⁶ mostraron la lesión que producía la EAEC al inocular las cepas en cerdos y aunque algunos de estos animales no experimentaron diarrea, todos desarrollaron un inusual moco gelatinoso fuertemente adherido al intestino delgado. Un minucioso examen de este moco reveló la presencia de numerosos paquetes de bacterias agregadas. Esta mucosidad no se puede considerar como un mecanismo de patogenicidad; sin embargo, la formación característica de la biopelícula de moco, proporciona evidencias que sugieren que la infección por EAEC va acompañada por un efecto citotóxico en la mucosa intestinal.

El fenotipo de adherencia agregativa (AA) de las cepas EAEC estudiado por Nataro et al⁴⁷ identificó una estructura flexible "bundle-forming- fimbrial" de 2 a 3 nm de diámetro, que designó "Adherent-Agregative-Fimbrial" (AAF/I).

La AAF/I facilita la adherencia a las células HEP-2 y la hemaglutinación en los enterocitos humanos con cepas del serotipo O17:H2. Los genes para AAF/I están organizados en dos grupos separados. El grupo I contiene un conjunto de genes que sintetizan y ensamblan la fimbria, incluyendo la unidad estructural para la misma fimbria⁴⁸. La región o grupo II codifica un activador transcripcional de AAF/I, expresión que muestra homología entre el DNA de miembros de la familia de estas proteínas. Una segunda fimbria designada (AAF/II) es morfológica y genéticamente distinta a lo que se ha identificado sobre AAF/I. Los genes que sintetizan AAF/II también son organizados en dos regiones, sin embargo la subunidad de la fimbria está separada por más de 15 kb del racimo de gen requerido en este caso⁴⁹

Existe un modelo de patogénesis realizado en animales *in vitro* el cual consta de tres fases. La primera involucra una adhesión inicial a la mucosa intestinal y/o capa mucoide. AAF/I y AAF/II son los principales factores que pueden facilitar la colonización inicial. En la segunda fase se involucra la producción de moco, con la formación de la biopelícula con una gran cantidad de EAEC, promoviendo una colonización persistente y quizás la mala absorción de nutrientes. Y la última fase, evidenciada histopatológica y molecularmente, incluye la elaboración de una citotoxina de EAEC que produce daño a las células intestinales. *In vitro*, se ha demostrado que el sitio de infección de EAEC en el intestino humano es la mucosa del intestino delgado y grueso⁵⁰

Un número elevado de estudios ha apoyado la relación de EAEC con diarrea en países en vías de desarrollo, siendo la duración mayor de 14 días. La relación de EAEC con la enfermedad diarreica parece ser geográfica. En la India, se han publicado cinco estudios que demuestra la importancia de EAEC en niños. Estos estudios incluyen a los pacientes hospitalizados con diarrea persistente, pacientes ambulatorios y casos esporádicos en casa 51, 52, 53

Savarino et al⁵⁵ han estudiado el plásmido de la cepa 17-2, identificando un marco de lectura de 4,100-Da de homología con ST⁵⁴. El producto de este gen EAST1, es una proteína de 38 aminoácidos con cuatro residuos de cisteína, diferente a los seis residuos de *E. coli* ST. El papel de EAST1 en la secreción no ha sido todavía determinado, aunque algunas clonas de EAST1 aumentan en la mucosa del conejo.

Los efectos citotóxicos observados en los modelos animales, en los tejidos intestinales humanos y en las células T84 no son acompañados por la internalización de las bacterias o por unión íntima. Por consiguiente, varios grupos han intentado identificar citotoxinas secretadas en EAEC. Eslava et al ⁵⁶ ha identificado una citotoxina de 108kDa que provoca lesiones destructivas en el asa ligada de la rata. Esta proteína fue reconocida a través de un suero de pacientes infectados con EAEC. Los datos recientes sugieren que esta proteína es autotransportador.

En la tabla 2 se hace un resumen de los procedimientos empleados para la identificación de los diferentes grupos patógenos de *E. coli* los cuales han sido anteriormente descritos.

Tabla 2. Procedimientos empleados para la identificación de los grupos patógenos de *Escherichia coli*

Grupo	Pruebas más comunes
ETEC	Asa ligada en conejo, ensayo en cultivo de tejidos (CHO*, YI**), ELISA, hibridación de DNA con sondas moleculares
EIEC	Prueba de invasividad de cultivos celulares (HeLa***, HEp-2****), prueba de Sereny positiva (queratoconjuntivitis en cobayos o conejos), hibridación de DNA.
EPEC	Pruebas de adherencia en cultivos celulares (HeLa, HEp-2) ; hibridación de DNA.
EHEC	Efecto citotóxico sobre cultivos celulares (HeLa,*****Vero), hibridación de DNA.
ADEC	Prueba de adherencia en cultivo celular (HEp-2), hibridación de DNA.
EAEC	Prueba de adherencia en cultivo celular (HEp-2), hibridación de DNA, PCR, serología.

*CHO: células de ovario de hámster chino

**YI: células de tumor adrenal

***HeLa: células de carcinoma de cérvix

****HEp-2: células de carcinoma laríngeo

*****Vero: riñón de mono verde

Modificado de: Eslava C et al³

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.5 Técnicas de Biología Molecular

Las técnicas de biología molecular permiten la identificación de sus características a nivel genético más que de los organismos.

Las metodologías de biología molecular se basan en la característica de complementariedad que hay entre las cadenas del DNA. La molécula de DNA de doble cadena formada por bases puricas (adenina y guanina) y pirimidicas (timina y citosina) unidas por puentes de hidrógeno se puede desnaturizar y separarse en cadenas sencillas por calentamiento o por adición de sustancias químicas como hidróxido de sodio y luego se renaturaliza bajo condiciones adecuadas⁵⁷

Las pruebas de biología molecular a nivel genético, se basan en la hibridación en fase sólida y en fase líquida.

La hibridación es el proceso en el cual dos cadenas individuales de ácido nucleico (una de las cuales ha sido marcada previamente) se unen *in vitro* para formar una molécula de doble cadena estable. Las cadenas cuyas secuencias de bases son complementarias se unen entre sí, semejando el cierre de una cremallera y como tales permanecen unidas. A la cadena marcada se le llama sonda y a la cadena complementaria se le conoce como DNA blanco y se encuentra en la muestra problema.

La muestra sirve como fuente de ácido nucleico para analizar y puede ser DNA ó RNA de una suspensión de microorganismos (para confirmación por cultivo) o directamente una muestra clínica como materia fecal.

La reacción de hibridación comienza a partir de las cadenas dobles del DNA blanco y es preciso desnaturizarlas para poder trabajar con cadenas sencillas: La cadena sencilla por

su parte es capaz de reasociarse con otra cadena de DNA o bien con un RNA de secuencia complementaria y así formar un híbrido. Existen tres variantes de la hibridación y son las siguientes:

- 1) Hibridación en fase sólida como soporte⁵⁸
- 2) Hibridación en fase líquida⁵⁹
- 3) Hibridación *in situ*^{60,61}

Todas ellas son aplicables en la clínica y en la epidemiología.

La hibridación en fase sólida consta de cuatro pasos:

- 1) preparación de la muestra, para exponer el DNA blanco.
- 2) aplicación y fijación del blanco al soporte sólido, lo que se conoce como transferencia o "blot".
- 3) hibridación propiamente dicha con ayuda de la sonda marcada y
- 4) detección de la señal producida por la sonda.

La hibridación que emplea fase sólida como soporte puede identificar tanto DNA como RNA proveniente de una muestra problema.

Existen tres métodos que utilizan membranas de nylon o nitrocelulosa como soporte:

- a) "Dot blot", "Slot blot", son pruebas que utilizan pocitos circulares o alargados^{62, 63} para depositar las muestras
- b) Macrocolonias y "colony blot" son procedimientos útiles en bacteriología⁶⁴ y
- c) "Southern blot" y "Northern blot", analizan DNA y RNA respectivamente^{65, 66}

COLONY BLOT.

Es un procedimiento que implica la aplicación directa de la masa microbiana sobre la membrana de nylon. Es una prueba presuntiva cuando se trabaja con la muestra clínica directa y se apoya en sus testigos positivos y negativos.

Requiere de cepas microbianas puras. Se toma una colonia individual con el asa bacteriológica y se siembra en una placa de BAB. Se aplican tantas cepas como sea necesario y se transfieren a una membrana de nylon. La membrana con la colonia se somete a tratamiento con NaOH para lisar las bacterias a la vez que se desnaturaliza el DNA.

El DNA blanco fijado en la membrana de nylon se hibrida con una sonda marcada previamente, la cual debe ser complementaria y específica para la cadena del gen de interés presente en el DNA blanco⁶⁴

La hibridación se revela por un método colorimétrico y enzimático.

El marcaje de la sonda puede consistir de un radioisótopo incorporado a un nucleótido, o bien está compuesta por un nucleótido unido covalentemente con una cadena larga hidrocarbonada que lleva en su extremo la molécula reportera, y puede ser una enzima como la peroxidasa o la fosfatasa alcalina⁶⁷

REACCIÓN DE POLIMERIZACIÓN EN CADENA (PCR).

Los métodos para amplificar secuencias nucleotídicas, emplean oligonucleótidos o iniciadores y una enzima DNA polimerasa, esto se fundamenta en la amplificación o síntesis múltiple de pequeños fragmentos de DNA, que son característicos del organismo a identificar: Existen varios métodos que se basan en amplificación de DNA y todos ellos tienen en común el uso de enzimas polimerizantes de DNA, termoestables, porque la enzima debe resistir los cambios de temperatura involucrados en el método que consiste en la síntesis " *in vitro* " del DNA problema, empleando una polimerasa, con objeto de amplificar un fragmento que estará delimitado por un par de oligonucleótidos iniciadores. En la PCR original, se usa enzima DNA polimerasa termoestable obtenida de un microorganismo termofílico, *Thermus aquaticus*, de ahí el nombre de Taq polimerasa, cuya temperatura óptima de polimerización es 72 ° C, y es estable aún a la temperatura de ebullición en solución amortiguadora⁶⁸

La mezcla de reacción se prepara inicialmente agregando todos los reactivos y no es necesario adicionar nada más. La mezcla lleva: los cuatro desoxinucleótidos (A, T, C, G) los oligonucleótidos iniciadores, la polimerasa termoestable y el DNA molde (presente en la muestra), todo en una solución reguladora adecuada. La reacción se efectúa debido a que se somete a ciclos constituidos por tres etapas de temperatura:

- 1) Desnaturalización. Se somete la mezcla a la temperatura necesaria para separar las cadenas del DNA molde durante 3 a 5 minutos a 94° C.
- 2) Hibridación. Después se disminuye la temperatura hasta ajustarla dentro del intervalo de temperaturas en las que los oligonucleótidos iniciadores hibridarán

restrictivamente con su cadena molde, es decir reconocerán de manera específica su secuencia en el DNA problema y solo a ella. La temperatura de hibridación frecuentemente está entre 50 ° C y 60 ° C, es específica para cada microorganismo por lo que se deben realizar ensayos para su estandarización.

- 3) Polimerización. La Taq polimerasa a 72° C se une a un iniciador y comienza a adicionar los nucleótidos (A, T, C, G) y el alargamiento de la cadena del DNA que se desea amplificar⁶⁹

Si este ciclo se repite 30 veces por lo menos, dado que hay un incremento logarítmico de las moléculas, el rendimiento de DNA a partir de una sola molécula llega a ser de millones de moléculas del fragmento sintetizado.

Por lo tanto, todas las pruebas de biología molecular son bastante costosas, comparadas con el costo promedio de un cultivo bacteriológico. Tienen la ventaja de ser sumamente sensibles (PCR), algunas de ellas pueden trabajar cien muestras o más por ensayo (por ejemplo "colony blot"), además de que la identificación que realizan es a nivel de genotipo del microorganismo en cuestión. Por ello, los laboratorios de referencia y de investigación son los adecuados para implementar tales métodos, ya que cuentan con el volumen adecuado de muestras.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Gran número de las diarreas queda sin diagnóstico debido a que son leves y autolimitadas y el paciente no solicita atención médica, o a causa de que no se dispone de instalaciones médicas y de laboratorio, sobre todo en los países en vías de desarrollo; por lo que es imposible distinguir sobre bases clínicas entre las infecciones causadas por patógenos viral o bacteriano. El diagnóstico preciso sólo puede establecerse mediante investigaciones de laboratorio que tienen importancia especial durante las epidemias, dada la necesidad de investigaciones epidemiológicas y medidas de control oportunas.

En México no se hace diagnóstico para EAggEC y no se sabe cual es la frecuencia de diarrea debido a este grupo de *E. coli*, siendo interesante, con base a referencias bibliográficas que reportan un 86 % de adherencia agregativa en otros países, adaptar las condiciones estándar para la PCR y la elaboración de una sonda sensible y específica que sean útiles en laboratorios de referencia y diagnóstico.

IV. OBJETIVOS:

GENERAL:

- Estandarizar la técnica de PCR y la sonda empleada en “Colony blot” para diagnóstico de *Escherichia coli* enteroagregativa (EAggEC).

PARTICULARES.

- Comparar las pruebas de biología molecular de hibridación en fase sólida y en fase líquida.
- Relacionar el cuadro clínico y la presencia de EAggEC.
- Determinar la frecuencia de EAggEC, en 500 cepas de *E. coli* aisladas durante 8 meses.
- Determinar la presencia o ausencia de EAggEC en hombres y mujeres de acuerdo a la edad.

V. HIPÓTESIS DE TRABAJO:

Es conocido que con las técnicas de biología molecular se pueden saber las características a nivel genético de los microorganismos, a diferencia de los medios de cultivo, que sólo nos muestran características fenotípicas, por lo tanto con los métodos de biología molecular como PCR y "colony blot", será posible poner de manifiesto la presencia de genes relacionados con la adherencia agregativa del grupo *Escherichia coli* enteroagregativa en cepas aisladas de casos de diarrea en México.

VI. MATERIAL Y METODOS

MATERIAL BIOLÓGICO:

- 500 cepas de *Escherichia coli* negativas a EHEC, ETEC, EIEC, EPEC
- Cepas de referencia: 22254-C, H10407, E-11, 25611, p207, pCVD419
- Células Hep-2
- DNA molde

MATERIAL DE VIDRIO:

- Cajas de Petri
- Pipetas graduadas 1, 2, 5, 10 y 25 mL
- Tubos de ensayo 13 x 100 y 16 x 150
- Tubo No. 1 del nefelómetro de Mac Farland (NMF)

MATERIAL DIVERSO:

- Membrana de nylon
- Guantes de látex desechables
- Papel filtro
- Micropipetas 10, 100, 200 y 1000 μ L
- Tubo cónico
- Mechero Fisher
- Tubos para microcentrifuga 0.5 y 1 mL
- Tubos para PCR 0.2 mL
- Placa para cultivo celular de 24 pozos estéril

SUSTANCIAS Y REACTIVOS:

- Solución de prehibridación
- Sonda marcada con digoxigenina
- Solución de lavado
- Buffer A, B, C
- Conjugado antidigoxigenina - fosfatasa alcalina
- Solución de NaOH 0.5 N
- Solución Tris 1M pH 8
- SSC 2X
- NBT
- BCIP
- Agua estéril y desionizada
- Cloruro de magnesio
- dNTP 's - dig dUTP
- Iniciadores
- Taq polimerasa
- Vaselina
- dNTP 's (Adenina, Guanina, Citosina, Timina)
- Agarosa tipo II
- Solución TBE 1X
- Bromuro de etidio
- Solución salina fisiológica (SSF) estéril 0.85%
- Metanol absoluto

- Medio MEM sin suero fetal bovino y sin PES
- Colorante Giemsa
- Caldo de soya tripticasefina (TSB)
- Agar base sangre (BAB)

EQUIPO:

- Lámpara de luz U. V.
- Baño de agua
- Placa de agitación
- Termociclador
- Centrifuga
- Horno de microondas
- Fuente de poder
- Cámara de electroforesis
- Platina caliente
- Estufa de 37 °C
- Microscopio óptico
- Campana de flujo laminar
- Estufa de CO₂

METODOS:

En este estudio se seleccionaron 500 cepas aisladas de personas con cuadro clínico de diarrea, las cuales previamente fueron negativas en la hibridación para los grupos ETEC, EIEC, EPEC y EHEC.

Criterios de inclusión: Muestras que tenían encuestas con información completa (nombre, edad, sexo, diarrea, algún síntoma, lugar de procedencia).

Criterios de exclusión: Muestras que no presentaron encuesta o información incompleta.

Las muestras contaban con información epidemiológica del caso, al llegar al InDRE y fueron sometidas a las siguientes metodologías.

- “Colony blot”
- PCR
- Cultivo celular

Colony Blot.

Se sembraron las cepas de *E. coli* negativas en una placa de BAB.

Se incubó la placa 4 a 6 h a 37° C.

Se colocó la membrana de nylon.

Se incubó toda la noche a 37° C.

Se retiró la membrana de la placa y se colocó sobre papel filtro con NaOH 0.5 N para lisar las bacterias.

Se dejó 15 minutos la membrana en NaOH 0.5 N.

Se transfirió la membrana a papel filtro saturado con solución Tris 1M pH 8 dejándola 10 minutos.

Se cambió la membrana a papel filtro saturado con solución Tris 1M pH 8 – 1.5 M NaCl dejándola 10 minutos.

Se enjuagó la membrana en SSC 2X.

Se dejó secar a temperatura ambiente.

Se fijó el DNA con luz U. V.

Se prehibridó, con la solución de prehibridación.

Se incubó a 65° C por una hora en baño de agua.

Se eliminó la solución de prehibridación.

Se hibridó con 2.5 mL de líquido de prehibridación con sonda marcada con digoxigenina, se hibridó a 65 °C toda la noche en baño de agua.

Se prepararon 60 mL de solución de lavado manteniéndola a 65° C hasta su uso.

Se retiró la sonda y se guardó para su reuso.

Se colocó la membrana en un recipiente y se enjuagó con 20 mL de solución de lavado.

Se eliminó la solución, se adicionaron 20 mL de solución de lavado y se incubó a 65° C 15 minutos.

Se eliminó la solución y se repitió el paso anterior.

Se enjuagó el filtro en 20 mL de solución A y se agitó por un minuto.

Se transfirió la membrana a 20 mL de solución B durante 1 hora

Se colocó la membrana en 10 mL de solución B con 1.5 µL de anticuerpo antidigoxigenina.

Se dejó incubando 30 minutos en agitación.

Se lavó el filtro con 20 mL de solución A agitando 15 minutos.

Se repitió el paso anterior.

Se enjuagó el filtro con 20 mL de solución C en un agitador por un minuto.

Se colocó la membrana en 10 mL de solución C adicionando 45 μ l de NBT y 35 μ l de BCIP.

Se dejó incubando a temperatura ambiente hasta la aparición de color.

La figura 3 resume la metodología de Colony blot.

PCR.

La estandarización de la técnica de PCR para EAEC se indica en la figura 4.

El coctel de reacción se preparó como sigue: agua estéril, regulador, cloruro de magnesio, dNTP's (A, T, C, G), iniciador 1, iniciador 2, Taq polimerasa, vaselina, DNA.

En las tablas 3 y 4, se muestran las condiciones realizadas en cada reactivo, durante la estandarización.

En la tabla 3 se presentan las variaciones de dilución de los iniciadores para el iniciador 1, las diluciones empleadas fueron de 1:80 a 1:640 y en el iniciador 2 de la dilución 1:10 a 1:80.

La tabla 4 presenta las variaciones en las cantidades y concentración de $MgCl_2$, dNTP's y Taq polimerasa.

Las muestras ya preparadas se colocaron en el termociclador con el siguiente programa: preincubación con 1 ciclo de 50 segundos a 94 °C, 53 °C 30 segundos y 72 °C 2 minutos con 30 segundos.

Se verificó la amplificación realizando la electroforesis para visualizar la banda de 620 pares de base (pb).

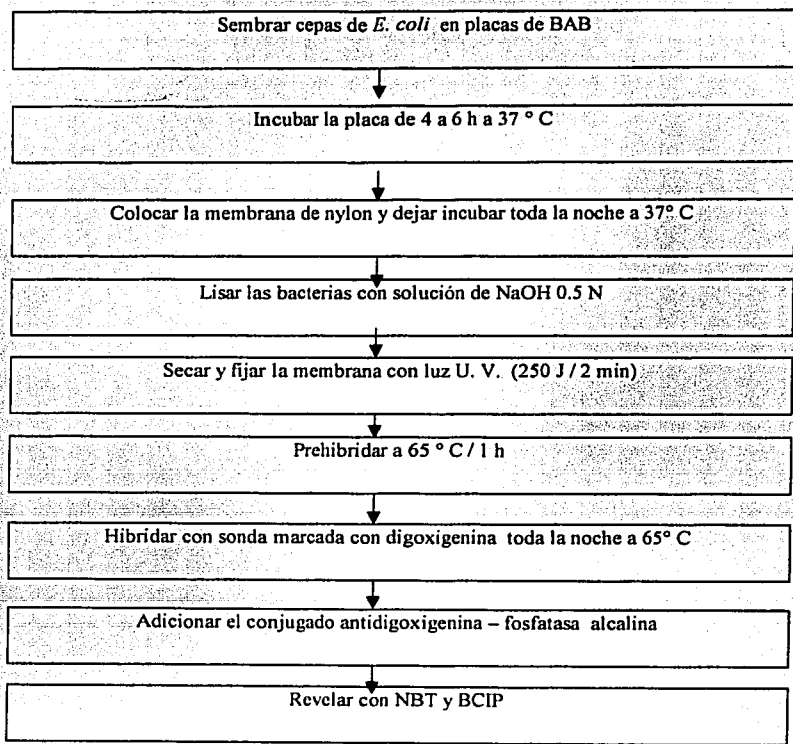


Figura 3. Diagrama de flujo de la técnica de Colony blot.

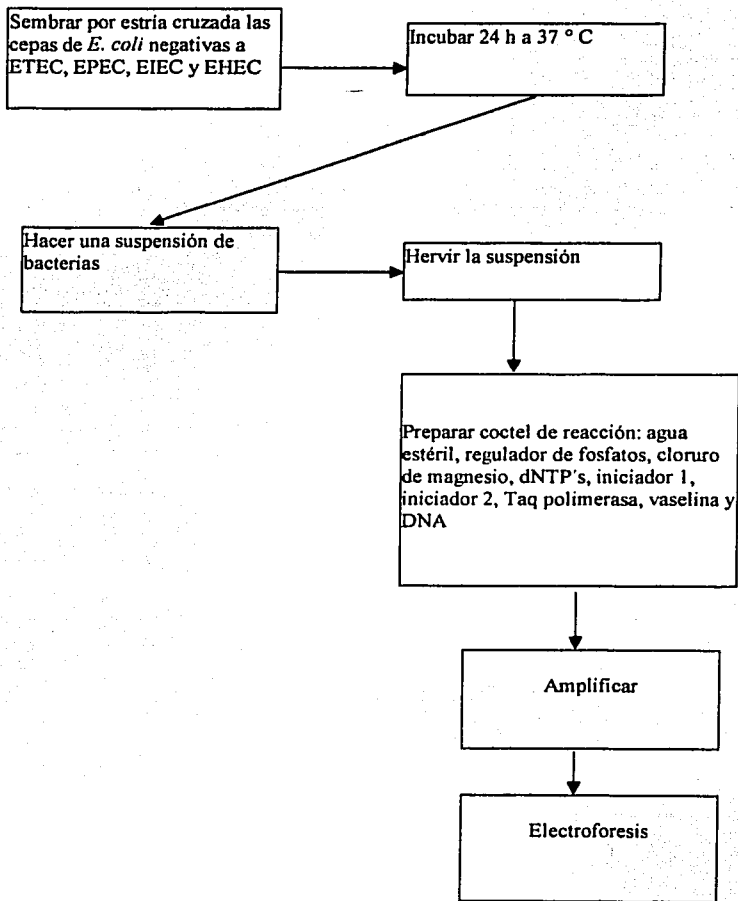


Figura 4. Diagrama de flujo de la técnica de PCR.

Tabla 3. Condiciones para PCR, variando la concentración de los iniciadores.

REACTIVO (μ L)		1	2	3	4	5	6	7	8
	Iniciador 1	1:80	1:80	1:160	1:160	1:320	1:320	1:640	1:640
	Iniciador 2	1:10	1:10	1:20	1:20	1:40	1:40	1:80	1:80
Agua		7	9	12	13	12	13	12	13
Regulador		2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
MgCl ₂		4	4	4	4	4	4	4	4
dNTP's		4	4	4	4	4	4	4	4
Iniciador 1		2	1	1	0.5	1	0.5	1	0.5
Iniciador 2		2	1	1	0.5	1	0.5	1	0.5
Taq polimerasa		0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Vaselina		10	10	10	10	10	10	10	10
DNA		3	3	3	3	3	3	3	3

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 4. Condiciones para PCR, variando el volumen de: $MgCl_2$, dNTP's y Taq polimerasa.

REACTIVO (μ L)	1	2	3	4	5	6	7	8
Agua	9	10	11	12	10.25	10	11	12
Regulador	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
$MgCl_2$	4	3	2	1	4	4	4	4
dNTP's	4	4	4	4	4	3	2	1
Iniciador 1	1	1	1	1	1	1	1	1
Iniciador 2	1	1	1	1	1	1	1	1
Taq polimerasa	0.5	0.5	0.5	0.5	0.25	0.5	0.5	0.5
Vaselina	10	10	10	10	10	10	10	10
DNA	3	3	3	3	3	3	3	3

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ADHERENCIA EN CULTIVO CELULAR.

DÍA 1.

Cultivo celular.

Se trypsinizó una botella confluyente de células Hep-2.

La suspensión celular se ajustó a 1.2×10^5 ó 10^6 células/mL.

Se agregaron 2 mL de la suspensión celular a cada pozo de la microplaca.

Se incubó por 24 h a 37° C.

Cultivo bacteriano.

Las cepas se sembraron en tubos con medio de TSB con D-manosa (0.1g / 2 mL)

Se incubó por 24 h a 37° C.

DÍA 2.

Cultivo bacteriano.

Se ajustó el cultivo bacteriano con el tubo 1 del NMF con medio TSB.

Se hizo una dilución 1:20 (50 µL de la solución y 950 µL de TSB):

Cultivo Celular.

Se observó que la confluencia de cada pozo fuera de 70 – 80%.

Se lavó 2 veces con solución salina fisiológica (SSF) estéril.

Se adicionó 1 mL de medio MEM sin suero fetal bovino y sin PES:

Inoculación.

Se inoculó la microplaca con 500 μ L de la suspensión diluida en cada pozo.

Se incubó 3 h a 37° en CO₂.

Se hicieron 6 lavados con 1 mL de SSF estéril.

Se adicionó una gota de metanol absoluto.

Se realizó la tinción de Giemsa.

La figura 5 resume la metodología empleada en los ensayos de adherencia.

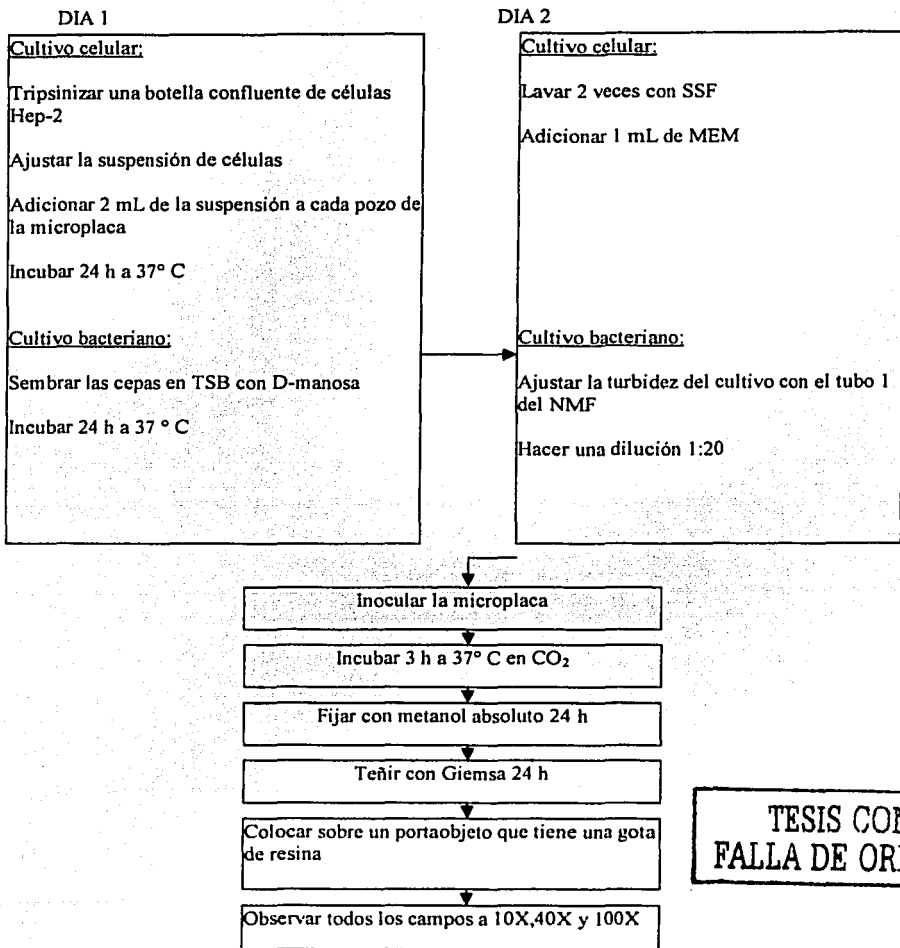


Figura 5. Diagrama de flujo de la técnica de adherencia en células HEp-2

Tomando en cuenta las características del tipo de estudio (experimental, comparativo, prospectivo y longitudinal) los resultados obtenidos fueron sometidos al análisis estadístico por medio del Teorema de Bayes, el cual nos permite calcular el valor de predicción de un test positivo y de un test negativo sobre la base de sensibilidad y especificidad diagnósticas y la prevalencia de una enfermedad así como valorar la utilidad clínica de una nueva prueba de laboratorio, especialmente una que sea utilizada para realizar exámenes colectivos.

Este método se ha utilizado cada vez más en medicina clínica durante los últimos años. Actualmente se han aceptado ciertas nociones y definiciones. Se incluyen las siguientes:

Sensibilidad diagnóstica. La probabilidad de que una persona que sufre una enfermedad determinada tenga un resultado positivo en un test.

Especificidad diagnóstica. La probabilidad de que una persona que no sufre enfermedad tenga un resultado negativo del test.

Prevalencia. La probabilidad de que una persona seleccionada al azar de una población sufra una enfermedad determinada.

Valor de predicción de un test positivo. La probabilidad de que una persona que tenga un resultado positivo a un test sufra una determinada enfermedad.

Valor de predicción de un test negativo. La probabilidad de que una persona que tenga un resultado negativo no sufra una enfermedad determinada.

El Teorema de Bayes utiliza la nomenclatura que se presenta en la tabla 5, a partir de la cual se calcularon los siguientes datos:

$$\text{Sensibilidad} = a / a + c$$

$$\text{Especificidad} = d / b + d$$

$$\text{Valor predictivo positivo (Vpp)} = a / a + b$$

$$\text{Valor predictivo negativo (Vpn)} = d / c + d$$

$$\text{Prevalencia} = a + c / a + b + c + d$$

$$\text{Concordancia} = a + b + c + d$$

Tabla 5. Nomenclatura habitualmente utilizada cuando se aplica el Teorema de Bayes

	Referencia positiva	Referencia negativa	Totales
Prueba positiva	a	b	a + b
Prueba negativa	c	d	c + d
Totales	a + c	b + d	a + b + c + d

donde:

a = verdaderos positivos

b = falsos negativos

c = falsos positivos

d = verdaderos negativos

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

VII. RESULTADOS

Se estudiaron 500 cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con diarrea, durante 8 meses, las cuales fueron previamente negativas en la hibridación para los grupos ETEC, EPEC, EIEC y EHEC.

En la tabla 6, se presentan las condiciones estandarizadas para la PCR, después de haber probado diferentes concentraciones de $MgCl_2$, dNTP's, iniciadores y la enzima.

En la tabla 7, se muestra que de las 500 cepas sólo 193 fueron positivas por Colony blot (39%) y por PCR 69 cepas fueron positivas (14 %).

En la figura 6, se observa una de las membranas de nylon que se hibridó con la sonda elaborada que ejemplifica a cepas positivas y negativas.

En la figura 7, se puede observar la banda de amplificación de 630 pb que corresponde a cepas de *E. coli* que fueron positivas con las condiciones estandarizadas y empleadas para la PCR.

La tabla 8 presenta los resultados obtenidos con las dos técnicas moleculares (colony blot y PCR): 33 (6.6 %) cepas colony blot positivo - PCR positivo, 36 (7.2 %) cepas colony blot negativo - PCR positivo, 160 (32 %) cepas colony blot positivo - PCR negativo y 271 (54.2 %) cepas colony blot negativo - PCR negativo.

Tabla 6. Condiciones empleadas para la PCR de *Escherichia coli* enteroagregativa.

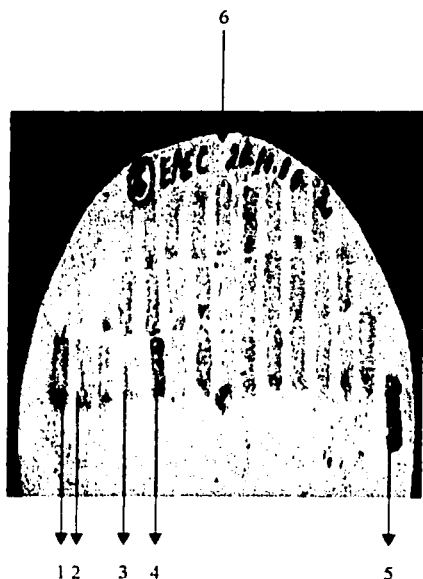
REACTIVO (Concentración)	VOLUMEN (μL)
Agua	13
Regulador	2.5
MgCl ₂ (50mM)	1
dNTP's (1 μ M)	3
EAEC 1 (1.5625 pmol / μ L)	1
EAEC 2 (12.5 pmol / μ L)	1
Taq (5 U / μ L)	0.5
Vaselina	10
DNA	3

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 7. Cepas de *Escherichia coli* que se estudiaron por Colony blot y PCR

Prueba molecular/ Resultado	Positivo	Negativo
Colony blot	193	307
PCR	69	431

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



1. Escherichia coli positiva al grupo EAEC
2. Testigo negativo
3. Escherichia coli negativa al grupo EAEC
4. Escherichia coli positiva al grupo EAEC
5. Testigo positivo para la cepa de Escherichia coli enteroagregativa (EAEC)
6. Clave que indica el grupo que está siendo hibridado

Figura 6. Membrana de nylon con cepas de Escherichia coli sometidas a hibridación por la técnica de " colony blot "

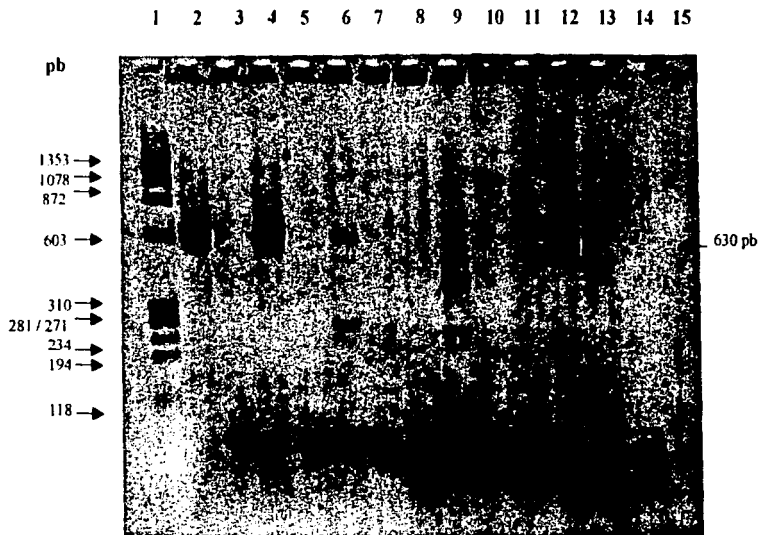


Figura 7. Productos amplificados de PCR en cepas de *Escherichia coli* agregativa, aisladas de pacientes con diarrea

Carril 1: marcador de peso molecular fago Fi 174

Carril 2: cepa 22254, testigo positivo

Carril 3: testigo negativo

Carriles 4 al 15: cepas aisladas de casos de diarrea

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 8. Relación entre pruebas moleculares y cuadros clínicos para EAEC

	D				D, V				D, DESH.				D, V, DESH.				D, V, F.				Total
	(A)	(B)	(C)	(D)	(A)	(B)	(C)	(D)	(A)	(B)	(C)	(D)	(A)	(B)	(C)	(D)	(A)	(B)	(C)	(D)	
ENERO	8	2	33	0	0	0	2	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	47
FEBRERO	3	0	31	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	39
MARZO	15	11	20	42	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	94
ABRIL	0	8	9	23	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	41
MAYO	3	10	24	117	0	1	0	2	0	0	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	160
JUNIO	1	2	17	38	0	0	1	5	0	0	1	2	0	0	0	1	0	0	0	0	68
JULIO	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
AGOSTO	0	0	15	30	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	48
Total	30	33	149	254	0	1	5	9	0	1	3	5	3	1	2	3	0	0	1	0	500

(A) = Colony blot (+) y PCR (+)

(B) = Colony blot (-) y PCR (+)

(C) = Colony blot (+) y PCR (-)

(D) = Colony blot (-) y PCR (-)

D = diarrea; V = vómito; DESH. = deshidratación; F = fiebre

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

En la misma tabla 8, se presenta el cuadro clínico observándose que el síntoma más frecuente es la diarrea; en algunos casos hubo vómito y deshidratación y en un caso se presentó fiebre.

Se aplicó el Teorema de Bayes, a los datos obtenidos en colony blot y PCR, los resultados se muestran en las tablas 9 y 10.

En la tabla 11, se puede observar que los niños menores de 1 año son los más afectados, sin descartar a los niños de 2 a 5 años que también muestran susceptibilidad.

La tabla 12, muestra que en cuanto al sexo la frecuencia es ligeramente mayor en 1.2 % en los hombres que en las mujeres.

El cultivo celular es la prueba de referencia para las pruebas moleculares.

En la tabla 13, se presentan los diferentes efectos de adherencia observados, con base en los patrones de adherencia y a los datos de las pruebas empleadas.

La figura 8, muestra el testigo negativo en el cual no se observó patrón de adherencia.

La figura 9, ejemplifica el efecto de adherencia agregativa, en donde se aprecia a las bacterias formando agregados que se adhieren a las células HEp-2 característicos de este grupo patógeno.

La figura 10, corresponde a el efecto de adherencia difusa y la figura 11, a el efecto de adherencia localizada.

Tabla 9. Datos obtenidos por Colony blot, a los cuales se les aplico el Teorema de Bayes

	Cultivo celular positivo	Cultivo celular negativo	Totales
Colony blot Positivo	35	72	107
Colony blot Negativo	13	75	88
Totales	48	147	195

Sensibilidad 73 %
Especificidad 51 %

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Tabla 10. Datos obtenidos por PCR , a los cuales se les aplico el Teorema de Bayes

	Cultivo celular positivo	Cultivo celular negativo	Totales
PCR Positivo	22	40	62
PCR Negativo	26	107	133
Totales	48	147	195

Sensibilidad 46 %
Especificidad 73 %

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 11. Distribución de EAEC que presentaron colony blot o / y PCR positivos por grupo etareo

EDAD (años)	ENERO	FEBRERO	MARZO	ABRIL	MAYO	JUNIO	JULIO	AGOSTO	Total
1	21	14	16	5	16	1	0	7	80
2	7	6	8	0	0	1	0	1	23
3	1	2	4	1	0	2	0	0	10
4	2	1	4	1	6	0	0	1	15
5	0	0	2	0	0	1	0	2	5
6-15	8	4	5	2	4	5	0	1	29
16-25	4	2	2	2	6	4	0	0	20
26-35	1	1	7	3	1	3	0	3	19
36-45	2	4	1	1	4	3	0	0	15
46-55	1	0	0	1	0	1	0	0	3
56-65	1	2	1	0	0	0	0	0	4
66-75	0	0	0	1	1	1	0	1	4
76-85	0	0	0	0	1	0	0	0	1
> 85	0	1	0	0	0	0	0	0	1
Total	48	37	50	17	39	22	0	16	229

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 12. Distribución de EAEC según el sexo del paciente.

	CB(+)		PCR(+)		CB(-)		PCR(-)	
	MASC.	FEM.	MASC.	FEM.	MASC.	FEM.	MASC.	FEM.
ENERO	9	0	0	2	16	20	0	0
FEBRERO	1	3	0	0	19*	15	1	0
MARZO	7	9	8	4	10	12	15	29
ABRIL	0	0	3	5	6	3	7	17
MAYO	1	2	7	5	11	13	65	56
JUNIO	1	0	1	1	10	9	25	21
JULIO	0	0	0	0	0	0	1	2
AGOSTO	0	0	0	0	10	6	19	14
TOTAL	19	14	19	17	82	78	133	138

CB = Colony blot
 MASC. = masculino
 FEM. = femenino

TESIS COM
 FALLA DE ORIGEN

Tabla 13. Efectos de adherencia para *Escherichia coli*, según las técnicas moleculares empleadas.

ADHERENCIA/ PRUEBA	AGREGATIVA	DIFUSA	LOCALIZADA	NEGATIVA	TOTAL
Colony blot y PCR positivo	15	0	1	16	32
Colony blot negativo y PCR positivo	7	3	3	17	30
Colony blot positivo y PCR negativo	20	6	2	47	75
Colony blot negativo y PCR negativo	6	3	0	49	58

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

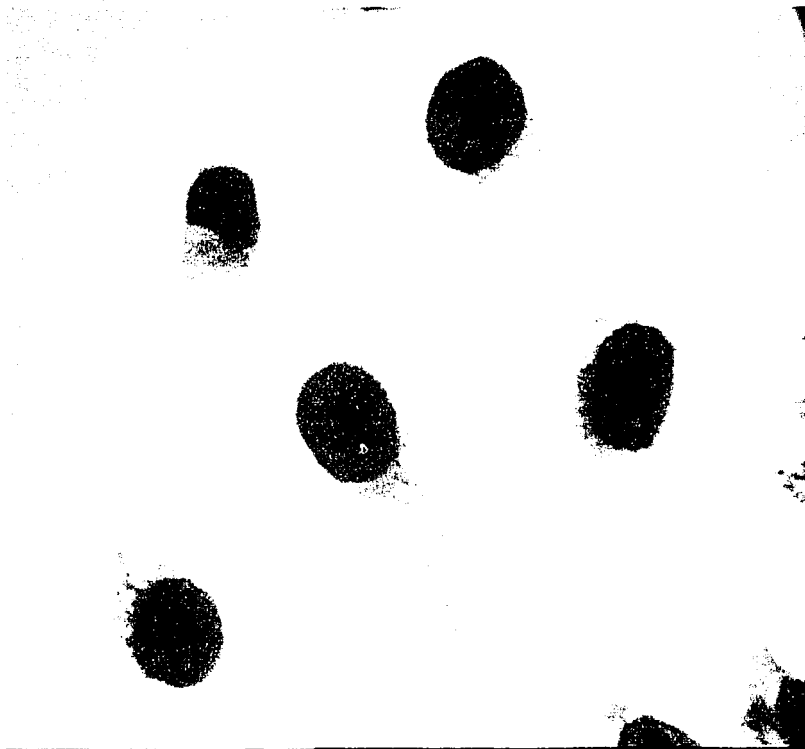


Figura 8. Micrografía de la adherencia a células HEP-2, infectadas con la cepa testigo negativo. Tinción de Giemsa, aumento 40X

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

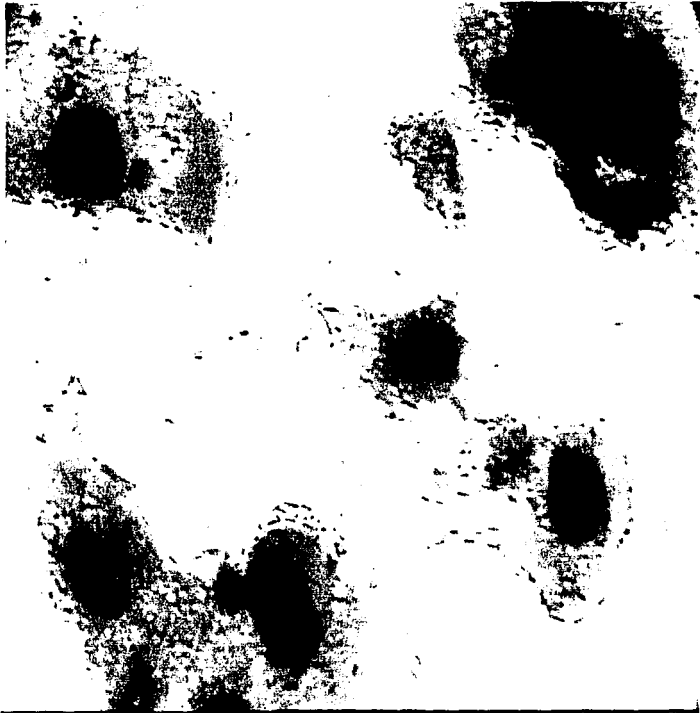


Figura 9. Micrografía de la adherencia a células HEp-2 infectadas con una cepa de EAEC sonda positiva y PCR positiva, mostrando adherencia agregativa. Tinción de Giemsa, aumento 40X

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

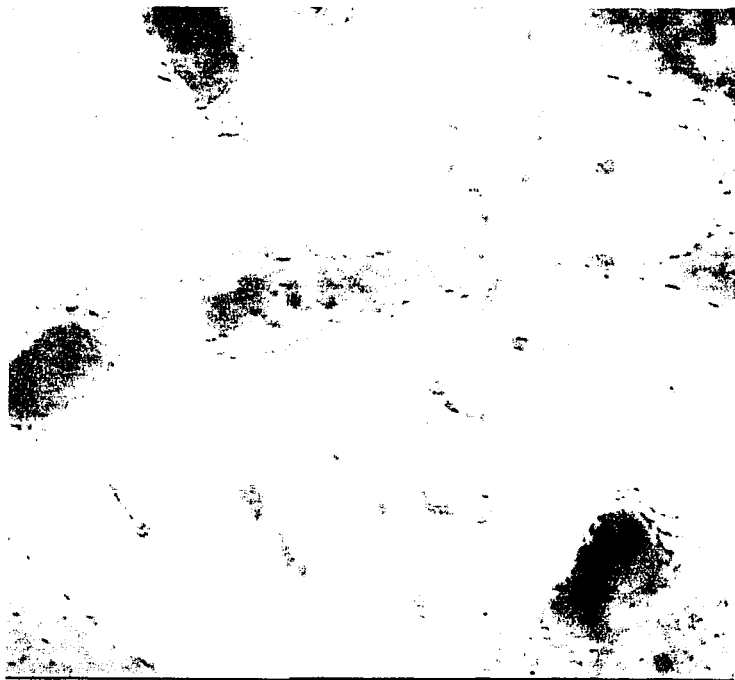


Figura 10. Micrografía de la adherencia a células HEp-2 infectadas con una cepa EAEC, pero con adherencia difusa. Tinción de Giemsa, aumento 40X



Figura 11. Micrografía de la adherencia a células HEp-2 infectadas con EAEC con adherencia localizada. Tinción de Giemsa, aumento 40X

Por otra parte, un panorama general en los estados de la República Mexicana, se muestra en la tabla 14 que presenta algunos estados que fueron colony blot y/o PCR positivo y que además presentaron el efecto de adherencia agregativa.

En la figura 12, se observa que la distribución del grupo EAEC, está indicada solamente para algunos estados que enviaron un número considerable de muestras al InDRE tales como Hidalgo y Tlaxcala.

Existen estados que no envían cepas al InDRE razón por la cual no se sabe si está presente EAEC, por ello se sugiere, realizar un estudio epidemiológico más detallado, ya que por ejemplo, en algunos estados como Puebla y Coahuila, sólo se estudio una cepa.

Tabla 14. Cepas de EAEC confirmadas por el patrón de adherencia agregativa en células HEp-2 que se presentaron en algunos estados de la República Mexicana

ESTADO	No. de cepas
Campeche	1
Chihuahua	1
Chiapas	1
Distrito Federal	3
Estado de México	7
Hidalgo	22
Michoacán	1
Nuevo León	1
Quintana Roo	1
Tabasco	1
Tlaxcala	8
Veracruz	1

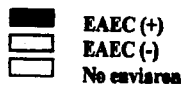


Figura 12. Distribución de *Escherichia coli* enteroagregativa con patrón de adherencia agregativa en México

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

VIII. DISCUSION

Un principio fundamental de la microbiología de diagnóstico es mejorar la atención al paciente a través del descubrimiento rápido y caracterización de patógenos específicos.

Durante el último siglo, la identificación de microorganismos se ha basado principalmente en sus características fenotípicas, morfológicas y bioquímicas. Sin embargo, en algunos casos, los sistemas de cultivo microbiológico, consumen tiempo y son costosos. Los adelantos en biología molecular durante los últimos 10 años han abierto una nueva frontera para la identificación del genotipo y caracterización de microorganismos.

La tecnología de amplificación (PCR) ha abierto nuevos caminos para el descubrimiento, identificación y caracterización de organismos patógenos en el laboratorio de microbiología clínica⁷⁰

El conocimiento de factores de riesgo, estudios epidemiológicos, el desarrollo de un tratamiento y medidas de control se facilitarán si el agente etiológico de diarrea puede identificarse⁷¹

Las diferentes categorías de *E. coli*, se han reconocido cada vez más como agentes importantes que producen diarrea aguda en niños en países en vías de desarrollo y recientemente se ha propuesto una nueva categoría la *E. coli* enteroagregativa (EAEC).

Guerrant et al⁷² en Fortaleza Brasil, han demostrado una relación continua entre EAEC y el síndrome de diarrea persistente. En esta área EAEC estuvo implicada en un 68 % de casos de diarrea que represento un porcentaje considerable de mortalidad. EAEC también se ha

identificado como una causa de diarrea esporádica en México, Chile, Bangladesh e Irán 45,73

Eslava et al⁵⁶, han descrito dos brotes de EAEC con diarrea persistente, en la guardería de un Hospital de la Ciudad de México, se encontraron infantes que se murieron en estos brotes por haber desarrollado lesiones necróticas de la mucosa ileal.

Por otra parte, se han descrito diferentes métodos para realizar el ensayo con células HEP-2. Sin embargo, los estudios comparativos sugieren que la técnica descrita por Cravioto et al⁷ puede diferenciar mejor los tres modelos de adhesión (agregativa, difusa y localizada).

La identificación de *E. coli* diarreagénica en estudios de epidemiología se ha facilitado enormemente en los últimos años por el desarrollo de sondas de DNA específico tales como para ETEC, EIEC, EPEC y EHEC, recientemente una sonda de DNA sensible y específica se ha descrito para identificar ADEC⁷⁴

El desarrollo de una sonda DNA para identificar EAEC ha sido considerada con alta prioridad como una alternativa al ensayo de adherencia con células HEP-2.

Las sondas son muy importantes por que están disponibles para múltiples agentes infecciosos que no pueden cultivarse fácilmente *in vitro*; esto permite al laboratorio clínico ampliar el espectro de agentes infecciosos que se pueden identificar y además pueden reducir los costos del envío de especímenes a los laboratorios de referencia son consideradas como pruebas adicionales. Una ventaja del empleo de las pruebas moleculares es que permiten la identificación rápida de algún patógeno directamente en una muestra obtenida del paciente⁷⁵

Así, la clave para desarrollar una sonda es aislar secuencias, reproducir grandes cantidades y unirse a una molécula reportera, los cuales se van a incorporar en una reacción de hibridación.

Por ello, en el presente estudio, al no existir en México alguna prueba diagnóstica para identificar a EAEC se procedió a emplear la sonda y PCR estandarizadas con esta finalidad, con las condiciones que se muestran en la tabla 6, empleando como estándar de oro el cultivo celular.

Se realizó la hibridación en fase sólida, usando la sonda de EAEC descrita por Baudry et al⁷⁶

Se encontró sólo un 31 % de EAEC, resultado diferente al esperado 86% de adherencia agregativa, el cual obtuvo Schmidt et al⁷⁷ quienes estudiaron a una población de 468 cepas de diferentes grupos patógenos, de las cuales 50 correspondieron a EAEC.

Comparando los resultados obtenidos con la sonda, PCR y el ensayo de cultivo celular de EAEC, se observó que de 500 cepas estudiadas, sólo 160 hibridaron con la sonda, y fueron negativas por PCR, lo cual es posible quizás por una variación en la unión con la secuencia de los iniciadores⁷²

Por otra parte, 23 cepas PCR positivo y sonda positiva no se adherieron a las células HEp-2, posiblemente debido a que alguna mutación en los genes evitó dicho efecto, aunque algunas cepas mostraron adherencia difusa⁷²

Hubo 6 cepas de *E. coli* que se adhirieron inespecíficamente a células Hep-2 pero eran sonda y PCR negativo.

Los estudios anteriores muestran que no todas las *E. coli* hibridan con la sonda de EAEC, lo cual coincide con lo obtenido por Baudry et al⁷⁶

Por lo cual, hay la posibilidad de que existan diferentes cepas de EAEC o subgrupos, considerando los diversos factores de virulencia y el desconocido mecanismo de patogenicidad.

Para los ensayos de adherencia se procedió a seleccionar un determinado número de cepas, observándose los diferentes tipos de adherencia: agregativa (figura 9), difusa (figura 10) y localizada (figura 11).

Como se puede observar las cepas de EAEC se caracterizan por su modelo de adhesión a las células HEP-2, mostrando como los agregados bacterianos se adhieren a las células en un "stacked-brick-like" (ladrillo apilado) y normalmente a la superficie del vidrio⁴⁵

En otras cepas se observó el efecto de adhesión difusa donde las bacterias se adhieren encima de la superficie de las células en un arreglo uniformemente dispersado.

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

Al comparar los resultados de la tabla 11 con los estudios realizados por Nataro et al⁷² al estudiar EAEC, se puede observar una gran similitud con respecto al grupo afectado, ya que son los niños los que presentaron la mayor frecuencia. Sin embargo, cualquier persona adulta puede estar expuesta a este patógeno. En contraste con lo que él reporta, son los niños menores de un año los más afectados y no los de 5 años.

El cuadro clínico que se manifestó generalmente fue la diarrea, el vómito en sólo 25 casos, deshidratación en 18 casos y fiebre en 1 caso. Por ello, se debe considerar que las enfermedades diarreicas siguen siendo un problema de salud pública, principalmente en niños y jóvenes en países en vías de desarrollo, sin embargo, con el uso creciente de terapia de rehidratación oral, ha disminuido la mortalidad en niños a causa de la deshidratación originada por una diarrea aguda. Y aunque mucha atención se ha dirigido hacia este problema importante, la etiología permanece desconocida.

Con base en los resultados obtenidos y en que el tiempo de duración descrito en las encuestas fue menor de 14 días, se sugiere realizar estudios intencionados que incluyan casos cuya duración sea mayor ó igual a 14 días, en el que se tendría que considerar el número de evacuaciones, ya que en el presente estudio muy pocos casos presentaban una duración mayor de 14 días.

Con respecto a la presencia de *E. coli* enteroagregativa en hombres y mujeres, es ligeramente mayor en los hombres (1.2%), sin embargo, comparándolo con Gilligan et al⁷⁸ EAEC puede afectar por igual a hombres y mujeres, siendo más importante la edad, ya que las diferentes categorías de *E. coli* son una mayor causa de mortalidad en infantes.

Por lo tanto, los resultados obtenidos en el presente estudio tienen la finalidad de mostrar que la técnica de PCR usada con un 46% de sensibilidad y 73% de especificidad permite un diagnóstico más rápido de EAEC que las otras técnicas actualmente disponibles. Sin

embargo, la prueba de hibridación en fase sólida la cual presentó un 73 % de sensibilidad y un 51 % de especificidad comparado con el ensayo de adhesión sugiriendo que colony blot puede suplir a PCR⁷⁹

La prueba de adherencia parece tener un nivel más alto de especificidad y se recomienda para ser usado como una prueba de confirmación definitiva.

Es así como, las cepas de EAEC han sido estudiadas últimamente como una causa de diarrea humana en muchas poblaciones. Sin embargo, no se conocen bien los factores de virulencia que caracterizan a este tipo de *E. coli* diarrogénica. Algunos datos sugieren que las cepas de EAEC son heterogéneas y que comparten determinados factores de virulencia potenciales con otro tipo de *E. coli* y con cepas de *Shigella*⁸⁰

Por lo tanto, existe una gran necesidad de estudios adicionales para elucidar la epidemiología de infección de EAEC en grupos de edades diferentes y de sitios geográficos, ya que por ejemplo en la figura 12, sólo se muestran algunos estados que enviaron sus cepas al IndRE y por tanto no se puede determinar con certeza cual es la distribución de EAEC, además de incluir la identificación de factores y medios de transmisión, duración de evacuaciones, y el espectro de enfermedad clínica.

En la actualidad, la única prueba disponible para identificar EAEC es el ensayo con células HEP-2, siendo reducido el número de muestras que se pueden analizar simultáneamente, además de estar sujeto a la variación del observador y solo se realiza en laboratorios de investigación o de referencia, lo cual implica una desventaja para el diagnóstico.

IX. CONCLUSIONES

- La PCR presentó 46 % de sensibilidad y 73 % de especificidad y colony blot presentó 73 % de sensibilidad y 51 % de especificidad por lo tanto, la técnica de PCR fue más rápida y específica, pero menos sensible que la hibridación en fase sólida.
- Los porcentajes de sensibilidad y especificidad obtenidos con la sonda, sugiere la búsqueda de una secuencia que presente mayores porcentajes que hagan más confiable la prueba de hibridación.
- La técnica de PCR fue más rápida y específica que la hibridación en fase sólida.
- Ambas técnicas son importantes ya que para los laboratorios pequeños pueden ayudar a reducir costos y ofrecer una nueva línea de pruebas de diagnóstico a las clínicas del enfermo ambulatorio y a médicos.
- Al no existir datos acerca de la distribución *E. coli* enteroagregativa por género, se observó que la infección fue ligeramente mayor en hombres que en mujeres.
- *E. coli* enteroagregativa se presentó más en niños menores de 1 año.
- El cuadro clínico más frecuente asociado a *E. coli* enteroagregativa fue la diarrea, pero se sugiere estudiar cepas con una diarrea mayor a 14 días.
- Las cepas de *E. coli* enteroagregativa son una causa de diarrea humana en gran parte de la población. Sin embargo, no se conocen bien los factores de virulencia y mecanismos de patogenicidad que caracterizan este tipo de *E. coli* diarrogénica.

X. ANEXO

Soluciones para Colony blot

1. Solución de prehibridación:

SSC 5X

Reactivo bloqueador 1%

N-laurilsarcosina 0.1 %

SDS 0.02%

2. Solución de lavado:

SSC 1X

SDS 0.1 %

3. Buffer A:

Tris 100 mM pH 7.5

NaCl 150 mM

4. Buffer B:

Buffer A

Leche descremada al 5 %

5. Buffer C:

Tris 100 mM pH 9.5

NaCl 100 mM

MgCl₂ 50 mM

Solución para PCR

1. TBE 10X (1000 mL):

Tris Base 108.0 g

Acido bórico 27.5 g

EDTA disódico 6.8 g

Medios para Colony blot y cultivo celular:

1. Base de Agar Sangre (BAB):

Infusión de músculo cardíaco 37.5 g

Peptona de carne 10.0 g

Cloruro de sodio 5.0 g

Agar 15.0 g

pH final 7.3 +/- 0.2

2. Caldo Soya Trypticaseína (TSB):

Peptona caseína 17.0 g

Peptona de soya 3.0 g

Cloruro de sodio 5.0 g

Fosfatos dipotásico 2.5 g

Dextrosa 2.5 g

pH final 7.3 +/- 0.2

Soluciones para Cultivo Celular:

1. Colorante Giemsa:

Solución A: 1 parte

Solución B: 40 ó 50 partes

1.1. Solución A:

Polvo de Giemsa 0.5 g

Alcohol metílico 33 mL

1.2. Solución B:

Solución amortiguadora de fosfatos pH 7.2:

Na₂HPO₄ 9.2 g (1000mL)

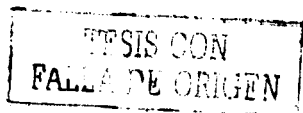
NaH₂PO₄ 9.2 g (1000mL)

XI. GLOSARIO

- Anticuerpos: proteína (inmunoglobulinas) sintetizada por las células plasmáticas en respuesta a la presencia de antígenos específicos y que tienen la capacidad de reaccionar contra ellos.
- Antígeno: cualquier sustancia que estimule una respuesta inmune; por lo general se trata de una proteína o de un carbohidrato de gran tamaño ajenos al cuerpo.
- Citotoxina: toxina que actúa a nivel de síntesis de proteínas.
- Enterocitos: células del intestino.
- Esfacelación: desgaste de la vellosidad.
- Fago: virus que infecta a una bacteria.
- Fenotipo: expresión física o química de los genes de un organismo.
- Fimbria: pili o adhesina, proteína que interviene en la adherencia y colonización.
- Gen: unidad indivisible de información hereditaria está formado por DNA y se localiza en los cromosomas.
- Genotipo: construcción genética completa de un organismo.
- Hemolisina: proteína con actividad enzimática sobre glóbulos rojos.
- Patógeno: organismo capaz de provocar enfermedad.
- Plásmido: material extracromosomal.
- Queratoconjuntivitis: ulceración de la conjuntiva.
- Transducción: transferencia de un fragmento genético de una célula a otra.

XII. BIBLIOGRAFIA

1. Mims C, Playfair J y Rott I. Microbiología médica. España: Mosby / Doyma, 1995: 251-255.
2. Zinsser D. Microbiología. 20ª ed. Argentina: Médica Panamericana, 1996:744-745.
3. Eslava C, Villaseca JM, Cravioto A. Cepas de *Escherichia coli* relacionadas con la diarrea. México: Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencias Epidemiológicas. Secretaría de Salud, 1993: 251.
4. Pumarola A, Rodríguez TJ, García RP. Microbiología y parasitología médica. Barcelona: Científicas Técnicas, 1987: 418-422.
5. Murray P, Drew L, Kobayashi G y Thompson J. Microbiología médica. España: Mosby / Doyma, 1992:107 - 109.
6. Knutton S, Lloyd DR, McNeish AS. Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to human intestinal erythrocytes and cultured human intestinal mucosa. *Infect Immun* 1987; 55: 69-77.
7. Cravioto A, Gross RJ, Scotland SM and Rowe B. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional enteropathogenic serotypes. *Curr Microbiol* 1989;3:95-99.
8. Scaletsky ICA, Silva MLM and Trabulsi LR. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. *Infect Immun* 1984;45:534-536.
9. Vial PA, Robins-Browne RM, Lior H, Prade V, Kaper JB, Nataro JP, Maneval D, Elsayed A and Levine MM. Characterization of enteroadherent-aggregative *Escherichia coli*, a putative agent of diarrheal disease. *J Infect Dis* 1987;155:377-389.
10. Baldini M, Kaper JB, Levine MM, Candy DC and Moon HW. Plasmid-mediated adhesion in enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1983;2:534-538.
11. Baldini M, Nataro JP and Kaper JB. Localization of a determinant for HEP-2 adherence by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1986;52:334-336.
12. Jerse AE, Yu J, Tall BD and Kaper JB. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:7839-7843
13. Knutton SM, Baldini M, Kaper JB and McNeish AS. Role of plasmid - encoded adherence factors in adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to HEP-2 cells. *Infect Immun* 1987;55:78-85.
14. Taylor CJ, Hort RM, McDougall CB and McLean L. Ultrastructural and biochemical changes in human jejunal mucosa associated with enteropathogenic *Escherichia coli* O:111. *Infect J Pediatr Gastroenterol Nut* 1986;5:70-73.
15. Andrade JR, Da Veiga VF, De Santa Rosa MR and Suassuna I. An endocytic process in HEP-2 cells induced by enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Med Microbiol* 1989;48:49-57.



16. Moon HW, Whipp SC, Argenizo RA, Levine MM and Giannella RA. Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. *Infect Immun* 1983;41:1340-1351.
17. Ulssem MH and Rollo JL. Pathogenesis of *Escherichia coli* gastroenteritis in man-another mechanism. *N Engl J Medical* 1980;302:99-101.
18. Donnenberg MS and Kaper JB. Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1992;60:3953-3961.
19. Girón JA, Ho ASY and Schoolnik GK. An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science* 1991;254:710-713.
20. Yoshimura S, Ikemura H and Watanabe H. Essential structure for full enterotoxigenic activity of heat-stable enterotoxin produced by enterotoxigenic *Escherichia coli*. *FEBS Lett* 1985;181:138-142.
21. Kupersztoch YM, Tachias K and Mooman CR. Secretion of methanol insoluble heat-stable enterotoxin (STb): energy and-secA-dependent conversion of pre STb to an intermediate indistinguishable from the extracellular toxin. *J Bacteriol* 1990;172:2427-2432.
22. Gaastra W and Svennerholm AM. Colonization factors of human enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). *Trends Microbiol* 1996;4:444-452.
23. Jann K and Hoshchutsky H. Nature and organization of adhesins. *Curr Top Microbiol Immunol* 1991;151:55-85.
24. Taniguchi T, Fujino Y, Yamamoto K, Miwatani T and Honda T. Sequencing of the gene encoding the major pilin of pilus colonization factor antigen III (CFA/III) of human enterotoxigenic *Escherichia coli* and evidence that CFA/III is related to type IV pili. *Infect Immun* 1995;63:724-728.
25. Levine MM, Ristaino P, Marley G, Smyth C, Knutton S, Boedeker E, Black R, Young C, Clements ML, Cheney C and Patnalk 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;44:409-420.
26. Cassels FJ and Wolf MK. Colonization factors of diarrheagenic *E. coli* and their intestinal receptors. *J Ind Microbiol* 1995;15:214-226.
27. Wolf MK. Occurrence, distribution, and association of O and H serogroups, colonization factor antigens, and toxins of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 1997;10:569-584.
28. Girón JA, Levine MM and Kaper JB. Longus: a long pilus ultrastructure produced by human enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 1994;12:71-82.
29. Girón JA, Viboud GI, Sperandio V, Gomez-Duarte OG, Maneval DR, Albert MJ, Levine MM and Kaper JB. Prevalence and association of the longus pilus structural gene (*lngA*) with colonization factor antigens, enterotoxin types, and serotypes of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1995;63:4195-4198.



30. Brenner DJ, Fanning GR, Miklos GV and Steigerwalt AG. Polynucleotide sequence relatedness among *Shigella* species. *Int J Syst Bacteriol* 1973;23:1-7.
31. Goldberg MB and Sansonetti PJ. *Shigella* subversion of the cellular cytoskeleton: a strategy for epithelial colonization. *Infect Immun* 1993;61:4941-4946.
32. Nataro JP, Seriwatana J, Fasano A, Maneval DR, Guers LD, Noriega F. Identification and cloning of a novel plasmid-encoded enterotoxin of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* strains. *Infect Immun* 1995;63:4721-4728.
33. Parsot C and Sansonetti PJ. Invasion and the pathogenesis of *Shigella* infections. *Curr Top Microbiol* 1996;209:25-42.
34. Sansonetti PJ. Molecular and cellular biology of *Shigella flexneri* invasiveness: from cell assay systems to shigellosis *Curr Top Microbiol Immun* 1992;180:1-19.
35. Tzipori S, Robins-Browne RM, Gonis G, Hayes J, Withers M and McCartney E. Enteropathogenic *Escherichia coli* enteritis: evaluation of the gnotobiotic piglet as a model of human infection. *Gut* 1985;26:570-578.
36. Jerse AE, Gicquelais KG and Kaper JB. Plasmid and chromosomal elements involved in the pathogenesis of attaching and effacing *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1991;59:3869-3875.
37. Schmidt HL, Beutin L and Karch H. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. *Infect Immun* 1995;63:1055-1061.
38. Bauer ME and Welch RA. Characterization of an STX toxin from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun* 1996;64:167-175.
39. Griffin PM. *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Infections of the gastrointestinal tract. *Raven Press New York* 739-761.
40. Cravioto A, Vázquez V y Soria A. Producción de citotoxina tipo Siga (SLT)I en cepas de *Escherichia coli* aisladas de niños con diarrea en una comunidad rural. *Bol Med Hosp. Infant Mex* 1988;45:206-210.
41. Sherman P, Drumm B, Karmali M and Cutz E. Adherence of bacteria to the intestine in sporadic cases of enteropathogenic *Escherichia coli* associated diarrhea in infants and young children: a prospective study. *Gastroenterology* 1989;96:86-94.
42. Schmidt H and Karch H. Enterohemolytic phenotypes and genotypes of shiga like toxin-producing of *Escherichia coli* O111 strains from patients with diarrhea and hemolytic uremic syndrome. *J Clin Microbiol* 1996;34:2364-2367.
43. Benz I and Schmidt MA. AIDA I the adhesin involved in diffuse adherence of the diarrheagenic *Escherichia coli* strain 2787 (O126: 27) is synthesized via a precursor molecule. *Mol Microbiol* 1992;6:1539-1546.

44. Nataro JP, Scaletsky IC, Kaper JB, Levine MM and Trabulsi LR. Plasmid-mediated factors conferring diffuse and localized adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1985;48:378-383.
45. Nataro JP, Kaper JB, Robins-Browne R, Prado V, Vial P and Levine MM. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *Pediatr Infect Dis J* 1987;6:829-831.
46. Tzipori S, Montanaro J, Robins-Browne R, Vial P, Gibson R and Levine MM. Studies with enteroaggregative *Escherichia coli* in the gnotobiotic piglet gastroenteritis model. *Infect Immun* 1992;60:5302-5306.
47. Nataro JP, Deng Y, Maneval DR, German AL, Martin WC and Levine MM. Aggregative adherence fimbriae I of enteroaggregative *Escherichia coli* mediate adherence to HEp-2 cells and hemagglutination of human erythrocytes. *Infect Immun* 1992;60: 2297-2304.
48. Nataro JP, Yikang D, Yingkang D and Walker K. AggR a transcriptional activator of aggregative adherence fimbria I expression in enteroaggregative *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1994;176:4691-4699.
49. Czeaczulin JR, Balepur S, Hicks S, Phillips A, Hall R, Korthary MH, Navarro-García F and Nataro JP. Aggregative adherence fimbria II, a second fimbrial antigen mediating aggregative adherence in enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1997;65:4135-4145.
50. Hicks S, Candy DCA and Phillips AD. Adhesion of enteroaggregative *Escherichia coli* to pediatric intestinal mucosa "in vitro". *Infect Immun* 1996;64:4751-4760.
51. Bhan MK, Khoshoo V, Sommerfelt H, Raj P, Sazawal S and Srivastava R. Enteroaggregative *Escherichia coli* associated with nondysenteric persistent diarrhea. *Pediatr Infect Dis J* 1989;8:499-502.
52. Bhan MK, Raj P, Levine MM, Kaper JB, Bhandari N, Srivastava R, Kumar R and Sazawal S. Enteroaggregative *Escherichia coli* associated with persistent diarrhea in a cohort of rural children in India. *J Infect Dis* 1989;159:1061-1064.
53. Bhatnagar S, Bhan MK, Sommerfelt H, Sazawal S, Kumar R and Saini S. Enteroaggregative *Escherichia coli* may be a new pathogen causing acute and persistent diarrhea. *Scand J Infect Dis* 1993;25 :579-583.
54. Savarino SJ, Fasano A, Roberston DC and Levine MM. Enteroaggregative *Escherichia coli* elaborate a heat-stable enterotoxin demonstrable in an "in vitro" rabbit intestinal model. *J Clin Invest* 1991;87:1450-1455.
55. Savarino SJ, Fox P, Yikang D and Nataro JP. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin is not restricted to enteroaggregative *Escherichia coli*. *J Infect Dis* 1996;173:1019-1022.
56. Eslava C, Villaseca J, Morales R, Navarro A and Cravioto A. Identification of a protein with toxigenic activity produced by enteroaggregative *Escherichia coli*. Abstr B-105 p.44. In Abstracts of the 93rd General Meeting of the American Society for Microbiology 1993. American Society for Microbiology, Washington D.C.

57. Watson JD, Tose J and Kurtz DT. Recombinant DNA: a short course. Scientific American Books, 1983.
58. Meinkoth J and Wahl G. Hybridization of nucleic acids immobilized on solid supports. *Anal Biochem* 138:287-292.
59. Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press New York. 1989.
60. Beckman A, Myerson D, Daling J, Kiviat N, Fenoglio C and Macdougall J. Detection and localization of human papillomavirus DNA in human genital condylomas by *in situ* hybridization with biotilylated probes. *J Med Virol* 1985;16:265-273.
61. Brigatti D, Myerson D, Leary J, Spalholz S, Travis C, Fong Y, Hsuing G and Ward C. Detection of viral genomes in cultured cells and paraffin embedded tissue sections using biotiny-labeled hybridization probes. *Virology* 1983;126:32-50.
62. Brandsma J and Miller G. Nucleic acid spot hybridization: rapid quantitative screening of lymphoid cell lines for Epstein-Barr viral DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:6851-6855.
63. Echeverria P, Seriwatana J, Chityothin O, Chaicumpa W and Tirapat C. Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* in water by filter hybridization with three enterotoxin gene probes. *J Clin Microbiol* 1982;16:1086-1090.
64. Grunstein M and Hogness S. Colony hybridization, a method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975;75:3961-3965.
65. Southern EM. Detection of species specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 1975;98:503-517.
66. Thomas PS. Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:5201-5209.
67. Giono CS, Rodríguez AMG, Rodríguez CMJ y Valdespino GJL. Identificación de enterotoxinas y citotoxinas de *Escherichia coli* por cultivo de células Vero e hibridación en fase sólida "colony blot". *Rev Lat.-Amer. Microbiol* 1994;36:231-241.
68. Saiki Rk, Gelfard DG, Stoffel S, Schare SJ, Higuchi R, Torn GT, Mullis KB and Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science* 1988;239:487-491.
69. Rodríguez AMG, Giono CS y Valdespino GJL. Efecto citotónico y citotóxico de la toxina colérica en células Vero y su relación con PCR. *Rev Lat.-Amer. Microbiol* 1994;36:263-271.
70. Eisenstein BI. The polymerase chain reaction. A new method of using molecular genetics for medical diagnosis. *N England J Med* 1990;322:178-183.
71. Bhan MK, Arora NK, Ghai OP, Ramachandran K, Khoshoo V and Bhandari N. Major factors in diarrhoea related mortality among rural children. *Indian J Med Res* 1986;83:9-12.
72. Nataro JP, Steiner T and Guerrant RL. Enteroggregative *Escherichia coli* *Emerg Infect Dis* 1988 ;4 :251-261.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

73. Henry FJ, Udoy AS, Wanke CA and Aziz KMA. Epidemiology of persistent diarrhea and etiologic agents in Mirzapur, Bangladesh *Acta Paediatr Suppl* 1996;381:27-31.
74. Levine MM, Prado V, Robins-Browne R, Lior H, Kaper JB, Moseley SL, Gicquelais K, Nataro JP, Vial P and Tall B. Use of DNA probes and HEP-2 cell adherence assay to detect diarrheagenic *Escherichia coli* *J Infect Dis* 1988;158:224-228.
75. Tenover FC. Diagnostic deoxyribonucleic acid probes for infectious diseases. *Clin Microbiol Reviews* 1988;1: 82,83.
76. Baudry B, Savarino SJ, Vial P, Kaper JB and Levine MM. A sensitive and specific DNA probe to identify enteroaggregative *Escherichia coli* a recently discovered diarrheal pathogen *J Infect Dis* 1990;161:1249-1251
77. Schmidt H, Knop C, Franke S, Aleksic S, Heesemann J and Karch H. Development of PCR for screening of enteroaggregative *Escherichia coli* *J Clin Microbiol* 1995;33:701-705.
78. Gilligan PH. *Escherichia coli*. EAEC, EHEC, EIEC, ETEC *Clin Lab Med* 1999;19:505-521.
79. Henry JR. Diagnóstico y tratamiento clínicos. 9ª ed. España: Ediciones Científicas y Técnicas, 1993: 55-57.
80. Vila J, Vargas M, Henderson JR, Gascón J and Nataro JP. Enteroaggregative *Escherichia coli* virulence factors in traveler's diarrhea strains *J Infect Dis* 2000;182:1780-1783.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN